



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106908606 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(21)申请号 201710108524.6

(22)申请日 2017.02.27

(71)申请人 石河子大学

地址 832003 新疆维吾尔自治区石河子市
北二路石河子大学医学院基础医学系

(72)发明人 魏虹 邓磊

(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理
有限公司 11385

代理人 董芙蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

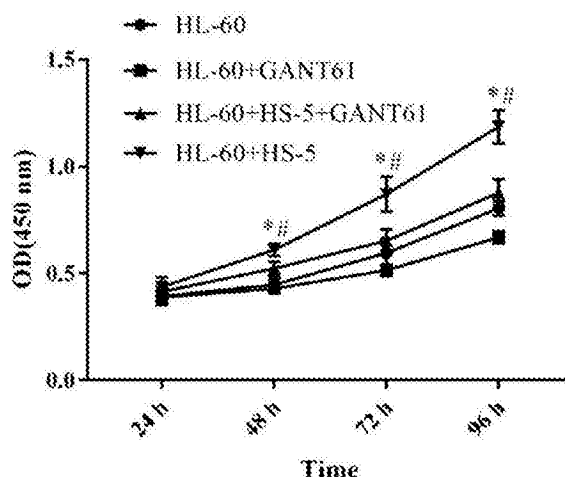
权利要求书2页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,所述检测方法包括:采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖,采用双染检测各组HL-60细胞凋亡率,采用半定量RT-PCR方法检测各实验组Hedgehog信号通路组成成分GLI 1基因及凋亡基因BCL-2、BCL-XL的表达,采用免疫荧光法检测GLI 1蛋白的表达。本发明采用人急性髓系白血病细胞株HL-60与HS-5细胞体外建立共培养模式,模拟体内白血病细胞与其周围的造血微环境的相互作用,研究造血微环境对白血病细胞凋亡的影响及作用的可能机制,为探索以阻断二者相互作用为靶标的白血病治疗药物的研制奠定理论基础。



1. 一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,所述调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法包括:

采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖;将HL-60细胞接种于有或无骨髓基质细胞HS-5的96孔板内,用酶标仪测各孔的吸光度OD值,绘制HL-60细胞的增殖曲线;

采用Annexin V-FITC/PI双染检测各组HL-60细胞凋亡率;将HL-60细胞接种于有或无HS-5细胞的24孔板内,每日固定时相收集对数生长期HL-60细胞,上流式细胞仪检测;

采用半定量RT-PCR方法检测各实验组Hedgehog信号通路组成成分GLI 1基因及凋亡基因BCL-2、BCL-XL的表达;提取总HL-60细胞RNA,将mRNA逆转录为cDNA,逆转录产物进行GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH基因扩增;

采用免疫荧光法检测GLI 1蛋白的表达,收集HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 培养组各组48h时HL-60细胞,PBS液洗,风干,兔抗人GLI1抗体孵育;FITC荧光标记山羊抗兔二抗,孵育,PBS液洗,封固,共聚焦显微镜下分析。

2. 如权利要求1所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,所述实验组为:HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 培养组。

3. 如权利要求1所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖方法具体包括:

将HL-60细胞按 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种于有或无骨髓基质细胞HS-5的96孔板内,100 μL /孔,设定3个复孔;对照组仅接种骨髓基质细胞HS-5;每日固定时相点取1个96孔板,每孔加入10 μL CCK 8溶液作用2h,用酶标仪测450nm处各孔的吸光度OD值,绘制HL-60细胞的增殖曲线。

4. 如权利要求1所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,采用Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡率方法包括:

将HL-60细胞按 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于有或无HS-5细胞的24孔板内,每日固定时相收集对数生长期HL-60细胞,用冷PBS洗涤2次,离心去上清液;用Annexin结合液重悬细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,向细胞悬液加5 μL Annexin V-FITC混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15min,加入10 μL PI,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育5min,上流式细胞仪检测。

5. 如权利要求1所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,RT-PCR检测HL-60细胞中Hedgehog信号通路成分和抑凋亡基因表达方法包括:

RT-PCR法检测48h的HL-60细胞GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH的表达;提取总RNA,将mRNA逆转录为cDNA,逆转录产物进行GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH基因扩增,扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统拍照,照片用Image J进行mRNA表达分析和灰度扫描。

6. 如权利要求1所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,免疫荧光法检测GLI 1表达方法包括:

收集HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 培养组各组48h时HL-60细胞,冷PBS洗2次,100 μL 细胞混悬液均匀滴加至多聚赖氨酸包被的载玻片上风干,4%多聚甲醛固定30分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,0.5%Triton X-100透膜处理10分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,10%山羊血清37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1h,1:100的兔抗人GLI1抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS液洗3次,5分钟/次,FITC荧光标记1:150的

山羊抗兔二抗室温避光孵育1h,PBS液洗3次,5分钟/次,终浓度为0.1mg/L PI室温避光孵育1分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,封固,共聚焦显微镜下分析。

7.如权利要求1所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法还包括:采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较符合正态分布采用LSD-t检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

8.如权利要求3所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,骨髓基质细胞HS-5为: $3 \times 10^4 \text{mI}^{-1}$,培养24h。

