

雷帕霉素对白血病 SUP-B15 细胞株 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响*

张亚莉¹, 陈涛¹, 李美¹, 王剑青², 张建英¹

(1. 贵阳医学院 医学检验系, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 生化科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察雷帕霉素对人急性淋巴细胞白血病 SUP-B15 细胞的生长及 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响。方法: 实验分为雷帕霉素处理组 and 对照组, 雷帕霉素处理组以含不同终浓度雷帕霉素(10 nmol/L、20 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L)的 IMDM 培养处理, 对照组以相同体积细胞 IMDM 培养液培养, 并于处理后 24 h、48 h、72 h 观察各组细胞形态, 实时荧光定量 PCR 检测 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 的表达。结果: 雷帕霉素处理后 SUP-B15 活细胞数量减少, 死细胞数量增加, 可见细胞抱团生长、胞膜出泡、细胞破碎等现象, 随药物浓度升高和作用时间增加变化程度明显。瑞氏染色观察可见, 雷帕霉素处理组早期无明显变化, 处理后期(72 h)细胞出现明显空泡样改变, 并呈浓度依赖关系; 雷帕霉素处理组细胞 HIF-1 α mRNA 的表达在 24 h 变化不明显; 48 h 时, 10 nmol/L、100 nmol/L 雷帕霉素处理细胞 HIF-1 α mRNA 的表达上调, 20 nmol/L、50 nmol/L 雷帕霉素处理细胞 HIF-1 α 表达下调; 72 h 时, 各浓度的雷帕霉素对 HIF-1 α mRNA 的表达均呈上调趋势; 在雷帕霉素处理后, 除较低浓度(10 nmol/L、20 nmol/L)雷帕霉素处理 72 h 外, SUP-B15 细胞的 VEGF mRNA 表达均呈显著下调。结论: 雷帕霉素可抑制 SUP-B15 细胞生长, 导致形态明显改变, 并能下调 SUP-B15 细胞 VEGF mRNA 的表达。

[关键词] 雷帕霉素; 低氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 白血病, 淋巴细胞, 急性

[中图分类号] R733.711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)04-0352-06

Effects of Rapamycin on the Expression of HIF-1 α and VEGF in Leukemic Cell Lines SUP-B15

ZHANG Yali¹, CHEN Tao¹, LI Mei¹, WANG Jianqing², ZHANG Jianying¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Clinical biochemistry, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of rapamycin on the growth of acute lymphoblastic leukemic cell SUP-B15 and the expression of VEGF and HIF-1 α . **Methods:** SUP-B15 cells were divided into control group and rapamycin(RAPA) group. The RAPA group was cultured with IMDM medium containing different concentration of rapamycin (10 nmol/L, 20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L) and the control group was cultured with the same volume of IMDM medium. After 24, 48, and 72 h, the morphologic changes of cells were observed under light microscope, and HIF-1 α and VEGF mRNA expression levels were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** After SUP-B15 cells were treated with rapamycin, the number of living cells decreased and the number of dead cells increased, membrane bubbling, cell breaking and agglomeration were observed. With the increase of rapamycin concentration and treating time, the morphological changes of the cells were more obvious. Wright staining showed that no obvious change was found in SUP-B15 cells after treated with rapamycin at early stage and obvious vacuole changes were found in 72 h, which showed a dose dependent manner. Real time fluorescent quantitative PCR results showed that the HIF-1 α mRNA expression was not significantly changed in SUP-B15 cells after treated with rapamycin for 24 hours. HIF-1 α mRNA

* [基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合[2010]3152号); 高等学校特色专业建设点(教高函[2010]15号)

NA expression was up-regulated by 10 nmol/L, 100 nmol/L rapamycin and was down-regulated by 20 nmol/L, 50 nmol/L rapamycin at 48 h; There was a upregulated trend for HIF-1 α mRNA expression at 72 h at each concentration. Except for up-regulation of VEGF in SUP-B15 cells after treated by 10 nmol/L, 20 nmol/L rapamycin for 72 hours, rapamycin could down-regulated the VEGF mRNA expression in the other RAPA groups compared with control group. **Conclusions:** There is inhibitory effect of rapamycin on SUP-B15 cell growth in dose and time dependant manner. Rapamycin can down-regulate VEGF mRNA expression in SUP-B15 cells.

