

bcl-2 基因过表达致急性髓系白血病对 柔红霉素耐药机制的初步探讨

饶佳, 卢玮, 王芸芸, 周玉兰, 张荣艳

摘要 目的 探讨 *bcl-2* 基因过表达导致人急性髓系白血病对柔红霉素耐药的机制。方法 通过分子克隆技术构建质粒 pcDNA3.1(+)/*bcl-2*, 将其转染人急性髓系白血病 U937 细胞, 分正常对照组、空载体对照组、转染组, 与柔红霉素培养 24 h, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖率, Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达变化, 从而比较转染 *bcl-2* 基因前后, U937 细胞对柔红霉素敏感性的变化。结果 成功构建质粒 pcDNA3.1(+)/*bcl-2*, 转染入 U937 细胞, PCR 证实其转染效果; CCK-8 法检测结果显示 U937/*bcl-2* 组细胞存活率显著高于对照组和空载体对照组; *bcl-2* 基因过表达降低 caspase-3 片段的裂解活化, 降低 U937 细胞对柔红霉素的敏感性。结论 *bcl-2* 过表达抑制 caspase-3 激活、抑制柔红霉素杀伤 U937 细胞, 导致细胞对柔红霉素耐药。*bcl-2* 可作为临床治疗急性髓系白血病的靶点。

关键词 *bcl-2*; 急性髓系白血病; 凋亡

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)03-0369-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.014

蒽环类药物柔红霉素(daunorubicin, DNR) 联合阿糖胞苷(cytarabine, Ara-C) 组成的 DA 化疗方案是目前临床治疗急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML) 的主要手段, 虽然 50% ~ 75% AML 患者可获完全缓解(complete remission, CR), 但只有 20% ~ 30% 可获长期无病生存^[1]。大部分获得 CR 的患者在 2 年内复发、死亡^[2]。耐药和复发是临床治疗 AML 的难点。因此, 阐明耐药基因导致化疗敏感性下降的机制, 并基于耐药基因筛选靶向治疗药物, 是逆转耐药、战胜白血病的必由之路。

该研究通过分子克隆技术构建质粒 pcDNA3.1(+)/*bcl-2*, 将其转染人急性髓系白血病 U937 细胞, 通过检测细胞增殖、凋亡相关蛋白表达等指标, 观察转染前后细胞对化疗药物 DNR 敏感性变化, 探

讨 *bcl-2* 基因的抗凋亡作用及机制, 为将来筛选 *bcl-2* 小分子抑制剂靶向作用白血病细胞奠定分子基础, 为临床治疗提供靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 人急性髓系白血病细胞系 U937(美国 ATCC 公司); RPMI1640、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 目的基因由上海捷瑞生物有限公司合成; 质粒提取试剂盒(南京凯基公司); caspase-3 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technologies 公司); 小鼠抗人 β -actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔/鼠抗体(美国 Protein Tech Group 公司); NC 膜、Whatman 3 mm 滤纸(美国 Bio-Rad 公司); 发光液(瑞典 Amersham Bioscience 公司); Pre-stained Protein Ladder(加拿大 Fermentas 公司); TRIzol、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸胺、TEMED、DTT、溴酚蓝、甘氨酸、NP-40、Tween 20、Triton X-100(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 U937 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 于 37 °C、含 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养传代。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 分组 实验分为 3 组: 正常对照组为非转染组, 空载体对照组转染空载体, 转染组转染 *bcl-2* 基因。

1.2.3 TRIzol-离心柱法提取细胞总 RNA 细胞去培养液后直接加 TRIzol 充分裂解, 加入氯仿剧烈振荡混匀离心; 吸取上层水相, 加入无水乙醇; 将上述溶液转移到 GenClean 柱中, 离心弃去废液, 加入 450 μ l RPE Solution, 将柱子放回收集管离心; 转移至 RNase-free 的离心管中, 在柱内膜的中央小心加入 DEPC 水, 室温离心 1 min; 所获溶液即为 RNA 溶液。测定 RNA 纯度并定量, 进行后续逆转录实验。

