论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0034-04

人干细胞标志 Musashi2 在急性髓系白血病细胞分化中的表达变化

张慧娟,谭 诗,陈莎娜,王 娟,覃凤娴,陈先春,张 伶 (400016 重庆,重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨人干细胞标志 Musashi2(Msi2)在佛波酯(phorbol myristoyl acetate,PMA)诱导急性单核白血病细胞株 THP-1 分化过程中的表达变化。**方法** PMA 作用 THP-1 细胞 0、6、12、24 h 后,倒置显微镜下观察 THP-1 细胞形态学改变,计算分化细胞百分数;流式细胞仪检测 THP-1 细胞表面分化抗原 CD11b 的表达;定量 PCR 和 Western blot 检测 Msi2 的基因及蛋白表达水平;定量 PCR 检测 Msi2 下游信号分子 Numb 的 mRNA 水平;定量 PCR 和 Western blot 检测 Numb 下游分子 Notch1 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** PMA 处理 24 h 后可诱导 THP-1 细胞出现巨噬细胞样分化表型,实验组分化细胞的百分比显著高于未处理组($P<0.05$)。同时 24 h 组 CD11b 表达量(59.30±8.70)较未处理组(0.32±0.08)显著增加($P<0.05$)。实验组白血病细胞经 PMA 处理 24 h 后,Msi2 的 mRNA 和蛋白相对表达量分别为(0.33±0.08)和(0.50±0.01),显著低于未处理组($P<0.05$);PMA 处理 12 h 后 Numb 的 mRNA 相对表达量为(2.92±0.33),较未处理组明显升高($P<0.05$);而 PMA 处理 24 h 后 Notch1 的 mRNA 和蛋白相对表达量分别为(0.31±0.03)和(0.23±0.01),较未处理组显著下降($P<0.05$)。**结论** 干细胞标志 Msi2 表达随 THP-1 细胞分化而下降,Msi2-Numb-Notch1 通路可能参与白血病细胞的分化调控。

[关键词] Musashi2;分化;佛波酯;THP-1 细胞
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R733.712 [文献标志码] A

Alteration of human stem cell marker Musashi2 in differentiation of acute myelomonocytic leukemia cells

Zhang Huijuan, Tan Shi, Chen Shana, Wang Juan, Qin Fengxian, Chen Xianchun, Zhang Ling (Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the alteration of human stem cell marker Musashi2 (Msi2) in the differentiation of human myelomonocytic leukemia cell line THP-1 induced by phorbol myristoyl acetate (PMA). **Methods** After THP-1 cells were incubated with PMA for 0, 6, 12 and 24 h respectively, the cell morphological changes were observed under an inverted microscope. The proportion of differentiated cells was calculated. The expression of CD11b, which is a THP-1 cell differential surface marker, was assayed using flow cytometry (FCM). Real-time PCR and Western blotting were applied to detect the mRNA and protein expression of Msi2 respectively. The expression of Msi2 downstream signal molecule Numb was detected by real-time PCR. The mRNA and protein expression of Numb downstream signal molecule Notch1 were detected by real-time PCR and Western blotting respectively. **Results** The THP-1 cells treated by PMA for 24 h showed differential phenotype of macrophages. The proportion of differentiated cells in the experimental group was significantly higher than that in the untreated group ($P<0.05$), and the expression of CD11b significantly increased in the 24 h treatment group (59.30±8.70) compared with that in the untreated group (0.32±0.08) ($P<0.05$). The mRNA and protein relative expression of Msi2 were (0.33±0.08) and (0.50±0.01) in the THP-1 cells treated by PMA for 24 h, respectively, and were significantly lower than that in the untreated group ($P<0.05$). Numb mRNA relative expression was 2.92±0.33 after PMA treatment for 12 h, and was

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC2010BB5363)
[通信作者] 张 伶,E-mail:lingzhang@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121030.1724.006.html(2012-10-30)

significantly higher than that in the untreated group ($P<0.05$). However, when THP-1 cells were treated by PMA for 24 h, the mRNA and protein relative expression of Notch1 were 0.31 ± 0.03 and 0.23 ± 0.01, respectively, which decreased significantly compared with that in the untreated group ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of stem cell marker Msi2 reduces significantly during THP-1 cell differentiation, indicating Msi2-Numb-Notch1 pathway may regulate the differentiation of leukemia cells.