[**Key words**] rapamycin; hypoxia-inducible factor; vascular endothelial growth factor; leukemia, lymphocytic, acute

研究已证实急性白血病的骨髓微环境呈低氧状态^[1]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 组织在应对缺氧的过程中起重要的中枢纽带作用,在多种恶性肿瘤组织内表达升高,并与血管内皮生长因子(VEGF)表达相关,参与诱导肿瘤新生血管的形成^[2]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路与低氧调节密切相关,HIF-1 α 是该信号通路的下游靶点^[3,4]。雷帕霉素(rapamycin, RAPA)是 mTOR 的抑制因子,有研究显示 RAPA 对一些急性髓系白血病细胞株有较强的生长抑制作用^[5]。本研究以人淋巴系白血病细胞株 SUP-B15 为研究对象,观察 RAPA 作用对该细胞生长及 mTOR 信号通路下游基因 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达的影响,以探讨 RAPA 抗白血病可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

SUP-B15 细胞株购自美国 ATCC 细胞库;雷帕霉素(Rapamycin);RPAI-1640 培养基、IMDM 培养基,美国 Hyclone 公司;总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 实时荧光试剂盒,大连宝生物工程有限公司;特异性扩增引物由大连宝生物工程有限公司设计并合成,序列如下: GAPDH 上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGACAAC-3'; GAPDH 下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3'; HIF-1 α 上游引物:5'-TCTGGGTTGAACTCAAGCAACTG-3'; HIF-1 α 下游引物:5'-CAACCGGTTTAAGGACACATTCTG-3'; VEGF 上游引物:5'-GAGCCTTGCTGCTCTAC-3'; VEGF 下游引物:5'-CACCAGGCTCTCGATTGATG-3'。

1.2 主要仪器

CO₂ 细胞恒温培养箱(日本 SANYO 公司); DU640 核酸定量仪(美国 Beckman 公司);凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);CMIS-2011 医学图文分析系统(重庆天海医疗设备有限公司);Millipore 超纯水仪(美国 Millipore 公司);SANYO MLS-3020 高压灭菌器(日本 SANYO 公司);LightCycler[®] 480 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);低温冷冻离心机(美国 Sigma 公司);TE2000-U 型相差倒置显微镜(日本 Nikon);超净工作台(美国 Labconco 公司)。