1.2.4 质粒构建 根据全基因序列, 合成引物进行 PCR 扩增。酶切载体 pcDNA3.1(+), 片段 PCR 产物酶切, 将上述回收到的片段和回收的载体进行连接, 并转化挑取单克隆进行鉴定测序, 测序验证重组

2016-12-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81200372); 江西省卫生计生委科技计划(编号: 20165167)

作者单位: 南昌大学第一附属医院血液科, 南昌 330006

作者简介: 饶佳, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: raojia2004126@126.com

克隆。测序结果表明正确构建了质粒 pcDNA3.1 (+) /bcl-2。

1.2.5 电穿孔转染 收集对数期细胞,计数,调整细胞浓度,PBS 洗涤 1 次,用电转液重悬,加入质粒,将混合液转入冰上预冷的电转杯中。电击 1 次,电击完毕,立即转移到冰上,尽快将混合液转入培养基中,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。转染效果由荧光定量 PCR 分析软件 BIO-RADCFX Manager 验证。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞活性 取各组的 U937 细胞,计数板计数,调整细胞浓度至 2 × 10⁵ 个/ml,每孔加入 0.2 ml(即 4 × 10⁴ 个/孔),与浓度梯度(0、0.4、0.8、1.6 μg/ml) DNR 作用 24 h。每孔加入 20 μl CCK-8 检测液,设置空白对照孔,37 °C 避光反应 1 h,450 nm 处读取各孔 OD 值。实验结果按下式计算:细胞存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (不加药组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

1.2.7 Western blot 检测细胞 caspase-3 蛋白表达 收集各组细胞,根据总蛋白提取试剂盒提取蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度,取变性后的不同蛋白样品(含 5 × 上样缓冲液)等量上样于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,电泳后把胶上的蛋白转移到 NC 膜,5%(W/V)牛血清白蛋白封闭 1 h,孵育相应的一抗、二抗。根据底物试剂盒要求将底物加到 NC 膜上显色,压片盒压片、定影、显影,晾干、扫描。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建真核表达载体 pcDNA3.1 (+) /bcl-2 基因 电穿孔转染 U937 细胞:人全长 bcl-2 cDNA 经双酶切后回收片段,粘端连接至真核表达载体 pcDNA3.1 (+),重组质粒转化大肠杆菌,涂平板过夜,挑取菌落提取质粒,酶切鉴定,见图 1。经测序分析 bcl-2 序列与 Genbank 记载一致。电穿孔转染 U937 细胞,基因转染上调 U937 细胞 bcl-2 表达,PCR 证实其转染效果,见图 2,转染组 bcl-2 表达显著高于正常对照组,差异有统计学意义(P < 0.05)。

2.2 转染后 U937 对 DNR 敏感性下降 U937 细胞经 0、0.4、0.8、1.6 μg/ml DNR 作用 24 h,CCK-8 检测细胞活力,结果显示未经转染前 U937 细胞对 DNR 敏感,转染 bcl-2 基因后 U937 细胞对 DNR 敏感性显著下降,bcl-2 转染组的细胞活力高于未转染

组及空载体对照组(P < 0.05)。见图 3、表 1。

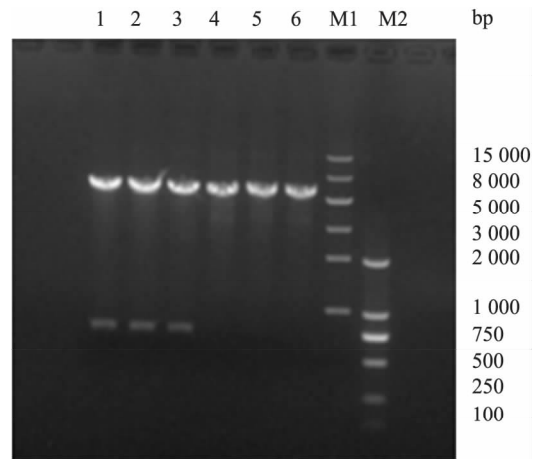


图 1 质粒 pcDNA3.1 (+) /bcl-2 和质粒 pcDNA3.1 (+) 酶切鉴定 M1: DL10 000; M2: DL2 500; 1 ~ 3: pcDNA3.1 (+) /bcl-2/Xho I + Eco R I; 4 ~ 6: pcDNA3.1 (+) /Xho I + Eco R I

