

抑癌基因 Hes1 影响急性髓系白血病细胞增殖和凋亡的机制研究

田晨 贾勇胜 胡冬至 李婵娟 屈福莲 张翼鹭

【摘要】 目的 阐明 Hes1 与急性髓系白血病(AML)细胞增殖和凋亡的关系。方法 通过实时定量 PCR 检测 AML 原代细胞和 HL-60、U937、KG1a 细胞中 Hes1 和 p21 的表达情况;通过在 AML 细胞中转染逆转录病毒载体使 Hes1 高表达,通过 MTT 及流式细胞术检测高表达 Hes1 的 AML 细胞增殖和细胞周期、凋亡的改变;并通过成瘤实验检测 Hes1⁺ AML 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的增殖情况。结果 Hes1 和 p21 在 AML 患者原代细胞和 HL-60、U937、KG1a 细胞中的表达分别为 0.67±0.24 和 0.59±0.43、0.42±0.03 和 0.32±0.26、0.54±0.01 和 0.44±0.12、0.36±0.12 和 0.59±0.43,均较正常对照组水平降低(P 值均<0.05);通过逆转录病毒载体诱导后 HL-60、U937、KG1a 细胞中 Hes1 的表达分别为 4.9±0.2、5.2±0.4、5.8±0.5,均较未转染诱导前上调(P 值均<0.05);感染 Hes1 后 AML 细胞与感染空载体的 AML 细胞比较,增殖受到抑制,细胞凋亡增加。与对照组比较,3 种细胞系高表达 Hes1 后在 NOD/SCID 小鼠体内的成瘤性均降低(P 值均<0.05)。结论 Hes1 过表达可抑制 AML 细胞的增殖,诱导 AML 细胞凋亡,从而提示 Hes1 为 AML 的抑制基因,可能成为治疗 AML 的新靶点。

【关键词】 白血病,髓样,急性; 基因,Hes1; 细胞增殖; 细胞凋亡

Inhibitory effects of Hes1 on acute myeloid leukemia cells Tian Chen, Jia Yongsheng, Hu Dongzhi, Li Chanjuan, Qu Fulian, Zhang Yizhuo. Department of Hematology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital. Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China Corresponding author: Zhang Yizhuo, Email: yizhuozhang111@163.com

【Abstract】 **Objective** To elucidate the impact of Hes1 on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia (AML) cells. **Methods** The expression levels of Hes1 and p21 in AML patient samples and myeloid leukemia cell lines were analyzed by real-time PCR. Hes1 was up-regulated by retrovirus transfection in AML cell lines and the proliferation capacity were assayed by MTT, cell cycle by Hoechst/PY, apoptosis by AnnexinV. **Results** The expression of Hes1 in primary AML cells and HL-60、U937、KG1a cell lines were 0.67±0.24, 0.59±0.43, 0.42±0.03, and 0.32±0.26, respectively, and p21 were 0.54±0.01, 0.44±0.12, 0.36±0.12, and 0.59±0.43, respectively. Hes1 expression levels after transduction in HL-60、U937、KG1a were 4.9±0.2, 5.2±0.4, 5.8±0.5, respectively. Induced activation of Hes1 led to AML cells growth arrest and apoptosis, which was associated with an enhanced p21 expression. Besides, activated Hes1 led to AML cells growth inhibition in vivo. **Conclusions** Hes1 could mediate growth arrest and apoptosis in AML cells, which may be a novel target for AML.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; Genes, Hes1; Cell proliferation; Apoptosis

