

rLukS-PV 体外诱导人急性髓系白血病细胞 THP-1 分化作用研究

章成芳, 马筱玲, 戴春阳, 孙晓曦

摘要 目的 研究金黄色葡萄球菌 PV-杀白细胞毒素亚组分(LukS-PV)对人急性髓系白血病细胞 THP-1 的诱导分化作用,为寻求白血病新的靶向治疗药物奠定基础。方法 分别采用 0、0.50、1.00、1.50 $\mu\text{mol/L}$ 体外重组 PV-杀白细胞毒素亚组分 LukS-PV(rLukS-PV) 体外刺激 THP-1 细胞 24、48 h。倒置显微镜、瑞氏-吉萨姆染色镜检等方法观察 rLukS-PV 作用前后细胞的形态学变化,流式细胞术检测细胞表面特异性抗原 CD11b、CD14,荧光显微镜观察细胞吞噬功能。结果 经 rLukS-PV 刺激的 THP-1 细胞由分散、悬浮转变为黏附、贴壁,且呈梭形。细胞体积增大,胞质增多,核质比例缩小,细胞核呈肾形、三角形或不规则形,偏于一侧。细胞表面 CD11b、CD14 表达增加,以 CD14 增加较为显著。细胞对荧光颗粒吞噬功能明显增强。以上作用有明显的时间和剂量依赖性。结论 rLukS-PV 具有诱导 THP-1 细胞向单核-巨噬细胞定向分化的作用,有望成为一种新的髓系白血病靶向治疗药物。

关键词 PV-杀白细胞毒素; THP-1 细胞; 诱导分化

中图分类号 R 733.713

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0280-06

诱导分化疗法是当前白血病治疗的主要方法之一。该方法与传统的化疗区别在于不杀伤肿瘤细胞,而是诱导其向正常或接近正常的细胞分化,同时逆转肿瘤细胞增殖、浸润、转移等恶性表型。全反式维甲酸(all-*trans*-retinoic acid, ATRA)为研究较为广泛的分化诱导剂之一,在临床上用于诱导治疗急性早幼粒细胞白血病已取得了较高的完全缓解率^[1],但该药对其他亚型急性髓系白血病疗效不佳,且存在容易复发和产生耐药性的问题,所以寻找新的白血病治疗诱导剂是医学领域亟待解决的问题。LukS-PV 是金黄色葡萄球菌分泌的 PV-杀白细胞素(Panton-Valentine leucocidin, PVL)两个组分之一。PV-杀白细胞素是一种细胞穿孔毒素,含有 LukS-PV(33 ku)和 LukF-PV(34 ku)两个组分,研究^[2]表明,单组分 rLukS-PV 对靶细胞的毒性明显减低,但仍保留诱导靶细胞凋亡的活性。本实验组前期已研究证

实 rLukS-PV 具有抑制 THP-1 细胞增殖诱导凋亡和细胞周期阻滞等作用^[3]。但对于重组 PV-杀白细胞毒素亚组分 LukS-PV(recombinant LukS-PV, rLukS-PV)是否具有诱导 THP-1 细胞分化的作用未见研究报道。该实验以原单核白血病细胞株 THP-1 为模型,对 rLukS-PV 诱导白血病细胞分化作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料 白血病细胞株 THP-1(中科院上海细胞研究所); RPMI 1640 培养基和新生胎牛血清(美国 Gibco 公司); 蛋白纯化试剂盒(德国 Novagen 公司); FITC 偶联的抗人 CD11b 单克隆抗体、PE 偶联的抗人 CD14 单克隆抗体(美国 eBioscience 公司); 0.5 μm 绿色荧光颗粒(美国 Polysciences 公司); 细胞培养瓶、6 孔板(美国 Corning 公司); CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EPICS XL-2 流式细胞仪(美国 COULTER 公司); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 THP-1 细胞培养于 RPMI-1640 培养基(含 100 U/ml 青霉素 G、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素和 10% 胎牛血清)培养,并置于 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养,每 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 rLukS-PV 蛋白的表达与纯化及蛋白的定量

本课题组前期构建了重组表达载体 pET28a-LukS-PV,并转化入大肠埃希菌(*E. coli*) BL21(DE3),-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。按常文娇等^[4]实验方法进行 rLukS-PV 蛋白表达和纯化。按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作检测重组蛋白浓度。

