

可溶性CD40配体通过长链非编码RNA linc00239对THP-1细胞生物学行为的影响

封忠昕, 李梅

(贵州医科大学附属医院血液科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] **目的:** 探讨CD40配体(CD40L)通过长链非编码RNA(lncRNA) linc00239对人单核细胞白血病THP-1细胞生物学行为的影响, 阐明其可能的作用机制。**方法:** 构建linc00239过表达载体(pcDNA-linc00239)和干扰载体(sh-linc00239), 转染至THP-1细胞, 采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测转染效率。THP-1细胞分为对照组、空载体(vector)组、pcDNA-linc00239组、sh-linc00239组、vector+CD40L组、pcDNA-linc00239+CD40L组和sh-linc00239+CD40L组。RT-qPCR法检测各组细胞中linc00239表达水平, CCK-8法检测各组细胞增殖活性, 流式细胞术检测各组不同细胞周期细胞百分率和细胞凋亡率, RT-qPCR法和Western blotting法检测各组细胞中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)和Bcl-2关联X蛋白(Bax)mRNA和蛋白表达水平, Western blotting法检测各组细胞中蛋白激酶B(AKT)和磷酸化AKT(p-AKT)蛋白表达水平并计算p-AKT/AKT比值。**结果:** 与vector组比较, pcDNA-linc00239组细胞增殖活性和G₂期细胞百分率明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 细胞中linc00239、Bcl-2 mRNA及蛋白表达水平和p-AKT/AKT比值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), G₁期细胞百分率、细胞凋亡率和细胞中Bax mRNA及蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与vector组比较, sh-linc00239组和vector+CD40L组细胞增殖活性和G₂期细胞百分率明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 细胞中linc00239、Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平及p-AKT/AKT比值明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), G₁期细胞百分率、细胞凋亡率和细胞中Bax mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与pcDNA-linc00239组比较, pcDNA-linc00239+CD40L组细胞增殖活性和G₂期细胞百分率明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 细胞中linc00239、Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平及p-AKT/AKT比值明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), G₁期细胞百分率、细胞凋亡率和细胞中Bax mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与sh-linc00239组比较, sh-linc00239+CD40L组细胞增殖活性和G₂期细胞百分率明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 细胞中linc00239、Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平及p-AKT/AKT比值明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), G₁期细胞百分率、细胞凋亡率和细胞中Bax mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** CD40L可通过linc00239抑制THP-1细胞增殖和细胞周期进展, 并诱导细胞凋亡。

[关键词] CD40配体; 长链非编码RNA; linc00239; 急性髓系白血病; 细胞周期; 细胞凋亡

[中图分类号] R733.71 **[文献标志码]** A

Effect of soluble CD40 ligand on biological behavior of THP-1 cells through long non-coding RNA linc00239

FENG Zhongxin, LI Mei

(Department of Hematology, Affiliated Hospital, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[收稿日期] 2023-04-11

[基金项目] 贵州省卫健委科学技术基金项目(gzwwkj2020-1-082)

[作者简介] 封忠昕(1978-), 男, 江西省抚州市人, 主任医师, 医学博士, 主要从事血液系统肿瘤诊治方面的研究。

[通信作者] 封忠昕, 主任医师, 博士研究生导师(E-mail: fengsuyan2006@126.com)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of CD40 ligand (CD40L) on the biological behavior of the human monocytic leukemia THP-1 cells through long non-coding RNA (lncRNA) linc00239, and to clarify its potential mechanism. **Methods:** The linc00239 over-expression vector (pcDNA-linc00239) and interference vector (sh-linc00239) were constructed and transfected into the THP-1 cells. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the transfection efficiency. The THP-1 cells were divided into control group, vector group, pcDNA-linc00239 group, sh-linc00239 group, vector+CD40L group, pcDNA-linc00239+CD40L group, and sh-linc00239+CD40L group. RT-qPCR method was used to detect the expression levels of linc00239 in the cells in various groups; CCK-8 assay was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the percentages of the cells at different cell cycles and the apoptotic rates of the cells in various groups; RT-qPCR and Western blotting methods were used to detect the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) mRNA and proteins in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of protein kinase B (AKT) and phosphorylated AKT (p-AKT) proteins in the cells in various groups, and the ratio of p-AKT/AKT was calculated. **Results:** Compared with vector group, the proliferation activity of the cells and the percentage of the cells at G₂ phase in pcDNA-linc00239 group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression levels of linc00239, Bcl-2 mRNA and protein, and the ratio of p-AKT/AKT were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the percentage of the cells at G₁ phase, apoptotic rate, and expression levels of Bax mRNA and protein in the cells were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with vector group, the proliferation activity of the cells and percentage of the cells at G₂ phase, expression levels of linc00239, Bcl-2 mRNA and protein, and ratio of p-AKT/AKT in the cells in sh-linc00239 group and vector+CD40L group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the percentage of the cells at G₁ phase, apoptotic rate, and the expression levels of Bax mRNA and protein in the cells were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with pcDNA-linc00239 group, the proliferation activity of the cells and percentage of cells at G₂ phase in pcDNA-linc00239+CD40L group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression levels of linc00239, Bcl-2 mRNA and protein, and ratio of p-AKT/AKT were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the percentage of cells at G₁ phase, apoptotic rate, and the expression levels of Bax mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with sh-linc00239 group, the proliferation activity of the cells and percentage of cells at G₂ phase in sh-linc00239+CD40L group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression levels of linc00239, Bcl-2 mRNA and protein, and ratio of p-AKT/AKT were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the percentage of the cells at G₁ phase, apoptotic rate, and expression levels of Bax mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** CD40L can inhibit the proliferation and cell cycle progression of the THP-1 cells through linc00239 and induce the apoptosis.

