

网络出版时间:2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.012.html

柠檬醛调控突变型 p53 基因和 AIF 基因表达诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 凋亡

王亚萍¹, 王娟¹, 吴中惠¹, 张慧¹, 侯小芳¹, 宋琴², 夏海龙¹

摘要 目的 探讨柠檬醛诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 凋亡的分子机制。方法 用不同浓度的柠檬醛处理 NB4 细胞 48 h, 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 法检测突变型 p53 (mtp53) 基因和凋亡诱导因子 AIF 基因的 mRNA 表达变化。结果 柠檬醛实验组与空白对照组比较, mtp53 基因表达量减低 ($P < 0.05$); 柠檬醛实验组与空白对照组比较, AIF 基因表达量增加 ($P < 0.05$); 乙醇对照组与空白对照组比较, mtp53 和 AIF 的 mRNA 表达量无明显差异; 随着柠檬醛浓度 (5、10、20 mg/L) 的递增, mtp53 mRNA 表达量逐渐下降, AIF mRNA 的表达量逐渐上升, mtp53、AIF 在不同浓度柠檬醛实验组表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 柠檬醛通过下调 NB4 细胞 mtp53 的表达, 上调 AIF 的表达诱导 NB4 细胞凋亡。

关键词 柠檬醛; 白血病; 急性早幼粒细胞白血病细胞株; p53; 凋亡诱导因子

中图分类号 R 733.71; R 979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)08-1101-05

山苍子油的主要成分柠檬醛, 不仅可作为香料和食品添加剂, 还有抗菌、抑菌、平喘等多种作用。研究^[1-3]表明柠檬醛可诱导多种肿瘤细胞如 A549、RAW264.7、HL-60、U937、MCF-7 等的凋亡, 且对人正常胸腺细胞和脾细胞无毒性作用。研究^[4-5]表明柠檬醛可以通过激活内源性线粒体途径, 抑制核因子 NF- κ B 的表达, 诱导急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 细胞株 NB4 的凋亡, 但具体机制尚不明确。该研究旨在通过研究柠檬醛诱导 NB4 细胞凋亡过程中突变型 p53 (mtp53) 基因、凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 基因表达的变化, 进一步探讨柠檬醛诱导 NB4 细胞凋亡的可能分子机制。

2016-04-19 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085MH159)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院血液内科, 合肥 230022

² 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230022

作者简介: 王亚萍, 女, 硕士研究生;

夏海龙, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者; E-mail:

xhl1999cn@163.com

1 材料与方法

1.1 试剂 胎牛血清、RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司; 柠檬醛购自美国 Sigma 公司, 纯度 > 95%, 用乙醇溶解备用; TRIzol、SuperScript III RT 反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 引物由北京百奥思科生物医学技术有限公司合成。目的基因及内参基因引物序列和产物长度见表 1。所测引物用 Primer-BLAST 软件验证, p53 Tm 58.8 °C, AIF Tm 58.0 °C。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列以及产物长度

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
p53	F: CAGCACATGACGGAGTTGT	125
	R: TCATCCAAATACTCCACACGC	
AIF	F: AAGTCAGACGAGAGGGGGTTA	157
	R: GCCAACTCAACATTGGGCTAAT	
GAPDH	F: GCAGCGAGATCCCTCCAAA	496
	R: GGCTGTTGTCATACTTCTCAT	

1.2 细胞来源与培养 APL 细胞株 NB4 细胞由天津血研所惠赠, 该细胞株 p53 基因是突变型。NB4 细胞于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度条件下, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 2~3 d 换液 1 次。实验所用细胞处于对数生长期, 台盼蓝染色拒染率 > 95%, 维持细胞浓度在 (2~3) × 10⁵ /ml。

1.3 实验分组 分为柠檬醛实验组和对照组。柠檬醛实验组: 选取处于对数生长期的 NB4 细胞, 分别加入不同浓度的柠檬醛 (5、10、20 mg/L, 培养基乙醇终浓度 5%) 培养。空白对照组: 培养基中不加柠檬醛和 5% 乙醇进行 NB4 细胞培养; 乙醇对照组: 培养基中不加柠檬醛, 仅加乙醇至终浓度 5% 进行 NB4 细胞培养。