1.2.3 rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞形态学观察 取对数生长期的 THP-1 细胞,将细胞浓度调整为 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5/\text{ml}$,分别加入 0(对照组)、0.50、1.00、1.50 $\mu\text{mol/L}$ rLukS-PV 与细胞共培养。分别于培养 24、48 h 后,通过相差显微镜、瑞氏染色镜检等方法观察细胞形态改变。

1.2.4 细胞表面特异性抗原的检测 收集 rLukS-PV 与 THP-1 细胞共培养 24、48 h 后细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,加

2014-11-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH188)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001

作者简介:章成芳,女,硕士研究生;

马筱玲,女,教授,研究生导师,责任作者,E-mail: xiaoling-

ma@126.com

入 5 μl FITC-CD11b 和 5 μl PE-CD14 荧光抗体双标样品细胞 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 预冷 PBS 洗涤 1 次 200 μl PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行测定。

1.2.5 细胞吞噬功能的检测 根据 Gaurnier-Hausser et al^[5] 实验方法, 将 0.5 μm 的绿色荧光颗粒稀释浓度为 5×10^{11} /ml, 向各组细胞中加入荧光颗粒, 浓度为 25 μl /ml 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 收集细胞, 冷 PBS 洗涤 5 次去除未吞噬荧光颗粒, 荧光显微镜涂片观察细胞吞噬功能。

1.2.6 qRT-PCR 检测信号通路基因表达 收集 rLukS-PV 与 THP-1 细胞共培养 48 h 后细胞悬液, 收集细胞, 抽提细胞 RNA 并逆转录为 cDNA 根据 abm EvaGreen 2X qPCR MasterMix 实验方法, 以 β -actin 作为内参, 使用 ABI7500PCR 仪进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据之间比较采用

方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 原单核白血病细胞 THP-1 正常情况下呈圆形, 悬浮生长, 经 rLukS-PV 作用后, 部分 THP-1 细胞呈贴壁生长, 且形状呈梭形。形态学上具有向巨噬细胞分化的特征。随着作用时间延长, 48 h 细胞贴壁生长程度及数量明显高于 24 h; 且随着 rLukS-PV 作用浓度的增加, 细胞贴壁程度增加。rLukS-PV 诱导 THP-1 细胞贴壁生长呈时间和剂量依赖性。见图 1。rLukS-PV 作用 THP-1 细胞后, 细胞涂片进行瑞氏染色, 光镜下观察细胞形态学发生明显变化。表现为细胞体积增大, 胞质增多, 核质比例缩小, 核偏于一侧, 细胞核呈肾形、三角形或不规则形。且随着作用时间和作用剂量增加, 细胞分化增多, 呈时间和剂量依赖性。见图 2、3。

