

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.008

CD44v6 对急性白血病细胞 HL-60 和 THP-1 增殖和迁移的影响 *

薛 丽 王志海 吕晓峰 孟建华 刘少博 李博文[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院 检验科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的: 探讨 CD44 变异亚型对急性白血病细胞增殖和迁移的影响。方法: 选择对数生长期的急性白血病细胞株 HL-60、THP-1 和慢性白血病细胞株 K562, 采用荧光定量 PCR 法检测 CD44v6mRNA 的表达。通过电转的方法转染 CD44v6siRNA 到 HL-60 和 THP-1 细胞抑制细胞的 CD44v6 表达, 通过 western 方法检测 CD44v6 蛋白的抑制情况。将实验分成 HL-60+N-siRNA、HL-60+ CD44V6-siRNA、THP-1+ N-siRNA、THP-1+ CD44V6-siRNA 共 4 组, 培养 24、48、72 h 后分别取细胞悬液用台盼蓝染色后计数活细胞数检测细胞的增殖情况; 使用 Transwell 小室培养法观察 HL-60 和 THP-1 细胞的迁移率。结果: 通过荧光定量 PCR 方法检测 THP-1 和 HL-60 细胞均高表达 CD44v6(分别为 0.0037 ± 0.0007 和 0.00292 ± 0.0002), 明显高于 K562 的表达 ($P < 0.01$); 转染后的 HL-60 和 THP-1 细胞株中 CD44v6 蛋白表达水平明显下调, 细胞计数结果显示转染 CD44v6-siRNA 的 HL-60 和 THP-1 细胞在 24、48 和 72 h 增殖均明显下降。迁移实验结果显示 THP-1+N-siRNA 和 HL-60+N-siRNA 细胞的迁移率为 17% 和 23%, 与相应对照组相比 THP-1+CD44v6-siRNA 和 HL60+ CD44v6-siRNA 组细胞 24 h 迁移率明显下降(分别降至 11% 和 14%)。结论: CD44v6 可以通过干预白血病细胞的增殖和迁移能力, 参与调解白血病细胞的增殖和髓外进展。

关键词: CD44v6; 迁移; 增殖; THP-1; HL-60

中图分类号: R-33; R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)19-3635-04

The Influence of CD44v6 on Proliferation and Migration in HL-60 and THP-1 Cells*

XUE Li, WANG Zhi-hai, LV Xiao-feng, MENG Jian-hua, LIU Shao-bo, LI Bo-wen[△]

(The Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Department of Clinical Laboratory, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of CD44v6 on proliferation and migration in HL-60 and THP-1 cells. **Methods:** The expression levels of CD44 in leukemia cell lines, when they were in logarithmic phase THP-1, HL-60 and K562 were assayed by qRT-PCR. CD44v6 siRNA was transfected into THP-1 and HL-60 cell lines by electransfection. And these cell lines were divided into control group (transfected with N-siRNA) and experimental group (transfected with siRNA-CD44V6). Western blot was used to measure the protein expression of CD44v6 in the experimental and the control groups. The proliferation and migration of cells were measured by cell count and the artificial matrix membrane. **Results:** The relative expression ratios of CD44 to GAPDH in THP-1 and HL-60 were 0.0037 ± 0.0007 and 0.00342 ± 0.0005 , respectively, which were significantly higher than that in K562 cell ($P < 0.01$). After THP-1 and HL-60 cells were transfected with siRNA-CD44v6 inhibit the protein expression of CD44v6. Compared with the control group, the experimental group had a significant decrease in proliferative capacity at 24, 48, 72 h. Migration assay showed that the transmembrane rates of THP-1+N-siRNA and HL-60+N-siRNA cells were 17% and 23% respectively, and decreased to 11% and 14% in HL60+CD44V6-siRNA and THP-1+ CD44V6-siRNA groups respectively. **Conclusion:** CD44V6 might play an important role in the migration and proliferation of leukemia cells and be involved in the extramedullary infiltration of leukemia cells.

