

文章编号: 1004 - 616X(2004)01 - 0017 - 04

三氧化二砷和全反式维甲酸联合使用诱导 NB4 细胞 C/EBP ϵ mRNA 的表达^①

谭映霞, 章圣辉, 尹丽慧, 吴建波

(温州医学院附属第一医院医科所, 浙江 温州 325000)

【摘要】背景与目的: 研究三氧化二砷 + 全反式维甲酸 (As_2O_3 + tRA) 和 As_2O_3 对 NB4 细胞凋亡和分化的影响, NB4 细胞 CD11b、Annexin V 和 C/EBP ϵ 、PML - RAR α 基因 mRNA 表达和相互调变关系。材料与方法: 取 10^6 个 NB4 细胞, 每孔中加入 As_2O_3 并同时在另外孔加入 As_2O_3 + tRA, 分别在 0、4、8、12、16、20、24、48、72 h 时取出细胞, 用流式细胞术检测细胞分化指标 CD11b 和凋亡指标 Annexin V, 半定量 RT-PCR 检测 C/EBP ϵ 和 PML - RAR α 基因的表达。结果: 72 h 内 As_2O_3 和 As_2O_3 + tRA 均能诱导 NB4 细胞 C/EBP ϵ 表达增强 4 倍, 从而进一步诱导 CD11b 的表达。 As_2O_3 + tRA CD11b 的表达增高更加明显, As_2O_3 和 As_2O_3 + tRA 两组药物均有显著的降解 PML - RAR α 基因的作用, As_2O_3 + tRA 组 PML - RAR α 融合基因降解更为明显, 凋亡发生在早期, 在 4 ~ 20 h 之内 Annexin V 表达较高, 24 h 后随时间的延长阳性率下降。结论: As_2O_3 + tRA、 As_2O_3 均能诱导 CD11b、C/EBP ϵ 表达增强, 可使 PML - RAR α 融合基因降解, 诱导 NB4 细胞凋亡。在一定剂量下 As_2O_3 + tRA 具有协同作用, 诱导 NB4 细胞分化和凋亡的能力比 As_2O_3 单独用药组更强。

【关键词】 C/EBP ϵ ; PML - RAR α 基因; 早幼粒细胞白血病; 三氧化二砷; 维甲酸

中图分类号: R329.25

文献标识码: A

C/EBP ϵ mRNA Expression Profile Induced by Arsenic Trioxide Combined with all-trans Retinoic acid in NB4 Cells

TAN Ying-xia, ZHANG Sheng-hui, YIN Li-hui, *et al*

(Institute of Med-science, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study the effect of As_2O_3 + tRA and As_2O_3 on apoptosis and differentiation of NB4 cells to evaluate the possible relation of these expressions among CD11b, Annexin V and C/EBP ϵ , PML - RAR α mRNA. **MATERIAL AND METHODS:** As_2O_3 + tRA and As_2O_3 were added to the culture system to induce NB4 cells apoptosis and differentiation. NB4 cells were incubated and collected at 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 and 72 hours, The expression of CD11b, Annexin V were determined by FACS, We used semi-quantitative RT-PCR to detect mRNA expressions of C/EBP ϵ , PML/RAR α . **RESULTS:** The mRNA expression of C/EBP ϵ were markedly increased after NB4 cells stimulated by As_2O_3 + tRA and As_2O_3 within 0 to 72 hours, it leads to NB4 cells CD11b expression increased. The CD11b expression was more significant increased by As_2O_3 + tRA. As_2O_3 + tRA and As_2O_3 had the same role to degrade PML - RAR α fuse gene, As_2O_3 + tRA was more powerful in degrading PML - RAR α fuse gene. Apoptosis was started in the early time after NB4 cells cultured with As_2O_3 + tRA and As_2O_3 , The expression of Annexin V peak was occurred from 4 to 20 hours, With time prolong the expression of Annexin V decreased. **CONCLUSION:** As_2O_3 + tRA and As_2O_3 could stimulate NB4 cells expression

① 收稿日期: 2003 - 08 - 22; 修订日期: 2003 - 09 - 16

作者简介: 谭映霞 (1971 -), 女, 重庆市人, 讲师, 研究方向: 血液分子生物学。

Tel: 0577 - 86533981; E-Mail: yingxiatan@hotmail.com

CD11b, C/EBP ϵ and decrease PML-RAR α fuse gene, leded to NB4 cells apoptosis. In some given dose the effect of As₂O₃ + tRA was more significant to induce NB4 cells apoptosis and differentiation than that of As₂O₃.