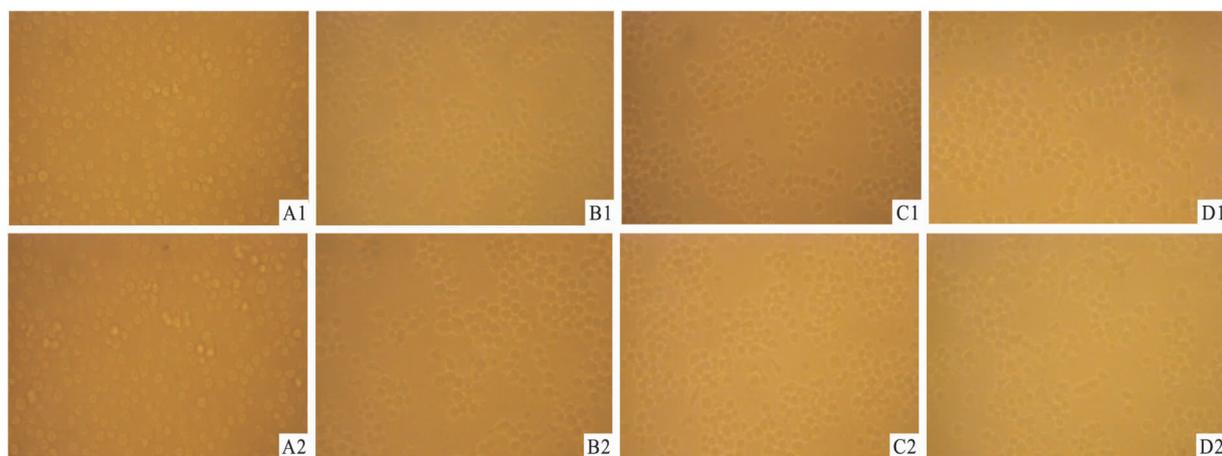


图1 rLukS-PV 对 THP-1 细胞形态学的影响 $\times 400$

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 组; C: rLukS-PV 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 组; D: rLukS-PV 1.50 $\mu\text{mol/L}$ 组; 1: 24 h; 2: 48 h

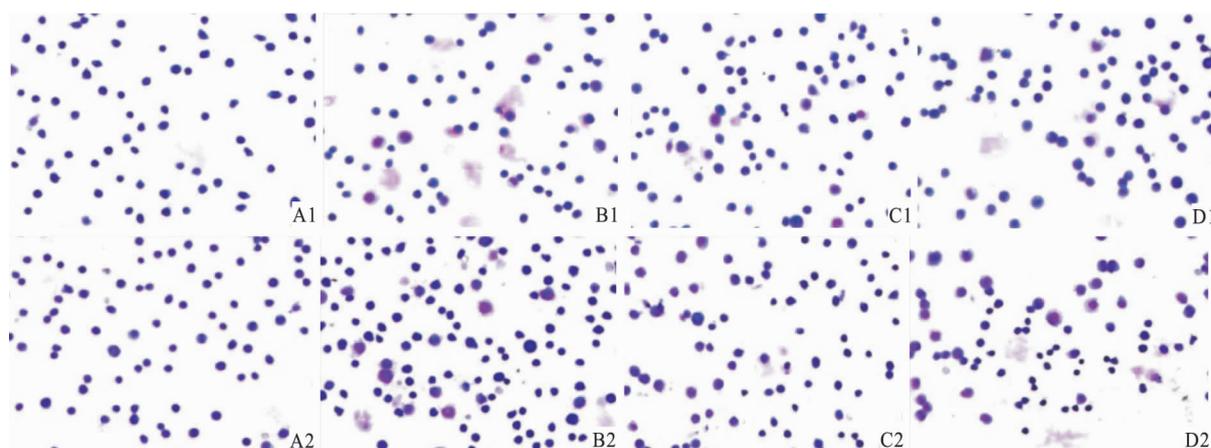


图2 rLukS-PV 对 THP-1 细胞形态学的影响 瑞氏-吉萨姆染色 $\times 400$

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 组; C: rLukS-PV 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 组; D: rLukS-PV 1.50 $\mu\text{mol/L}$ 组; 1: 24 h; 2: 48 h

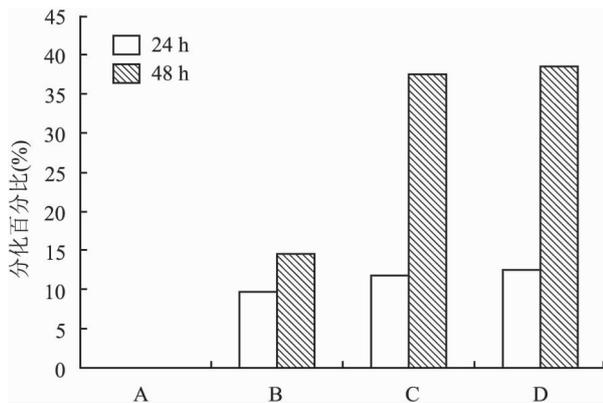


图3 rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞 24、48 h 后形态学上观察细胞分化的百分比

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 μmol/L 组; C: rLukS-PV 1.00 μmol/L 组; D: rLukS-PV 1.50 μmol/L 组

