

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.001

• 基础研究 •

HES4 抑制急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 Jurkat
对阿糖胞苷的敏感性*段永娟¹ 兰 洋¹ 易美慧¹ 毕 杨² 陈晓燕¹刘立鹏¹ 张傲利¹ 张陆阳¹ 宗苏玉¹ 郑佳睿³ 张英驰^{1Δ} 竺晓凡^{1Δ}

(1 中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液病临床研究中心, 天津 300020; 2 南开大学生命科学学院 天津 300071; 3 天津医科大学基础医学科学院 天津 300070)

摘要 目的: 研究 hes 家族 bHLH 转录因子 4 (HES4) 与急性 T 淋巴细胞白血病 (T-ALL) 细胞系 Jurkat 对化疗药物阿糖胞苷 (Ara-C) 的敏感性作用。**方法:** 构建 Lenti-pCDH-HES4-puro 质粒, 包装慢病毒感染 Jurkat 细胞, 感染空载体 Lenti-pCDH-puro 为对照组, puromycin 筛选阳性细胞, Realtime-PCR 检测转录水平 HES4 过表达情况, CCK8 法检测 Jurkat 对 Ara-C 敏感性, Ara-C 终浓度为 0.1、1、10、100、1000、10000 nmol·L⁻¹; 设计 3 对针对 HES4 的特异 sgRNA 序列, 构建 LentiGuide-sgRNA1-puro、LentiGuide-sgRNA2-puro、LentiGuide-sgRNA3-puro 质粒, LentiGuide-puro 空载体为对照组, 包装慢病毒感染 Jurkat 细胞, puromycin 筛选, 提取基因组 DNA, PCR 扩增 sgRNA 的靶序列, 一代测序检测 HES4 的敲除效率, CCK8 法检测敲除 HES4 后 Jurkat 对 Ara-C 敏感性, Ara-C 终浓度为 0.1、1、10、100、1000、10000 nmol·L⁻¹。**结果:** 与对照组相比, HES4 在 Jurkat 中过表达 (2.37 ± 0.09) 倍 ($P < 0.001$), 在 Ara-C 为 1 nmol·L⁻¹、100 nmol·L⁻¹ 浓度下, 过表达 HES4 使 Jurkat 对 Ara-C 的药物敏感性降低 (P 值分别小于 0.01、0.05); sgRNA1、sgRNA 2、sgRNA 3 敲除效率分别为 83、71、63, 其中 sgRNA1 的敲除效果最佳, 在 Ara-C 为 1000 nmol·L⁻¹ 浓度下, 敲除 HES4 促进 Jurkat 对 Ara-C 的敏感性 ($P < 0.05$), 3 条 sgRNAs 之间无明显区别 ($P > 0.05$)。**结论:** HES4 抑制 T-ALL 细胞系 Jurkat 对 Ara-C 的敏感性, 为 T-ALL 化疗耐受的机制研究提供指导。

关键词: HES4; 过表达; 敲除; Jurkat 细胞; Ara-C**中图分类号:** R-33; R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)11-2001-06

HES4 Inhibits Chemosensitivity of T-cell Line Jurkat to Cytarabine*

DUAN Yong-juan¹, LAN Yang¹, YI Mei-hui¹, BI Yang², CHEN Xiao-yan¹, LIU Li-peng¹,ZHANG Ao-li¹, ZHANG Lu-yang¹, ZONG Su-yu¹, ZHENG Jia-ru³, ZHANG Ying-chi^{1Δ}, ZHU Xiao-fan^{1Δ}

(1 State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin, 300020, China; 2 College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, 300071, China; 3 Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between hes family bHLH transcription factor 4 (HES4) and sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell line Jurkat to cytarabine (Ara-C), a chemotherapeutic drug. **Methods:** Lentiviral vector Lenti-pCDH-HES4-puro was constructed and packaged to infect Jurkat cells, and empty vector Lenti-pCDH-puro was used as control group. Puromycin was used to screen positive cells. Real-time PCR was used to detect HES4 overexpression. CCK8 method was used to detect Jurkat's sensitivity to Ara-C. The final concentration of Ara-C was 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 nmol·L⁻¹. Three pairs of specific sgRNA sequences targeting HES4 were designed to construct the recombinant plasmids LentiGuide-sgRNA1-puro, LentiGuide-sgRNA2-puro and LentiGuide-sgRNA3-puro, and LentiGuide-puro was used as control group. Then the packaging lentivirus infected Jurkat cells was screened by puromycin and genomic DNA was extracted. The target sequence of sgRNA was amplified by PCR, and then the knockout efficiency of HES4 was detected by DNA sequencing. The sensitivity of Jurkat to Ara-C was detected by CCK8 method. The final concentration of Ara-C was 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 nmol·L⁻¹. **Results:** Compared with the control group, HES4 overexpression in Jurkat was (2.37±0.09) times ($P < 0.001$). Overexpression of HES4 can inhibit Jurkat's drug sensitivity to Ara-C. When