1.4 采用 qPCR 法检测 mtp53 及 AIF 的表达 收集柠檬醛处理 48 h 后的细胞, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 再用反转录试剂盒 superscript III 进行反转录反应, 反应体系为 dNTP 1 μl、DTT 2 μl、5 × Buffer 4 μl、RT 酶 1 μl、RNA 200 ng, 补水至 10 μl, 1000 r/min 离心 5 min 后, 置于 42 °C 水浴箱水浴 60 min, 85 °C 孵育 10 min。反应结束后置于 -20 °C 保

存待用。取 2 μl 逆转录成的 cDNA ,进行 qPCR 反应。以管家基因 GAPDH 为内参 ,每份样本设 3 组平行对照。反应体系为 20 μl 条件: 95 ℃、2 min、94 ℃、20 s、65 ℃、20 s、72 ℃、30 s、40 个循环。所测基因的表达量 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta\Delta Ct = (\text{待测样品的目的基因的 } Ct \text{ 平均值} - \text{待测样本的看家基因的 } Ct \text{ 平均值}) - (\text{对照样品的目的基因的 } Ct \text{ 平均值} - \text{对照样本的看家基因的 } Ct \text{ 平均值})$] ,RQ 值越大 ,基因的表达量越大。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两独立样本的比较采用 *t* 检验 ,多组样本间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞生长计数 空白对照组 NB4 细胞培养呈对数生长状态时 ,调整细胞浓度均为 $(2 \sim 3) \times 10^5 / \text{ml}$ 。柠檬醛实验组分别加入不同浓度的柠檬醛(5、10、20 mg/L ,培养基乙醇终浓度 5%) ,乙醇对照组加入乙醇至终浓度 5% ,与空白对照组同时进行细胞培养。分别在培养 12、24、36、48 h 时进行台盼蓝染色 ,计数活细胞数。乙醇对照组与空白对照组比较细胞计数差异无统计学意义; 各实验组与空白对

照组比较 ,细胞计数差异有统计学意义 ($F = 21.000, P < 0.05$) ;不同浓度实验组比较细胞计数差异有统计学意义 ($F = 23.134, P < 0.05$)。NB4 细胞生长计数曲线见图 1。

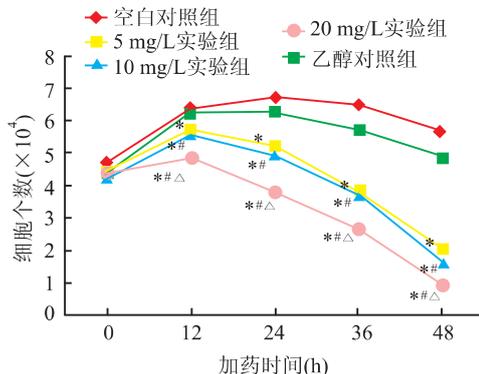


图 1 细胞生长计数曲线

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5 mg/L 实验组比较: # $P < 0.5$; 与 10 mg/L 实验组比较: $\Delta P < 0.05$