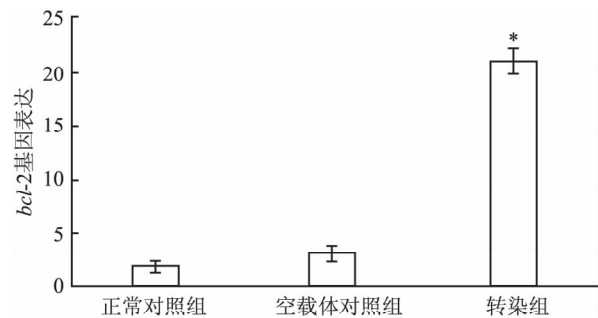


图 2 PCR 鉴定基因转染 U937 细胞效果 与正常对照组比较: * P < 0.05

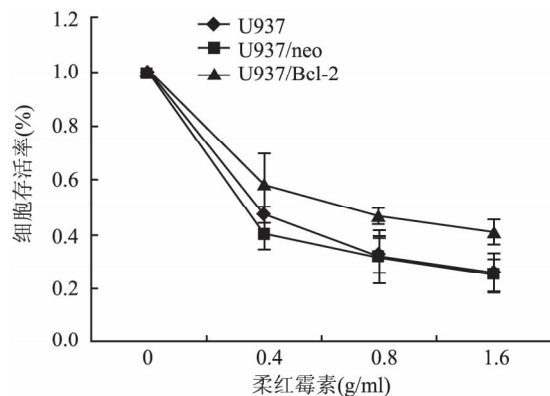


图 3 bcl-2 表达上调对细胞活性的影响

表 1 浓度梯度 DNR 对各组细胞生存率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

DNR 浓度(μg/ml)	正常对照组	空载体对照组	转染组
0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
0.4	0.48 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.59 ± 0.11 [△]
0.8	0.33 ± 0.06	0.32 ± 0.10	0.47 ± 0.03 ^{#△}
1.6	0.26 ± 0.07 [*]	0.25 ± 0.06 [*]	0.41 ± 0.04 ^{*#△}

与 0 μg/ml 比较: * P < 0.05; 与正常对照组比较: # P < 0.05; 与空载体对照组比较: [△] P < 0.05

2.3 转染后 caspase-3 蛋白表达水平 Western blot 检测结果显示转染 *bcl-2* 基因后,细胞对 DNR 敏感性显著下降,不能诱导 caspase-3 断裂激活,而未转染组及空载体对照组均可见 caspase-3 断裂激活、诱导凋亡形成,见图 4。结果表明,上调 *bcl-2* 基因可以降低 U937 细胞对 DNR 敏感性。

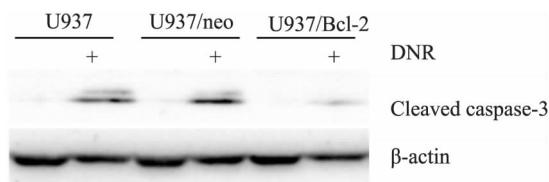


图 4 *bcl-2* 表达上调对细胞凋亡相关蛋白的影响

3 讨论

AML 是由造血细胞增殖能力提高、分化阻滞、凋亡障碍而引起的一种恶性疾病^[1,3]。DNR 是 NC-CN 治疗指南推荐治疗 AML 的首选药物^[2]。白血病细胞对 DNR 耐药是临床白血病治疗的一大障碍。针对 DNR 的耐药机制进行干预治疗可以逆转 DNR 耐药、提高其抗肿瘤作用。参与 AML 耐药的因素可能有^[4-6]: P 糖蛋白输出泵、JNK 激活缺失、伴随抗凋亡蛋白 *bcl-2* 表达增多等。但目前尚缺少直接的分子生物学证据来证明, *bcl-2* 过表达和 DNR 耐药存在直接因果关系及 DNR 耐药的可能机制。本研究通过分子克隆技术构建质粒 pcDNA3.1(+)/*bcl-2*, 将其转染人急性髓系白血病 U937 细胞, 通过检测细胞增殖、凋亡相关蛋白表达等指标, 观察转染前后其对化疗药物 DNR 诱导 U937 细胞凋亡的影响, 探讨 *bcl-2* 基因的抗凋亡作用及其机制, 并为将来筛选 *bcl-2* 小分子抑制剂靶向作用白血病细胞奠定分子基础。