Key words: CD44v6; Migration; Proliferation; THP-1; HL-60

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R733.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3635-04

前言

急性白血病是造血系统的恶性疾病,其特征是造血细胞增殖失控和分化障碍。近年来研究阐明了骨髓瘤的存在,使白血病细胞不被化疗药物所杀伤^[1]。粘附分子 CD44 及其受体是将干细胞固定在骨髓瘤的主要因素之一,减少粘附分子的表达会

使造血瘤中的细胞游离到外周提高化疗药物的作用^[2,3]。白血病干细胞伴随 CD44 变异亚型表达水平的上调,能够激活 PI3K-Akt 信号通路,增加细胞的粘附和增殖^[4]。粘附分子 CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白,作为透明质酸(HA)的受体,CD44 分子的表达与白细胞的粘附、血管发生、细胞增殖、分化、迁移及淋巴细胞的活化、归巢,以及免疫细胞在炎症部位迁移和凝

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531290)

作者简介:薛丽(1980-),博士,副主任医师,研究方向:血液系统疾病的机制研究,E-mail: 13904812026@163.com

[△] 通讯作者:李博文(1989-),硕士,住院医师,研究方向:血液系统疾病的分子标记物研究,E-mail: jylbw2013@163.com

(收稿日期:2019-02-23 接受日期:2019-03-18)

集有关^[56]。CD44有标准型CD44(CD44s)和变异型CD44(CD44v)之分。CD44s主要在间质和造血细胞中表达,CD44v主要分布于上皮源性细胞和肿瘤细胞。肿瘤转移扩散依赖于肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)之间以及肿瘤细胞和血管内皮细胞之间的相互作用^[78]。CD44v6是CD44v的一种变异亚型,在正常骨髓造血细胞低表达,在非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤等多种恶性血液病的肿瘤细胞中表达增高,与肿瘤的发展有关^[9,10]。最近研究显示人类B细胞白血病中CD44v6通过NF- κ B和MAP激酶信号途径促进肿瘤细胞增殖,并在肿瘤的浸润、转移和预后中起重要作用^[11]。本研究粘附分子CD44V6亚型对急性白血病细胞HL-60和THP-1增殖和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及抗体

HL-60、THP-1和K562细胞株系本实验室所藏,培养条

件:含10%的灭活胎牛血清的RPMI1640培养基(Gibco公司)、置37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱培养,隔日半量换液,存活细胞百分率(台盼蓝拒染法)>95%。CD44v6单克隆抗体(货号:ab78960)。CD44v6-siRNA及N-siRNA购于吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 通过电转染方式将CD44v6-siRNA和N-siRNA转染HL-60和THP-1细胞,设立HL-60+N-siRNA和THP-1+N-siRNA为对照组,HL60+siRNA-CD44V6和THP-1+siRNA-CD44V6为实验组,转染48小时进行后续实验。

1.2.2 荧光定量RT-PCR法检测HL-60和THP-1细胞CD44v6 mRNA的表达 收集各组细胞,提取总RNA,准确定量后合成cDNA,再采用SYBR Green进行定量PCR,总反应体系20 μ L,含2 $\times$ SYBR Green PCR Mix 10 μ L,上、下游引物各0.5 pmol,cDNA 2 μ L。荧光定量PCR结果采用相对定量法=2^{- $\Delta\Delta$ CT}分析。各基因引物见表1。

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 The primer of qRT-PCR

Primer	Sequence	Size
CD44V6	3' CTGAAGACATCTACCCAGCAAC	242bp
	5' TTGCCAAACCACTGTTCCTTC	
GAPDH	3'AACGGATTGTGTCGTATTGGG	220bp
	5'TGGAAGATGGTGATGGGATTTC	

1.2.3 western blot 检测CD44v6的蛋白表达情况 收集各组细胞,2000 r/min离心5 min,留取细胞沉淀并用PBS洗涤3次。弃上清加入RIPA裂解液充分裂解细胞,13000 r/min离心30 min,取上清,BCA法测蛋白浓度。取40 μ g变性样品上样,用10%的SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,使用转膜仪将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,分别加入CD44v6和GAPDH抗体,4度孵育过夜,TBST漂洗3次,每次10 min。孵育相应二抗室温1 h。最后用ECL化学发光试剂凝胶显影。条带用Image J软件进行分析。

1.2.4 抑制CD44v6表达对HL-60和THP-1细胞增殖的影响 取处于对数生长期的HL-60和THP-1细胞重悬于含10%的灭活胎牛血清的RPMI1640培养液中,分成HL-60、HL60+siRNA-CD44V6、THP-1、THP-1+siRNA-CD44V6共4组,分别种于12孔培养板,细胞浓度为1 $\times$ 10⁶·mL⁻¹。置37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱培养,培养24、48、72、96 h后分别取细胞悬液用台盼蓝染色后计数活细胞数。取3孔平均值,以时间为横坐标,活细胞数为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 抑制CD44v6表达对HL-60和THP-1细胞迁移的影响 Transwell实验检测各组细胞迁移能力,收集转染后的各组细胞,悬浮于无血清RPMI-1640培养液中。按1 $\times$ 10⁶个/室将细胞接种于Transwell上室,下室加入600 μ L完全培养基,于37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养24 h。收集下室细胞加入1 mL培养基重悬细胞,台盼蓝染色后计数活细胞数。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,定量资料以均值 $\pm$