2.2 细胞表面抗原 CD11b 和 CD14 的表达 流式细胞术检测 rLukS-PV 处理 THP-1 细胞后细胞表面抗原 CD11b 和 CD14 的表达,结果显示,rLukS-PV 作用 THP-1 细胞 24、48 h 后,其表面抗原 CD11b 和 CD14 表达率均有增加,且 CD14 显著增加。见图 4、5。作用 48 h 后,CD11b 和 CD14 的表达均较 24 h 上调,呈时间依赖关系。在同一时间点,不同浓度 rLukS-PV (0、0.50、1.00、1.50 μmol/L) 实验组 CD11b 和 CD14 表达均随 rLukS-PV 浓度的增加而增加 ($F_{24} = 36.53, F_{48} = 26.57, P < 0.01; F_{24} = 46.48, F_{48} = 277.20, P < 0.01$)。见图 6。结果提示 rLukS-PV 具有诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化的潜能,且呈时间和剂量依赖性。

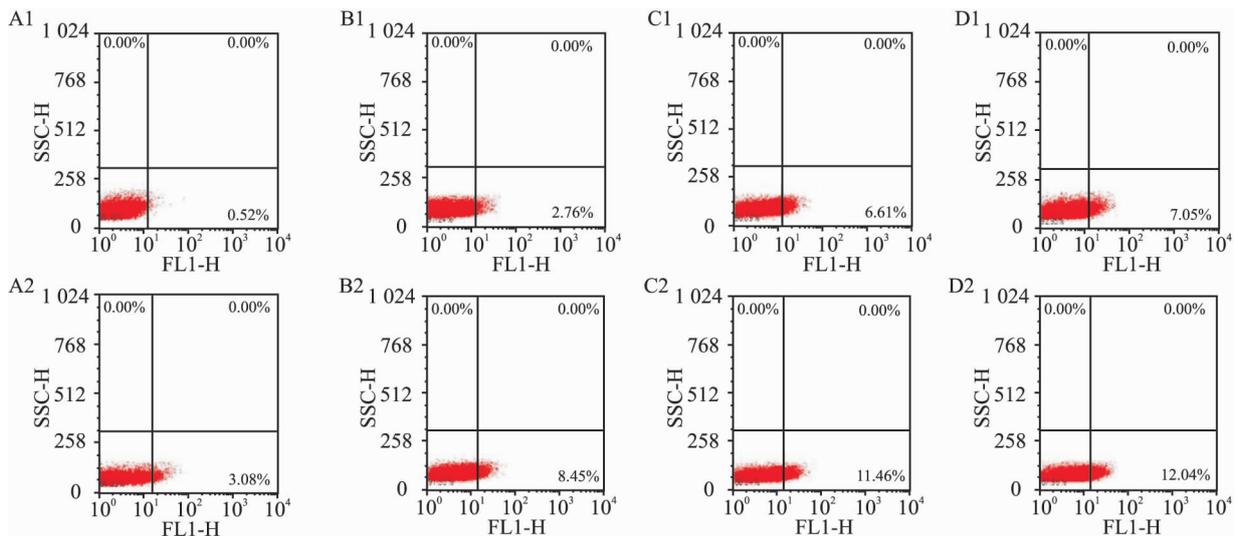


图4 rLukS-PV 对 THP-1 细胞表面抗原 CD11b 的影响

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 μmol/L 组; C: rLukS-PV 1.00 μmol/L 组; D: rLukS-PV 1.50 μmol/L 组; 1: 24 h; 2: 48 h