[**Key words**] Musashi2; differentiation; phorbol myristoyl acetate; THP-1 cell

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5363). Corresponding author: Zhang Ling, lingzhang@cqmu.edu.cn

白血病是血液系统恶性肿瘤,一个重要的发病机制是白血病细胞分化成熟障碍。若调控造血干细胞分化的关键基因失调,将导致白血病的发生。Musashi2(Msi2)是一种RNA结合蛋白,最早在神经干细胞中发现可参与调控神经干细胞的分化发育[1]。2010年Kharas等[2]在造血干细胞中发现Msi2高表达,Msi2可抑制早期粒系和巨核系的分化。同时在慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia,CML)中也证实高表达Msi2,且在CML加速期或急变期显著高于慢性期,过表达Msi2可以促使CML由慢性期进入加速期或急变期[2]。这提示Msi2可能在白血病发生、发展中发挥重要作用。目前关于Msi2在急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia,AML)中的研究主要限于临床资料的统计分析,其在AML发生、发展中的具体作用机制尚不清楚。因此,本研究以急性髓系白血病细胞株THP-1为细胞模型,观察PMA处理后Msi2及下游信号分子Numb和Notch1在急性髓系白血病细胞分化中的表达变化,初步探讨Msi2在白血病发生、发展中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

佛波酯药物购自上海碧云天生物技术有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,RPMI1640培养基购自Gibco公司,RNA提取试剂RNAiso Plus及定量PCR试剂SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ均购自TaKaRa公司,CD11b-PE单克隆抗体购自北京四正柏生物有限公司,兔抗人Msi2单克隆抗体(ab76148)购自Abcam公司,兔抗人Notch1多克隆抗体购自Anbo公司,鼠抗人β-actin单克隆抗体,羊抗兔二抗及羊抗鼠二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养及PMA处理

急性单核白血病细胞株THP-1购自上海生命科学院,用含10%的胎牛血清,青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL)和L-谷氨酰胺(2 mmol/mL)的RPMI1640培养液于37 ℃,5% CO_2的条件下培养。PMA处理细胞终浓度为50 nmol/L。

1.3 光镜下细胞形态学观察

50 nmol/L PMA作用THP-1细胞0、6、12、24 h,倒置显微镜下观察不同处理时间下的细胞形态改变。计数300个细胞,计算PMA处理不同时间下形态发生改变的THP-1细胞占的百分数。

1.4 FCM检测CD11b的表达

PMA作用THP-1细胞0、6、12、24 h后,胰酶消化,用含0.2% BSA的PBS洗2次,调整细胞数为10^6/100 μL的细胞悬液。加入10 μL CD11b-PE单克隆抗体,避光,冰上孵育30 min,再次用含0.2% BSA的PBS洗2次,流式细胞仪检测CD11b的表达。

1.5 定量PCR检测Msi2、Numb及Notch 1的mRNA表达

用RNAiso Plus试剂提取总RNA,按TaKaRa试剂盒将RNA逆转录成cDNA,为定量PCR做准备。定量PCR总体系包括:2×SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ,去离子水,PCR上游引物,PCR下游引物,模板cDNA。各基因引物及产物长度见表1。反应程序如下:预变性95 ℃ 30 s;变性95 ℃ 30 s,退火20 s(Msi2为56 ℃,Numb为56 ℃,Notch1为61.4 ℃),延伸72 ℃ 30 s,72 ℃采集荧光,共39个循环。融解曲线条件:(65~95)℃每上升0.5 ℃采集1次荧光。反应体系在BIO-RAD仪器上进行,结果用$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示。

表1 引物序列及长度

基因	序列5′-3′	产物长度(bp)
Msi2	上游:GTTATCTGCGAACACAGTAGTG 下游:ACCCTCTGTGCCTGTTGGTAG	110
numb	上游:GGCTCTTTCCGAGGTTT 下游:GTGCTGAAGGCATTGGT	197
Notch1	上游:CTCCCCGTTCCAGCAGTCTC 下游:CAGCCACTCGCATTGACCAT	123
β-actin	上游:TAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG 下游:TGCTGTCACCTTCACCGTTC	156

