

[文章编号] 1000-4718(2007)08-1527-04

# 乌苯美司下调 *c-myc* 表达与其增强全反式维甲酸诱导 NB4 细胞分化作用关系的实验研究

林茂芳, 钱习军

(浙江大学医学院第一附属医院血液科, 浙江 杭州 310003)

**[摘要]** 目的: 了解氨基肽酶抑制剂乌苯美司(bestatin)能否增强全反式维甲酸(ATRA)对 NB4 细胞的诱导分化作用, 及此过程中 NB4 细胞 *c-myc* mRNA 表达水平的改变。方法: MTT 法检测药物抑制细胞生长的作用。流式细胞仪测细胞表面分化抗原 CD11b 及四氮唑蓝(NBT)还原实验检测 NB4 细胞的分化。RT-PCR 检测细胞 *c-myc* mRNA 表达水平。结果: 50 mg/L、75 mg/L、100 mg/L 乌苯美司与 10 nmol/L ATRA 联合处理 72 h, 均能明显增强 NB4 细胞的 NBT 还原能力, 与 10 nmol/L ATRA 组差异显著( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。从 48 h 到 96 h, 100 mg/L 乌苯美司时间依赖性地增强 10 nmol/L ATRA 诱导 NB4 细胞的 NBT 还原能力, 与相应时点 10 nmol/L ATRA 组差异明显( $P < 0.01$ )。100 mg/L 乌苯美司与 10 nmol/L ATRA 联合应用 72 h, NB4 细胞 CD11b 表达率明显高于 10 nmol/L ATRA 组( $P < 0.01$ )。50 mg/L、75 mg/L、100 mg/L 乌苯美司与 10 nmol/L ATRA 联合处理 4 h, NB4 细胞 *c-myc* mRNA 表达水平明显低于单用 ATRA 组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 药物联合应用各组 NB4 细胞的 *c-myc* mRNA 表达水平与 NBT 还原能力之间呈负相关( $r = -0.917$ ,  $P < 0.05$ )。结论: 乌苯美司可能通过下调 NB4 细胞 *c-myc* mRNA 的表达, 从而增强 ATRA 诱导 NB4 细胞分化的作用。

[关键词] 乌苯美司; 维甲酸; NB4 细胞; 细胞分化

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Bestatin potentiates ATRA induced differentiation in NB4 cells possibly through down-regulation of *c-myc* expression

LIN Mao-fang, QIAN Xi-jun

(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate whether aminopeptidase inhibitor bestatin potentiates differentiation in NB4 cells induced by all-trans-retinoic acid (ATRA) and whether down-regulation of *c-myc* expression is involved in this process. **METHODS:** MTT was used to detect the inhibitory effect of bestatin on the growth of NB4 cells. The expression of CD11b as myeloid differentiation marker was measured by flow cytometry. The nitroblue-tetrazolium (NBT) reduction assay was performed to determine the cyto-differentiation in NB4 cells. The mRNA expression of transcription factors *c-myc* in NB4 cells was detected by RT-PCR. **RESULTS:** After NB4 cells were treated for 72 hours, various concentration (50 mg/L, 75 mg/L and 100 mg/L) of bestatin dose-dependently enhanced NBT reduction in NB4 cells induced by 10 nmol/L ATRA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). From 48 to 96 hours, 100 mg/L bestatin time-dependently increased 10 nmol/L ATRA induced NBT reduction in NB4 cells ( $P < 0.01$ ). Bestatin at concentration of 100 mg/L plus 10 nmol/L ATRA prominently elevated CD11b expression in NB4 cells compared to the group treated with ATRA alone ( $P < 0.01$ ). Various concentration (50 mg/L, 75 mg/L and 100 mg/L) of bestatin synergized with the effect of 10 nmol/L ATRA on down-regulation of *c-myc* mRNA expression, which was inversely correlated with the NBT reduction activity in NB4 cells induced by 10 nmol/L ATRA alone or plus various concentrations of bestatin ( $r = -0.917$ ,  $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Aminopeptidase inhibitor bestatin potentiates ATRA-induced differentiation in acute promyelocytic leukemia cells, possibly through down-regulation of *c-myc* expression.