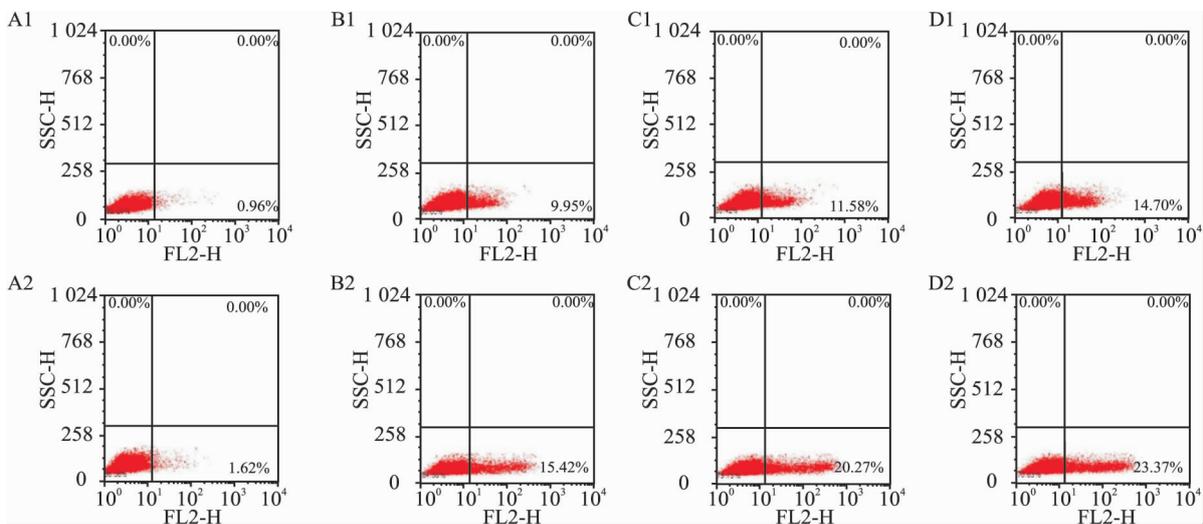


图5 rLukS-PV 对 THP-1 细胞表面抗原 CD14 的影响

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 μmol/L 组; C: rLukS-PV 1.00 μmol/L 组; D: rLukS-PV 1.50 μmol/L 组; 1: 24 h; 2: 48 h

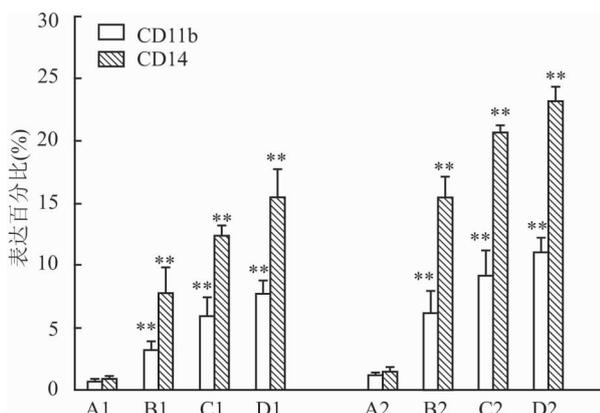


图6 rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞 24、48 h 后 CD11b 和 CD14 表达百分比

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 μmol/L 组; C: rLukS-PV 1.00 μmol/L 组; D: rLukS-PV 1.50 μmol/L 组; 1: 24 h; 2: 48 h; 与对照组比较: ** P < 0.01

2.3 细胞吞噬功能的改变 为进一步验证 rLukS-PV 对 THP-1 细胞的诱导分化作用, 荧光颗粒吞噬实验检测 rLukS-PV 刺激后的细胞吞噬功能。结果显示经 rLukS-PV 作用后, THP-1 细胞表现出对荧光颗粒的吞噬功能, 且随着作用时间和作用剂量增加, 细胞吞噬功能增强, 呈时间和剂量依赖性。见图 7。

2.4 MAPK 信号通路基因的变化 为研究 rLukS-PV 诱导 THP-1 细胞分化的作用机制, qRT-PCR 检测 MAPK 信号通路基因表达。结果显示经 rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞 48 h 后, p38、JNK1、JNK2、ERK1、ERK2 表达量均明显上调, 且其下游转录调节因子 Fos、Jun、c-myc、ATF2 表达量也明显升高。见图 8。

3 讨论

LukS-PV 和 LukF-PV 同比例混合时, 高浓度时

可使细胞穿孔溶解(坏死), 低浓度时则诱导细胞发生凋亡^[6]。本课题前期成功构建了重组表达载体 pET28a-LukS-PV, 体外表达纯化重组蛋白 LukS-PV, 研究^[3]表明, rLukS-PV 细胞毒性明显减低, 且体外可以诱导人急性髓系白血病细胞 THP-1 凋亡及细胞周期阻滞, 抑制其增殖, 具有抗白血病细胞生长活性。

