文章编号:1000-5404(2008)19-1791-04

论著

# 稳定表达 BCR/ABL 的小鼠 BaF3-P210 细胞株的建立及其生物学特性的研究

史 梦[1],冯文莉[1],张文萍[1],王小中[1],黄世锋[1],曾建明[1],温健萍[2],陶 昆[1],陈新敏[1],曹唯希[1],黄宗干[3] ([1]重庆医科大学医学检验系临床血液学教研室,临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400016; [2]Canadian Blood Services, Hamilton, ON L8S 1H8 Canada;[3]重庆医科大学附属第一医院血液科,重庆 400016)

**摘 要:目的** 构建能稳定表达 BCR/ABL 的小鼠转化细胞株 BaF3-P210,并初步探讨 BCR/ABL 对 BaF3 细胞生物学特性的影响。**方法** 将含有 *bcr/abl* 基因的逆转录病毒载体转染到包装细胞,收集病毒感染 BaF3 细胞,经筛选和亚克隆,获得稳定表达 BCR/ABL 的转基因 BaF3-P210 细胞。用 PCR、DNA 测序、RT-PCR 和 Western blot 检测 *bcr/abl* 基因在靶细胞中的整合和表达;用台盼蓝细胞计数法、流式细胞仪(FCM)和 MTT 法研究 BCR/ABL 对 BaF3 细胞生物学特性的影响。**结果** *bcr/abl* 基因整合在 BaF3 细胞基因组中,BaF3-P210 细胞能稳定表达 *bcr/abl* 基因及其蛋白。与对照组相比,BaF3-P210 细胞增殖速度增快($P<0.05$);$G_0/G_1$ 期细胞比例下降,S 期和 $G_2/M$ 期细胞比例增高($P<0.05$);经 STI571 处理后的细胞增殖抑制率为(54.08±1.90)%($P<0.05$),早期凋亡率为(12.35±2.04)%($P<0.05$)。**结论** 成功构建的能稳定表达 BCR/ABL 的小鼠 BaF3-P210 转化细胞株具有增殖能力增强、细胞周期进程加速和对 STI571 敏感的恶性表型特征。

**关键词:** 慢性粒细胞白血病;*bcr/abl* 融合基因;逆转录病毒载体;BaF3 细胞
**中图法分类号:** R73-354; R730.23; R733.72 **文献标识码:** A

# Construction of BaF3-P210 cell line stably expressing BCR/ABL protein and its biological activity

SHI Meng[1], FENG Wen-li[1], ZHANG Wen-ping[1], WANG Xiao-zhong[1], HUANG Shi-feng[1], ZENG Jian-ming[1], WEN Jian-ping[2], TAO Kun[1], CHEN Xin-min[1], CAO Wei-xi[1], HUANG Zong-gan[3] ([1]Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, [3]Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [2]Canadian Blood Services, Hamilton, ON L8S 1H8 Canada)

**Abstract:** Objective To construct the transformed mouse BaF3-P210 cell line stably expressing BCR/ABL and to initially investigate the influence of BCR/ABL on the cell biological characteristics of BaF3 cell line. Methods The retroviral vector with *bcr/abl* gene was transfected into the packaging cell line. The BaF3 cells were infected with the collected viral supernatant. The transgenic BaF3-P210 cell line stably expressing BCR/ABL were screened and subcloned. The integration of the *bcr/abl* gene in the genome of the target cell was determined by PCR and DNA sequencing, trypan blue staining assay, flow cytometry and MTT assay. Results The *bcr/abl* gene was integrated into the BaF3 cell genome; RT-PCR and Western blot verified the stable expression of the *bcr/abl* gene and protein in the screened subclone cell line BaF3-P210. Compared with the control group, the cell proliferation rate was promoted ($P<0.05$), and the cell proportion in $G_0/G_1$ phase was decreased with the increasing of the cell proportion in both S and $G_2/M$ phase ($P<0.05$); the cell proliferation inhibition rate and the early apoptosis rate of the BaF3-P210 cells were respectively (54.08±1.90)% ($P<0.05$) and (12.35±2.04)% ($P<0.05$) after the treatment of protein tyrosine kinase inhibitor STI571. Conclusion The transformed mouse BaF3-P210 cell line stably expressing BCR/ABL was successfully constructed. The expression of BCR/ABL not only promoted the proliferation, but also accelerated the cell cycle progression of the BaF3 cells. It endowed the BaF3-P210 transformed cell line with the sensitivity to STI571.

