

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00705

mbr-FPGS 高效表达质粒增强 Jurkat 细胞对甲氨蝶呤的敏感性

胡文佳¹, 孙玉洁^{1,2}

1. 南京医科大学细胞生物学系, 南京 210029;
2. 江苏省人类基因组重点实验室, 南京 210029

摘要: 叶酰多聚谷氨酸盐合成酶(Folypolyglutamate synthetase, FPGS)是将化疗药物甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)转化成甲氨蝶呤多聚谷氨酸盐(MTXPG)的关键酶, 其表达水平直接影响肿瘤细胞对 MTX 敏感性。与 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)相比, T 细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)细胞中 FPGS 表达水平低, 因此对 MTX 不敏感。本实验室前期研究证实, 位于 *BCL2* 基因 3'-UTR 区的一段长 279 bp 的 DNA 序列 mbr 具有显著的增强子效应。文章构建了含有 mbr 增强子样序列的 FPGS 表达质粒, 用其转染 Jurkat 细胞后, 分别以 Western blotting 和 MTT 法检测 FPGS 表达水平及 MTX 对肿瘤细胞的抑制率。结果表明 mbr 能够显著提高 FPGS 表达质粒的表达水平, 并有效增强 Jurkat 细胞对 MTX 的敏感性。这一结果为将基础研究结果应用于临床、提高 MTX 对 T-ALL 细胞的化疗疗效提供了新的思路。

关键词: FPGS 基因; mbr; 过表达; MTX 敏感性

The mbr-FPGS efficient expression plasmid enhances the sensitivity of Jurkat cells to methotrexate

HU Wen-Jia¹, SUN Yu-Jie^{1,2}

1. Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;
2. Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China

Abstract: Folypolyglutamate synthetase (FPGS) is the key enzyme that converts chemotherapy drug Methotrexate (MTX) into MTXPG. The expression level of FPGS directly influences MTX-sensitivity of tumor cells. Compared with B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL), T-cell acute lymphocytic leukemia (T-ALL) cells express a lower level of FPGS, which results in insensitivity of the cells to MTX. Our previous work has demonstrated that 279 bp mbr element located within the 3'-UTR of the *BCL2* gene possesses enhancer function. In this study, FPGS expression plasmid containing mbr element at the 5' upstream of the gene was constructed and transfected into Jurkat cells to sensitize the cells to MTX. Western blotting and MTT assay were applied to detect the FPGS expression level and suppression rate of the cells

收稿日期: 2012-01-08; 修回日期: 2012-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 90919051)资助

作者简介: 胡文佳, 硕士, 专业方向: 肿瘤分子生物学。Tel: 025-86862732; E-mail: lynn111@sohu.com

通讯作者: 孙玉洁, 教授, 博士生导师, 研究方向: 遗传学和肿瘤分子生物学。E-mail: yujiesun@njmu.edu.cn

treated by MTX, respectively. We found that the mbr enhanced the expression of FPGS significantly and increased sensitivity of Jurkat cells to MTX efficiently, while FPGS expression plasmid without mbr element had less effect. Our data provides a new clue for the clinical application of mbr regulatory element and may contribute to improvement of MTX treatment in T-ALL.