Notch 信号通路是调节细胞分化、凋亡与增殖的关键信号通路^[1]。Notch 配体与受体结合后,受体的胞内结构域脱落,转移到核内与相应效应子结

合,从而调节基因的转录^[2]。文献报道 Notch 通路在造血系统肿瘤中有促癌和抑癌两种角色,这取决于疾病的类型^[3]。目前已明确 Notch 过表达可诱导急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)^[4],然而其在急性髓系白血病(AML)中的作用尚有争议。Li 等^[5]的研究结果表明,Notch 受体在人早幼粒白血病细胞株 HL-60 中高表达。然而 Lobry 等^[6]报道 Notch 信号通路在 AML 患者白血病细胞及 AML 动物模型均未激活。Kannan 等^[7]发现,虽然在 AML 细胞中 Notch 受体高表达,但 Notch 通路并未激活。Hes1 是 Notch

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.008

基金项目:国家自然科学基金(31301161、81270603);天津市应用基础与前沿技术研究计划(13JCYBJC22800)

作者单位:300060 天津医科大学肿瘤医院血液科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室

通信作者:张翼鹭,Email: yizhuozhang111@163.com

通路的下游靶基因,可影响细胞的增殖、分化,并能维持造血干细胞处于静止状态^[8],而 p21 是 Hes1 的下游效应子^[9],因此我们重点研究 Hes1 在 AML 细胞中的作用及其机制。

对象和方法

1. 研究对象: AML 细胞系 HL-60、U937 和 KG1a 细胞由中国医学科学院血液学研究所郑国光教授赠送,培养于含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基中。骨髓标本来自 3 例 AML 患者(1 例 M₄, 2 例 M₅)、4 例正常骨髓患者(膀胱癌、乳腺癌、横纹肌肉瘤、贫血患者各 1 例)和 1 名健康人,将后者作为正常对照组。此实验经天津市肿瘤医院伦理委员会审核批准。

2. AML 原代细胞分离:在患者和健康供者充分知情同意的前提下,取骨髓 5 ml(患者为治疗前)。常规肝素抗凝,PBS 稀释后,用淋巴细胞分离液分离骨髓单个核细胞(BMNC),用 PBS 充分洗涤后重悬备用。

3. 实时定量 PCR:采用 TRIzol(购于美国 Invitrogen 公司)提取 AML 患者细胞及对照者细胞的 RNA,逆转录后,采用 ABI PRISM 7500(购于美国 ABI 公司)行 PCR。循环参数如下:95 ℃ 15 s; 60 ℃ 60 s, 45 个循环。Hes1 引物序列上游:5'-GCAGATGACGGCTGCGCTGA-3',下游:5'-AAGCGGGGTCACCTCGTTCATGC-3'。p21 引物序列上游:5'-AATCTTGTTGATGTCCGACC-3',下游:5'-TTGCAGAAGACCAATCTG-3'。以 2^{-ΔΔCT} 计算 Hes1 和 p21 的表达水平。

4. 转染:质粒 MSCV-Hes1-IRES-GFP、pCMV-VSV-G、PKAT 由中国医学科学院血液学研究所程涛教授惠赠,用 Lipofectamin 2000(美国 Invitrogen 公司)共同转入包装细胞系 293T。48 h 后收集病毒上清分别转染 U937、HL-60 和 KG1a 细胞,48 h 后采用流式细胞术检测绿色荧光蛋白(GFP)荧光强度以判断转染效率。MSCV-IRES-GFP 载体用作对照载体。

5. 流式细胞术检测细胞周期和凋亡:转染后的细胞加入 Hoechst33342 和 PY(购于美国 Sigma 公司)后孵育。采用流式细胞术检测 G₀ 期的细胞比例。转染后的细胞加入 Annexin V 5 μl(购于美国 BD Pharmingen 公司)和碘化丙啶(PI) 1 μl,避光放置 20 min,上流式细胞仪检测凋亡细胞比例。每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次。

