

研究论文

人RAR α 基因重组腺病毒表达质粒的构建及其对人白血病NB4细胞的影响研究

蒋开玲^{1,2} 钟 梁² 阳小群² 王 慧² 马鹏鹏² 朱新瑜² 刘北忠^{1,2*}¹重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160;²重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 利用AdEasy系统构建携带人RAR α 基因的重组腺病毒表达质粒, 感染人白血病NB4细胞后用生理浓度的维甲酸诱导, 观察其对NB4细胞增殖和分化的影响。以急性早幼粒细胞株NB4的cDNA为模板, PCR扩增RAR α 基因, 克隆至穿梭质粒pAdTrace-TO4中, 构建重组腺病毒穿梭质粒pAdTrace-TO4-RAR α 。用EcoR V和Sal I双酶切及测序鉴定, 然后与骨架质粒AdEasy-1同时转化大肠杆菌BJ5183菌株的感受态, 经同源重组获得重组腺病毒质粒Ad-RAR α 。酶切验证后, Pac I酶线性化后转染AD293细胞, 包装出重组腺病毒Ad-RAR α , 经3轮扩增后, 测定病毒滴度, 进行PCR鉴定。流式细胞术测定病毒感染效率, Western blot法检测重组腺病毒感染的人NB4细胞中RAR α 蛋白和凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2的表达, CCK-8法检测重组腺病毒感染对NB4细胞增殖的影响, Annexin V/PI双染法测定细胞周期, PI测定细胞凋亡。重组腺病毒穿梭质粒pAdTrace-TO4-RAR α 经双酶切及测序证明构建正确, 病毒感染效率可达70%, 与空载体感染及未感染的NB4细胞相比, 重组腺病毒感染的NB4细胞内RAR α 蛋白的表达明显升高($P < 0.05$), 且经生理浓度全反式维甲酸ATRA处理后, 能够有效地促进感染重组腺病毒细胞的分化成熟和凋亡。该研究成功构建了携带人RAR α 基因的重组腺病毒表达质粒, 感染NB4细胞后可促进细胞增殖, 经生理浓度维甲酸诱导后能促进NB4细胞分化成熟和凋亡, 为进一步研究该基因在急性髓细胞白血病发生发展中的作用奠定了基础。

关键词 RAR α 基因; 腺病毒; NB4细胞; 维甲酸; 增殖

Construction of Recombinant Adenovirus Vector Carrying Human RAR α Gene and Its Effect on NB4 Human Promyelocytic Leukemia Cells

Jiang Kailing^{1,2}, Zhong Liang², Yang Xiaoqun², Wang Hui², Ma Pengpeng², Zhu Xinyu², Liu Beizhong^{1,2*}¹Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;²Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In this research, we constructed recombinant adenovirus Ad-RAR α and determined its effect on NB4 human promyelocytic leukemia cells. RAR α gene was amplified by PCR using cDNA of NB4 cells as a

收稿日期: 2014-03-12 接受日期: 2014-05-28

国家自然科学基金(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(批准号: 2011BA5037)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-85381906, E-mail: liubeizhong@cqmu.edu.cn

Received: March 12, 2014 Accepted: May 28, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and Chongqing Natural Science Foundation Key Project (Grant No.2011BA5037)

*Corresponding author. Tel: +86-23-85381906, E-mail: liubeizhong@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-21 10:35

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0073.html>

template and inserted into shuttle plasmid pAdTrace-TO4. The constructed recombinant shuttle plasmid pAdTrace-TO4-RAR α was digested with *Pme* I, and transformed to competent *E. coli* BJ5183 containing adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1. The obtained recombinant adenovirus plasmid Ad-RAR α was digested with *Pac* I and transfected to AD293 cells for packaging. The obtained recombinant adenovirus Ad-RAR α was subjected to three cycles of amplification, then determined titer and identified by PCR and sequencing. NB4 cells were infected by the recombinant adenovirus, with infection rate of 70%. Protein expression, proliferation and differentiation in NB4 cells of RAR α were detected by Western blot, CCK-8 and flow cytometry respectively. Cell cycle was measured by Annexin V/PI. Recombinant adenovirus Ad-RAR α reached a titer of 5.2×10^5 pfu/mL after three cycles of amplification and recombinant adenovirus Ad-RAR α was constructed correctly as proved by PCR and sequencing, and the RAR α gene in Ad-RAR α was successfully expressed in NB4 cells. Recombinant adenovirus Ad-RAR α was constructed successfully and RAR α gene could be expressed in NB4 cells. The proliferation of infected NB4 cells was enhanced. Physiological concentration of ATRA (all-trans-retinoic acid) can induce differentiation effectively. All of these results lay the foundation to further study for the role of this gene in acute myeloid leukemia development.

