

[文章编号] 1000-2200(2009)01-0009-03

· 基础医学 ·

# bcl-2 和 bax 在三氧化二砷诱导 HL-60 细胞凋亡过程中的变化

高绪锋, 陈昌杰, 王东萍, 章尧

**[摘要]** 目的: 探讨 bcl-2 和 bax 在三氧化二砷(arsenic trioxide,  $As_2O_3$ ) 诱导 HL-60 细胞凋亡过程中的变化。方法:  $7.5 \mu\text{mol/L}$  的  $As_2O_3$  作用 HL-60 细胞 12、24 h, RT-PCR 和 Western-blot 分别检测 bcl-2 和 bax 基因 mRNA 表达及相应的蛋白表达变化。结果:  $7.5 \mu\text{mol/L}$  的  $As_2O_3$  作用 HL-60 细胞 12、24 h 后, bcl-2 mRNA 相对表达分别为  $(65.02 \pm 4.69)\%$ 、 $(40.70 \pm 3.94)\%$ , bax mRNA 相对表达分别为  $(46.71 \pm 4.26)\%$ 、 $(95.65 \pm 5.57)\%$ , Western-blot 检测 bcl-2 蛋白相对表达分别为  $(56.34 \pm 6.45)\%$ 、 $(42.01 \pm 3.01)\%$ , bax 蛋白质表达分别是  $(50.65 \pm 4.50)\%$ 、 $(66.78 \pm 5.05)\%$ , 对照组与实验组差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论:  $As_2O_3$  诱导 HL-60 细胞凋亡过程中, 下调 bcl-2 mRNA 和蛋白质表达, 同时上调 bax mRNA 和蛋白质表达, 可能是  $As_2O_3$  诱导细胞凋亡信号传导通路之一。

**[关键词]** 白血病, 髓母细胞性; 三氧化二砷; HL-60 细胞; bcl-2; bax; 细胞凋亡

**[中国图书资料分类法分类号]** R 733.71; O 612.5 **[文献标识码]** A

## Alteration of bcl-2 and bax expression in apoptosis of HL-60 cells induced by arsenic trioxide

GAO Xu-feng, CHEN Chang-jie, WANG Dong-ping, ZHANG Yao

(Research Center of Clinical Laboratory, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the alteration of bcl-2 and bax expression in apoptosis of HL-60 cells induced by  $As_2O_3$  (arsenic trioxide, ATO). **Methods:** HL-60 cells were treated with  $7.5 \mu\text{mol/L}$   $As_2O_3$  for 12 and 24 hours, the expressions of bcl-2 and bax mRNA were examined by semi-quantitative RT-PCR, and the activities of bcl-2 and bax protein were determined by Western blot. **Results:** Treated with  $7.5 \mu\text{mol/L}$   $As_2O_3$  for 12 and 24h, the relative expressions of bcl-2 mRNA in HL-60 cells were  $(65.02 \pm 4.69)\%$  and  $(40.70 \pm 3.94)\%$ , and the bax were  $(46.71 \pm 4.26)\%$  and  $(95.65 \pm 5.57)\%$ , respectively. Western blot indicated that the ratio of bcl-2 protein were  $(56.34 \pm 6.45)\%$  and  $(42.01 \pm 3.01)\%$ , and the bax were  $(50.65 \pm 4.50)\%$  and  $(66.78 \pm 5.05)\%$ , respectively. There was significant difference between control group and experience group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:**  $As_2O_3$  could down-regulate the expression of bcl-2 mRNA and protein, and the same time up-regulate the expression bax mRNA and protein in apoptosis of HL-60 cells. It may be one of signal transduction in apoptosis of HL-60 cells induced by  $As_2O_3$ .

**[Key words]** leukemia, myeloblastic; arsenic trioxide; HL-60 cells; bcl-2; bax; apoptosis

20 世纪 90 年代我国学者应用三氧化二砷(arsenic trioxide,  $As_2O_3$ ) 作为抗肿瘤药物治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)取得良好疗效。HL-60 细胞是急性早幼粒细胞白血病细胞株。已有学者<sup>[1-3]</sup>经体内外实验研究,证实  $As_2O_3$  能够明显抑制 HL-60 细胞的生长,低浓度可诱导 HL-60 细胞的部分分化,而高浓度时则可诱导其凋亡。 $As_2O_3$  抑制肿瘤细胞 HL-60 生长的主要机制是诱导其细胞的凋亡。细胞凋亡是有基因编码调控的细胞主动自杀过程,即程序性细胞死亡(programed cell death, PCD),它是机体在生长、发育和受到外来刺激时清除富余、衰老或受伤的细胞,以保持机体内环境平衡的一种自我调节机制。 $As_2O_3$