KEYWORDS CD40 ligand; Long non-coding RNA; linc00239; Acute myeloid leukemia; Cell cycle; Apoptosis

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是成人最常见的白血病类型, 约占成人白血病的 70%, 其发病率随着年龄的增加不断升高^[1]。传统的 AML 化疗方案尽管有一定的效果, 但复发风险较高^[2]。目前治疗 AML 的有效方法是造血干细胞移植, 但供者来源有限, 且易引起严重的移植物抗宿主反应^[3]。因此, 探索新的治疗

AML 的方法具有重要意义。

CD40 配体 (CD40 ligand, CD40L) 属于肿瘤坏死因子受体超基因家族成员, 在肿瘤细胞抗原递呈和免疫应答中发挥重要作用^[4]。本课题组前期研究^[5-7]证实: 可溶性 CD40L 可以通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路下

调B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 并激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3), 诱导人单核细胞白血病 THP-1 细胞凋亡, 还可以有效降低 THP-1 细胞阿霉素耐药株的耐药性^[8], CD40L 有望作为 AML 治疗的靶点, 但 CD40L 通过何途径调控 PI3K/AKT 信号通路并抑制 AML 细胞活性尚未完全阐明, 其作用机制有待进一步研究。研究^[9]表明: AML 细胞中长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) linc00239 表达水平升高, 且对细胞增殖、集落形成和迁移能力等具有促进作用, 能够增强 AML 细胞对阿霉素的化学耐药性, 降低阿霉素诱导的细胞凋亡。基于以上研究背景, 本研究拟在 THP-1 细胞中过表达或沉默 linc00239, 并采用可溶性 CD40L 处理, 检测 CD40L 对 THP-1 细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响, 分析 CD40L 与 linc00239 之间的联系, 为治疗 AML 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人单核细胞白血病 THP-1 细胞购于中国科学院上海细胞库。CD40L 购于美国 PeproTech 公司, RPMI-1640 购于美国 Hyclone 公司, 胎牛血清购于美国 Gibco 公司, TOP10 感受态细菌、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS)、CCK-8 试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于中国 Solarbio 公司, *Hind* III 和 *Nhe* I 购于美国 NEB 公司, T4 DNA 连接酶和逆转录试剂盒购于日本 TaKaRa 公司, DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司, TRIzol 购于美国 Ambion 公司, SYBR FAST qPCR Master Mix 购于美国 KAPA Biosystems 公司, 氯仿、异丙醇和无水乙醇购于国药集团化学试剂上海有限公司, PI/Rnase Staining Buffer Solution 和 Annexin V -PE/7 AAD 凋亡检测试剂盒购于美国 BD 公司, Bcl-2、Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、AKT、GAPDH 和 HRP 标记的山羊抗兔二抗购于中国 Bioswamp 公司, 磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 购于美国 CST 公司, PVDF 转移膜购于美国 Millipore 公司, Lipofectamine™ 2000 购于美国 Invitrogen 公司, 空载体 (vector)、pcDNA、linc00239 过表达质粒 (pcDNA-linc00239) 和干扰质粒 (sh-linc00239-1、sh-linc00239-2 和

sh-linc00239-3) 购于武汉华联科生物技术有限公司。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪和电泳仪 (型号: CFX-Connect 96) 购于美国 Bio-Rad 公司, 超微量分光光度计 (型号: Nano-300) 购于杭州奥盛仪器有限公司, 倒置荧光显微镜 (型号: DMIL LED) 购于德国 Leica 公司, 流式细胞仪 (型号: NovoCyte) 购于杭州安捷伦生物有限公司, 酶标仪 (型号: MK3) 购于芬兰雷勃公司。

1.2 细胞培养及转染 THP-1 细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。控制细胞密度为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1} \sim 4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 并在细胞生长至 $8 \times 10^5 \text{ mL}^{-1} \sim 1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 时进行传代。转染前 1 d 将生长状态良好的细胞均匀铺于 6 孔细胞培养板上, 细胞生长汇合至 70% 时, 按照 Lipofectamine™ 2000 说明书步骤进行细胞转染。转染过表达质粒时细胞分为 3 组: 对照组, 不做任何处理, 正常培养; pcDNA 组, 转染 pcDNA 质粒; pcDNA-linc00239 组, 转染 linc00239 过表达质粒。转染干扰质粒时细胞分为 5 组: 对照组、sh-NC 组、sh-linc00239-1 组、sh-linc00239-2 组和 sh-linc00239-3 组, 除对照组外分别转染不同 linc00239 干扰质粒。转染完成后培养 24 h, 采用 RT-qPCR 法检测各组细胞中 linc00239 表达水平, 验证转染效率。