抗凋亡蛋白 *bcl-2* 家族是凋亡的关键执行者^[7]。*bcl-2* 根据其功能可分为具有抗凋亡作用的 *bcl-2*、*Bcl-W*、*A1*、*Mcl-1* 蛋白, 以及具有促凋亡作用的 *Bax*、*Bid*、*Bad*、*Bic*、*Bok*、*Bcl-XS*、*Hrk* 蛋白^[8]。这些促凋亡和抗凋亡蛋白的相对水平决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是生存还是死亡。Del Poeta et al^[9] 对 255 例初治 AML 回顾性研究显示, *bax/bcl-2* 比值与 CR 率、无病生存呈正相关性。*bcl-2* 高表达明显延长白血病细胞生存时间, 其可能机制有: 抑制或阻断多种因素包括 p53、生长因子等所触发的细胞凋亡^[10]。

本研究采用电转法将 *bcl-2* 基因转入 U937 细

胞, 分别采用 0、0.4、0.8、1.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 DNR 处理 U937 细胞 24 h, CCK-8 法检测结果显示转染组细胞存活率显著高于正常对照组和空载体对照组, 表明 *bcl-2* 基因过表达能抑制 U937 细胞增殖。caspase-3 是凋亡通路的关键执行者, 进一步通过 Western blot 检测转染前后各组细胞 caspase-3 的变化。结果表明, 转染 *bcl-2* 基因后 DNR 不能诱导 caspase-3 断裂激活, 提示细胞对 DNR 敏感性显著下降。而未转染组及空载体对照组均可见 caspase-3 断裂激活、诱导凋亡形成。以上结果证明, *bcl-2* 高表达导致耐药的机制可能是通过降低 caspase-3 片段的裂解活化实现, 从而降低白血病细胞对 DNR 的敏感性。

本研究表明 *bcl-2* 过表达通过抑制 caspase-3 激活, 导致 AML 耐药, 探讨了 *bcl-2* 基因的抗凋亡作用, 阐明 *bcl-2* 过表达导致 AML 细胞凋亡逃逸, 为临床治疗提供靶点, 下一步研究将以此筛选靶向治疗药物、逆转耐药、提高 AML 治疗效果。

参考文献

- [1] Jabbour E J, Estey E, Kantarjian H M. Adult acute myeloid leukemia [J]. Mayo Clin Proc, 2006, 81(2): 247-60.
- [2] Tallman M S, Gilliland D G, Rowe J M. Drug therapy for acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2005, 106(4): 1154-63.
- [3] 全国白血病与再生障碍性贫血流行病学调查协作组. 全国白血病发病情况调查 [J]. 中国医学科学院学报, 1992, 14(1): 12217.
- [4] Norgaard J M, Hokland P. Biology of multiple drug resistance in acute leukemia [J]. Int J Hematol, 2000, 72(3): 290-7.
- [5] Cory S, Huang D C, Adams J M. The *bcl-2* family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8590-607.
- [6] Lagadinou E D, Ziros P G, Tsopra O A, et al. c-Jun N-terminal kinase activation failure is a new mechanism of anthracycline resistance in acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2008, 22(10): 1899-908.
- [7] Brunelle J K, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the *bcl-2* family [J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 4): 437-41.
- [8] Catz S D, Johnson J L. Transcriptional regulation of *bcl-2* by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer [J]. Oncogene, 2001, 20(50): 7342-51.
- [9] Del Poeta G, Venditti A, Del Principe M I, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by *Bax/bcl-2* ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML) [J]. Blood, 2003, 101(6): 2125-31.
- [10] Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the *bcl-2* family [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(6): 417-22.

