

抗 CD44 抗体 HI44a 诱导 THP-1 细胞凋亡作用的研究

宋国丽¹/廖晓龙²/韩忠朝^{2,*}(1. 深圳大学生命科学院, 广东 深圳 518060;
2. 中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

Apoptosis of Human Leukemia THP-1 Cells Induced by Anti-CD44 Antibody

SONG Guo-li¹, LIAO Xiao-long², HAN Zhong-chao^{2,*}

(1. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China; 2. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300020, China)

【摘要】背景与目的: 研究抗 CD44 抗体 HI44a 体外诱导白血病细胞 THP-1 凋亡的作用及其机制。材料与方法: 应用 Annexin-V/PI 染色法、原位凋亡检测试剂盒及透射电镜分别检测形态学变化及其凋亡情况, RT-PCR 及 western-blot 方法检测原癌基因 c-myc mRNA 及蛋白水平的表达, JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位的变化, 流式细胞仪检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。结果: 采用多种方法均可证实, HI44a 对 THP-1 细胞有明显的诱导凋亡作用。HI44a 明显抑制 THP-1 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$); 同时 c-myc 在 mRNA 及蛋白水平的表达水平均明显降低; 并可诱导细胞线粒体膜电位的改变。结论: HI44a 能够有效诱导 THP-1 细胞凋亡。其作用机制可能与调节相关癌基因及抗凋亡蛋白的表达, 降低线粒体膜电位有关。

【关键词】抗 CD44 抗体; 细胞凋亡; 急性白血病

中图分类号: R733.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)03-0190-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: The present study was designed to determine the apoptosis-inducing effects of HI44a, an anti-CD44 monoclonal antibody, on THP-1 leukemia cells and to investigate its mechanism of action. MATERIAL AND METHODS: The effect of HI44a on leukemia cells apoptosis was assayed by annexin-V/PI staining, ultrastructural changes and *in situ* cell death detection assay. RT-PCR and Western-blot were used to examine the expression of c-myc at both mRNA and protein levels. The expression of Bcl-2 and mitochondrial potential were examined using FACS. RESULTS: All tests showed that HI44a effectively induced apoptosis of THP-1 cells. When treated with HI44a, the level of c-myc expression in leukemic cells obviously decreased at both mRNA and protein levels, and the intracellular level of Bcl-2 protein also decreased. Moreover, HI44a could effectively induce changes in mitochondrial membrane potential of the THP-1 cells. CONCLUSION: HI44a effectively induced apoptosis of THP-1 cells. These activities of the anti-CD44 antibody may be associated with its inhibitory effect on oncogene and anti-apoptosis protein expressions, and changes in mitochondrial membrane potential.

【KEY WORDS】 anti-CD44 monoclonal antibody; apoptosis; acute leukemia

急性白血病细胞的主要生物学特征是增殖失控、分化及凋亡受阻。诱导白血病细胞分化、凋亡已成为急性白血病治疗的重要手段之一^[1,2]。CD44 是一种分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 在所有急性白血病(AML)亚型的白血病原始细胞均有表达。HI44a 是一种鼠抗人

CD44 单克隆抗体, 我们前期的研究结果发现它能够有效地诱导原始白血病细胞分化及凋亡, 但其作用机制尚不清楚^[4]。本研究主要对 HI44a 作用过的白血病细胞株 THP-1, 对其细胞形态学变化、凋亡情况, 调控细胞凋亡、分化的分子及线粒体变化进行了研究。

收稿日期: 2006-01-18; 修订日期: 2006-03-08

作者简介: 宋国丽(1976-), 女, 山东省莱阳人, 讲师, 博士, 研究方向: 血液学。E-mail: guolsong@hotmail.com

* Correspondence to: HAN Zhong-chao Tel: 86-22-27317276, E-mail: tihzhan@public.tpt.tj.cn

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂 白血病细胞系 THP-1 和抗 CD44 抗体 HI44a(IgG2a) 由协和干细胞基因工程公司提供。Bcl-2 抗体以及 FITC 标记相应的 IgG 同型对照, 羊抗鼠二抗系 BD 公司产品, 鼠抗 c-myc 单克隆抗体, 羊抗 actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。JC-1 购自 sigma, Annexin-V-FITC staining 试剂盒, In Situ Cell Death Detection Kit, POD 试剂盒使用 ROCHE 公司产品。SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 Annexin-V/PI 双标法检测细胞早期凋亡

