

早幼粒细胞白血病蛋白在髓系白血病中的表达 及其对慢性粒细胞白血病增殖的影响分析

苏梅芳

(黄冈市中心医院血液科,湖北 黄冈 438000)

摘要:**目的** 探讨早幼粒细胞白血病(PML)蛋白在髓系白血病中的表达情况及其对慢性粒细胞白血病细胞增殖的抑制作用。**方法** 收集髓系白血病患者(髓系白血病组)60例,非肿瘤性血液病患者(对照组)15例,患者骨髓制备石蜡切片,采用免疫荧光技术观察PML在细胞内的分布和表达;提取骨髓单核细胞总RNA,采用逆转录聚合酶链反应观察PML mRNA的表达情况;提取骨髓总蛋白,采用蛋白质印迹法(Western Blot)观察PML蛋白的表达情况;K562细胞分别转染空质粒(MSCV组)、截短失活PML(DN组)和野生型PML(Wt组),测定PML基因对K562细胞增殖和集落产生的影响。**结果** 非肿瘤性血液病患者的PML表达聚集在细胞核内,而髓系白血病患者的PML分散表达在细胞核和胞质内;髓系白血病组PML mRNA水平 0.356 ± 0.092 显著低于对照组的表达 0.536 ± 0.066 ($t = 7.11, P < 0.01$);髓系白血病组PML蛋白相对表达水平 0.189 ± 0.032 显著低于对照组 0.323 ± 0.025 ($t = 16.10, P < 0.01$);DN(转染截短失活PML)组、MSCV(转染空质粒)组和Wt(转染野生型PML)组在450 nm波长下吸光度值(Optical Density₄₅₀, OD₄₅₀)和集落生成单位(Colony-Forming Units, CFU)的数据均差异有统计学意义($F = 34.28, 25.39, P < 0.05$), q 检验结果显示,均为Wt组的数值低于DN组和MSCV组。**结论** 髓系白血病患者中PML蛋白表达水平下降导致细胞异常增殖可能是其发病机制。

关键词: 髓淋巴细胞性白血病蛋白质;白血病,髓样;K562细胞;白血病,粒-单核细胞,慢性;细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.019

Expression of promyelocytic leukemia protein in myeloid leukemia and its effect on the proliferation of chronic myelocytic leukemia

SU Meifang

(Department of Hematology, Huanggang Central Hospital, Huanggang, Hubei 438000, China)

Abstract:**Objective** To investigate the expression of promyelocytic leukemia (PML) protein in myeloid leukemia and its inhibitory effect on the proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. **Methods** 60 cases of myeloid leukemia (myeloid leukemia group) and 15 cases of non neoplastic hematopathy (control group) were collected. Paraffin sections were prepared from patients' bone marrow, and the distribution and expression of PML in the cells were observed by immunofluorescence technique. The total RNA of bone marrow mononuclear cells was extracted, and the expression of PML mRNA was observed by reverse transcription polymerase chain reaction. The total protein of bone marrow was extracted and the expression of PML protein was observed by Western blot test. K562 cells were transfected into empty plasmids (group MSCV), truncated inactivated PML (DN group) and wild type PML (Wt group), and the effects of PML gene on the proliferation and colony formation of K562 cells were measured. **Results** The expression of PML in patients with non-tumor hematological disease concentrated in the nucleus, while the PML of the myeloid leukemia patients was distributed in the nucleus and cytoplasm. The level of PML mRNA in myeloid leukemia group was significantly lower than that in the control group (0.356 ± 0.092 vs $0.536 \pm 0.066, t = 7.11, P < 0.01$). The relative expression level of PML protein in myeloid leukemia group was significantly lower than that in the control group (0.189 ± 0.032 vs $0.323 \pm 0.025, t = 16.10, P < 0.01$). In DN group (transfected

[15] DULUCQ JL, WINTRINGER P, STABILINI C, et al. Laparoscopic and open gastric resections for malignant lesions: A prospective comparative study [J]. Surgical Endoscopy, 2005, 19 (7): 933-938.