[KEY WORDS] Bestatin; Tretinoin; NB4 cells; Cell differentiation

乌苯美司(bestatin)为氨基肽酶 N (CD13) 和亮氨酸氨基肽酶的抑制剂。乌苯美司可通过增强宿主免疫功能、抑制肿瘤细胞生长及诱导肿瘤细胞凋亡等发挥抗肿瘤作用。已有报道, 急性髓细胞白血病

该药治疗有效<sup>[1]</sup>。最近, Hirano 等<sup>[2]</sup> 根据四氮唑蓝 (nitroblue - tetrazolium, NBT) 还原实验结果提出, 乌苯美司可能增强 ATRA 对急性早幼粒白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 细胞株 NB4 细胞的诱导分化作用。本研究以 NB4 细胞为研究对象, 通过功能和表面分化抗原等多层次实验, 以期再次验证乌苯美司对 ATRA 诱导分化作用的增强效应, 并初步探索其可能的机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

乌苯美司、ATRA 均购自 Sigma 公司。乌苯美司以无菌去离子水溶解为 1 g/L, 分装后 -20 °C 保存; ATRA 以无水乙醇溶解成 10 μmol/L 的储存液, 4 °C 避光保存, 使用时以 RPMI - 1640 细胞培养液稀释为相应工作浓度。MTT 为 Sigma 公司产品, 以 PBS 配制成 5 g/L 溶液, 过滤除菌后 4 °C 避光保存。NBT 为 BBI 公司产品, 以 PBS 配制成 1 g/L 溶液, 过滤除菌后 4 °C 避光保存, 使用前 1 周之内配制。佛波酯 (12 - O - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate, TPA) 为 Sigma 公司产品, 二甲亚砷溶解为 1 g/L, 分装后 -80 °C 保存。CD11b - FITC 标记单克隆抗体为 Teotech 公司产品。Trizol 试剂为 Gibco 公司产品, M - MLV 逆转录酶和 Taq DNA 合成酶为 Promega 公司产品。RPMI - 1640 为 Gibco 公司产品。胎牛血清为 JRH 公司产品。

### 2 方法

**2.1 细胞培养及药物处理** 人急性早幼粒白血病细胞株 NB4 细胞 (浙江大学肿瘤研究所惠赠) 培养于含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI - 1640 细胞培养液中, 置 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中, 2 - 3 d 传代 1 次。实验时, 取对数生长期的细胞, 调整细胞密度为 7 × 10<sup>7</sup> cells/L, 以不同浓度 ATRA 和乌苯美司单独及联合处理后, 于不同时间收集细胞进行实验。

**2.2 MTT 法检测药物对细胞的生长抑制** 调整细胞数为 7 × 10<sup>7</sup> cells/L, 以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板, 同时加不同浓度药物 (每浓度 5 个复孔, 等体积的 RPMI - 1640 作为空白对照) 处理 72 h 后, 每孔加 MTT 工作液 (5 g/L) 20 μL, 37 °C 孵育 4 h, 离心 (1 500 r/min, 10 min), 小心吸去上清, 加入 200 μL 二甲亚砷, 混匀。酶联免疫检测仪 (DG3022A 型) 读取 570 nm 波长的吸光度值 (A)。

**2.3 四氮唑蓝还原实验** 按文献报道<sup>[3]</sup> 的方法进行。空白对照组及药物处理各组细胞与 NBT 共孵育后, 制备涂片, 瑞氏 - 姬姆萨染色, 在光学显微镜下

(100 × 10) 观察, 胞浆内含有蓝黑色颗粒者为阳性细胞, 随机计数 200 个细胞, 计算阳性细胞百分率。

**2.4 细胞表面分化抗原 CD11b 的检测** 取空白对照组及药物处理各组细胞离心, PBS 洗涤, 调整细胞数为 2 × 10<sup>5</sup> 个, 加 CD11b - FITC 标记单抗 5 μL, 避光孵育 30 min, PBS 洗涤, 上流式细胞仪 (BD 公司) 检测。以 Cellquest 1.2 软件进行分析。

