

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.012

· 基础研究 ·

## Foxp3 在成神经细胞瘤细胞株 SK-N-SH 中的表达及其对化疗的敏感性

孙婧, 李良, 肖燕, 唐锁勤(解放军总医院第一附属医院 儿科, 北京 100037)

[摘要] 目的: 研究成神经细胞瘤细胞株 SK-N-SH 中 Foxp3 的表达及其对化疗药物环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)和吡柔比星(pirarubicin, THP)的敏感性。方法: 体外培养 SK-N-SH 细胞, 流式细胞术检测 Foxp3 在 SK-N-SH 细胞中的表达。MTT 法检测化疗药物 CTX、THP 对 SK-N-SH 细胞的敏感剂量; 流式细胞术及 real-time PCR 检测 CTX、THP 对 SK-N-SH 细胞中 Foxp3 表达的影响。结果: 流式细胞术检测结果显示, SK-N-SH 细胞高表达 Foxp3 分子。CTX 作用于 SK-N-SH 细胞的敏感剂量为 6 mmol/L, THP 作用于 SK-N-SH 细胞的敏感剂量为 80 ng/ml。6 mmol/L CTX 或 80 ng/ml THP 以及两者的联合不能抑制 SK-N-SH 细胞中 Foxp3 的表达 ( $P > 0.05$ ); real-time PCR 结果也证实, CTX 或 THP 以及两者的联合不能抑制 SK-N-SH 细胞中 Foxp3 mRNA 的表达。结论: 成神经细胞瘤细胞株 SK-N-SH 高表达 Foxp3 蛋白, 但其表达对化疗药物 CTX 和 THP 不敏感。

[关键词] Foxp3; 成神经细胞瘤; SK-N-SH 细胞; 环磷酰胺; 吡柔比星

[文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)02-0179-04

## Foxp3 expression in neuroblastoma cell line SK-N-SH and its sensitivity to chemotherapy

SUN Jing, LI Liang, XIAO Yan, TANG Suo-qin (Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate Foxp3 expression in neuroblastoma cell line SK-N-SH and its chemosensitivity to cyclophosphamide (CTX) and pirarubicin (THP). **Methods:** SK-N-SH cells were cultured *in vitro*, and Foxp3 expression in SK-N-SH cells was examined by flow cytometry (FCM). The sensitive dosages of CTX and THP on SK-N-SH cells were determined by MTT assay. The effects of CTX or THP on Foxp3 expressions in SK-N-SH cells were examined by FCM and real-time PCR. **Results:** FCM results showed that SH-N-SK cells expressed high level of Foxp3. The sensitive dosage of CTX on SK-N-SH cells was 6 mmol/L, and that of THP was 80 ng/ml. CTX (6 mmol/L), THP (80 ng/ml) alone or in combination could not inhibit the expression of Foxp3 in SK-N-SH cells ( $P > 0.05$ ). Real-time PCR data also showed that CTX, THP alone or in combination could not down-regulate the expression of Foxp3 in SK-N-SH cells at mRNA level ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Neuroblastoma SK-N-SH cells can express high level of Foxp3, but Foxp3 shows no chemosensitivity to CTX and THP.

[Key words] Foxp3; neuroblastoma; SK-N-SH cell; cyclophosphamide (CTX); pirarubicin (THP)

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 179-182]

Foxp3 是一种发现于 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞内的转录因子, 是叉头样/翼状螺旋 (forkhead/winged-helix) 转录因子家族的成员。Foxp3 转录因子的活性主要在于抑制 T 细胞免疫反应, 诱导免疫耐受<sup>[1-2]</sup>。Foxp3 表达过高则容易出现免疫抑制状态, 导致感染扩散乃至肿瘤的发生<sup>[3-5]</sup>。以往大多数关于 Foxp3 的研究主要集中在其与自身免疫性疾病的关系上。近来研究<sup>[6-9]</sup>发现, Foxp3 也表达于多种肿瘤细胞内, 如乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞、胰腺癌细胞等。由于 Foxp3 与免疫抑制的关系, 肿瘤细胞表

达的 Foxp3 是否通过抑制机体的免疫反应参与肿瘤的免疫逃逸过程, 以及能否根据这一机制探讨新的

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No. 2007AA021004)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA021004)