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81770175)

作者简介: 段永娟 (1978-), 女, 硕士, 主管技师, 主要研究方向: 儿童白血病的发病机制研究,

电话: 13920678336, E-mail: duanyongjuan@ihcams.ac.cn

Δ 通讯作者: 张英驰, 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向: 儿童血液系统疾病的临床转化和精准干预研究,

E-mail: zhangyingchi@ihcams.ac.cn;

竺晓凡, 女, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 儿童白血病的诊断及治疗, E-mail: xfzhu@ihcams.ac.cn

(收稿日期: 2020-12-31 接受日期: 2021-01-23)

Ara-C was $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, overexpression of HES4 decreased the drug sensitivity of Jurkat to Ara-C ($P < 0.01$ and 0.05 , respectively); the knockout score of sgRNA1, sgRNA 2 and sgRNA 3 was 83, 71 and 63, respectively, and the knockout effect of sgRNA1 was the best. When Ara-C was $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HES4 knockout promoted the sensitivity of Jurkat to Ara-C ($P < 0.05$), but there was no significant difference among the three sgRNAs ($P > 0.05$). **Conclusions:** HES4 inhibits the sensitivity of Jurkat to Ara-C, which provides guidance for the study of the mechanism of chemotherapy tolerance in T-ALL.

Key words: HES4; Overexpression; Knockout; Jurkat cell; Ara-C

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2001-06

前言

HES4 (Hairy-Enhancer of Split 家族 bHLH 转录因子 4) 属于 bHLH 家族成员之一, 具有碱性螺旋-环-螺旋结构, bHLH 家族是细胞分化发育的关键调节因子^[1,2]。HES4 是 Notch 信号通路下游靶基因之一, Notch 信号通路是一条非常重要的信号通路, 参与神经干细胞、造血干细胞增殖分化^[3,4], 肿瘤形成等病理生理过程^[5], 其靶基因 HES4 参与视网膜光感受器发育^[6], 骨髓间充质干细胞分化, 促进骨质生成, 抑制脂肪生成^[7]。高表达 HES4 促进骨肉瘤细胞侵袭性^[8]。在造血细胞发育过程中, HES4 能够促进早期 T 细胞发育, 但不抑制 B 细胞的发育^[9]。在人类急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)中 Notch-hes 通路表现遗传失活^[10]。与 B-ALL 相比, 急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)常伴有高白细胞计数、纵隔包块和中枢神经系统侵犯等临床特征, 预后相对较差, 对化疗的耐受性较差^[11-13]。目前未有文献报道 HES4 与 T-ALL 细胞对化疗药物敏感性相关的研究, 本研究探讨急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 Jurkat 过表达 HES4、敲除 HES4 后, 细胞对化疗药物 Ara-C 的敏感性变化, 为 T-ALL 的耐药机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、青链霉素双抗、0.25%胰酶、Opti-MEM 培养基、PBS 均购自美国 Gibco 公司, FastDigest Bsm I 内切酶、FastAP 购自美国 Fermentas 公司, T4 PNK、Quick Ligase 购自美国 NEB 公司, 胎牛血清购自以色列 BI 公司, DH5 α 感受态细胞、TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix、SYBR Green 试剂均购自北京全式金生物技术有限公司, 琼脂糖购自西班牙 BOWEST 公司、LB 液体培养基、LB 固体培养基均购自索莱宝生物科技有限公司, 氨苄青霉素、ddH₂O 均购自美国 sigma 公司, PEI 转染试剂购自美国 Polysciences 公司, Trizol 试剂、二硫苏糖醇(DTT)均购自美国 invitrogen 公司, Lenti-pCDH-HES4-puro 质粒购自优宝生物科技有限公司, LentiGuide-puro 质粒、包装质粒 pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G 均购自 addgene 公司, 基因组 DNA 提取试剂盒购自北京擎科生物有限公司, Endo-free 质粒中提试剂盒细胞购自康为世纪科技有限公司, 胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。Polybrene 助转染试剂购自美国 merck 公司, KAPA-HiFi-HotStart-ReadyMix 购自美国 Roche 公司, CCK8 试剂购自碧云天生物技术有限公司。Ara-C 购自美国 Selleckchem 公司。引物、sgRNA 序列均由生工生物工程(上海)股份有限公

