

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0477-04

TNF- α 对白血病 K562 及 K562/ADM 细胞 *hTERT* 及 *mdr1* 表达的抑制作用

姜莉华*, 初晶学, 孙善会, 刘 洋, 黄 平(济南市中心医院 中心实验室, 济南 250013)

[摘 要] 目的: 观察 TNF- α 对人髓系白血病细胞 K562 及其耐药细胞 K562/ADM *hTERT* 基因表达、端粒酶活性的抑制以及对多药耐药(multidrug resistance-1, *mdr1*)基因表达的影响。方法: K562 及 K562/ADM 细胞传代培养, 加入 5×10^6 U/L 的 TNF- α 培养 24 h 进行诱导实验; MTT 法检测 K562 和 K562/ADM 细胞的增殖能力, 流式细胞术检测 K562 和 K562/ADM 细胞的凋亡, RT-PCR 检测 *hTERT* 和 *mdr1* mRNA 的表达, ELISA 法检测端粒酶活性。结果: TNF- α 诱导 K562 及 K562/ADM 细胞表现持续的生长抑制作用, 且具有时效关系($P < 0.05$); TNF- α 诱导 K562 及 K562/ADM 细胞的凋亡率增加($P < 0.05$), 而且耐药细胞 K562/ADM 凋亡的增加更明显($P < 0.01$); *hTERT* 基因与端粒酶活性的表达密切相关($r = 0.983$, $P < 0.05$), TNF- α 诱导后两者也同时下调($P < 0.01$); 多药耐药 *mdr1* 基因伴随着 *hTERT* 基因的下调而下调($r = 0.966$, $P < 0.05$)。结论: TNF- α 能诱导白血病 K562 及 K562/ADM 细胞系 *hTERT* 基因表达的抑制, 端粒酶活性下调的同时多药耐药基因 *mdr1* 的表达也下调。

[关键词] 人端粒酶逆转录酶; TNF- α ; 白血病

[中图分类号] R733.7; R730.5 [文献标志码] A

Inhibitory effect of TNF- α on expression of *hTERT* and *mdr1* gene in leukemic K562 and K562/ADM cell lines

JIANG Li-hua, CHU Jing-xue, SUN Shan-hui, LIU Yang, HUANG Ping (Department of Clinical Diagnosis, Ji'nan Central Hospital, Jinan 250013, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of TNF- α on *hTERT* gene expression in human myelogenous leukemia cell line K562 and K562/ADM and to study the influence of changed telomerase activity on expression of multidrug resistance-1(*mdr1*) gene. **Methods:** K562 and K562/ADM cells were treated with 5×10^6 U/L TNF- α for 24 h, then cell proliferation was detected by MTT assay and cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of *hTERT* and *mdr1* mRNA was detected by RT-PCR and the telomerase activity was detected by ELISA. **Results:** TNF- α inhibited the growth of K562 and K562/ADM cells and the inhibition showed a time-effect relationship ($P < 0.05$). TNF- α also significantly increased the apoptosis rates of K562 and K562/ADM cells ($P < 0.05$), with the increase in drug-resistant K562/ADM cells more significantly ($P < 0.01$). *hTERT* gene expression was correlated with telomerase activity (Pearson correlation coefficient $r = 0.983$, $P < 0.05$). TNF- α treatment decreased *hTERT* expression and telomerase activity. *Mdr1* gene expression decreased with the decrease of *hTERT* gene ($r = 0.966$, $P < 0.05$). **Conclusion:** TNF- α can inhibit the expression of *hTERT* gene in human K562 and K562/ADM cells; the down-regulation of telomerase activity is accompanied by the down-regulation of *mdr1* gene expression.

