

· 实验研究 ·

糖皮质激素对急性淋巴细胞白血病 Puma 表达的影响

徐波¹, 王保捷¹, 李爱敏², Richard LOCK³

(1. 中国医科大学法医学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 烟台毓璜顶医院儿科, 山东 烟台 264000;

3. 澳大利亚儿童肿瘤研究所, 澳大利亚新南威尔士州 悉尼 2031)

[摘要] 目的 糖皮质激素可通过调节某些基因的表达而诱导细胞凋亡,但在治疗白血病过程中对促凋亡蛋白 Puma 表达的影响尚不清楚,该实验探讨糖皮质激素在诱导体外培养的急性淋巴细胞白血病细胞凋亡过程中对 Puma 表达的影响。**方法** 利用人急性淋巴细胞白血病细胞移植到免疫缺陷小鼠体内建立的细胞系,地塞米松处理后 MTT 比色法进行药物敏感性实验、Western 印迹及实时荧光定量 PCR 检测 Puma 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** 来源于临床疗效好的病例样本,其体外培养的白血病细胞对地塞米松敏感,来源于临床疗效差的病例样本,其体外培养的白血病细胞对地塞米松耐药,耐药组与敏感组白血病细胞间对地塞米松的体外敏感性有显著差异($P < 0.05$)。地塞米松处理后耐药组及敏感组均未见 Puma 蛋白及 mRNA 的表达上调。**结论** 糖皮质激素在诱导体外培养的白血病细胞凋亡过程中,不能引起 Puma 表达的上调。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):151-154]

[关键词] 糖皮质激素;地塞米松;急性淋巴细胞白血病;Puma

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0151-04

Effect of glucocorticoid on the expression of Puma in acute lymphoblastic leukemia

XU Bo, WANG Bao-Jie, LI Ai-Min, Richard LOCK. Faculty of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China (Wang B-J, Email: bjwang@mail.cmu.edu.cn)

Abstract: Objective Glucocorticoid can induce apoptosis by regulating some genes' expression, but its effect on the pro-apoptotic protein Puma in leukemia remains unclear. This study was designed to investigate the effect of glucocorticoid on the expression of Puma in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells *in vitro*. **Methods** Leukemia cells from acute lymphoblastic leukemia patients were transplanted into the immunodeficient mice. The transplanted leukemia cells were collected and then were treated with dexamethasone at the final concentration of 1 μ M. The expression of Puma protein and mRNA in leukemia cells after dexamethasone treatment was detected by Western Blot and real-time quantitative PCR. A drug sensitive test was performed by MTT assay. **Results** The leukemia cells which came from the patients who had good clinical outcomes were sensitive to dexamethasone, while the ones from the patients who had poor clinical outcomes were resistant to dexamethasone *in vitro*. The sensitivity to dexamethasone *in vitro* between the resistant and sensitive leukemia cells was significantly different ($P < 0.05$). No upregulation of Puma protein and mRNA was detected in resistant and sensitive leukemia cells after dexamethasone treatment. **Conclusion** Glucocorticoid can not upregulate the expression of Puma in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells *in vitro*. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):151-154]

Key words: Glucocorticoid; Dexamethasone; Acute lymphoblastic leukemia; Puma

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是儿童肿瘤中的常见病,糖皮质激素是其重要的化疗药,尽管白血病治愈率在不断提高,药物耐药仍是临床复发的主要原因^[1]。至今,糖皮质激素诱导细胞凋亡及其耐药的机制仍不完全清楚,其中 Bcl-2 家族成员在其中起重要作用。对糖皮质激素敏感的白血病细胞系中,外源性的 Bcl-2 具有

抗凋亡功能^[2]。有报道^[3]在地塞米松作用的原代小鼠胸腺细胞中,能诱导 Bcl-2 家族中具有促凋亡功能成员 Puma(又名 bcl-2 3)的表达。Erlacher 等^[4]对 Puma 基因敲除小鼠进行体内分析发现,淋巴细胞对糖皮质激素的敏感性与体外培养的细胞相符,Puma 基因缺失显著抑制糖皮质激素诱导的胸腺细胞凋亡,而淋巴细胞的凋亡程度则因细胞类型而异,

