基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0290-04

FOXO3a 转录因子对白血病 HL60 细胞增殖和凋亡的影响研究

陈佳琳[1],张丽平[2],孙成铭[3],姚声涛[1],朱元方[4],赵 宇[5]

(1. 贵州省遵义医院儿科,遵义 563000;2. 江西省儿童医院 ICU,南昌 330000;3. 山东烟台毓璜顶医院检验中心,烟台 264000;4. 南昌大学第一附属医院妇产科,南昌 330000;5. 哈尔滨医科大学附属医院神经内科,哈尔滨 150016)

【摘 要】目的:研究转录因子 FOXO3a 对急性粒细胞白血病 HL60 细胞株增殖、凋亡的影响及可能的分子机制。方法:将 FOXO3a 表达质粒 pcDNA3.1-FOXO3a 及空载对照质粒 pcDNA3.1 分别经阳离子脂质体介导转染 HL60 细胞,用 G418 筛选出 FOXO3a稳定表达细胞株。台盼蓝拒染法和 MTT 法检测 HL60 细胞增殖,流式细胞仪分析细胞周期和凋亡,RT-PCR 及 Western blot 方法检测基因 Bim 和 bcl-2 的表达。结果:筛选到稳定表达 FOXO3a 基因的细胞株 HL60/FOXO3a 细胞,与空载体转染组(HL60/empty)及未处理对照组(HL60/untreated)细胞相比,转染组 FOXO3a 明显抑制 HL60 细胞生长与增殖,导致 G_1 期阻滞,细胞凋亡明显增加。RT-PCR 及 Western blot 显示 FOXO3a 明显上调 Bim 基因的 mRNA 和蛋白表达,而抑制 bcl-2 基因 mRNA 和蛋白的表达。结论:FOXO3a 转录因子能抑制 HL60 细胞的生长和增殖,并诱导其发生凋亡,其机制可能是通过对凋亡相关基因的调控并阻止细胞周期进程来实现的。

【关键词】转录因子;增殖;凋亡;细胞周期;白血病

【中国图书分类法分类号】R733 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-23

The research on the effect of transcription factor FOXO3a on proliferation and apoptosis of acute myeloblastic leukemia HL60 cell line

CHEN Jia-lin, et al

(*Department of Pediatrics, Zunyi Hospital of Guizhou*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of transcription factor FOXO3a on acute myeloblastic leukemia HL60 cell line proliferation, apoptosis and the possible molecular mechanism. *Methods*: The FOXO3a expression plasmid pcDNA3.1-FOXO3a and the no-load control plasmid pcDNA3.1 were separately transfected to HL60 cells mediated by cationic lipid body. The FOXO3a stable expression cell line was screened with G418. HL60 cell proliferation was assayed by Trypan blue exclusion staining and MTT. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The expressions of Bim and bcl-2 genes were detected by RT-PCR and Western blot method. *Results*: The stable cell lines HL60/FOXO3a cells were screened, which significantly inhibited the growth and proliferation ability of HL60 cells compared with the empty vector transfection group (HL60/empty) and untreated control group (HL60/untreated) cells, and were accompanied with G1 phase block and apoptotic cell increase. The gene FOXO3a significantly up-regulated Bim gene mRNA and protein expression, while inhibited the bcl-2 gene mRNA and protein expression. *Conclusion*: Transcription factor FOXO3a could inhibit HL60 cell growth and proliferation, and induce apoptosis. Its possible mechanism may be involved in the regulation of apoptosis-related genes and prevention of cell cycle progression.

【Key words】transcription factor; proliferation; apoptosis; cell cycle; leukemia

急性粒细胞白血病(Acute myeloblastic leukemia, AML)是骨髓造血干细胞的恶性增殖性疾病,在 AML 的治疗中,许多药物包括维甲酸的应用很大程度缓解了 AML 的进程[1],但是临床耐药和复发的现象越来越明显[2,3]。白血病干细胞(Leukemia stem cell, LSCs)的自我更新和生长潜能可以导致白血病恶变[4],因此从白血病干细胞水平发现新的治疗靶点是解决临床耐药现象以及复发的关键环节。

国外研究表明,转录因子 Forkhead 家族重要成员 FOXO3a 在白血病干细胞中处于低表达水平[4],在慢性粒细胞白血病细胞中 FOXO3a 的外源性表达能够抑制细胞的增殖并诱导凋亡[5]。转录因子 FOXO3a 在白血病干细胞或急性粒细胞白血病中低表达可能改变了白血病的恶性表型,因此本课题以 AML 的 HL60 细胞为研究对象,观察 FOXO3a 对 HL60 细胞增殖和凋亡的影响,并探讨其可能机制,为 AML 的临床治疗