1.3 实验分组和处理 将细胞分为对照组、vector 组、pcDNA-linc00239 组、sh-linc00239 组、vector+CD40L 组、pcDNA-linc00239+CD40L 组和 sh-linc00239+CD40L 组。按照分组方法转染细胞, 其中 CD40L 处理组均用 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CD40L 处理细胞 24 h^[10], 结束后采用 RT-qPCR 法检测各组细胞中 linc00239 表达水平。

1.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性 调整细胞悬液浓度, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 3×10^3 个细胞 (100 μL), 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁。按照“1.3”中的方法进行分组并处理细胞, 48 h 后取出培养板, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 培养 4 h 后采用酶联免疫检测仪测量 450 nm 波长处吸光度 (A) 值, 以 A 值代表细胞增殖活性。

1.5 流式细胞术检测各组不同细胞周期细胞百分率 收集各组 1×10^7 个细胞, 1 mL 培养基重悬, 400 g 离心 5 min, 弃上清, 300 μL PBS 缓冲液重悬沉淀; 加入 700 μL 无水乙醇, -20 °C 固定 24 h 以

上, 4 °C、700 g 离心 5 min, 弃上清; 1 mL 预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次后用 0.5 mL PI/Rnase Staining Buffer Solution 重悬细胞沉淀, 室温孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测细胞 DNA 含量, 确定细胞在各细胞周期所占百分率, 采用 NovoExpress 软件分析结果。

1.6 Annexin V-PE/7-AAD 染色结合流式细胞术检测各组细胞凋亡率 取 1×10^6 个培养基重悬的细胞, 400 g、4 °C 离心 5 min, 弃上清; 加入 1 mL 预冷 PBS 缓冲液, 混匀, 400 g、4 °C 离心 5 min, 弃上清; 200 μ L PBS 缓冲液重悬, 加入 5 μ L Annexin V-PE 和 5 μ L 7-AAD, 4 °C 避光孵育 30 min 后加入 300 μ L PBS 缓冲液, 立即采用流式细胞仪检测, NovoExpress 软件分析结果。细胞凋亡率 = 右上象限细胞百分率 + 右下象限细胞百分率。

1.7 RT-qPCR 法检测各组细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 测定 RNA 的纯度和浓度, 逆转录获得 cDNA, 进行 RT-qPCR 扩增。RT-qPCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。扩增体系: SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L, 总体积 20 μ L。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 扩增 95 °C、5 s, 56 °C、10 s, 72 °C、25 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence
Bcl-2	F: 5'-CTGGTGGACAACATCGC-3'
	R: 5'-GGAGAAATCAAACAGAGGC-3'
Bax	F: 5'-TTCAGGGGATGATTGCC-3'
	R: 5'-GCCTTGAGCACCAAGTTTG-3'
GAPDH	F: 5'-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3'
	R: 5'-GAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'

1.8 Western blotting 法检测各组细胞中 Bcl-2、Bax、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平 收集各组细胞, 取 1×10^6 个细胞按照蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白浓度, 蛋白变性冷却后每孔 20 μ g 加样进行电泳, PVDF 膜进行转

膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 4 °C 过夜, 加入一抗稀释液 (稀释比均为 1: 1 000), 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次后加入二抗 (稀释比为 1: 20 000), 膜室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次后进行曝光显影, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / GAPDH 蛋白条带灰度值, p-AKT / AKT 比值 = p-AKT 蛋白表达水平 / AKT 蛋白表达水平。

1.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞中 linc00239 表达水平, 各组细胞增殖活性、细胞凋亡率和不同细胞周期细胞百分率, 各组细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 及蛋白表达水平, 各组细胞中 p-AKT / AKT 比值, 均符合正态分布且方差齐, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

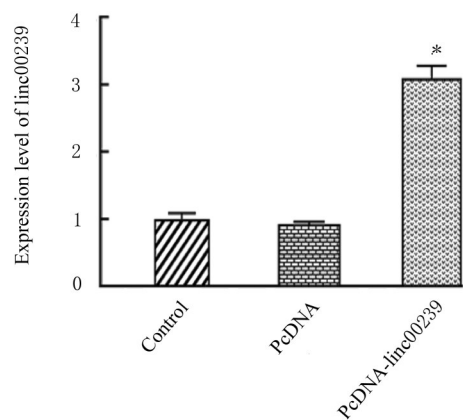
2 结果

2.1 linc00239 的转染效率 与 pcDNA 组比较, pcDNA-linc00239 组细胞中 linc00239 表达水平明显升高 ($P < 0.01$) (图 1A)。与 sh-NC 组比较, 各 sh-linc00239 组细胞中 linc00239 表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), 其中 sh-linc00239-1 组细胞中 linc00239 表达水平最低, 因此选择 sh-linc00239-1 进行后续实验 (图 1B)。