Key words RAR α ; adenovirus; NB4 cells; ATRA; proliferation

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是髓细胞白血病的一种特殊类型, 90%以上的APL具t(15;17)(15q22;17q21)的染色体易位^[1], 形成早幼粒细胞白血病因子-维甲酸受体 α 融合基因(PML-RAR α), 表达异常的PML-RAR α 融合蛋白^[2]。该融合蛋白的形成将干扰野生型RAR α 、PML与PML核体的功能及其相关的信号途径, 使髓细胞的生长停滞在早幼粒阶段, 最终导致成瘤性早幼粒细胞的大量堆积^[3]。

维甲酸受体 α (retinoic acid receptor α , RAR α)基因属于核受体家族, 是一种转录因子, 可被配体诱导^[4]。其靶基因有多种, 如细胞周期调节因子、细胞表面黏附分子、细胞凋亡及终末分裂调节分子等, 故RAR α 的作用很广泛。在急性早幼粒细胞白血病发生过程中, 融合蛋白PML-RAR α 的形成干扰了RAR α 的正常生理作用, 导致粒细胞增殖加速, 分化受阻, 停滞在早幼粒阶段。有文献报道, 粒细胞分化受阻有可能是因为融合蛋白的形成导致RAR α 单倍剂量不足所致^[5], 那么如果在急性早幼粒白血病细胞株中过表达RAR α 会产生什么样的结果呢? 故我们提出在NB4细胞中过表达RAR α 。由于急性早幼粒白血病细胞株NB4为悬浮细胞, 采用脂质体转染质粒效率不高, 而腺病毒能在悬浮细胞中有效进行增殖, 且具有高效率、低致病性、高滴度以及在体内不整合入宿主细胞染色体等优点^[6-7], 因此在肿瘤基因研究中被广泛应用。我们通过构建RAR α 基因的腺病毒, 并用此病毒感染人白血病NB4细胞, 观察

RAR α 过表达及过表达后经生理浓度维甲酸处理, 对NB4细胞增殖、分化及凋亡的影响, 为进一步阐明APL发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒及菌株 人早幼粒细胞白血病细胞株NB4、AD293细胞、感受态大肠杆菌DH5 α 和BJ5183、腺病毒穿梭质粒pAdTrace-TO4和骨架质粒pAdEasy-1均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶EcoR V、Sal I及T4 DNA连接酶、Trizol试剂和高保真DNA多聚酶均购自TaKaRa公司; ATRA(all-trans-retinoic acid)购自美国Sigma公司; 限制性内切酶Pme I和Pac I购自Thermo公司; Lipofectamine2000购自Invitrogen公司; Annexin V/PI试剂盒购自凯基生物公司; 胶回收试剂盒和质粒小抽试剂盒购自Promega公司; 兔抗人RAR α 、Bax、Bcl-2多克隆抗体均购自Santa Cruz公司; 小鼠抗人 β -actin单克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG、HRP标记的山羊抗小鼠IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成 根据GenBank中登录的RAR α 基因编码区序列(NM_5914), 采用PrimerPremier 6.0软件设计特异性引物, 序列如下: RAR α -F: 5'-CCG GTC GAC AGA TGT ACG AGA GTG TAG AAG-3'(下划线部分为Sal I酶切位点), RAR α -R: 5'-CCG GAT ATC

GTC ACA TGG TCG GTA G-3'(下划线部分为EcoR V的酶切位点), 扩增片段大小为1 449 bp; 引物由上海英潍捷基生物技术公司合成。

1.2.2 目的基因的扩增与纯化 以急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4的cDNA为模板, RAR α -F和RAR α -R为引物, PCR扩增RAR α 的CDS区序列。反应条件为: 95 °C预变性5 min; 98 °C变性10 s, 62 °C退火35 s, 72 °C延伸90 s, 共35个循环; 72 °C再延伸5 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。在紫外灯的照射下, 快速将目的片段切下, 称重后加入等体积的DNA结合缓冲液(binding buffer), 经离心过柱洗涤之后, 测定其浓度。

1.2.3 重组腺病毒穿梭质粒的构建 将腺病毒穿梭质粒pAdTrace-TO4和纯化回收的PCR产物分别经Sal I和EcoR V双酶切, 胶回收载体片段和RAR α 基因片段, 以T4 DNA连接酶于16 °C连接过夜, 连接产物转化感受态大肠杆菌DH5 α , 涂布含50 μ g/mL卡那霉素的LB平板, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 经双酶切鉴定, 并送上海英潍捷基生物技术公司测序, 鉴定正确的阳性重组质粒命名为pAdT-RAR α 。