Keywords: FPGS; mbr element; overexpression; MTX-sensitivity

自 1948 年首次报道甲氨蝶呤前体——氨蝶呤可以用于治疗儿童急性白血病以来, 以此为基础的化疗方案开始广为应用。甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)作为叶酸合成拮抗剂, 目前已成为应用于白血病、淋巴瘤、头颈部肿瘤、骨肉瘤以及风湿关节炎最为广泛的一种抗代谢药物。研究表明 MTX 为叶酸同类药物, 主要借助于还原性叶酸载体(RFC)进入细胞, 进入细胞的 MTX 在叶酰多聚谷氨酸盐合成酶(FPGS)的作用下形成甲氨蝶呤多聚谷氨酸盐(MTXPG)。MTX 及 MTXPG 共同和二氢叶酸竞争与二氢叶酸还原酶(DHFR)结合, 从而使二氢叶酸不能被还原成四氢叶酸, 导致一碳单位形成减少, DNA、RNA 合成受限, 快速增生的肿瘤细胞因缺乏复制所需的原料而逐渐死亡^[1]。但是, 利用 MTX 在抑制白血病细胞 DNA 合成的同时也抑制了正常细胞 DNA 合成, 进而导致多种不良反应^[2]。MTX 的代谢产物 MTXPG 有 2~7 个不等谷酰胺链, 与 DHFR 结合能力较 MTX 更强, 而且 MTXPG 的抗代谢作用比 MTX 强, 在细胞内的停留时间比 MTX 长^[3], 抗肿瘤的作用也更强。因此, 决定 MTX 疗效和毒副作用大小的主要因素是细胞内 MTX 和 MTXPG 的浓度和停留时间。由于 T-ALL 细胞中 FPGS 的表达水平比 B-ALL 细胞要低, 细胞内 MTX 活性代谢产物 MTXPG 的量很低, 必须高剂量使用 MTX 来补偿^[4,5]。所以, 治疗急性淋巴细胞白血病(ALL)尤其 T 细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)通常使用大剂量 MTX, 而严重的毒副反应是制约疗效的关键因素。因此, 增强肿瘤细胞内的 FPGS 表达水平, 是提高肿瘤细胞对 MTX 的敏感性, 减少 MTX 对正常细胞的毒性的关键环节。

人 *BCL2* 基因的编码产物 BCL2 蛋白是调节细胞凋亡的关键因子^[6], 利用报告基因系统和基因定向打靶技术我们已证实, *BCL2* 基因的 3'端非翻译区(3'-UTR)的主要断裂点区(Major breakpoint region,

mbr)是一个正向调控元件, 可显著增强 BCL2 表达水平, 这一效应在人急性 T 淋巴细胞性白血病细胞(Jurkat)中尤为显著^[7,8], 显示 mbr 作为正向调控元件在 T 细胞性白血病细胞能够最大程度发挥其功能。

为了提高 MTX 对 T 细胞急性淋巴细胞白血病疗效, 降低毒副反应, 本研究利用 mbr 调控元件的增强子效应, 构建了 mbr-FPGS 高效表达载体, 以人急性 T 淋巴细胞性白血病细胞 Jurkat 为模型, 研究 mbr 介导的 FPGS 高表达对于提高白血病细胞对 MTX 敏感性的作用。该研究为临床抗肿瘤药物获得更好的疗效提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

Jurkat(人急性 T 淋巴细胞性白血病细胞株)和质粒 pEGFP-C1 由美国洛杉矶希望城国立医学中心的 Dr.Krontiris 实验室馈赠。

1.2 方法

1.2.1 mbr-FPGS 高效表达质粒的构建

用 Trizol 法从 Jurkat 细胞中提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒(ABI 公司)将总 RNA 逆转录为特异性 cDNA, 特异性逆转录引物 FPGS-reverse 的序列为 5'-GGCCAGGCAGCGCACACAAT-3'。特异性 cDNA 再经 PrimerSTAR HS DNA Polymerase(TaKaRa 公司)扩增得到目的 FPGS 片段, 利用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物, 引物序列如下:

FPGS-F: 5'-CCCAAGCTTCTATGTCGCGGGC
GCGGAGC-3',

FPGS-R: 5'-CCGGAATTCCTACTGGGACAGT
GCGGGCT-3'.

选取表达载体 pEGFP-C1 上多克隆位点中 *Hind*
、*EcoR* 两个酶切位点, 将 FPGS 片段克隆至

pEGFP-C1; 在 T4 连接酶(TaKaRa 公司)的作用下, 经试剂盒切胶纯化(Axygen 公司)的 FPGS 片段插入同样经双酶切的 pEGFP-C1 载体, 得到含有 FPGS 片段的 FPGS-pEGFP-C1 表达质粒。另外, 以 Jurkat 细胞基因组 DNA 为模板, 用 *Ase* -mbr 引物对 PCR 扩增 *BCL2* 基因 mbr 序列。其中, *Ase* -mbr 引物对序列包括:

Ase -mbr F : 5'-AGTTATATTAATCTTTAGAG TTGCTTTACGTGGC-3',

Ase -mbr R : 5'-AGTTATATTAATAGGATAG CAGCACAGGATTG-3'。

在 T4 连接酶的作用下, 将纯化后的目的片段用 *Ase* 酶切, 与同样经 *Ase* 酶切的 FPGS-pEGFP-C1 表达质粒连接, 构建 mbr-FPGS 高效表达质粒。载体结构如图 1 所示。重组质粒分别经酶切鉴定和菌液 PCR 鉴定, 菌液 PCR 鉴定引物序列如下:

mbr-identify-F : 5'-AGTTATATTAATCTTTAGAG GTTGCTTTACGTGGC-3',

mbr-identify-R : 5'-TATTGGCGTTACTATGGGA ACAT-3'。

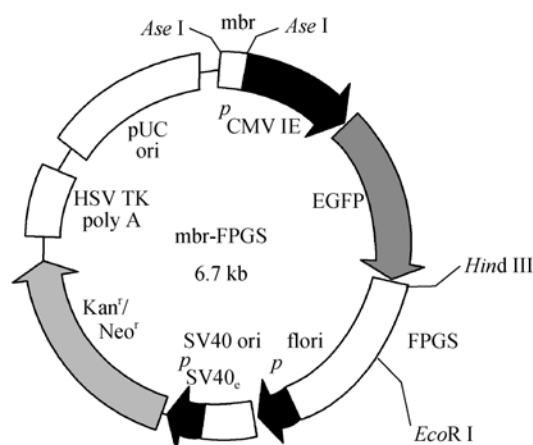


图 1 mbr-FPGS 高效表达质粒结构示意图。

1.2.2 细胞培养与基因转染

人白血病 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞培养于含有 10% 新生牛血清、10 mmol/L HEPES、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 培养密度为 0.2-1.0×10⁶ 个/mL。

采用电转方法分别将 mbr-FPGS 高效表达质粒、

FPGS-pEGFP-C1 质粒、pEGFP-C1 质粒转染 Jurkat 细胞, 具体操作步骤为: 将 1×10⁷ 个 Jurkat 细胞重悬于 350 μL 不含抗生素的培养液中; 加入 20 μg 质粒混匀, 在室温下静置 15 min; 将混合物转移至电转杯, 选择参数 250 V, 975 μF 进行电击; 电击后室温下静置 15 min, 转移至 8 mL 不含抗生素的培养液中, 37℃ 培养 48 h, 收获细胞。

1.2.3 Western blotting 检测 FPGS 蛋白表达水平

收获细胞, 用预冷的 PBS 洗一次, 加入预冷的裂解缓冲液裂解, 收集于离心管中, 置冰上进一步裂解 20 min 后, 收集蛋白上清液用 BIO-RAD 的蛋白定量检测试剂按照说明书的方法测定蛋白浓度, 加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸 5 min。按照蛋白浓度进行加样, 进行 10% 的 SDS-PAGE, 采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入滴度 1 : 300 的 FPGS 抗体 (SantaCruz Biotechnology 公司) 和滴度 1 : 4000 的 β-actin 单抗 (SigmaChemical 公司), 4℃ 摇床孵育过夜; 用抗兔或抗鼠二抗 (1:4000) 于室温孵育 1 h; 用 ECL 发光, 胶片显色, 分析结果。以 β-actin 为内参照。

1.2.4 MTT 法检测增殖情况

利用 MTT 法检测 MTX 半数抑制浓度 (IC₅₀), 方法为: 收集对数生长期的 Jurkat 细胞, 接种于 96 孔板。参照临床药物 MTX 血浆峰值浓度配制成 5 个药物浓度梯度, 浓度为: 2×10⁻⁶ mg/mL、1×10⁻⁵ mg/mL、5×10⁻⁵ mg/mL、2.5×10⁻⁴ mg/mL、1.25×10⁻³ mg/mL; 以含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液溶解。MTX 标准品 (江苏省食品药品检验所) 用 DMSO 配置为 100 mg/mL 溶液, 4℃ 避光保存。Jurkat 细胞每孔接种 10 000 个, 加入不同浓度的 MTX, 每个浓度设 3 个复孔, 培养 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h。加入 5 mg/mL MTT (Sigma 公司) 10 μL, 孵育 4 h 后加入 100 μL 三联溶液 (10% SDS, 5% 异丁醇, 0.012 mol/L HCl, 以蒸馏水溶解), 在全自动酶标仪上测定 570 nm 波长的吸光度值 (A)。应用 SPSS10.0 软件计算 IC₅₀。细胞存活率 = (试验孔 A 值 / 对照孔 A 值) × 100%。