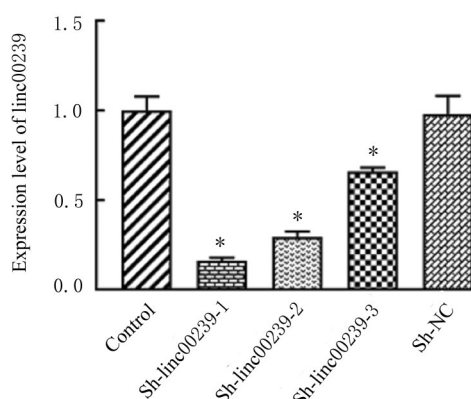
2.2 各组细胞中 linc00239 表达水平 与 vector 组比较, pcDNA-linc00239 组细胞中 linc00239 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), sh-linc00239 组和 vector+CD40L 组细胞中 linc00239 表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 pcDNA-linc00239 组比较, pcDNA-linc00239+CD40L 组细胞中 linc00239 表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 sh-linc00239 组比较, sh-linc00239+CD40L 组细胞中 linc00239 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组细胞增殖活性 与 vector 组比较, pcDNA-linc00239 组细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.01$), sh-linc00239 组和 vector+CD40L 组细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$); 与 pcDNA-linc00239 组比较, pcDNA-linc00239+CD40L 组细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$); 与 sh-linc00239 组比较, sh-linc00239+CD40L 组细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 各组不同细胞周期细胞百分率 与 vector 组



A



B

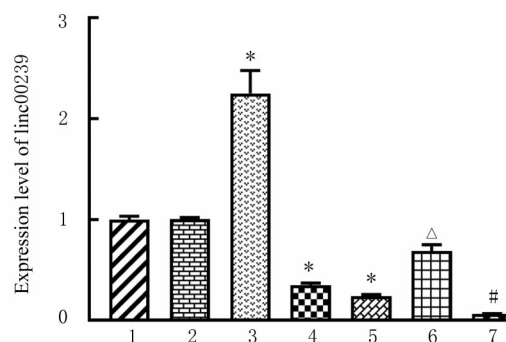
A: Expression level of linc00239 in cells transfected with pcDNA-linc00239 ($P < 0.01$ compared with pcDNA group); B: Expression level of linc00239 in cells transfected with sh-linc00239 ($P < 0.01$ compared with sh-NC group).

图1 各组细胞linc00239转染效率

Fig. 1 Transfection efficiencies of linc00239 in cells in various groups

比较, pcDNA-linc00239组G₁期细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$), G₂期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), sh-linc00239组和vector+CD40L组G₁期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), G₂期细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$); 与pcDNA-linc00239组比较, pcDNA-linc00239+CD40L组G₁期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), G₂期细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$); 与sh-linc00239组比较, sh-linc00239+CD40L组G₁期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$), G₂期细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$)。见图4和5。

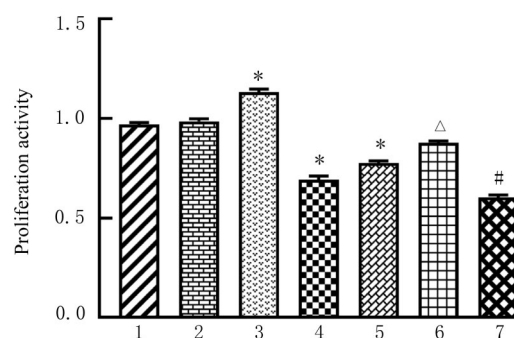
2.5 各组细胞凋亡率 与vector组 (9.73%±0.31%) 比较, pcDNA-linc00239组细胞凋亡率 (3.94%±0.45%) 明显降低 ($P < 0.01$),



1: Control group; 2: Vector group; 3: PcDNA-linc00239 group; 4: Sh-linc00239 group; 5: Vector+CD40L group; 6: PcDNA-linc00239+CD40L group; 7: Sh-linc00239+CD40L group. * $P < 0.01$ compared with vector group; [△] $P < 0.01$ compared with pcDNA-linc00239 group; # $P < 0.05$ compared with sh-linc00239 group.