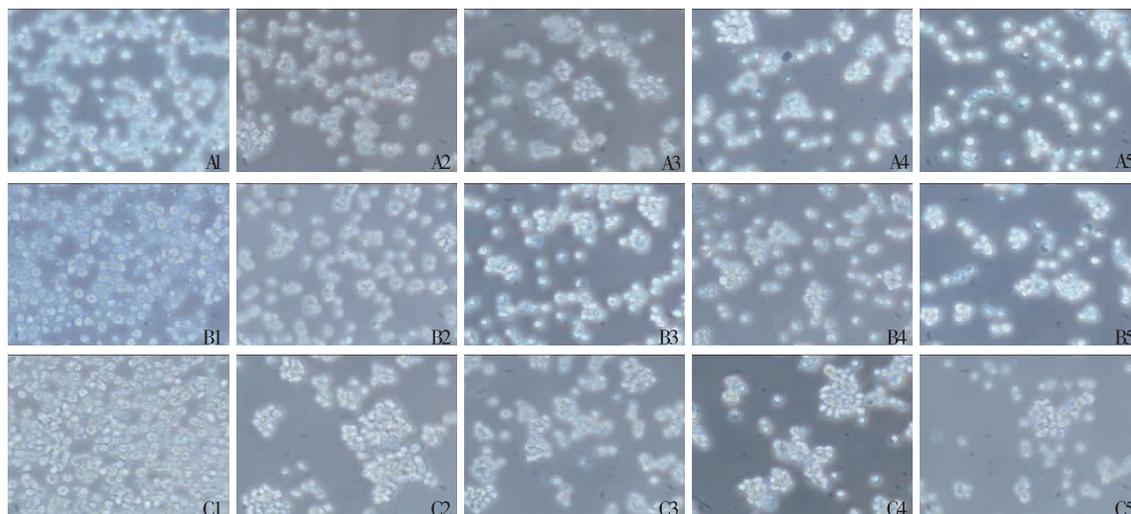
1.3 方法

1.3.1 细胞培养及形态观察 SUP-B15 细胞用添加 4 mmol/L L-谷氨酰胺、1.5 g/L 碳酸氢钠及 0.05 mmol/L β -巯基乙醇的 IMDM 培养,80% 胎牛血清,20% 完全培养液。10、20、50 及 100 nmol/L 雷帕霉素处理组细胞以相应终浓度 RAPA 的 IMDM 培养基培养,对照组细胞以相同体积的 IMDM 培养基培养,各组细胞置 5% CO₂、37 °C 培养 24 h、48 h、72 h 后收集细胞用于检测,倒置显微镜观察各实验组细胞生长。制备细胞涂片行瑞氏染色,镜下观察细胞形态。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 HIF-1 α 、VEGF、mTOR 基因的表达 Trizol 法提取细胞的总 RNA,紫外分光法检测 A260/A280,鉴定 RNA 样品的纯度和完整性后进一步用于逆转录 PCR。按照试剂盒说明冰浴上配制反转录反应液:混匀,将反应管放入 PCR 仪,设定反转录反应条件如下:37 °C 15 min,85 °C 5 sec。采用 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 实时荧光试剂盒进行荧光定量 PCR 反应。将处理组及对照组样品 cDNA 模板以每个检测点设 3 个平行反应管,按试剂盒说明在冰浴上配制 Real Time PCR 反应液;参照仪器说明及预实验设定荧光定量 PCR 仪反应参数:预变性 95 °C 30 sec;主循环 95 °C 5 sec,60 °C 20 sec(40 cycles)。

根据各反应管的靶基因 Ct 值 (Ct_{Target}) 和内参基因 Ct 值 (Ct_{GAPDH}), 采用比较 Ct 值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 计算靶基因的表达水平^[6]。采用 SPSS13.0 软件对基因表达水平进行统计学分析。

2 结果



注:A1~5: 24 h 观察 0(对照组)、10、20、50、100 nmol/L 雷帕霉素处理组;B1~5: 48 h 观察 0、10、20、50、100 nmol/L 雷帕霉素处理组;C1~5: 72 h 观察 0、10、20、50、100 nmol/L 雷帕霉素处理组

图 1 不同浓度雷帕霉素作用 24 h、48 h、72 h SUP-B15 细胞形态 (200 ×)

Fig. 1 Morphologic changes of SUP-B15 cells in control group and rapamycin at different concentration treatment group in 24 h, 48 h and 72 h

2.2 瑞氏染色形态观察

处理 72 h 后, 雷帕霉素处理组细胞较对照组细胞出现形态改变, 核呈疏松空网状, 胞浆空泡数量增多, 直至胞浆充满空泡 (图 2); 对照组细胞呈原始淋巴细胞形态, 呈圆形或椭圆形, 边缘整齐, 核染色质呈颗粒状, 胞浆无空泡变化。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达

不同浓度雷帕霉素作用 SUP-B15 细胞 24 h 后, 对 HIF-1 α 表达的调控不明显; 48 h 时, 10 nmol/L 和 100 nmol/L 雷帕霉素对 HIF-1 α 表达调控呈现上调趋势, 而 20 nmol/L、50 nmol/L 则下调 HIF-1 α 基因的表达; 72 h 时, RAPA 对 HIF-1 α 的表达均呈上调 (图 3)。