6. MTT 法检测细胞增殖的抑制率:将转染后分选的 GFP⁺ 细胞接种于 96 孔板(每孔 8 000×10³ 个细胞),每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml),37 ℃ 孵育 4 h 后,1 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min,弃上清后加入 200 μl DMSO,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上检测 570 nm 波长处吸光度(A)值。每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次。

$$\text{增殖抑制率}(\%) = [1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

7. 体内成瘤实验:6~8 周龄 NOD/SCID 小鼠由中国医学科学院血液学研究所动物室赠送。转染后分选的 GFP⁺ U937、HL-60、KG1a 细胞按每只 1×10⁶ 个细胞皮下接种于 NOD/SCID 小鼠。实验组和对照组各有 4~6 只。注射后 10、20、25、30 d 测量肿瘤大小。

8. 统计学处理:应用 Graphpad 软件进行 t 检验,实验数据用平均值±标准差表示。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. AML 患者原代细胞和细胞系中 Hes1 的表达:Hes1 及其下游效应分子 p21 在 AML 原代细胞和 HL-60、U937、KG1a 细胞中的表达均比正常 BMNC 低(表 1, P 值均<0.05)。

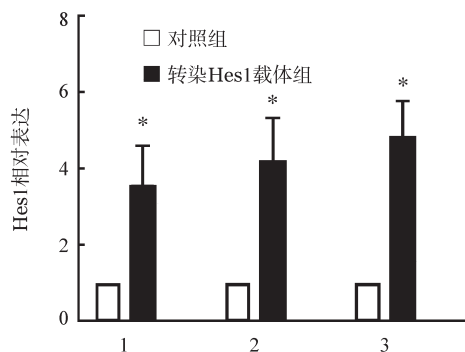
表 1 Hes1 及 p21 在急性髓系白血病(AML)原代细胞及细胞系中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	Hes1	p21
正常对照组	1	1
HL-60 细胞组	0.42±0.03 ^a	0.32±0.26 ^a
U937 细胞组	0.54±0.01 ^a	0.44±0.12 ^a
KG1a 细胞组	0.36±0.12 ^a	0.34±0.04 ^a
AML 原代细胞组	0.67±0.24 ^a	0.59±0.43 ^a

注:正常对照组样本数为 5;AML 原代细胞组样本数为 3;细胞系每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次。与正常对照组比较,^aP<0.05

2. 转染逆转录病毒载体后 Hes1 的表达:转染后,通过荧光显微镜观察转染效率,通过实时定量 PCR 检测 Hes1 的表达,结果显示 Hes1 的表达均较转染前上调(图 1, P 值均<0.05)。

3. Hes1 活化对白血病细胞体外增殖、凋亡的影响:MTT 法检测结果显示,高表达 Hes1 的 AML 细胞系增殖能力均较对照组下降;流式细胞术检测结果显示:与对照组比较, Hes1⁺ AML 细胞大多进入 G₀/G₁ 期; Annexin V 实验结果显示:与对照组比较, Hes1⁺ AML 细胞的凋亡增加(表 2, P 值均<0.05)。



1:HL-60细胞; 2:U937细胞; 3:KG1a细胞

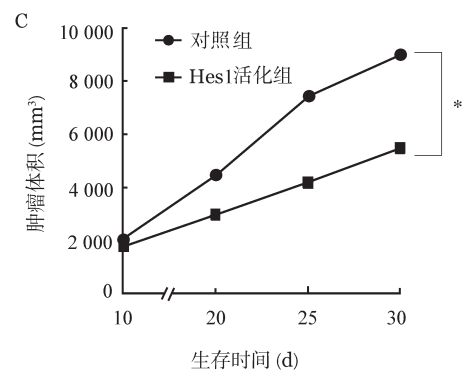
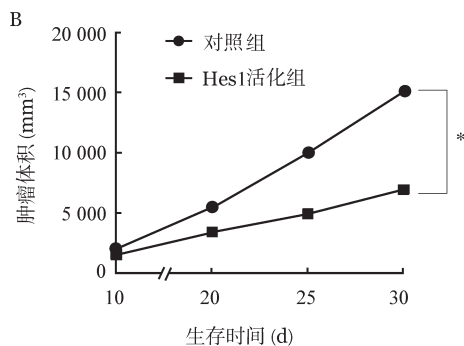
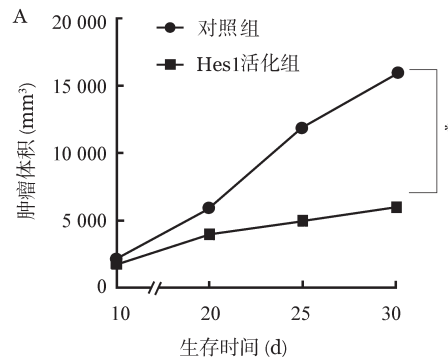
图1 实时定量PCR检测转染逆转录病毒载体后细胞系中Hes1的表达(与对照组比较,*P<0.05)