9.如权利要求4所述的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,其特征在于,HS-5细胞为: $1 \times 10^5 \text{mI}^{-1}$,培养48h。

一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学技术领域,尤其涉及一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法。

背景技术

[0002] 骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSC)是造血微环境(hematopoietic microenvironment, HM)的核心组成成分。骨髓造血微环境中的骨髓基质细胞能调节急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)的增殖、存活、耐药。因此,除了直接针对急性髓系白血病的治疗外,阻断白血病与骨髓基质细胞的相互作用将为白血病的治疗提供新的策略。Hedgehog (HH) 蛋白属于分泌蛋白家族,广泛表达于哺乳动物,非哺乳动物等多个物种,参与调控多种肿瘤形成,器官成熟、血管生成,干细胞分化,免疫细胞以及胚胎发育。Hh信号可以通过调节肿瘤细胞增殖、分化、免疫调节来创造适合肿瘤生存的微环境,进而为肿瘤发展和转移创造环境。然而,骨髓造血微环境能否通过Hh信号影响HL-60细胞的存活仍然不清楚。现有技术不清楚HH信号通路在骨髓基质细胞对白血病细胞生长中是否有作用,所以,本发明探究骨髓基质细胞诱导的HH信号对HL-60细胞的存活的影响。

[0003] HM是由基质细胞(即成骨细胞、破骨细胞、内皮细胞,周围的网状细胞,间充质干细胞)和造血细胞、细胞外基质、可溶性因子、膜结合因子构成的复杂结构,它们协同支持正常造血。BMSC是骨髓造血微环境重要组成成分,骨髓造血微环境中的BMSC调节白血病细胞的增殖、分化、凋亡,此外BMSC作为白血病细胞的“避难所”有助于白血病细胞耐药和体内微小残留病灶形成。因此,除了针对白血病细胞的治疗,阐明白血病细胞和BMSC相互作用的机制,将为白血病治疗提供新的治疗策略。Hh信号通路参与调控器官成熟、血管生成、干细胞分化、免疫细胞以及胚胎发育, Hh信号通路的异常激活参与多种肿瘤发生,包括基底细胞癌,肺癌,乳腺癌,胃癌,肝癌,胰腺癌,前列腺癌,近年研究发现Hh信号通路在BMSC对慢性淋巴细胞性白血病,多发性骨髓瘤的保护中起重要作用。那么在BMSC对AML的保护作用中,该信号通路是否发挥作用呢?骨髓基质细胞HS-5可产生多种细胞因子(如GM-CSF、M-CSF、LIF等)促进骨髓前体细胞的增殖,支持长期造血,因此HS-5细胞能很好地体外模拟骨髓造血微环境。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,旨在解决现有技术不清楚HH信号通路在骨髓基质细胞对白血病细胞生长中是否有作用,骨髓基质细胞诱导的HH信号对HL-60细胞的存活的影响的问题。

[0005] 本发明是这样实现的,一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,所述调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法包括:

[0006] 采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖;将HL-60细胞接种于有或无骨髓

基质细胞HS-5的96孔板内,用酶标仪测各孔的吸光度OD值,绘制HL-60细胞的增殖曲线;

[0007] 采用Annexin V-FITC/PI双染检测各组HL-60细胞凋亡率;将HL-60细胞接种于有或无HS-5细胞的24孔板内,每日固定时相收集对数生长期HL-60细胞,上流式细胞仪检测;

[0008] 采用半定量RT-PCR方法检测各实验组Hedgehog信号通路组成成分GLI 1基因及凋亡基因BCL-2、BCL-XL的表达;提取总HL-60细胞RNA,将mRNA逆转录为cDNA,逆转录产物进行GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH基因扩增;

[0009] 采用免疫荧光法检测GLI 1蛋白的表达,收集HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 μ mol/L培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 μ mol/L培养组各组48h时HL-60细胞,PBS液洗,风干,兔抗人GLI1抗体孵育;FITC荧光标记山羊抗兔二抗,孵育,PBS液洗,封固,共聚焦显微镜下分析。

[0010] 进一步,所述实验组为:HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 μ mol/L培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 μ mol/L培养组。

[0011] 进一步,采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖方法具体包括:

[0012] 将HL-60细胞按 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种于有或无骨髓基质细胞HS-5的96孔板内,100 μ I/孔,设定3个复孔;对照组仅接种骨髓基质细胞HS-5;每日固定时相点取1个96孔板,每孔加入10 μ I CCK 8溶液作用2h,用酶标仪测450nm处各孔的吸光度OD值,绘制HL-60细胞的增殖曲线。

[0013] 进一步,采用Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡率方法包括:

[0014] 将HL-60细胞按 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于有或无HS-5细胞的24孔板内,每日固定时相收集对数生长期HL-60细胞,用冷PBS洗涤2次,离心去上清液;用Annexin结合液重悬细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,向细胞悬液加5 μ I Annexin V-FITC混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15min,加入10 μ I PI,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育5min,上流式细胞仪检测。

[0015] 进一步,RT-PCR检测HL-60细胞中Hedgehog信号通路成分和抑凋亡基因表达方法包括:

