基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1658-04

HSP90β 在 ATRA 诱导的白血病细胞株 HL60 耐药中的作用研究

蔡 倩,徐酉华,刘筱梅,郭玉霞
(重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤科,重庆 400014)

【摘 要】目的:通过检测 HSP90β 基因在白血病细胞株 HL60 及其耐药株 HL60/ATRA 中的表达差异,探讨 HSP90β 基因在 ATRA 相关多药耐药性发生中的作用。方法:采用 ATRA 浓度递增及间歇诱导法建立 HL60/ATRA 耐药细胞株;用 MTT 法和流式细胞检测技术(Flow cytometry,FCM),分别检测 HL60 和 HL60/ATRA 细胞的增殖及细胞周期;RT-PCR、Western blot 法检测 HSP90β 基因在 HL60 及 HL60/ATRA 细胞中的表达;通过 MTT 法检测 HL60 和 HL60/ATRA 细胞对常用化疗药物(VCR、CTX、VP-16、ADM)敏感性。结果:成功构建了白血病细胞耐药株 HL60/ATRA;在 mRNA 和蛋白两个水平,均检测到 HSP90β 在耐药株 HL60/ATRA 中的表达较 HL60 明显增高($P<0.01$);药敏结果显示 HL60/ATRA 细胞对 VCR、CTX、ADM、VP-16 的耐药倍数分别为 10.74、5.51、4.01、3.24。结论:ATRA 能够诱导 HL60 细胞中 HSP90β 高表达,经 ATRA 诱导后的 HL60/ATRA 细胞对抗癌药物的敏感性显著降低、耐药性增高,这提示 HSP90β 可能在 ATRA 相关多药耐药性的发生过程中发挥着重要作用。

【关键词】多药耐药;全反式维甲酸;HSP90β;HL60/ATRA
【中国图书分类法分类号】R363.1;R730.2;R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-16

Effect of HSP90β on the leukemic cell line HL60 induced by ATRA

CAI Qian, et al
(*Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the different expressions of heat shock protein 90β (HSP90β) mRNA and protein in all-trans retinoic acid (ATRA) sensitive leukemia cell line HL-60 and its resistant cell line HL60/ATRA in order to explore the effect of HSP90β on the ATRA multidrug resistance in leukemia. *Methods*: HL60/ATRA cell line was constructed by increasing ATRA concentration stepwisely and intermittently. The proliferation and sensitivity to anticancer drugs (VCR, CTX, VP-16, ADM) of HL60 and HL60/ATRA were tested by MTT assay. The cell cycle was analyzed using flow cytometry (FCM). The expression of HSP90β in HL60 cells and HL60/ATRA cells was detected with RT-PCR (reverse transcription PCR) and Western blot. *Results*: HL60/ATRA was successfully constructed. The transcription and protein expression of HSP90β in HL60/ATRA cells was higher than that of HL60 cells statistically ($P<0.01$). The drug resistant indexes of HL60/ATRA cells to VCR, CTX, VP-16 and ADM increased to 10.74, 5.51, 4.01 and 3.24, compared with HL60 cells respectively. *Conclusion*: ATRA could induce the high expression of HSP90β in HL-60 cells. The sensitivity to anticancer drugs of HL60/ATRA induced by ATRA is decreased, but drug resistance is increased, which suggests that HSP90β may play an important role in the development of ATRA multidrug resistance.

【Key words】Multidrug resistance; All-trans retinoic acid; HSP90β; HL60/ATRA

肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药机理的探讨一直是肿瘤化疗面临的难题,也是肿瘤学界研究的热点问题。通常认为,肿瘤细胞的多药耐药性是多种基因共同参与调节形成的[1-3]。全反式维甲酸(All-trans retinoic acid,ATRA)是急性早幼粒细胞白血病(Acute promyelocytic leukemia,APL)有效的诱导分化剂,成为 APL 治疗的首选药物,并广泛用于其它恶性肿瘤的治疗。但是使用 ATRA 后可以导致肿瘤细胞对 ATRA 产生耐受,并继发肿瘤细胞对多种化疗药物的耐药[4],从而使其化疗效果降低甚至治疗失败。曾有学者对 ATRA 所产生的耐药机理进行研究认为与多种因素有关[5-8],各国研究者相继设计了各种逆转 ATRA 分化耐受的策略,但效果均不理想[9],说明 ATRA 的耐药机制仍有待更深入的探讨。本研究以人急性髓系白血病细胞株 HL60 及建立的 HL60/ATRA 耐药株为模型,探讨 HSP90β 基因在 ATRA 诱导的白血病细胞耐