[Key words] human telomerase reverse transcriptase; tumor necrosis factor- α ; Leukemia

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 477-480]

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶激活过程中的重要限速酶,是细胞恶性变的重要步骤。细菌和超过 85 % 的恶性肿瘤细胞都表达端粒酶活性,而在大多数的人体细胞中其活性是被抑制的。hTERT mRNA 的表达仅限于肿瘤细胞,且其表达与端粒酶的活性平行。肿瘤细胞的持续增殖需要端粒酶维持其染色体的稳定性,需要端粒酶延长端粒长度以调控细胞增

殖^[1]。因此,利用 hTERT 作为抗原肽或显性失活 hTERT 对端粒酶的抑制可以使缩短的端粒不能延长,并诱发一系列肿瘤免疫反应,通过多种机制最终导致细胞生长停滞并凋亡。白血病(Leukemia)细

[作者简介] 姜莉华(1964-),女,山东沾化县人,本科,副主任检验师,主要从事免疫检验方面的研究

* Corresponding author. E-mail: jlh1964@163.com

胞尤其是其多药耐药细胞具有较高的端粒酶活性,可见端粒酶是白血病治疗非常好的靶点。本课题采用 TNF- α 诱导白血病细胞 K562 及其耐药细胞 K562/ADM 的 *hTERT* 基因下调,观察其对 K562 及 K562/ADM 细胞端粒酶活性、耐药基因 *mdrl* 及细胞体外增殖的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

MTT 购自 Sigma 公司, MMLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、RPMI 1640、TRIzol 试剂均购自 Gibco 公司。Telomerase PCR ELISA 试剂盒为 Roche 公司产品。Annexin V-FITC 试剂盒购自美国 Bender 公司。TNF- α 购自上海罗氏制药有限公司,原液活性浓度为 3×10^9 U/L。

1.2 人髓系白血病 K562 细胞株和 K562/ADM 耐药细胞株的培养

人髓系白血病 K562 细胞株和 K562/ADM 耐药细胞株由山东省医学科学院惠赠。细胞接种于含 15% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)中,置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。定期加入多柔比星(3 ~ 6 μ g/ml)以刺激 *mdrl* 持续高表达,无多柔比星培养液继续培养 1 周后用于实验。TNF- α 诱导试验活性浓度为 5×10^6 U/L。实验设复孔,重复 3 次。

1.3 MTT 法检测人髓系白血病 K562 和 K562/ADM 细胞的增殖能力

分别取 TNF- α 诱导前后的对数生长期 K562、K562/ADM 细胞,调整细胞密度为 2×10^5 /ml。将 100 μ l 细胞悬液加到 96 孔培养板中,每组各设 3 个平行孔。继续培养 1、2、3、4、5 d,测定前 4 h 加入 MTT 液,4 h 后加入溶解液,待结晶完全溶解后于全自动酶标仪上在波长 595 nm 处测定每孔光密度值(*D*)。以时间为横轴、*D* 为纵轴绘制生长曲线。

1.4 流式细胞术检测 TNF- α 诱导对 K562 和 K562/ADM 细胞凋亡的影响

分别收集 1×10^7 个 TNF- α 诱导前后的 K562 和 K562/ADM 细胞,以 4 °C 预冷的 0.01 mmol/L PBS 洗涤 2 次,悬浮于 250 μ l 结合缓冲液中,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。取 100 μ l 细胞悬液加入 5 μ l Annexin V/FITC 和 10 μ l PI,室温避光孵育 15 min。流式细胞术(BD FACSCalibur)分析。

1.5 RT-PCR 检测 TNF- α 诱导对 K562 和 K562/ADM 细胞 *hTERT* 及 *mdrl* mRNA 表达的影响

采用 Primer premier 5.0 软件设计 *hTERT* 和

mdrl 基因 PCR 引物,*hTERT* 上游引物:5'-TATG-GATCCTCGTCGAGCTGCTCAGGTCT-3',下游引物:5' -CGTGAATCGGTGCACATGAAGCGTAC-3',基因片段长度为 808 bp。*mdrl* 上游引物:5'-CCCACAT AATAGCAG-3',下游引物:5'-GTAACIT'CTTCCTGA-3',扩增片段 167 bp。 β -*actin* 上游引物:5'-CGCTCGCTGGTCGTCGACA-3',下游引物:5'-GT-CACGCACGATCCCGCAT-3',扩增片段 619 bp。分别收集 1×10^6 个 TNF- α 诱导前后的 K562 和 K562/ADM 细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA。20 μ l 反应体系中含 Oligo(dT) 0.5 μ g,10 mmol/L dNTP 1 μ l,RNA 3 μ g,DEPC 水补足容积,65 °C 5 min。加 $5 \times$ 缓冲液 4 μ l,0.1 mol/L DTT 2 μ l,RNase 抑制剂 50 U,37 °C 2 min。加逆转录酶 200 U,37 °C 50 min,70 °C 15 min 终止反应。扩增条件:94 °C 60 s,57 °C 50 s,72 °C 100 s,35 个循环。 β -*actin* PCR 循环 25 次。PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,300 nm 紫外光下摄影,凝胶成像系统扫描条带灰度,目的基因 mRNA 的相对强度以目的基因条带灰度值与内参照条带灰度比值来表示。