司合成。

1.1.2 仪器 CO₂ 培养箱、NanoDrop 1000 紫外-可见分光光度计均购自美国 Thermo 公司, TS-100 倒置显微镜购自日本 Nikon 公司, QuantStudio 6 Flex PCR 仪购自美国 ABI 公司, Synergy H4 酶标仪购自美国 BioTech 公司, JXN-26 高速离心机购自美国 Beckman Coulter 公司, Tanon 1600 凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.1.3 细胞株 Jurkat、Lenti-X 293T 细胞系均来自于中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)国家重点实验室细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞传代与培养 Jurkat 细胞用含 10% FBS、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基培养, 细胞密度保持在 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ - $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 2 - 3 天换液。Lenti-X 293T 细胞以 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 100 mm 培养皿, 培养基为 DMEM(含 10% FBS、1% 双抗), 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞生长密度为 80% 左右弃上清, PBS 洗一次, 0.25% 胰酶 37 °C 消化 1 min, 含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 中和胰酶, 300 × g 室温离心 5 min, 弃上清, 细胞按照 1 : 4 比例进行传代。

1.2.2 载体构建 载体构建参照张锋教授发表的文章进行操作^[14,15]。HES4 sgRNA 序列参照 <http://www.genome-engineering.org> 进行合成, LentiGuide-puro 信息参照 Zhang Lab GeCKO website : <http://www.genome-engineering.org/gecko/>, sgRNA1 序列为: oligo1 5'-CACCGCGGGCGGCCCGCTAGACCT-3', oligo2 5'-AAACAGGTCTACGCGGGCCGCCCGC-3'; sgRNA2 序列为: oligo1 5'-CACCGGAGCTCCCGCCACTCGAAGC-3', oligo2 5'-AAACGCTTCGAGTGCGGGGAGCTCC-3'; sgRNA3 序列为: oligo1 5'-CACCGCCGTCACCTGCACGCGACGC-3', oligo2 5'-AAACGCGTCGCGTGACAGGTGACGGC-3'。将 Oligos 磷酸化及退火: Oligo 1(100 μM)1 μL , Oligo 2(100 μM)1 μL , 10 × T4 Ligation Buffer 1 μL , 6.5 μL ddH₂O, 0.5 μL T4 PNK, 总共 10 μL 反应体系, 37 °C 孵育 30 min, 95 °C 孵育 5 min, 然后以 5 °C · min⁻¹ 的速度降至 25 °C, 形成黏性末端的双链 oligos。将退火的 oligos 用 ddH₂O 稀释 200 倍。LentiGuide-puro 质粒线性化、去磷酸化: 取 5 μg LentiGuide-puro 质粒, 加 3 μL FastDigest Bsm I 内切酶、3 μL FastAP, 6 μL 10 × FastDigest Buffer, 0.6 μL 100 mmol · L⁻¹ DTT, 加 ddH₂O 补至 60 μL , 37 °C 孵育 30 min。胶回收: 将酶切产物进行 1% 琼脂糖电泳, 120 v 电压条件下电泳 30 min, 紫外分光光度计下将线性化的质粒条带切下, 胶回收试剂盒进行回收。连接反应: 50 ng Bsm I 消化的质粒片段, 稀释后的 oligo 双链 1 μL , 2 × Quick Ligase Buffer 5 μL , Quick

Ligase 1 μL , ddH₂O 补至 11 μL , 室温连接反应 10 min。将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 培养皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 挑取单个菌落接种于含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的液体 LB 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 12 h, 收集菌液提取质粒送测序鉴定。

1.2.3 病毒包装、感染细胞、puro 筛选 病毒包装前一天将 Lenti-X 293T 细胞 1:2 传代接种于 100 mm 培养皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养过夜。包装质粒 pRRE 2 μg 、pRSV-Rev 2 μg 、pMD2.G 4 μg 、目的质粒 6 μg 与 2.5 mL Opti-MEM 充分混匀, 1 $\times$ PEI 转染试剂 42 μL 与 2.5 mL Opti-MEM 充分混匀, 室温静置 5 min, 将含有 4 质粒的 Opti-MEM 与含有 PEI 的 Opti-MEM 混合, 充分混匀, 形成转染复合物, 室温静置 20 min。Lenti-X 293T 细胞弃培养基, 加入上述混合物, 再加 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 6-8 h 弃培养基, 加 15 mL 含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 48 h, 收集上清, 加 5 mL 含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 继续培养至 72 h, 收集上清。病毒上清 4000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 去除细胞碎片, 0.45 μm 针头滤器过滤上清, 病毒上清 48000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2.5 h 进行浓缩, 弃上清留病毒沉淀, 加 200 μL DMEM 重悬, 10000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 去除细胞碎片, 吸取病毒上清, 分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。细胞感染: 将 5 $\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ Jurkat 细胞共 4 mL 接种于 60 mm 培养皿, 加 polybrene 助转染试剂(终浓度 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 室温放置 15 min, 加浓缩病毒悬液 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养过夜, 换新鲜含 10% FBS、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基继续培养 48 h, puro(终浓度 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 筛选 72 h。