诱导 HL-60 细胞凋亡与两种基因有关:bcl-2 是抑制凋亡的基因,bax 是促进凋亡的基因,两者是一对正负凋亡调节基因,因此 bcl-2 和 bax 在细胞内的表达是决定 HL-60 细胞发生凋亡的重要因素。我们的研究是在  $As_2O_3$  的作用下,观察 bcl-2 和 bax 基因表达在 HL-60 细胞凋亡过程中的变化,探讨  $As_2O_3$  诱导 HL-60 细胞凋亡的机制,现作报道。

### 1 材料与方法

**1.1 主要仪器与试剂** PCR 扩增仪(日本 Astack 公司);水平、垂直电泳槽(美国 BIO-RAD 公司);电转移装置(美国 BIO-RAD 公司);DDY-11131C 稳流电泳仪(北京六一仪器公司)。 $As_2O_3$  (购自美国 Sigma 公司)用  $1 \text{ mol/L}$  的 NaOH 滴定至完全溶解,用  $1 \text{ mol/L}$  的 HCl 调整 pH 值为 7.2,然后加入三蒸水配制成浓度为  $1 \text{ mmol/L}$  的储存液,过滤除菌。使用前用 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度。HL-60 细胞为本室冻存,RT-PCR 试剂盒(MBI Fermentas 公司);Trizol 试剂(Invitrogen 公司);丙烯酰胺、N,N' 亚甲基丙烯酰胺、TEMED(华美公司);鼠抗 bcl-2、

[收稿日期] 2007-09-25

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2004kj278)

[作者单位] 蚌埠医学院 临床检验诊断学实验中心,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 高绪锋(1977-),硕士研究生。

[通讯作者] 章尧,研究生导师,教授。

bax 抗体(Santa Cruz 公司);羊抗鼠 IgG、 $\beta$ -actin 抗体(北京中杉金桥公司)。

1.2 细胞培养 HL-60 细胞接种于含 10% 灭活小牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养液中,置 37 °C,饱和湿度,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,1~2 天传代 1 次。所有实验操作均采用对数生长期的细胞。

### 1.3 RT-PCR 检测 bcl-2 和 bax mRNA 表达

1.3.1 总 RNA 抽提与 cDNA 链合成 用不含小牛血清的 RPMI 1640 培养液洗涤收集不同处理组的 HL-60 细胞 2 次,计数  $5 \times 10^6$  细胞,加入 Eppendorf 管,离心沉淀后加 Trizol 试剂 1 ml,按操作提取总 RNA,取 2  $\mu$ l 总 RNA 溶于 48  $\mu$ l 经 DEPC 处理的水中,用紫外分光光度计测定其 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值,检测其纯度和浓度,取约 2  $\mu$ g RNA,按逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA。

1.3.2 引物 bcl-2、bax、 $\beta$ -actin 和 GAPDH 引物由上海 Sangon 公司合成。序列及扩增长度见表 1。

表 1 引物、序列及扩增长度

引物	序列	扩增长度
bcl-2	上游:5'-CAGCTGCACCTGACGCCCTT-3'	231 bp
	下游:5'-GCCTCCGTTATCTCGGATCC-3'	
bax	上游:5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTG-3'	258 bp
	下游:5'-TGTCAGCCCATGATGGTTC-3'	
$\beta$ -actin	上游:5'-CCTCACCATGGATGATGATATC-3'	275 bp
	下游:5'-GCCAGATTTTCTCCATGTCGTC-3'	
GAPDH	上游:5'-CCGAAGCTGAAGCTCCGACTC-3'	375 bp
	下游:5'-AGCAGAGGGCGCAGAGATGAT-3'	

25  $\mu$ l 反应体系中含 10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ l, Mg<sup>2+</sup> 2  $\mu$ l, dNTPs 1  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, 上下游引物各 1  $\mu$ l (20 pmol/L), Taq 酶 1  $\mu$ l, bcl-2 反应条件:95 °C 3 min 预变性,95 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后 72 °C 终止平衡 10 min。bax 反应条件:95 °C 3 min 预变性,95 °C 45 s,58 °C 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后 72 °C 终止平衡 10 min。PCR 扩增产物分析:在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳结果 用 Smartview 凝胶成像系统扫描电泳条带,以特异性扩增产物条带灰度值(A)与  $\beta$ -actin(GAPDH)条带灰度值(A)之比做半定量,分析不同处理组、对照组的基因表达水平。

