

论著·实验研究

Foxp3 在神经母细胞瘤 LA-N-6 细胞的表达 及化疗药物对其影响

孙婧¹ 李良² 肖燕³ 余素明¹ 唐锁勤⁴

(解放军总医院第一附属医院 1. 儿科; 2. 干一科; 3. 呼吸科; 4. 解放军总医院儿科, 北京 100048)

[摘要] 目的 研究神经母细胞瘤细胞是否表达免疫逃逸相关分子 Foxp3 及其对化疗药物的敏感性。方法 体外培养神经母细胞瘤细胞株 LA-N-6; MTT 试验明确化疗药物环磷酰胺 (CTX)、盐酸吡柔比星 (THP) 对 LA-N-6 的效应剂量, 流式细胞术 (FACS) 及实时定量 PCR (RT-PCR) 测定 Foxp3 在 LA-N-6 中的表达和 CTX、THP 对 LA-N-6 中 Foxp3 表达的影响。结果 FACS 结果显示 LA-N-6 细胞高表达 Foxp3, 加入 CTX、THP 后显著降低了 LA-N-6 上 Foxp3 的表达 ($P < 0.05$); RT-PCR 显示 CTX 显著降低了 LA-N-6 细胞中 Foxp3 的表达 ($P < 0.05$), THP 加药组与对照组比较差异无统计学意义。结论 肿瘤逃逸相关转录因子 Foxp3 高表达于神经母细胞瘤细胞 LA-N-6; CTX、THP 能分别在蛋白或基因水平降低 Foxp3 分子在 LA-N-6 的表达, 提示 CTX、THP 可能通过抑制 Foxp3 分子的表达而抗肿瘤的作用。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(5): 386-389]

[关键词] Foxp3; 神经母细胞瘤; 环磷酰胺; 盐酸吡柔比星; LA-N-6 细胞株

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)05-0386-04

Neuroblastoma LA-N-6 cells express Foxp3 which can be suppressed by chemotherapeutic agents

SUN Jing, LI Liang, XIAO Yan, YU Su-Ming, TANG Suo-Qin. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100037, China (Tang S-Q, Email: suoqin@yahoo.com)

Abstract: Objective To investigate whether neuroblastoma cells LA-N-6 express Foxp3 and whether the expression of Foxp3 is sensitive to chemotherapy by cyclophosphamide (CTX) and pirarubicin (THP). **Methods** Expression of Foxp3 on LA-N-6 cells was examined by flow cytometry analysis. The dose-effects of chemotherapy drugs including CTX and THP on LA-N-6 cells were investigated by MTT assay. The effects of CTX and THP on Foxp3 expression were examined by flow cytometry and real-time PCR assays. **Results** Flow cytometry analysis showed that LA-N-6 cells expressed Foxp3 at a high level. At sub-optimal concentration, chemotherapy drugs CTX and THP significantly down-regulated expression of Foxp3 on LA-N-6 cells at protein level ($P < 0.05$). CTX also decreased the expression of Foxp3 at mRNA level ($P < 0.05$). **Conclusions** Neuroblastoma cells LA-N-6 express Foxp3 at a high level, which can be suppressed by chemotherapy drugs CTX and THP. These data suggest that chemotherapy might suppress the growth and metastasis of tumor cells partially through inhibiting the expression of Foxp3. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(5): 386-389]

Key words: Foxp3; Neuroblastoma; Cyclophosphamide; Pirarubicin; LA-N-6 cell

肿瘤免疫逃避相关转录因子 Foxp3 是参与 T 淋巴细胞负性调节的转录因子^[1-2]。有研究报道 Foxp3 也表达在肿瘤细胞内, 通过抑制自身免疫反应效应细胞参与肿瘤的免疫逃逸过程^[3-5]。神经母细胞瘤恶性程度高, 易复发, 对于其发生发展机制是否也涉及免疫逃逸过程尚不清楚。本研究以神经母细胞瘤细胞株 LA-N-6 为研究对象, 分别用流式细胞术 (FACS)、实时定量 PCR (RT-PCR) 等方法检测

Foxp3 在 LA-N-6 细胞中的表达, 研究化疗药物环磷酰胺 (CTX)、盐酸吡柔比星 (THP) 对 Foxp3 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 LA-N-6 细胞培养

LA-N-6 细胞为神经母细胞瘤细胞株, 由美国洛

[收稿日期] 2009-08-03; [修回日期] 2010-11-26

[作者简介] 孙婧, 女, 硕士, 主治医师。

[通讯作者] 唐锁勤, 教授。

杉矶儿童医院 Stuart E. Siegel 教授惠赠。采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 37°C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养、传代。实验用对数生长期细胞, 台盼蓝拒染率在 95% 以上。