1.2.4 重组腺病毒质粒的构建、包装、扩增及鉴定 重组腺病毒穿梭质粒pAdTrace-TO4-RAR α 经Pme I酶切线性化及FastAP去磷酸化后, 转化含有骨架质粒pAd-Easy-1的大肠杆菌DH-BJ5183, 进行体外同源重组, 涂布含50 μ g/mL卡那霉素的LB平板, 挑取阳性克隆, 溶解于5 mL含50 μ g/mL卡那霉素的LB平板, 于摇床上振荡12~16 h后提取质粒, 经Pac I酶切鉴定, 鉴定正确的阳性重组腺病毒质粒命名为Ad-RAR α 。取AD293细胞, 接种于25 cm²的培养瓶培养8~10 h, 待细胞融合度达50%时, 取重组腺病毒质粒pAd-RAR α 经Pac I酶切线性化, 乙酸钠-乙醇沉淀法纯化并回收酶切产物, 将脂质体(μ L)与线性化重组质粒(μ g)按2.5:1混合并转染AD293细胞, 于荧光显微镜下观察红色荧光蛋白的表达, 当出现满天星样红色荧光及细胞病变效应(细胞变圆、肿胀, 折光性增强)时, 收获原代病毒Ad-RAR α , 离心收集细胞, 冷冻、融化、涡旋振荡, 重复4次, 收集病毒上清, 继续感染AD293细胞, 扩增3代, 采用倍比稀释法测定病毒滴度; 同法进行空载病毒Ad-KZ的包装。采用蛋白酶K法消化病毒颗粒, 以病毒基因组DNA为模板, RAR α -F和RAR α -R为引物进行PCR反应。以质粒pAdTrace-TO4-RAR α 模板作为阳性对照, 以PBS

为模板作为阴性对照。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 重组腺病毒在NB4细胞中的表达的检测 取对数生长期的NB4细胞分别感染Ad-RAR α 重组腺病毒、阴性腺病毒Ad-KZ和未感染组, 培养48 h后提取细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度后进行SDS-PAGE电泳。取30~50 μ g蛋白, 经10% SDS-PAGE分离后, 湿转至PVDF膜上, 以50 g/L脱脂奶粉室温封闭2 h后, 加入兔抗人RAR α 多抗(1:2 000稀释), 4 °C孵育过夜; 回收抗体后, 用1 \times TBST洗膜2次, 每次10 min, TBS洗膜10 min, 加入HRP标记的羊抗兔(1:2 000稀释), 室温孵育1 h; 1 \times TBST洗膜2次, 每次10 min, TBS洗膜1次, 10 min, ECL化学发光成像分析。

1.2.6 过表达RAR α 的NB4细胞增殖能力检测 取对数生长期的NB4细胞, 按1 \times 10⁴/孔均匀接种于96孔板中, 设4个复孔, 每孔200 μ L。一组细胞感染病毒, 分别于24, 48, 72, 96 h加入10 μ L CCK-8试剂, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养4 h, 于酶标仪上测定各孔450 nm波长下的D值; 另一组细胞感染病毒的同时加入生理浓度全反式维甲酸ATRA(1 nmol/L)处理, 分别于12, 24, 36, 48 h, 加入10 μ L CCK-8试剂, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养4 h, 于酶标仪上测定各孔450 nm波长下的D值, 以D值为纵坐标, 时间(d)为横坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.2.7 感染细胞周期检测 采用PI法检测。取对数生长期的NB4细胞, 1 \times 10⁵/孔接种于6孔板中, 每组设3个复孔, 加入重组腺病毒24 h后, 加入1 nmol/L ATRA处理。48 h后收集细胞, 预冷的PBS洗涤2次后用50 μ L PBS重悬细胞, 用预冷的70%乙醇于4 °C固定2 h, 预冷的PBS洗涤后弃去上清, 每管细胞中加入400 μ L PI染色液、100 μ L RNase A, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37 °C避光温浴30 min后上流式细胞仪检测。

1.2.8 细胞凋亡检测 采用Annexin V/PI法检测细胞凋亡。取对数生长期的NB4细胞, 1 \times 10⁶/孔接种于6孔板中, 每孔设3个复孔, 加入重组腺病毒24 h后, 加入1 nmol/L ATRA处理; 另设空白对照组, 48 h后收集细胞, 预冷的PBS洗涤2次(2 000 r/min, 5 min), 弃上清, 加入500 μ L binding buffer重悬细胞, 加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI混匀, 室温避光孵育15 min, 上流式细胞仪检测。