[0016] RT-PCR法检测48h的HL-60细胞GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH的表达;提取总RNA,将mRNA逆转录为cDNA,逆转录产物进行GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH基因扩增,扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统拍照,照片用Image J进行mRNA表达分析和灰度扫描。

[0017] 进一步,免疫荧光法检测GLI 1表达方法包括:

[0018] 收集HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 μ mol/L培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 μ mol/L培养组各组48h时HL-60细胞,冷PBS洗2次,100 μ L细胞混悬液均匀滴加至多聚赖氨酸包被的载玻片上风干,4%多聚甲醛固定30分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,0.5%Triton X-100透膜处理10分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,10%山羊血清37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1h,1:100的兔抗人GLI1抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS液洗3次,5分钟/次,FITC荧光标记1:150的山羊抗兔二抗室温避光孵育1h,PBS液洗3次,5分钟/次,终浓度为0.1mg/L PI室温避光孵育1分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,封固,共聚焦显微镜下分析。

[0019] 进一步,调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法还包括:采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较符合正态分布采用LSD-t检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

- [0020] 进一步,骨髓基质细胞HS-5为: $3 \times 10^4 \text{mI}^{-1}$,培养24h。
- [0021] 进一步,HS-5细胞为: $1 \times 10^5 \text{mI}^{-1}$,培养48h。
- [0022] 进一步,GLI1,BCL-2、BCL-XL和GAPDH的RNA分别为:
- [0023] $5' - \text{TCCTACCAGAGTCCCAAGTTTC} - 3'$ 、 $5' - \text{GAGGAGCTCTTCAGGGACGG} - 3'$ 、
- [0024] $5' - \text{ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG} - 3'$ 、 $5' - \text{ACCACAGTCCATGCCATCAC} - 3'$;
- [0025] 逆转录为cDNA分别为:
- [0026] $5' - \text{CCAGAATAGCCACAAAGTCCAG} - 3'$ 、 $5' - \text{GGTGCCGGTTCAGGTACTCA} - 3'$ 、 $5' - \text{TCATTTCCGACTGAAGAGTGA} - 3'$ 、 $5' - \text{TCCACCACCCTGTTGCTGTA} - 3'$;
- [0027] GLI1的扩增条件为: $95^\circ\text{C} 5\text{min}$, $94^\circ\text{C} 30\text{s}$, $58.3^\circ\text{C} 30\text{s}$, $72^\circ\text{C} 45\text{s}$,循环30次;
- [0028] BCL-2的扩增条件为: $95^\circ\text{C} 3\text{min}$, $94^\circ\text{C} 40\text{s}$, $60^\circ\text{C} 40\text{s}$, $72^\circ\text{C} 40\text{s}$,循环30次;
- [0029] BCL-XL的扩增条件为: $95^\circ\text{C} 5\text{min}$, $94^\circ\text{C} 30\text{s}$, $64.5^\circ\text{C} 30\text{s}$, $72^\circ\text{C} 45\text{s}$,循环30次;
- [0030] GAPDH的扩增条件为: $95^\circ\text{C} 5\text{min}$, $94^\circ\text{C} 30\text{s}$, $59^\circ\text{C} 30\text{s}$, $72^\circ\text{C} 30\text{s}$,循环30次。
- [0031] 本发明提供的骨髓基质细胞对HL-60细胞具有促进增殖和抑制凋亡的作用,以GLI1为靶点的Hedgehog信号通路抑制剂GANT61 $10 \mu\text{mol/L}$ 可以逆转骨髓基质细胞的这些作用。共培养体系中HL-60细胞GLI1蛋白及mRNA表达上调,抑凋亡基因BCL-2和BCL-XL的mRNA表达上调。本发明骨髓基质细胞对急性髓系白血病细胞具有保护作用,其机制可能是骨髓基质细胞激活急性髓系白血病细胞中的Hedgehog信号通路进而上调下游靶基因BCL-2和BCL-XL的表达。
- [0032] 本发明采用人急性髓系白血病细胞株HL-60与HS-5细胞体外建立共培养模式,模拟体内白血病细胞与其周围的造血微环境的相互作用,研究造血微环境对白血病细胞凋亡的影响及作用的可能机制,为探索以阻断二者相互作用为靶标的白血病治疗药物的研制奠定理论基础。

附图说明

- [0033] 图1是本发明实施例提供的各实验组中HL-60细胞增殖情况图;
- [0034] 图中:HL-60VS HL-60+HS-5,* $p < 0.05$;HL-60+HS-5+GANT61VS HL-60+HS-5,# $p < 0.05$;
- [0035] 图2是本发明实施例提供的不同处理组对HL-60细胞凋亡率的比较图;
- [0036] 图中:A、HL-60;B、HL-60+HS-5;C、HL-60+HS-5+GANT61;D、HL-60+GANT61培养组。
- [0037] 图3是本发明实施例提供的不同实验组HL-60细胞GLI1、BCL-XL、BCL-2mRNA表达情况图;
- [0038] 图中:1为HL-60;2为HL-60+GANT61;3为HL-60+HS-5+GANT61;4为HL-60+HS-5;HL-60VS HL-60+HS-5,* $p < 0.05$;HL-60+HS-5+GANT61VS HL-60+HS-5细胞培养组比较,# $p < 0.05$;
- [0039] 图4是本发明实施例提供的激光共聚焦观察HL-60细胞GLI1表达状况($\times 400$)图;
- [0040] 图中:HL-60VS HL-60+HS-5比较,* $p < 0.05$;HL-60+HS-5+GANT61 VS HL-60+HS-5比较,# $p < 0.05$ 。