白血病发病的分子生物学机制与细胞增殖和细胞分化异常密切相关。诱导肿瘤细胞分化疗法是白血病治疗的新策略, 该方法基本特点在于不杀伤肿瘤细胞, 而是诱导其向正常或接近正常的细胞分化, 从而达到抑制肿瘤细胞生长的作用^[7]。本研究首次以人单核白血病细胞株 THP-1 为模型, 通过观察细胞贴壁生长情况、细胞形态结构、表面抗原表达、吞噬功能等方法, 研究 rLukS-PV 诱导 THP-1 细胞分化作用。结果显示, rLukS-PV 作用一段时间后, THP-1 细胞部分呈梭形, 有伪足, 贴壁生长。瑞氏染色观察到 rLukS-PV 处理后 THP-1 细胞体积增大, 胞质增多, 核质比例减小, 细胞核呈不规则形, 位于一侧, 表现出明显的巨噬细胞形态特征。

CD11b 是细胞黏附分子整合蛋白家族成员之一 MAC-1 (CD11b/CD18) 的 α 链, 它主要在成熟单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞上表达, 是单核/巨噬分化的标志。CD14 为 LPS 受体, 主要功能是结合 LPS 并引起细胞活化^[8], 主要存在于单核细胞、巨噬细胞等细胞表面, 是单核/巨噬分化的主要标志。rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞后, 细胞表面抗原 CD14 表达明显上调, 且具有时间和剂量依赖性, 在 1.50 μmol/L rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞 48 h 后, CD14 表达比例最高, 可达 24.3%。本研究中 rLukS-PV 诱导 THP-1 细胞分化表现出与 PMA 诱导

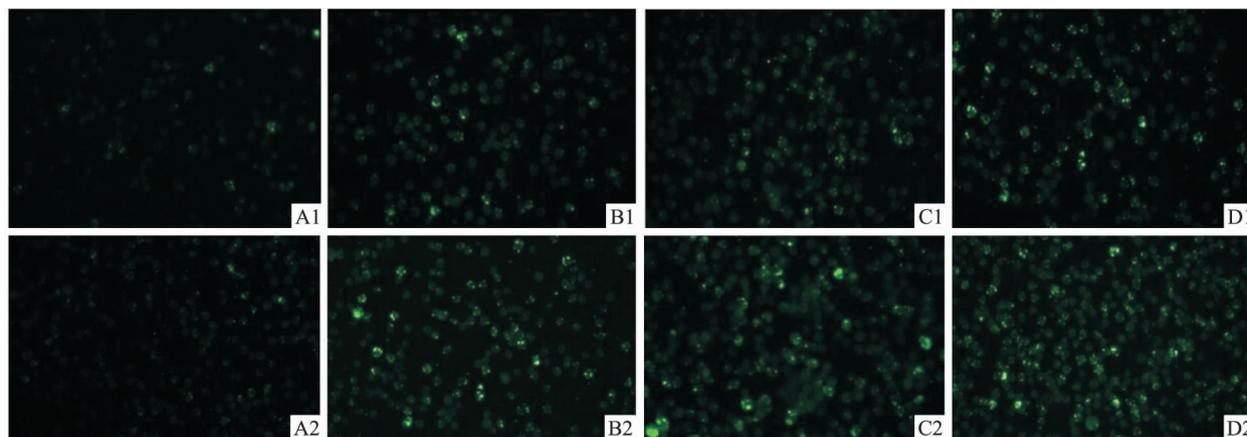


图7 THP-1 细胞吞噬功能的改变

A: 对照组; B: rLukS-PV 0.50 μmol/L 组; C: rLukS-PV 1.00 μmol/L 组; D: rLukS-PV 1.50 μmol/L 组; 1: 24 h; 2: 48 h