4. Hes1活化对白血病细胞体内增殖的影响:成瘤实验结果显示,与对照组比较,3种细胞系高表达Hes1后在NOD/SCID小鼠体内的成瘤性均降低(图2,P值均<0.05)。

讨论

Notch信号通路在造血细胞的分化发育中发挥着重要的作用^[10]。文献报道Notch信号通路的异常激活能导致某些造血系统恶性肿瘤^[11]。例如,已证实染色体易位t(7;9)(q34;q34.3)是T-ALL的病因^[12]。不同于ALL,Notch通路在AML中的作用尚有争议。Mirandola等^[13]报道,Notch受体在AML患者原代细胞表达升高,但其靶基因Hes1的表达水平较低,表明AML细胞中Notch信号通路未激活。同样,有研究者报道,AML细胞株和原代AML细胞高表达Notch受体,阻断Notch通路后可抑制AML细胞株的增殖^[14-15]。Li等^[5]发现HL-60细胞高表达Notch配体和受体,阻断Notch通路后抑制HL-60细胞的增殖并诱导HL-60细胞凋亡。Xu等^[2]发现,与正常对照组比较,Notch1及其配体Jagged1和Delta1在AML细胞中上调。

然而,也有与此相反的文献报道。Chadwick等^[3]报道Notch通路的活化可抑制AML细胞的生



A:HL-60细胞; B:U937细胞; C:KG1a细胞

图2 体内成瘤检测Hes1活化对白血病细胞体内增殖的影响(与对照组比较,*P<0.05,每组鼠数为4只)

长并诱导凋亡。同样地,Yin等^[16]证明活化的Notch通路可抑制K562细胞的增殖和集落形成。Kannan等^[7]报道Notch受体的激活导致AML生长受抑和caspase依赖的细胞凋亡,这与Bcl-2、p53和p21的表达相关。Lobry等^[6]发现,Notch信号通路在AML原

表2 Hes1活化对白血病细胞增殖的影响(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞增殖的抑制率		G ₀ 期细胞比例		细胞凋亡率	
	对照	Hes1 ⁺	对照	Hes1 ⁺	对照	Hes1 ⁺
HL-60细胞组	7.8±1.1	19.6±0.2 ^a	11.00±1.21	20.00±0.83 ^a	5.00±0.16	13.00±1.08 ^a
U937细胞组	8.9±0.3	23.4±1.4 ^a	13.00±0.98	25.00±0.24 ^a	10.00±1.65	21.00±3.12 ^a
KG1a细胞组	4.5±0.8	26.4±0.4 ^a	10.00±2.44	33.00±1.45 ^a	8.00±1.03	18.00±0.73 ^a