标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,两样本均数比较采用t检验,多样本之间的比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 CD44v6在HL-60、THP-1和K562细胞株的表达情况

我们通过荧光定量PCR技术检测几种细胞株CD44v6的表达,发现在急性白血病细胞株THP-1和HL-60呈现高表达(分别为0.0037 $\pm$ 0.0007和0.00292 $\pm$ 0.0002),而在慢性白血病细胞株K562呈现低表达($P < 0.01$)。图1。

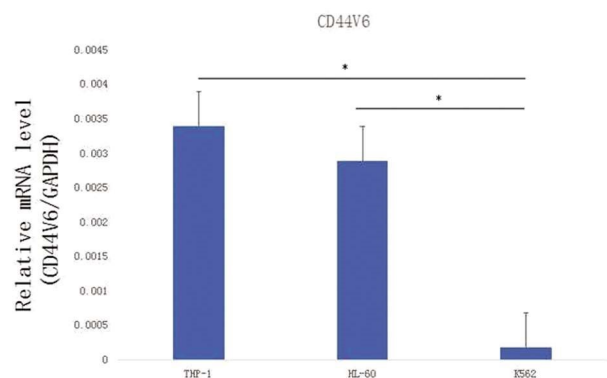


图1 三种白血病细胞株CD44v6的mRNA表达

Fig.1 The expression of CD44v6 in leukemia cell lines

* $P < 0.01$, compared with K562cell line

2.2 检测转染CD44v6-siRNA的HL-60和THP-1细胞的转染效率

使用 western blot 方法检测 HL-60 和 THP-1 细胞转染 CD44v6-siRNA 后细胞 CD44v6 蛋白的表达情况。图 2。转染

CD44v6-siRNA 的细胞 CD44v6 蛋白表达明显下降。

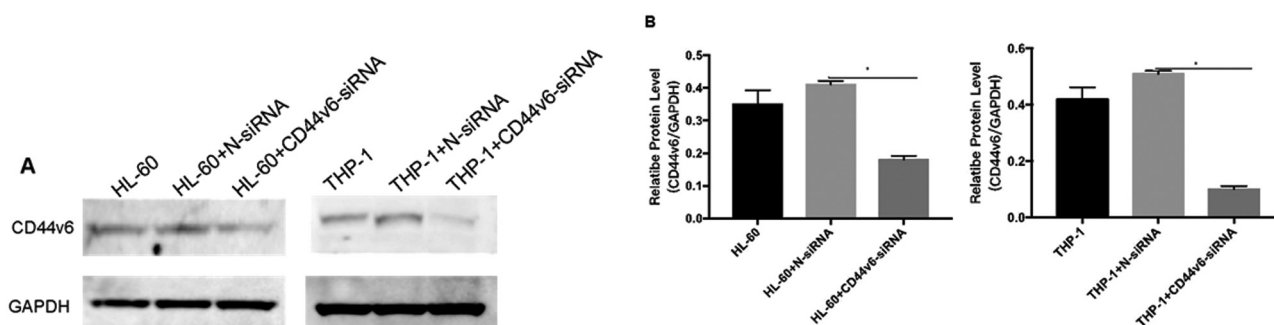


图 2 Western blot 技术检测细胞转染 CD44v6-siRNA 的转染效率

Fig.2 The expression of CD44v6 in different groups by Western blot

Note: * $P < 0.05$, compared with Control group.

2.3 抑制 HL-60 和 THP-1 细胞的 CD44v6 表达对细胞增殖的影响

计数 HL-60 和 THP-1 细胞转染前后 24、48、72 小时的细胞数,计算出各实验组细胞的增殖情况,结果显示抑制细胞 CD44v6 表达降低了细胞的增殖。图 3。