**Key words:** chronic myeloid leukemia; *bcr/abl* fusion gene; retroviral vector; BaF3 cell line

---

**基金项目:** 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20050631007)
Supported by the Funds for Doctoral Culitivation in Colleges and Universities by Ministry of Education of China (20050631007)
**作者简介:** 史 梦,女,四川省荥经县人,博士研究生,检验士,主要从事白血病分子机制和基因治疗方面的研究。电话:(023)68485938
**通信作者:** 冯文莉,电话:(023)68485938,E-mail:fengwlcqmu@sina.com
**收稿日期:** 2007-09-28;**修回日期:** 2007-11-05

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)具有特征性的 *bcr/abl* 融合基因及其产物 BCR/ABL 融合蛋白(P210)。该蛋白具有强烈的酪氨酸激酶活性,能异常激活多种信号转导通路从而导致血细胞的恶性转化[1]。

目前在 CML 研究中最常用的 BCR/ABL 阳性细胞模型为 K562 细胞株,但该细胞株建系已 32 年,细胞中 BCR/ABL 癌蛋白的长期存在会造成基因、染色体的突变和复制等异常,随着传代会进一步加重这种异常,可对细胞内的多种基因造成影响,导致研究结果的可信度下降。另一方面,如果在实验中采用从基因水平抑制 *bcr/abl* 或用酪氨酸激酶抑制剂 STI571 抑制 K562 细胞株的 BCR/ABL 激酶活性的方法,都无法完全消除 BCR/ABL 对细胞的影响,且细胞在 BCR/ABL 受抑后可引起凋亡,对后续的实验研究影响较大。因此,本研究拟构建能稳定表达 BCR/ABL 的转化细胞株 BaF3-P210,并初步研究 BCR/ABL 对 BaF3 细胞生物学功能的影响,为进一步研究受 BCR/ABL 融合蛋白调控的信号转导途径及其机制提供一种理想的细胞模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒及细胞株

逆转录病毒载体 MIGR1 及 MIGR-P210 由美国 Warren S Pear 教授惠赠。小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 和小鼠急性粒单核白血病细胞株 WEHI-3 购于中国医学科学院基础医学细胞中心。

### 1.2 主要试剂

转染试剂 jetPEI™为 Polyplus 公司产品;聚凝胺为 Sigma 公司产品;凋亡检测试剂 Annexin V-PE(BioVision);兔抗鼠 c-abl 单抗、羊抗鼠 α-tubulin 抗体、羊抗兔二抗、驴抗羊二抗、ECL 显色试剂盒均购于 Cell Signaling 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养与病毒包装 Phoenix-Ampho 包装细胞、NIH3T3 细胞及 WEHI-3 细胞用含 10% 胎牛血清(FCS)DMEM 高糖培养基培养于含 5% $CO_2$ 的 37℃恒温培养箱中;BaF3 细胞用含 10% FCS,10% WEHI-3 条件培养基的 PRMI1640 液培养,取对数生长期的细胞作实验。按照 jetPEI™转染试剂说明书将逆转录病毒载体转染入 Phoenix-Ampho 包装细胞,以 NIH3T3 细胞为靶细胞测定病毒滴度。

1.3.2 靶细胞的感染与筛选 收集处于对数生长期的 BaF3 细胞,按文献[2]的方法进行感染。感染后 48 h 的细胞换为不含 WEHI-3 条件培养基的 RPMI1640 培养液以进行筛选。14 d 后,通过有限稀释法筛选获取单克隆细胞命名为 BaF3-P210,培养增殖,进行后续实验。

1.3.3 PCR 检测 *bcr/abl* 基因的整合 分别提取空载体感染 BaF3 细胞(BaF3-MIGR1)和 BaF3-P210 细胞的基因组 DNA。以细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,引物序列:上游引物:5′-GCA AGC TTA CCA TGG ACA TCC GTG G-3′,下游引物:5′-GTC GAC CTT GCC ATC AGA AGC-3′,目的片段大小为 654 bp,反应条件为:94℃预变性 5 min, 98℃变性 10 s, 55℃退火 30 s,72℃延伸 55 s,共 32 个循环,最后 72℃延伸 5 min。同时做 β-actin 内对照,目的片段为 341 bp, PCR 产物电泳后在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察并保存结果。PCR 产物同时送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