1.2.5 统计学分析

SPSS10.0 统计软件进行分析处理, *P* < 0.05 具有

统计学意义。

2 结果与分析

2.1 mbr-FPGS 高效表达质粒的构建和鉴定

以 Jurkat 细胞特异性 cDNA 为模板, 用合成的一对引物作 PCR 扩增 FPGS 序列, PCR 扩增产物经琼脂糖电泳检测结果表明大小与预期值相符。在 T4 连接酶的作用下, 将该片段从 *Hind* 和 *EcoR* 两个酶切位点克隆到质粒载体 pEGFP-C1 中, 构成质粒 FPGS-pEGFP-C1。用内切酶 *Hind* 和 *EcoR* 对 FPGS-pEGFP-C1 进行双酶切鉴定, 阳性克隆切下约 1.7 kb 片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步证明克隆正确(图 2)。另外, 以 Jurkat 细胞基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *BCL2* 基因 mbr 序列, 在 T4 连接酶的作用下, 将纯化后的目的片段用 *Ase* 酶切, 与上述构建的 FPGS-pEGFP-C1 质粒连接, 构建出 mbr-FPGS 高效表达质粒。用菌液 PCR 初步验证 mbr 片段的正向插入, PCR 结果显示目标片段大小正确(图 3)。将得到的阳性菌株送华大基因公司测序, 证实克隆结果正确。

2.2 FPGS 蛋白表达水平分析

电转后 48 h 检测 Jurkat 细胞 FPGS 蛋白水平, 如图 4 所示, 3 组细胞都表达内源性 FPGS 蛋白, 转染

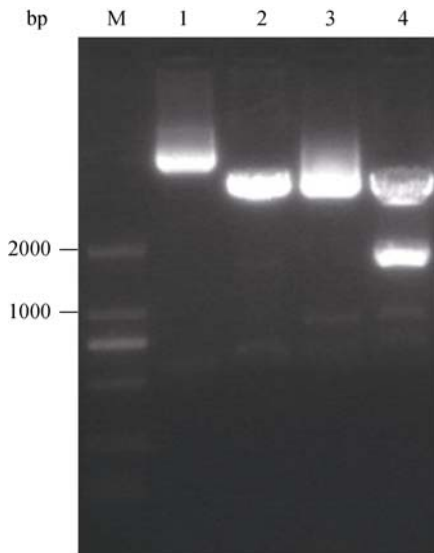


图 2 FPGS-pEGFP-C1 质粒 *Hind* /*EcoR* 双酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

M: DL2000 DNA marker; 1: pEGFP-C1 质粒未酶切; 2: pEGFP-C1 质粒双酶切; 3: FPGS-pEGFP-C1 质粒未酶切; 4: FPGS-pEGFP-C1 质粒双酶切。

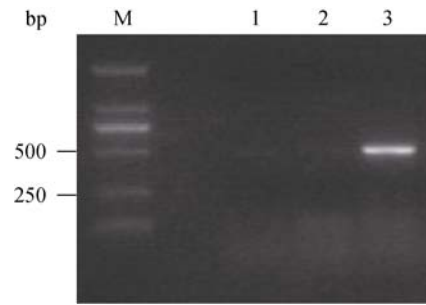


图 3 mbr-FPGS 高效表达质粒菌液 PCR 后琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