1.2.4 基因组 DNA 的提取 收集 puro 筛选后的细胞 1 $\times 10^6$, 300 $\times g$ 室温离心 10 min, 弃上清, 加 200 μL ddH₂O 混匀, 加 20 μL 蛋白酶 K, 涡旋振荡 10 s, 加 200 μL Buffer g1 涡旋振荡 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 期间震荡 3-5 次, 加 200 μL 无水乙醇涡旋振荡混匀, 转移入 Spin column 吸附柱中, 12000 $\times g$ 离心 1 min, 弃滤液, 加 500 μL Buffer PW, 12000 $\times g$ 离心 1 min, 弃滤液, 重复洗一次, 加 500 μL Wash Buffer, 12000 $\times g$ 离心 30 s, 再次 12000 $\times g$ 离心 2 min, 将吸附柱置于干净收集管中, 室温干燥 5 min, 加 50 μL EB 洗脱基因组 DNA, NanoDrop-1000 分光光度计检测 DNA 浓度, OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 比值 1.8-2.0 为合格。

1.2.5 RT-PCR 收集 1 $\times 10^6$ 细胞, 300 $\times g$ 室温离心 10 min, 弃上清, 加 1 mL Trizol 充分裂解细胞, 加 200 μL 三氯甲烷, 上下剧烈震荡混匀, 室温静置 3 min, 12000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 吸取水相层, 加 500 μL 异丙醇, 颠倒混匀 6-8 次, 室温静置 10 min, 12000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 弃上清, 加 75% 乙醇颠倒混匀, 7500 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃尽上清, RNA 团块室温干燥至乙醇完全挥发, 加 50 μL ddH₂O 溶解 RNA, NanoDrop-1000 分光光度计检测 RNA 浓度, OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 比值 1.8-2.0 为合格。逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 反应体系及反应条件: RNA 1 μg , oligo (dT) 1 μL , ddH₂O 补充至 9 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 迅速置于冰上 2 min, 加 2 $\times$ buffer 10 μL , RNA 聚合酶 1 μL , 45 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, ddH₂O 将 cDNA 5 倍稀释, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。Realtime-PCR 反应体系及条件: cDNA 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μL , 2 $\times$ SYBR Green 10 μL , ddH₂O

补至 20 μL ; 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 40 cycles, 升/降温速度 1.6 $^{\circ}\text{C/s}$; 溶解曲线反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 降温速度 1.6 $^{\circ}\text{C/s}$, 升温速度 0.05 $^{\circ}\text{C/s}$ 。以 GAPDH 为内参, 结果以公式 $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$ 计算基因相对表达量。引物序列: GAPDH 上游引物序列 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3', 下游引物序列 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'; HES4 上游引物序列 5'-GAGCGCGTATTAACGAGAGC-3', 下游引物序列 5'-CG-GTACTTGCCCAAGACG-3'。

1.2.6 sgRNA 敲除效率检测 提取感染 LentiGuide-HES4-sgRNAs 的 Jurkat 细胞以及感染空载体细胞基因组 DNA, PCR 扩增含有 sgRNA 靶点的 HES4 序列, HES4 序列扩增上游引物序列: 5'-GAGCGCGTATTAACGAGAGC-3', 下游引物序列: 5'-TCTGCTACAGTCTCGGCAAA-3'。反应体系: 基因组 DNA 200 ng, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 1 μL , 2 $\times$ KAPA-Hi-Fi-HotStart-ReadyMix 25 μL , ddH₂O 补至 50 μL 。反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s, 98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 cycles, PCR 产物送上海生工测序, 测序引物序列: 5'-GAGCGCGTATTAACGAGAGC-3', 测序结果在 Synthego 网站分析敲除效率。

1.2.7 CCK8 实验 取对数生长期细胞接种于 96 孔板, 1.25 $\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔接种 80 μL , 分别加 20 μL 不同浓度的 Ara-C, 混匀, 药物终浓度为 0.1、1、10、100、1000、10000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对照孔的细胞加等体积的培养基, 空白孔只加 100 μL 培养基, 每组做 3 重复。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 72 h, 每孔加 CCK8 试剂 10 μL , 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 波长处 OD 值。细胞活率 = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / 对照孔 OD 值 $\times 100\%$ 。使用 Graphpad 5.0 软件绘制细胞活率曲线, 实验重复 3 次, 取均值为最终结果。

1.2.8 统计学分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 使用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 统计学处理用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Jurkat 细胞过表达 HES4 对 Ara-C 的敏感性影响

