DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.022
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1069-04

论著

HOXB1基因转染对HL-60细胞视黄酸代谢和α-干扰素表达的影响

韦 娜,糜漫天,郎海滨 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨同源盒基因B1(HOXB1)转染对HL-60细胞视黄酸代谢和α-干扰素表达的影响。方法 采用脂质体介导的质粒转染、RT-PCR及高效液相色谱(HPLC)分析等方法进行分析检测。结果 2.5×10^{-7} mol/L全反式视黄酸(ATRA)能抑制HOXB1转染及非转染HL-60细胞的增殖,HOXB1的高表达能明显减弱ATRA对HL-60细胞的增殖抑制作用;HPLC分析显示,转染细胞ATRA的代谢减慢;ATRA处理能诱导HOXB1转染及未转染HL-60细胞IFNα表达,加用外源性IFNα能上调ATRA处理HL-60细胞IFNα基因表达。结论 HOXB1转染使HL-60细胞ATRA代谢受抑,ATRA增殖抑制作用减弱,外源性IFNα能上调HL-60细胞IFNα表达。

关键词:基因转染;同源盒基因B1;视黄酸代谢;IFNα表达;白血病细胞
中图法分类号:R733.71 文献标识码:A

Effects of human Homeobox B1 gene transfection on retinoic acid metabolism and IFNα expression HL-60 cells

WEI Na, MI Man-tian, LANG Hai-bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical Uuniversity, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of human Homeobox B1 gene (HOXB1) on retinoic acid (RA) metabolism and IFNα expression in promyelocyte leukemic cell line HL-60. Methods Plasmid transfection mediated by liposomal reagent, high performance liquid chromatograph (HPLC) analysis and RT-PCR were used to analyze the metabolism and expression. Results All-trans RA (ATRA) of 2.5×10^{-7} mol/L inhibited the proliferation of HL-60 cells with or without HOXB1 gene transfection. High expressed HOXB1 could alleviate the inhibition. HPLC analysis revealed that HOXB1 transfection could reduce the metabolism of ATRA in HL-60 cells. Additionally, ATRA treatment could induce IFNα expression in HOXB1 gene transfection cells and non transfection cells, but the use of exogenous IFNαcombined with ATRA increased IFNα mRNA level in HL-60 cells. Conclusion The metabolism of ATRA is inhibited in HL-60 cells with HOXB1 gene transfection and its inhibitory effect on the cell proliferation is alleviated too. Exogenous IFNα can up-regulate the expression of IFNα in HOXB1 gene transfection HL-60 cells.

Key words: gene transfer; Homeobox B1 gene; retinoic acid metabolism; IFNα expression; leukemic cells

在哺乳动物体内,同源盒基因(Homeobox genes, HOX)与胚胎发育和造血细胞生长关系密切。研究显示,HOXB1基因的异常表达与白血病细胞生成有关[1,2]。视黄酸(Retinoic acid, RA)作为一种有效的诱导分化剂,不但与胚胎发育、组织发生及器官的形成有关,还被广泛用于急性早幼粒细胞白血病(APL)的诱导分化治疗。有研究证明,HOX基因启动子区域有视黄酸反应元件(Retinoic acid response elements, RARE),RAR和RXR(RA胞内核受体)与相应配体结合而被活化成转录因子,后者与位于HOX基因启动子区域内的高亲和性顺式反应元件(RAREs)作用活化该基因表达,因此推测,RA对HOX基因表达的影响是其调节细胞分化的关键环节之一。本实验旨在探讨HL-60细胞HOXB1基因的异常高表达与胞内全反式视黄酸(ATRA)代谢、RA诱导分化治疗敏感性的相互关系。

基金项目:全军"九五"科研基金资助项目(98M093)
作者简介:韦 娜(1973-),女,重庆市南川县人,实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752291
收稿日期:2000-02-21;修回日期:2000-05-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 试剂