M: DL2000 DNA marker; 1: 阴性对照组; 2: mbr-FPGS 阴性克隆; 3: mbr-FPGS 阳性克隆。

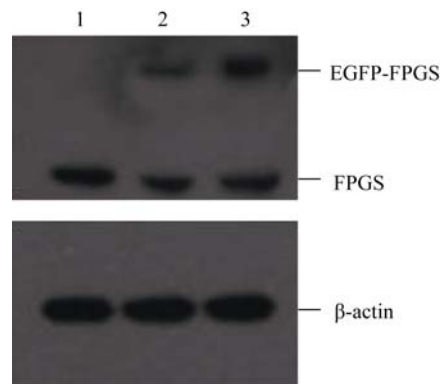


图 4 mbr-FPGS 高效表达质粒转染 Jurkat 细胞 Western blotting 分析结果

1: pEGFP-C1 质粒; 2: FPGS-pEGFP-C1 质粒; 3: mbr-FPGS 高效表达质粒。

FPGS-pEGFP-C1 质粒组及 mbr-FPGS 高效表达质粒组细胞能够表达外源性 EGFP-FPGS 融合蛋白, 但是, 转染了 mbr-FPGS 高效表达质粒细胞的 FPGS 表达水平显著高于 FPGS-pEGFP-C1 组 ($P < 0.05$), 显示 mbr 调控元件对 FPGS 表达载体的增强效应。

2.3 转染 mbr-FPGS 高效表达质粒显著提高细胞对 MTX 敏感性

用 MTT 法检测 MTX 对用不同质粒转染细胞的抑制率, 并绘制细胞增殖率浓度梯度曲线。如图 5 所示, 尽管转染了 mbr-FPGS 高效表达质粒及 FPGS-pEGFP-C1 质粒细胞对 MTX 的敏感性均显著提高, 但 mbr-FPGS 表达质粒作用下, 细胞抑制率比 FPGS-pEGFP-C1 对照质粒组明显提高。A、B、C 图分别为不同浓度 MTX 处理细胞 24 h、48 h、72 h 后 MTT 结果。当 MTX 浓度高于 1×10^{-5} mg/mL 时, 各浓度

下 MTX 对 Jurkat 细胞均有增殖抑制作用, 而低浓度 (2×10^{-6} mg/mL) MTX 处理对细胞出现促进增殖作用。接着, 我们选取了增殖率差异最明显的浓度 (1×10^{-5} mg/mL) MTX 处理细胞, 建立时间曲线。如图 6 所示, MTX 对 Jurkat 细胞的抑制作用呈时间依赖关系。mbr-FPGS 高效表达组细胞 IC₅₀ 值(72 h)为 2.63 ng/mL, 约是 pEGFP-C1 组细胞 IC₅₀ 值(19.01 ng/mL) 的 1/7 ($P < 0.05$)。这些观察结果表明, mbr 增强子可有效地提高表达载体表达 FPGS 的效率, 而 FPGS 的高效表达可显著增强白血病细胞对 MTX 的敏感性。