图2 各组细胞中linc00239表达水平

Fig. 2 Expression levels of linc00239 in cells in various groups



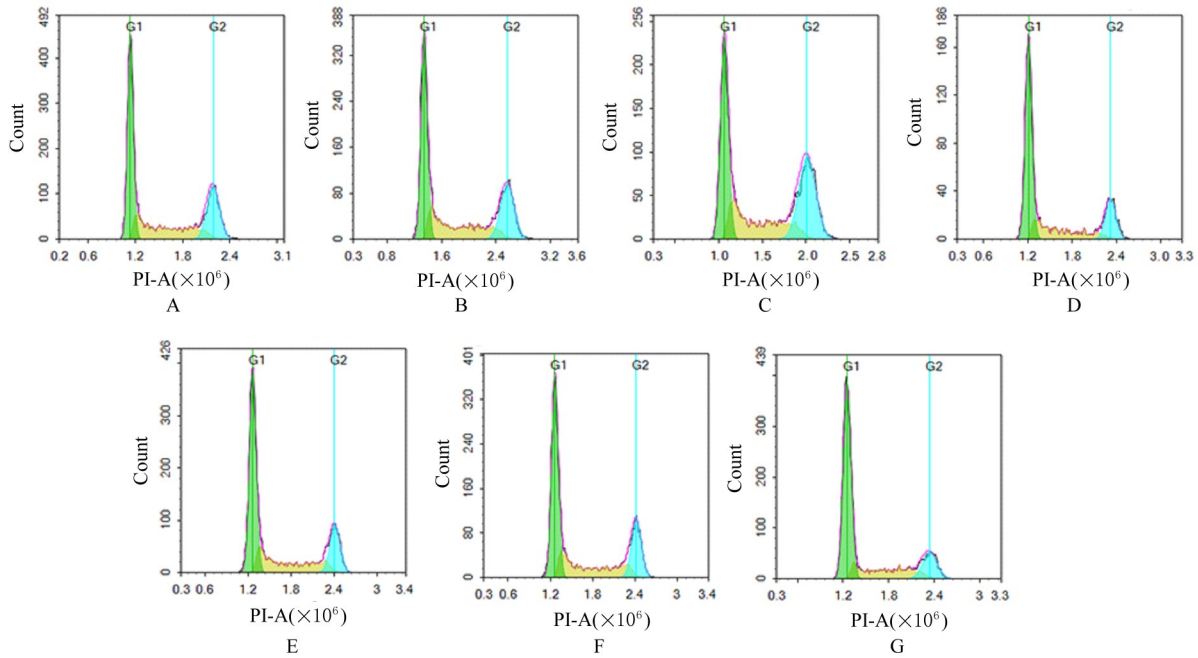
1: Control group; 2: Vector group; 3: PcDNA-linc00239 group; 4: Sh-linc00239 group; 5: Vector+CD40L group; 6: PcDNA-linc00239+CD40L group; 7: Sh-linc00239+CD40L group. * $P < 0.01$ compared with vector group; [△] $P < 0.01$ compared with pcDNA-linc00239 group; # $P < 0.01$ compared with sh-linc00239 group.

图3 各组细胞增殖活性

Fig. 3 Proliferation activities of cells in various groups

sh-linc00239组和vector+CD40L组细胞凋亡率 (28.73%±0.87%和21.87%±0.68%) 明显升高 ($P < 0.01$); 与pcDNA-linc00239组比较, pcDNA-linc00239+CD40L组细胞凋亡率 (13.73%±0.70%) 明显升高 ($P < 0.01$); 与sh-linc00239组比较, sh-linc00239+CD40L组细胞凋亡率 (36.67%±2.15%) 明显升高 ($P < 0.01$)。见图6。

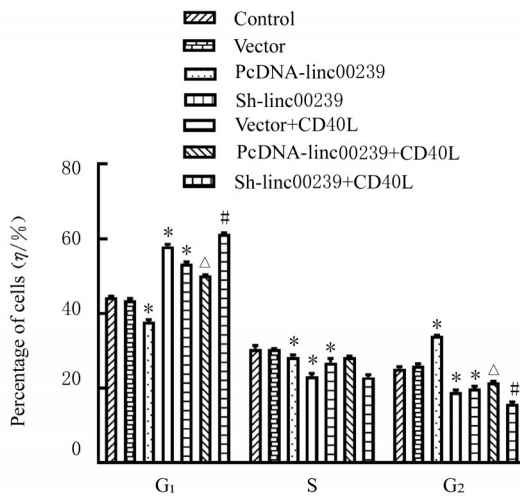
2.6 各组细胞中Bcl-2和Bax mRNA及蛋白表达水平 与vector组比较, pcDNA-linc00239组细胞中Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平明显升高 ($P <$



A: Control group; B: Vector group; C: PcDNA-linc00239 group; D: Sh-linc00239 group; E: Vector+CD40L group; F: PcDNA-linc00239+CD40L group; G: Sh-linc00239+CD40L group.

图4 流式细胞术检测各组不同细胞周期细胞百分率

Fig. 4 Percentages of cells at different cell cycles in various groups detected by flow cytometry



* $P < 0.05$ compared with vector group; $\Delta P < 0.05$ compared with pcDNA-linc00239 group; # $P < 0.05$ compared with sh-linc00239 group.