作者介绍:蔡 倩(1985-),女,硕士,
研究方向:小儿血液肿瘤基因治疗。
通讯作者:徐酉华,女,教授,E-mail:xuyouhua54@163.com。
基金项目:重庆医科大学校办课题资助项目(编号:XBYB2007058)。

药中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人急性髓系白血病细胞 HL60 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药物与试剂 全反式维甲酸(美国 Sigma 公司),阿霉素(ADM,pfizer Italia S.r.l),长春新碱(VCR,深圳万乐),环磷酰胺(CTX,江苏恒瑞)、依托泊甙(VP-16,江苏恒瑞)。RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),四甲基偶氮唑(MTT,美国 Sigma 公司),总 RNA 提取试剂盒(GENEMEGA 公司),逆转录试剂盒(TaKaRa 公司),胞浆蛋白及核蛋白提取试剂盒(凯基公司),HSP90β 山羊抗人多克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 耐药细胞系 HL60/ATRA 的建立 取对数生长期的 HL60 细胞 10^4 个/ml 加入 10^{-9} mol/L ATRA(0.01 μg/ml)培养 48 h 后用 RPMI1640 洗净,再用不含 ATRA 的完全培养基培养 2~3 代后提高 ATRA 浓度 1 倍,如此反复,经过 4 个月后最终诱导出在含 10^{-6} mol/L ATRA 的 RPMI1640 维持培养基中仍保持原有的细胞增殖和分化状态的细胞系,将其命名为 HL60/ATRA,并始终培养于含 ATRA 10^{-6} mol/L的 RPMI1640 维持培养基中用于实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖情况 实验分为两组:HL60 细胞组、HL60/ATRA 细胞组。将两组细胞以 10^4 个/ml 的细胞数接种于 96 孔板(200 μl/孔),其中 HL60/ATRA 细胞培养于维持培养基中,同时设立只加培养基的空白对照组。分别培养 0、1、2、3、4、5 d,然后加入 20 μl MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h 后离心,弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,振荡混匀,酶标仪检测 490 nm 波长时的吸光度 A 值,并绘制细胞生长曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布 以 1×10^5 个/ml 的细胞数传代(其中 HL60/ATRA 细胞培养于维持培养基中),培养 48 h 后,分别收集两组细胞约 5×10^6 个/ml,PBS 清洗 2 次,用 70%乙醇固定 4℃过夜,离心弃上清,PBS 洗 2 次后加入溴化丙啶(PI)染色液,流式细胞仪检测在各细胞周期时相的细胞数。

1.2.4 RT-PCR 测定 HSP90β mRNA 的表达 分别收集两组细胞,按总 RNA 提取试剂盒操作步骤提取总 RNA,逆转录成 cDNA,进行扩增。HSP90β 上游引物:5'-CCATAGCCAAATCTGGGACAAGC-3',下游引物:5'-GAAGGCGGAATA-GAAACCGACAC-3',扩增片段长度为 116 bp;GAPDH 上游引物:5'-CAGCGACACCCACTCCTC-3',下游引物:5'-TGAGGTCCACCACCCTGT-3',扩增片段长度为 109 bp,引物由上海英骏公司合成;扩增条件:95℃预变性 2 min;95℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 5 min。取 6 μl PCR 产物,进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。以同时扩增的内参 GAPDH 作为对照,靶基因条带密度与内参条带密度的比值表示 HSP90β mRNA 的表达水平。