将 THP-1 细胞以 2×10^5 /ml 的细胞浓度种于 24 孔板, 1 ml/孔, 加入 HI44a 共同培养于 RPMI 1640 培养基(含 10% 的胎牛血清), 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养 48 h 后, 离心收集细胞, PBS 洗涤后, Annexin-V 试剂盒检测细胞早期凋亡^[8]。

1.3 原位细胞凋亡检测 收集加入 HI44a 培养 4 d 后细胞, 离心涂片。加入新鲜配制的 4% 多聚甲醛/PBS (pH7.4), 15 °C ~ 25 °C 固定 1 h。按照原位细胞凋亡检测试剂盒方法操作, 荧光显微镜下观察反应细胞凋亡情况。

1.4 透射电子显微镜观察凋亡细胞超微结构变化 收集与 HI44a 共培养后细胞于 1.5 ml EP 管, 加入一定量血浆混匀。1 500 r/min 离心 5 min。弃去多余血浆, 沿管壁轻轻加入 2.5% 戊二醛固定剂, 4 °C 固定 30 min。透射电子显微镜下观察。

1.5 RT-PCR 及 western-blot 检测 c-myc 基因 mRNA 及蛋白水平的表达 收集与 HI44a 共培养 4 h 和 24 h 的 THP-1 细胞, RT-PCR 法检测其 mRNA 水平的表达变化, Trizol(GIBCO) 一步法提取细胞总 RNA, 以 Oligo d(T) 为引物, 经 M-MLV 逆转录酶逆转录为 cDNA, 管家基因 β -actin 作为内参。PCR 扩增的引物为: c-myc,

5'-CCC GAC GCG GGG AGG CTA TT-3' 和 5'-TCT CCA GCT GGT CGG CCG TG-3'; (引物由上海 Sangon 公司合成)。PCR 反应条件为: 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 32 个循环。常规 western-blot 检测其蛋白水平的表达, 化学发光显色。

1.6 JC-1 染色检测线粒体膜电位 收集与 HI44a 共培养 48 h 的 THP-1 细胞, 按照文献方法^[9]进行 JC-1 染色, FACS 检测线粒体膜电位的变化。

1.7 FACS 检测细胞 Bcl-2 表达的变化 收集培养后各组细胞, PBS 洗涤两次。沉淀细胞以新鲜配制的 2% 的多聚甲醛冰浴固定 10 min, 1% 的 TritonX-100 冰上破膜作用 10 min, PBS 洗涤两次后, 将细胞重悬浮于 200 μ l PBS 中, 每管加入 20 μ l FITC- 标记的抗 Bcl-2 抗体及相应的阴性对照, 4 °C 孵育 30 min。细胞用冰冷的 PBS 洗 2 遍后, 重新悬浮于 300 μ l PBS 中, FACS 检测。

1.8 统计学方法 数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 HI44a 可诱导 THP-1 细胞发生早期凋亡

HI44a 对白血病细胞系 THP-1 作用 48 h 后, Annexin-V/PI 双标法检测结果显示细胞的早期凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.005$), 并表现出剂量依赖性, 随着抗体浓度的增加, 凋亡率增高(图 1)。同样, HI44a 作用 5 d 后, 原位凋亡检测试剂盒检测发现, THP-1 细胞的凋亡率明显增高($P < 0.01$)(图 2)。

2.2 细胞凋亡超微结构变化 HI44a 作用后, 细胞体积缩小, 多数细胞核电子密度较高, 核染色质凝聚, 凝聚的染色质外表光滑、均匀, 呈新月形、马鞍形和镰刀形, 分布在核的周边, 核分裂成碎块, 与细胞质成分包围完整的细胞器形成“凋亡小体”, 呈明显的凋亡细胞的特征(图 3)。