具体实施方式

- [0041] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明

进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0042] 本发明实施例提供的调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法,包括:

[0043] 采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖;将HL-60细胞接种于有或无骨髓基质细胞HS-5的96孔板内,用酶标仪测各孔的吸光度OD值,绘制HL-60细胞的增殖曲线;

[0044] 采用Annexin V-FITC/PI双染检测各组HL-60细胞凋亡率;将HL-60细胞接种于有或无HS-5细胞的24孔板内,每日固定时相收集对数生长期HL-60细胞,上流式细胞仪检测;

[0045] 采用半定量RT-PCR方法检测各实验组Hedgehog信号通路组成成分GLI 1基因及凋亡基因BCL-2、BCL-XL的表达;提取总HL-60细胞RNA,将mRNA逆转录为cDNA,逆转录产物进行GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH基因扩增;

[0046] 采用免疫荧光法检测GLI 1蛋白的表达,收集HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 μ mI/L培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT6110 μ mI/L培养组各组48h时HL-60细胞,PBS液洗,风干,兔抗人GLI1抗体孵育;FITC荧光标记山羊抗兔二抗,孵育,PBS液洗,封固,共聚焦显微镜下分析。

[0047] GLI1, BCL-2、BCL-XL和GAPDH的RNA序列分别为:

[0048] SEQ ID N01:5'-TCCTACCAGAGTCCCAAGTTTC-3'、

[0049] SEQ ID N02:5'-GAGGAGCTCTTCAGGGACGG-3'、

[0050] SEQ ID N03:5'-ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG-3'、

[0051] SEQ ID N04:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'、

[0052] 逆转录为cDNA分别为:

[0053] SEQ ID N05:5'-CCAGAATAGCCACAAAGTCCAG-3'、

[0054] SEQ ID N06:5'-GGTGCCGGTTCAGGTACTCA-3'、

[0055] SEQ ID N07:5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGA-3'、

[0056] SEQ ID N08:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3。

[0057] 下面结合附图及具体实施例对本发明的应用原理作详细描述。

[0058] 1材料与方法

[0059] 1.1药物和试剂GANT61为SeIIeck公司产品;RPMI 1640培养基和胎牛血清为Gibco公司产品;Cell Counting Kit 8(CCK 8试剂盒)购自日本同仁化学研究所(Dojindo);AnnexinV FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。Trizol购自于invitrogen公司,逆转录试剂盒购自于Thermo Fisher Scientific公司,GLI 1抗体购买与Abcam公司。

[0060] 1.2细胞株及培养条件骨髓基质细胞HS-5和急性髓系白血病细胞HL-60购自中国科学院细胞库,细胞培养均采用含10%胎牛血清的RPMI 1640,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂饱和湿度培养箱中培养。细胞取生长良好,细胞存活率(台盼蓝拒染法)>95%的细胞进行实验。

[0061] 1.3方法

[0062] 实验设4组:HL-60细胞单独培养组;HL-60+GANT61 10 μ mI/L培养组;HL-60+HS-5细胞培养组;HL-60+HS-5+GANT61 10 μ mI/L培养组。

[0063] 1.3.1骨髓基质细胞对HL-60细胞增殖特性的影响将HL-60细胞按 4×10^4 mI⁻¹接种于有或无骨髓基质细胞HS-5(3×10^4 mI⁻¹,培养24h)的96孔板内,100 μ I/孔,设定3个复孔。对

照组仅接种骨髓基质细胞HS-5。每日固定时相点取1个96孔板,每孔加入10 μ I CCK 8溶液作用2h,用酶标仪测450nm处各孔的吸光度(OD)值,绘制HL-60细胞的增殖曲线。

[0064] 1.3.2Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡率将HL-60细胞按 $5 \times 10^5 \text{mI}^{-1}$ 接种于有或无HS-5细胞($1 \times 10^5 \text{mI}^{-1}$,培养48h)的24孔板内,每日固定时相收集对数生长期HL-60细胞,用冷PBS洗涤2次,离心去上清液。用Annexin结合液重悬细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,向细胞悬液加5 μ I Annexin V-FITC混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15min,加入10 μ I PI,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育5min,上流式细胞仪检测。

[0065] 1.3.3RT-PCR检测HL-60细胞中Hedgehog信号通路成分和抑凋亡基因表达RT-PCR法检测48h的HL-60细胞GLI1,BCL-2、BCL-XL和GAPDH的表达。按照Trizol试剂盒说明书提取总RNA,将mRNA逆转录为cDNA,逆转录产物进行上述基因扩增,扩增条件见(表1)。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统拍照,照片用Image J进行mRNA表达分析和灰度扫描。