2.2 PCR 产物的分析 扩增曲线及熔解曲线显示 p53、AIF 和内参基因 GAPDH 的 PCR 产物呈单峰。熔解温度均一 ,曲线中没有其他杂峰 ,扩增产物具有特异性。见图 2、3。

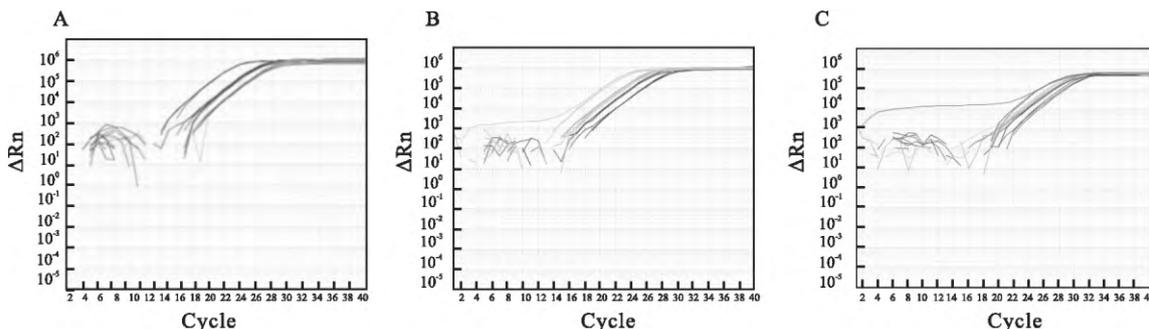


图 2 不同基因的扩增曲线
A: p53; B: AIF; C: GAPDH

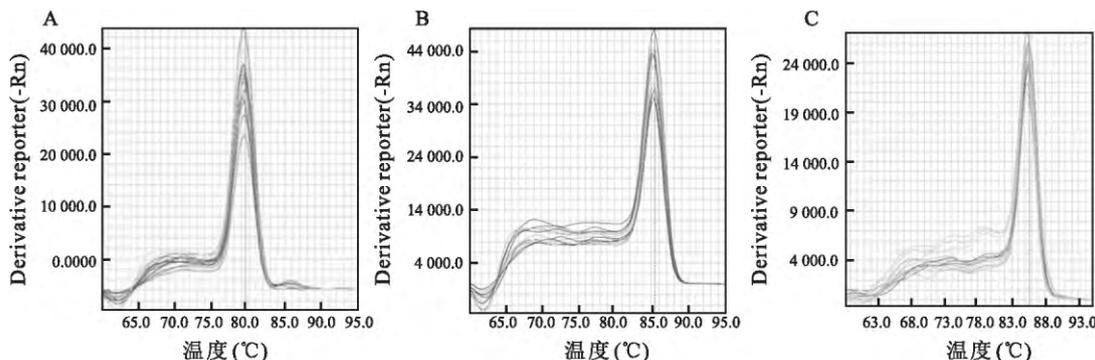


图 3 不同基因的熔解曲线
A: p53; B: AIF; C: GAPDH

2.3 突变型 p53 (mtp53) mRNA 的表达量检测

乙醇对照组和空白对照组比较, mtp53 mRNA 的表达量差异无统计学意义; 实验组与空白对照组比较, mtp53 mRNA 的表达量差异有统计学意义 ($F = 53.46, P < 0.05$); 各实验组间随柠檬醛浓度递增, mtp53 mRNA 的表达量递减, 差异有统计学意义 ($F = 71.03, P < 0.05$)。见表 2、图 4。

表 2 不同浓度柠檬醛作用于 NB4 细胞 48 h 后 mtp53 mRNA 表达量的变化 ($n = 3$)

组别	Ct 平均值	RQ
空白对照	20.542 ± 0.114	1.050 ± 0.200
乙醇对照	20.580 ± 0.112	0.997 ± 0.231
5 mg/L 实验	20.805 ± 0.183	0.326 ± 0.152*
10 mg/L 实验	21.655 ± 0.170	0.220 ± 0.110* #
20 mg/L 实验	21.649 ± 0.149	0.206 ± 0.208* #△

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5 mg/L 实验组比较: # $P < 0.05$; 与 10 mg/L 实验组比较: △ $P < 0.05$

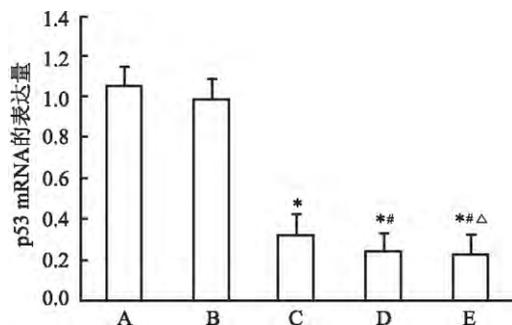


图 4 柠檬醛对 mtp53 基因 mRNA 表达量的影响

A: 空白对照组; B: 乙醇对照组; C: 5 mg/L 实验组; D: 10 mg/L 实验组; E: 20 mg/L 实验组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5 mg/L 实验组比较: # $P < 0.05$; 与 10 mg/L 实验组比较: △ $P < 0.05$

2.4 AIF mRNA 的表达量检测 乙醇对照组与空白对照组比较, AIF mRNA 的表达量差异无统计学意义; 各实验组与空白对照组比较, AIF mRNA 的表达量差异有统计学意义 ($F = 50.04, P < 0.05$); 各实验组间随柠檬醛浓度递增, AIF mRNA 的表达量递增, 差异有统计学意义 ($F = 73.82, P < 0.05$)。见表 3、图 5。

表 3 不同浓度柠檬醛作用于 NB4 细胞 48 h 后 AIF mRNA 表达量的变化 ($n = 3$)