1.2.5 Western blot 法测定 HSP90β 蛋白表达 分别收集两组细胞,提取总蛋白,用紫外分光光度仪蛋白定量,取 40 μg 样品在 10%SDS-PAGE 凝胶上电泳,半干转至 PVDF 膜上,含 5%脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h,封闭后的膜与 1:200 稀释的 HSP90β 一抗 4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,与 1:5 000 稀释的二抗孵育 1.5 h,TBST 洗膜,ECL 化学显色后用 Quantity one 软件进行吸光度分析,测定灰度值代表蛋白的表达。实验中以 β-actin 作为内参。

1.2.6 药物敏感性实验 采用 MTT 法测定两组细胞对 VCR、ADM、Vp-16、CTX 的半数抑制浓度 IC_{50}。以(2~4)×10^5 个/ml 的细胞数接种于 96 孔板(180 μl/孔),参照临床药物 VCR、ADM、VP-16、CTX 的血浆峰浓度(Peak plasma concentration,ppc),配制成 7 个药物浓度梯度,每孔加入 20 μl 不同浓度的各种化疗药物,同时设只加培养基的空白对照组。培养 48 h 后,加入 MTT 20 μl(5 mg/ml)继续培养 4 h。离心后弃上清,加入 DMSO 150 μl/孔,振荡混匀后用酶标仪测定 490 nm 波长时每孔吸光度 A 值。细胞抑制率 = (1-实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值)×100%,耐药指数(Resistant index,RI)=IC50(HL60/ATRA)/IC50(HL60)。

1.2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 统计软件,所有数据分析均采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞增殖检测结果

细胞增殖曲线显示,HL60/ATRA 细胞生长未受药物影响,与 HL60 细胞相比没有差异($P>0.05$,表 1,图 1)。

2.2 细胞周期检测

HL60/ATRA 细胞进入细胞增殖周期(G_2/S 期)的细胞占细胞总数的 47.4%,HL60 细胞进入细胞增殖周期的细胞占总数的 56.54%,二者均增殖良好($P>0.05$,表 2)。

2.3 HSP90β mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示,在 HSP90β 基因 mRNA 的转录水平,HL60 组 HSP90β/GAPDH 比值为 0.54±0.21,HL60/ATRA 组 HSP90β/GAPDH 比值为 1.37±0.28($P<0.01$,图 2)。

2.4 HSP90β 蛋白的表达

Western blot 法测定结果显示,在 HSP90β 蛋白合成水平,HL60 组 HSP90β/β-actin 比值为 0.53±0.15,HL60/ATRA 组 HSP90β/β-actin 比值为 1.34±0.34($P<0.01$,图 3)。

2.5 药物敏感性试验

HL60/ATRA 细胞对 VCR、CTX、ADM、VP-16 的 IC50 分别为 5.458±0.325、6.905±1.394、1.921±0.219、1.027±0.169,均显著高于 HL60 细胞组,耐药倍数分别为 10.74、5.51、4.01、3.24($P<0.01$,表 3)。

表 1 肿瘤细胞增殖检测结果（D 值，$n=4, \bar{x} \pm s$）

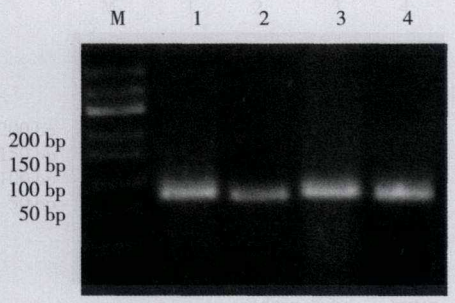
组别	培养时间（d）					
	0	1	2	3	4	5
1	0.26 ± 0.07	0.39 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.64 ± 0.06	0.78 ± 0.04	0.96 ± 0.19
2	0.28 ± 0.04	0.40 ± 0.06	0.58 ± 0.08	0.69 ± 0.06	0.79 ± 0.14	0.85 ± 0.13

注：组 1 为 HL60 细胞；组 2 为培养在维持培养基中的 HL60/ATRA 细胞，$P>0.05$，与 HL60 细胞组比较

表 2 肿瘤细胞细胞周期检测结果（$n=3, \bar{x} \pm s$）

细胞	细胞周期的细胞数（%）		
	G_1	S	G_2
HL60	46.79 ± 10.24	47.07 ± 8.24	9.47 ± 5.20
HL60/ATRA	52.63 ± 1.75	37.46 ± 1.66	9.94 ± 2.92