[0066] 表1RT-PCR基因信息汇总

Gene	Primer sequences	bp	PCR condition
GLI1	F5'-TCCTACCAGAGTCCCAAGTTTC-3'	391	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58.3 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 cycles
	R5'-CCAGAATAGCCACAAAGTCCAG-3'		
BCL-2	F5'-GAGGAGCTCTTCAGGGACGG-3'	151	95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 30 cycles
	R5'-GGTGCCGGTTCAGGTACTCA-3'		
BCL-XL	F5'-ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG-3'	491	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 64.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 cycles
	R5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGA-3'		
GAPDH	F5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	496	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 cycles
	R5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

[0068] 1.3.4免疫荧光法检测GLI 1表达收集各组48h时HL-60细胞,冷PBS洗2次,100 μ L细胞混悬液均匀滴加至多聚赖氨酸包被的载玻片上风干,4%多聚甲醛固定30分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,0.5%Triton X-100透膜处理10分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,10%山羊血清37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1h,兔抗人GLI 1抗体(1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS液洗3次,5分钟/次,FITC荧光标记山羊抗兔二抗(1:150)室温避光孵育1h,PBS液洗3次,5分钟/次,终浓度为0.1mg/L PI室温避光孵育1分钟,PBS液洗3次,5分钟/次,封固,共聚焦显微镜下观察。

[0069] 1.3.5采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较符合正态分布采用LSD-t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0070] 2结果

[0071] 2.1HL-60细胞增殖曲线通过CCK 8试剂盒检测细胞增殖情况,结果显示(图1):与HS-5共培养的HL-60细胞生长速度比单独悬浮培养的HL-60细胞快,24h无统计学差异($P > 0.05$),48、72、96h($p < 0.05$)差异有统计学意义;与HS-5共培养的HL-60生长速度比GANT61 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理的共培养中的HL-60细胞快,同样24h无统计学差异($P > 0.05$),48、72、96h($p < 0.05$)差异有统计学意义。

[0072] 2.2骨髓基质细胞HS-5对急性髓系白血病细胞HL-60凋亡率的影响

[0073] 由表2可知,24、48、72h时,HL-60细胞培养组中HL-60细胞凋亡率均高于HL-60+HS-5细胞培养组HL-60凋亡率,差异具有统计学意义($p<0.05$);24、48、72h时,HL-60+HS-5+GANT61培养组中HL-60细胞凋亡率均高于HL-60+HS-5细胞培养组HL-60细胞凋亡率,24h两组差异无统计学意义($p>0.05$),而48、72h差异有统计学意义($p<0.05$);24、48、72h时,HL-60+GANT61 10 μ mol/L培养组中HL-60细胞凋亡率与HL-60细胞单独培养组中凋亡率无统计学差异($p>0.05$)。

[0074] 综合表2和图2可知,HS-5细胞抑制HL-60细胞凋亡,然后用GANT61抑制Hedgehog信号通路可以逆转此作用。

[0075] 表2.不同处理组对HL-60细胞早期凋亡率的比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

	Group	Early apoptosis rate (%)		
		24h	48h	72h
[0076]	HL-60	16.9167 \pm 1.1254	14.2167 \pm 0.8867	7.6733 \pm 0.18824
	HL-60+ HS-5	10.8567 \pm 0.4186 *	7.2367 \pm 0.86933 *	3.2067 \pm 0.4500 *
	HL-60+ HS-5+GANT61	14.7400 \pm 1.2046	10.8067 \pm 0.4162 ^{\$}	5.5233 \pm 0.5586 ^{\$}
	HL-60+ GANT61	20.7933 \pm 3.7402 [#]	15.8967 \pm 0.7011 [#]	8.5667 \pm 0.6423 [#]
	F值	12.258	80.124	71.391
	P值	P=0.002	P=0.000	P=0.000

[0077] 注:HL-60VS HL-60+HS-5比较,* $p<0.05$;

[0078] HL-60VS HL-60+GANT61, [#] $p<0.05$;

[0079] HL-60+HS-5+GANT61VS HL-60+HS-5, ^{\$} $p<0.05$;

[0080] 2.3RT-PCR检测48h时不同实验组中HL-60细胞中Hedgehog信号通路成分和抑凋亡基因mRNA表达情况;

[0081] 结果(图3)示:与HS-5共培养的HL-60的GLI 1、BCL-2、BCL-XL mRNA比GANT61 10 μ mol/L处理的共培养中的HL-60细胞、单独悬浮培养的HL-60细胞表达高,差异具有统计学意义($p>0.05$)。

[0082] 2.4细胞免疫荧光检测HL-60细胞中GLI1蛋白的表达水平

[0083] 从(图4)中可以看出,与HL-60+HS-5细胞培养组中的HL-60细胞相比,HL-60细胞单独培养组中荧光强度减弱,HL-60+HS-5+GANT61培养组中HL-60细胞中的荧光强度比HL-60+HS-5细胞培养组中的HL-60细胞弱。