1.2.9 感染细胞凋亡蛋白的检测 采用Western

blot法检测。取对数生长期的NB4细胞, 5×10^6 /孔接种于6 cm培养皿中, 加入重组腺病毒Ad-RAR α 处理24 h后, 一组加入1 nmol/L ATRA处理, 另一组加入等量的PBS处理, 48 h后收集细胞, 提取细胞总蛋白, 进行SDS-PAGE电泳。

1.2.10 感染细胞分化成熟程度的检测 取对数生长期的NB4细胞, 按 1×10^6 /孔接种于6孔板中, 每组设3个复孔且设一个不含细胞的空白对照。在感染病毒24 h后加入1 nmol/L ATRA处理, 48 h后收集细胞, PBS洗涤2次后每孔细胞用100 μ L PBS重悬, 按10:1的比例加入CD11b抗体4 $^{\circ}$ C避光孵育1 h, PBS洗涤2次后上流式细胞仪检测。

1.2.11 统计学分析 所有实验独立重复3次, Western blot结果用Quantity One进行灰度分析, 用目的基因吸光度值/内参吸光度值的均数 \pm 标准差表示, 统计软件为SPSS 18.0, 组间比较采用 t 检验及方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 重组腺病毒感染效率检测

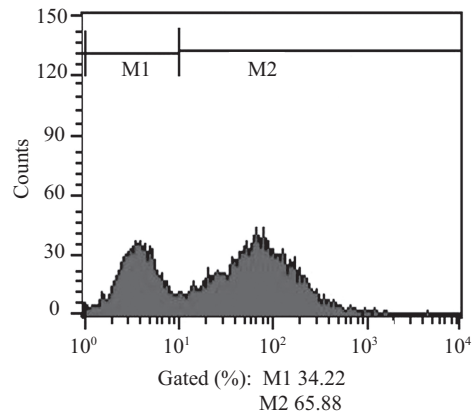
用包装成功的腺病毒Ad-RAR α 感染NB4细胞, 48 h后经流式细胞仪测定其感染效率, 结果显示感染效率可达70%(图1)。

2.2 RAR α 蛋白在NB4细胞中的表达

Western blot检测结果显示, 感染Ad-RAR α 重组腺病毒的细胞RAR α 蛋白的表达明显高于空载组和未感染组, 差异有统计学意义(图2)。

2.3 重组腺病毒对NB4细胞增殖能力的影响

CCK-8检测结果显示, 与未感染组相比, 感染



M1: 未感染细胞; M2: 感染细胞。

M1: uninfected cells; M2: infected cells.

图1 流式细胞仪检测感染效率

Fig.1 Infection efficiency detected by flow cytometry

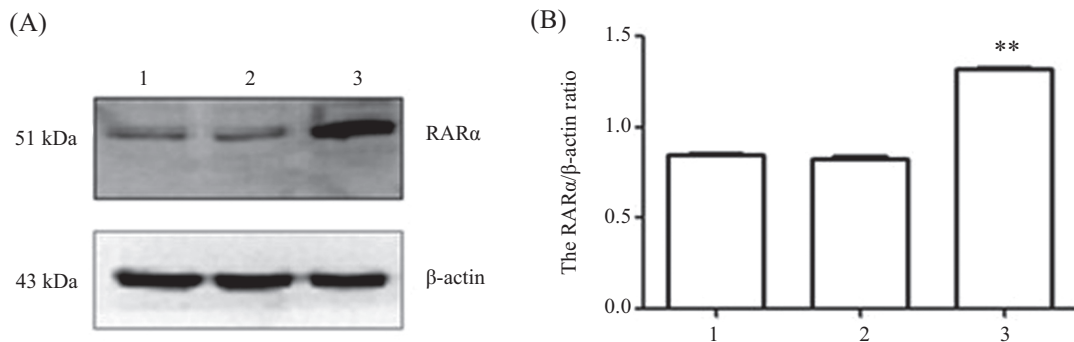
空载组增殖能力稍有下降, 4个时间点的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。未加入ATRA处理时, Ad-RAR α 组与未感染组和空载组相比, 感染重组腺病毒Ad-RAR α 能促进NB4细胞增殖, 差异有统计学意义; 经生理浓度ATRA(1 nmol/L)处理后, Ad-RAR α 组与未感染组和空载组相比, 其增殖能力呈一定程度的下降趋势, 且差异有统计学意义(图3和图4)。

2.4 重组腺病毒对NB4细胞细胞周期的影响

细胞周期结果显示, 经生理浓度ATRA处理后, Ad-RAR α 组细胞周期与未感染组和空载组细胞周期的差异无统计学意义(图5和表1)。

2.5 重组腺病毒对NB4细胞细胞凋亡的影响

凋亡检测结果显示, 经ATRA处理后, 空载组较未感染组凋亡率稍高, 但差异无统计学意义; Ad-RAR α 组凋亡率与未感染组和空载组相比, 凋亡率增高, 其差异有统计学意义(表2)。