[作者简介] 孙婧(1975 -), 女, 山东省海阳市人, 硕士, 主要从事儿科肿瘤免疫逃避机制研究。E-mail: sunjing304@163.com

[通信作者] 唐锁勤(TANG Suo-qin, corresponding author), E-mail: suoqin@yahoo.com

肿瘤防治策略是人们关注的课题。

成神经细胞瘤是最常见的外周神经系统恶性肿瘤,恶性程度高,易复发。成神经细胞瘤的发生、发展是否涉及免疫逃逸机制目前尚不清楚。为了深入认识成神经细胞瘤细胞的生物学行为,本研究以成神经细胞瘤 SK-N-SH 细胞为研究对象,用流式细胞术(FCM)、real-time PCR 等方法检测了 Fopx3 在 SK-N-SH 细胞上的表达,分析了化疗药物环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)、吡柔比星(pirarubicin, THP)对成神经细胞瘤细胞株 SK-N-SH 内 Fopx3 表达的影响,探讨 Fopx3 在成神经细胞瘤细胞中的表达规律,为深入认识成神经细胞瘤的发生机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

成神经细胞瘤细胞株 SK-N-SH 由美国洛杉矶儿童医院 Siegel 教授惠赠。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。实验时细胞处于对数生长期,锥虫蓝拒染率为 95% 以上。

### 1.2 试剂和仪器

注射用环磷酰胺(CTX,山西普德药业公司,国药准字 H14023686),0.2 g/瓶,用生理盐水稀释成 0.1 mol/L,4 °C 冰箱保存,分装待用。注射用盐酸吡柔比星(THP,深圳万乐药业有限公司,国药准字 H10930105),10 mg/瓶,加生理盐水稀释成 2 mg/ml,4 °C 冰箱保存,分装待用。Fopx3 抗体(Clone:FJK-16s)及 Fopx3 细胞内染色试剂盒购自 eBioscience 公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自北京元亨金马生物技术有限公司。PCR 试剂盒、RNA 反转录试剂盒、real-time PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司。酶联检测仪购自 Bio-Rad 公司,流式细胞仪购自 BD 公司,real-time PCR 分析仪购自 Bio-Rad 公司。

### 1.3 MTT 法检测 SK-N-SH 细胞对化疗药物的敏感性

MTT 法检测化疗药物 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 增殖的影响。接种  $1 \times 10^4$  个 SK-N-SH 细胞于 96 孔板中,100  $\mu$ l/孔。CTX 浓度自 0.03 mol/L 起倍比稀释,THP 浓度自 0.67  $\mu$ g/ml 起 10 倍稀释,共设 5~6 浓度梯度,每组设 3 个复孔,与细胞共培养 1 d 后进行 MTT 检测。每孔加入 10  $\mu$ l MTT(5 mg/L)溶液,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 100  $\mu$ l(0.01 mol/L HCl + 10% SDS),培养过夜。以全自动酶标

仪在 570 nm 波长下检测各孔光密度值(D),以药物浓度为横轴,以 D 值为纵轴绘制量-效应曲线。

### 1.4 流式细胞术检测 SK-N-SH 细胞内 Fopx3 的表达

收集 SK-N-SH 细胞,按说明书配制细胞穿孔液,每管加细胞穿孔液 500  $\mu$ l,4 °C 孵育过夜。每管加入 1 ml PBS 洗涤 1 次后,每管再加入 1 ml 穿孔液,洗涤 1 次,弃上清;震荡重悬细胞后,加入 1  $\mu$ l 的 Fopx3 抗体,避光冰浴 30 min。每管加入 1 ml 穿孔液,洗涤 1 次,弃上清,震荡重悬细胞沉淀,加入 300~400  $\mu$ l 多聚甲醛溶液固定,然后用流式细胞仪进行检测。

### 1.5 Real-time PCR 检测 Fopx3 mRNA 在 SK-N-SH 细胞中的表达

常规方法提取 SK-N-SH 细胞的 RNA,取 1  $\mu$ l cDNA 作为模板,利用 real-time PCR 试剂盒扩增目的基因片段。人 Fopx3 特异性引物序列如下:Fopx3 上游引物为 5'-GTTCACACGCATGTTTCCTTC-3',Fopx3 下游引物为 5'-GCACAAAGCACTTGTG-CAGACTC-3'。人 GAPDH 上游引物为 5'-AATG-GAAATCCCATCACCATCT-3',GAPDH 下游引物为 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'。计算 Fopx3 基因表达的相对变化。