作者介绍:陈佳琳(1973-),女,副主任医师,
研究方向:白血病发病机制

通信作者:孙成铭,男,副教授,Email:sunzhuokai@yahoo.com.cn。

基金项目:烟台市科技发展计划项目资助(编号:2008142-28)。

提供新的药物作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

急性粒细胞白血病 HL60 细胞株为本室冻存，胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品；质粒 pcDNA3.1-FOXO3a 由 Norio Komatsu 馈赠(Department of Biochemistry, Jichi Medical School, Tochigi)，空载 pcDNA3.1 质粒由本室保存。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、总 RNA 提取试剂、逆转录酶 M-MLV 及限制性内切酶、脂质体 Lipofectamine 2000 等分别购自 TaKaRa、Promega、invitrogen 公司；鼠抗人 bcl-2 单抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司，兔抗鼠二抗购自博士德公司。

1.2 细胞培养

HL60 细胞用含 10%灭活胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液，于 37℃、5% CO_2、饱和湿度的恒温培养箱中培养，常规传代换液，取对数生长期细胞进行后续实验。

1.3 质粒转染及稳定筛选

阳离子脂质体介导的质粒转染参照脂质体(Lipofectamine 2000)说明书中悬浮细胞转染操作步骤进行：将质粒与脂质体按照 1:1 比例在 2 管中以无血清 RPMI1640 稀释，两者轻轻混合后静置 30 min。加入以无血清 RPMI1640 洗涤并与调整好细胞数 5×10^5 的 HL60 细胞悬液，轻轻混匀，置37℃培育 5 h 后加入含 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养。稳定表达筛选转染后 24 h 进行细胞传代，第 2 天开始将转染的细胞在含 800 μg/ml G418 的培养基中培养，G418 的浓度经浓度反应分析后确定，含抗生素的培养基每周换液 2 次。10～14 d 后，观察到抗性克隆，通过有限稀释法筛选获取单克隆抗性细胞，培养增殖，进行后续实验。同时以转染 pcDNA3.1 空载质粒 HL60 细胞为对照组，HL60 细胞为非处理组。

1.4 细胞生长曲线制作

采用台盼蓝拒染法，取对数生长期细胞以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔培养板中，连续培养 5 d，每天取 3 孔细胞，以台盼蓝拒染法计算活细胞数，取均值绘制生长曲线。

1.5 MTT 法检测细胞增殖

收集对数生长期的实验组 pcDNA3.1- FOXO3a-HL60、空载 pcDNA3.1-HL60 对照 HL60 组，接种于 96 孔培养板(3×10^4 个/L)，细胞铺板处理 5 d。每组设 5 个平行孔。每孔加入 MTT 后孵育 4 h，于 595 nm 波长测吸光度值(OD)计算细胞增殖抑制率：(处理组吸光度值 - 空白组吸光度值)÷空白组吸光度值 × 100%

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

离心收集转染后 48 h 的细胞，将转染组和未处理组HL60细胞，经 PBS 洗涤，70%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 的碘化丙啶染色 30 min，上流式细胞仪检测。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

离心收集转染后 48 h 的细胞，将转染组和空载组细胞经 PBS 洗涤后，按照凋亡试剂盒说明处理细胞，以 HL60 细胞为对照组，在流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.8 RT-PCR 检测相关基因表达

收集稳定表达的转染组细胞和未处理 HL60 细胞，RNA 提取用 Trizol 试剂(Invitrogen)按说明书进行，取 2 μg RNA，用 M—MLV 逆转录酶制备 cDNA，取 2 μl cDNA 进行 PCR 扩增。实验中用到的所有引物序列如表 1 所示。

PCR 反应体系 4 × dNTP(each 2.5 mmol/L)2 μl，10 × buffer 4 μl，上游引物(5 μmol/L)2 μl，下游引物(5 μmol/L)2 μl，反转录产物 4 μl，Taq DNA 聚合酶(5 U/μl)0.4 μl，加水至 40 μl。PCR 反应条件为 94℃ 3 min；94℃ 40 s，55℃ 1 min，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 5 min→4℃ 保存。取 PCR 产物 5 μl 上样于 1.6%的琼脂糖凝胶中，80 V 电压，电泳 1 h。凝胶分析系统观察、分析。