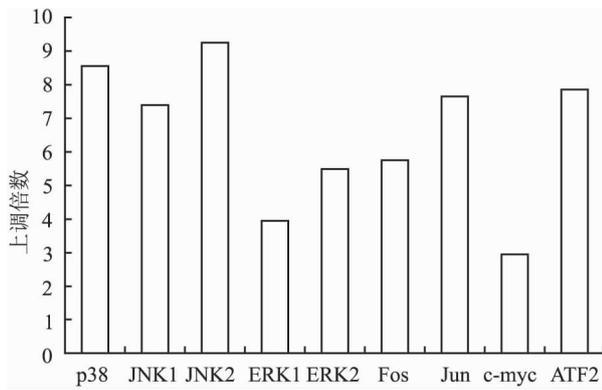


图8 rLukS-PV 刺激 THP-1 细胞 48 h 后相关基因相对于对照组上调倍数

THP-1 细胞向巨噬细胞分化同样的表型改变,进一步证实了 rLukS-PV 诱导 THP-1 细胞分化向巨噬细胞分化方向。

巨噬细胞对颗粒性抗原物质具有很强的吞噬功能,为验证 THP-1 细胞分化后功能的变化,检测了 rLukS-PV 作用后 THP-1 细胞对 0.5 μm 绿色荧光颗粒的吞噬作用。结果显示,经 rLukS-PV 诱导后,THP-1 细胞表现出很强的荧光颗粒吞噬功能,且呈时间和剂量依赖关系。综合形态学、流式细胞术及吞噬实验结果,共同证实 rLukS-PV 体外诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化作用,并且诱导效率随时间和浓度的增加而增加,呈时间和剂量依赖关系。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是生物体内重要的信号转导系统之一,参与介导细胞生长、发育、分裂和分化等多种生理及病理过程。在哺乳动物细胞中 MAPK 亚族主要包括 ERK1/2、JNK、p38 和 ERK5,这几条通路之间存在相互“对话”从而导致通路间产生相互协同或抑制作用。研究^[9]表明,维生素 D3 诱导白血病细胞 HL60 和 U937 粒系分化,主要作用机制是激活 ERK1/2、JNK、p38 信号通路并激活其下游转录因子如 c-jun 和 ATF-2 的磷酸化。在本研究中,THP-1 细胞经 rLukS-PV 作用后,

p38、JNK1/2、ERK1/2 基因表达明显上调,且转录因子 Fos、Jun、c-myc、ATF2 表达增加。因此猜想,rLukS-PV 有可能是通过激活 ERK1/2、JNK、p38 信号通路,进而激活其下游转录因子如 Fos、Jun 的磷酸化,从而达到诱导 THP-1 细胞分化的效果。

参考文献

- [1] Nowak D, Stewart D, Koeffler H P. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development [J]. *Blood*, 2009, 113(16): 3655-65.
- [2] Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(1): e1000715.
- [3] Bu S, Xie Q, Chang W, et al. LukS-PV induces mitochondrial-mediated apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in human acute myeloid leukemia THP-1 cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(8): 1531-7.
- [4] 常文娇, 马筱玲, 沈继龙, 等. 金黄色葡萄球菌 PV-杀白细胞毒素的原核表达及生物学活性鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 34(1): 4-9.
- [5] Gaumier-Hausser A, Rothman V L, Dimitrov S, et al. The novel angiogenic inhibitor, angiocidin, induces differentiation of monocytes to macrophages [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5905-14.
- [6] Jayasinghe L, Bayley H. The leukocidin pore: evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis [J]. *Protein Sci*, 2005, 14(10): 2550-61.
- [7] Silva G, Cardoso B A, Belo H, et al. Vorinostat induces apoptosis and differentiation in myeloid malignancies: genetic and molecular mechanisms [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53766.
- [8] Methe H, Kim J O, Kofler S, et al. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(7): 1439-45.
- [9] Wang Q, Wang X, Studzinski G P. Jun N-terminal kinase pathway enhances signaling of monocytic differentiation of human leukemia cells induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(6): 1087-101.

rLukS-PV induces differentiation function in human acute myeloid leukemia THP-1 cells *in vitro*

Zhang Chengfang, Ma Xiaoling, Dai Chunyang, et al

(Dept of Laboratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the induction differentiation effect of the subunit of Panton-Valentine leukocidin (LukS-PV) on the acute myeloid leukemia THP-1 cell lines and search a promising therapeutic strategy of myeloid leukemia. **Methods** THP-1 cells were treated with different concentrations (0, 0.50, 1.00, 1.50 μmol/L) of