注：$P>0.05$，与 HL60 细胞相比较



注 M. 50 bpMarker; 1. 对照组内参; 2. 对照组; 3. 实验组内参; 4. 实验组

图 2 RT-PCR 检测到 HL60 和 HL60/ATRA 细胞 HSP90β mRNA 的表达

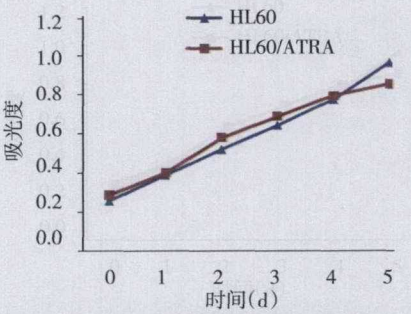


图 1 瘤细胞增殖检测结果示意

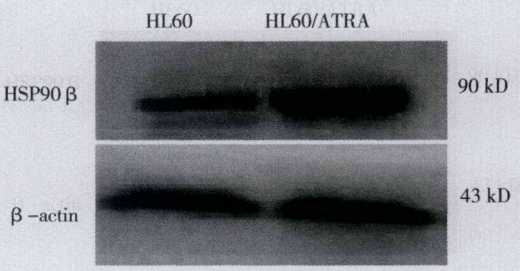


图 3 Western blot 法测定 HL60 和 HL60/ATRA 组细胞 HSP90β 的蛋白表达

表 3 瘤细胞化疗药物敏感性实验结果（$n=3, \bar{x} \pm s$）

药物	半数抑制浓度（IC_{50}）		耐药指数
	HL60	HL60/ATRA	RI
VCR	0.508 ± 0.033	5.458 ± 0.325	10.74
ADM	0.479 ± 0.001	1.921 ± 0.219	4.01
CTX	1.253 ± 0.071	6.905 ± 1.394	5.51
VP-16	0.317 ± 0.040	1.027 ± 0.169	3.24

注：$P<0.01$，与 HL60 细胞相比较

3 讨 论

HSP90（Heat shock protein 90，HSP90）是热休克蛋白家族中的重要成员之一，其主要功能是作为分子伴侣，保护细胞免受有害应激因素破坏[10]。在较高等的真核生物中，HSP90以其是否含有丰富的谷氨酰胺片段而分为 HSP90α 和HSP90β 两类。目前多项研究已经证实，HSP90 基因的表达与肿瘤的发生密切相关，已成为抗肿瘤研究的热门靶点。HSP90α 通过调节细胞周期促进肿瘤细胞增殖，HSP90β 能够抑制细胞凋亡与分化，并可能参与了肿瘤细胞耐药[11]。HSP90 能够使细胞对诱导细胞凋亡的药物产生抗性，此作用可能是通过下调细胞凋亡相关基因、蛋白和蛋白酶活性（如 SAPK/JNK 和 caspases-3 ）等从而拮抗细胞凋亡的。在多种肿瘤组织或细胞中可看到 HSP90β 通过与 bcl-2 结合形成异源复合物，使 bcl-2 的稳定性增强。因此推想，HSP90β 参与耐药机制可能与 bcl-2 的等凋亡相关信号通路有关[12]。最近有研究发现 HSP90 与受体酪氨酸激酶 ErbB2 结合可能参与激酶活性和稳定性的调节[13]。Manik 等[14]发现 HSP90α 和 HSP90β 是信号途径 IL-6R/STAT3 和 MAPK 的共同靶基因，而联合阻断这两个信号途径可抑制骨髓微环境介导的多发性骨髓瘤细胞的存活。对 HSP90 在肿瘤细胞中功能的研究多集中于对 HSP90α 的探讨，对 HSP90β 在白血病耐药方面的研究报道尚不多见。由此，我们拟探讨此靶基因对白血病治疗中耐药性的影响。