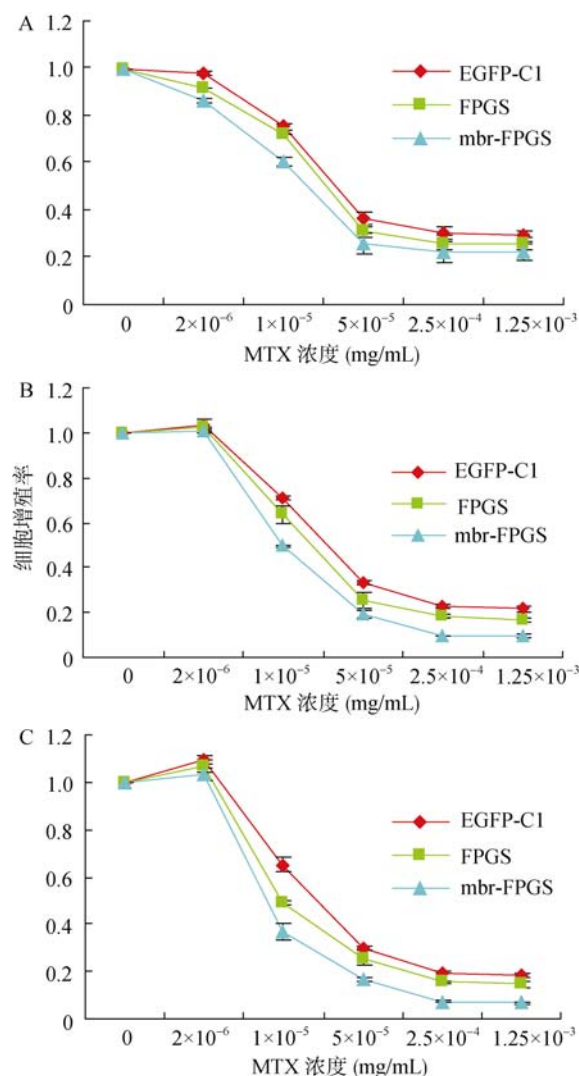


图 5 不同浓度的甲氨蝶呤对 Jurkat 细胞生长的抑制曲线
A: MTT 检测 MTX 处理 24 h 后细胞增殖率; B: MTT 检测 MTX 处理 48 h 后细胞增殖率; C: MTT 检测 MTX 处理 72 h 后细胞增殖率。

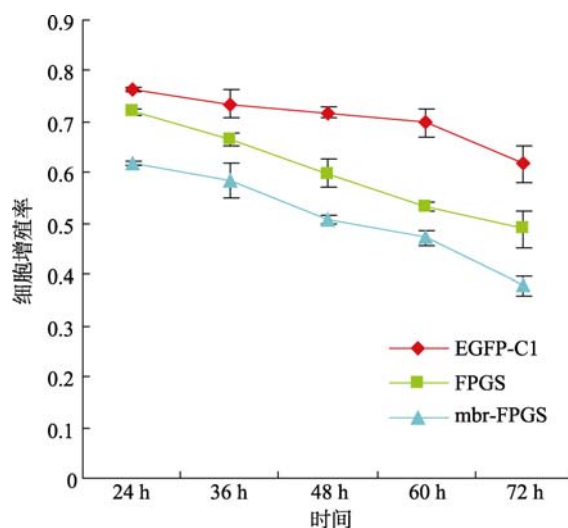


图 6 1×10^{-5} mg/mL 浓度的 MTX 处理细胞不同时间的细胞生长抑制曲线

3 讨论

MTX 是一种叶酸拮抗剂, 于 1956 年代替氨基蝶呤开始应用于临床, 从此它便成为 ALL 治疗方案中的一个重要药物。细胞内的 MTX 及其在 FPGS 作用下生成的 MTXPG 可以共同作用于叶酸代谢途径, 发挥细胞毒性功能。与 MTX 相比, MTXPG 在细胞内保留的时间更长, 并且能够更有效地竞争细胞内的某些叶酸辅因子, 从而使 DNA 合成、修复和细胞复制等生物合成途径受到抑制。因此, 细胞内蓄积的 MTXPG 浓度的高低是 MTX 发挥抗白血病作用的决定因素。Kager 等^[4]研究了叶酸代谢途径相关基因 mRNA 表达水平与 ALL 亚型之间的关系, 发现在 T-ALL 细胞中 FPGS 低水平表达。Synold 等^[5]对 101 例预后相对较差的儿童 T-ALL 和非超二倍体的 B-ALL 分别给予大剂量 MTX 和小剂量 MTX 方案治疗, 发现与 B-ALL 相比, T-ALL 细胞中 MTXPG 的蓄积浓度显著低于前者。所以 T-ALL 需要更大剂量的 MTX 才能得到有效治疗, 而高剂量药物化疗又伴随着更大的毒副反应。另有研究发现 MTX 耐药与 FPGS 表达降低有关^[9,10]。目前 MTX 的耐药机制研究集中在 3 方面: 多聚谷氨酸化的不足; 还原性载体转运能力的降低; 二氢叶酸还原酶(DHFR)、FPGS 等的活性变化及其基因扩增和突变^[11]。其中 FPGS 作为 MTX 代谢途径中的关键酶之一, 其表达水平是决定细胞