### 2.5 细胞总 RNA 提取和 RT - PCR 反应

①细胞总 RNA 提取 用 Trizol 一步法抽提细胞总 RNA, 按试剂说明书操作。甲醛变性凝胶电泳验证 RNA 的完整性, 紫外分光光度仪定量, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值均在 1.8 - 2.0 之间。

②逆转录反应 样品总 RNA 4 μg 及随机引物 0.5 μg, 70 °C 5 min, 立即冰浴, 离心。依次加 5 × 逆转录酶缓冲液 5 μL、10 mmol/L dNTP 1.25 μL、M - MLV 200 U、RNase 抑制剂 0.6 μL, 无 RNA 酶水补至反应体积为 25 μL, 于 27 °C 10 min, 37 °C 60 min 逆转录反应后, 72 °C 10 min 灭活逆转录酶, 冰浴 1 min 结束反应。

③PCR 反应 PCR 引物为上海 Sangon 公司合成。引物序列及产物大小见表 1。反应体系包括逆转录产物 2 μL、10 × PCR 缓冲液 2.5 μL、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL、10 mmol/L dNTP 0.5 μL、25 μmol/L (*c - myc*) 或 2.5 μmol/L (*β - actin*) 上游及下游引物各 0.5 μL、Taq DNA 聚合酶 1 U, 用灭菌去离子水补至终体积为 25 μL。于 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 22 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。预实验确定产物与循环之间呈线性关系范围。取 5 μL 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 中电泳, 电场强度 5 V/cm, 紫外灯下观察电泳结果, 用凝胶成像系统 (Bio - Rad 公司) 扫描分析条带灰度, 以 *c - myc* 与 *β - actin* 的灰度比进行半定量分析。

表 1 PCR 所用引物序列及产物大小

Tab 1 The sequences of primers and the size of PCR products

Gene	The sequences of primers	The size of PCR products
<i>c - myc</i> <sup>[4]</sup>	Sense: 5' - CCTACCCTCTCAACGACAGC - 3'	494 bp
	Antisense: 5' - GTTGTGTGTTCCGCTCTTGA - 3'	
<i>β - actin</i> <sup>[5]</sup>	Sense: 5' - GTCACGCACGATTCCCGCT - 3'	619 bp
	Antisense: 5' - CGCTGCCGCTGCTCGTCA - 3'	

### 3 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较方差齐性检验后采用方差分析及 Tukey 检验, 相关分析采用 Pearson 相关。应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。

## 结 果

### 1 乌苯美司抑制 NB4 细胞的生长

乌苯美司对 NB4 细胞具有生长抑制作用。1 mg/L 乌苯美司处理 NB4 细胞 72 h, 即可显著抑制 NB4 细胞的生长 ( $P < 0.01$ )。乌苯美司作用 72 h, 对 NB4 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 30.69 mg/L。见表 2。

表 2 乌苯美司抑制 NB4 细胞生长

Tab 2 The inhibitory effect of bestatin on NB4 cells (A.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Bestatin(mg/L)	Absorbency value
0	2.76 ± 0.18
0.1	2.73 ± 0.13
1	2.47 ± 0.10 <sup>△△</sup>
10	1.83 ± 0.15 <sup>△△</sup>
100	0.97 ± 0.06 <sup>△△</sup>
1 000	0.58 ± 0.08 <sup>△△</sup>

<sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs control group.

### 2 乌苯美司增强 ATRA 诱导 NB4 细胞的 NBT 还原能力

以一定浓度乌苯美司 (50 mg/L、75 mg/L、100 mg/L) 单独处理 72 h, NB4 细胞的 NBT 还原能力无明显改变 (与空白对照组相比,  $P > 0.05$ ); 10 nmoL/L ATRA 单独作用 72 h, NB4 细胞 NBT 还原能力明显高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。不同浓度乌苯美司分别与 10 nmoL/L ATRA 联合处理 72 h, NB4 细胞的 NBT 阳性率明显高于 10 nmoL/L ATRA 单独处理组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 一定浓度乌苯美司浓度依赖性增强 10 nmoL/L ATRA 诱导 NB4 细胞的 NBT 还原能力