组别	Ct 平均值	RQ
空白对照	38.667 ± 0.170	0.012 ± 0.003
乙醇对照	37.548 ± 0.153	0.011 ± 0.003
5 mg/L 实验	35.810 ± 0.134	0.013 ± 0.002*
10 mg/L 实验	30.674 ± 0.114	0.020 ± 0.001* #
20 mg/L 实验	30.580 ± 0.042	0.048 ± 0.003* #△

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5 mg/L 实验组比较: # $P < 0.05$; 与 10 mg/L 实验组比较: △ $P < 0.05$

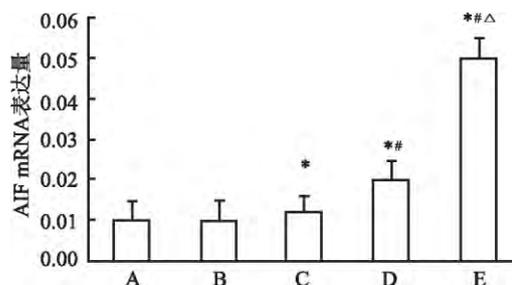


图 5 柠檬醛对 AIF 基因 mRNA 表达量的影响

A: 空白对照组; B: 乙醇对照组; C: 5 mg/L 实验组; D: 10 mg/L 实验组; E: 20 mg/L 实验组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5 mg/L 实验组比较: # $P < 0.05$; 与 10 mg/L 实验组比较: △ $P < 0.05$

3 讨论

APL 作为急性髓系白血病的一种特殊亚型, 是高度异质性的血液系统恶性肿瘤。APL 有特异性的基因异位 $t(15; 17)$, 形成 PML-RAR α 融合基因^[6]。维甲酸和三氧化二砷分别通过不同的途径诱导 APL 细胞凋亡, 使得 APL 患者达到缓解。维甲酸和亚砷酸治疗 APL 取得了巨大成就, 但在治疗过程中出现一定的不良反应, 部分病例对维甲酸、三氧化二砷耐药^[7], 研发新的治疗药物成为进一步提升 APL 治疗效果的重要问题。

研究^[8]表明柠檬醛能够诱导 APL 细胞株 NB4 出现细胞凋亡的典型形态学改变, 这种诱导作用在柠檬醛作用 48 h 时最强。研究^[9]表明柠檬醛作用于 NB4 细胞后, 凋亡相关基因 Bcl-2 的表达量明显下降, BAX 基因、Caspase 蛋白的表达量明显增加, 这些结果表明柠檬醛通过线粒体凋亡相关途径诱导 NB4 细胞凋亡, 但更为详尽的分子信号机制还有待进一步研究。

由于本实验使用的柠檬醛难溶于水, 需要用乙醇进行溶解, 设计了空白对照组和乙醇对照组, 以观察 5% 乙醇对正常 NB4 细胞生长及突变型 p53 基因、AIF 基因表达的影响。结果表明, 5% 乙醇对 NB4 细胞生长、突变型 p53 基因及 AIF 基因的表达无明显影响。

本研究表明柠檬醛作用 NB4 细胞 48 h, 突变型 p53 基因 mRNA 表达量均降低。p53 基因可以通过抑制有丝分裂的进程, 阻止细胞进入 DNA 合成期, 参与 DNA 损伤修复或者启动细胞的凋亡, 防止细胞向恶性转化; p53 基因的突变会导致其正常生物学功能丧失, 促进细胞的恶性转化和增殖, 抑制细胞凋亡。研究^[10]表明恶性肿瘤中, p53 基因的突变占 50%。细胞系中血液系统肿瘤 p53 突变率最高, 约占

17%。本实验细胞株具有典型 t(15;17) 异位, 细胞株中的 p53 基因属于突变型^[11]。野生型 p53 基因作为 BAX/BAK 的上游调控基因, 可以通过下调 BCL-2 的表达, 改变 BCL-2/BCL-xL 比例, 形成 BAX 蛋白的寡聚化, 上调 BAX 的表达, 改变线粒体通透性诱导细胞凋亡^[12-14]。突变型 p53 基因作用则与之相反, 本研究显示 NB4 细胞中突变型 p53 基因表达较高, 随着柠檬醛浓度的递增, 突变型 p53 基因的表达量呈下降的趋势, 提示柠檬醛可能通过下调突变型 p53 基因的表达, 调控与之相关的下游调控因子, 改变线粒体通透性, 诱导细胞凋亡。