1.6 ELISA 法检测 TNF- α 诱导对 K562 和 K562/ADM 细胞端粒酶活性的影响

分别收集 TNF- α 诱导 72 h 后的 K562 和 K562/ADM 细胞 2×10^6 个,按试剂盒说明书提取细胞端粒酶上清。以 K562 细胞端粒酶上清为阳性对照,RNase 处理的 K562 细胞上清为阴性对照。取上述提取液 2 μ l,加反应混合液 25 μ l,补充灭菌 DEPC 水至 50 μ l,充分混匀,在 PCR 扩增仪上按要求进行 RT-PCR 扩增。取 5 μ l PCR 扩增产物,按试剂盒说明书操作步骤进行,在酶标仪上测定 450 nm 和 655 nm 处的 *D* 值,根据 $D = D_{450} - D_{655}$ 计算端粒酶活性。

1.7 统计学处理

SPSS 10.0 软件包对结果进行统计处理。多组比较采用双因素重复实验方差分析,两组比较采用独立样本 *t* 检验,相关检验采用 Spearman 分析。

2 结 果

2.1 TNF- α 诱导对 K562 和 K562/ADM 细胞凋亡的影响

TNF- α 诱导前后的 K562 细胞的凋亡率分别为 $(11.2 \pm 2.5)\%$ 和 $(17.2 \pm 2.3)\%$,TNF- α 诱导前后的 K562/ADM 细胞凋亡率分别为 $(21.7 \pm 1.8)\%$ 和 $(24.3 \pm 3.4)\%$,诱导前后比较均有明显差异($P < 0.05$)。结果提示 TNF- α 可以诱导白血病细胞发生凋亡,而且对耐药组影响更明显($P < 0.01$)。

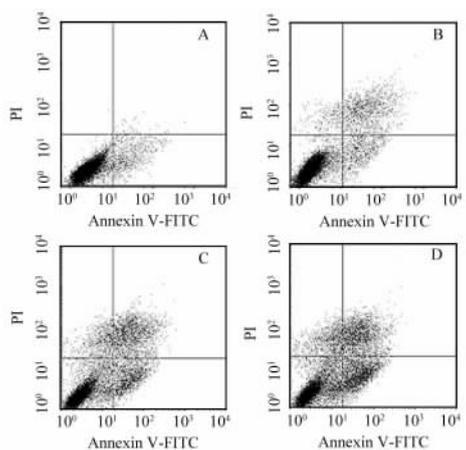


图1 流式细胞术检测 TNF- α 诱导前后 K562 和 K562/ADM 细胞的凋亡

Fig. 1 Apoptosis of K562 and K562/ADM cells before and after TNF- α treatment by flow cytometry

A: K562 cells by TNF- α pre-induction; B: K562 cells by TNF- α post-induction; C: K562/ADM cells by TNF- α pre-induction; D: K562/ADM cells by TNF- α post-induction

2.2 TNF- α 诱导对 K562 及 K562/ADM 细胞生长的抑制作用

TNF- α 诱导后的 K562 及 K562/ADM 细胞出现明显持续的生长抑制(图 2), 细胞生长速度明显减慢, 与空白对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着时间的延长 TNF- α 对细胞的生长抑制作用也显著增强, TNF- α 作用于 K562 及 K562/ADM 细胞 1、2、3、4、5 d 的生长抑制率分别为 9.87%、16.49%、35.37%、53.96%、70.85% 和 7.53%、13.20%、27.74%、40.19%、60.36%, 具有明显时效关系($P < 0.05$)。