【KEY WORDS】arsenic trioxide; retinoic acid; C/EBP ϵ ; acute promyelocytic leukemia; PML-RAR α

急性早幼粒细胞白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia, APL)是一种特殊的急性白血病,90%左右的APL患者具有t(15; 17)易位,使得15号染色体上的PML基因和17号染色体上的RAR α 融合形成PML-RAR α 融合基因,该融合基因是形成早幼粒细胞白血病的关键因素。C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein)基因家族的重要成员C/EBP ϵ ,是调控粒细胞和单核巨噬细胞分化成熟的关键基因,细胞越成熟,C/EBP ϵ 表达越强。PML-RAR α 融合基因可抑制C/EBP ϵ 的表达^[1]。为了进一步研究低浓度As₂O₃和As₂O₃ + tRA诱导NB4细胞分化和凋亡的机制,我们用低浓度的As₂O₃和As₂O₃ + tRA分别诱导PML-RAR α 阳性的NB4细胞,用流式细胞仪检测CD11b、Annexin V,用RT-PCR检测C/EBP ϵ 和PML-RAR α ,探讨低浓度的As₂O₃对NB4的作用机制和As₂O₃ + tRA对NB4细胞的分化和凋亡是否具有协同作用。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂 RPMI1640、Trizol、随机引物和M-MLV (Invitrogen公司产品),引物设计用primer 5软件,由Invitrogen公司合成,胎牛血清(天津正江),As₂O₃、tRA (Sigma公司产品),Taq酶 (Promega公司产品),CD11b (B-D公司产品),膜联蛋白V (Annexin V) (Caltag公司产品),NB4细胞株由上海市血液病研究所沈树红博士惠赠。

1.2 细胞培养 在含10%胎牛血清的RPMI1640培养液调整每孔培养皿NB4细胞数量为2 × 10⁶,并在每孔中加入1 × 10⁻⁶mol/L As₂O₃和在另外相应的孔加入1 × 10⁻⁶mol/L As₂O₃的同时加入浓度为1 × 10⁻⁷ mol/L tRA,并设阴性对照孔,37℃、5% CO₂条件下培养。并

分别在0、4、8、12、16、20、24、48、72 h时取出细胞,用流式细胞术检测CD11b和Annexin V。Trizol提取总RNA,RT-PCR检测C/EBP ϵ 和PML-RAR α 基因的表达,实验在同样的条件下重复3次,所有的结果均取3次实验的均值。

1.3 流式细胞检测NB4细胞

1.3.1 细胞凋亡Annexin V的分析 收集1 × 10⁶细胞,PBS洗1遍,按试剂盒检测说明书操作,最后上流式细胞仪检测分析。

1.3.2 粒系分化的细胞表面特异抗原CD11b检测

收集细胞,调整细胞密度为2.5 × 10⁶/mL。取两份细胞悬液各200 μ l,加入10 μ l的FITC偶联的CD11b抗体,用IgG₁作阴性对照,轻微混匀后室温20 min,再加300 μ l PBS溶液,流式细胞仪检测。

1.4 半定量RT-PCR检测C/EBP ϵ 、PML-RAR α 的表达 逆转录:反应体系40 μ l,随机引物500 ng, M-MLV 400 U,总RNA 5 μ g。反应条件为含RNA的反应体系,65℃变性5 min,加入MMLV后37℃1 h,70℃10 min。

PCR反应体系25 μ l,含cDNA模板2.5 μ l,10 × buffer 2.5 μ l,2.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l,4 × dNTPs 2.0 μ l,引物为20 pmol/L,Taq DNA聚合酶1 U,C/EBP ϵ 同时每管内加入10 pmol/L β -actin引物作为内参照,PML-RAR α 和RAR α (内参照)基因的引物各20 pmol/L,共扩增30个循环。PCR引物序列和反应条件及产物长度见表1。1.5%琼脂糖凝胶电泳后用Pharmacia凝胶成像仪观察,并用imageMaster分析软件分析条带峰面积,计算C/EBP ϵ / β -actin、PML-RAR α /RAR α (内参照)峰面积比值。