1.4 Western-blot 分别检测 bcl-2 和 bax 蛋白表达水平 收集不同处理的  $4 \times 10^6$  个 HL-60 细胞,用预冷的细胞蛋白裂解液(PMSF)裂解,按说明书操作提取总蛋白,取上清液 16  $\mu$ l,加 4  $\mu$ l 5  $\times$  上样缓冲液混匀煮沸 5 min 后上样,进行 SDS-PAGE(15% 浓缩液,5% 分离胶)电泳,电泳条件为 40 V,4 h。电转

移条件为 33 V 湿转 9 h,将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。丽春红 S 染膜、考马斯亮蓝染胶,通过与蛋白 Marker 比较,确定目的条带位置。5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,充分洗膜,辣根过氧化物酶标记二抗 37 °C 孵育 1 h,充分洗膜,ECL 显色。鼠抗 bcl-2、bax 抗体:1:200, $\beta$ -actin 工作浓度为 1:800,抗鼠 IgG 二抗工作浓度 1:2 000。结果经 Smartview 成像系统扫描条带,以目的条带灰度值(A)与  $\beta$ -actin 灰度值(A)之比作半定量,分析不同处理组、对照组的蛋白表达水平。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

2.1 RT-PCR 检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 HL-60 细胞 bcl-2 和 bax 基因 mRNA 表达的影响 HL-60 细胞 bcl-2 基因高表达,7.5  $\mu$ mol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于 HL-60 细胞 12、24 h 后,bcl-2 基因 mRNA 表达逐渐下降,与对照组差异有统计学意义( $P < 0.01$ );bax 基因 mRNA 在 HL-60 细胞也有表达,7.5  $\mu$ mol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于 HL-60 细胞 12、24 h 后,随着作用时间的延长,bax 表达逐渐增强,与对照组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(见图 1、2 和表 2)。

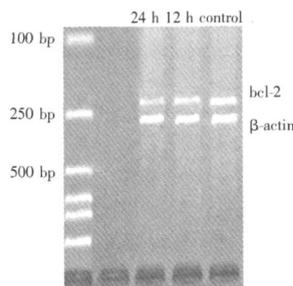


图 1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 bcl-2 mRNA 的影响

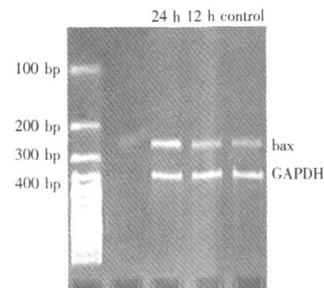


图 2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 bax mRNA 的影响

2.2 Western-blot 检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 HL-60 细胞 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响 7.5  $\mu$ mol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于 HL-60 细胞 12、24 h 后,bcl-2 蛋白表达逐渐下降,与对照组均有统计学意义( $P < 0.01$ );bax 蛋白表达逐

渐增加,与对照组差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见图 3、表 3)。

表 2  $As_2O_3$  作用时间对 HL-60 细胞 bcl-2 和 bax mRNA 表达的影响 ( $n_1 = 3; \bar{x} \pm s$ )

时间	bcl-2 mRNA/ $\beta$ -actin mRNA (%)	bax mRNA/GAPDH mRNA (%)
control	87.34 $\pm$ 6.91	32.15 $\pm$ 2.91
12 h	65.02 $\pm$ 4.69**	46.71 $\pm$ 4.26**
24 h	40.70 $\pm$ 3.94**	95.65 $\pm$ 5.57**
F	57.44	19.214
P	< 0.01	< 0.01
MS <sub>组内</sub>	28.423	86.394

q 检验:与对照组比较 \*\* $P < 0.01$

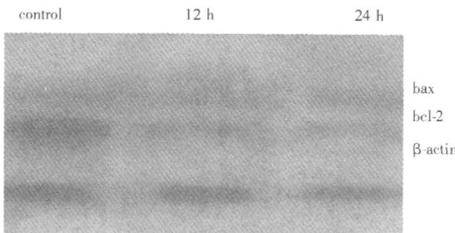


图 3 HL-60 细胞 bcl-2 和 bax Western-blot 结果

表 3  $As_2O_3$  作用时间对 HL-60 细胞 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响 ( $n_1 = 3; \bar{x} \pm s$ )