1.2 主要试剂和仪器

注射用 CTX(山西普德药业公司), 生理盐水稀释成 0.1 M 分装待用; 注射用 THP(深圳万乐药业有限公司), 生理盐水稀释成 2 mg/mL 分装待用。4°C 冰箱保存。TRIZOL 试剂(Invitrogen 公司, 美国); RPMI 1640 培养基(GiBCO 公司); 胎牛血清(北京元亨金马生物技术有限公司); PCR 试剂、RNA 反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(TOYOBO 公司, 日本); Foxp3 抗体及 Foxp3 细胞内染色试剂盒购自 eBioscience 公司(Clone: FJK-16s)。酶联检测仪(Bio-Rad); 流式细胞仪(BD 公司); RT-PCR 分析仪(BioRad 公司)。

1.3 MTT 比色法检测化疗药物对 LA-N-6 细胞增殖的影响

接种 1×10^4 个细胞于 96 孔板中, 100 μ L/孔。参考文献所用的浓度, CTX 浓度自 0.03 mol/L 起倍比稀释, THP 浓度自 0.67 μ g/mL 起 10 倍稀释, 共设 5 个梯度, 每组设 3 个复孔, 与细胞共培养 1 d 后进行 MTT 检测。每孔加入 10 μ L MTT(5 mg/L) 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 100 μ L (0.01M HCL + 10% 十二烷基磺酸钠), 培养过夜, 以全自动酶标仪在 570 nm 波长下检测各孔吸光度值(OD)。以药物浓度为横轴, 以吸光度值为纵轴绘制量-效曲线。

1.4 FACS 检测 Foxp3 在 LA-N-6 细胞的表达

收集 LA-N-6 细胞, 细胞穿孔液由 eBiosciences 公司提供, 每管加细胞穿孔液 500 μ L, 4°C 孵育过夜, 每管加入 1 mL PBS, 洗涤一次后, 每管再加入 1 mL 穿孔洗液, 洗涤一次, 弃上清, 震荡重悬细胞后, 加入 1 μ L 的 Foxp3 抗体, 避光冰浴 30 min, 每管加入 1 mL 穿孔洗液, 洗涤一次, 弃上清, 震荡重悬细胞沉淀, 加入 300 ~ 400 μ L 多聚甲醛溶液中固定。然后用流式细胞仪进行检测。

1.5 RT-PCR 检测 Foxp3 在 LA-N-6 中的表达

按 RNA 试剂盒提供的方法提取 LA-N-6 细胞的 RNA, 确定 cDNA 反转录成功后, 取 1 μ L cDNA 作为模板, 用 RT-PCR 试剂盒扩增目的基因片断。用相应的 RT-PCR 结果分析软件分析结果。人 Foxp3 引物序列: 正向 5'-GTTCACACGCATGTTTGCCTTC-3', 反向 5'-GCACAAAGCACTTGTGCAGACTC-3'。人 GAPDH 引物序列: 正义 AATGGAAATCCCATCAC-

CATCT; 反义 CGCCCCACTTGATTTTGG。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法来计算基因表达的相对变化。将未经处理的样品作为参照因子, 经内标基因均一化处理后, 以经过处理的样本相对于未经处理的样本的倍数来表示。

1.6 统计学分析

计量资料数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行卡方检验、t 检验及方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Foxp3 在 LA-N-6 细胞上的表达

流式细胞术检测 Foxp3 在神经母细胞瘤 LA-N-6 中的表达, 多次重复的实验结果显示, Foxp3 在 LA-N-6 上的表达结果为阳性。见图 1。

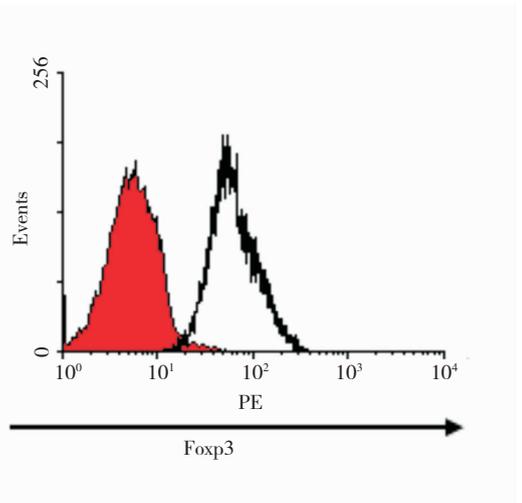


图 1 流式细胞术检测 Foxp3 在 LA-N-6 中的表达

2.2 CTX、THP 对 LA-N-6 增殖的影响

MTT 检测显示, LA-N-6 细胞对 CTX 的敏感区间是: 20 mmol/L ~ 4 mmol/L, 决定采用 6 mmol/L CTX 作为下一步实验的浓度。LA-N-6 细胞对 THP 的敏感区间是: > 6.7 ng/mL, 决定采用 80 ng/mL THP 作为下一步实验的浓度。