### 1.6 统计方法

计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 软件进行  $\chi^2$  检验、t 检验及方差分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Fopx3 蛋白在 SK-N-SH 细胞中的表达

为了探讨成神经细胞瘤细胞 SK-N-SH 是否表达 Fopx3 蛋白,采用细胞内染色的方法检测了 SK-N-SH 细胞中 Fopx3 的表达。结果表明,SK-N-SH 细胞内高表达 Fopx3 蛋白(图 1)。

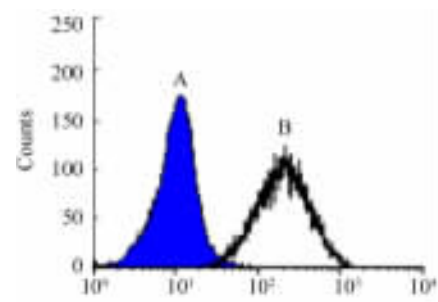


图 1 Fopx3 蛋白在 SK-N-SH 中细胞的表达

Fig. 1 Expression of Fopx3 protein in SK-N-SH cells

A: Isotype control; B: Fopx3

2.2 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 细胞的敏感作用剂量

为探讨 CTX、THP 化疗药物是否可影响 SK-N-SH 细胞内 Foxp3 的表达,先测定了 CTX、THP 对 SK-N-SH 细胞的敏感作用剂量。MTT 法检测结果(图 2)表明,SK-N-SH 细胞对 CTX 的敏感剂量区间是:4 mmol/L ~ 15 mmol/L;因此,CTX 作用于 SK-N-SH 细胞的后续实验中采用 6 mmol/L。SK-N-SH 细胞对 THP 的敏感剂量区间是:6.7 ~ 670 ng/ml;因此,后续实验中 THP 作用于 SK-N-SH 细胞的剂量采用 80 ng/ml。

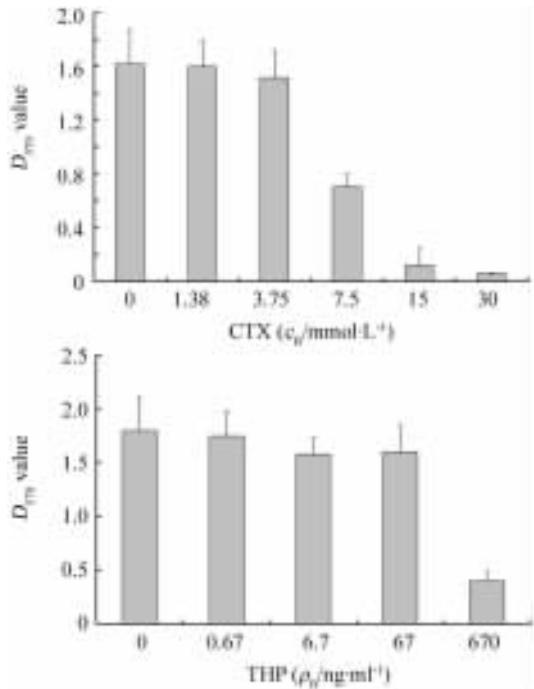


图 2 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 细胞的杀伤

Fig. 2 Cytotoxicity of CTX and THP against SK-N-SH cells

2.3 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 细胞 Foxp3 表达的影响

前期研究结果标明,成神经细胞瘤细胞株 LA-N-6 所表达的 Foxp3 分子能被化疗药物抑制<sup>[10]</sup>。为了探讨 SK-N-SH 细胞 Foxp3 分子的表达是否也受化疗药物的影响,本研究用细胞内染色的方法检测了 SK-N-SH 胞内 Foxp3 的表达及其对化疗药物 CTX、THP 的敏感性。结果(图 3)表明,在化疗药物 CTX、THP 存在的情况下,SK-N-SH 细胞内 Foxp3 表达水平未出现显著变化 ( $P > 0.05$ )。