DOTAP 转染试剂盒、质粒 DNA 快速抽提试剂盒、DNA 片段快速回收试剂盒、TripureTM 分离试剂均为宝灵曼公司产品，Rnase 抑制剂、Oligd(T)18、Taq 酶、M-MLV 逆转录酶、dNTP、Lambda DNA/ *Eco*RⅠ＋*Hind*Ⅲ marker、GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder 为 Sangon 公司产品，IFNα 和β-actin PCR 扩增引物由 Sangon 公司合成，全反式视黄酸(All-tran retinoic acid，ATRA)、TPA 购自 Sigma 公司，人重组 IFNα 购于深圳先科制药有限公司。

1.2 主要仪器

PTC-100 多功能 PCR 仪(MJ Research，Inc)，Waters 810 高效液相色谱仪，Farstar Plus 流式细胞仪，紫外透照仪及一次成像系统。

1.3 细胞株的培养与实验分组

1.3.1 细胞株 HL-60(人早幼粒细胞白血病)细胞株由中国科学院上海细胞所提供。细胞在含 10% 热灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中常规传代。

1.3.2 实验分组 实验设未转染对照细胞＋ATRA 组、空载体转染细胞＋ATRA 组、转染细胞＋ATRA 组、转染细胞＋ATRA＋IFN 组和未转染细胞非 ATRA 处理组。ATRA 处理细胞终浓度为 2.5×10^{-7} mol/L。

1.4 质粒的提取、鉴定

HOXB1 质粒由 Evans M.R 教授惠赠，将质粒转入大肠杆菌中扩增，而后用宝灵曼公司质粒提取试剂盒提取质粒，测量质粒浓度、纯度，行酶切鉴定。

1.5 脂质体介导的质粒转染

取质粒溶液(HOXB1 质粒浓度为 0.12 μg/μl)25 μl(相当于 HOXB1 质粒 3 μg)与 25 μl 20 mmol/L HEPES(pH 7.4) 进行转染试验，详细步骤参见转染试剂盒。转染 HL-60 细胞(细胞密度为 1.8×10^5 个/ml) 37℃，5% CO_2 培养 48 h，细胞生长接近融合时 1∶4 传代，当细胞生长至 70% 融合时 600 μg/ml G418 加入培养液中进行筛选。同时，以相同剂量 G418 处理未转染细胞和空载体对照组细胞 6 d 后，对照组及空载体组细胞均死亡，将 G418 浓度降至 200 μg/ml 维持筛选。

1.6 RNA 提取与纯度鉴定

HOXB1 质粒转染并经 G418 筛选获得稳定表达的 HL-60 细胞，一定剂量 ATRA 和 IFNα 处理 3 d 后，用 Promega 公司 Tripure™分离试剂提取 $3\times10^6\sim5\times10^6$ 个细胞总 RNA，详细步骤参见试剂盒说明书。以紫外分光光度计检测 RNA 含量及 D_{260}/D_{280}比值，RNA 保存于－70℃备用。

1.7 逆转录及 PCR 扩增

1.7.1 RNA 提取及逆转录 上述方法提取的总 RNA 3 μg 65℃、5 min 后加入 RNA 酶抑制剂、dNTP、Oligd(T))及逆转录酶，反应总体为 20 μl，37℃、1 h 进行逆转录，70℃、10 min 灭活逆转录酶。

1.7.2 PCR 扩增引物 IFNα 上游引物为 5' CAGTTCCAGAAGGCTCAA GC-3'，下游引物为 5'-ACCTCCTGCATCATACAGGC-3'，扩增片段 173 bp；Human β-actin 上游引物为 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA-C-3'，下游引物为 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'，扩增片段 348 bp。

1.7.3 PCR 扩增条件 反应总体积 50 μl，加入膜板 DNA 0.75 μg，待扩增片段上游和下游引物终浓度为 0.3 μmol/L，95℃变性 5 min 后加 5.0 U Taq DNA 聚合酶。扩增 IFNα 和β-actin 片段反应参数为 94℃ 1 min，61℃ 1 min，72℃ 2 min，共 32 个循环，最后一个循环后 72℃延伸 10 min。取 4 μl 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，检查有无特异扩增带。

