

nm23- H1 过表达对人白血病细胞系 HL60 细胞周期和分化的影响

袁茵^{1,2}, 鲁欣³, 张美英¹, 黄树林², 王一飞¹

Changes of Cell Cycle and Differentiation of Human Leukemia Cell Line HL60 Induced by nm23- H1 Overexpression

YUAN Yin^{1,2}, LU Xin³, ZHANG Mei-ying¹, HUANG Shu-lin², WANG Yi-fei¹

1. Ji 'nan Biomedicine Research & Development Basement, Ji 'nan University, Guangzhou 510000, China; 2. College of Life Science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University; 3. College of Life Science, South China Normal University

Corresponding Author: WANG Yi-fei, E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

Abstract Objective To investigate effects of nm23- H1 overexpression on cell cycle and differentiation of HL60 cells. **Methods** Recombinant expression vector pEGFP-N1-nm23 H1 was constructed and transfected into HL60 cells with the aid of liposome in a transient way. Expression of fusion protein nm23- H1-EGFP was detected under the fluorescence microscope. Flow cytometry was adopted to analyze cell cycle. Differentiation rate of the DMSO-induced HL60 cells was tested by NBT reduction assay. **Results** Expression level of recombinant plasmid pEGFP-N1-nm23 H1 in HL60 cells reached a peak at 48 h after transfection. Meanwhile, proportion of S-phase cells increased dramatically and HL60 cells became less sensitive to differentiation inducer DMSO. **Conclusion** Overexpression of nm23- H1 gene could stimulate proliferation but inhibit differentiation of HL60 cells. nm23- H1 gene might be a potential target of leukemia treatment.

Key words nm23- H1 gene; Leukemia; Cell cycle; Cell differentiation

摘要目的 探讨 nm23- H1 基因过表达对人早幼粒白血病细胞株 HL60 细胞周期及分化的影响。方法 构建 nm23- H1 cDNA 的真核表达载体 pEGFP-N1-nm23 H1, 脂质体介导瞬时转染 HL60 细胞; 在荧光显微镜下观察 nm23- H1-EGFP 融合蛋白的表达情况; 流式细胞术分析细胞周期变化; NBT 还原比色法检测细胞的诱导分化能力。结果 转染 48h nm23- H1-EGFP 融合蛋白在 HL60 细胞内表达量最高, 此时细胞周期处于 S 期的细胞明显增多, 对分化诱导剂 DMSO 的敏感性下降。结论 nm23- H1 基因的过表达能促进 HL60 细胞的增殖和抑制其分化。

关键词: nm23- H1 基因; 白血病; 细胞周期; 细胞分化

中图分类号: Q753; R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)03-0165-03

0 引言

白血病是一种常见的造血系统恶性肿瘤。目前, 白血病在青少年恶性肿瘤中的发病率位居第一, 在世界癌症总体发病率中位居第六, 是严重危害人类健康的恶性疾病之一。研究发现, 肿瘤转移抑制基因 nm23- H1 的表达水平与多种血液恶性肿瘤的

恶化呈正相关, 与病人的存活时间呈负相关, 其高表达可作为白血病和淋巴瘤预后不良的指标之一^[1]。本研究构建了可融合表达 nm23- H1 与报告基因绿色荧光蛋白(EGFP)的真核表达质粒, 瞬时转染人早幼粒白血病细胞 HL60, 探讨了 nm23- H1 基因过表达对 HL60 细胞周期及分化的影响, 旨在为以 nm23- H1 基因为分子靶点的白血病反义治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人早幼粒白血病细胞株 HL60, nm23- H1 基因 cDNA、真核表达质粒 pEGFP-N1, E. coli Top10 菌

收稿日期: 2006-03-08; 修回日期: 2006-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400071); 广东省工业攻关计划项目(2005A10904001)

作者单位: 1. 510000 广州暨南大学生物医药研究开发基地; 2. 广东药学院生命科学与生物制药学院; 3. 华南师范大学生命科学学院

通讯作者: 王一飞, E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

作者简介: 袁茵(1981-), 女, 硕士, 助教, 主要从事生物制药研究

株由本室保存;限制性内切酶 EcoR、Sac, T4 DNA 连接酶,高保真 DNA 聚合酶 PyrobestTM 购自 Takara 公司;NBT 粉剂为上海华舜公司产品;脂质体 lipofectamineTM 2000 购于 Invitrogen;佛波酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)为 Sigma 公司产品。

1.2 nm23-H1 真核表达质粒的构建

PCR 扩增 nm23-H1 基因 cDNA,上游引物:5'-TTA GAA TTCTGATGGCCAACTGTGAGCGT-3',下游引物:5'-ATTCCGCGGTTCA TAGATCCAGTTCTGA-3';PCR 条件为 94 变性 45s,56 退火 45s,72 延伸 1min,30 个循环。该扩增产物与 pEGFP-N1 质粒经 EcoRI 和 Sac 双酶切、连接,转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑取若干重组子行菌落 PCR、酶切和测序鉴定。大量抽提纯化正确质粒,BECKMAN DU 640 型核酸蛋白分析仪测定浓度及纯度。