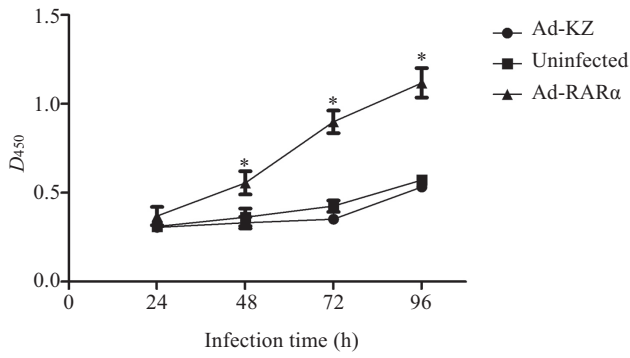


A: 不同组RAR α 蛋白的表达; B: A图的统计学分析。1: Ad-KZ组; 2: 未感染组; 3: Ad-RAR α 感染组。 ** $P < 0.01$, 与空载组和未感染组比较。

A: the expressions of RAR α in different groups; B: statistical analysis of A. 1: Ad-KZ group; 2: uninfected group; 3: Ad-RAR α group. ** $P < 0.01$ vs Ad-KZ group and uninfected group.

图2 不同组RAR α 的表达变化

Fig.2 Expressions of RAR α in different groups

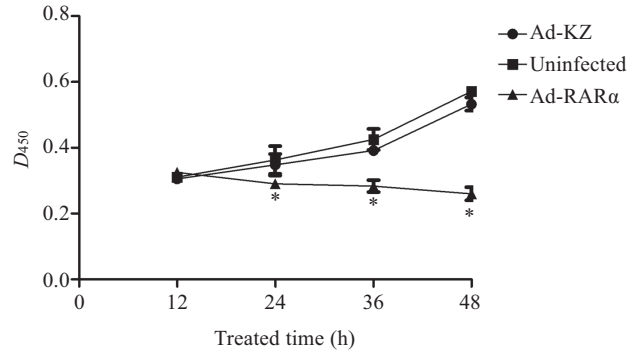


* $P < 0.05$, 与未感染组和空载组相比, $n = 5$ 。

* $P < 0.05$ vs Ad-KZ group and uninfected group, $n = 5$ 。

图3 重组腺病毒Ad-RAR α 对NB4细胞增殖的影响 (未经ATRA处理)

Fig.3 Effect of Ad-RAR α on proliferation of NB4 cells (untreated with ATRA)

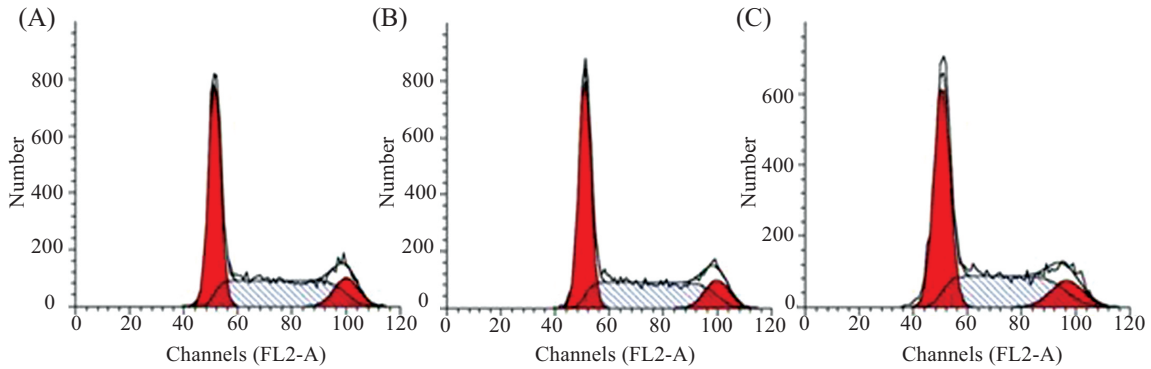


* $P < 0.05$, 与未感染组和空载组相比, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ 。

* $P < 0.05$ vs Ad-KZ group and uninfected group, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ 。

图4 重组腺病毒Ad-RAR α 对NB4细胞增殖的影响 (经生理浓度ATRA处理)

Fig. 4 Effect of Ad-RAR α on proliferation of NB4 cells (treated with physiological ATRA)



A: 空载组; B: 未感染组; C: Ad-RAR α 组。

A: Ad-KZ group; B: uninfected group; C: Ad-RAR α group.