[16] HOSONO S, ARIMOTO Y, OHTANI H, et al. Meta-analysis of short-term outcomes after laparoscopy-assisted distal gastrectomy [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12 (47): 7676-7683.

[17] 李国新, 陈韬. 腹腔镜胃癌远端胃切除术后消化道重建术式选择[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2014, 8 (4): 292-

295. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-3946-2014.04.084

[18] 季加孚, 季鑫. 胃癌根治术后消化道重建的原则与进展[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2014, 8 (4): 285-288. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-3946-2014.04.082

[19] ZUIKI T, HOSOYA Y, KANEDA Y, et al. Stenosis after use of the double-stapling technique for reconstruction after laparoscopy-assisted total gastrectomy [J]. Surg Endosc, 2013, 27 (10): 3683-3689.

(收稿日期:2016-10-23, 修回日期:2018-04-09)

truncated inactivated PML), MSCV group (transfected empty plasmid) and Wt group (transfected with wild type PML), a wavelength of 450nm optical density value (Optical Density450, OD450) and colony forming units (Colony-Forming, Units, CFU) data had significant differences ($F=34.28, 25.39, P<0.05$). The results of q test showed that the values of Wt group were lower than those of DN and MSCV groups. **Conclusions** The decrease of PML protein expression leading to abnormal cell proliferation in patients with myeloid leukemia may be its pathogenesis.

Keywords: Myeloid-lymphoid leukemia protein; Leukemia, myeloid; K562 cells; Leukemia, myelomonocytic, chronic; Cell proliferation

髓系白血病是一个有着不同种类的染色体异常和基因突变的克隆性疾病。针对该种疾病的分子学研究, 目前是热点之一。在人体的正常细胞内, 早幼粒细胞白血病(PML)蛋白以一种不连续的点状方式分布在细胞核内, 被称之为核体(nuclear bodies), 而且 PML 蛋白也是细胞生长和转化的抑制蛋白^[1-2]。研究表明 PML 蛋白具有抗肿瘤特性, 它在许多肿瘤的形成中起重要作用^[3-4]。PML 蛋白在急性早幼粒细胞白血病中发挥了重要作用, 但 PML 是否在其他髓系白血病中也发挥了类似作用, 尚没有明确证明。本研究分别通过免疫荧光、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹法(Western Blot)和转染等方法观察 PML 在髓系白血病中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料 所有样品均来源于 2012 年 1 月至 2013 年 12 月黄冈市中心医院收治的髓系白血病的样品, 所有的病例均经过临床、细胞形态学、免疫学及组织化学染色等方法确诊。髓系白血病患者共 60 例, 其中初治患者 41 例, 完全缓解患者 19 例。髓系白血病患者中男性 38 例, 女性患者 22 例, 年龄范围 17~68 岁, 中位年龄为 39 岁。M2 患者 21 例, M3 患者 25 例, M5 患者 14 例。对照组选取黄冈市中心医院非肿瘤性血液病患者(如溶血性贫血、缺铁性贫血等)15 例, 其中男性 10 例, 女性 5 例, 年龄范围 20~59 岁, 中位年龄为 36 岁。所有患者均签署了知情同意书, 并通过黄冈市中心医院医学伦理委员会审核。

K562 细胞来源于慢性粒细胞白血病病人的细胞系, 培养于 37℃ 5% 二氧化碳培养箱。

1.2 主要仪器和试剂 PML 兔抗人单克隆抗体(美国 Abcam 公司); 梯度聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增仪、细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK8) (美国 Sigma 公司); 禽类成髓细胞瘤病毒(Avian Myeloblastosis Virus, AMV)逆转录试剂盒、DNA 标记(Marker)、预混合水生栖热菌(Premix Thermus Aquaticus, Premix Taq)酶及热启动水生栖热菌(Hot start Thermus