AIF 位于染色体 Xq25-26, 由 16 个外显子组成, 其编码可以产生 67 ku、62 ku、57 ku 3 种亚型蛋白。正常情况下, AIF 蛋白位于线粒体内, 当细胞中 BAX 增多时, BAX 形成二聚体并转移到线粒体膜上, 线粒体膜的通透性功能发生改变, 线粒体通透性转换孔开放, 57 ku AIF 蛋白可以从线粒体中释放到细胞质并转移到细胞核内, 降解 DNA 导致 DNA 片段化, 从而促进细胞凋亡^[15]。本研究结果显示, 柠檬醛作用于 NB4 细胞 48 h, AIF 基因表达量明显增加, NB4 细胞产生过量的 57 ku AIF 蛋白, 有可能通过线粒体途径诱导 NB4 细胞凋亡。

综上所述, 柠檬醛可能通过线粒体途径诱导 NB4 细胞凋亡。可能机制是: 柠檬醛下调 mtp53 基因的表达, 影响下游 Bcl-2/BAX 的比例, 增加 BAX 的表达, 从而改变线粒体膜的通透性, 上调 AIF 等活性物质的释放。柠檬醛是否存在线粒体以外的凋亡通路诱导细胞凋亡, 尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Porto Mde P, da Silva G N, Luperini B C, et al. Citral and eugenol modulate DNA damage and pro-inflammatory mediator genes in murine peritoneal macrophages [J]. *Mol Biol Rep* 2014, 41(11): 7043 - 51.
- [2] Lee H J, Jeong H S, Kim D J, et al. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264. 7 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(3): 342 - 9.
- [3] Chaouki W, Leger D Y, Liagre B, et al. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells [J]. *Fundam Clin Pharmacol* 2009, 23(5): 549 - 56.
- [4] 程 歆, 夏海龙, 陈晓文. 柠檬醛抑制 NB4 细胞生长并诱导凋亡机制的研究 [J]. *安徽医药* 2010, 14(10): 1128 - 30.
- [5] 宋 琴, 夏海龙. 柠檬醛诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 凋亡机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2012, 47(4): 404 - 7.
- [6] Gañón-Gómez I, Estañ-Omaña M C, Sancho P, et al. Mechanisms of resistance to apoptosis in the human acute promyelocytic leukemia cell line NB4 [J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(3): 379 - 92.
- [7] Rubio V, Calviño E, García-Pérez A, et al. Human acute promyelocytic leukemia leukemia NB4 cells are sensitive to esculetin through induction of an apoptotic mechanism [J]. *Chem Biol Interact* 2014, 220: 129 - 39.
- [8] 陈晓文, 夏海龙. 柠檬醛抑制急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 增殖并诱导其凋亡的作用 [J]. *安徽医科大学学报* 2010, 45(2): 196 - 9.
- [9] Xia H, Song Q, Chen X, et al. The *in vitro* study of apoptosis in NB4 cell induced by citral [J]. *Cytochnology* 2013, 65(1): 49 - 57.
- [10] Bush J A, Li G. Anchorage-independent growth of p53-knockout dermal fibroblasts is reversed by wild-type p53 [J]. *J Cutan Med Surg* 2001, 5(1): 18 - 24.
- [11] Li F, Chen X, Xu B, et al. Curcumin induces p53-independent necrosis in H1299 cells *via* a mitochondria-associated pathway [J]. *Mol Med Rep* 2015, 12(5): 7806 - 14.
- [12] Hu W, Ge Y, Ojcius D M, et al. p53 signalling controls cell cycle arrest and caspase-independent apoptosis in macrophages infected with pathogenic *Leptospira* species [J]. *Cell Microbiol* 2013, 15(10): 1642 - 59.
- [13] Jamil S, Lam I, Majd M, et al. Etoposide induces cell death *via* mitochondrial dependent actions of p53 [J]. *Cancer Cell* 2015, 15: 79 - 89.
- [14] Yu Z, Wu F, Chen L, et al. ETME, a novel β -elemene derivative, synergizes with arsenic trioxide in inducing apoptosis and cell cycle arrest in hepatocarcinoma cells *via* a p53-dependent pathway [J]. *Acta Pharm Sin B* 2014, 4(6): 424 - 9.
- [15] Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor(AIF) [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396(1): 95 - 100.