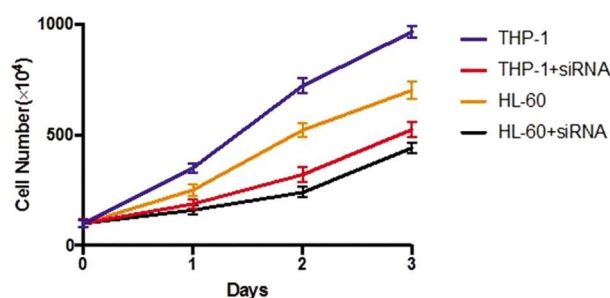


图 3 抑制 CD44v6 蛋白的表达对细胞增殖的影响

Fig.3 The influence of Proliferation in CD44v6 inhibited cell

2.4 抑制 HL-60 和 THP-1 细胞的 CD44v6 表达对细胞迁移的影响

通过使用 Tanswell 计数 24 小时穿过滤膜进入下室的细胞数,比较转染前后细胞的迁移情况,结果显示抑制细胞 CD44v6 表达降低了细胞的迁移。HL-60 细胞的 24 小时迁移率从 23% 降到了 14%,THP-1 细胞的 24 小时迁移率从 17%降到了 11%,差异有统计学意义 $P < 0.05$ (图 4)。

3 讨论

急性白血病细胞归巢到骨髓微环境,恶性克隆的肿瘤细胞持续增殖与疾病的发生发展密切相关。寻找新的抑制肿瘤细胞增殖和迁移的方法或增加白血病细胞对化疗药物的敏感性成为迫切需要研究的问题。近年来,已有研究显示 CD44V6 作为一种肿瘤转移促进蛋白与肿瘤细胞的恶性行为及不良预后相关^[12,13]。以往也有学者研究发现在急性白血病患者 CD44V6 变异亚型较 CD44V3、V6 变异亚型表达更强、更频繁,但尚未就其机制进行探讨^[14,15]。骨桥蛋白(Osteopontin,OPN)作为 CD44 的配体,特异性地识别 CD44V6,它参与了某些肿瘤细胞的侵袭、扩散和转移过程^[16,17]。在脾脏中 CD44v6 突变富集,可增强 CLL 的转移和增殖,同时 HA 结合增强。此外,研究人员在人类

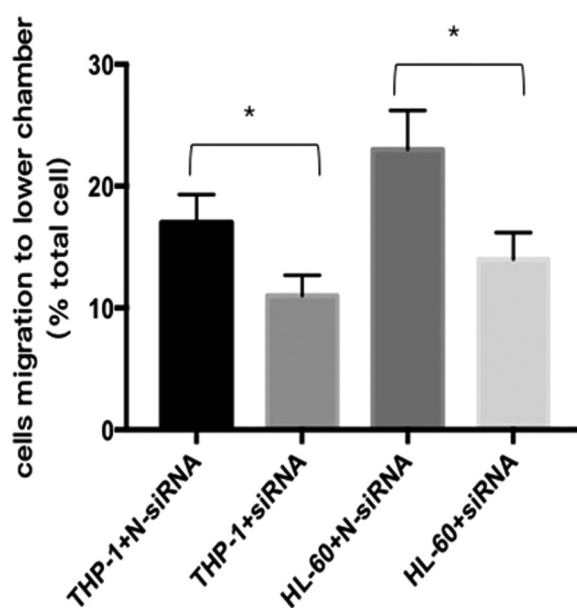


图 4 抑制 CD44v6 蛋白的表达对细胞迁移的影响

Fig.4 The influence of migration in CD44v6 inhibited cell

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$, compared with Control group.

疾病中对 CD44v6 诱导进行归纳概括,并利用体外抑制试验和染色体免疫组化试验,发现 MAP 激酶和 NF- κ B 信号参与 CD40 配体和 B 细胞受体激活。通过对 CD44v6-HA 涉及的下游信号进行研究发现 ERK 和 p53 激活。抗 -CD44v6 治疗可减少人类和小鼠体外的白血病细胞增殖^[11]。综上所述,CD44v6 在细胞的肿瘤细胞的存活和发生发展中起着重要作用。

在这项研究中我们检测了 CD44V6 变异亚型在急性白血病细胞株 THP-1 和 HL-60 中的表达及其对细胞迁移和增殖的影响。我们发现 THP-1 和 HL-60 细胞高表达 CD44V6,当我们通过 siRNA 沉默了 CD44V6 在细胞表面的表达时降低了肿瘤细胞的增殖和迁移。

白血病同其它血液系统肿瘤一样,具有迁移到骨髓微环境中恶性克隆增殖的特性。这些行为与肿瘤细胞表面黏附分子表达变化有关^[18,19],CD44v6 是 CD44 的一种变型体,也具有黏附分子的特性,可以引起肿瘤细胞与细胞外基质中多种结构蛋白