1.3 细胞转染

实验分转染 pEGFP-N1-nm23 H1 组、转染 pEGFP-N1 空质粒组和未转染的对照组。将两种质粒 DNA 分别与 lipofectamineTM 2000 脂质体以 1:3 (w/w) 的比例混合,室温放置 15min 后加入对应板孔的细胞悬液中,质粒 DNA 的终浓度为 6mg/L,对照组加入等体积的无血清培养液。37 无血清培养 24h 后,每孔加入含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 100μl,使血清终体积分数为 10%,继续培养 24、48、72h。于每一时点在荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白及其融合蛋白的表达程度。

1.4 流式细胞术检测细胞周期

收集各组细胞,冷 PBS 洗涤细胞 2 次(1 200r/min,5min),取 300μl 含 10% 普通级小牛血清的 PBS 重悬细胞,震荡加入 700μl 无水乙醇,固定 30min;冷 PBS 洗涤 1 次(1 500r/min,5min),加入 400μl PI 染液,避光放置 15min 待测。

1.5 NBT 还原比色实验

参照文献^[2],略有改进。HL60 细胞以 1 × 10⁵/ml 的密度接种于 96 孔板,作用于各实验组的质粒 DNA 和 DMSO 的终浓度分别为 6mg/L 和 1.6% (v/v)。48h 后进行 NBT 还原比色测定;同时设各组的平行孔,用 MTT 法测定活细胞数。以 NBT 和相应的 MTT 吸光度的比值表示 HL60 细胞 NBT 还原能力的大小。

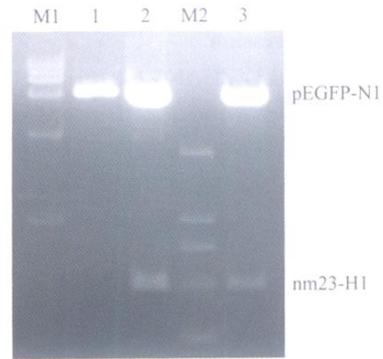
1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 真核表达质粒 pEGFP-N1-nm23 H1 的鉴定

双酶切和测序鉴定证明 pEGFP-N1-nm23 H1 质粒重组构建成功。pEGFP-N1-nm23 H1 经 EcoR 和 Sac 双酶切有 2 条电泳带约在 4.7 kb 和 459bp 处,pEGFP-N1 经 EcoR 单酶切有 1 条电泳带约在 4.7kb 处,见图 1。

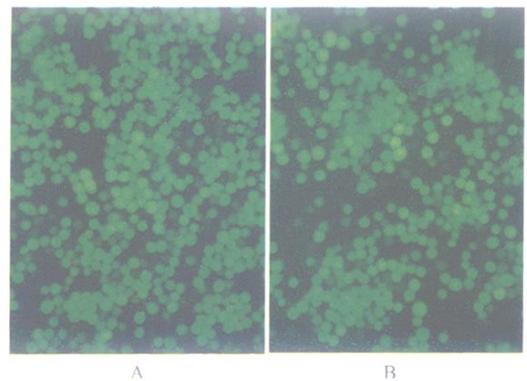


M1:DL 15000 Marker(15kb,10kb,7.5kb,5kb,2.5kb,1kb,0.25kb);M2:DL 2000 Marker(2kb,1kb,0.75kb,0.5kb,0.25kb,0.1kb);1:pEGFP-N1 digested by EcoRI;2,3:recombinant plasmid pEGFP-N1-nm23 H1 digested by EcoRI/Sac

图 1 重组质粒 pEGFP-N1-nm23 H1 酶切电泳图

2.2 质粒转染的 HL60 细胞中报告基因 EGFP 蛋白的表达

用荧光显微镜实时观察绿色荧光蛋白及其融合蛋白在 HL60 细胞中表达情况。结果显示,EGFP 蛋白及 nm23-H1-EGFP 融合蛋白在 HL60 细胞中均有表达,转染细胞在补加完全培养基后 48h 的发光率最高,即此时的蛋白表达最多,见图 2。以下均为 48h 的实验结果。

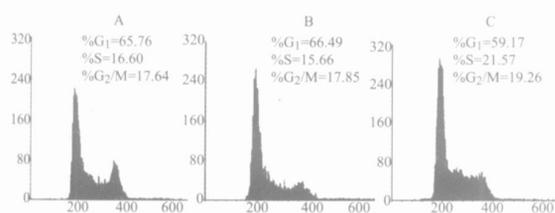


A: transfected with pEGFP-N1; B: transfected with pEGFP-N1-nm23 H1 (×200)

图 2 绿色荧光蛋白及 nm23-H1-EGFP 融合蛋白在 HL60 细胞中的表达

2.3 转染 pEGFP-N1-nm23 H1 对 HL60 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组和转空质粒组细胞相比,转染 pEGFP-N1-nm23 H1 组细胞周期发生明显变化,S 期细胞增多,见图 3。