实验采用人急性髓系白血病细胞株 HL60 为模型，小剂量、多次、渐进 ATRA 处理 HL60 细胞，成功构建耐 ATRA 分化作用的细胞模型 HL60/ATRA。HL60/ATRA 耐药株与 HL60 细胞株相比较，其细胞增殖能力和细胞周期无统计学差异

($P>0.05$)。说明在 HL60/ATRA 细胞生长过程中并没有出现明显的细胞凋亡,HSP90β 可能在其中起到抗凋亡的作用。

我们检测了 HL60 及 HL60/ATRA 细胞中 HSP90β 基因的表达情况。RT-PCR 结果表明,在 HSP90β 基因的转录水平,HSP90β 在 HL60/ATRA 细胞中的表达显著高于 HL60 细胞($P<0.01$);Western blot 法分析结果显示,在 HSP90β 基因的蛋白表达水平,HSP90β 在 HL60/ATRA 细胞中的表达也显著高于 HL60 细胞($P<0.01$);通过药物敏感试验检测到 HL60/ATRA 细胞对常用化疗药物 VCR、CTX、VP-16、ADM 的耐受性明显增高,耐药倍数 3~10 倍不等。因此我们推测,HSP90β 通过与细胞内相关客户蛋白及蛋白酶结合,更加增强了对白血病细胞的保护作用,使 ATRA 诱导后的 HL60/ATRA 细胞对抗癌药物的敏感性降低、耐药性增高。这提示 HSP90β 基因可能参与了 ATRA 相关多药耐药过程。

综上所述,HSP90β 基因在 ATRA 相关多药耐药性的发生过程中可能发挥着重要作用,这一结果为我们以后继续研究 HSP90β 基因参与肿瘤多药耐药性的发生、发展机制提供了重要线索。

参 考 文 献

[1] Douer D.New advances in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. Int J Hematol, 2002, 76(2): 179-187.

[2] Gueddari N, Madoulet C, Lefebvre P, et al. Partial restoration of all trans retinoic acid (ATRA) sensitivity by compactin in ATRA-resistant leukemic cells(ATRA-R HL-60)[J]. Leuk Res, 2000, 24(6): 543-548.

[3] Damiani D, Michieli M, Michelutti A, et al. Antibody binding capacity for evaluation of MDR-related proteins in acute promyelocytic leukemia: Onset versus relapse expression[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2004, 59(1): 40-45.

[4] Degos L.The history of acute promyelocytic leukemia[J]. Br J Haematol, 2003, 122(4): 539-553.

[5] Quere R, Baudet A, Cassinat B, et al. Pharmacogenomic analysis of acute promyelocytic leukemia cells highlights CYP26 cytochrome metabolism in differential all-trans retinoic acid sensitivity[J]. Blood, 2007, 109(10): 4450-460.

[6] Casale F, D'Angelo V, Addeo R, et al. P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Oncol Rep, 2004, 12(6): 1201-1207.

[7] Stromskaya T P, Rybalkina E Y, Zabotina T N, et al. Influence of RARalpha gene on MDR1 expression and P-glycoprotein function in human leukemic cells[J]. Cancer Cell Int, 2005, 24(5): 15-23.

[8] Moreb J S, Mohuczy D, Muhoczy D, et al. RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide[J]. Cancer Chemotherapy Pharmacology, 2007, 59(1): 127-136.

[9] Palozza P, Serini S, Torsello A, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by beta-carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: possible involvement of a redox mechanism [J]. Int J Cancer, 2002, 97(5): 593-600.

[10] Caplan A J. Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies[J]. Trends Cell Biol, 1999, 9(7): 262-268.

[11] Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, et al. Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by hsp90 beta[J]. Anticancer Drugs, 1996, 7(8): 838-845.

[12] Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, et al. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90β[J]. Blood, 2006, 107(4): 1413-1420.

[13] Xu WP, Yuan XT, Beebe K, et al. Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity[J]. Molecular and Cellular Biology, 2007, 27(1): 220-228.

[14] Manik C, Sarika J, Thorsten St, et al. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins90 α and β in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival[J]. Blood, 2007, 109(2): 720-728.

(责任编辑:关蕴良)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132