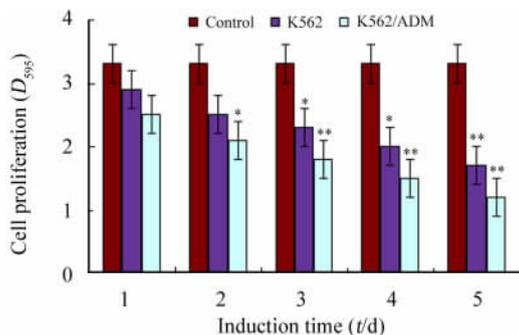


图2 MTT 法检测 TNF- α 对 K562 及 K562/ADM 细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Effect of TNF- α on K562 and K562/ADM cells proliferation detected by MTT

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control cells

2.3 TNF- α 诱导对 K562 及 K562/ADM 细胞 *hTERT* mRNA 表达的影响

TNF- α 作用于 K562 及 K562/ADM 细胞后, *hTERT* mRNA 表达水平明显下调, 表明 TNF- α 可以诱导白血病细胞的 *hTERT* 基因抑制, 从而使端粒酶活性下调(图 3, 表 1)。

2.4 TNF- α 诱导对 K562 及 K562/ADM 细胞 *hTERT*、*mdr1* 基因及端粒酶活性的影响

PCR 及 ELISA 法检测的结果(图 3, 表 1)显示, K562 及 K562/ADM 细胞的 *hTERT* 基因与端粒酶活性的表达密切相关($r = 0.983$, $P < 0.05$), TNF- α 诱导后两者也同时下调($P < 0.01$)。而且 *mdr1* 基因伴随着 *hTERT* 基因的下调而下调($r = 0.966$, $P < 0.05$), 与对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。

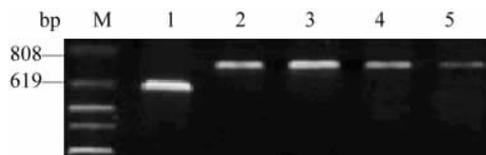


图3 RT-PCR 检测 K562 和 K562/ADM 细胞 *hTERT* mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of *hTERT* mRNA in K562 and K562/ADM cells detected by RT-PCR

M: Marker; 1: β -actin mRNA; 2: K562 cells by TNF- α pre-induction; 3: K562/ADM cells by TNF- α pre-induction; 4: K562 cells by TNF- α post-induction; 5: K562/ADM cells by TNF- α post-induction

表1 TNF- α 诱导对端粒酶活性、*hTERT* 和 *mdr1* mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of TNF- α induction on expressions of telomerase activity, *hTERT* mRNA and *mdr1* mRNA ($\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>hTERT</i> / β -actin	<i>mdr1</i> / β -actin	Telomerase activity
K562	0.509 \pm 0.117	0.238 \pm 0.022	0.312 \pm 0.034
K562 + TNF- α	0.231 \pm 0.020 **	0.104 \pm 0.013 **	0.149 \pm 0.018 **
K562/ADM	0.684 \pm 0.012	0.559 \pm 0.110	0.437 \pm 0.017
K562/ADM + TNF- α	0.362 \pm 0.015 **	0.204 \pm 0.070 **	0.269 \pm 0.051 **

** $P < 0.01$ vs K562 or K562/ADM group

3 讨论

TNF- α 是一种多功能的细胞因子。TNF- α 在许多转化细胞和正常细胞中都是一种强有力的细胞生

长抑制剂或细胞毒性物质^[1]。TNF- α 可以通过端粒酶依赖机制降低端粒酶的活性导致端粒损伤来诱导细胞衰老、凋亡,诱发抗肿瘤免疫反应^[2]。有研究^[3-4]表明,TNF- α 诱导的衰老中 hTERT 基因表达和活性的抑制与衰老具有时间相关性。本实验通过 TNF- α 作用于人髓系白血病细胞系 K562 及其耐药细胞系 K562/ADM,结果显示 hTERT 基因表达和活性明显受到 TNF- α 的抑制,端粒酶活性在耐药细胞明显高于非耐药细胞($P < 0.01$);实验还发现,K562/ADM 细胞的耐药基因 mdrl 与端粒酶活性呈相关性($P < 0.05$),端粒酶活性在髓系细胞系 K562,尤其是耐药细胞系 K562/ADM 持续高表达,说明端粒酶活性增高是白血病多药耐药^[5-6]的重要原因之一。这一研究结果为今后临床筛选白血病的治疗途径提供了重要实验依据。