1.6 Western blot检测Msi2和Notch1的蛋白表达

收集PMA诱导0、6、12、24 h的THP-1细胞并提取蛋白。各组取100 μg,经12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白转至PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭液室温封闭3 h,加入封闭液稀释的一抗(Msi2,1∶2 000;Notch1,1∶2 000;β-actin,1∶500)4 ℃过夜。TBST洗2次,10 min/次;TBS洗1次,10 min。加入TBST稀释的二抗(anti-rabbit 1∶1 000;anti-mouse 1∶1 000)室温孵育1 h,洗膜。用化学发光显色试剂进行显色,用Quantity One软件分析条带灰度值。

1.7 统计学处理

实验数据用SPSS 17.0软件进行分析,计量资料用$\bar{x}\pm s$表

示。样本之间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 白血病细胞诱导分化过程中形态学改变

PMA未作用时THP-1细胞呈悬浮成簇生长，经50 nmol/L PMA处理后，随着作用时间的延长，贴壁细胞的数量逐渐增加，同时细胞形态出现巨噬细胞样分化表型：胞体由圆形转变成椭圆形、梭形，部分细胞膜开始伸出伪足，甚至呈分枝状（图1箭头所指）。实验组中细胞经PMA处理12 h和24 h后分化细胞百分比分别为（1.59±0.18）%和（3.77±0.25）%，显著高于未处理组（0.11±0.05）%，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 白血病细胞诱导分化过程中CD11b表达的改变

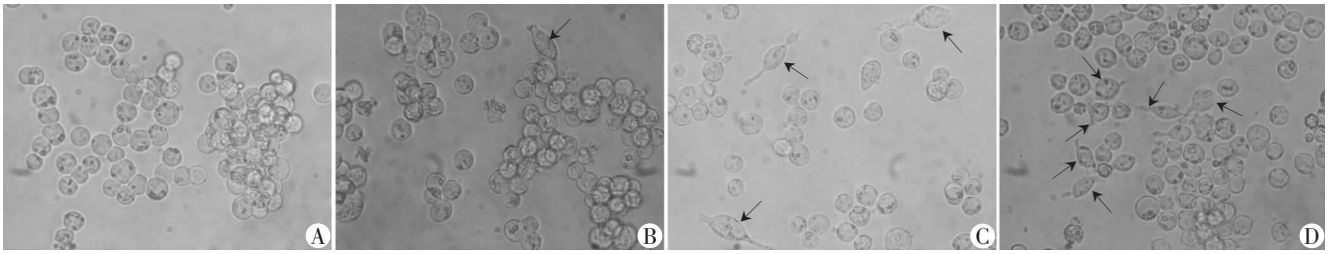
PMA作用THP-1细胞后，随着PMA处理时间的延长，THP-1细胞表面分化抗原CD11b表达逐渐增高。与未处理（0.32±0.08）比较，PMA处理12 h（12.66±4.30）和24 h（59.30±8.70）时CD11b表达量显著增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 白血病细胞诱导分化过程中Msi2表达的改变

PMA作用THP-1细胞24 h后，Msi2的mRNA相对表达量为（0.33±0.08），较未处理组明显下降（$P<0.05$）（图2A）。此外，PMA处理THP-1细胞24 h后Msi2的蛋白相对表达量为（0.50±0.01），较未处理组显著下降（$P<0.05$）（图2B、C）。