Tab 3 Various concentration of bestatin dose - dependently enhanced 10 nmoL/L ATRA induced NBT reduction of NB4 cells (%.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Group	NBT positive cells(%)
Control	1.4 ± 0.4
50 mg/L bestatin	1.4 ± 0.7
75 mg/L bestatin	1.3 ± 0.3
100 mg/L bestatin	2.4 ± 1.1
10 nmoL/L ATRA	12.0 ± 2.2 <sup>△△</sup>
50 mg/L bestatin + 10 nmoL/L ATRA	17.6 ± 2.5
75 mg/L bestatin + 10 nmoL/L ATRA	23.5 ± 3.2*
100 mg/L bestatin + 10 nmoL/L ATRA	36.0 ± 8.3**

<sup>△</sup> $P < 0.05$  vs control group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 10 nmoL/L ATRA alone treated group.

100 mg/L 乌苯美司单独处理不同时间 (48 - 96

h), NB4 细胞的 NBT 还原能力改变不显著 (与相应时间空白对照组比较,  $P < 0.05$ ); 10 nmoL/L ATRA 处理细胞至 72 h 开始, 出现 NB4 细胞 NBT 还原能力的增强, 并呈时间依赖性, 与相应时间对照组相比, 差异明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 而 10 nmoL/L ATRA 与 100 mg/L 乌苯美司联合处理 NB4 细胞 48 h, NB4 细胞的 NBT 还原能力就明显强于相应时间 10 nmoL/L ATRA 组, 且此作用随时间延长而明显增加 ( $P < 0.01, P < 0.01$ )。见图 1。

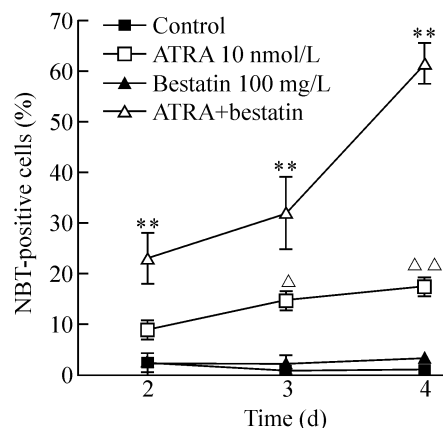


Fig 1 100 mg/L bestatin time - dependently increased 10 nmoL/L ATRA induced NBT reduction of NB4 cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$  vs 10 nmoL/L ATRA alone treated group.

图 1 100 mg/L 乌苯美司呈时间依赖性增强 10 nmoL/L ATRA 诱导 NB4 细胞的 NBT 还原能力

### 3 乌苯美司与 ATRA 联合处理后增加 NB4 细胞 CD11b 阳性表达率

100 mg/L 乌苯美司单独处理 72 h, NB4 细胞的 CD11b 阳性百分率与对照组差异不显著 ( $P < 0.05$ ); 10 nmoL/L ATRA 单独处理 72 h, NB4 细胞的 CD11b 表达率明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 100 mg/L 乌苯美司与 10 nmoL/L ATRA 联合应用 72 h, NB4 细胞 CD11b 表达率明显高于 10 nmoL/L ATRA 组 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 乌苯美司与 ATRA 单独及联合应用 72 h NB4 细胞 CD11b 表达的改变

Tab 4 Effect of bestatin alone or in combination with ATRA on CD11b expression of NB4 cells (%.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Group	CD11b positive cells(%)
Control	9.97 ± 0.89
100 mg/L bestatin	16.60 ± 2.91
10 nmoL/L ATRA	31.95 ± 5.52 <sup>△△</sup>
100 mg/L bestatin + 10 nmoL/L ATRA	60.58 ± 9.18**

<sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$  vs 10 nmoL/L ATRA alone treated group.