1.3.4 RT-PCR 检测 *bcr/abl* mRNA 的表达 收集 BaF3-MIGR1 和 BaF3-P210 细胞,Trizol 抽提总 RNA,进行逆转录,以所得 cDNA 为模板进行 PCR 反应。引物序列同上。同时做 β-actin 内对照,目的片段为 341 bp,琼脂糖电泳鉴定,在 Bio-Rad 凝胶成像上观察并保存结果。

1.3.5 Western blot 检测 BCR/ABL 的表达 收集 BaF3-MIGR1 和 BaF3-P210 细胞,用细胞裂解液提取细胞总蛋白,Bradford 法测蛋白总量。蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、加c-abl 抗体及 α-tubulin 抗体和二抗后, ECL 法显色于化学发光成像仪上显影并保存图像。

1.3.6 细胞生长曲线 实验分未处理细胞组、BaF3-MIGR1 组和 BaF3-P210 3 组,调各组细胞数为 $1\times10^4$ $ml^{-1}$,加入 24 孔板中,每组设 3 复孔,常规培养。在随后的 1、3、5、7 d 分别取出每组中的悬液,台盼蓝染色后计数活细胞数,以平均值绘制细胞生长曲线。

1.3.7 FCM 检测细胞周期相分布 实验分组同前,收集的各组细胞经 PBS 洗涤,70% 冰乙醇固定,加入 PBS 溶液室温处理 30 min,离心去上清,加入 50 μg/ml RNase A 消化 30 min,再加入终浓度为 50 μg/ml 的碘化丙啶(PI)染色 25 min,上流式细胞仪检测。

MTT 检测细胞对药物的敏感性 实验分组同前,收集各组细胞制备细胞悬液,调整细胞数为 $1\times10^5$ $ml^{-1}$,接种于 96 孔培养板中($1\times10^4$ $ml^{-1}$)。实验组分别加入不同浓度的酪氨酸激酶抑制剂 STI571 工作液,药物终浓度为 0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0 μmol/L,每一浓度均设 3 个平行孔,于培养 24 h 后每孔加入 MTT 100 μl(1 g/L),4 h 后加入 DMSO 100 μl,温育 30 min,用酶联仪检测波长 570 nm 处的吸光度值[$D$(570)],按以下公式计算细胞存活率:

细胞增殖抑制率 = (1 − 实验组平均 $D$(570)值/对照组平均 $D$(570)值) × 100%(以对照组生存率为 100%)。

1.3.9 Annexin V-PE/7AAD 双染法检测凋亡 实验分组同前,离心收集 $1\times10^6$ 经 2 μmol/L STI571 处理 24 h 后的各组细胞,冰冷 PBS 洗涤 2 次后重悬于 100 μl 反应缓冲液中,加入 5 μl Annexin V-PE、10 μl 7AAD,轻轻混匀,避光保存 20 min,加入 200 μl 缓冲液,立即上 FCM 检测。

### 1.4 统计学处理

每次实验均重复 3 次以上,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 SPSS 11.5 统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 稳定表达细胞的筛选

感染后的靶细胞培养 14 d 后,经有限稀释法筛选获得稳定

表达的单克隆细胞,在倒置荧光显微镜下观察发现细胞呈单克隆状生长,且均发绿色荧光。阳性克隆细胞经扩大培养鉴定后,命名为 BaF3-P210,目前已连续传代培养至 30 余代。传代、复苏和冻存不改变细胞的形态及增殖能力,传至 30 余代且中途经过数次冻存、复苏的 BaF3-P210 细胞仍能稳定的表达绿色荧光蛋白(图 1)。