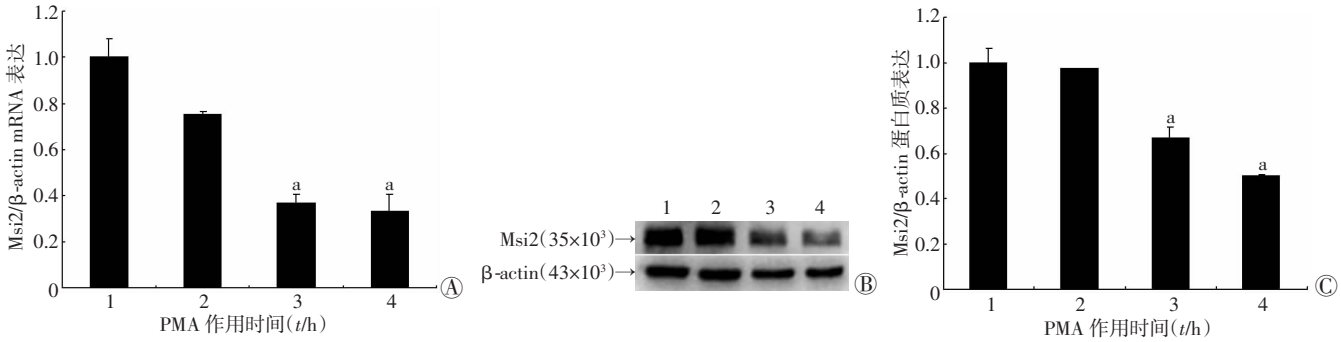
2.4 白血病细胞诱导分化过程中Msi2下游信号分子的改变

定量PCR结果显示，PMA处理细胞12 h后，THP-1细胞的Numb mRNA水平显著升高（2.92±0.33），较未处理组有显著性差异（$P<0.05$）（图3A）。PMA处理细胞24 h后Notch1的mRNA和蛋白相对表达量分别为（0.31±0.03）和（0.23±0.01），较未处理组明显下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$）（图3B、C、D）。



A、B、C、D：PMA作用THP-1细胞0、6、12、24 h时的细胞形态（箭头所指是形态发生改变的细胞）

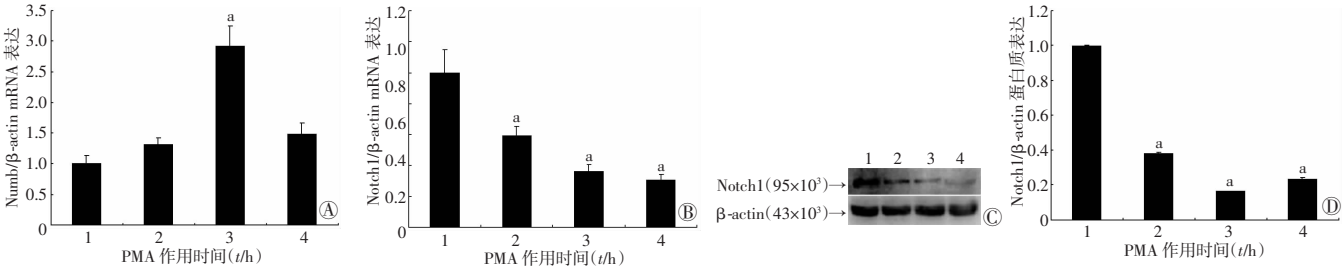
图1 不同时间PMA处理THP-1细胞后细胞形态学变化 （倒置显微镜 ×400）



A：定量PCR检测结果；B：Western blot检测结果；C：半定量分析结果

1：0 h；2：6 h；3：12 h；4：24 h；a：$P<0.05$，与0 h比较

图2 不同时间PMA处理THP-1细胞后Msi2 mRNA和蛋白的表达



A：Numb mRNA的表达；B：Notch1 mRNA的表达；C：Notch1蛋白的表达；D：Notch1蛋白表达的半定量分析

1：0 h；2：6 h；3：12 h；4：24 h；a：$P<0.05$，与0 h比较

图3 不同时间PMA处理THP-1细胞后Numb和Notch1的表达

3 讨论

具有自我更新、多向分化和无限增殖潜能的白血病干细胞是形成白血病的“罪魁祸首”。人干细胞分子 Msi2 具有维持胚胎干细胞自我更新和多潜能特性，在胚胎干细胞的早期分化中起着重要的调控作用[3]。最近发现，Msi2 可能参与白血病的发生发展，临床上发现 AML 患者高表达 Msi2，且与患者的生存率呈负相关，Msi2 可作为 AML 独立的预后标志之一[4]。然而，Msi2 与 AML 分化阻滞的关系尚不清楚。

为了观察 Msi2 在 AML 细胞分化过程中的表达改变，本研究采用 PMA 处理 THP-1 细胞，发现 PMA 能够诱导 THP-1 细胞出现巨噬细胞样分化表型的改变，同时伴有分化抗原 CD11b 的增加。白血病细胞在 PMA 诱导分化的过程中，Msi2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著下降。Kharas 等[2]在研究正常造血干细胞分化时发现，随着造血干细胞逐渐分化为祖细胞以及成熟的血细胞，Msi2 的表达逐渐下降。de-Andres-Aguayo 等[5]也发现 Msi2 高表达于造血系统内的原始细胞，并随原始细胞的分化而急剧下降。