图5 Ad-RAR α 对NB4细胞周期的影响(经生理浓度ATRA处理后)

Fig.5 Effect of Ad-RAR α on cell cycle (treated with physiological ATRA)

表1 ATRA对NB4细胞周期的影响

Table 1 Effect of ATRA on cell cycle of NB4 cells

组别 Groups	细胞周期(%) Cell cycle (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Ad-KZ group	44.78 \pm 0.03	43.31 \pm 0.02	11.91 \pm 0.04
Uninfected group	44.34 \pm 0.05	43.28 \pm 0.04	12.38 \pm 0.06
Ad-RAR α group	43.58 \pm 0.04	44.15 \pm 0.06	12.27 \pm 0.03

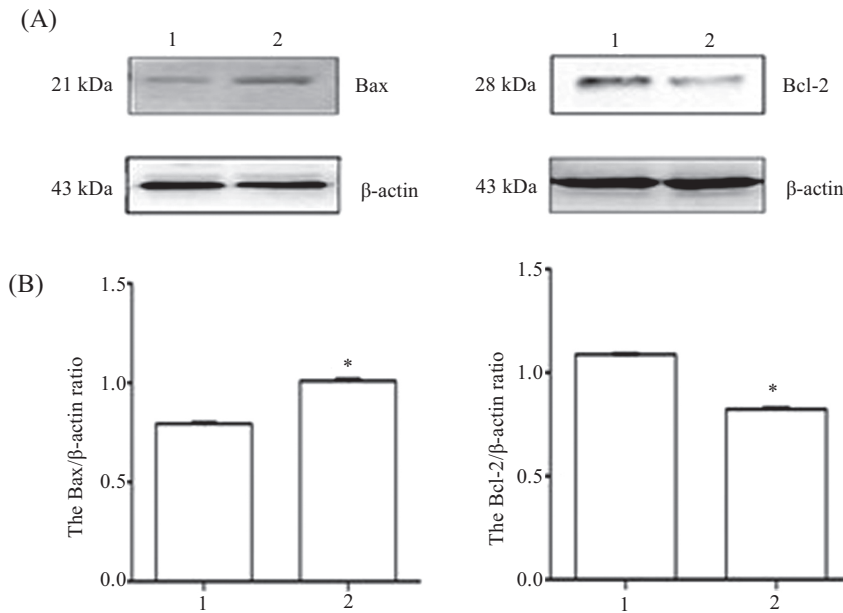
表2 ATRA对NB4细胞凋亡的影响

Table 2 Effect of ATRA on apoptosis of NB4 cells

组别 Groups	细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate (%)
Uninfected group	23.8 \pm 0.01
Ad-KZ group	25.3 \pm 0.02
Ad-RAR α group	36.4 \pm 0.01*

* $P < 0.05$, 与未感染组和空载组相比。

* $P < 0.05$ vs Ad-KZ group and uninfected group.



1: 对照组; 2: ATRA处理组。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

1: control group; 2: ATRA treated group. * $P < 0.05$ vs control group.

图7 Western blot检测Bax、Bcl-2的变化

Fig.7 Expression changes of Bax and Bcl-2 detected by Western blot

表3 流式细胞术测定各组细胞CD11b表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Detection of CD11b expression in NB4 cells of different groups by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别 Groups	处理因素 Treated factors	
	阴性对照 Negative control (PBS)	生理浓度ATRA(1 nmol/L) Physiological concentration of ATRA (1 nmol/L)
Ad-KZ group	7.129 2±0.228 1	8.212 7±0.306 5
uninfected group	7.520 3±0.232 1	9.083 3±0.241 3
Ad-RAR α group	7.324 5±0.205 8	21.193 3±1.296 2*

* $P < 0.05$, 与空载组和未感染组相比。

* $P < 0.05$ vs Ad-KZ group and uninfected group.

2.6 NB4细胞中凋亡蛋白的表达

Western blot结果显示, 经ATRA处理组, 促凋亡蛋白Bax表达上调, 抑凋亡蛋白Bcl-2表达下降, 与对照组(未经ATRA处理)相比, 差异有统计学意义(图7)。

2.7 重组腺病毒对NB4细胞分化成熟的影响

NB4细胞感染重组腺病毒24 h后, 加入生理浓度ATRA处理, 48 h后用流式细胞仪检测髓细胞表面分化抗原CD11b, 结果显示, 与对照组(加入等量的PBS)相比, 加入1 nmol/L ATRA组, 重组腺病毒Ad-RAR α 感染组NB4细胞有一定程度的分化, 与未感染组和Ad-KZ相比, 差异有统计学意义(表3)。