内MTXPG浓度的关键,直接与疗效相关。因此提高FPGS的表达水平,是增强MTX化疗敏感性的重要途径。

本研究首次构建并鉴定了含有增强子序列 mbr 的FPGS高效表达质粒,在后续实验中,用该质粒转染 Jurkat 细胞后经 Western blotting 验证 FPGS 表达水平得到明显提高。同时,MTT 实验也证实高表达FPGS 可显著增强肿瘤细胞对 MTX 的敏感性,并且该作用具有时间依赖性。其中 mbr-FPGS 高效表达质粒的转染导致 MTX 对肿瘤细胞的抑制作用要明显高于转染FPGS-pEGFP-C1对照质粒组,mbr-FPGS 高效表达组细胞 IC₅₀ 值(72 h)约是对照组细胞 IC₅₀ 值的 1/7。

我们的研究结果提示:(1)在T白血病细胞中,mbr可有效的发挥其增强下游基因表达的功效,利用mbr-FPGS表达质粒可在T白血病细胞中高效表达FPGS,这与我们前期研究中发现mbr的调控功能与SATB1 蛋白密切相关是一致的^[12];(2)利用mbr调控元件构建外源性FPGS高效表达载体,可有效增强T-ALL细胞对MTX的敏感性,为提高白血病的化疗疗效、降低毒副反应提供了新思路;(3)FPGS是一种与 5-Fu作用密切相关的蛋白,以往的研究证实,肿瘤细胞对 5-Fu的敏感性与FPGS的表达水平呈正相关^[12]。因此,mbr-FPGS高效表达质粒的应用可拓展到提高肿瘤细胞对化疗药物 5-Fu敏感性的研究。

综上所述,本研究为将基础研究结果应用于临床、提高 MTX 对 T-ALL 细胞的化疗疗效提供了新的思路。

参考文献(References):

- [1] 叶辉,顾龙君.大剂量甲氨蝶呤治疗急性淋巴细胞白血病的研究进展.中国血液学杂志,1999,20(2):110. DOI
- [2] 韩月芹,阵力军.氨甲蝶呤的副作用——粘膜炎发生与修复机制的研究进展.中国小儿血液,2003,8(5):231-236. DOI
- [3] Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D, Jolivet J. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem*, 1985, 260(17): 9720-9726. DOI
- [4] Kager L, Cheok M, Yang W, Zaza G, Cheng Q, Panetta JC, Pui CH, Downing JR, Relling MV, Evans WE. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest*, 2005, 115(1): 110-117. DOI
- [5] Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, Crist WM, Pui CH, and Evans WE. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation *in vivo* differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 1994, 94(5): 1996-2001. DOI
- [6] Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990, 348(6299): 334-336. DOI
- [7] Zhang J, Ma C, Han X, Durrin L K, Sun Y. The bcl-2 major breakpoint region (mbr) possesses transcriptional regulatory function. *Gene*, 2006, 379(S1): 127-131. DOI
- [8] Ma C, Zhang J, Durrin LK, Lv J, Zhu D, Han X, Sun Y. The BCL2 major breakpoint region (mbr) regulates gene expression. *Oncogene*, 2007, 26(18): 2649-2657. DOI
- [9] Leclerc GJ, York TA, Hsieh-Kinser T, Barredo JC. Molecular basis for decreased folypoly-gamma-glutamate synthetase expression in a methotrexate resistant CCRF-CEM mutant cell line. *Leuk Res*, 2007, 31(3): 293-299. DOI
- [10] Stark M, Wichman C, Avivi I, Assaraf YG. Aberrant splicing of folypolyglutamate synthetase as a novel mechanism of antifolate resistance in leukemia. *Blood*, 2009, 113(18): 4362-4369. DOI
- [11] 李道静,何晓东,孙余婕,凡任芝,许维东,孙利,张永娟,张白银,沈佐君.氨甲蝶呤对映体获得性耐药A549细胞株二氢叶酸还原酶基因表达分析.临床检验杂志,2011,29(3):219-221. DOI
- [12] Sohn KJ, Smirnakis F, Moskovitz DN, Novakovic P, Yates Z, Luccock M, Croxford R, Kim YI. Effects of folypolyglutamate synthetase modulation on chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Gut*, 2004, 53(12): 1825-1831. DOI