Mechanisms of apoptosis in NB4 cells induced by citral *via* regulation of mtp53 gene and AIF gene

Wang Yaping, Wang Juan, Wu Zhonghui, et al

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the mechanism of the apoptosis induced by citral in the acute promyelocytic

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.014.html>

流式细胞术检测 IgD 与 IgD 受体结合实验方法的建立

陈恒石 吴育晶 黄琼 陈文生 董进 魏伟

摘要 目的 建立非放射性荧光标记的配体受体结合实验,检测 IgD 与其受体结合的作用特性。方法 以配体受体结合理论为基础,利用荧光标记抗体技术,建立非放射性配体受体结合实验方法。利用流式细胞术检测人 CD4⁺ T 细胞和人滑膜细胞上 IgD 与 IgD 受体结合的亲和力。结果 人 CD4⁺ T 细胞上 IgD 与 IgD 受体结合的解离常数 (K_D) 和受体最大结合容量 (B_{max}) 分别是 8.10×10^{-10} mol/L 和 6 605 相对值/ 10^4 细胞,人滑膜细胞上 IgD 受体与 IgD 结合的 K_D 和 B_{max} 值分别是 7.02×10^{-10} mol/L 和 5 977 相对值/ 10^4 细胞。结论 该方法避免了传统受体与配体结合分析中放射性标记的问题,操作简便、稳定性好、灵敏度及选择性均较高,可为分析配体受体结合提供新的方法。

关键词 配体受体结合;亲和力;IgD;荧光标记

中图分类号 R 9-331

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1105-06

2016-04-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81330081、81173075、81202596);安徽医科大学“青年拔尖人才支持计划”项目;高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20113420120006、20123420110003);安徽省科技攻关计划项目(编号:1301042098);安徽省自然科学基金青年项目(编号:1408085QH173)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、安徽抗炎免疫药物协同创新中心,合肥 230032

作者简介:陈恒石,男,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

免疫球蛋白 D (immunoglobulin D, IgD) 作为一类免疫球蛋白,一方面可作为 B 细胞表面受体 (B cell receptor, BCR) 发挥免疫功能,另一方面可以作为配体与其受体 (IgD receptor, IgD-R) 结合激活下游信号通路^[1]。在病理状态下, IgD 与 IgD-R 的过度结合,可能导致自身抗体生成增多、自身免疫反应增强,从而介导自身免疫疾病的发生。目前相关研究仅确定了 IgD-R 分布以及表达量, IgD-R 的编码基因和分子结构尚不明确, IgD 与 IgD-R 特异性结合后产生的相关作用及机制更是了解甚少^[2], 因此 IgD 与其受体结合的动力学参数是研究 IgD 和 IgD-R 特性的基础性环节。受体动力学特性的检测主要通过配体受体结合实验,该方法考察的是受体与配体结合能力,而非受体的功能,且不涉及受体信号通路研究。经典的放射性配体受体结合 (radio-ligand-receptor binding assays, RRA) 实验方法应用放射性核素标记配体与特异性受体相结合,研究受体的亲和力和受体的数量,以及研究受体亚型,广泛用于测定受体的密度和亲和力^[3-4]。鉴于 RRA 存在放射性元素标记困难,需要进行安全防护,放射性废物处理繁琐且费用昂贵等缺点,该实验采用一种非放射性荧光标记抗体的技术,来检测 IgD 与 IgD-R 结合的亲和力等特性,克服了传统受体配体结合分析中放射性标记技术的问题,为进一步筛选 IgD 与 IgD-R 结合的竞争性药物奠定实验基础,并为药

leukemia cell line NB4. **Methods** NB4 cells were treated with citral for 48 h at the various concentration, and then the mRNA expression of mutation p53 (mtp53) and AIF was detected by method of qPCR. **Results** The expression of mtp53 gene decreased when the citral groups compared with the control group, the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$); the expression of AIF gene was increased when the citral group compared with the control group, the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$); ethanol group compared with the control group, mRNA expressions of mtp53 and AIF had no significant difference. With citral concentration (5, 10, 20 mg/L) increasing, the level of expression of mtp53 mRNA reduced, while the level of expression of AIF mRNA gradually increased, both mtp53 and AIF expression in different concentrations of citral group differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Citral can induce apoptosis in NB4 cells by downregulating the expression of mtp53 and upregulating the expression of AIF.

Key words citral; leukemia; NB4; p53; apoptosis inducing factor