Jurkat 细胞感染慢病毒 Lenti-pCDH-HES4-puro, puro 抗性筛选 72 h, Realtime-PCR 检测细胞 HES4 的表达, OE 为过表达细胞, pCDH 为感染空质粒对照细胞, 图 1A 所示 OE 细胞表达 HES4 的量是对照细胞的 (2.37 $\pm$ 0.09) 倍, 两组有统计学意义 ($P < 0.001$)。将两组细胞接种于 96 孔板, 4 $\times 10^4$ / 孔, 依次加不同浓度 Ara-C, 药物终浓度为 0.1、1、10、100、1000、10000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测两组细胞对 Ara-C 的敏感性, 结果如图 1B 所示, 在 1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, OE 细胞对 Ara-C 的敏感性低于对照细胞 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。说明在化疗药物 Ara-C 为 1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 过表达 HES4 的 Jurkat 细胞对 Ara-C 的敏感性降低。

2.2 CRISPR/cas9 法敲除 HES4 基因

设计 3 对 HES4 基因的 sgRNA 序列, 构建慢病毒质粒, 包装病毒感染 Jurkat 细胞, puro 筛选 72 h, 提取细胞基因组 DNA, PCR 扩增 sgRNAs 的靶序列片段进行一代测序, 以感染 LentiGuide-puro 的空质粒的测序结果为对照, Synthego 网站分

析 HES4 的敲除效率。结果如图 2 所示, HES4sgRNA1 敲除分值为 83, HES4sgRNA2 敲除分值为 71, HES4sgRNA3 敲除分值为 63, 说明 3 对 sgRNA 均具有良好的 HES4 基因敲除效果, sgRNA1 敲除分值最高。另外, 3 对 sgRNA 序列均引起 DNA 缺失突变, DNA 缺失率分别为 94 %、87 %、89 %, 如图 2 所示, 垂直点状线为 CRISPR/cas9 切割位点, 切割位点之后的 DNA 序列出现重叠峰, 这是由于切割和容易出错的修复通常会导致切割后的混合测序碱基, 从而达到基因敲除目的。sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3 的模型拟合指数 R^2 分别为 0.94、0.88、0.89, 其中

sgRNA1 的拟合指数 R^2 最接近于 1, 结果最准确可靠, 因此 3 对 sgRNA 均可有效敲除 HES4, 其中 sgRNA1 的敲除效果最好。

2.3 Jurkat 细胞敲除 HES4 基因后对 Ara-C 的敏感性的影响

敲除 HES4 的 Jurkat 细胞 HES4 sgRNA 1、HES4 sgRNA 2、HES4 sgRNA 3 与感染 LentiGuide-puro 空质粒细胞接种于 96 孔板, 分别加化疗药物 Ara-C, 药物终浓度为 0.1、1、10、100、1000、10000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测 4 组细胞对不同浓度 Ara-C 的敏感性, 结果在 1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, HES4 sgRNA 1、HES4 sgRNA 2、HES4 sgRNA 3 细胞对 Ara-C 的敏感性分别高于对照细胞,

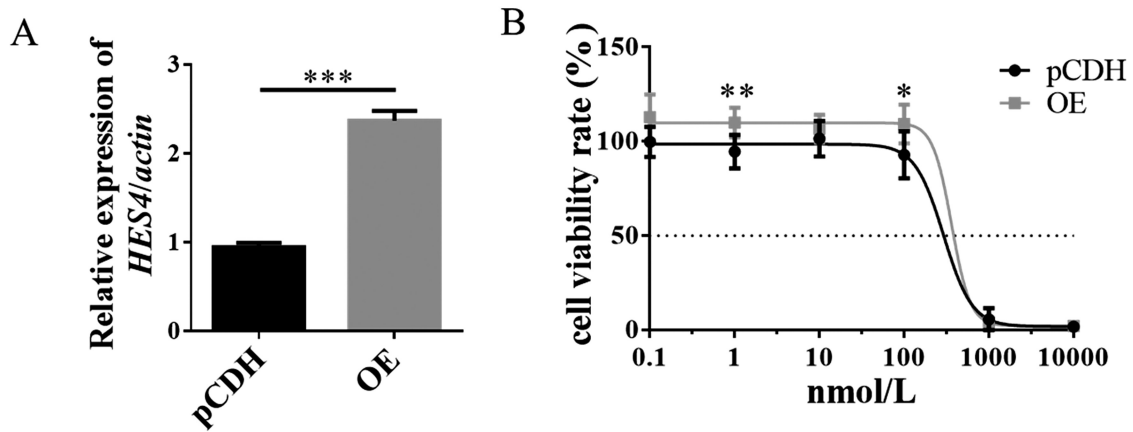
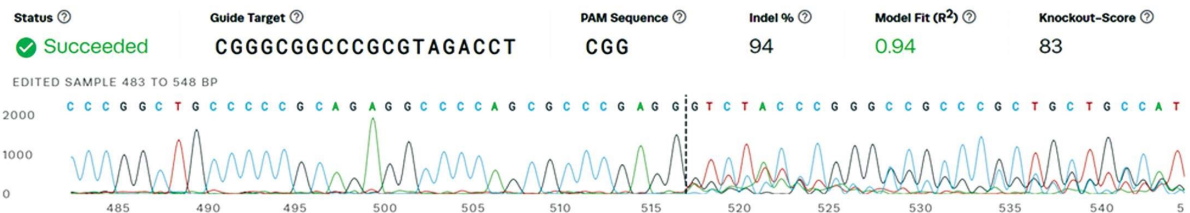


