

·论著·

经全反维甲酸诱导和未诱导的 HL-60 细胞基因的差异展示分析

龚放¹, 廖清奎², 李丰益², 李钦伯², 袁淑兰³

(1. 成都市第三人民医院儿科, 四川 成都 610031; 2. 华西医科大学附二院儿科, 四川 成都 610041;
3. 华西医科大学肿瘤研究所, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 对经全反维甲酸诱导和未诱导的 HL-60 细胞差异表达基因进行初探。方法 提取早幼粒白血病细胞株中总 RNA, 经由锚定引物介导的逆转录反应(RT)获得 cDNA; 以 cDNA 为模板采用相同锚定引物和另一上游引物进行 PCR 扩增, 然后将 PCR 扩增产物在非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 比较两组细胞的基因表达情况。结果 经由 24 种引物组合对经全反维甲酸诱导和未诱导的 HL-60 细胞进行差异展示分析, 扩增出 541 条片段, 平均每泳道显带数 23 条, 发现差异明显片段 36 条。结论 mRNA 差异展示技术能有效地反映出经全反维甲酸诱导和未诱导的 HL-60 细胞多个基因差异表达情况。

[关键词] 全反维甲酸; 人早幼粒白细胞株; 诱导分化; 逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)05-0329-04

mRNA Differential Display of Promyelocytic Leukemia Cell Lines (HL-60): Induced and Non-induced by All-trans Retinoid Acid

GONG Fang, LIAO Qing-Kui, LI Feng-Yi, et al.

Department of Pediatrics, Third Hospital of Chengdu, Chengdu, 610031, China

Abstract: **Objective** To study the differential display of promyelocytic leukemia cell lines induced and non-induced by all-trans retinoid acid (ATRA). **Methods** cDNA fragment was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with total RNA extracted from promyelocytic leukemia cell lines. The amplified cDNA fragment was confirmed on non-denaturing polyacrylamide gel. **Results** With 24 primer combinations, we amplified a total of 541 bands, the mean number of bands obtained per lane was 23, and 36 bands were found with obvious difference. **Conclusions** mRNA differential display is effective to detect and characterize altered gene expressions in promyelocytic leukemia cell lines induced and non-induced by ATRA.

Key words: All-trans retinoid acid; Human promyelocytic leukemia cell lines; Induce; Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

高等动物大约含有 10 万个不同基因, 但对于某一细胞来说, 大约只有 15% 的基因得以表达^[1], 基因的选择性表达决定着细胞的生长和发育, 衰老和死亡^[2]。1980 年, Breitmann 等^[3~6]发现全反维甲酸能将 HL-60 细胞彻底诱导分化成为类似成熟粒细胞, 因此, 全反维甲酸不仅广泛用于临床治疗白血病 M₃ 型, 而且维甲酸类对 HL-60 细胞诱导分化

还成为研究造血干细胞增殖、分化以及肿瘤化机制的最佳体外模型。过去许多研究表明造血干细胞增殖、分化及肿瘤化过程涉及多种基因的表达变化, 但其内在机制仍不清楚, 我们采用 mRNA 差异展示技术可以更全面、详尽地了解这一细胞过程中多种基因所起作用, 从而为进一步探讨白血病的发病机制奠定基础。

[收稿日期] 2000-03-05; **[修回日期]** 2000-06-26

[作者简介] 龚放(1968-), 女, 博士, 主治医师。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 人早幼粒白血病细胞(HL-60) 将贮存于液氮中的 HL-60 细胞进行复苏及传代培养至细胞数达 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 时收集细胞用于总 RNA 提取。

1.1.2 工具酶及试剂 RNase-free DNase I 购于华美生物工程公司。Tag DNA 聚合酶购自 Life Tech 公司。总 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit) 购自 QIAGEN 公司。mRNA 差异展示分析技术所用试剂为 Gen HunterTM 公司产品。荧光染料 SYBR Green I 系 FMC Bioproducts 公司产品。其余均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 HL-60 细胞的复苏及培养 按常规方法将贮存于液氮中的 HL-60 细胞株复苏后,接种于含 10% 小牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养基中,并加入 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素,在含 5% CO₂ 湿润空气中于 37 °C 进行培养,待细胞数达 $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ 时收集细胞备用。