1.8 细胞周期分析

2.5×10^{-7} mol/L ATRA 处理细胞 3 d，碘化丙啶染色后用流式细胞仪对 DNA 进行定量分析，再结合计算机软件推算出各细胞周期相细胞所占比例，并计算增殖指数(PI)。

$$PI=G_0/G_1+S/G_0/G_1+S+G_2/M$$

1.9 HPLC 分析 ATRA 代谢

各实验组以 2.5×10^5 个/ml 细胞悬液 2 ml 加入到 24 孔培养板中，2.5×10^{-7} mol/L ATRA 处理细胞 3 d，同时设未处理组对照。收集细胞及培养液，反复冻溶裂解细胞，15 000× g、5 min，吸取上清液，用 2∶1(*V*/*V*)氯仿/甲醇加入到上清液中，充分混匀，静置 1 h，吸取下层氯仿层，避光条件下置于弱氮气下吹干，以 200 μl 氯仿定容后采用反相高效液相色谱法检测 ATRA 含量，间接反应 ATRA 代谢，结果以 nmol/L 表示。

2 结果

2.1 HOXB1 转染对 HL-60 细胞 ATRA 代谢的影响

HPLC 分析显示见图 1、2，单纯 HOXB1 转染及转染细胞加入重组 IFNα 均能抑制 HL-60 细胞 ATRA 代谢，尤以单纯 HOXB1 转染作用明显。

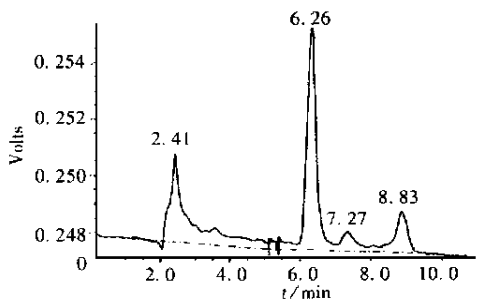


图 1 **HL-60** 细胞全反式视黄酸的 **HPLC** 分析图谱

Fig 1 HPLC analysis of ATRA in HL-60 cells

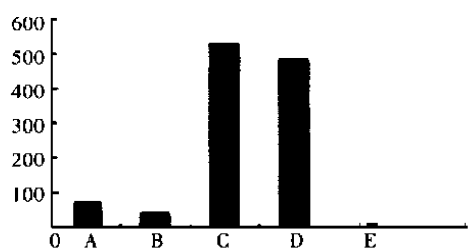


图 2 **HOXB1** 质粒转染对 **HL-60** 细胞 **ATRA** 代谢的影响

Fig 2 Effects of HOXB1 transfection on the metabolism of ATRA in HL-60 cells

A: Control; B: Control vector; C: Hox transfection; D: Hox transfection＋IPN (A、B、C、D) ATRA treated for 3 days); E: Negative control (without ATRA)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　HOXB1 转染对HL-60 细胞增殖能力的影响及A-TRA 处理的效应

2.5×10^{-7} mol/ L ATRA 能显著抑制 HOXB1 转染及未转染 HL-60 细胞的增殖, 使其受阻于 G_0/G_1 期, HOXB1 的高表达可使 ATRA 增殖抑制作用减弱, HOXB1 转染细胞加用外源性重组 IFNα 后对 ATRA 增殖抑制的拮抗更为明显, 见表 1。

表 1　**HOXB1** 基因转染对 **HL-60** 细胞增殖周期的影响

Tab 1　Effect of HoxB1 gene transfection on the cell cycle in HL-60 cells

Group	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
Control	86.7	8.2	5.1	0.133
Vector control	84.6	11.3	4.1	0.154
HoxB1	82.2	12.2	5.6	0.178
HoxB1+ IFN	77.6	15.9	6.5	0.224
*Negative control	57.0	34.7	8.4	0.431

Above data represented results of 3 samples.　*: without A-TRA treatment

2.3　HOXB1 转染对HL-60 细胞 IFNα 表达的影响及 ATRA 处理的效应

本研究采用 RT-PCR 法未检测到野生型 HL-60 细胞 IFNα 的表达, 但 ATRA 处理能诱导 HOXB1 转染及未转染 HL-60 细胞 IFNα 表达, 外源性重组 IFNα 能明显增强 ATRA 处理 HL-60 细胞 IFNα 表达, 见图 3。