在雷帕霉素处理后, 除较低浓度 (10 nmol/L、20 nmol/L) 雷帕霉素处理 72 h 外, SUP-B15 细胞的 VEGF mRNA 表达均呈显著下调 ($P < 0.05$)。见图 4。

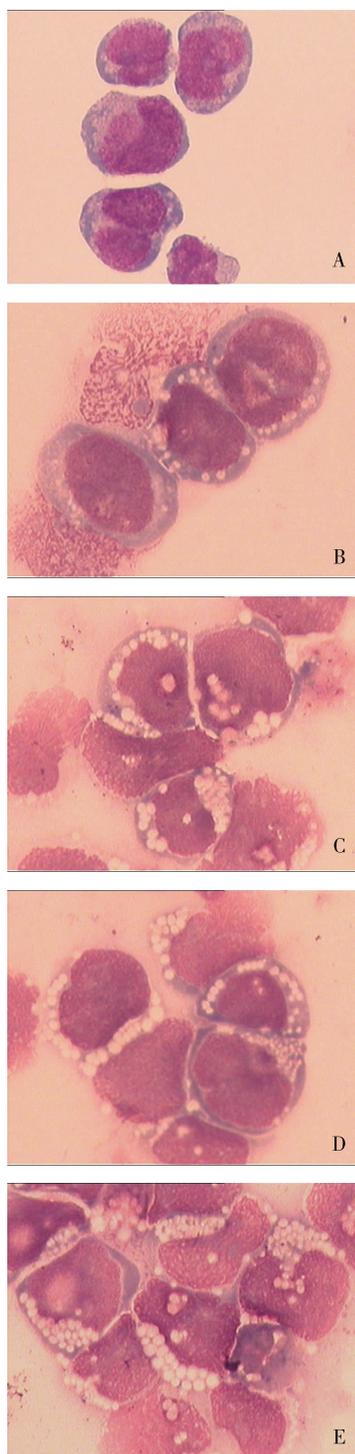
2.1 倒置显微镜细胞形态观察

对照组细胞生长状况良好, 胞体完整, 分布均匀, 随着时间的延长, 细胞数量增多。雷帕霉素处理组活细胞数量减少, 视野中出现一定比例的死亡细胞及细胞分裂出的胞质小体, 细胞出现抱团生长、胞膜出泡、破碎等现象, 上述变化程度随雷帕霉素浓度升高和作用时间增加而明显 (图 1)。

3 讨论

RAPA 是从吸水性链霉菌发酵液中提取出来的一种大环内酯类抗生素, 最初发现其有抗真菌作用, 后来发现其还具有免疫抑制作用, 1989 年开始用于器官移植后的抗免疫排斥反应。目前, RAPA 在造血系统恶性肿瘤中的抗肿瘤作用已被证实^[7]。RAPA 的类似物目前正在临床进行试验, 并被证实其可作为抗肿瘤药抑制 VEGF 等血管生成相关因子的表达^[8]。此外, RAPA 对多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增生异常综合征也能发挥抗肿瘤效应, 其对 T、B 来源的细胞抗增殖、抑制肿瘤细胞生长的作用得到初步的认可^[9]。

本研究结果显示, 雷帕霉素处理后 SUP-B15 活细胞数量减少, 细胞生长受抑制, 细胞出现抱团生长、胞膜出泡、细胞破碎等现象, 并随药物浓度升



注:A:对照组;B:10 nmol/L 雷帕霉素处理组;
C:20 nmol/L 雷帕霉素处理组;D:50 nmol/L
雷帕霉素处理组;E:100 nmol/L
雷帕霉素处理组