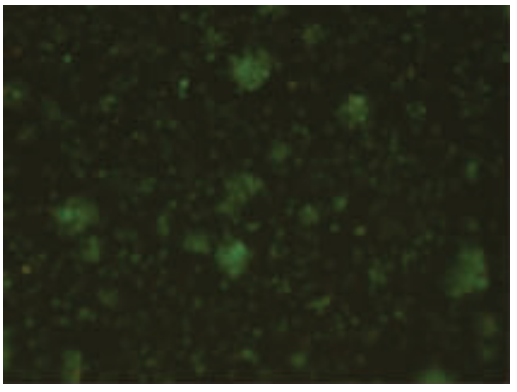
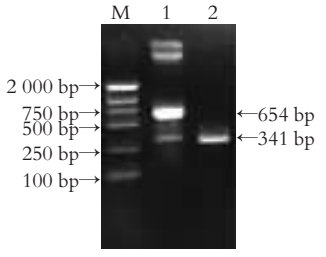


**图 1　经多次传代后的 BaF3-P210 细胞中绿色荧光蛋白的表达**
(倒置荧光显微镜 ×100)

## 2.2　*bcr/abl* 基因在 BaF3-P210 细胞基因组中的整合

稳定表达细胞 BaF3-P210 的基因组 DNA,经特异 *bcr/abl* 引物 PCR 扩增后,可见大小约 654bp 的特异性扩增产物。而 BaF3-MIGR1 细胞的对照 DNA 没有此条带出现(图 2)。PCR 产物的测序结果经 DNAssist 软件分析,与 GenBank 中 *bcr/abl* 融合基因的公布序列符合。

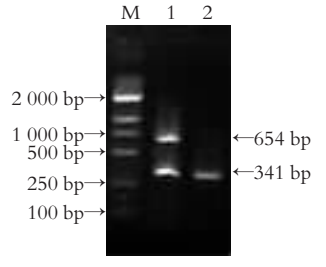



M:DL2000 DNA 标准;1:BaF3-P210;2:BaF3-MIGR1

**图 2　PCR 检测 *bcr/abl* 在细胞基因组中的整合**

## 2.3　*bcr/abl* mRNA 在 BaF3-P210 细胞中的表达

以稳定表达细胞 BaF3-P210 的总 RNA 为模版,以特异性的引物经 RT-PCR 扩增出大小为 654 bp 的片段,其长度与预期一致。而 BaF3-MIGR1 细胞的对照 RNA 未见该条带(图 3)。

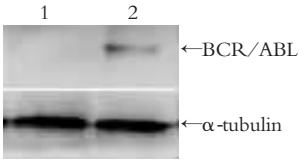



M:DL2000 DNA 标准;1:BaF3-P210;2:BaF3-MIGR1

**图 3　RT-PCR 检测细胞基因组中 *bcr/abl* mRNA 的表达**

## 2.4　BCR/ABL 在 BaF3-P210 细胞中的表达

经 Western blot 检测, BaF3-P210 细胞与 BaF3-MIGR1 细胞相比,在 $210\times10^3$ 处有一明显的目的条带,表明 BaF3-P210 细胞成功表达 BCR/ABL 融合蛋白(图 4)。




1:BaF3-MIGR1 2:BaF3-P210

**图 4　Western blot 检测各组细胞 BCR/ABL 融合蛋白的表达**

## 2.5　BCR/ABL 对 BaF3 细胞增殖能力的影响

稳定表达 BCR/ABL 的 BaF3 细胞与未处理细胞相比,其增殖速度明显增快(差异有统计学意义)。而空载体感染的细胞与未处理组相比无明显差异(图 5)。

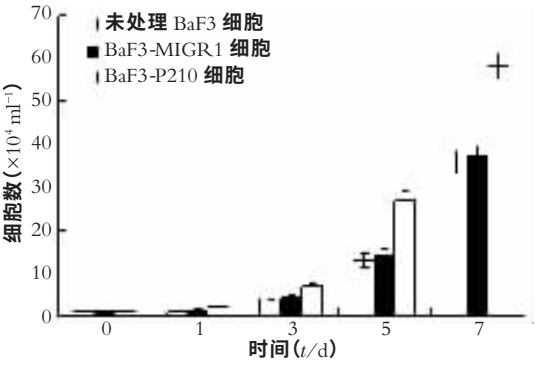



**图 5　BaF3-MIGR1、BaF3-P210 及未处理 BaF3 细胞的增殖曲线**

## 2.6　BCR/ABL 对 BaF3 细胞周期的影响

经流式细胞仪检测,稳定表达 BCR/ABL 的 BaF3 细胞与未处理细胞相比,$G_0/G_1$ 期细胞比例下降,S 期和 $G_2/M$ 期细胞比例增高,差别有统计学意义($P<0.05$),见表 1。提示 BCR/ABL 的稳定表达促进了 BaF3 细胞的周期进程。而空载体感染的细胞与未处理组相比无明显差异。