[0084] 3.讨论

[0085] Moshaver B等应用CFSE荧光标记法研究发现骨髓基质细胞HS-5具有促进HL-60和原代AML增殖的作用,本实验应用CCK-8法检测骨髓基质细胞HS-5对HL-60细胞增殖的影响,同样发现HS-5细胞确实可以促进HL-60细胞的增殖,Garrido等研究报道骨髓基质细胞HS-5抑制AML细胞自发及化疗药物诱导的凋亡,KonopIeva等应用无血清及阿糖胞苷诱导HL-60细胞凋亡,发现鼠基质细胞MS-5具有抑制HL-60凋亡的作用。本发明无血清预处理HL-60细胞48h后,建立共培养体系,Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡率发现HS-5细胞具有抑制HL-60细胞凋亡的作用。Hh信号通路最早由NussIein-VoIhard和Wieschaus E在1980年进行遗传筛选影响果蝇胚胎形成的因素中发现。Hh-GLI信号通路包括分泌型信号糖蛋白配体Hh、跨膜蛋白受体Patched (PTCH) 以及与G蛋白偶联的磷酸化受体Smoothened (Smo) 组成的复合体和胶质瘤相关癌基因同源物(glioma-associated oncogene homolog, GLI) 等蛋白

成分, GLI是有锌指结构核转录因子, 哺乳动物有3个GLI的同源基因GLI-1, GLI-2和GLI-3, 分别编码GLI-1, GLI-2和GLI-3蛋白, GLI-3是一个主要的转录抑制因子, GLI 2存在于全长的活性形式和截短的抑制形式, GLI 1仅有活化Hh信号通路的作用, 哺乳动物中Hh信号通路的活化还需要初级纤毛的参与。哺乳动物中, 当Hh配体不存在时, PTCH受体表达于细胞质膜, 抑制SMO的表达及初级纤毛定位, 从而抑制SMO活性, 然后具有抑制作用的GLI 2 (GLI-R) 片段特别是GLI 3 (GLI-3R) 片段细胞核转移, 充分抑制信号通路活化; 当Hh配体与PTCH受体结合时, PTCH受体对SMO的抑制作用被解除, 促进有活性作用的GLI转录因子细胞核转移, 激活下游靶基因表达, 如GLI 1。GLI 1既是Hh信号通路的组成成分, 又是信号的转录靶基因, 因此GLI 1可作为信号通路激活的标记基因, 以此来判断通路激活的程度。所以本发明选取检测GLI 1 mRNA和蛋白表达情况来判断信号通路活化状况。Hh信号通路的异常活化参与多种实体肿瘤的发生, 然而Hh信号通路在恶性血液病的发生中还存在很大争论。Zhao和Dierks表明BCR-ABL⁺CML干细胞中存在SMO高表达导致Hh信号通路活化, 抑制SMO可减少CML干细胞存活, 从而使白血病发病率降低。然而Hofmann等表明Smoothered (SMO) 失活对正常造血无影响, 包括外周血数目, 干或祖细胞的数目或细胞周期状态, 造血细胞集落形成能力, 此外, Hh信号通路在MLL-AF9诱导的AML的发生中没有起作用。Gao等发现条件性降低和升高SMO的表达对正常造血干细胞的自我更新和功能没有影响, 而且T-ALL的发生不依赖Hedgehog信号通路。Weilbrock等应用GLI为靶点的Hedgehog信号通路特异性抑制剂GANT61和shRNA在体内外分析Hh信号通路和AML的关系, 发现AML患者存在Hh信号通路的异常活化, GLI的表达是一个不良的预后因素, 可能是一种新的药物靶点。Pan等发现以SMO为靶点的特异性Hh信号通路抑制剂cyclopamine, 对HL-60细胞的增殖和凋亡无影响, 然而GANT61 30μmol/L, 48h时明显抑制其增殖、促进其凋亡, 并且与雷帕霉素具有协同杀伤作用。本发明中应用GANT61处理的共培养组中HL-60细胞的增殖速度慢于共培养组中HL-60细胞的增殖, 而且凋亡率也高于共培养组。说明GANT61可以逆转骨髓基质细胞HS-5对急性髓系白血病细胞HL-60的保护作用, 同时可推测Hh信号通路在BMSC对急性髓系白血病细胞的保护作用中发挥作用。Hegde等表明cyclopamine能够抑制骨髓基质细胞对B-CLL细胞的保护作用, 从而说明Hh信号通路参与这种保护作用。Dierks等结果同样支持上述观点。为验证Hh信号通路同样参与骨髓微环境对急性髓系白血病的保护作用, 本发明应用RT-PCR和免疫荧光技术检测GLI 1在实验组中的表达情况, 发现共培养组中的HL-60细胞GLI 1较HL-60细胞单独悬浮培养的高, 用GANT61处理共培养组后的GLI 1表达量比共培养组中的HL-60细胞低, 说明Hh信号通路在BMSC对急性髓系白血病细胞的保护作用中发挥作用。BCL-2家族蛋白是细胞凋亡的关键调节分子, 线粒体是其调控内在凋亡途径的靶点。本发明检测BCL-2家族中的抑凋亡基因BCL-2和BCL-XL, 结果与GLI 1在各组中的表达相一致。Moshaver B和Konopleva实验表明BMSC可以上调AML细胞BCL-2的表达进而抑制其凋亡, 支持本发明结果。

[0086] 综上所述, 本发明表明骨髓基质细胞HS-5可以促进急性髓系白血病细胞HL-60增殖, 抑制其凋亡, 这些作用可能是通过激活HL-60细胞中Hh信号通路进而上调抑凋亡基因BCL-2、BCL-XL实验, 本发明体外初步探索BMSC对AML增殖和凋亡的影响及可能作用机制, 为AML的治疗提供新的治疗策略。