1.9 Western blot 检测蛋白表达

收集稳定表达的转染组细胞和未处理 HL60 细胞，细胞裂解液提取细胞总蛋白，并测定蛋白含量。取 80 μg 蛋白质，进行 12%SDS—PAGE 电泳、电转膜，BSA 封闭后，加一抗鼠抗人抗体孵育过夜，抗体稀释度为 1:2 000，漂洗后加二抗羊抗鼠(1:2 000)室温下孵育 2 h，TBST 洗 3 次后化学发光显示试剂盒显色并成像分析。GAPDH 作为内参。

1.10 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组之间比较采用单因素方差分析，差异有统计学意义再进行 q 检验，方差不齐采用 Kruskai-Wallis 检验，两组间比较采用

表 1 RT-PCR 实验中合成的引物序列及预期产物长度

基因名称	引物序列	产物长度(bp)
β-actin(BC001301)	5'-TCGTCCACCGCAAATGCTTCTA-3' 5'-AACCGACTGCTGTCACCTTCACC-3'	200
Bim (NM_207002)	5'-CGCCACTACCACCACTTGATTCT-3' 5'-GCCATACAAATCTAAGCCAGTAAATA-3'	480
Bcl-2 (NM_000657)	5'-TGTCGCAGAGGGGCTACGAGTGG-3' 5'-ACCCCACCGAACTCAAAGAAGGC-3'	400
FOXO3a(NM_001455)	5'- GCGAGGCCGTCGATTCGCTCGCGGC -3' 5'-CCGCGAGCGAATCGACGGCCTCGCG-3'	390

t 检验。$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 FOXO3a 基因在 HL60 细胞中成功转染

将筛选到的单克隆培养后提取 RNA 逆转录后进行 RT-PCR，结果显示 FOXO3a 转染组其 mRNA 水平明显高于空载组和对照组。如图 1 所示。

2.2 对细胞生长曲线的影响

通过对生长曲线的观察发现：FOXO 过表达对 HL60 细胞的生长具有明显的抑制作用，而空载体对 HL60 细胞的生长无明显影响。细胞生长情况见图 2。

2.2 MTT 实验结果

FOXO 过表达对 HL60 细胞的增殖具有明显的抑制作用，增殖抑制率为(71.0 ± 6.4)%，而空载体对 HL60 细胞的增殖无明显影响(9.1 ± 1.1)%。如图 3 所示。

2.3 对 HL60 细胞周期的影响

与未处理细胞及空载转染组细胞相比，HL60/FOXO3a 组 G_1 期细胞比例增高（如表 2 所示），差别有统计学意义（$P<0.05$）。图 4 所示。

2.4 对 HL60 细胞凋亡的影响

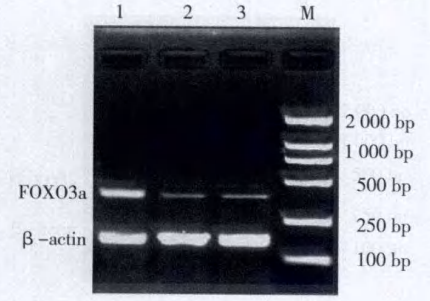
AnnexinV-PI 双染色结果表明：相对于对照组细胞凋亡率(0.17 ± 0.02)%和空载组细胞凋亡率(6.16 ± 0.31)%，转染组细胞凋亡率(43.33 ± 2.8)%凋亡明显增加，差别有统计学意义（$P<0.05$），图 5 所示。

2.5 RT-PCR 及 Western blot 检测 Bim、bcl-2 基因 mRNA 的表达

RT-PCR 和 Western blot 检检测各组 HL60 细胞 Bim、bcl-2 基因 mRNA 和蛋白水平表达，结果如图 6 和 7 所示。与未处理及空载组相比，转染组 Bim 基因的 mRNA 和蛋白水平升高，bcl-2 基因 mRNA 和蛋白水平则被明显下调。

3 讨　论

FOXO3a 是 Forkhead 转录因子家族的重要成员，通过调节其下游基因的转录，参与细胞分化、DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡等方面的调控[6,7]。有报道显示 p53 与 FOXO3a 有着相似的作用[8]，FOXO3a 有可能是新的肿瘤抑制因子。国外的研究者发现了 FOXO3a 对慢性粒细胞白血病的肿瘤抑制作用，然而在 AML 中的情况不很清楚。对此，我们进行了深入研究。台盼蓝染色和 MTT 及 AnnexinV-PI 双染显示，外源性的 FOXO3a 基因对 HL60 细胞具有增殖抑制作用，并能促进细胞凋亡，而抑制细胞增殖和促进细胞凋亡是