**表 1　BCR/ABL 对各组细胞周期的影响**

| 组别 | 细胞周期($\bar{x}\pm s$,%) | | |
|---|---|---|---|
| | $G_0/G_1$ 期 | S 期 | $G_2/M$ 期 |
| 未处理 BaF3 | 40.83 ± 2.47 | 52.21 ± 2.54 | 6.96 ± 0.56 |
| BaF3-MIGR1 | 37.67 ± 2.37 | 53.7 ± 1.63 | 7.03 ± 0.75 |
| BaF3-P210 | 31.66 ± 1.78[ab] | 58.25 ± 2.8[ab] | 10.09 ± 1.03[ab] |

a:$P<0.05$, 与未处理组相比; b: $P<0.05$, 与 BaF3-MIGR1 组相比

## 2.7　BaF3-P210 细胞对 STI571 的敏感性和凋亡情况

MTT 实验显示 STI571 对 BaF3-P210 细胞的增殖具有明显的抑制作用,该作用与药物剂量成正相关,当 STI571 浓度为 2 μmol/L 时抑制率达到(54.08 ± 1.90)%。而 STI571 对未处理 BaF3 细胞和 BaF3-MIGR1 细胞都没有明显的抑制效应(图 6)。2 μmol/L STI571 作用 BaF3-P210 细胞 24 h 后其早期凋亡率为(12.35 ± 2.04)%,与其余各组相比有显著差异($P<0.05$),而未处理 BaF3 和 BaF3-MIGR1 细胞在经 STI571 处理后早期凋亡细胞分别只有(2.34 ± 0.42)%和(2.78 ± 0.95)%。

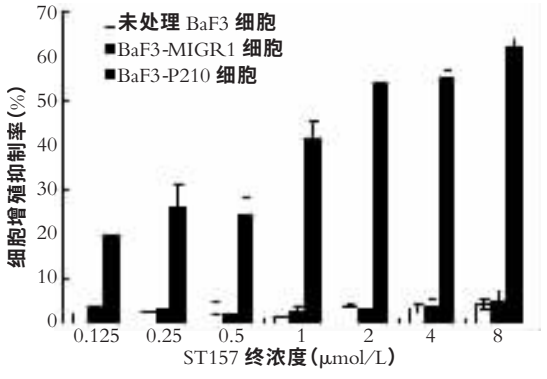



**图6 STI571 对 BaF3-MIGR1、BaF3-P210 及未处理 BaF3 细胞的增殖抑制作用**

## 3 讨论

为了建立能稳定表达 BCR/ABL 的转化细胞株 BaF3-P210 细胞模型,需解决如何将目的基因高效地导入靶细胞并稳定表达的问题。因脂质体介导的基因转染效率低且不能获得稳定长期的表达,故本实验使用了逆转录病毒载体介导。逆转录病毒载体一包装细胞系统被认为是在具有分裂功能的细胞中进行转移和表达最为成功的真核细胞基因转移技术,它具有高效转移,高整合,高表达和宿主细胞范围广的优点。所用的 pMIGR1 载体是由 MSCV2.2 载体优化而来的逆转录病毒载体,它带有增强型绿色荧光蛋白(eGFP)以及核糖体结合位点(IRES);重组逆转录病毒载体 MIG-210 是将从 pGD210 来源的 7.2 kb *bcr/abl* cDNA 连接入 pMIGR1 而成[2]。含 IRES 的双顺反子策略对提高目的基因的表达水平具有重要意义,而 eGFP 的表达可作为转染细胞标记便于快速、方便地辨别阳性克隆细胞。