相互作用,肿瘤细胞随后发生位移,使其具备迁移的能力,因此CD44v6 蛋白可能参与肿瘤细胞的生长转移过程。已有研究表明,CD44v6 与大肠癌,胃癌等肿瘤的浸润转移有关^[20-22],我们研究也显示了 CD44v6 蛋白在急性白血病细胞株 THP-1 和 HL-60 中的高表达,而在慢性白血病细胞株 K562 中呈现低表达。转染后的 HL-60 和 THP-1 细胞株中 CD44v6 蛋白表达水平明显下调,转染了 CD44v6-siRNA 的 HL-60 和 THP-1 细胞在 24、48 和 72 h 增殖均明显下降。迁移实验结果显示与相应对照组相比 HL60+siRNA 和 THP-1+siRNA 组细胞 24 h 迁移率明显下降(分别降至 11%和 14%)。

我们的实验表明干预 CD44v6 表达抑制白血病细胞的增殖和迁移能力。那么能否通过抑制肿瘤细胞表面 CD44v6 表达协同促进化疗药物的治疗敏感性有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 王愿,高晓晗,郝洪岭. CD44 与抗白血病效应的研究进展 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2015, 42(3): 235-237
- [2] Kelly L, Mooney, Winward Choy, et al. The role of CD44 in glioblastoma multiforme[J]. Journal of Clinical Neuroscience, 2016, 34: 1-5
- [3] Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker [J]. Saudi Med J, 2015, 36(3): 273-279
- [4] Huang HF, Chen P, Lu R, et al. Regulation of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide on CD44v6 expression in NB4 cells [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2012, 20(1): 33-37
- [5] Misra S, Hascall VC, Markwald RR, et al. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer[J]. Front Immunol, 2015, 6: 201
- [6] Zoller M. CD44, hyaluronan. The hematopoietic stem cell, and leukemia-initiating cells[J]. Front Immunol, 2015, 6: 235
- [7] Tsuneki M, Madri JA. CD44 Influences Fibroblast Behaviors Via Modulation of Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions, Affecting Survival and Hippo Pathways[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(3): 731-743
- [8] Ghosh SC, NeslihanAlpay S, Klostergaard J. CD44: a validated target for improved delivery of cancer therapeutics[J]. Expert Opin Ther Target, 2012, 16: 635-650
- [9] Liebisch P, Eppinger S, Schopflin C, et al. CD44v6, a target for novel antibody treatment approaches, is frequently expressed in multiple myeloma and associated with deletion of chromosome arm 13q[J]. Haematologica, 2005, 90(4): 489-493
- [10] Saito S, Okabe H, Watanabe M, et al. CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. Oncology Reports, 2013, 29: 1570-1578
- [11] Gutjahr JC, Szenes E, Tschach L, et al. Microenvironment-induced CD44v6 promotes early disease progression in chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2018, 131(12): 1337-1349
- [12] Orian-Rousseau V, Ponta H. Perspectives of CD44 targeting therapies [J]. Arch Toxicol, 2015, 89: 3-14
- [13] Nilvebrant J, Kuku G, Bjorkelund H, et al. Selection and in vitro characterization of human CD44v6-binding antibody fragments [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2012, 59: 367-380
- [14] S Legras, U Guenther, R Stauder. A Strong Expression of CD44-6v Correlates With Shorter Survival of Patients With Acute Myeloid Leukemia[J]. Blood, 1998, 91(9): 3401-3413
- [15] Rupp U, Schoendorf-Holland E, Eichbaum M, et al. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study[J]. Anticancer Drugs, 2007, 18: 477-485
- [16] Pietras A, Katz AM, Ekstrom EJ, et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth[J]. Cell Stem Cell, 2014, 14: 357-369
- [17] Song Qingxiao, Wu Yong, Chen yuanzhong. The effect of CD44 antibody, HI44a, on proliferation and differentiation of acute myeloid leukemia cell line HL-60 in vitro [J]. Chin Pharmacol Bull, 2011, 27(3): 378-382
- [18] Zhang S, Wu CC, Fecteau JF, et al. Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: 6127-6132
- [19] Helena Porsch, Paraskevi Heldin. Knock-Down of CD44 Regulates Endothelial Cell Differentiation via NFκB-Mediated Chemokine Production Berit Olofsson[J]. PLOS ONE, 2014, 9(3): 1-12
- [20] 胡大为, 敖亚洲, 物景哲, 等. CD44v6、p27 表达与大肠癌临床病理学因素的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2009, 21: 597-599
- [21] Zhe Wang, Kun Zhao, Thilo Hackert, et al. CD44/CD44v6 a Reliable Companion in Cancer-Initiating Cell Maintenance and Tumor Progression [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2018, 6: 97-126
- [22] Amirghofran, Zahra, Asiaee, et al. CD44 and CD44v6 and prognosis in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology, 2016, 12(3): 375-382