注:与对照组比较,*P<0.05;每组实验设3个复孔,实验重复3次

代细胞表达很低,该通路的活化会促使细胞凋亡。

Hes1是Notch通路下游的效应子^[17]。文献报道其在造血细胞发育及某些恶性血液病中起重要作用^[18]。Hes1基因参与细胞周期,能维持某些成体干细胞处于未分化的静止状态^[19-22]。鉴于Notch受体活化在AML中的不同观点,我们将研究重点放在其下游分子Hes1上。首先我们检测了Hes1在HL-60、U937、KG1a和AML患者原代细胞中的表达情况。结果发现,Hes1及其下游效应子p21在AML细胞株和患者样本中表达很弱。而通过转染增强Hes1表达后,AML细胞的增殖受到抑制。细胞周期分析结果显示,更多的Hes1⁺AML细胞进入G₀期并诱导细胞凋亡。而Hes1的高表达也激活了下游效应子p21的表达。因此我们的结果表明Hes1是通过p21通路影响AML细胞。总之,我们的结果表明Hes1通过抑制AML细胞增殖和诱导AML细胞的凋亡来发挥抗肿瘤的活性,从而证实Hes1是潜在的治疗AML的新靶点。

参考文献

- [1] Aster JC1, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia [J]. *Annu Rev Pathol*, 2008, 3:587-613.
- [2] Xu X, Zhao Y, Xu M, et al. Activation of Notch signal pathway is associated with a poorer prognosis in acute myeloid leukemia [J]. *Med Oncol*, 2011, 28:S483-S489.
- [3] Chadwick N, Nostro MC, Baron M, et al. Notch signaling induces apoptosis in primary human CD34 + hematopoietic progenitor cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(1):203-210.
- [4] Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(10):1931-1935.
- [5] Li GH, Fan YZ, Liu XW, et al. Notch signaling maintains proliferation and survival of the HL60 human promyelocytic leukemia cell line and promotes the phosphorylation of the Rb protein [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340(1-2):7-14.
- [6] Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, et al. Notch pathway activation targets AML initiating cell homeostasis and differentiation[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(2): 301-319.
- [7] Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, et al. Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(2): 321-337.
- [8] Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, et al. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(14):2872-2881.
- [9] Tian C, Zheng G, Cheng T, et al. Hes1 protects the function of normal HSC in leukemic microenvironment [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12 (2): 322-331.
- [10] Hu X, Shen H, Tian C, et al. Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model [J]. *Blood*, 2009, 114(18): 3783-3792.
- [11] Hughes DP. How the NOTCH pathway contributes to the ability of osteosarcoma cells to metastasize [J]. *Cancer Treat Res*, 2010, 152:479-496.
- [12] Wang L, Cheng T, Zheng G. The impact of tumor microenvironments on stem cells [J]. *Transl Cancer Res*, 2013, 2 (5): 422-428.
- [13] Mirandola L, Apicella L, Colombo M, et al. Anti- Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1 [J]. *Leukemia*, 2013, 27(7): 1558-1566.
- [14] Tohda S, Nara N. Expression of Notch1 and Jagged1 proteins in acute myeloid leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(3): 467-472.
- [15] Tohda S, Kogoshi H, Murakami N, et al. Diverse effects of the Notch ligands Jagged1 and Delta1 on the growth and differentiation of primary acute myeloblastic leukemia cells [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(5): 558-563.
- [16] Yin G, Hou R, Li J, et al. Expression of Notch receptor and its target gene Hes-1 in bone marrow CD34+ cells from patients with psoriasis[J]. *Dermatology*, 2012, 225(2):147-153.
- [17] Vo TT, Ryan J, Carrasco R, et al. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML[J]. *Cell*, 2012, 151(2):344-355.
- [18] Del Giudice, Rossi D, Chiaretti S, et al. NOTCH1 mutations in 12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of + 12 CLL [J]. *Haematologica*, 2011, 97(3):437-441.
- [19] Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, et al. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 230-233.
- [20] Yu X, Alder JK, Chun JH, et al. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):876-888.
- [21] Nwabo Kamdje AH, Mosna F, Bifari F, et al. Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Blood*, 2011, 118(2): 380-389.
- [22] Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Blood*, 2011, 117(23):6083-6090.

(收稿日期:2014-12-08)

(本文编辑:刘志红)