图 1 CCK8 法检测 Jurkat 细胞过表达 HES4 对 Ara-C 的敏感性变化

Fig.1 CCK8 method was used to detect the sensitivity of Jurkat cells overexpressing HES4 to Ara-C.

A: Real time PCR was used to detect the expression of HES4 in Jurkat cells. pCDH: Lenti-pCDH-puro empty plasmid control cells; OE: Lenti-pCDH-HES4-puro overexpression plasmid cells ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

sgRNA1



sgRNA2



sgRNA3

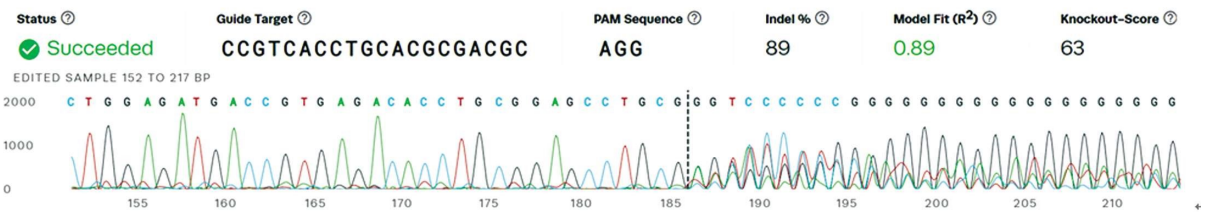


图 2 Synthego 网站分析 HES4sgRNA1、HES4sgRNA2、HES4sgRNA3 敲除效率

Fig.2 Synthego website analyzes the knockout efficiency of HES4-sgRNA1, HES4-sgRNA2 and HES4-sgRNA3. The vertical black dotted lines indicate the actual cut sites of CRISPR/cas9. Cutting and error-prone repair usually results in mixed sequencing bases after the cut.

P 值均小于 0.001 (图 3), 3 对 sgRNA 之间无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 Jurkat 细胞敲除 HES4 后, 在化疗药物 Ara-C 为 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 细胞对 Ara-C 的敏感性增强。

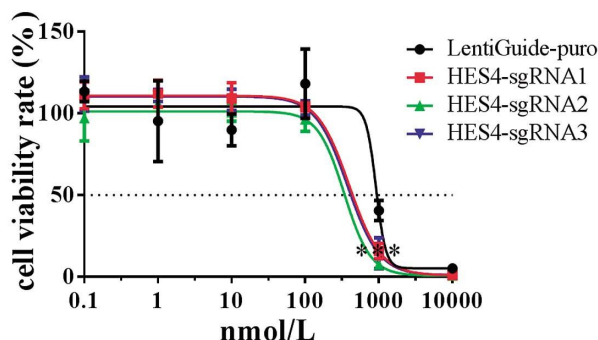


图 3 CCK8 法检测 Jurkat 细胞敲除 HES4 对 Ara-C 的敏感性变化

Fig.3 CCK8 assay was used to detect the sensitivity of Jurkat cells to Ara-C after HES4 knockout. ($n = 3$, *** $P < 0.001$, The cells infected with lentivirus HES4-sgRNA 1, HES4-sgRNA 2 and HES4-sgRNA 3 were compared with lentivirus LentiGuide-puro cells).

3 讨论

急性淋巴细胞白血病(ALL)是儿童发病率最高的恶性肿瘤疾病(4 / 10 万)。根据免疫表型,可分为 B 细胞型和 T 细胞型。其中,B-ALL 约占 85 %, T-ALL 约占 15 %。随着检测手段、联合化疗和造血干细胞移植技术的不断发展,儿童 ALL 的治疗效果有了很大的提高,尤其是 B-ALL。在发达国家,B-ALL 的 5 年无事件生存(EFS)率可达 80 %~90 %,但 T-ALL 的生存率仍较低,为 40 %~70 %^[11,12,16,17]。中国儿童白血病组(CCLG)急性淋巴细胞白血病(ALL)2008 方案(CCLG-ALL 2008)治疗儿童 T 细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)的疗效研究中显示 VDLT 诱导联合环磷酰胺+阿糖胞苷+6-巯基嘌呤(d 80)治疗的完全缓解率为 94 % (79 / 84)^[18]。也有研究发现 AZD1775 使 T-ALL 细胞对 Ara-C 敏感增加^[19],小鼠模型中急性消融 BTB/POZ 结构域因子 Miz-1poz 区域可增强阿糖胞苷治疗的效果,延缓小鼠 T-和 B-ALL/淋巴瘤的发生^[20],儿童急性白血病的治疗可以联合 FLT3 受体靶向药与 Ara-C 进行治疗^[21]。因此,Ara-C 在治疗急性淋巴细胞白血病中较为常见。