M. Marker DL2000；1. 转染组；2. 空载组；3. 对照组

图 1　RT-PCR 显示 FOXO3a 的转染

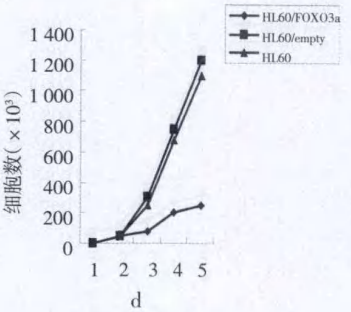


图 2　HL60 细胞生长曲线

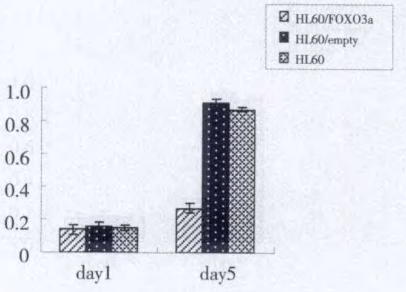


图 3　MTT 实验

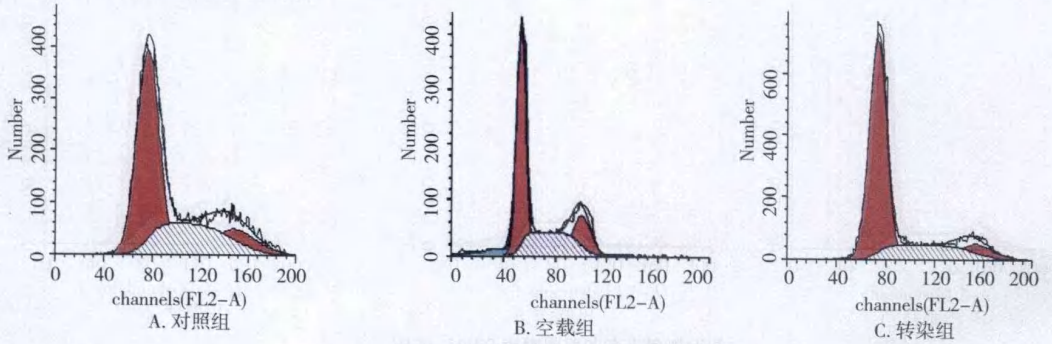


图 4　HL60 细胞周期的流式检测结果

表 2　对细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$,%)

组别	G_1	S	G_2
转染组	70.00 ± 10.40	20.42 ± 3.70	9.58 ± 2.50*
空载组	53.03 ± 6.50	28.20 ± 4.30	18.77 ± 3.90
对照组	58.25 ± 7.20	27.63 ± 4.10	14.12 ± 3.30

*$P<0.05$（分别与空载组和对照组比较）

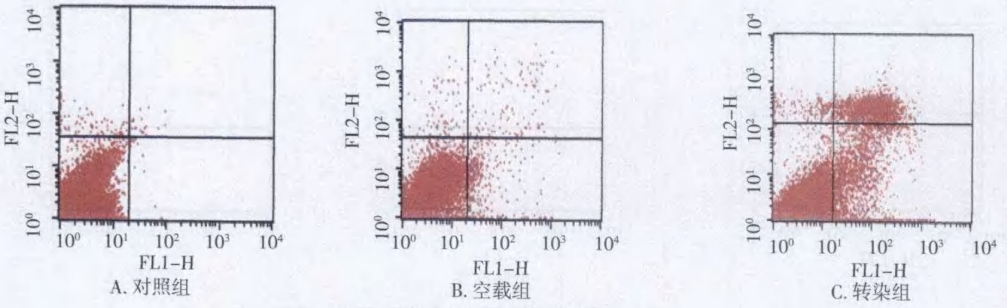
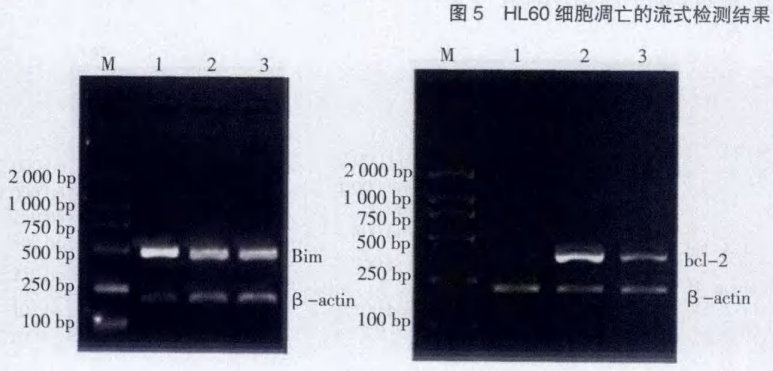
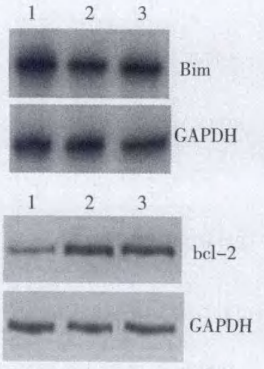