图5 各组不同细胞周期细胞百分率

Fig. 5 Percentages of cells at different cell cycles in various groups

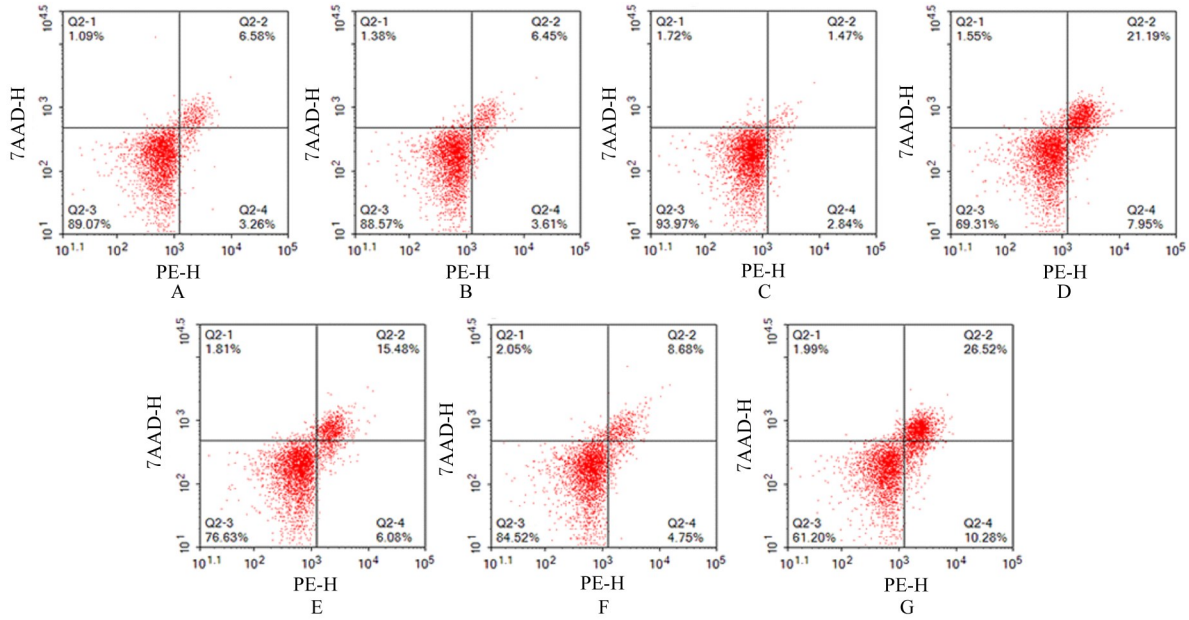
0.05 或 $P < 0.01$), Bax mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), sh-linc00239 组和 vector+CD40L 组细胞中 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), Bax mRNA 和蛋白

表达水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与 pcDNA-linc00239 组比较, pcDNA-linc00239+CD40L 组细胞中 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), Bax mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 sh-linc00239 组比较, sh-linc00239+CD40L 组细胞中 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bax mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见图 7 和表 2。

2.7 各组细胞中 p-AKT/AKT 比值 与 vector 组比较, pcDNA-linc00239 组细胞中 p-AKT/AKT 比值明显升高 ($P < 0.01$), sh-linc00239 组和 vector+CD40L 组细胞中 p-AKT/AKT 比值明显降低 ($P < 0.01$); 与 pcDNA-linc00239 组比较, pcDNA-linc00239+CD40L 组细胞中 p-AKT/AKT 比值明显降低 ($P < 0.01$); 与 sh-linc00239 组比较, sh-linc00239+CD40L 组细胞中 p-AKT/AKT 比值明显降低 ($P < 0.01$)。见图 8。

3 讨论

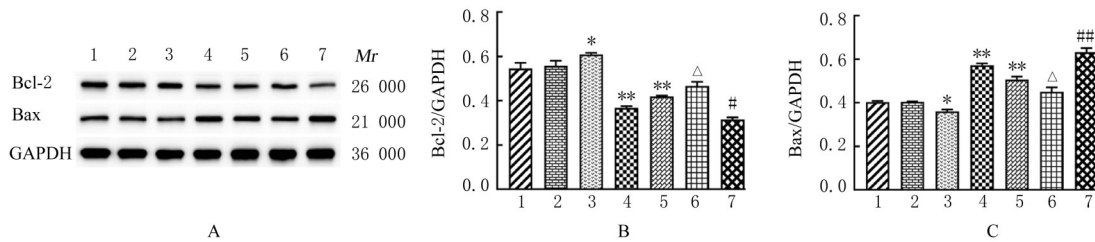
近年来,随着肿瘤免疫学研究的深入,不断涌现出许多新的免疫治疗策略,肿瘤的免疫治疗取得快速发展。目前与白血病治疗相关的研究热点是白血病特异性靶抗原的鉴定和通过靶抗原抑制肿瘤微



A: Control group; B: Vector group; C: PcDNA-linc00239 group; D: Sh-linc00239 group; E: Vector+CD40L group; F: PcDNA-linc00239+CD40L group; G: Sh-linc00239+CD40L group.

图6 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig. 6 Apoptotic rates of cells in various groups detected by flow cytometry



Lane 1: Control group; Lane 2: Vector group; Lane 3: PcDNA-linc00239 group; Lane 4: Sh-linc00239 group; Lane 5: Vector+CD40L group; Lane 6: PcDNA-linc00239+CD40L group; Lane 7: Sh-linc00239+CD40L group; 1: Control group; 2: Vector group; 3: PcDNA-linc00239 group; 4: Sh-linc00239 group; 5: Vector+CD40L group; 6: PcDNA-linc00239+CD40L group; 7: Sh-linc00239+CD40L group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vector group; $\Delta P < 0.01$ compared with pcDNA-linc00239 group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with sh-linc00239 group.