[0087] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

<110> 申请人名称 石河子大学
<120>一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法
<160>8
<210> 1
<211>22
<212> RNA
<213>人工序列
<400> RNA序列TCCTACCAGAGTCCCAAGTTTC
<210> 2
<211>20
<212> RNA
<213>人工序列
<400> RNA序列GAGGAGCTCTTCAGGGACGG
<210> 3
<211>21
<212> RNA
<213>人工序列
<400> RNA序列ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG
<210> 4
<211>20
<212> RNA
<213>人工序列
<400> RNA序列ACCACAGTCCATGCCATCAC
<210> 5
<211>22
<212>DNA
<213>人工序列
<400> DNA序列CCAGAATAGCCACAAAGTCCAG
<210>6
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列
<400> DNA序列GGTGCCGGTTCAGGTACTCA
<210> 7
<211>21
<212>DNA
<213>人工序列
<400> DNA序列TCATTTCCGACTGAAGAGTGA

<210>8

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

<400> DNA序列TCCACCACCCTGTTGCTGTA。

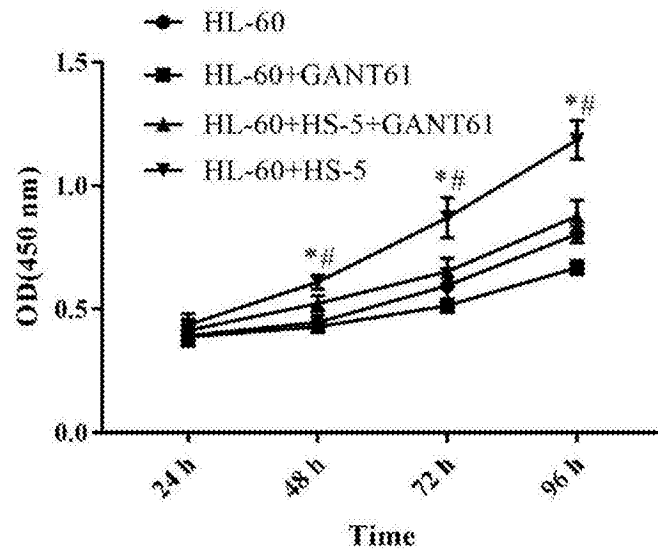


图1

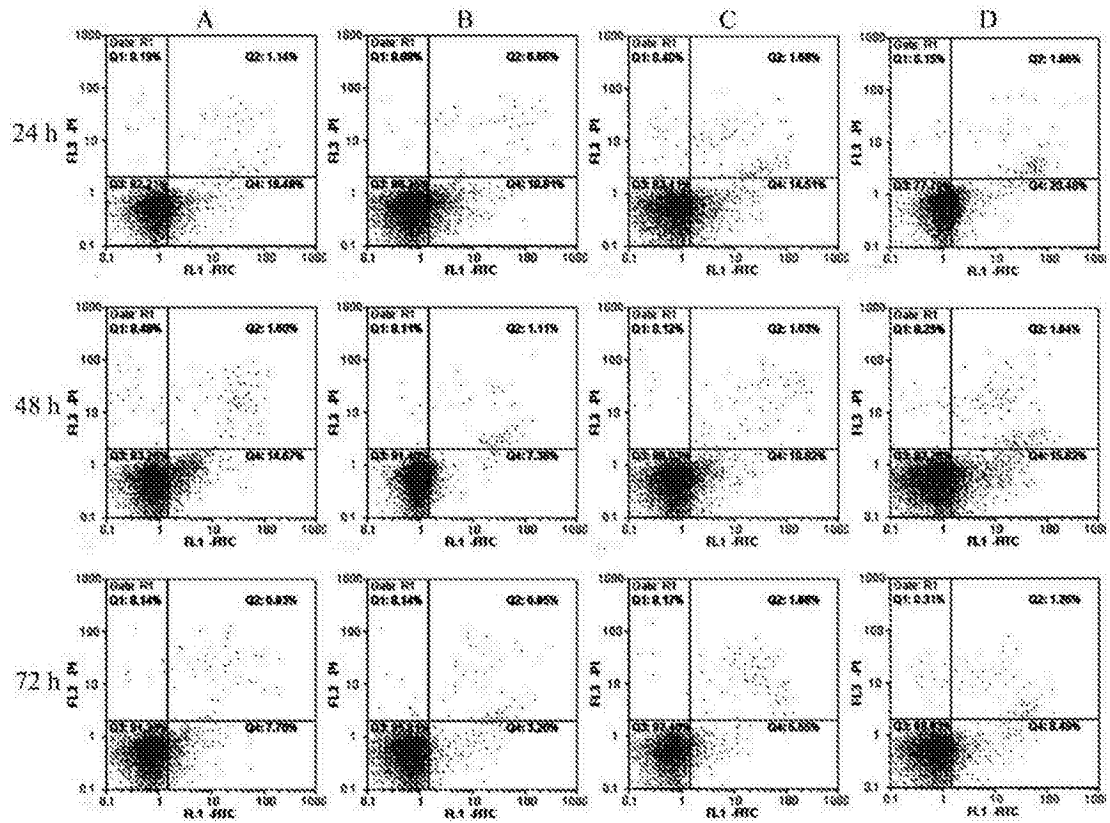
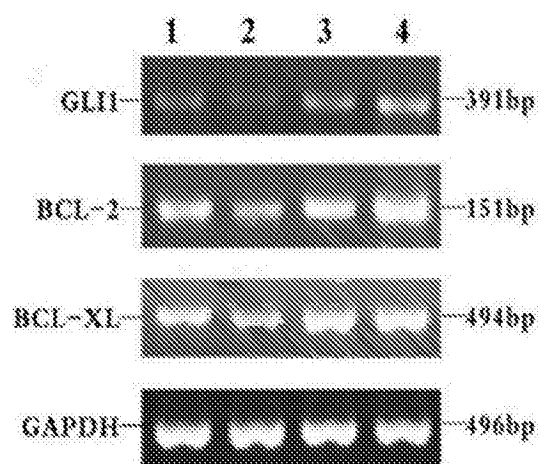
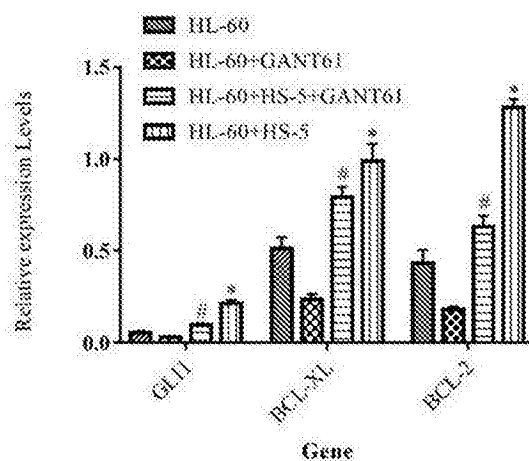