2.3 FACS 检测 CTX、THP 对 LA-N-6 中 Foxp3 表达的影响

FACS 检测结果显示, 在 LA-N-6 细胞中加入 6 mmol/L CTX 后, Foxp3 表达的平均荧光强度为 51 ± 3.5 ; 加入 80 ng/mL THP 后, Foxp3 的平均荧光强度为 45 ± 6.1 ; 同时加入 CTX 和 THP 后 Foxp3 的平均荧光强度 48 ± 4.0 ; 各组与未加液的对照组 (78 ± 9.8) 相比, 平均荧光强度显著降低, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。见图 2。

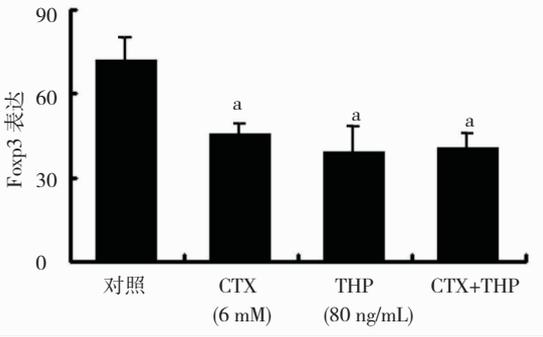


图2 化疗药物对在神经母细胞瘤细胞上的 Foxp3 表达水平的影响 a: 与对照组比较, $P < 0.05$

2.4 RT-PCR 检测 CTX、THP 对 LA-N-6 中 Foxp3 基因表达的影响

CTX 处理后 Foxp3 在 LA-N-6 细胞中的表达显著降低 (1.01 ± 0.15), 与对照组 (1.68 ± 0.12) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 THP 处理后 Foxp3 在 LA-N-6 细胞中的表达 (1.7 ± 0.25) 与对照组比较差异无统计学意义。CTX 与 THP 合用后 Foxp3 的表达 (0.98 ± 0.12) 也显著降低, 但由于 THP 单独不能降低 Foxp3 mRNA 的表达, 故该效应主要由 CTX 引起。见图 3。

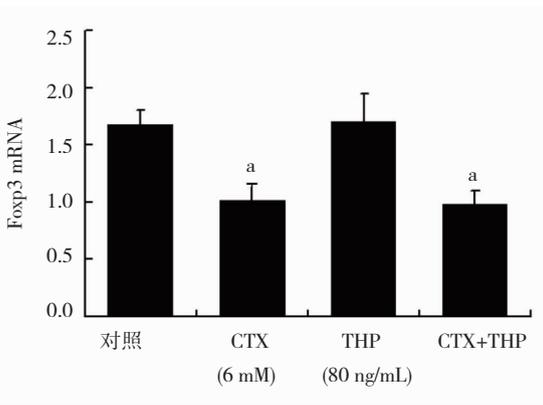


图3 化疗药物 CTX、THP 对 LA-N-6 中 Foxp3 基因表达的影响 a: 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

免疫系统对突变细胞监视功能的异常, 或肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击是肿瘤发生、发展的机制之一。神经母细胞瘤恶性程度高、易复发。起初发现 Foxp3 是一种 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞的转录因子, 其活性与免疫应答的负性调节相关, 主要作用是防止机体过强的免疫应答。Foxp3 表达过高, 则出现免疫抑制状态, 导致感染扩散或者肿瘤的发生^[6-8]。本研究结果显示神经母细胞瘤细胞株 LA-N-6 中 Foxp3 表

达增高, 且 CTX、THP 能影响 Foxp3 在 LA-N-6 中的表达, 提示 Foxp3 可能参与了肿瘤细胞 LA-N-6 的免疫逃避过程, 化疗药物 CTX、THP 可能通过抑制 Foxp3 分子的表达而发挥抗肿瘤的作用。