图 3　**HL-60** 细胞 **IFNα mRNA** 逆转录 **PCR** 分析

Fig 3　RT-PCR analysis of IFNα mRNA in plasmid transfection HL-60 cells

1: DNA marker; 2: Untransfected cells + ATRA; 3: Control vector + ATRA; 4: Transfected cells+ ATRA; 5: Transfected cell+ IFNα+ ATRA; 6: Negative cells (with no ATRA in untransfected cells)

3　讨论

HOX 基因在调节造血干/祖细胞的发育方面起重要作用[3], 有研究显示, HOXB6 和 HOXB9 mRNA 在 HL-60 细胞中低水平表达, 用全反式视黄酸处理 3 d, HOXB6 和 HOXB9mRNA 表达增多。此外, HOXB8 的异常表达能抑制 DMSO、G-CSF 诱导的 HL-60 细胞及 32Dc13 造血前体细胞的分化成熟, 以上研究提示, HOX 基因不但参与正常的造血调控, 还与白血病的形成、诱导分化治疗敏感性密切相关[4,5]。

目前 RA 已被广泛用于白血病、尤其是急性早幼粒细胞白血病(APL)的诱导分化治疗, 但单用 RA 治疗获得完全临床缓解难以维持, 且 RA 治疗过的病人复发后会出现对 RA 的抵抗。本实验结果显示, HOXB1 的高表达可明显抑制 HL-60 细胞 ATRA 代谢、使 ATRA 增殖抑制作用减弱, HOXB1 转染细胞加用外源性重组 IFNα 后对 ATAR 代谢的影响与单纯转染组无显著差异, 但对 ATRA 的增殖抑制的拮抗则更明显。有研究认为, RA 诱导分化的抵抗与 RA 加速代谢为 RA 的极性代谢物 4-OXO-RA, 致使患者血浆 RA 水平快速降低有关。但近来已证实 4-OXO-RA 能以 RA 相同的亲和力与 RARβ 结合, 提示 RA 的极性代谢物可能在 RAR 介导的信号传递过程中也起重要作用, RA 代谢物在介导 RA 功能方面是有活性的[6]。本研究 RA 代谢减慢后, 其对细胞的增殖抑制作用减弱可能与 RA 极性代谢产物降低有关。本实验还显示, 野生型 HL-60 细胞不表达 IFNα, ATRA 处理能诱导 HOXB1 转染及未转染 HL-60 细胞 IFNα 表达, 外源性重组 IFNα 能明显增强 ATRA 处理 HL-60 细胞 IFNα 表达。以往也发现 RA 可诱导 NB4 细胞合成 IFNα, 且 IFNα 能协同 RA 诱导细胞增殖抑制、促进细胞分化成熟[7], 本研究加入外源性 IFNα 后不但未增强 RA 对 HL-60 细胞的增殖抑制, 反而减弱其效应, 原因可能与 IFNα 对细胞功能的双向调节作用或使用剂量有关。

有研究提示, RA 能通过 3 条信号传导通路控制 HOXB1 基因的表达, 其中第 1、第 2 条通路以活化 HOXB1 启动子 5' 或 3' RARE 发挥作用, 第 3 条通路为 HOXB1 基因启动子邻近区域的一个自动调节位点调节, 三者间建立了 RA 诱导 HOXB1 基因表达的机制[8]。野生型 HL-60 细胞是否有 HOXB1 基因表达尚不清楚, 本实验将外源性 HOXB1 介导入 HL-60 细胞, 使其在该细胞中稳定的表达, 结果证实 HOXB1 在 HL-60 细胞中的异常表达能干扰 ATRA 的代谢, 降低 A-TRA 生物学功效。这种作用是 HOXB1 大量表达, 影响了控制 ATRA 代谢的细胞色素氧化酶 p450(CYP)表达及活性, 还是大量 ATRA 与 HOXB1 靶基因 RARE 结合而得以保留尚需进一步探讨。

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Michael A, Bremmer P. Sequence characterisation and expression of homeobox HOX A7 in the multi-potential erythroleukaemic cell line TF-1[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1 442(2—3): 329—333.

[2] Ognra T, Evans R M. Retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(2): 387—391.

[3] Shen W F, Largman C, Lowney P, *et al*. Lineage-restricted expression in homeobox-containing genes in human hematopoietic cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(21): 8 536—8 540.