端粒酶的高表达与急性白血病等恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[7],白血病细胞的端粒酶活性普遍高表达。因此,如何降低端粒酶的活性,是临床医生和免疫学者所面临的共同问题。随着免疫学和分子生物学的研究进展,端粒酶的靶点作用日趋明显。研究发现,hTERT 是端粒酶组分中真正具有调控端粒酶活性的亚单位,被称为端粒酶的限速酶^[8]。Takakura 等^[9]分析了人端粒酶 RNA(hTR)、端粒酶蛋白 1(TP1)mRNA、hTERT mRNA 的表达情况及它们与端粒酶活性之间的关系,结果显示 hTR mRNA、TP1 mRNA 在癌性和非癌性组织中均有表达,而 hTERT mRNA 仅见于宫颈癌组织及细胞系中,而正常宫颈组织及正常成纤维细胞中则无 hTERT mRNA 表达,hTERTmRNA 的表达水平与端粒酶的活性高度相关而 TP1 和 hTR 则不存在相关性,并证实上游调节对端粒酶活性表达起重要作用,抑制端粒酶活性可导致肿瘤细胞生长速度下降,细胞凋亡率增加。Dawel 等^[10]还发现 TNF- α 可下调 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Daudi 和 P3HR-1 以及髓性肿瘤细胞 U266 和 H9 细胞株 hTERT 表达水平和端粒酶活性,抑制细胞增殖。表明 TNF- α 在一定浓度范围内可能通过对 hTERT mRNA 的抑制而影响端粒酶的活性。端粒酶能以自身 RNA 为模板合成端粒的 DNA 重复序列,维持端粒长度的稳定,其表达与细胞衰老、凋亡以及机体的肿瘤免疫功能密切相关。本实验结果显示 TNF- α 可增强对 K562 细胞端粒酶活性的抑制,下调 hTERT mRNA 和耐药基因 mdrl,并产生某种肿瘤免疫反应,促使细胞凋亡。

有学者认为,TNF- α 在正常白细胞和白血病细胞中可以通过神经酰胺- JNK 通路下调端粒酶的活性,而这条通路的负性调控因子如蛋白激酶 C 活性增加和抗氧化防御系统对 AML 细胞拮抗 TNF- α 具有保护作用^[11]。因此,TNF- α 可以成为临床上拮抗白血病细胞端粒酶活性的有效治疗途径,并可通过作用后较长时间内继续诱导细胞免疫反应的促进剂,最终使白血病细胞自主衰老、凋亡。

[参考文献]

- [1] 卫立辛,吴孟超. 端粒酶:肿瘤治疗研究的新希望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006,13(5):325-328.
- [2] 陈元仲,吴勇,梁敏,等. P53 基因诱导白血病细胞凋亡的机制研究[J]. 中华血液学杂志,2003,24(12):640-643.
- [3] 孟秀香,苏本利,贾莉,等. 端粒酶反义 hTERT 的构建及其对 K562 细胞的作用[J]. 中华血液学杂志,2003,24(5):245-248.
- [4] Beyne-Rauzy O, Recher C, Dastugue N, et al. Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells[J]. Oncogene, 2004, 23(45):7507-7516.
- [5] 肖希斌,谢兆霞,秦群. MDR1 基因短发卡样 RNA 表达载体逆转 K562/A02 人白血病细胞多药耐药的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(6):422-425.
- [6] Garcia MG, Alaniz L, Lopes EC, et al. Inhibition of NF-kappa B activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines[J]. Leuk Res, 2005, 29(12):1425-1434.
- [7] Bellon M, Nicot C. Telomerase: a crucial player in HTLV-I-induced human T-cell leukemia[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2007, 4(1):21-25.
- [8] Dudognon C, Pendino F, Hillion J, et al. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance[J]. Oncogene, 2004, 23(45):7469-7474.
- [9] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(1):1558-1561.
- [10] Dawel Xu, Erickson S, Szeps M, et al. Interferon- α down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells[J]. Blood, 2000, 96(13):4313-4318.
- [11] Beyne-Rauzy O, Prade-Houdellier N, Demur C, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells[J]. Blood, 2005, 106(9):3200-3205.

[收稿日期] 2007-07-18

[修回日期] 2007-08-26

[本文编辑] 王莹