LA-N-6 中表达 Foxp3 是一个具有生物学意义的现象。先前的报道认为 Foxp3 的表达仅限于 T 淋巴细胞^[9-10], 近来发现 Foxp3 转录因子在其他非 T 细胞系上也有表达, 如黑色素瘤细胞, 胰腺肿瘤细胞^[11-12], 与本研究报告一致。由于 Foxp3 在 T 细胞中的免疫应答中的负性调节作用, 其在肿瘤细胞中的表达是否也具有免疫抑制功能是目前比较关注的课题。有研究显示表达 Foxp3 的黑色素瘤细胞具有抑制 T 效应细胞活性的功能^[3-5], 该现象提示肿瘤细胞有可能通过表达 Foxp3 逃避免疫细胞的攻击。

Foxp3 能够结合到 DNA 上, 调节下游基因的表达。Hori 等^[2] 研究表明转导了 Foxp3 的初始 T 细胞, 其 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的表达被抑制。研究发现 Foxp3 结合到 DNA 上的位点是在 IL-2 增强子附近的 NFAT (nuclear factor of activated T cells) 调节位点, Foxp3 通过结合 NFAT 来抑制 IL-2 增强子的活性, 抑制 IL-2 的产生^[13]。由此可以看出, Foxp3 分子可能通过抑制肿瘤局部的特异性免疫反应, 介导免疫逃避过程。本研究用 FACS 及 RT-PCR 的方法检测到神经母细胞瘤 LA-N-6 细胞中 Foxp3 的表达, 提示该肿瘤细胞可能通过模拟抑制性 T 调节细胞的功能逃避机体的免疫监视作用。

本研究发现化疗药物能降低 Foxp3 在神经母细胞瘤细胞中的表达。化疗药物使免疫抑制分子表达下调目前尚未见报道。尽管药物下调 Foxp3 表达的机制尚不明确, 但可以排除药物直接杀伤 LA-N-6 细胞的可能性。因为实验中选用的化疗药物剂量为非致死剂量。本研究结果提示 Foxp3 可能参与了神经母细胞瘤细胞的免疫逃避过程, CTX、THP 可能通过抑制 Foxp3 的表达抑制肿瘤的生长过程。

[参 考 文 献]

- [1] Weigel D, Jackle H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? [J]. Cell, 1990, 63 (3):455-456.
- [2] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3 [J]. Science, 2003, 299 (5609):1057-1061.
- [3] Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svoboda S, Russell SE, Kirkpatrick N, et al. The regulatory T cell-associated transcription factor Foxp3 is expressed by tumor cells [J]. Cancer Res, 2008, 68 (8):3001-3009.
- [4] Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S,

- Sipos B, et al. Foxp3 expression in Pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17):8344-8350.
- [5] Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochoff G, Dubertret L, et al. FoxP3 expressing CD4 + CD25 (high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173(2):1444-1453.
- [6] de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, et al. CD4 + CD25 (bright) regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis[J]. *J Immunol*, 2004, 172(10):6435-6443.
- [7] Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzumiya J, et al. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells[J]. *Br J Haematol*, 2004, 126(1):81-84.
- [8] Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, et al. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12):4228-4233.
- [9] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. *Nat Genet*, 2001, 27(1):68-73.
- [10] Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3[J]. *Immunity*, 2005, 22(3):329-341.
- [11] Zuo T, Wang L, Morrison C. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/Erbb2 oncogene[J]. *Cell*, 2007, 129(7):1275-1286.
- [12] Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(6):612-618.
- [13] Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40):37672-37679.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

2010 年全军第十一届儿科专业学术会议征文通知

中国人民解放军医学科学技术委员会儿科学专业委员会拟定于 2010 年 8 月在兰州举办全军第十一届儿科专业学术会议暨第四次全国儿科热点会议。欢迎军内外从事小儿内科、内儿科、妇儿科、小儿外科专业的各级临床医师及护理人员、预防医学工作者、实验室研究及相关人员踊跃投稿参加学术会议。

一、征文范围:小儿内、外科所有专业临床、保健、实验室以及军事儿科学方面各种形式的论文。

二、征文要求:(1)文章未在国内外杂志上公开发表,全文 4500 字以内及摘要 800 字以内的打印稿一份,需同时附电子版(Word 格式),写明作者姓名、单位、邮编、联系电话,加盖单位公章。

三、来稿请寄:兰州市七里河区滨河南路 333 号兰州军区总医院儿科收。邮编 730050。在信封上请注明“会议征文”字样,联系人:戴永利(手机:13099147678)。电子版请寄:zmt0702@163.com; guolinmei9999@sina.com; guolinmei9999@163.com

四、注意事项:(1)请作者自留底稿;(2)截稿日期:2010 年 6 月 26 日

五、会议确切时间以第二轮会议通知为准。

全军医学科学委员会儿科专业委员会

2010 年 1 月 22 日