表 1. PCR引物序列、退火温度和产物长度
Table 1. The primer sequence, annealing temperature, product length of PCR

Gene	Primer	Annealing temperature	Product length
C/EBP ϵ	5' - GGG ACA TGT GTG AGC ATG AG - 3'	58 °C	350 bp
	5' - CAC TTG GTA CTG CAG GGG AT - 3'		
homo β -actin	5' - GAC TAC CTC ATG AAG ATC - 3'	58 °C	500 bp
	5' - GAT CCA CAT CTG CTG GAA - 3'		
PML-RAR α	5' - GTC ATA GGA AGT GAG GTG TTC - 3'	58 °C	220 bp
	5' - CTC ACA GGC GCT GAC CCC AT - 3'		
RAR α	5' - GCC TCC CTA GCT CTT CTT CT - 3'	56 °C	200 bp
	5' - AAA GCA AGG CTT GTA GAT GC - 3'		

2 结果

2.1 流式细胞仪检测 As_2O_3 + tRA 和 As_2O_3 诱导 NB4 细胞表达 CD11b 和 Annexin V 从表 2 中可以看出, 在 1×10^{-6} mol/L As_2O_3 作用下, 在 72 h 内, CD11b 的表达增高不明显, 仅从 2.03 % 上升到 7.27 %, 增高 3.09 倍。而 As_2O_3 + tRA 组中可以看出, CD11b 的表达较 As_2O_3 单独作用组明显增高, 而且随着时间的延长表达逐渐增强, 从 2.03 % 上升到 66.41 %, 上升达到 33.2 倍, 上升的幅度与 As_2O_3 单独作用组比较更加

表 2. 不同时间段 NB4 细胞 CD11b、Annexin V 的表达

Table 2. The ratio of expression of CD11b, Annexin V in NB4 cells after stimulated by As_2O_3 + tRA and As_2O_3

hours		0	4	8	12	16	20	24	48	72
CD11b	As_2O_3	2.03	2.84	3.02	3.25	3.59	3.80	4.03	6.88	7.27
	As_2O_3 + tRA	2.03	2.49	4.66	7.04	8.51	17.58	39.84	60.51	66.41
Annexin V	As_2O_3	1.05	5.73	5.85	6.54	5.69	4.82	3.99	1.99	1.52
	As_2O_3 + tRA	1.05	13.52	15.63	13.08	12.31	10.45	4.16	3.18	2.87

表 3 中可以看出, 1×10^{-6} mol/L As_2O_3 和 1×10^{-6} mol/L As_2O_3 加 1×10^{-7} mol/L tRA 均可诱导 NB4 细胞 C/EBP ϵ 基因的表达增强, 随着时间延长表达逐渐增加, 24 h 是增加到 2 倍以上, 48 h 时增加到 3 倍左右, 72 h 内基因的表达可增强 4 倍, 两组药物作用后 C/EBP ϵ 基因表达的增加幅度差别不大。而对于 PML - RAR α 融合基因来说, 两组药物均有降解该基因的作用, 从表中可以得知, As_2O_3 单独作用组 PML - RAR α 融合基因与内对照 RAR α 基因的比值随着药物作用时间的延长而逐渐下降, 比值从 1.001 到 72 h

显著。用 Annexin V 监测细胞凋亡时, 我们发现两组细胞的凋亡率增高, 而且凋亡均发生在 24 h 内, 随着细胞培养时间的延长 Annexin V 阳性率逐渐下降, 在 4 到 20 h 之间 Annexin V 的表达较高。 As_2O_3 + tRA 组的阳性率较 As_2O_3 单独作用要高, As_2O_3 + tRA 组 Annexin V 的表达最高为 15.63 %, 而 As_2O_3 单独作用组 Annexin V 的表达最高仅为 6.54 %。

2.2 半定量 RT - PCR 检测 As_2O_3 + tRA 和 As_2O_3 诱导 NB4 细胞后 C/EBP ϵ 、PML - RAR α 表达变化 从

时降低到 0.47, 比值下降了 0.531, 即下降了 53.1%。说明三氧化二砷对 NB4 细胞 PML - RAR α 融合基因有明显的降解作用。 As_2O_3 + tRA 联合用药组, PML - RAR α 融合基因的降解比 As_2O_3 单独作用组更为明显, 比值从 1.001 到 72 h 时仅为 0.160, 比值下降了 0.841, 即下降了 84.01%, 比 As_2O_3 单独作用组下降的幅度高 31.0 %。