Aquaticus, Hot start Taq)酶(美国 Takara 公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗二抗(美国 SantaCruz 公司); Trizol RNA 抽提试剂盒、洛斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RPMI)1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 石蜡切片机(德国 SM 公司); 荧光显微镜 EX60(日本 OLYMPS); 贝克曼 DU800 紫外分光光度计(美国贝克曼公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 免疫荧光 所有患者的骨髓均制备成厚度 2 μm 至 3 μm 的石蜡切片, 60℃ 烤片, 脱蜡, 复水, 抗原修复后封闭, 一抗孵育过夜(1:50), 再荧光二抗(DyLight 594 红色荧光二抗)避光孵育 1 h, 封片, 观察。

收集所有患者的骨髓单核细胞并提取细胞总 RNA, 采用逆转录试剂盒合成 cDNA。依据文献^[3]设计 PML mRNA 引物, 上海生工工程公司合成。RT-PCR 扩增基因。见表 1。反应结束后, 取 50 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 紫外灯下观察并照相。

表 1 引物序列

类型	5'端引物	3'端引物	长度
PML	5'- CTCAGATGCC- GAAAACTCG-3'	5'- CCTGCACT- T CTTTTT-3'	238 bp
β-actin	5'-CCCTGGACTTCGA- GCAA GAGAT-3'	5'-GTTTTCCTGCC- CAAGTTAGG-3'	531 bp

1.3.2 蛋白质印迹法检测 所有样本裂解 1 h, 12 000 r·min⁻¹、4℃ 离心 30 min, 收集上清。总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-page)分离, 蛋白电转移聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗室温孵育 1 h, Tris 缓冲吐温 20 生理盐水(Tris-buffered Saline with Tween 20, TBST)缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 通过增强化学发光法(enhanced

chemilum inescence,ECL)方法显色。

1.3.3 PML 对 K562 细胞增殖和集落形成的影响 MSCV 组为转染空质粒,DN 组为转染截短失活 PML,Wt 组为转染野生型 PML, MSCV/puro-PML-WT 和 MSCV/puro-PML-DN 真核表达质粒;以 pDONR223-PML 质粒为模板,分别以 P1/P2 和 P1/P3 为引物,通过 PCR 扩增获得全长 PML(fgfr3-WT)和 PML-DN;按 Lipofectamine™2000(Invitrogen)说明书操作转染,通过 PCR 和蛋白质印迹法检测 PML 的表达情况^[4]。将稳定转染的 PML-WT 和 PML-DN 的 K562 细胞的细胞浓度调整为 $5 \times 10^6 \cdot L^{-1}$,CCK8 法测定细胞的增殖情况。将对数生长期的稳定转染 PML-WT 和 PML-DN 的 K562 细胞接种于 6 孔板中,恒温孵育 7 d,瑞氏姬姆萨试剂染色,光镜下计数,总集落形成率=(总细胞集落数/接种细胞数)×500。

1.4 统计学方法 本组研究中所有数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 *t* 检验,三组及以上比较采用方差分析,若结果阳性,则利用 *q* 检验进行两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PML 蛋白在髓系白血病患者和非肿瘤性血液病患者的免疫荧光染色 PML 蛋白主要表达在细胞核内,髓系白血病患者核内及胞质内可见大量弥散分布的针尖样细小荧光颗粒,非肿瘤性血液病患者 PML 蛋白主要表达在细胞核内,聚集表达,荧光较为明显,胞质内原有的针尖样颗粒消失。

2.2 PML 蛋白在对照组和髓系白血病患者中的表达差异 PT-PCR 结果显示:60 例髓系白血病均表达 PML 蛋白。Quantity one 软件对 PML mRNA 表达水平进行量化,对照组 15 例 PML mRNA 表达相对量(A 值)为 0.536 ± 0.066 ,髓系白血病组 60 例 PML mRNA 表达相对量为 0.356 ± 0.092 ,髓系白血病组 PML mRNA 水平显著低于对照组($t = 7.11, P < 0.01$);初诊组 41 例 PML mRNA 表达相对量为 0.284 ± 0.022 。