[4] Ohnishi K, Tobita T, Sinjo K, *et al*. Modulation of homeobox B6 and B9 genes expression in human leukemia cell lines during myelomonocytic differentiation[J]. Leuk Lymphoma, 1998, 31(5—6): 599—608.

[5] Shimamoto T, Ohyashiki K, Toyama K, *et al*. Homeobox genes in hematopoiesis and leukemogenesis[J]. Int J Hematol, 1998, 67(4): 339—350.

[6] Takatsuka J, Takahashi N, Luigi M, *et al*. Retinoic acid metabolism and inhibition of cell proliferation: An unexpected liaison[J]. Cancer Res, 1996, 56(4): 675—678.

[7] Chelbi-Alix M K, Pelicano L. Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA-resistant APL cells[J]. Leukemia, 1999, 13(8): 1 167—1 174.

[8] Ognra T, Evans R M. Evidence for two distinct retinoic acid response pathways for HOXB1 gene regulation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(2): 392—396.

（编辑 陈聪连）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)11-1072-01

早期新生儿高胆红素血症的诊疗探讨

Study on the diagnosis and treatment of early neonatal hyperbilirubinemia

黄 宁 （海军总医院小儿科，北京 100037）

早期新生儿高胆红素血症诊断治疗不及时，若并发胆红素脑病可造成死亡或残疾。因此对高胆红素血症的早期诊断及防治非常重要。

1 资料和方法

1.1 临床资料

1994～1995 年日本マット病院新生儿科共收治患儿 617 例，诊断为早期高胆红素血症 340 例。高胆红素血症标准与光疗标准相同，见表 1。受试组一旦血清胆红素值按出生体重及日龄达到光疗标准即进行光疗[1,2]。另外以我院儿科 1980～1995 年 15 年收治的早期高胆红素血症 200 例作对照组，我院高胆红素血症诊断标准，足月儿为≥205 μmol/L(120 mg/L)，早产儿为≥256.5 μmol/L(150 mg/L)。

1.2 治疗措施

1.2.1 蓝光治疗 实验组出生 1 周内每日采用微量法复查胆红素，若有高危因素如：(1)窒息；(2)呼吸窘迫；(3)代谢性酸中毒；(4)低体温；(5)溶血；(6)感染等，光疗指证则降低一个标准，按日龄计减去 1 d 诊断高胆红素血症进行光疗。例如生后 3 日龄按 2 日龄标准诊断高胆红素血症。光疗期间每日复查 2 次胆红素，光疗后如果胆红素值低于日龄标准 20～30 mg/L 即中止光疗。次日查胆红素值，按日龄如果达到高胆红素血症标准再予光疗，见表 1。

表 1 新生儿高胆红素血症的光疗(P)、换血(ET)标准(血清胆红素 mg/dl)

出生体重	＜24 h	＜48 h	＜72 h	＜96 h	＜120 h	＜5 d
	P/ET	P/ET	P/ET	P/ET	P/ET	P/ET
＜1 000 g	5/8	6/10	6/12	8/12	8/15	10/15
＜1 500 g	6/10	8/12	8/15	10/15	10/18	12/18
＜2 500 g	8/10	10/15	12/18	15/20	15/20	15/20
≥2 500 g	10/12	12/18	15/20	18/22	18/25	18/25

胆红素浓度 1 mg/dl=17.1 μmol/L

1.2.2 白蛋白辅助治疗 实验组仅限于早期使用，用于低蛋白血症(血清蛋白≤50 g/L 或白蛋白≤25 g/L)。白蛋白按 1 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 连续 2～3 d。对照组以血清胆红素达到前述高胆红素血症标准开始光疗。直至肉眼观察黄疸消失或轻度黄疸才停止光疗。全部患儿予白蛋白或血浆辅助治疗。白蛋白按 1 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，血浆 10 $ml \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，静滴连续 2～3 d。全部患儿予地塞米松 0.5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 静滴连续 3～5 d，鲁米那 5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$

（下转 1076 页）

作者简介：黄 宁(1943—)，女，湖北省洪湖县人，主任医师，主要从事小儿哮喘方面的研究，发表论文 20 余篇。(010)68587733-958407

收稿日期：1999-01-30；修回日期：1999-05-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net