研究表明，Msi2 可通过调控 Numb-Notch 途径参与慢性粒细胞白血病的分化[6]。Numb 是不对称细胞分裂子，它与细胞的分化有直接的联系[7]。Notch 信号通路和肿瘤的分化，增殖，凋亡有着广泛联系[8]。在慢性粒细胞白血病中，Msi2 可以阻止 Numb 蛋白的表达[6]，而 Numb 可以抑制 Notch 信号通路的表达[9]。因此，Msi2 可通过 Numb-Notch 途径上调 Notch 表达，从而促进慢性粒细胞白血病的进展。但目前 Msi2 以及 Numb/Notch 信号通路与 AML 分化的关系少见文献报道。为此，我们在观察急性髓系白血病诱导分化过程中 Msi2 改变的同时，首先检测了 THP-1 细胞中 Numb 的表达改变。结果表明，Numb 的 mRNA 表达的整体趋势是随着 PMA 诱导 THP-1 细胞分化增加而增加，和 Msi2 的表达下调刚好相反。Ito 等[6]报道在慢性粒细胞白血病中，Msi2 可以抑制 Numb 蛋白的表达，若 Msi2 的基因缺失则可以恢复 Numb 的表达，这与本研究观察到 Numb 与 Msi2 表达呈负相关的结果是相符的。已知 Notch 包含 4 个亚型，其中只有 Notch1 能被所有的 Numb 亚型抑制[10]。因此本研究重点检测 AML 细胞分化过程中 Notch1 的基因和蛋白表达水平改变。结果发现 Notch1 的表达随着 THP-1 细胞的分化而下降，和 Msi2 表达的改变相一致。

本研究探讨了人干细胞标志 Msi2 在急性髓系白血病细胞分化中的表达变化，随着 THP-1 的诱导分化，Msi2 表达下降的同时伴随着其下游 Numb 分子的上调和 Notch1 分子的下调。下一步的研究将通过干预 Msi2 及其下游 Numb/Notch1 信号分子的表达，观察白血病细胞分化表型的相应改变，从而明确 Msi2 及下游 Numb/Notch 信号通路在急性髓系白血病细胞分化中的重要作用。探讨 Msi2 在急性髓系白血病分化中的调控作用，有助于阐明白血病的发病机制和寻找白血病治疗的潜在靶点。

参考文献：

[1] Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, *et al*. Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS[J]. J Neurosci, 2001, 21(20): 8091-8107.

[2] Kharas M G, Lengner C J, Al-Shahrour F, *et al*. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia[J]. Nat Med, 2010, 16(8): 903-908.

[3] Wuebben E L, Mallanna S K, Cox J L, *et al*. Musashi2 is required for the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34827.

[4] Byers R J, Currie T, Tholouli E, *et al*. MSI2 protein expression predicts unfavorable outcome in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2011, 118(10): 2857-2867.

[5] de-Andres-Aguayo L, Varas F, Kallin E M, *et al*. Musashi 2 is a regulator of the HSC compartment identified by a retroviral insertion screen and knockout mice[J]. Blood, 2011, 118(3): 554-564.

[6] Ito T, Kwon H Y, Zimdahl B, *et al*. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi[J]. Nature, 2010, 466(7307): 765-768.

[7] El-Hashash A H, Warburton D. Numb expression and asymmetric versus symmetric cell division in distal embryonic lung epithelium[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(9): 675-682.

[8] Purow B. Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 727: 305-319.

[9] Song Y, Lu B. Interaction of Notch signaling modulator Numb with α-Adaptin regulates endocytosis of Notch pathway components and cell fate determination of neural stem cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(21): 17716-17728.

[10] Beres B J, George R, Lougher E J, *et al*. Numb regulates Notch1, but not Notch3, during myogenesis[J]. Mech Dev, 2011, 128(5/6): 247-257.

（**收稿**：2012-08-15；**修回**：2012-10-25）

（编辑 王 红）