3 讨论

RAR α 属于核受体家族, 属转录因子, 是视黄酸

受体三种亚型之一。它在机体胚胎发育、器官形成、细胞增殖和凋亡、生长发育等诸多过程中起着重要作用^[8]。RAR α 以配体诱导的方式发挥作用, 在RAR α 不结合配体时, 其配体结合区与一系列辅助抑制因子相结合, 即视黄醛和甲状腺素受体家族介导因子SMRT(silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor)、N-CoR/mSin3/HDAC, 结合后使组蛋白与DNA之间的结合变得紧密, 转录因子难以结合DNA, 而不能起始转录, 呈现转录抑制。当RAR α 结合配体后, 配体结合区构象发生改变, 与辅助抑制因子解离, 转而与大多辅助激活因子结合, 进而激活转录^[9-11]。由此可以看出, RAR α 对靶基因转录的调节是双重性的。

急性早幼粒细胞白血病的发生是由于染色体

异位形成异常的PML-RAR α 基因, 进而形成PML-RAR α 融合蛋白, 这一形成必定影响野生型RAR α 发挥其生理作用。NB4细胞株具有典型的t(15;17)(15q22;17q21)染色体易位及PML-RAR α 融合基因特征, 常用于研究APL的细胞模型^[12]。有文献报道, 在髓细胞克隆形成过程中, RAR α 的单倍剂量不足可与PML-RAR α 协同作用导致细胞增殖加速, 分化受阻, 停滞在早幼粒阶段^[5,13]。本实验中, 通过构建野生型RAR α 的腺病毒, 在急性早幼粒白血病细胞株NB4细胞中过表达野生型RAR α , 旨在通过弥补NB4细胞中野生型RAR α 的单倍剂量不足来观察其对该细胞株增殖、分化成熟的影响。实验结果表明, 在NB4细胞中过表达RAR α 能够促进细胞增殖, 加入生理浓度ATRA处理后, 细胞增殖受抑, 凋亡增加, 分化作用加强。

RA主要是通过细胞核膜上的维甲酸受体介导信号转导来调控细胞的基因表达。在有足够受体结合的情况下, ATRA有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。在白血病细胞株NB4中过表达RAR α 使该细胞株增殖能力增强, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。由于RAR α 的过表达导致细胞内RA的量相对不足, 没有足够的配体维甲酸与之结合, 使其所调控的增殖与凋亡相关基因如*survivin*等异常表达^[14], 从而促进细胞的增殖, 抑制细胞凋亡。在经过生理浓度ATRA处理之后, 其增殖能力受抑, 凋亡水平增高, 与对照组的差别有统计学意义。但生理浓度的ATRA处理组细胞的细胞周期并没有明显的变化, 故我们推测, 生理浓度ATRA引起的增殖能力受抑可能是通过诱导细胞凋亡增加导致的。因此我们测定了经生理浓度ATRA处理后NB4细胞中的凋亡蛋白Bax和Bcl-2, 结果显示, Bax表达量增加, Bcl-2表达量减少, 说明生理浓度ATRA引起的增殖能力受抑是通过上调Bax、下调Bcl-2这一凋亡信号通路活化而引起的。

CD11b是细胞黏附分子整合素家族成员之一, Mac-1(CD11b/CD18)的A链。正常情况下, 它主要在成熟单核细胞、粒细胞及自然杀伤细胞上表达。主要作用是促进炎症的发生和发展、激活淋巴细胞、促进吞噬细胞的吞噬功能等, 在机体的抗感染免疫中发挥重要作用^[15-16]。白血病免疫表型研究发现, CD11b属髓系相关分化抗原, 是一个髓系细胞分化较为成熟的标志^[17], 故测定CD11b是髓系细胞分化

成熟的良好指标。本实验中, 感染病毒组中加入生理剂量(1 nmol/L) ATRA之后, 其分化作用明显, 与对照组相比, 其CD11b表达量增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明生理浓度的ATRA能与感染病毒组过表达的RAR α 相结合, 调控一些与参与髓系细胞分化的基因如*Hox*家族基因、*C/EBP*基因等, 从而促进NB4细胞分化。关于该过程中参与细胞分化的具体基因还需要进一步深入研究。

本实验证实, 在NB4细胞株中过表达RAR α 能弥补野生型RAR α 的单倍剂量不足所引起的分化成熟受阻, 且分化水平可通过加入生理浓度的ATRA而改变。此外, RAR α 还可通过共价键结合参与蛋白翻译后修饰, 影响多种通路相关蛋白活性, 如Akt、PKC、JNK、c-Jun等, 涉及的相关信号通路正在进一步的研究中。