图 5 HL60 细胞凋亡的流式检测结果



M. Marker DL2000；1. 转染组；2. 空载组；3. 对照组

图 6 RT-PCR 检测 Bim、bcl-2 基因表达



1. 转染组；2. 空载组；3. 对照组

图 7 Western blot 检测 Bim、bcl-2 蛋白表达

抗癌治疗的一个重要策略[9]，说明 FOXO3a 可以作为潜在的抑癌基因发挥作用。

肿瘤细胞特点是分裂快、增殖旺盛，G_1 期为细胞的 DNA 合成前期，细胞周期的长短主要差别在 G_1 期，G_1 期长说明细胞分裂延缓受阻，增殖受抑制。有研究表明 p53 基因产物是调节细胞周期和细胞凋亡的重要因子，致突变因子引起的 DNA 损伤，能迅速诱导 P53 产物积累，将细胞周期阻滞于 G_1 期[10]，FOXO3a 有可能模拟了 p53 基因的功能促使细胞发生 G_1 期的阻滞从而使细胞分裂延缓，增殖受抑制。

细胞生长主要受癌基因和抑癌基因的双重调控。正常情况下，两类基因协同调控，使细胞生长处于平衡状态。与正常细胞相比，肿瘤细胞丧失增殖与凋亡平衡的调控。细胞凋亡的信号整合可能主要是通过 Bcl-2 家族蛋白，并发生在线粒体水平[11]。在许多肿瘤中 Bcl-2 存在高表达，并与细胞的耐药性有关[12]。本研究表明，转染 FOXO3a 基因能上调 Bim 基因和下调 Bcl-2 基因的表达，可能存在 FOXO3a 抑制 Bcl-2 的表达来促进细胞凋亡的信号通路。

以上结果表明，外源性表达 FOXO3a 基因能抑制 HL60 细胞增殖、促进凋亡，从而改变其恶性表型，其可能机制是通过上调 Bim 基因和下调 Bcl-2 基因的表达来实现的。这一结果为基因治疗 AML、解决临床耐药及复发提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, et al.Therapeutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years[J].Cancer, 2008, 113(1): 1933-1952.

[2] Petrie K, Zelent A, Waxman S.Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future[J].Curr Opin Hematol, 2009, 16(2): 84-91.

[3] Bellos F, Mahlknecht U.Valproic acid and all-trans retinoic acid: meta-analysis of a palliative treatment regimen in AML and MDS patients [J].Oncology, 2008, 31(11): 629-633.

[4] Huntly B J, Gilliland D G.Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia[J].Cancer Cell, 2004, 6(3): 199-201.

[5] Essafi A, Fernandezde Mattos S, Hassen Y A, et al.Lam, Direct transcriptional regulation of BIM by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in BCR-ABL expressing cells[J].Oncogene, 2005, 24(14): 2317-2329.

[6] Tran H, Brunet A, Griffith E C, et al. The many forks in FOXO's road[J]. Sci STKE, 2003, 172: 5.

[7] Accili D, Arden K C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism differentiation and transformation[J].Cell, 2004, 117(4): 421-426.

[8] You H, Mak T W.Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors[J]. Cell Cycle, 2005, 4(1): 37-38.

[9] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(5203): 1456-1462.

[10] Yang P M, Huang W C, Lin Y C, et al .Loss of IKKbeta activity increases p53 stability and p21 expression leading to cell cycle arrest and apoptosis[J].J Cell Mol Med, 2010, 14(3): 687-698.

[11] Autret A, Martin S J.Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis[J].Mol Cell, 2009, 36(3): 355-363.

[12] Yip K W, Reed J C.Bcl-2 family proteins and cancer[J].Oncogene, 2008, 27(50): 6398-6406.

（责任编辑：冉明会）