3 讨论

造血细胞的分化、增殖和存活依赖许多调控转录

表 3. 不同时间段 NB4 细胞 C/EBP ϵ (C/EBP ϵ / β - actin)、PML - RAR α (PML - RAR α / RAR α) 的比值

Table 3. The ratio of (C/EBP ϵ / β - actin), PML - RAR α (PML - RAR α / RAR α) mRNA in NB4 cells after stimulated by As_2O_3 + tRA and As_2O_3

hours		0	4	8	12	16	20	24	48	72
C/EBP ϵ	As_2O_3	1.016	1.186	1.241	1.331	1.672	1.945	2.352	3.475	4.333
	As_2O_3 + tRA	1.016	2.342	1.403	1.424	1.683	2.152	2.565	3.493	4.236
PML - RAR α	As_2O_3	1.001	0.839	0.752	0.728	0.682	0.627	0.575	0.487	0.470
	As_2O_3 + tRA	1.001	0.801	0.764	0.067	0.523	0.413	0.299	0.202	0.160

因子的共同作用。在正常粒细胞的分化和成熟的过程中, C/EBP 家族是一类关键的调控基因, C/EBP ϵ 表达在较为成熟的粒细胞中比较高。在 C/EBP ϵ 基因敲除小鼠中, 出现明显的粒细胞成熟障碍, 而且 G - CSF 等细胞因子的表达低下, 小鼠出生后不久多数因感染而死亡。在先天性中性粒细胞缺乏症的病人中 C/EBP ϵ 基因的表达量极低。上调 C/EBP ϵ 基因的表达, 可抑制白血病细胞的生长和诱导分化^[1-3]。 As_2O_3 和 RA 均为治疗 t(15; 17) 易位的 APL 的有效药物, RA 靶作用位点是通过 PML 和 RAR α 位点降解 PML - RAR α 融合蛋白而诱导白血病细胞分化成熟, As_2O_3

靶作用位点是通过 PML 位点降解 PML - RAR α 融合蛋白诱导白血病细胞凋亡为主, 小剂量的三氧化二砷也可诱导白血病细胞分化成熟^[4-6]。

5×10^{-7} mol/L 的 RA 作用于 NB4 细胞, 12 h 可使 C/EBP ϵ 的表达增强 3 倍。 5×10^{-7} mol/L 的 tRA 在 24 h 时诱导 NB4 细胞 C/EBP ϵ 的表达增强 5 倍, 故 RA 具有较强的诱导 C/EBP ϵ 基因表达的能力^[7]。在我们的研究中发现, 在未加药物之前, NB4 细胞 CD11b 表达极低, 仅为 2.03 %。C/EBP ϵ 的表达也较弱, 而相比之下, PML - RAR α 融合基因的表达却处在一个较高的水平。实验表明 As_2O_3 和 As_2O_3 + tRA 均能