综上所述, 重组腺病毒RAR α 感染NB4细胞后可促进细胞增殖, 经生理浓度维甲酸诱导后能促进NB4细胞分化成熟和凋亡, 丰富了RAR α 在急性早幼粒细胞白血病发生发展过程中所起的作用, 为进一步研究其参与APL发生的机制及寻找临床诊疗靶点奠定了一定的基础。

参考文献 (References)

- 1 吴凡, 夏瑞祥. 急性早幼粒细胞白血病的治疗及预后研究进展. 安徽医学(Wu Fan, Xia Ruixiang. Advances in treatment and prognosis of acute promyelocytic leukemia. Anhui Medical Journal) 2009; 30(5): 584-6.
- 2 Aymee P, Philippe K. PML-RAR α homodimers: Distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. EMBO J 1993; 12(8): 3171-82.
- 3 Dekking EH, van der Velden VH, Varro R, Wai H, Böttcher S, Kneba M, et al. Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML-RAR α fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. Leukemia 2012; 26(9): 1976-85.
- 4 钟少东, 蔡晓燕. 急性早幼粒细胞白血病发病机制及治疗进展. 安徽医药(Zhong Shaodong, Cai Xiaoyan. Pathogenesis and treatment progress of acute promyelocytic leukemia. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal) 2011; 15(3): 277-9.
- 5 Welch JS, Klco JM, Varghese N, Nagarajan R, Ley TJ. RAR α haploinsufficiency modestly influences the phenotype of acute promyelocytic leukemia in mice. Blood 2011; 117(8): 2460-8.
- 6 范凌云, 谢庆军. 腺病毒载体的研究进展. 中国生物制品学杂志(Fan Lingyun, Xie Qingjun. Advances in adenoviral vectors. Chinese Journal of Biologicals) 2008; 21(2): 153-7.
- 7 匡文斌, 成凤, 秦晓林, 范晓卿, 王秦, 董晋豫, 等. 重组腺病毒Ad5-hNK4-EGFP的构建与鉴定. 中国生物制品学杂志(Kuang Wenbin, Cheng Feng, Qin Xiaolin, Fan Xiaoqing, Wang Qin, Dong Jinyu, et al. Construction and identification of recombinant adenovirus Ad5-hNK4-EGFP. Chinese Journal of Biologi-

- cals) 2012; 25(6): 676-80.
- 8 Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008; 134(6): 921-31.
- 9 Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004; 328: 1-16.
- 10 Lin RJ, Evans RM. Acquisition of oncogenic potential by RAR α chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell* 2000; 5(5): 821-30.
- 11 Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Söderstrom M, Laherty CD, Torchia J, *et al.* A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 1997; 387(6628): 43-8.
- 12 王 慧, 钟 梁, 蒋开玲, 朱新瑜, 马鹏鹏, 阳小群, 等. NLS-RAR α 蛋白在重组腺病毒Ad-NE感染的NB4中定位的验证. *中国细胞生物学学报*(Wang Hui, Zhong Liang, Jiang Kailing, Zhu Xinyu, Ma Pengpeng, Yang Xiaoqun, *et al.* Location verification of NLS-RAR α protein in infected NB4 cell line with adenovirus Ad-NE. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(3): 331-7.
- 13 Westervelt P, Lane AA, Pollock JL, Oldfather K, Holt MS, Zimonjic DB, *et al.* High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RAR α expression. *Blood* 2003; 102(5): 1857-65.
- 14 Xue J, Xie XJ, Lin MF. Expression and clinical significance of antiapoptotic gene (survivin) in NB4 and acute promyelocytic leukemia cells. *The Scientific World Journal* 2012; 2012: 937087.
- 15 Xia Y, Borland G, Huang J, Mizukami IF, Petty HR, Todd RF 3rd, *et al.* Function of the lectin domain of mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol* 2002; 169(11): 6417-26.
- 16 兰志建, 汤永民, 宁铂涛, 沈红强, 杨世隆, 钱柏芹, 等. CD11b在白血病细胞上的表达. *浙江医学*(Lan Zhijian, Tang Yongmin, Ning Botao, Shen Hongqiang, Yang Shilong, Qian Boqin, *et al.* Expression of CD11b on peripheral leucocytes in patients with leukemia. *Zhejiang Medicine*) 2003; 25(8): 458-60.
- 17 Rizzatti EG, Garcia AB, Portieres FL, Silva DE, Martins SL, Falcão RP. Expression of CD117 and CD11b in bone marrow can differentiate acute promyelocytic leukemia from recovering benign myeloid proliferation. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(1): 31-7.