2.4 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 细胞中 Foxp3 mRNA 表达的影响

Real-time PCR 检测 CTX、THP 两种药物是否能在 mRNA 水平影响 SK-N-SH 细胞中 Foxp3 的表达,结果如图 4 所示,CTX 和 THP 不能在 mRNA 水平影响 SK-N-SH 细胞内 Foxp3 的表达。

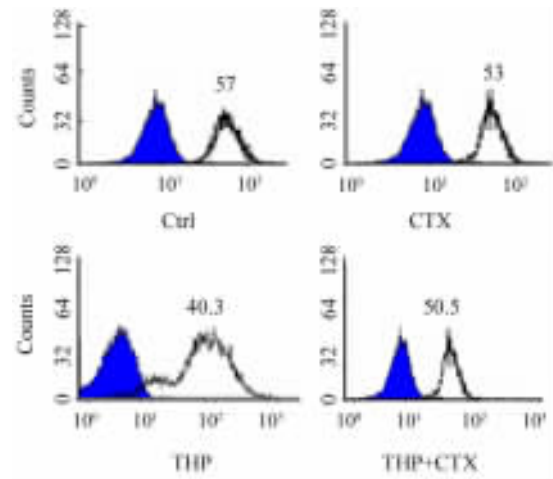


图 3 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 细胞内 Foxp3 表达的影响

Fig. 3 Effects of CTX and THP on Foxp3 expression in SK-N-SH cells

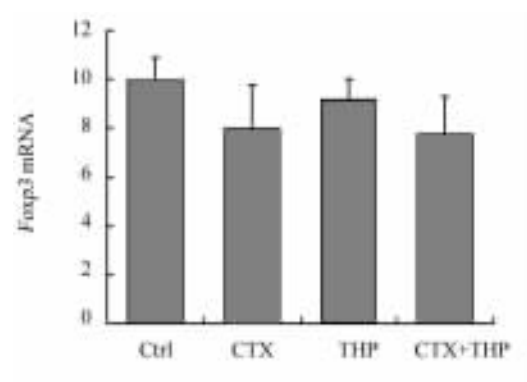


图 4 CTX 和 THP 对 SK-N-SH 细胞中 Foxp3 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of CTX and THP on Foxp3 mRNA expression in SK-N-SH cells

3 讨论

肿瘤的发生、发展机制复杂。免疫系统对突变细胞监视功能的异常,或肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击是肿瘤发生、发展的机制之一。Foxp3 是目前比较明确的能抑制 T 细胞免疫功能的转录因子。研究<sup>[11-13]</sup>表明,Foxp3 表达降低,对 CD4<sup>+</sup>T 效应细胞的抑制功能减弱,可导致自身免疫病的发生。因此,Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞可用于防治自身免疫病<sup>[14]</sup>。近来有较多的报道<sup>[4,15]</sup>显示,肿瘤细胞也高表达 Foxp3。鉴于 Foxp3 在免疫抑制中的作用,Foxp3 在肿瘤细胞中的作用及其与肿瘤免疫逃避的关系是肿瘤研究工作者普遍关注的课题。

Foxp3 可通过结合到 DNA 上,调节靶基因的表

达。Hori 等<sup>[2]</sup>研究表明, 转染 Foxp3 后的初始 T 细胞, 其 IL-2、IL-4 和 IFN- $\gamma$  的表达被抑制。早在 2001 年, 就有学者<sup>[15]</sup>发现, Foxp3 的 DNA 结合位点是 IL-2 增强子附近的 NFAT( nuclear factor of activated T cell ), Foxp3 可通过结合 NFAT 来抑制 IL-2 增强子的活性, 从而抑制 IL-2 的产生。

近来有研究<sup>[16]</sup>表明, Foxp3<sup>+</sup> T 细胞可通过诱导 DCs 细胞死亡发挥免疫抑制作用。同时有研究<sup>[17]</sup>显示, 肿瘤细胞局部 CD8<sup>+</sup> T 细胞/Foxp3<sup>+</sup> T 细胞的比例与肿瘤的预后相关。虽然 Foxp3 在肿瘤局部的作用机制还有待深入研究, 但其免疫抑制功能是无容置疑的<sup>[18]</sup>。因此, 在由于自身免疫反应增强而导致的自身免疫病或移植排斥中, 人们千方百计地探索增强 Foxp3 表达的方法。而另一方面, 由于近来发现一些肿瘤细胞也表达 Foxp3, Foxp3 分子在肿瘤发生、发展中的作用机制如何, Foxp3 如何通过抑制免疫细胞促进肿瘤的生长, 成为人们普遍关注的课题。