实验中选用的靶细胞 BaF3 是细胞因子 IL-3 依赖性的小鼠原 B 淋巴细胞株,撤去 IL-3 后,细胞会出现 $G_1$ 期阻滞和细胞凋亡现象。而经 P210 BCR/ABL 转化的 BaF3 细胞由于 BCR/ABL 可表达类似的细胞因子及促进细胞周期的作用,能防止细胞停滞于 $G_1$ 期和阻止因 IL-3 缺乏而导致的凋亡[3,4]。本研究利用逆转录病毒载体介导的基因转染技术将 BCR/ABL 基因导入小鼠原 B 淋巴细胞 BaF3,以撤除 IL-3 法筛选后挑选阳性克隆扩大培养并连续传代,筛选后得到的转化细胞株从基因组整合、基因表达水平和蛋白表达水平三方面进行了鉴定,结果证实获得了稳定表达 BCR/ABL 的 BaF3-P210 细胞。

继而研究了 BCR/ABL 对 BaF3 细胞生物学特性的影响,通过连续传代培养至 30 余代的观察发现:传代、复苏和冻存不改变细胞的形态及增殖能力,传至 30 余代且中途经过数次冻存、复苏的 BaF3-P210 细胞仍能稳定的表达绿色荧光蛋白。结果还显示,与野生型 BaF3 细胞相比,BaF3-P210 细胞增殖能力显著增强,$G_0/G_1$ 期细胞比例下降,S 期及 $G_2/M$ 期细胞比例增高。其可能的机制是 BCR/ABL 活化了 JAK/STAT、MAPK 和 PI3K 等主要信号转导途径、激活细胞周期蛋白依赖激酶(CDK),诱导 G1 期细胞转化至 S 期,促进了细胞周期进程,从而使细胞获得增殖优势[5,6,7]。还观察到 BaF3-P210 细胞可被酪氨酸激酶抑制剂 STI571 特异性地抑制,当 2 μmol/L STI571 作用 24 h 后其早期凋亡率为(12.35 ± 2.04)%。

综上所述,本研究成功地构建了稳定表达 BCR/ABL 的 BaF3-P210 细胞株,该细胞在 BCR/ABL 的作用下具有增殖能力增强、细胞周期进程加速和对 STI571 敏感的恶性表型特征。同时这株转化细胞还具有的优势是:细胞中 BCR/ABL 的表达是人为的,避免了 BCR/ABL 长期存在对细胞造成的不明影响;同时,与空载体转染细胞相比,两组细胞之间唯一的差别在于 BCR/ABL 的存在与否,从而提供了稳定一致的实验背景,减少了一些不明原因对 BCR/ABL 相关研究的干扰;其次,BaF3 细胞的生长是 IL-3 依赖性的,而一旦 BCR/ABL 转化后就可以不依赖 IL-3 生长,便于 BCR/ABL 转化细胞的分离纯化。本研究结果为进一步利用这种转化细胞模型深入研究受 BCR/ABL 融合蛋白调控的信号转导途径及其机制奠定了基础。

**参考文献:**

[1] Goldman J M, Melo J V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment[J]. N Engl J Med, 2003, 349(15): 1451 - 1464.

[2] Pear W S, Miller J P, Xu L, *et al*. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 *bcr/abl*-transduced bone marrow[J]. Blood, 1998, 92(10): 3780 - 3792.

[3] Jin A, Kurosu T, Tsuji K, *et al*. BCR/ABL and IL-3 activate Rap1 to stimulate the B-Raf/MEK/Erk and Akt signaling pathways and to regulate proliferation, apoptosis, and adhesion[J]. Oncogene, 2006, 25(31): 4332 - 4340.

[4] Parada Y, Banerji L, Glassford J, *et al*. BCR/ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and P27Kip1 expression[J]. J Biol Chem, 2001, 276(26): 23572 - 23580.

[5] Corradini F, Cesi V, Bartella V, *et al*. Enhanced proliferative potential of hematopoietic cells expressing degradation-resistant c-Myb mutants[J]. J Biol Chem, 2005, 280(34): 30254 - 30262.

[6] Andreu E J, Liedo E, Poch E, *et al*. BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3264 - 3272.

[7] Chu S, Li L, Singh H, *et al*. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia[J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 7045 - 7053.

(编辑 汪勤俭)