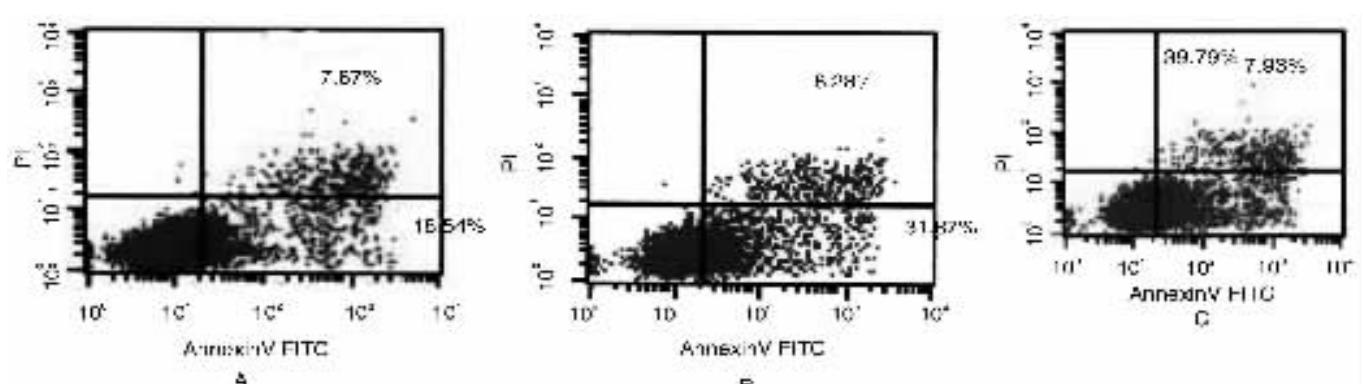


图 1 FITC-Annexin-V/PI 染色法检测 HI44a 作用后 THP-1 细胞的早期凋亡率。A. 对照组; B. HI44a, 30 μ g/ml; C. HI44a, 50 μ g/ml。

Figure 1 Apoptotic cell death induced by HI44a was assessed by FITC-annexin V/PI. A. Control; B. HI44a, 30 μ g/ml; C. HI44a, 50 μ g/ml

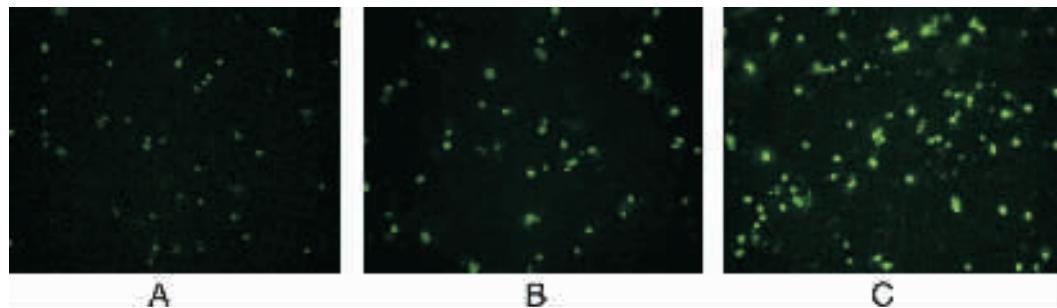


图 2 经原位细胞凋亡检测法, 荧光显微镜下观察 HI44a 对 THP-1 细胞凋亡的影响。A. 空白对照; B. IgG2a 抗体对照; C. HI44a 作用组

Figure 2 Cells apoptosis induced by HI44a was detected by *in situ* cell death detection kit and analyzed by fluorescence microscopy. A. untreated; B. IgG2a control; C. HI44a-treated

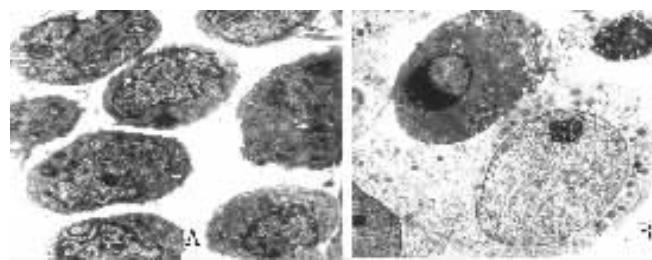


图 3 透射电子显微镜观察 HI44a 作用后凋亡细胞的形态。A: 对照组; B: HI44a 作用组

Figure 3 Morphology of THP-1 cells untreated and treated with HI44a under transmission electron microscope. A: Untreated with HI44a; B: Treated with HI44a after 48 h shows nucleus chromation condense and marginate like crescent.