成神经细胞瘤是儿童最常见的恶性实体瘤之一, 预后较差。本研究所前期的研究中发现, 成神经细胞瘤 LA-N-6 细胞表达 Foxp3, 且 LA-N-6 细胞对化疗药物 CTX 和 THP 较敏感。为了探讨不同来源的成神经细胞瘤 SK-N-SH 细胞是否也表达 Foxp3, 以及 Foxp3 的表达是否也受化疗药物的影响, 本研究检测了 Foxp3 分子在 SK-N-SH 细胞上的表达。结果发现, SK-N-SH 细胞也高表达 Foxp3 分子。但在接下来的研究中发现, 虽然同为高表达 Foxp3 的肿瘤细胞, SK-N-SH 中 Foxp3 的表达不受化疗药物 CTX 和 THP 的影响, 在蛋白及 mRNA 水平的检测均证实了这一现象。因此, 不同来源的成神经细胞瘤细胞其生物学特性不同。本研究进一步明确了肿瘤免疫逃避的不同机制, 为肿瘤治疗需遵循个性化原则提供了实验理由。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Weigel D, Jackle H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors [ J ]. *Cell*, 1990, 63( 3 ): 455-456.
- [ 2 ] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [ J ]. *Science*, 2003, 299( 5609 ): 1057-1061.
- [ 3 ] de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, *et al.* CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis [ J ]. *J Immunol*, 2004, 172( 10 ): 6435-6443.
- [ 4 ] Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R,

Suzumiya J, *et al.* Expression of Foxp3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells [ J ]. *Br J Haematol*, 2004, 126( 1 ): 81-84.

- [ 5 ] Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, *et al.* Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101( 12 ): 4228-4233.
- [ 6 ] Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N, *et al.* The regulatory T cell-associated transcription factor Foxp3 is expressed by tumor cells [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 8 ): 3001-3009.
- [ 7 ] Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, *et al.* Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 17 ): 8344-8350.
- [ 8 ] Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochoy G, Dubertret L, *et al.* Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173( 2 ): 1444-1453.
- [ 9 ] 黄 焰, 张瑰红, 吴正升, 王红群, 丁向东, 张 晴, 等. Foxp3 在乳腺癌中的表达及临床意义 [ J ]. *临床与实验病理学杂志*, 2009, 25( 1 ): 19-23.
- [ 10 ] 孙 婧, 李 良, 肖 燕, 余素明, 唐锁勤. Foxp3 在成神经细胞瘤 LA-N-6 细胞的表达及化疗药物对其影响 [ J ]. *当代儿科杂志*, 2010, 12( 5 ): 386-389( 印刷中 ).
- [ 11 ] Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune arthritis [ J ]. *Immunol Rev*, 2010, 233( 1 ): 97-111.
- [ 12 ] Wheeler KM, Samy ET, Tung KS. Normal regional lymph node enrichment of antigen-specific regulatory T cells with autoimmune disease-suppressive capacity [ J ]. *J Immunol*, 2009, 183( 12 ): 7635-7658.
- [ 13 ] Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, *et al.* CD39<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis [ J ]. *J Immunol*, 2009, 183( 11 ): 7602-7610.
- [ 14 ] Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21( 6 ): 612-618.
- [ 15 ] Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin( Foxp3 ) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation [ J ]. *J Biol Chem*, 276 ( 2001 ): 37672-37679.
- [ 16 ] Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Valet F, Kissenpennig A, Sparwasser T, *et al.* Foxp3<sup>+</sup> T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes [ J ]. *Immunity*, 2010, 32( 2 ): 266-278.
- [ 17 ] Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J, Yamasaki A, Kitaura Y, *et al.* Intratumoral CD8( + ) T/Foxp3 ( + ) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59( 5 ): 653-661.
- [ 18 ] Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, Kondoh E, Baba T, Fujii S, Marks JR, *et al.* Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory cells ( Treg ) are associated with a metastatic phenotype [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116( 3 ): 556-562.

[ 收稿日期 ] 2009 - 12 - 30

[ 修回日期 ] 2010 - 03 - 18

[ 本文编辑 ] 徐红梅