1.2.2 全反维甲酸对 HL-60 细胞的诱导分化及分组 取对数生长期细胞调细胞浓度 2×10^5 /ml 接种于含 10% 小牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养基中,同时加入 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素,并按随机方式分为两组,其中一组为对照组,即不加全反维甲酸组(ATRA);另一组为诱导组,即加入全反维甲酸组,加药浓度为 1×10^{-6} mol/L (1 μ M),两组在相同条件下(37 °C 含 5% CO₂ 的空气中)同时培养,待加药 5d 同时收集两组细胞,并分别计数。

1.2.3 HL-60 细胞总 RNA 的制备 取 HL-60 细胞 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ /ml 按购自 QIAGEN 公司 RNeasy Mini Kit 说明书上方法进行总 RNA 提取,同时以琼脂糖凝胶电泳检查所提取总 RNA 的质和量,并用 RNase-free DNase I 处理总 RNA 样本。

1.2.4 逆转录反应(RT) 取 2 ml 经 RNase-free DNase I 处理过的总 RNA 样本,以锚定引物(H-T11M, M 为 A, C 或 G)为逆转录的起始引物,在 100 U 鼠白血病病毒逆转录酶的作用下反应 1 h, 75 °C 灭活 5 min 终止反应, cDNA 贮存于 -20 °C 备用。

1.2.5 mRNA 差异展示技术(mRNA DDRT-PCR) 将 3 种锚定引物和 8 种随机引物互配成 24 种引物组合分别对两组细胞进行差异展示分析,具

体操作按试剂盒提供方法进行。

1.2.6 将 PCR 产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺胶电泳上分离后用荧光染料 SYBR Green I 染色,然后在紫外光下照像。

2 结果

2.1 ATRA 诱导分化 HL-60 细胞形态学上的改变

在未加 ATRA 的 HL-60 细胞中,绝大部分为早幼粒细胞,仅极少数为较成熟粒细胞(如中、晚幼粒、杆状核或分叶核细胞)。经 ATRA (1 μ M) 诱导分化 5d 的 HL-60 细胞在形态学上变化极大,表明出分化成熟的粒细胞形态学特征(见图 1)。

1 μ M ATRA 诱导 5 d, HL-60 细胞诱导分化率达 87% (见表 1)。

表 1 全反维甲酸对 HL-60 细胞形态分化的影响

Table 1 Differentiation of HL-60 cells induced by ATRA

组别	细胞形态分类 (%)				分化诱导率 (%)
	早幼粒	中幼粒	晚幼粒	杆状核及分叶核	
对照组	97	2	1	0	
诱导组	10	40	25	25	87

光镜观察:高倍镜下可见未经 ATRA 诱导的 HL-60 细胞,体积大,呈圆形或不规则圆形,胞核大而圆,胞浆极少而染色浅,97% 为早幼粒,2% 有自身分化似中幼粒,1% 似晚幼粒;经 ATRA 诱导的 HL-60 细胞,胞体稍增大,核浆比例下降,核形状不规则,出现杆状核或分叶核。

电镜观察:对照组细胞大而圆,胞质内核糖蛋白体丰富,粗面内质网及线粒体可见,胞核大而圆,常可见 1-2 个大核仁,核内以常染色体为主;诱导组细胞最明显的变化是细胞核,呈不规则形,杆状或分叶核,小叶间有细蒂相连,核内异染色质数量明显增多,胞质中除一般细胞器外还可见发育良好的高尔基体及微丝结构。

2.2 两组细胞系总 RNA 纯度及完整性检测

2.2.1 纯度检测 用紫外线/可见光分光光度仪检测 OD_{260 nm}, OD_{280 nm} 值,测得两组细胞系总 RNA OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 比值位于 1.9~2.1 范围内,说明总 RNA 纯度较高。

2.2.2 完整性检测 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性,5 s, 18 s, 28 s 片段清晰可见(见图 2),说明总 RNA 未降解。

2.3 对照组和诱导组细胞系差异展示分析

将三种锚定引物及八种随机引物互相配成二十四种引物组合对两组细胞系进行 DDRT-PCR (见图 3)。

24 种引物对扩增片段总数 541 条,每条泳道最

多显带数 30 条,最少 15 条,平均条带数为 23 条,其中锚定引物 H-T₁₁C 扩增效果最佳,而 H-T₁₁G 扩增效果相对较弱。经比较发现差异明显片段共 36 条,其中对照组表达而诱导组未表达的片段为 12 条,对照组未表达而诱导组表达为 24 条。