诱导 NB4 细胞 C/EBP ϵ 表达增强, 从而进一步诱导 CD11b 的表达。As₂O₃ 单独用药时虽然可使细胞分化成熟的基因 C/EBP ϵ 表达增强, 但细胞 CD11b 表达增强却并不明显。加入低浓度的维甲酸后虽然 C/EBP ϵ 基因的表达增幅与前者相差不大, 但 CD11b 的表达在 24 h 内可增强 20 倍左右, 72 h 内可增强 30 倍左右。这可能是由于 As₂O₃ 虽然有诱导 NB4 细胞部分分化的作用, 但诱导 NB4 细胞的分化能力不强, 加入低浓度的维甲酸以后, 强烈激活了粒细胞的分化成熟基因 C/EBP ϵ , 使白血病细胞分化能力大大加强。在诱导细胞凋亡方面, 在我们的实验条件和药物浓度下, 凋亡发生在早期, 在 4 到 20 h 之内 Annexin V 表达较高, 24 h 后开始下降, 阳性率呈逐渐下降趋势, 而且 Annexin V 的阳性率在 20% 以下, 说明在该浓度下 As₂O₃、tRA 诱导细胞凋亡的能力不强。在降解 PML-RAR α 融合基因的方面, As₂O₃ 和 As₂O₃ + tRA 两组药物均有显著的降解该基因的作用, 联合用药组 PML-RAR α 融合基因降解更为明显, 这也更进一步说明一定浓度的维甲酸和三氧化二砷具有协同作用, 二者联合用药可使得早幼粒白血病细胞 PML-RAR α 融合基因降解更加明显, 诱导白血病细胞分化的能力更强。PML-RAR α 融合基因的产物可以封闭或干扰关键的髓系细胞分化基因的转录, 在我们的研究中也说明了此观点, 在用药的早期, PML-RAR α 融合基因的表达较强, 随着 PML-RAR α 表达的减弱, 而诱导细胞分化的基因 C/EBP ϵ 基因呈逐渐上升, 二者呈反相关关系。Yongkui jing 等^[8]报道, 0.1 ~ 1 μ mol/L As₂O₃ 在标准的培养条件下 6 d 可诱导 20% ~ 30% 的 APL 细胞分化, 0.5 μ mol/L As₂O₃ 的不诱导维甲酸拮抗的 NB4 细胞分化和凋亡, 若加入 0.1 ~ 10 nmol/L 的维甲酸, 具有增强 NB4 细胞的分化能力, 若维甲酸的浓度上升到 0.1 ~ 1 μ mol/L 则表现为抑制 NB4 细胞的分化, 但均能促进降解 PML-RAR α 融合基因。由此可见, 维甲酸和三氧化二砷诱导 NB4 细胞的分化和凋亡是否具有协同作用, 除了取决于药物的浓度外, 还要取决于白血病细胞对药物的敏感性。Eduardo M Rego 等^[9]报道, As₂O₃、RA、As₂O₃ + tRA 均可延长 PML-RAR α 转基因小鼠和注入 PML-RAR α 阳性白血病细胞裸鼠的生命, 但与单独用药组比较, As₂O₃ + tRA 组小鼠存活时间更

长。无论在体内或体外实验中, As₂O₃ + tRA 诱导细胞分化和凋亡的能力均强于 As₂O₃ 和 RA 单独用药组。由此可见, 如何上调 APL 细胞 C/EBP ϵ 基因和下调 PML-RAR α 融合基因的表达, 是提高 APL 疗效的关键因素之一。As₂O₃ 和 RA 联合用药也许能为治疗 APL 提供一个新的方案。

参考文献:

- [1] Truong BT, Lee YJ, Lodie TA, *et al.* CCAAT/ Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2003, 101(3): 1 141 - 1 148.
- [2] Roberta AM, Dorothy JP, Alexey MC, *et al.* Novel myeloid transcription factor, C/EBP ϵ , is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation [J]. *Blood* 1997, 90(7): 2 591 - 2 600.
- [3] Sigal T, Peter TV, Dorothy JP, *et al.* Macrophage functional maturation and cytokine production and impaired in C/EBP ϵ , deficient mice [J]. *Blood*, 2002, 99(8): 1 794 - 1 801.
- [4] Ting XL, Ji WZ, Jiong T, *et al.* Gene expression networks underlying retinoic acid - induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells [J] *Blood*, 2000, 96: 1 496 - 1 504.
- [5] Maurizio G, Marcel HM, Koken MK, *et al.* combined arsenic and retinoic acid treatment enhances differentiation and apoptosis in arsenic - resistant NB4 Cells [J]. *Blood*, 1998, 91: 4 300 - 4 310.
- [6] 魏亚明, 欧剑峰, 欧英贤, 等. 三氧化二砷对白血病细胞凋亡和分化的双相诱导作用 [J]. 西北国防医学杂志, 2002, 23(5): 324 - 326.
- [7] Doris YC, Alexey MC, Dorothy JP, *et al.* Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid - selective CCAAT/ enhancer binding protein binding protein gene (C/EBP ϵ) [J]. *Blood*, 1997, 90(8): 2 987 - 2 994.
- [8] Yongkui Jing, Long Wang, Lijuan Xia, *et al.* Combined effect of all - trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2001, 97: 264 - 269.
- [9] Eduino MR, Li ZH, Raymond PW, *et al.* Retinoic acid (RA) and As₂O₃ treatment in transgenic models of acute promyelocytic leukemia (APL) unravel the distinct nature of the leukemogenic process induced by the PML - RAR α and PLZF - RAR α oncoprotein [J]. *PNAS*, 2000, 97(18): 10 173 - 10 178.