A: control; B: transfected with pEGFP-N1; C: transfected with pEGFP-N1-nm23 H1

图 3 nm23- H1 基因过表达对 HL60 细胞周期的影响

2.4 转染 pEGFP-N1-nm23 H1 48 小时后对 HL60 细胞分化的影响

转染 pEGFP-N1-nm23 H1 48 小时后的 HL60 细胞 NBT 还原能力下降 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 48 小时后 HL60 细胞 NBT 及 MTT 还原能力测定

Group	HL60	HL60 + DMSO	HL60 + pEGFP-N1 + DMSO	HL60 + pEGFP-N1-nm23 H1 + DMSO
NBT/MTT (%)	2.8 ± 0.36	35.6 ± 2.27	36.4 ± 1.61	14.8 ± 2.85 [#]

注: [#] $P < 0.01$ vs HL60 + DMSO; $P > 0.05$ vs HL60 + DMSO

3 讨论

nm23- H1 最初是作为一种肿瘤转移抑制基因而被发现的,它在乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、肝癌和恶性黑色素瘤等癌症患者癌组织中的表达水平与癌组织的转移潜能呈负相关^[3]。nm23- H1 具有广泛的生物学功能,除参与调控肿瘤转移之外,还与细胞的增殖、分化及个体发育有关。1995 年 Okabe- Kado 从一株不分化的鼠髓性白血病细胞 M1 中分离到的一种分化抑制因子^[4]被鉴定为 nm23- H1,其高表达可抑制鼠、人白血病细胞的分化。nm23- H1 在多种血液系统恶性肿瘤患者血清和血浆中的表达水平明显高于正常血细胞,而且较高的 nm23- H1 表达水平与较高的肿瘤浸润性或恶性程度、患者的预后不良、对初始化疗的不敏感性及其总体存活率的降低呈密切的正相关性^[5, 6]。

近年来随着分子生物学、基因组学研究的进展,部分白血病的发病机制已明确,相关基因的靶向治疗有可能从根本上治愈白血病。本研究用 PCR 克隆的方法构建了真核表达质粒 pEGFP-N1-

nm23 H1。根据 pEGFP-N1 多克隆位点部位的序列以及融合构建的要求,在上游引物的 EcoRI 酶切位点与 nm23- H1 起始密码子之间设计 2 个碱基 TG,下游引物去掉终止密码子,以保证 nm23- H1 基因与其后的 EGFP 基因阅读框一致且基因内部无终止密码子。真核表达质粒 pEGFP-N1 带有 CMV 启动子,可驱动连接在其后 MCS 部位的外源基因在真核细胞中高效表达,同时具有 G418 或新霉素抗性,便于筛选稳定转染的抗性克隆。但 HL60 细胞最大的特点就是在分化诱导剂作用下的多向性分化,G418 作为筛选药物不但会降低 HL60 细胞存活率并产生毒性,还会诱导 HL60 细胞发生分化。为了排除这种干扰,我们采用脂质体瞬时转染法进行研究。转染组细胞在形态上与对照组细胞无显著差异,但增殖和分化状况大不相同。nm23- H1 基因的过表达一方面促进 HL60 细胞的增殖,另一方面使 HL60 细胞对分化诱导剂 DMSO 的敏感性下降。说明 nm23- H1 基因很可能对白血病细胞的生长和分化起关键的调控作用,提示 nm23- H1 基因有可能成为治疗白血病和淋巴瘤的新靶点^[7]。

参考文献:

- [1] Okabe-kado J, Kasukabe T, Honma Y. Expression of cell surface NM23 proteins of human leukemia cell lines of various cellular lineage and differentiation stages [J]. *Leukemia Research*, 2002, 26(6): 569-576.
- [2] 夏丽娟,景永奎,韩锐. 一种快速的癌分化诱导剂筛选方法 [J]. *中华血液学杂志*, 1994, 15(2): 99-101.
- [3] De La Rosa A, Williams R L, Steeg P S. nm23/ nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions [J]. *BioEssays*, 1995, 17(1): 53-62.
- [4] Okabe- Kado J, Kasukabe T, Baba H, et al. Inhibitory action of nm23 proteins on induction of erythroid differentiation of human leukemia cells [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1995, 1267(2): 101-106.
- [5] Kazushige Yokoyama. Transcriptional regulation of c-myc protooncogene by antisense RNA [A]. In: Eric Wickstrom. eds. *Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS* [M]. New York: Wiley-Liss Publication, 1991. 35-51.
- [6] Niitsu N, Okabe-kado J, Okamoto M, et al. Serum nm23- H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1202-1210.
- [7] Niitsu N, Honma Y, Lijima K, et al. Clinical significance of nm23- H1 proteins expressed on cell surface in non-Hodgkin lymphoma [J]. *Leukemia*, 2003, 17(1): 196-202.

[编辑:贺文]