2.3 c-myc mRNA 及蛋白水平的表达变化

HI44a 作用 24 h 后, THP-1 细胞的 c-myc mRNA 和蛋白水平的表达均明显降低, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (如图 4)。

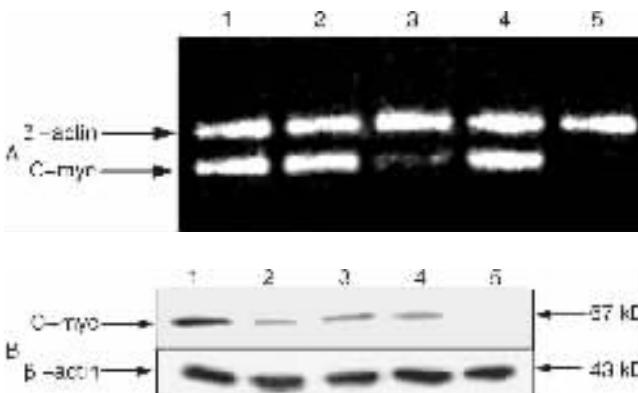


图 4 HI44a 对 THP-1 细胞 c-myc mRNA(A)和蛋白水平(B)表达的影响
Figure 4 The expression of c-myc in THP-1 cells modulated by HI44a. Blasts were treated with HI44a for 4 or 24 h, and analyzed by RT-PCR and western-blot. β -actin was used as an internal standard. A. 1: Pretreated; 2: Isotypic control 4 h; 3: HI44a 4 h; 4: Isotypic control 24 h; 5: HI44a 24 h. B. 1: Pretreated; 2: Isotypic control 4 h; 3: HI44a 4 h; 4: Isotypic control 24 h; 5: HI44a 24 h.

2.4 HI44a 对线粒体膜电位的影响

如图 5 结果显示, HI44a 未作用的细胞活性好, 线粒体膜电位高, 线粒体内 JC-1 聚集体的浓度高, 红色荧光很强, HI44a

的作用使凋亡细胞的比例上升。R3 区的细胞红色光降低, 说明其中 JC-1 聚集体的浓度下降。

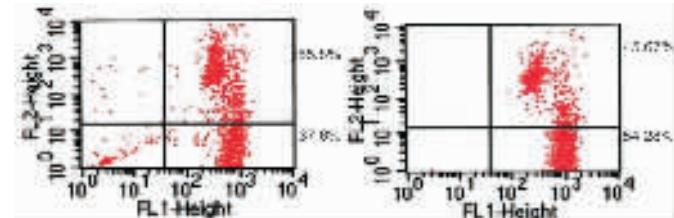


图 5 HI44a 作用后, THP-1 细胞线粒体膜电位的变化。A. 对照组; B. HI44a 作用组。

Figure 5 The effect of HI44a on cell mitochondrial membrane potential analyzed by flow cytometry. A. Control; B. HI44a-treated.

2.5 HI44a 对 THP-1 细胞 Bcl-2 表达的影响

如图 6 结果所示, HI44a 可明显抑制白血病细胞 Bcl-2 表达, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

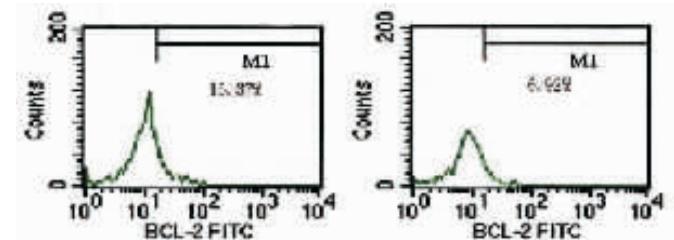


图 6 HI44a 对白血病细胞 bcl-2 表达的影响。A. 对照组; B. HI44a 作用组

Figure 6 Bcl-2 expression in THP-1 cells modulated by HI44a. A. Control; B. HI44a-treated

3 讨论

细胞凋亡是细胞在各种死亡信号刺激后发生的一系列瀑布式激活的主动性死亡过程, 传统的肿瘤细胞治疗方法(化疗和放疗)主要是抑制肿瘤细胞的继续增殖, 然而由于药物缺乏特异性, 往往对正常组织也造成损伤。随着对肿瘤形成机制研究的深入, 人们认识到特异性诱导肿瘤细胞凋亡, 可能是肿瘤治疗中最有广阔前景的尝试。急性白血病细胞恶性克隆的持续扩增与细胞增殖及凋亡速率不平衡有关。寻找新的凋亡诱导剂或增加