[收稿日期]2005-11-02;[修回日期]2005-12-30

[基金项目]教育部国家留学基金资助(编号:留金出[2003]3041号)。

[作者简介]徐波,女,在读博士,法医师。主攻方向:法医血清学及白血病。

[通讯作者]王保捷,教授,中国医科大学法医学院法医血清教研室,邮编:110001。

证明 Puma 是糖皮质激素诱导凋亡的原因,是诱导体内淋巴细胞凋亡的主要启动因子。糖皮质激素通过调节某些基因的表达而诱导细胞凋亡,而在白血病细胞中是否通过调节具有促凋亡作用的 Puma 基因的表达来诱导凋亡,目前尚无相关报道。本实验将人急性淋巴细胞白血病细胞移植小鼠体内,建立与临床样本密切相关的细胞系,地塞米松处理后检测 Puma 蛋白及其 mRNA 的表达,从而探讨糖皮质激素在诱导急性淋巴细胞白血病细胞凋亡过程中对 Puma 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验模型建立

澳大利亚儿童肿瘤研究所收集的 4 例儿童急性淋巴细胞白血病临床样本,其中 2 例确诊时取样的病例对化疗药物敏感,临床疗效较好,现处于完全缓解期,将其归为敏感组;2 例复发时取样病例已对药物产生耐药,临床疗效差,现在已临床死亡,将其归为耐药组(表 1)。实验参照 Lock 方法^[5],将人 ALL 细胞经尾静脉注入免疫缺陷的 NOD/SCID 小鼠体内,每隔 7 d 采集尾静脉血 50 μ L 经抗人 CD45 抗体染色,当人 CD45 在周边血中达到 1% 时证明白血病细胞已经在移植鼠体内扩散。收集小鼠脾细胞内的人白血病细胞,其纯度可达 90% 以上,液氮中冻存。

1.2 四甲基偶氮唑蓝法(MTT 法)

白血病移植细胞从液氮中取出后复苏,重悬在预热的含 20 ng/mL Flt 3 L 的 QBSF-60 培养液中。每种细胞分别取 100 μ L 分 3 孔种于 96 孔板上,细胞在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中过夜。次日加入 20 μ L 地塞米松使其终浓度分别为 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M 及 10 μ M, 72 h 后加 12 μ L 5 mg/mL MTT 作用 4 h,加入 100 μ L 含 10% SDS 的盐酸溶解液,酶标仪 570 nm 处读取光密度。各加药组光密度均值除以未加药对照组光密度均值,为各组细胞存活率。实验重复 3 次,应用 GraphPad Prism 软件计算细胞活力受抑制 50% 时药物的浓度 IC₅₀ 值。

1.3 Western 印迹

白血病移植细胞分别取 1×10^7 个,终浓度为 1 μ M 的地塞米松处理 20 h 后收集,置于含 1% 蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中,4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min,离心 10 min 收集上清。蛋白浓度用 BCA 评定试剂盒检测。15 μ g 蛋白样品经 4% ~ 12% SDS-NuPAGE 预制胶电泳 150 V 100 min。转印槽中 100 V 4 $^{\circ}$ C 3 h 转至 PVDF 膜。以含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 封闭至

少 1 h,TTBS 洗膜,加入兔抗 Puma 多克隆抗体,内参照用兔抗 Actin 多克隆抗体(均为 Sigma 公司),室温孵育 3 h,TTBS 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体(Amersham Biosciences 公司),室温孵育 1 h,TTBS 洗膜,ECL 增强化学发光法用 SuperSignal 试剂盒(Pierce 公司),对胶片放射自显影检测,信号经 VersaDoc 5000 Imaging System 图像分析系统(Bio-Rad 公司)成像,应用 Quantity One 软件定量分析 Puma 与 Actin 的灰度并计算其比值。