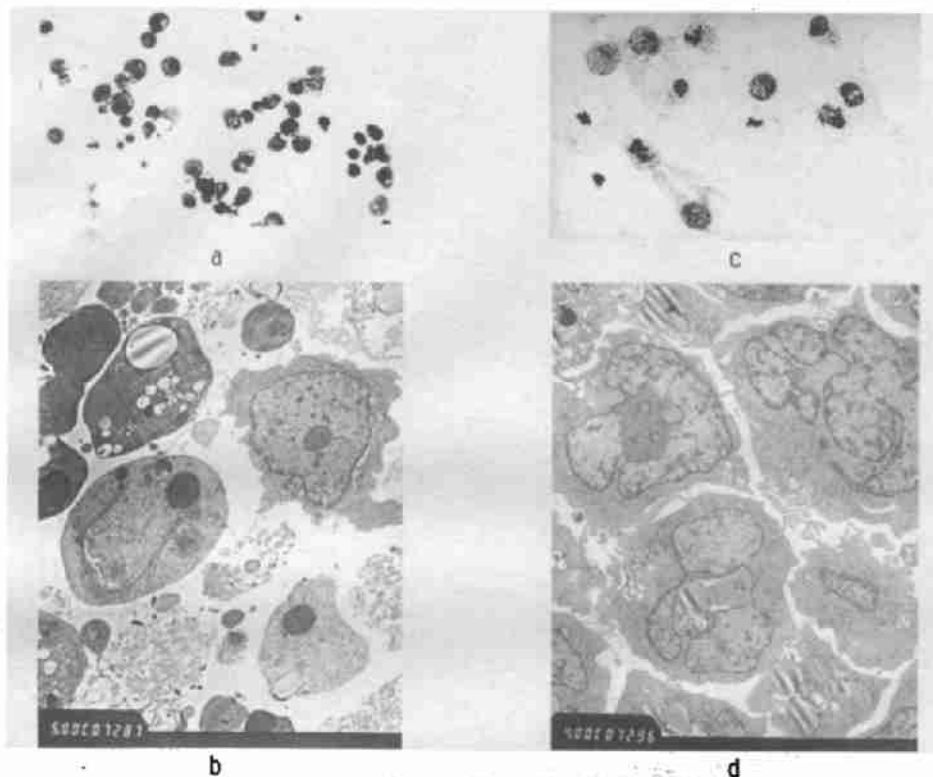


图 1 未经 ARTA 诱导及 ATRA 诱导后 HL-60 细胞形态学

a, b 为未经 ATRA 诱导的 HL-60 细胞的光镜和电镜特征; c, d 为 ATRA 诱导后 HL-60 细胞的光镜和电镜特征

Figure 1 Morphology of non-induced and retinoic acid-induced HL-60 cells

a, b: non-induced HL-60 cells. c, d: retinoic acid-induced HL-60 cells

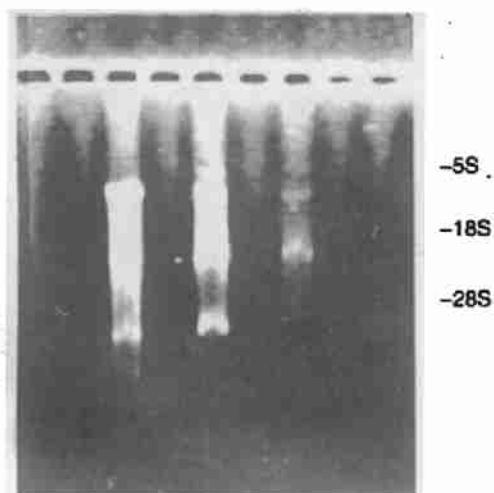


图 2 RNA 完整性检测

Figure 2 Integrity of total RNA

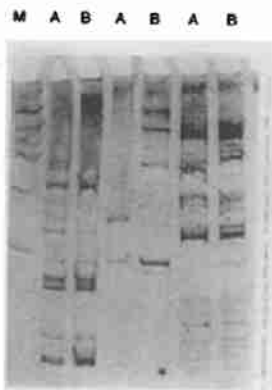


图 3 锚定引物均为 H-T₁₁C, 随机引物为 H-AP₁₋₃

M: PCR Marker A: 对照组细胞 B: 诱导组细胞

Figure 3 A Differential display was carried out using a one-base anchored oligo-dT primer (H-T₁₁C) and a 5' arbitrary primer (H-AP₁₋₃) respectively