采用 Band Leader 软件计算 PML 蛋白相对表达水平,以最大灰度值作为 1,其它条带与其灰度值比值为其相对表达量。对照组 PML 蛋白相对表达水平为 0.323 ± 0.025 ,髓系白血病组 PML 蛋白相对表达水平为 0.189 ± 0.032 ,髓系白血病组 PML 蛋白相对表达水平显著低于对照组($t = 16.10, P < 0.01$);初诊组 PML 蛋白相对表达水平为 0.139 ± 0.041 ,完全缓解组 PML 蛋白相对表达水平为

0.186 ± 0.017 ,初诊组 PML 蛋白相对表达水平显著低于完全缓解组($t = 4.40, P < 0.01$)。

2.3 PML 对 K562 细胞增殖的影响 MSCV 组,DN 组和 Wt 组在 450 nm 波长下吸光度值(Optical Density450,OD450)和集落生成单位(Colony-Forming Units,CFU)的数据均差异有统计学意义($F = 34.28, 25.39, P < 0.05$),*q* 检验结果显示,均为 Wt 组的数值低于 DN 组和 MSCV 组。见表 2。

表 2 PML 对 K562 细胞增殖和克隆的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	OD450	CFU/500 细胞
MSCV	6	1.12 ± 0.23^{bc}	256 ± 23^{bc}
DN	6	1.07 ± 0.31^{bc}	247 ± 34^{bc}
Wt	6	0.68 ± 0.26^a	158 ± 17^a
<i>F</i> 值		34.28	25.39
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:MSCV 组为转染空质粒,DN 组为转染截短失活 PML,Wt 组为转染野生型 PML;*q* 检验结果:与 MSCV 组相比,^a $P < 0.05$;与 DN 组相比,^b $P < 0.05$;与 Wt 组相比,^c $P < 0.05$

3 讨论

髓系白血病是成人急性白血病中最常见的类型,由于白血病细胞的增殖失控、分化障碍、凋亡受阻,使细胞停滞在较早的发育阶段,最终导致白血病的发生。目前化疗可以使 70%~80% 的患者病情得到缓解,但大多数患者缓解后会复发,进展为难治性白血病^[5-6]。因此寻找对预后分析评价有意义的基因及蛋白具有重要意义。随着基因芯片、PCR 等生物学技术的发展,多种蛋白、基因的过度表达与急性髓细胞性白血病发展及预后不良相关,如 BAALC、MNI、乳腺癌耐药蛋白、ERG 等^[7-8]。

PML 是近年来研究较多的凋亡相关蛋白,PML 参与了多个凋亡途径,PML 基因敲除后的小鼠细胞在受到 Fas、IFN、TNF、神经酰胺(ceramide)和电离辐射诱导后均无法凋亡^[9-11]。PML 蛋白是一种十分稳定的蛋白,控制着细胞的增殖、肿瘤基因及造血细胞的分化过程^[12]。在多种研究中表明,PML 在肿瘤形成中有重要的作用,转染 PML 将导致肿瘤的凋亡^[13]。在早幼粒细胞白血病中,PML-RAR α 融合蛋白与 PML 蛋白形成二聚体,而干扰了其功能而导致了疾病的发生^[14]。骨髓髓系祖细胞中 PML 高表达,PML 在细胞核内呈现分散的斑点状分布,在本研究中发现正常人的 PML 表达与该研究类似,PML 荧光大量表达且分散分布,而髓系白血病患者 PML 表达下降,且呈针点状分布^[15]。

本组研究中,60 例髓系白血病患者均表达 PML

蛋白,髓系白血病组 PML mRNA 水平显著低于对照组,并且初诊组 PML mRNA 水平显著低于完全缓解组。通过比较正常人和患者之间的 PML 蛋白含量可以发现,髓系白血病患者 PML 蛋白的表达显著下降,完全缓解组 PML 蛋白相对表达水平显著低于完全缓解组,提示 PML 蛋白对髓系白血病的诊断和病情评估具有重要的参考价值。髓系白血病中 PML 扮演了何种生物功能,为此我们将 PML 基因转染入 K562 白血病细胞株,观察转染和未转染的 K562 细胞增殖和克隆能力,结果显示转染 PML 基因后,K562 的增殖和克隆能力显著下降。由此可推断 PML 基因高表达于正常骨髓髓系祖细胞中,可抑制细胞的异常增殖,而 PML 的异常表达减少,可能会导致髓系原始细胞克隆性恶性增殖,其作用机制可能类似于早幼粒细胞白血病中 PML-RAR α 融合蛋白与 PML 蛋白二聚体的形成。