目前有文献报道 B-ALL 发病与 Notch 通路的靶基因 HES4 高甲基化有关,表现为 Notch-hes 通路表观遗传失活,而 hes4 在 T-ALL 中未发现高甲基化^[10]。Notch 通路涉及多种病理生理过程^[22-24],与肿瘤的形成关系密切^[25-27],也参与正常造血干细胞的发育^[28-30]。在造血祖细胞发育初期,Notch1 是诱导人和小鼠造血祖细胞活化的主要动力。但是在人类细胞中,单个 Notch1 靶基因在这些造血发育选择中的作用尚不清楚,尤其是 HES4,因为小鼠体内没有同源基因,其作用还不清楚。Decker et al 研究了 Notch1 靶基因 HES1 和 HES4 在早期 T 细胞发育过程中的功能,结果显示,这两个基因在早期 T 细胞发育过程中以 Notch1 依赖性方式表达上调,其中 HES1 通过维持 CD34⁺造血祖细胞静息来抑制其分化。虽然 HES4 也能像 HES1 一样抑制自然杀伤细胞和髓细胞的发育,但它在 T 细胞和 B 细胞谱系选择上的作用不同。B 细胞是 Notch 介导的抑制最敏感的造

血谱系,但是 HES4 并不能抑制 B 细胞的发育。与 HES1 相比,HES4 促进 T 细胞早期发育,但异位表达 HES4、HES1、甚至 HES1 与 HES4 组合不足以诱导 T 系分化。重要的是,敲除 HES1 或 HES4 可显著降低人类 T 细胞的发育。总体而言,Notch1 靶基因 HES1 和 HES4 在人类 T 细胞早期发育过程中具有非冗余的作用,这可能与介导 Notch 依赖的人类造血谱系分化的差异有关^[9]。

本研究发现 T-ALL 细胞系 Jurkat 过表达 HES4(hes 家族 bHLH 转录因子 4)对化疗药物 Ara-C 的敏感性降低,而 CRISPR/cas9 法敲除 HES4 基因后 Jurkat 细胞对 Ara-C 的敏感性增加,因此 HES4 能够抑制 Jurkat 细胞对化疗药物 Ara-C 的敏感性,这一结论为 T-ALL 化疗药物耐药机制的研究提供线索。

HES4 作为 Notch 信号通路的靶基因之一,可能参与白血病对化疗药物耐药,后续我们将要进一步验证是否在 B-ALL 细胞系中有相似结果,以及 Notch-hes 通路其他成员,包括 hes 家族的 HES1、HES5 等成员在化疗药物敏感性方面的作用,另外 Notch-hes 通路甲基化状态是否参与耐药机制。这一研究为 ALL 化疗药物耐药机制的研究提供思路。

参考文献(References)

- [1] Daniel J Dennis, Sisu Han, Carol Schuurmans. bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming [J]. Brain Res, 2019, 15(1705): 48-65
- [2] Mitsushige Ando, Masanori Goto, Masato Hojo, et al. The proneural bHLH genes Mash1, Math3 and NeuroD are required for pituitary development[J]. J Mol Endocrinol, 2018, 61(3): 127-138
- [3] Yu Wu, Qiang Gao, Shibo Zhu, et al. Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of neural stem cells through notch signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(3): 793-798
- [4] Yuhong Qin, Keke Fang, Nan Lu, et al. Interferon gamma inhibits the differentiation of mouse adult liver and bone marrow hematopoietic stem cells by inhibiting the activation of notch signaling [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 210
- [5] Emmanuel N Kontomanolis, Sofia Kalagasidou, Stamatia Pouliliou, Xanthoula Anthoulaki, et al. The Notch Pathway in Breast Cancer Progression[J]. Scientific World Journal, 2018, 2018: 2415489
- [6] Cagney E Coomer, Stephen G Wilson, Kayla F Titalii-Torres, et al. Her9/Hes4 is required for retinal photoreceptor development, maintenance, and survival[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11316
- [7] Dimitrios Cakouros, Sandra Isenmann, Sarah Elizabeth Hemming, et al. Novel basic helix-loop-helix transcription factor hes4 antagonizes the function of twist-1 to regulate lineage commitment of bone marrow stromal/stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(11): 1297-308
- [8] Madonna McManus, Eugenie Kleinerman, Yanwen Yang, et al. Hes4: A potential prognostic biomarker for newly diagnosed patients with high-grade osteosarcoma [J]. Pediatr Blood Cancer, 2017, 64 (5): 10. 1002/pbc.26318
- [9] Matthias De Decker, Marieke Lavaert, Juliette Roels, et al. HES1 and HES4 have non-redundant roles downstream of Notch during early human T cell development[J]. Haematologica, 2020, 9: 226126
- [10] Shao-Qing Kuang, Zhihong Fang, Patrick A Zweidler-McKay, et al.