3 讨论

Liang 等^[7]创立的 mRNA 差异展示技术的基本原理就是通过 DNA 测序胶分辨 mRNA 3' 末端片段。该研究方法可以对两个或更多相关细胞中几乎所有已表达的 mRNA 进行直接的并列比较。最初该技术采用的是放射性自显影, 费时, 费力, 且有放射性污染, 而本研究则采用一种荧光染色, 具有快速、简便、无污染的特点。1980 年, Breitmann 等^[3]研究发现全反维甲酸(ATRA)能将 HL-60 细胞彻底诱导分化为成熟粒细胞。自此以后, 维甲酸类不仅被广泛用于临床治疗急性白血病 M₃ 型, 而且维甲酸类对 HL-60 细胞诱导分化还成为研究造血干细胞增殖、分化以及肿瘤化机制的最佳体外模型之一。虽然许多研究已发现造血细胞增殖、分化及肿瘤化过程中涉及许多基因的表达变化, 如已知癌基因 c-myc, ras, c-fos 以及抑癌基因 P₅₃ 等^[8~12], 但其内在机制仍不清楚, 而对这些基因表达的同时研究可以更全面、更详尽地了解它们在这一特定细胞过程中所起作用, 同时还有可能发现未知肿瘤相关基因, 这一特点是 mRNA 差异展示技术所具备的最明显优势。本研究中, 我们把全反维甲酸(1 μ M)作为诱导分化剂, 将 HL-60 细胞按随机方式分组, 一组不加药(对照组), 另一组加药(诱导组), 我们将其两组细胞作为 mRNA 差异展示的研究对象。研究中, 我们把 3 种锚定引物(H-T₁₁G, H-T₁₁A, H-T₁₁C)和 8 种随机引物(H-AP₁₋₈)互配成 24 个引物对, 对两组细胞进行差异展示, 共扩增出 541 条片段, 每泳道显带数最多 30 条, 最少仅 15 条, 平均约为 23 条(如图 3), 经比较, 差异明显及比较明显的片段总数为 36 条。其中对照组表达而诱导组未表达的为 12 条; 对照组未表达而诱导组表达的为 24 条。研究结果表明, 在 ATRA 将 HL-60 细胞诱导分化成为成熟粒细胞过程中, 涉及许多基因的表达变化。因此, 在以后的研究中我们可以扩大引物对数量以便发现更多差异片段, 一旦发现差异明显片段就将其所在位置的凝胶用刀片切下后将 cDNA 回收后采用相同引物对进行扩增后可被用于 Northern

印迹杂交或克隆后测序等一系列研究。总之, 利用 mRNA 差异展示技术可筛选出差异常表达基因, 为深入研究白血病发病机制提供了方法学依据。

【参考文献】

- [1] Liang P, Pardee AB. Methods of differential display [J]. *Methods Mol Genetics*, 1994, 5(1): 3-16.
- [2] Hsu DKW, Alberts DPJ and Winkles JA. Fibroblast growth factor-1 induces phosphofructokinase, fatty acid synthesis and Ca⁺⁺ ATPase mRNA expression in NH 373 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(12): 1483-1491.
- [3] Breitmann TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoid acid [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(5): 2936-2940.
- [4] De Gentile A, Toubert ME, Dubois, et al. Induction of high-affinity GM-CSF receptors during all-trans retinoic treatment of acute promyelocytic leukemia [J]. *Leukemia*, 1994, 8(15): 1758-1768.
- [5] Wanrell RP. Retinoid resistant in acute promyelocytic leukemia: New mechanisms. Strategies and implications [J]. *Blood*, 1993, 82(20): 1949-1957.
- [6] Dawson MI, Elstner E, Kizak M, et al. Myeloid differentiation mediated through retinoid acid reception/retinoic X receptor not RXR/RXR Pathway [J]. *Blood*, 1994, 84(21): 446-452.
- [7] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(3): 967-971.
- [8] Janssen J, Steenvoorden A, Collard J, et al. Oncogene activation in human myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 1985, 45(20): 3262-3270.
- [9] Filus J, Buick R. Relationship of c-myc expression to differentiation and proliferation of HL-60 cells [J]. *Cancer Res*, 1985, 45(2): 822-831.
- [10] Chomienne C, Barbey S, Balitrand N, et al. Regulation of Bcl-2 and cell death by all-trans retinoid acid in acute promyelocytic leukemia cells [J]. *Proc Am Ass Cancer Res*, 1992, 33(1): 41-42.
- [11] Needleman S, Kraus M, Srivastavas, et al. High frequency of N-ras activation in acute myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 1986, 67(3): 753-760.
- [12] Wolf D, Rotler V. Major deletions in the gene encoding the P53 tumor antigen cause lack of P53 expression in HL-60 cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(3): 790-798.

(本文编辑: 黄榕)