总之,髓系白血病患者中 PML 蛋白表达水平下降导致细胞异常增殖可能是其发病机制。PML 是一种潜在的抑癌基因,可以通过调节相关功能蛋白的活性而影响髓系白血病及慢性粒细胞性白血病细胞的增殖和凋亡。对 PML 蛋白的调控机制进行深入研究,可以进一步阐明白血病的发病机制。

参考文献

- [1] 吴洁,邱玲,程倩,等. 早幼粒细胞白血病蛋白在髓系白血病细胞中的表达及对细胞增殖的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2013,36(5):395-399.
- [2] 于伟,张向阳. 早幼粒细胞白血病蛋白核体的结构形成及功能研究进展[J]. 济宁医学院学报,2016,39(6):381-386.
- [3] 赵旭杰,朱雪花,张济,等. 早幼粒白血病-维甲酸受体 α 融合蛋白对 RIAM 基因转录的负调控作用探讨[J]. 肿瘤,2012,32(10):767-774.

- [4] 阳小群,王慧,蒋开玲,等. 腺病毒介导的 PML(NLS-)过表达对白血病 NB4 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 基础医学与临床, 2014,34(10):1327-1332.
- [5] 王欣,刘林,陈建斌,等. PML-RAR α 融合基因 BCR3 亚型急性早幼粒细胞白血病的临床研究[J]. 重庆医学,2013,(28):3382-3384,3387.
- [6] 丁士华,秦慧,翟志敏,等. 实时定量 PCR 监测急性早幼粒细胞白血病患者 PML/RAR α 融合基因的临床意义[J]. 山东医药,2014,54(1):34-36.
- [7] 邓守恒,李林均,蔡晓军,等. 硒化壳聚糖通过下调 PML-RAR α 融合蛋白对急性早幼粒白血病 NB4 细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中国老年学杂志,2011,31(6):1000-1001.
- [8] 李娜,蓝祖连,何焱玲,等. 早幼粒细胞白血病基因在寻常性银屑病患者外周血淋巴细胞中表达的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2012,45(11):796-798.
- [9] 韩兰秀,林江,周剑波,等. 51 例 APL 患者 PML/RAR α mRNA 转录本的检测及其意义[J]. 重庆医学,2012,41(1):1-3,7.
- [10] 谢杏仪,黎毓光,韩泽平,等. Hsa-miR-203 联合伊马替尼对慢性粒细胞白血病 K562 细胞的作用[J]. 安徽医药,2013,17(10):1764-1766.
- [11] 陆伟,秦燕,丁润生,等. 实时定量 RT-PCR 检测 PML-RAR α 融合基因诊断 APL 的临床价值[J]. 山东医药,2011,51(33):13-15.
- [12] 陈莹莹,曾庆曙. TKI 治疗慢性粒细胞白血病慢性期的新目标转换[J]. 安徽医药,2014,18(11):2021-2024.
- [13] 夏亮,夏瑞祥,曾庆曙,等. 二代酪氨酸激酶抑制剂治疗慢性粒细胞性白血病继发 T315I 突变 1 例报道及分析[J]. 安徽医药,2013,17(5):843-844.
- [14] 郑全辉,张爱红,郑爱华,等. DNA 甲基化通过锌指蛋白 185 调控慢性粒细胞白血病细胞的增殖[J]. 生物化学与生物物理进展,2013,40(1):64-71.
- [15] 成志勇,王亚丽,王凤云,等. PTEN 对髓系白血病细胞 VEGF 及 MMP 表达的影响[J]. 基础医学与临床,2014,34(2):190-195.

(收稿日期:2017-03-23,修回日期:2018-04-16)

《安徽医药》关于文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位实行国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》,并以单位符号表示,具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时,应采用负数幂的形式表示,如 ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不采用 $\text{ng/kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。