白血病细胞对化疗药物的敏感性成为迫切需要研究的问题^[1,2,3]。

造血细胞的分化、凋亡是由骨髓微环境调节的，骨髓微环境主要包括细胞外基质、细胞因子及附属细胞。粘附分子CD44在造血干细胞及骨髓微环境细胞上均可表达，而CD44的主要配体透明质酸是细胞外基质的主要组分。据报道，抗CD44抗体A3D8、H90或受体透明质酸能够逆转M1-M5各亚型AML细胞及细胞系的分化阻滞，诱导细胞凋亡^[5,6]。我们前期工作也发现HI44a能够有效诱导原代白血病细胞及THP-1细胞系分化及凋亡^[4]。A3D8、H90作用主要通过调控细胞周期相关蛋白，而HI44a则表现出不同的作用机制。c-myc基因是参与细胞增殖、分化与凋亡的重要基因，c-myc蛋白主要由羧基端的亮氨酸拉链区(ZIP)、螺旋-环-螺旋区(HLH)、碱性氨基酸区(BR)及位于氨基端的转录激活区(TAD)组成，这些是c-myc作为转录因子功能的结构基础，其中碱性氨基酸区(BR)与结合特异性DNA靶序列CACGTC有关。当某些抑癌因素存在时(抗癌因子、低浓度血清、抑止细胞周期因子等)，c-myc蛋白可促进细胞凋亡。当有致癌因素存在，Bcl-2基因表达时，c-myc蛋白促进癌细胞增殖^[7]。近年来陆续有报道说明，线粒体在细胞凋亡的过程中起着枢纽作用，线粒体跨膜电位 $\Delta\psi_m$ 的下降，被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件，它发生在细胞核凋亡特征(染色质浓缩、DNA断裂)出现之前，早于核酸酶的激活，也早于磷酯酰丝氨酸暴露于细胞表面，一旦线粒体 $\Delta\psi_m$ 崩溃，则细胞凋亡不可逆转^[12]。而Bcl-2抗凋亡作用的主要机制是因为Bcl-2蛋白能够增强线粒体膜电位，抑制线粒体钙离子的释放，使核酸内切酶无法活化，而具有抗凋亡作用^[10,11]。本研究结果显示，HI44a诱导THP-1细胞凋亡作用时伴随着原癌基因c-myc在mRNA及蛋白水平的降低，同时，线粒体膜电位及抗凋亡蛋白Bcl-2水平均降低。这些结果提示，线粒体通路参与了HI44a的诱导细胞凋亡作用，c-myc蛋白主要起促进作用，是否还有其它通路参与，尚需要进一步的研究。

参考文献：

- [1] Parisi E, Draznin J, Stoopler E, et al. Acute myelogenous leukemia: advances and limitations of treatment [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2002, 93(3): 257-263.

- [2] Wang ZY. Ham-wasserman lecture: treatment of acute leukemia by inducing differentiation and apoptosis [J]. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2003, 1-13.
- [3] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RARalpha/ PML proteins [J]. *Blood*, 1996, 88(3): 1 052-1 061.
- [4] Song GL, Liao XL, Han ZC, et al. HI44a, an anti-CD44 monoclonal antibody, induces differentiation and apoptosis of human acute myeloid leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2004, 28(10): 1 089-1 096.
- [5] Charrad RS, Li Y, Delpech B, et al. Ligation of the CD44 adhesion molecule reverse blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia [J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(6): 669-676.
- [6] Charrad RS, Gadhoum Z, Qi J, et al. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines [J]. *Blood*, 2002, 99(1): 290-299.
- [7] Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, et al. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis [J]. *Oncogene*, 2002, 21(21): 3 414-3 421.
- [8] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis [J]. *Blood*, 1994, 84(5): 1 415-1 420.
- [9] Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, et al. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye [J]. *Methods Enzymol*, 1995, 260: 406-417.
- [10] Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(1): 61-66.
- [11] Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability [J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7(12): 1 182-1 191.
- [12] Chow KU, Boehrer S, Napieralski S, et al. In AML cell lines Ara-C combined with purine analogues is able to exert synergistic as well as antagonistic effects on proliferation, apoptosis and disruption of mitochondrial membrane potential [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(1): 165-173.