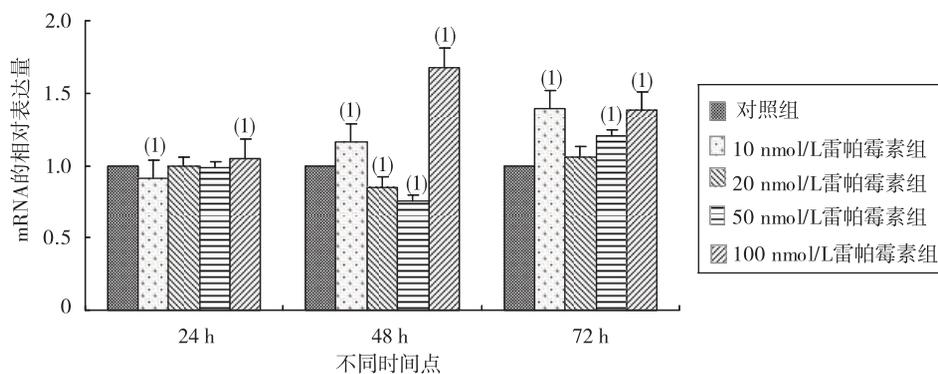
图2 不同处理组细胞瑞氏染色的结果(1 000 \times)

Fig.2 Results of Wright's staining of SUP-B15 cells in different treatment groups

高和作用时间增加变化明显,染色后光镜下观察可见细胞呈明显空泡化等改变,且细胞空泡数随 RAPA 浓度的增加而增多,表明 RAPA 处理可导致细胞发生显著形态改变,显示其具有较强的抑制细胞增殖作用。有研究表明,RAPA 对白血病细胞株 K562、HL60、CEM、SUP-B15 的敏感性不同,其中 RAPA (≤ 100 nmol/L) 对 K562、HL-60、CEM 的抑制作用均不明显,抑制率不超过 40%,并达到一个平台期^[10];而对 Ph 阳性的急性 B 淋巴细胞白血病细胞株 SUP-B15 表现出较高的敏感性。有研究报道 RAPA 对 Ph 阳性的急性淋巴细胞白血病患者表现出较高的敏感性^[11]。王伟等人^[12]研究发现,RAPA 可抑制 mTOR 通路激活并通过阻滞细胞周期发展,从而抑制人淋巴瘤细胞株 Raji 细胞的增殖。本研究中,RAPA 对 SUP-B15 细胞生长有明显抑制作用,并呈药物浓度及时间相关,与相关研究报道结果基本一致。

目前关于白血病发病机制的研究显示,大部分白血病细胞存在多条信号通路过度活化,如 PI3K/Akt/mTOR、JAK/STAT、RAS/MAPK/ERK、NF- κ B、Notch 等。其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路与白血病发病机制、治疗和耐药产生的研究已成为热点。根据已有研究报道,RAPA 在不同类型白血病细胞株的作用存在差异,这可能与不同细胞株中 mTOR 信号通路的活化程度有密切的关系。由 PI3K、Akt、mTOR 为主线的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在多种白血病中存在组成性激活,其过度活化已成为大部分急性髓系白血病(AML)原始细胞生存的必需条件,在 Ph(+) 的慢性粒细胞性白血病(CML)细胞、Ph(+) 的 B 淋巴细胞性白血病(B-ALL)细胞中均可呈 PI3K/Akt/mTOR 信号通路过度活化^[13-15]。