时间	bcl-2/ $\beta$ -actin (%)	bax/ $\beta$ -actin (%)
control	83.72 $\pm$ 8.14	37.77 $\pm$ 3.70
12 h	56.34 $\pm$ 6.45**	50.65 $\pm$ 4.50**
24 h	42.01 $\pm$ 3.01**	66.78 $\pm$ 5.05**
F	34.57	31.99
P	< 0.01	< 0.01
MS <sub>组内</sub>	38.974	19.814

q 检验:与对照组比较 \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

细胞凋亡是一个多基因参与的复杂的生命过程,以 bcl-2 家族在细胞凋亡中的作用备受人们关注,bcl-2 基因家族是哺乳动物细胞中调节凋亡的最重要调控基因之一,其家族成员具备双重功能,其中 bcl-2、bcl-xL 等蛋白抗凋亡,而 bax、bid 等蛋白促凋亡<sup>[4]</sup>。bcl-2 基因被发现是在淋巴瘤细胞第 18 号染色体断裂点 t(14,18)附近,其蛋白定位表达于线粒体膜上,bcl-2 基因家族中 bcl-2 是目前发现的抗凋亡作用最强的基因之一<sup>[5]</sup>,它在细胞凋亡过程中处于调控机制的终末部分,对肿瘤的发生、发展和治疗均有重要意义。研究证明<sup>[6]</sup>,bcl-2 基因蛋白表达可以抑制细胞凋亡,它的抗凋亡机制是因为 bcl-2 基因

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,从而发挥抗凋亡作用。

bax 基因在组织中广泛表达,当外界信号引起细胞凋亡时,bax 与线粒体膜相结合,两个 bax 蛋白相互聚合形成同二聚体,促进细胞凋亡。当 bcl-2 基因转录增强,蛋白含量升高时,bcl-2 与 bax 形成比 bcl-bax 更稳定的异二聚体,从而抑制 bax 促细胞凋亡的作用<sup>[7]</sup>。

本研究发现,经 7.5  $\mu$ mol/L  $As_2O_3$  处理 HL-60 细胞后,bcl-2 mRNA 和蛋白表达明显下调,而 bax 基因 mRNA 和蛋白的表达明显增加。这提示  $As_2O_3$  诱导 HL-60 细胞的凋亡下调 bcl-2 mRNA 和蛋白表达,上调 bax mRNA 和蛋白的表达,可能是通过激活线粒体凋亡的信号传导途径来诱导 HL-60 细胞的凋亡。在  $As_2O_3$  诱导其它细胞凋亡的实验中也类似发现,Kumagai 等<sup>[8]</sup>在研究中多次发现, $As_2O_3$  致 NB4 的凋亡与 bcl-2 及 bcl-x(L)下调有关。陆建萍等<sup>[9]</sup>研究也显示  $As_2O_3$  诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡时伴随 bax 表达上调和 bcl-2 表达下调。总之,目前对细胞凋亡机制的认识既没有一条通路可以概括,也存在许多矛盾之处,这种复杂的过程可能受多种信号的协同调控,可能在不同的细胞存在不同的机制。

在  $As_2O_3$  诱导 HL-60 细胞凋亡的过程中,bcl-2 基因功能的下调和 bax 基因的上调可能是重要的分子机制,但二者的结构变化及其之间的相互关系仍需进一步深入的研究。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Miller WH Jr. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells[J]. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 1): 14-19.
- [2] Sturlan S, Baumgartner M, Roth E, et al. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells[J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4990-4997.
- [3] 章尧,赵燕,陈昌杰. 三氧化二砷对 HL-60 细胞生长的影响[J]. *蚌埠医学院学报*, 2003, 28(2): 95-97.
- [4] Shore GC, Viallet J. Modulating the bcl-2 family of apoptosis suppressors for potential therapeutic benefit in cancer [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: 226-230.
- [5] 崔玉芳,杨红,高亚兵,等. 辐射诱发小鼠淋巴瘤细胞凋亡特征和意义的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2001, 21(3): 197-199.
- [6] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.
- [7] 陈伟,付小兵,王海滨,等. 增生性瘢痕中凋亡相关基因转录的变化[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(2): 235-237.
- [8] Kumagai T, Shih LY, Hughes SV, et al. 19-Nor-1, 25(OH)2D2 (a novel, noncalcemic vitamin D analogue), combined with arsenic trioxide, has potent antitumor activity against myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2488-2497.
- [9] 陆建萍,孙红,欧周罗. 三氧化二砷诱导卵巢癌细胞系 SKOV3 凋亡的实验研究[J]. *现代妇产科进展*, 2003, 12(2): 93-95.