- Epigenetic Inactivation of Notch-Hes Pathway in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61807
- [11] Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine [J]. Blood, 2015, 125(26): 3977-87
- [12] Karrman K, Johansson B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Genes, chromosomes & cancer, 2017, 56(2): 89-116
- [13] David T Teachey, Ching-Hon Pui. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(3): e142-e154
- [14] Neville E Sanjana, Ophir Shalem, Feng Zhang. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening [J]. Nat Methods, 2014, 11(8): 783-784
- [15] Ophir Shalem, Neville E Sanjana, Ella Hartenian, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. Science, 2014, 343(6166): 84-87
- [16] Liu X, Zou Y, Chen X, et al. Minimal residual disease surveillance at day 90 predicts long-term survival in pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Leukemia & lymphoma, 2020, 61(14): 3460-7
- [17] Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia[J]. The New England journal of medicine, 2006, 354(2): 166-178
- [18] 刘晓明, 陈晓娟, 邹尧, 等. 中国儿童白血病组织急性淋巴细胞白血病 2008 方案治疗急性 T 淋巴细胞白血病 84 例分析[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(10): 761-766
- [19] James B Ford, Dmitry Baturin, Tamara M Burleson, et al. AZD1775 sensitizes T cell acute lymphoblastic leukemia cells to cytarabine by promoting apoptosis over DNA repair [J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 28001-10
- [20] Julie Ros, Marissa Rashkovan, Jennifer Fraszczak, et al. Deletion of the Miz-1 POZ Domain Increases Efficacy of Cytarabine Treatment in T- and B-ALL/Lymphoma Mouse Models [J]. Cancer Res, 2019, 79(16): 4184-4195
- [21] Catalina M Perelló-Reus, Albert Català, Liska Caviedes- Cárdenas, et al. FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) modulates key enzymes of nucleotide metabolism implicated in cytarabine responsiveness in pediatric acute leukemia[J]. Pharmacol Res, 2020, 151: 104556
- [22] Liquan Wu, Haitao Xu, Wenfei Zhang, et al. Circular RNA circCCDC9 alleviates ischaemic stroke ischaemia/reperfusion injury via the Notch pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(24): 14152-14159
- [23] Jianli Shi, Peilin Xiao, Xiaoli Liu, et al. Notch3 Modulates Cardiac Fibroblast Proliferation, Apoptosis, and Fibroblast to Myofibroblast Transition via Negative Regulation of the RhoA/ROCK/Hif1 α Axis [J]. Front Physiol, 2020, 11: 669
- [24] Jiao Gong, Yusheng Jie, Cuicui Xiao, et al. Increased Expression of Fibulin-1 Is Associated With Hepatocellular Carcinoma Progression by Regulating the Notch Signaling Pathway [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 478
- [25] Zhixin Liu, Teng Ma, Jufeng Duan, et al. MicroRNA 223 induced inhibition of the FBXW7 gene affects the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells via the Notch and Akt/mTOR pathways[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 154
- [26] Binyu Zhao, Shanshan Hu, Qingqing Xiao, et al. Expression of NOTCH receptors and ligands and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Biomark Med, 2020, 14(17): 1631-1639
- [27] Tra Ly Nguyen, Marie-Julie Nokin, Silvia Terés. Downregulation of Glutamine Synthetase, not glutaminolysis, is responsible for glutamine addiction in Notch1-driven acute lymphoblastic leukemia [J]. Mol Oncol, 2020, Dec 12. doi: 10.1002/1878-0261.12877
- [28] Thomas Mercher, Melanie G Cornejo, Christopher Sears, et al. Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(3): 314-326
- [29] Takahiro Suzuki, Shigeru Chiba. Notch signaling in hematopoietic stem cells[J]. Int J Hematol, 2005, 82(4): 285-294
- [30] Clint Campbell, Ruth M Risueno, Simona Salati, et al. Signal control of hematopoietic stem cell fate: Wnt, Notch, and Hedgehog as the usual suspects[J]. Curr Opin Hematol, 2008, 15(4): 319-325