图7 各组细胞中Bcl-2和Bax蛋白表达电泳图(A)和直条图(B, C)

Fig. 7 Electrophoregram(A) and histograms (B, C) of expressions of Bcl-2 and Bax proteins in cells in various groups

环境的免疫逃逸^[11], 因此探索新的白血病治疗靶点和免疫疗法对于AML的治疗具有重要的现实意义。本研究探讨CD40L对THP-1细胞增殖、凋亡和PI3K/AKT信号通路的影响及可能机制。

lncRNA在肿瘤的发生、转移和侵袭中起着至关重要的作用^[12-13]。linc00239是AML细胞的新型肿瘤启动子, 并可作为一种潜在的治疗靶点^[9]。本研究结果显示: 过表达linc00239能够提高THP-1细胞的增殖能力, 而沉默linc00239的表达可降低THP-1细胞的增殖能力, 表明linc00239对THP-1

细胞的增殖具有促进作用, 与前期研究结果一致; THP-1细胞沉默linc00239后再用CD40L处理可使其增殖能力进一步降低, 而过表达linc00239后再用CD40L处理则逆转了其对细胞增殖的促进作用, 且CD40L能够抑制细胞中linc00239的表达, 表明CD40L能够通过下调linc00239抑制THP-1细胞的增殖。

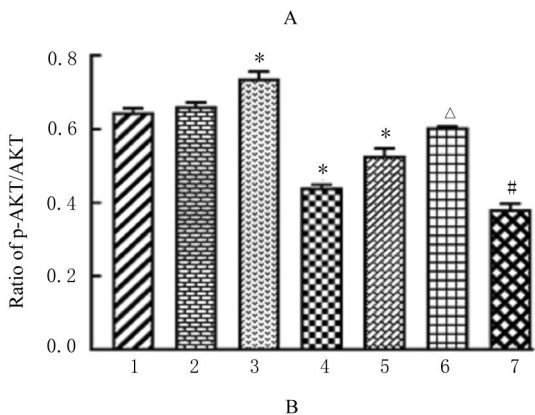
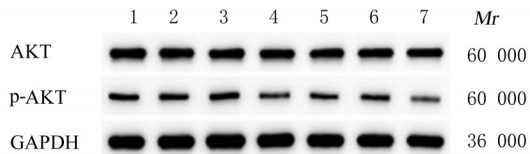
细胞周期分为间期(G₁、S及G₂期)和分裂期(M期)2个阶段, 细胞周期的调节主要通过G₁期的阻滞来实现^[14]。本研究结果显示: 过表达

表 2 各组细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平

Tab. 2 Expression levels of Bcl-2 and Bax mRNA in cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
Control	1.00±0.05	1.00±0.03
Vector	1.00±0.04	1.17±0.08
PcDNA-linc00239	1.80±0.06*	0.17±0.01*
Sh-linc00239	0.26±0.04*	5.18±0.44*
Vector+CD40L	0.22±0.01*	3.70±0.24*
PcDNA-linc00239+CD40L	0.46±0.03 [△]	2.07±0.12 [△]
Sh-linc00239+CD40L	0.05±0.01 [#]	7.52±0.14 [#]

* $P<0.01$ compared with vector group; [△] $P<0.01$ compared with pcDNA-linc00239 group; [#] $P<0.01$ compared with sh-linc00239 group.



Lane 1: Control group; Lane 2: Vector group; Lane 3: PcDNA-linc00239 group; Lane 4: Sh-linc00239 group; Lane 5: Vector+CD40L group; Lane 6: PcDNA-linc00239+CD40L group; Lane 7: Sh-linc00239+CD40L group; 1: Control group; 2: Vector group; 3: PcDNA-linc00239 group; 4: Sh-linc00239 group; 5: Vector+CD40L group; 6: PcDNA-linc00239+CD40L group; 7: Sh-linc00239+CD40L group. * $P<0.01$ compared with vector group; [△] $P<0.01$ compared with pcDNA-linc00239 group; [#] $P<0.01$ compared with sh-linc00239 group.

图 8 各组细胞中 AKT 和 p-AKT 蛋白表达电泳图(A) 及 p-AKT/AKT 比值直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram(A) of expressions of AKT and p-AKT proteins and histogram (B) of ratio of p-AKT/AKT in cells in various groups

linc00239 能够明显降低 G₁ 期细胞百分率, 而抑制 linc00239 的表达则会明显升高 G₁ 期细胞百分率,

表明 linc00239 能够减少 G₁ 期阻滞, 对细胞的生长具有促进作用; CD40L 处理沉默 linc00239 的 THP-1 细胞后 G₁ 期细胞百分率进一步升高, 而 CD40L 处理过表达 linc00239 的 THP-1 细胞后能够逆转其对细胞生长的促进作用, 表明 CD40L 能够通过 linc00239 抑制 THP-1 细胞的生长。细胞凋亡和自噬是维持组织稳态的主要因素, 凋亡和自噬的失调会促进肿瘤的发生和发展^[15-16]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 能够通过抑制促凋亡蛋白 Bax 来阻断程序性细胞死亡而不影响细胞增殖^[17]。Bcl-2 和 Bax 之间的平衡关系决定了细胞凋亡的发生^[18]。本研究结果显示: 过表达 linc00239 能够抑制细胞凋亡, 上调 Bcl-2 表达并下调 Bax 表达, 而抑制 linc00239 的表达后结果与之相反, 表明 linc00239 能够抑制 THP-1 细胞的凋亡; 沉默 linc00239 后再用 CD40L 处理, 细胞凋亡率进一步升高, 而 CD40L 处理过表达 linc00239 的 THP-1 细胞能够逆转 linc00239 对细胞凋亡的抑制作用, 表明 CD40L 能够通过 linc00239 促进 THP-1 细胞凋亡。