#### 4 乌苯美司与 ATRA 单独及联合处理 4 h 对 NB4 细胞 *c-myc* mRNA 表达水平的影响

未加药组 NB4 细胞的 *c-myc* mRNA 表达水平高。10 nmol/L ATRA 单独处理 4 h, NB4 细胞 *c-myc* mRNA 表达明显低于空白对照组 ( $P < 0.05$ ); 50 mg/L、75 mg/L、100 mg/L 乌苯美司均能增强 10 nmol/L ATRA 下调 NB4 细胞 *c-myc* mRNA 的表达水平, 与单用 ATRA 组相比, 差异有显著意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2。药物联合应用各组 NB4 细胞的 *c-myc* mRNA 表达水平与 NBT 还原能力之间呈负相关 ( $r = -0.917, P < 0.05$ )。

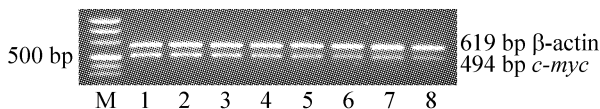


Fig 2 Various concentration of bestatin in combination with 10 nmol/L ATRA down-regulated *c-myc* mRNA expression of NB4 cells. 1: control; 2: 50 mg/L bestatin; 3: 75 mg/L bestatin; 4: 100 mg/L bestatin; 5: 10 nmol/L ATRA; 6: 50 mg/L bestatin + 10 nmol/L ATRA; 7: 75 mg/L bestatin + 10 nmol/L ATRA; 8: 100 mg/L bestatin + 10 nmol/L ATRA.

图 2 不同浓度乌苯美司增强 10 nmol/L ATRA 下调 NB4 细胞 *c-myc* mRNA 的表达

### 讨 论

ATRA 对 APL 的有效治疗是白血病诱导分化治疗的成功典范。但是, 单用 ATRA 治疗容易复发及发生耐药, 因此, 寻找能够增强 ATRA 诱导分化作用的药物一直是白血病分化治疗的一个研究热点。最近, Hirano 等<sup>[2]</sup>根据 NBT 还原实验结果提出, 氨肽酶抑制剂乌苯美司能够增强 ATRA 对 NB4 细胞的诱导分化作用。在本研究中, 通过对细胞分化的功能和表面分化抗原等多层次的检测和分析对比, 进一步证实一定浓度范围的乌苯美司确能增强 ATRA 对 NB4 细胞的诱导分化作用。

原癌基因 *c-myc* 在造血细胞的分化及凋亡过程中有重要作用, 其表达异常与髓细胞性白血病的发生有关, 抑制 *c-myc* 表达可以促使白血病细胞的分化及诱导细胞终末分化后的凋亡。本结果显示, 10 nmol/L ATRA 单独作用于 NB4 细胞可以下调 *c-myc* 的表达, 与文献报道相似<sup>[6]</sup>。我们还发现, 乌苯美司与 ATRA 联合应用时, 对 *c-myc* mRNA 表达水平的下调作用较单用 ATRA 更加明显。而且药物联合应用各组的 *c-myc* mRNA 表达水平与药物诱导的 NBT 还原能力之间具有明显的相关性。提示, 乌苯美司可能通过与 ATRA 协同下调 *c-myc* 的表达, 进一步调节 *c-myc* 下游与 NB4 细胞分化相关基因的表达, 从而增强 ATRA 对 NB4 细胞的诱导分化作用, 后者有待进一步的研究验证。

### [参 考 文 献]

[1] Saito M, Aoyagi T, Umezawa H, et al. Bestatin, a new specific inhibitor of aminopeptidases, enhances activation of small lymphocytes by concanavalin A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, 76(2): 526-533.

[2] Hirano T, Kizaki M, Kato K, et al. Enhancement of sensitivity by bestatin of acute promyelocytic leukemia NB4 cells to all-trans retinoic acid [J]. *Leuk Res*, 2002, 26(12): 1097-1103.

[3] 韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 329-330.

[4] Zhuang WJ, Fong CC, Cao J, et al. Involvement of NF-kappa B and c-myc signaling pathways in the apoptosis of HL-60 cells induced by alkaloids of *Tripterygium hypoglaucom* (levl.) Hutch [J]. *Phytomedicine*, 2004, 11(4): 295-302.

[5] 林茂芳, 俞 静, 严力行. 可溶性抗 CD47 单抗对人树突细胞分化与功能的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25(12): 709-712.

[6] Hu ZB, Ma W, Uphoff CC, et al. Modulation of gene expression in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 [J]. *Leukemia*, 1993, 7(13): 1817-1823.