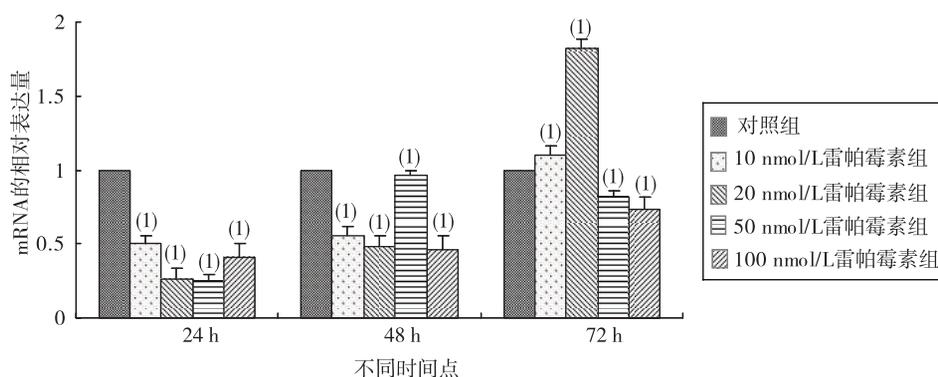
HIF-1 α 是 mTOR 信号通路的下游靶点,它是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体的一种转录因子,其表达水平对维持肿瘤细胞能量代谢、细胞增殖及肿瘤血管生成具有重要作用。VEGF 是一种特异的血管内皮细胞刺激因子,可与肿瘤血管内皮细胞的相应受体结合刺激肿瘤血管内皮细胞增生,增加血管的通透性,为肿瘤生长、浸润和转移提供适合的物质基础。在急性白血病的异常骨髓微环境中,存在 HIF-1 α 的表达异常,该异常表达进而引起 VEGF 异常、血管新生等造血微环境改变。RAPA 作为高度特异 mTOR 抑制剂,通过 mTOR 信号途径抑制 HIF-1 α 的表达。作为 VEGF 基因上游



⁽¹⁾与各时段对照组比较, $P < 0.05$

图3 雷帕霉素处理后 SUP-B15 细胞 HIF-1 α 的表达

Fig. 3 Expression of HIF - 1 α mRNA in SUP-B15 cells of different treatment groups



⁽¹⁾与各时段对照组比较, $P < 0.05$

图4 不同处理组 SUP-B15 细胞 VEGF 的表达

Fig. 4 Expression of VEGF mRNA in SUP-B15 cells in different treatment groups

的重要表达调控因子, HIF-1 α 能在基因水平上直接调控 VEGF 的表达, 可促进 VEGF 的转录、增加 VEGF mRNA 的稳定性, 从而促进肿瘤新生血管形成^[16]。该效应涉及 2 种途径发挥抗血管生成的作用, 即直接抑制受血清及 VEGF 刺激的血管内皮细胞的生长和抑制 HIF-1 α 以减少 VEGF 的产生、使内皮细胞对 VEGF 的反应减弱, 从而间接抑制血管生成。

为了解 RAPA 作用 SUP-B15 细胞后的变化与 mTOR/HIF-1 α /VEGF 信号传导通路的关系, 本研究进一步采用实时荧光定量 PCR 法对 HIF-1 α 及 VEGF 的 mRNA 表达进行分析, 结果显示, RAPA 处理细胞后, 与各时间段对照组比较, 早期 (24 h) 对 HIF-1 α 的转录水平的表达无明显影响; 处理后期 (72 h), RAPA 对 HIF-1 α 的表达均呈上调趋势。

作为高度特异的 mTOR 抑制因子, RAPA 具有

HIF-1 α 的间接抑制效应, 可抑制肿瘤细胞 HIF-1 α 的转录水平^[17]。但也有文献报道, 对于某些肿瘤, RAPA 对 HIF-1 α 的抑制只能在蛋白水平上^[18]。在本研究中, RAPA 对 HIF-1 α mRNA 的表达未呈现明显抑制作用, 这可能与 SUP-B15 细胞内复杂的 mTOR 信号通路调控有关, 推测 RAPA 对急性 B 淋巴系白血病细胞 HIF-1 α 的抑制作用不在转录水平上, 其对 HIF-1 α 的抑制作用是否在蛋白水平上还需进一步的实验研究证实。

本研究对 VEGF 基因表达分析的结果显示, RAPA 处理 SUP-B15 细胞后早期 (24 h)、中期 (48 h) 均可下调 VEGF 基因的表达, 以处理早期下调幅度明显, 后期 (72 h) 出现较低浓度 (10 nmol/L、20 nmol/L) 的 RAPA 对 VEGF 表达的小幅上调, 较高浓度 (50 nmol/L、100 nmol/L) RAPA 对 VEGF 的表达仍呈下调趋势。Guba M 等人^[19]的实验证实,