1.4 实时荧光定量 RT-PCR

白血病移植细胞分别取 2×10^6 个,终浓度为 1 μ M 的地塞米松处理 0, 1, 2, 4, 8, 16 h 后收集,总 RNA 提取用 RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)。RNA 浓度测定经 NanoDrop 超微量分光光度计检测(DuPont 公司)。取 100 ng RNA,随机引物法逆转录合成 cDNA 后,用 ABI Prism 7700 SDS 荧光 PCR 扩增仪(Applied Biosystems 公司)进行实时 PCR 扩增。Puma 引物及探针使用 Taqman 基因表达试剂盒(Applied Biosystems 公司),其内包括序列特异性引物及 6-FAM 标记的 Taqman 探针。内对照基因 EF1 α 的引物(Sigma Genosys 公司)序列分别为:上游 5'-CTG AAC CAT CCA GGC CAA AT-3',下游 3'-ATT GGA TTG CCA CAC GGC T-5'。EF1 α 探针(Applied Biosystems 公司)序列为:5' VIC- AGC GCC GGC TAT GCC CCT G -TAMRA 3'。

实时 PCR 多重扩增的反应条件为:20 μ L 反应体系,2 μ L cDNA 模板,10 μ L 2 $\times$ Taqman 通用 PCR 反应预混液,1 μ L Puma 引物及探针混合液,0.5 μ L 10 μ M EF1 α 引物,0.4 μ L 10 μ M EF1 α 探针。95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性后 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。荧光信号通过循环周期 Ct 值做出曲线,结果采用比较 Ct 值方法定量分析,Puma 基因表达的倍数变化用内参照基因 EF1 α 校正。 Δ Ct = Ct_{Puma} - Ct_{EF1 α} , Puma 及 EF1 α 均用 3 次加样的均值, $\Delta\Delta$ Ct = 各时间段加药组平均 Δ Ct 值 - 对照组平均 Δ Ct 值。倍数变化 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.5 统计学分析

数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差别用方差分析。

2 结果

2.1 地塞米松对白血病移植细胞的体外敏感性实验

MTT 示 100 nM, 1 μ M 及 10 μ M 地塞米松处理 72 h 后,ALL2 及 ALL19 细胞存活率均在 70% 以上,

IC50 值均大于 10 μ M, 而 ALL3 及 ALL16 细胞存活率则低于 20%, IC50 值均小于 10nM, 分别为 3.01 nM 和 1.25 nM。前两者与后两者 IC50 浓度相差 1 000 倍。经方差分析, 1nM 以上地塞米松处理的 4 组细胞存活率差异有显著性 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, ALL3 与 ALL2 及 ALL19 间差异有显著性 ($P < 0.05$), ALL16 与 ALL2 及 ALL19 间差异有显著性 ($P < 0.05$), 耐药组内 ALL2 与 ALL19 差异无显著性 ($P > 0.05$), 敏感组内 ALL3 与 ALL16 差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。结合临床治疗效果, 耐药组的细胞存活率明显高于药物敏感组, 白血病细胞对地塞米松的体外敏感性与临床治疗效果相符。

2.2 地塞米松对 Puma 蛋白表达的影响

Western 印迹检测 Puma 蛋白在地塞米松加药与未加药对照组均见表达, 地塞米松处理细胞 20 h

后, 与未加药时比, 地塞米松敏感组与耐药组均未见明显 Puma 表达增强 (图 1)。

2.3 地塞米松对 Puma mRNA 表达的影响

实时荧光定量 RT-PCR 检测地塞米松作用 1, 2, 4, 8, 16 h 后, 敏感组与耐药组 Puma mRNA 均未见显著表达上调 ($P > 0.05$) (表 3)。

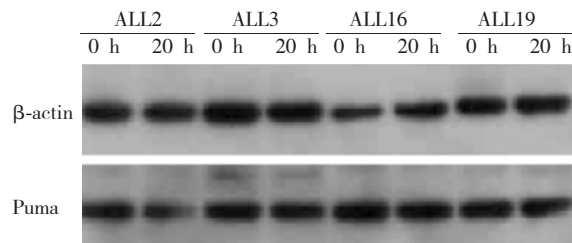


图 1 地塞米松对 Puma 蛋白的表达影响。Western blot 检测 1 μ M 地塞米松作用 20 h 后 Puma 蛋白的表达。

表 1 急性淋巴细胞白血病样本的临床资料

人白血病 移植细胞	诊断时年龄 (月)及性别	白血病 分型	取样时 疾病状态	第 1 次完全缓解 时间(月)	第 1 次复发后 存活时间(月)	现在临床 状态
ALL 3	154/女	前 B 型	确诊	38	98	第 2 次完全缓解
ALL 16	122/女	T 细胞型	确诊	108	未复发	第 1 次完全缓解
ALL 2	65/女	普通型	第 3 次复发	30	46	死亡
ALL 19	194/男	普通型	第 1 次复发	4	7	死亡