图2

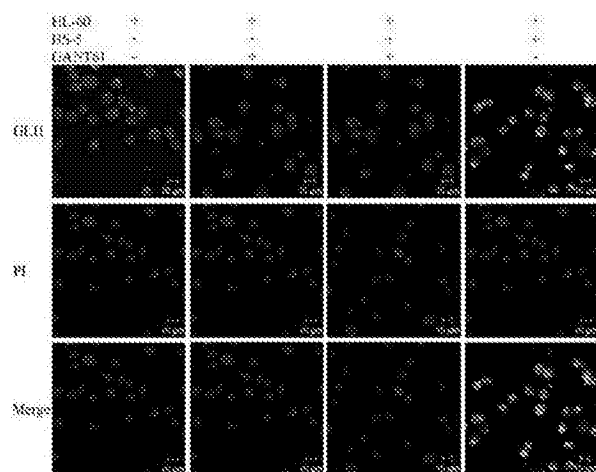


a

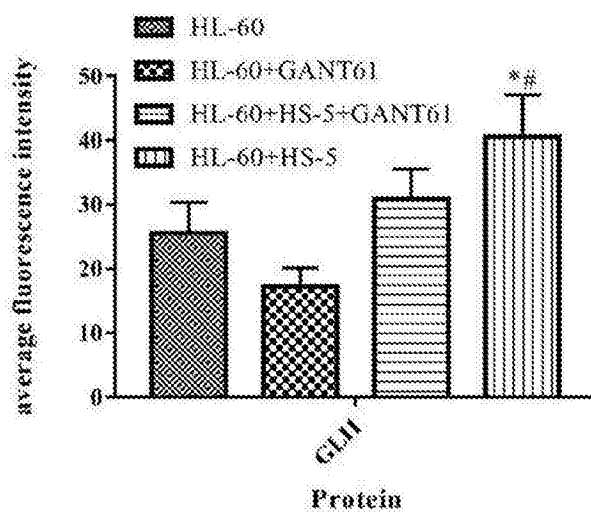


b

图3



a



b

图4

专利名称(译)	一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法		
公开(公告)号	CN106908606A	公开(公告)日	2017-06-30
申请号	CN201710108524.6	申请日	2017-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	石河子大学		
申请(专利权)人(译)	石河子大学		
当前申请(专利权)人(译)	石河子大学		
[标]发明人	魏虹 邓磊		
发明人	魏虹 邓磊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/574 C12Q1/68 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/6893 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/533 G01N33/57484		
代理人(译)	董芙蓉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种调控Hh信号通路抑制HL-60细胞的检测方法，所述检测方法包括：采用试剂盒检测不同实验组间HL-60细胞的增殖，采用双染检测各组HL-60细胞凋亡率，采用半定量RT-PCR方法检测各实验组Hedgehog信号通路组成成分GLI 1基因及凋亡基因BCL-2、BCL-XL的表达，采用免疫荧光法检测GLI 1蛋白的表达。本发明采用人急性髓系白血病细胞株HL-60与HS-5细胞体外建立共培养模式，模拟体内白血病细胞与其周围的造血微环境的相互作用，研究造血微环境对白血病细胞凋亡的影响及作用的可能机制，为探索以阻断二者相互作用为靶标的白血病治疗药物的研制奠定理论基础。