治疗剂量的 RAPA 能够减少带瘤小鼠或非带瘤小鼠血清标本中的 VEGF 的含量。本研究通过人急性 B 淋巴细胞白血病细胞株研究表明, RAPA 可在一定水平和时期下调 VEGF 的表达。此结果提示, 较高浓度的 RAPA 可能对 VEGF 在转录水平上的调控作用时间更持久。而后期出现的低、中浓度 RAPA 上调 VEGF 的情况, 考虑可能与培养后期细胞代谢产物堆积以及其它信号通路激活调控 HIF-1 α /VEGF 通路有关, 其机制有待进一步研究证实。

本研究通过观察 RAPA 对白血病细胞 SUP-B15 的增殖及 HIF-1 α 、VEGF 的表达的影响, 为阐明其作用机制及寻找新的白血病治疗策略提供了实验依据。

4 参考文献

- [1] Michael Andreeff, Martin Dietrich, Paul Corn, et al. The hypoxic microenvironment in acute myelogenous leukemia: critical role of CXCR4 in the induction of HIF-1 [J]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2007 (110): 1819 - 1820.
- [2] 黄滨滨, 修冰, 陆惠娜, 等. 白血病细胞株 K562 中 HIF1- α 的表达及其对下游基因的影响 [J]. 同济大学学报(医学版), 2010(2): 22 - 23.
- [3] 张丽红, 林凤茹. 雷帕霉素靶蛋白与白血病治疗 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2008(6): 469 - 470.
- [4] 王金, 孔佩艳. HIF-1 α 与急性白血病关系的研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2008(5): 414 - 416.
- [5] Vu C, Fruman DA. Clin Cancer Res. Target of Rapamycin Signaling in Leukemia and Lymphoma [J]. 2010 (22): 5374 - 5380.
- [6] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nat Protoc, 2008 (6): 1101 - 1108.
- [7] 唐帆, 唐圣松. 雷帕霉素及其衍生物的抗肿瘤活性研究进展 [J]. 2011(5): 47 - 51.
- [8] Aleffi S, Navari N, Delogu W, et al. Mammalian target of rapamycin mediates the angiogenic effects of leptin in human hepatic stellate cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011(301): G210 - G219.
- [9] 金丽娜. 雷帕霉素对恶性血液肿瘤细胞株抗肿瘤效应的研究 [D]. 苏州大学硕士学位论文, 2008.
- [10] 杨曦, 龚玉萍, 杨雷, 等. 雷帕霉素单药及联合硼替佐米、柔红霉素对白血病细胞株抗肿瘤效应的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2010(3): 201 - 203.
- [11] Hirase C, Maeda Y, Takai S, et al. Hypersensitivity of Ph-positive lymphoid cell lines to rapamycin: possible clinical application of mTOR inhibitor [J]. Leukemia Research, 2009(3): 450 - 459.
- [12] 王伟, 王志彬, 高玉环. 国产雷帕霉素对人淋巴瘤细胞 Raji 增殖的影响 [J]. 2012(2): 157 - 160.
- [13] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nat Protoc, 2008 (6): 1101 - 1108.
- [14] Park S, Chapuis N, Tamburini J, et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2010 (5): 819 - 828.
- [15] Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors [J]. Cancer Res, 2005 (65): 2047 - 2053.
- [16] 陆蕴松, 高忠礼, 刘光耀. 低氧诱导因子-1 对血管内皮生长因子的调控 [J]. 中国老年学杂志, 2009(7): 905 - 907.
- [17] 王金, 孔佩艳. HIF-1 α 与急性白血病关系的研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2008(5): 414 - 416.
- [18] 任传增, 许戈良, 英卫东. 雷帕霉素抑制肿瘤血管生成的研究进展 [J]. 国际外科学杂志, 2007(8): 547 - 549.
- [19] Guba M, Breitenbuch PV, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits Primary and metastatic tumor growth by anti-angiogenesis involvement of vascular endothelial growth factor [J]. Nature Medicine, 2002(4): 127 - 129.

(2012 - 05 - 09 收稿, 2012 - 07 - 09 修回)

编辑: 张丽君