广西少数民族农村地区人体重点寄生虫感染状况调查

杨平¹, 石武祥², 康敏¹, 冯乐平³, 农子军¹, 麦浩⁴, 李天雪⁵

摘要 目的 了解广西少数民族农村地区人体重点寄生虫感染状况。方法 采用自制问卷进行横断面入户调查, 收集人口学资料和居民粪便标本; 用改良加藤厚涂片法和硫酸锌浮聚法检查寄生虫。结果 ① 调查了 780 户家庭 1 720 例村民。查见人体重点寄生虫卵者 1 284 例, 总感染率为 74.7%。② 柳州市三江县、百色市的隆林县和乐业县感染率较高 (>70%)。③ 不同民族人群间人体重点寄生虫感染率和种类有差异 ($P < 0.05$)。④ 男性鞭虫和华枝睾吸虫感染率显著高于女性 ($P < 0.05$); 女性钩虫和蛔虫感染率显著高于男性 ($P < 0.05$)。⑤ 寄生虫虫种在各年龄组间的分布不一致 ($P < 0.05$)。结论 广西少数民族地区人体重点寄生虫感染的情况较十年前有明显改善, 但是仍然处于高水平, 是该地区主要的公共卫生问题, 应引起政府和全社会的高度重视。

关键词 人体重点寄生虫; 农村; 少数民族; 广西壮族自治区

2016-12-12 接收

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号: 2013GXNSFCA019016)

作者单位: 桂林医学院¹ 基础医学院、² 人文与管理学院、³ 公共卫生学院, 桂林 541004

⁴ 桂林市疾病预防控制中心, 桂林 541001

⁵ 广西师范大学文化与旅游学院, 桂林 541001

作者简介: 杨平, 女, 硕士研究生;

石武祥, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: swx_56@126.com

中图分类号 R 53

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)03-0372-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.015

寄生虫病流行状况不仅是我国的公共卫生问题, 也是公众福利及社会文明的重要指标。调查人体重点寄生虫的感染情况, 控制其传播流行具有十分重要的意义^[1-2]。广西是我国少数民族人口最多的自治区。少数民族多居住在石山、高寒和边境山区, 经济社会发展落后, 生产生活条件艰苦; 流行“走众亲”等民俗, 生食动物肉、内脏、鱼等饮食特征, 存在居住环境卫生较差, 喜饮生水、便后不洗手等不良的个人生活卫生习惯^[3]。2004 年, 有研究者对广西少数民族地区寄生虫感染做过调查, 发现人群寄生虫感染率较高, 分别为 76.8% 和 75.9%^[2,4]。目前该地区的人体重点寄生虫感染状况如何尚不清楚。该调查可为制定广西少数民族地区的人体重点寄生虫防治措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究设计 基于自然村开展横断面入户调查。

1.2 研究对象及抽样方法 研究人群为居住在广西 11 个少数民族地区, 年龄在 2 岁以上, 愿意参加

Over expression of *bcl-2* resulting in resistance to daunorubicin in acute myeloid leukemia cells

Rao Jia, Lu Wei, Wang Yunyun, et al

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract Objective To explore the relationship between *bcl-2* over-expression with the resistance to daunorubicin in acute myeloid leukemia(AML) cell line U937. **Methods** Construction of pcDNA3.1(+)/*bcl-2*, and then pcDNA3.1(+)/*bcl-2* and pcDNA3.1(+)- were transfected into U937 cell line. The cells were divided into 3 groups: U937, U937/NC, U937/*bcl-2*. These groups were exposed to daunorubicin for 24 h. The growth inhibitory effects of daunorubicin were evaluated by CCK-8. Expression of apoptosis-related proteins was determined by Western blot. **Results** Survival rate of cells in U937/*bcl-2* group was markedly higher than cells in U937 and U937/NC groups. The enhanced caspase-3 activity was observed in U937 and U937/NC groups. **Conclusion** High expression of *bcl-2* inhibits activation of caspase-3 and suppression of daunorubicin induced growth inhibitory and generation of drug resistance.

Key word *bcl-2*; acute myeloid leukemia; apoptosis