罗格列酮对耐药乳腺癌细胞影响的研究

陈皖京 汤 铜 钱 波 李 佳 田 多 郑 璐

摘要 目的 探讨罗格列酮(ROS)对耐他莫西芬(TAM)的乳腺癌细胞 MCF-7/TAM 体外生长的影响,及其耐药性的逆转效果和作用机制。方法 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色分析法测定 ROS 作用于 MCF-7/TAM 细胞后的抑制率及逆转耐药的效果;采用流式细胞术检测 ROS 作用 MCF-7/TAM 细胞后的凋亡率;采用实时定量荧光 PCR 技术检测 ROS 作用 MCF-7/TAM 细胞后对 FOXA1、ER α 、ErbB-2 和 P53 基因表达的影响。结果 ROS 干预 MCF-7/TAM 细胞后,呈量-效和时-效关系抑制其增殖。半数抑制浓度(136 $\mu\text{mol/L}$)的 ROS 对 MCF-7/TAM 细胞具有明显的逆转耐药效果,逆转耐药倍数为 2.05 倍。高浓度可诱导 MCF-7/TAM 细胞凋亡。半数抑制浓度(136 $\mu\text{mol/L}$)的 ROS 作用 MCF-7/TAM 细胞后,能够上调 FOXA1、ER α 和 P53 基因表达水平($P < 0.05$),下调 ErbB-2 基因表达水平($P < 0.05$)。结论 ROS 可抑制 MCF-7/TAM 细胞增殖,高浓度 ROS 可诱导其凋亡,其机制可能与上调 P53 基因表达有关。ROS 可逆转 MCF-7/TAM 细胞的耐药性,逆转机制可能与上调 FOXA1 和 ER α 基因表达,下调 ErbB-2 基因表达有关。

关键词 罗格列酮;他莫西芬;乳腺癌细胞;FOXA1;ER α ;ErbB-2;P53

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0285-05

2014-11-12 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085QH152)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院普通外科,合肥 230601

作者简介:陈皖京,男,硕士研究生;

汤 铜,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: tt20164@126.com

他莫西芬(tamoxifen, TAM)是作为雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌患者内分泌治疗的主要药物,可有效降低患者的死亡率和复发率,但长期使用会产生耐药继而限制其疗效。罗格列酮(rosiglitazone, ROS)作为胰岛素增敏剂广泛应用于糖尿病的临床治疗,最近研究^[1]显示 ROS 可抑制乳腺癌细胞增殖,但其对 TAM 耐药的乳腺癌细胞 MCF-7/TAM 的增殖和耐药性的影响尚无报道。本研究观测了 ROS 在体外对 MCF-7/TAM 细胞的增殖、凋亡和耐药性的影响,以探索 ROS 在抑制耐药细胞增殖和恢复耐药细胞对 TAM 敏感性中的作用,为临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系 人乳腺癌细胞系(MCF-7)和耐 TAM 乳腺癌细胞系(MCF-7/TAM)由安徽医科大学第一附属医院中心实验室馈赠, MCF-7/TAM 细胞株已用浓度为 10^{-6} mol/L 的 TAM 维持 1 年,实验前撤药 1 周;上述两种细胞分别培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中和含 10% 胎牛血清的改良型 RPMI-1640 培养基中。

1.2 主要试剂及器材 胎牛血清(杭州四季青公司),改良型 RPMI-1640 培养基和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);TAM(天津希恩思公司),批号: T-00470, 1 g 装;四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)及 ROS(美国 Sigma 公司),DMSO 批号: D5879,

recombinant LukS-PV(rLukS-PV)。After 24, 48 h, the morphology of induced cells was observed with Wright-Giemsa staining under optical microscope. The expression of differentiation markers CD14 and CD11b was determined by flow cytometry. The cell phagocytosis of fluorescent particles was examined by fluorescence microscope. **Results**

THP-1 cells treated with rLukS were changed from dispersal and suspended into adhesive and fusiform. Cell volume and cytoplasm content increased, nucleocytoplasmic ratio decreased. The shape of cell nucleus was reniform, triangle and irregular. The cell nucleus was located at the side of cells. The expression of CD11b and CD14 was significantly increased, especially CD14. The cell phagocytosis of fluorescent particles was also obviously enhanced. The above effects were both in a dose- and time-dependent manner. **Conclusion** rLukS-PV has the differentiation effect of inducing THP-1 cell lines into monocyte-macrophages system. These findings suggest the rLukS-PV maybe as a novel approach for treatment of myeloid leukemia.

Key words rLukS-PV; THP-1 cell; induce differentiation