表 2 MTT 检测不同浓度地塞米松处理后细胞存活率

(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞编号	地塞米松浓度					
	0.1nM	1nM	10nM	100nM	1 μ M	10 μ M
ALL 3	94.82 $\pm$ 13.12	73.10 $\pm$ 1.80 ^c	24.90 $\pm$ 0.91 ^c	6.47 $\pm$ 0.88 ^c	4.99 $\pm$ 0.16 ^c	5.94 $\pm$ 0.78 ^c
ALL 16	85.73 $\pm$ 20.44	54.49 $\pm$ 3.36 ^c	10.16 $\pm$ 1.54 ^c	8.43 $\pm$ 0.64 ^c	7.31 $\pm$ 1.39 ^c	7.47 $\pm$ 0.33 ^c
ALL 2	100.18 $\pm$ 0.11	104.69 $\pm$ 2.46 ^{a,b}	79.61 $\pm$ 0.50 ^{a,b}	69.25 $\pm$ 2.69 ^{a,b}	70.00 $\pm$ 2.04 ^{a,b}	70.28 $\pm$ 6.19 ^{a,b}
ALL 19	106.45 $\pm$ 6.44	107.51 $\pm$ 6.90 ^{a,b}	102.67 $\pm$ 11.79 ^{a,b}	76.82 $\pm$ 11.56 ^{a,b}	76.72 $\pm$ 11.59 ^{a,b}	79.23 $\pm$ 13.72 ^{a,b}

a 与 ALL3 比较, $P < 0.05$; b 与 ALL 16 比较, $P < 0.05$; c 与 ALL 2 比较, $P < 0.05$

表 3 地塞米松对 Puma mRNA 表达的影响

细胞编号	地塞米松作用时间					
	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
ALL2	1	1.19 $\pm$ 0.21	1.45 $\pm$ 0.49	1.74 $\pm$ 0.33	1.30 $\pm$ 0.45	1.56 $\pm$ 0.35
ALL3	1	0.96 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.52	0.67 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.08
ALL16	1	0.88 $\pm$ 0.44	0.80 $\pm$ 0.30	0.63 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.13	0.57 $\pm$ 0.08
ALL19	1	0.86 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.52	0.95 $\pm$ 1.17	1.01 $\pm$ 0.14	1.21 $\pm$ 0.31

3 讨论

糖皮质激素是目前广泛使用的抗肿瘤药, 尤其对白血病的治疗较为有效, 对其诱导细胞凋亡的机制, 尚不完全清楚。目前认为, 糖皮质激素进入细胞

后, 与胞浆内特定受体结合成复合物, 使受体与热休克蛋白 HSP90 分离而被激活, 激活的受体再转位到细胞核, 结合到基因组的糖皮质激素反应元件 (glucocorticoid response elements, GREs) 或转录因子上, 从而转录激活或抑制靶基因, 最终导致细胞周期停滞及细胞凋亡^[6]。有报道^[2] Bcl-2 家族成员参与其