PI3K/AKT 信号通路参与肿瘤的分化、转移、侵袭和血管生成等过程, 在白血病的发生发展过程中也发挥重要作用^[19-20]。PI3K 激活后发生磷酸化并激活 AKT, AKT 是一种原癌基因, 可调控不同细胞的生长、增殖和代谢等^[21-22]。研究^[9]表明: linc00239 与 PI3K/AKT 信号通路的激活有关, linc00239 可作为 PI3K/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路激活剂发挥作用。本研究结果显示: 过表达 linc00239 能够提高 AKT 蛋白的磷酸化水平, 而抑制 linc00239 的表达会降低 AKT 蛋白的磷酸化水平, 表明 linc00239 能够促进 AKT 蛋白磷酸化; CD40L 处理沉默 linc00239 的 THP-1 细胞后, 细胞中 AKT 蛋白的磷酸化水平进一步降低, 而 CD40L 可逆转过表达 linc00239 对 THP-1 细胞中 AKT 蛋白磷酸化的促进作用, 表明 CD40L 能够通过 linc00239 抑制 AKT 蛋白的磷酸化, 进而抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活。

综上所述, CD40L 可通过 linc00239 抑制 THP-1 细胞增殖和细胞周期进展, 并诱导细胞凋亡。本研究为 AML 的临床治疗提供了理论依据, 但其具体作用机制仍需进一步研究。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

封忠昕参与实验设计、数据整理、统计学分析和论文撰写,李梅参与实验操作、数据收集和论文审校。

[参考文献]

- [1] NEWELL L F, COOK R J. Advances in acute myeloid leukemia[J]. *BMJ*, 2021, 375: n2026.
- [2] DINARDO C, LACHOWIEZ C. Acute myeloid leukemia: from mutation profiling to treatment decisions [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, 14 (5): 386-394.
- [3] TAKAMI A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2018, 107(5): 513-518.
- [4] KARNELL J L, RIEDER S A, ETTINGER R, et al. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 141: 92-103.
- [5] 封忠昕, 陈琦, 王永伦, 等. 可溶性CD40配体对白血病HL-60细胞Caspase-3及Caspase-8表达的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(19): 1287-1290.
- [6] 封忠昕, 陈琦, 闵迅, 等. 可溶性CD40配体对白血病THP-1细胞的影响及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(14): 3472-3474.
- [7] FENG Z X, CHEN Q, REN M Q, et al. CD40L inhibits cell growth of THP-1 cells by suppressing the PI3K/Akt pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3011-3017.
- [8] FENG Z X, CHEN Q. Raised CD40L expression attenuates drug resistance in Adriamycin-resistant THP-1 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 2188-2194.
- [9] YANG Y T, DAI W S, SUN Y W, et al. Long non-coding RNA linc00239 promotes malignant behaviors and chemoresistance against doxorubicin partially via activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in acute myeloid leukaemia cells[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4): 2311-2320.
- [10] 封忠昕, 陈琦, 王季石, 等. 可溶性CD40配体对白血病THP-1细胞生物学影响及机制研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(10): 690-694.
- [11] SAUER T, ROONEY C M. Current challenges for CAR T-cell therapy of acute myeloid leukemia [J]. *Transfusion*, 2019, 59(4): 1171-1173.
- [12] LIN W Y, ZHOU Q Y, WANG C Q, et al. LncRNAs regulate metabolism in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(7): 1194-1206.
- [13] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(41): 5661-5667.
- [14] DONJERKOVIC D, SCOTT D W. Regulation of the G₁ phase of the mammalian cell cycle [J]. *Cell Res*, 2000, 10(1): 1-16.
- [15] YANG R, DONG H, JIA S, et al. Resveratrol as a modulatory of apoptosis and autophagy in cancer therapy[J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(7): 1219-1230.
- [16] DAS S, SHUKLA N, SINGH S S, et al. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer[J]. *Apoptosis*, 2021, 26(9/10): 512-533.
- [17] RAHMANI M, NKWOCHA J, HAWKINS E, et al. Cotargeting BCL-2 and PI3K induces BAX-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 3075-3086.
- [18] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34.
- [19] LIU L, YANG L, LIU X J, et al. SEMA4D/PlexinB1 promotes AML progression via activation of PI3K/Akt signaling[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 304.
- [20] LIU H C, HUSSAIN Z, XIE Q Q, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway to enhance the anti-leukemia efficacy of venetoclax[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 417(2): 113192.
- [21] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [22] 张靖, 冯晓杰, 白惠娟. lncRNA PTPRG-AS1通过调控PI3K/Akt信号通路对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(2): 275-279.