细胞凋亡过程。糖皮质激素在不能诱导细胞凋亡时产生耐药,糖皮质激素受体不足或基因突变、糖皮质激素调节的相关基因表达异常等均可导致耐药发生^[7]。

Puma 基因是 Bcl-2 家族仅含 BH3 区(BH3 only)亚家族成员,具有促凋亡作用^[8],Karst 等^[9]发现在人皮肤黑色素瘤中 Puma 表达明显减少,且在转移后的肿瘤较原发肿瘤的程度更明显,证明 Puma 在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的促凋亡作用。Puma 可被 p53 激活而诱导细胞凋亡,DNA 损伤等刺激使肿瘤抑制基因 p53 被激活,p53 进一步作用于靶基因 Puma、Noxa 等,导致细胞周期停滞或凋亡。Villunger 等^[10]发现 Puma 基因敲除的小鼠胸腺细胞对 DNA 损伤性刺激耐受,证实 Puma 是由 p53 及其他药物致 DNA 损伤诱导凋亡反应的重要调节因子,Gu 等^[11]发现 p53 腺病毒介导的肺癌细胞凋亡过程中,Puma 表达显著上调。除了经依赖 p53 的途径诱导细胞凋亡,各种不依赖 p53 的死亡信号刺激,包括细胞因子去除,药物如地塞米松等,均可导致 Puma 激活诱导细胞凋亡^[7]。最近对 Puma 基因敲除的小鼠研究发现,Puma 是糖皮质激素诱导凋亡的原因,是诱导体内淋巴细胞凋亡的主要启动因子^[4]。对于 Puma 基因诱导凋亡的机制,目前认为是因 Puma 能结合 Bcl-2,从而抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用,使线粒体释放细胞色素 C,通过激活 caspase 前体,启动细胞凋亡程序^[12]。

本研究根据白血病的临床治疗效果选用了敏感组、耐药组样本各 2 例,并将白血病细胞移植到小鼠体内增殖,模拟人体内的微环境,建立与临床样本密切相关的白血病模型。MTT 比色法证实,来源于临床疗效好的敏感组病例样本,其体外培养的白血病细胞对地塞米松敏感,细胞存活率较低;而来源于临床疗效差的耐药组病例样本,其体外培养的白血病细胞对地塞米松耐药,细胞存活率较高,白血病细胞对地塞米松的体外敏感性与临床病例的治疗转归情况一致,说明可以通过由此动物模型建立的细胞系进行白血病体外实验研究。本研究所选样本中,耐药组均为相同临床分型,而敏感组则为对地塞米松敏感的 T 细胞型或前 B 型,提示白血病分型可能与临床耐药性相关。

糖皮质激素通过转录激活或抑制某些基因的表达来调节细胞凋亡,本研究通过地塞米松处理后对 Puma 蛋白的表达进行动态检测及定量分析,并结合具有特异性强、灵敏度高、重复性好、准确迅速的实

时荧光定量 PCR 技术对 mRNA 水平进行定量分析,证实无论是耐药组还是敏感组,均没有 Puma 蛋白及基因表达的明显增加,说明在糖皮质激素诱导的细胞凋亡过程中,Puma 基因没有受其转录激活而发挥促凋亡作用。糖皮质激素在诱导体外白血病细胞凋亡过程中,可能通过调节其他基因的表达发挥作用,Puma 基因表达不受其影响。

[参 考 文 献]

- [1] Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Cancer Treat Rev*, 2003,29(1):31-44.
- [2] Hartmann BL, Geley S, Löffler M, Hattmannstorfer R, Strasser-Wozak EM, Auer B, et al. Bcl-2 interferes with the execution phase, but not upstream events, in glucocorticoid-induced leukemia apoptosis [J]. *Oncogene*, 1999,18(3):713-719.
- [3] Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, et al. Expression of bcl-2, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,98(20):11318-11323.
- [4] Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo [J]. *Blood*, 2005,106(13):4131-4138.
- [5] Lock RB, Liem N, Farnsworth ML, Milross CG, Xue C, Tajbakhsh M, et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse [J]. *Blood*, 2002,99(11):4100-4108.
- [6] Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003,111(1):3-22.
- [7] Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance [J]. *Cell Death Differ*, 2004,11(Suppl 1):S45-S55.
- [8] Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins-evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death [J]. *J Cell Sci*, 2002,115(Pt 8):1567-1574.
- [9] Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas [J]. *Oncogene*, 2005,24(6):1111-1116.
- [10] Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa [J]. *Science*, 2003,302(5647):1036-1038.
- [11] Gu J, Zhang L, Swisher SG, Liu J, Roth JA, Fang B. Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis [J]. *Oncogene*, 2004,23(6):1300-1307.
- [12] Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53 [J]. *Mol Cell*, 2001,7(3):683-694.

(本文编辑:吉耕中)