

CALR基因在MDS患者中的表达及其对 细胞生长和凋亡的影响

张涛 匡兴怡 魏春梅 张端众 王利*

(重庆医科大学附属第一医院血液内科, 重庆 400016)

摘要 该文研究了钙网蛋白(Calreticulin, *CALR*)基因在骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)患者中的表达, 并构建了*CALR*-RNAi慢病毒载体, 观察其对入MDS细胞株SKM-1细胞生长和凋亡的影响。反转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)检测34例低危、高危MDS患者、8例非MDS患者骨髓标本及细胞株中*CALR*的表达; 设计3条含靶向沉默*CALR*基因的Oligo DNA, 与酶切后的GV248质粒连接形成表达载体, 经筛选、鉴定后得到3种GV-*CALR*-RNAi重组慢病毒载体。分别转染SKM-1细胞, 流式细胞术检测转染效率, RT-PCR及Western blot验证干扰效果, 筛选出最佳靶向序列。然后, 使用含最佳靶向序列的慢病毒载体转染SKM-1, CCK-8法和Annexin V/7-AAD双染法分别观察其对细胞生长和凋亡的影响, Western blot检测caspase-3的表达。34例低危、高危MDS患者中有31例检测到*CALR*基因表达较正常组明显降低($P < 0.01$)。成功构建了3种*CALR*-RNAi慢病毒载体, 流式细胞术检测平均转染效率在70%以上。RT-PCR及Western blot检测结果显示, *CALR*-RNAi(3)慢病毒载体敲除效率最高, 为最佳靶点。结果发现, *CALR*-RNAi(3)转染SKM-1后可促进细胞生长、抑制细胞凋亡($P < 0.05$), 同时*CALR*-RNAi(3)组的G₀/G₁期细胞减少, S期细胞增多。Western blot证实凋亡因子cleaved-caspase-3的水平降低。*CALR*基因在MDS中起到抑癌基因的作用, 构建的GV-*CALR*-RNAi(3)重组慢病毒载体有利于进一步研究*CALR*基因在MDS中的作用机制。

关键词 钙网蛋白基因; 慢病毒载体; RNA干扰; 细胞生长; 细胞凋亡; 骨髓增生异常综合征

CALR Gene Expression in MDS Patients and Its Influence on Cell Growth and Apoptosis

Zhang Tao, Kuang Xingyi, Wei Chunmei, Zhang Duanzhong, Wang Li*

(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract We studied the expression of Calreticulin (*CALR*) in patients with MDS (myelodysplastic syndrome) and also constructed RNAi lentiviral vector targeting *CALR* gene in SKM-1 to investigate the effect of *CALR*-RNAi on proliferation and apoptosis of MDS cells. RT-PCR (reverse transcription PCR) was used to detect *CALR* expression in bone marrow specimens obtained from 34 MDS patients and 8 non-MDS patients. Three kinds

收稿日期: 2015-12-24 接受日期: 2016-03-24

国家自然科学基金(批准号: 81250034)和重庆市卫生局科研项目(批准号: 2013-2-023)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011532, E-mail: liwangls@yahoo.com

Received: December 24, 2015 Accepted: March 24, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81250034) and the Fund of Health Bureau of Chongqing (Grant No.2013-2-023)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011532, E-mail: liwangls@yahoo.com

网络出版时间: 2016-05-31 16:54:32 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160531.1654.008.html>

of single-stranded primers were designed and synthesized, then annealed to double-stranded oligo sequences and subcloned into linear GV248 lentiviral plasmid to produce GV-*CALR*-RNAi lentiviral vector. After being identified by PCR and sequencing, recombinant lentiviral vector expressing *CALR* RNAi were obtained. This lentiviral vector was transferred into human SKM-1 cells, and the transfection efficiency was detected by flow cytometry. The interference efficiency of recombinant lentiviral vector was determined by reverse transcription PCR and Western blot, and the most effective vector was selected. CCK8 assay and Annexin V/7-AAD staining were conducted to observe the effects of *CALR* gene silencing on cell growth and apoptosis. *CALR* gene expression was significantly decreased ($P < 0.01$) in MDS patients when compared with healthy controls. Three kinds of *CALR*-RNAi-expressing lentiviral vectors were successfully constructed, and the transfection efficiency was more than 70%. Reverse transcription PCR and Western blot results showed that *CALR*-RNAi(3) lentiviral vector was the most effective vector for interfering the expression of *CALR* gene. Moreover, *CALR*-RNAi(3) could promote cell growth and inhibit apoptosis in SKM-1 cells ($P < 0.05$). The percentage of SKM-1 cells in G_0/G_1 phase was decreased and it was increased in S phase. Results of Western blot showed that down regulation of *CALR* resulted in the decreased protein level of cleaved-caspase-3. *CALR* is an important tumor suppressor gene in MDS, and the *CALR*-RNAi(3) lentivirus vector will be helpful in studying the functional role of *CALR* gene in MDS.

Keywords *CALR* (Calreticulin); lentivirus; RNA interference; cell growth; cell apoptosis; MDS (myelodysplastic syndrome)

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一种异质性恶性疾病,起源于多能造血干/祖细胞,以病态造血和向急性髓系白血病转化为特征^[1]。目前其病因和发病机制尚未阐明。细胞遗传学及分子生物学研究已经揭示, MDS细胞常伴有染色体变化及基因异常,深入认识基因及转录元件,阐释异常表达基因的机制和作用,将有利于明确MDS恶性克隆发生、发展的机制。

近年来,有研究报道^[2-3]在70%~80%的JAK2 (Janus kinase 2, JAK2)和促血小板生成素受体(thrombopoietin receptor, MPL)突变阴性的骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN)存在钙网蛋白(Calreticulin, *CALR*)基因突变,是其特征性突变之一。临床上,MPN同MDS疾病非常相似,两者均可进展为急性髓系白血病。*CALR*基因突变在MPN中的致病作用提示,该基因可能在MDS中起着重要作用。虽然上述报道也提及在MDS患者中*CALR*基因很少发生突变,但并未就基因表达及蛋白情况等进一步说明。本文研究了*CALR*在MDS患者中的表达水平,构建了*CALR*-RNAi的慢病毒载体,通过转染人MDS细胞株SKM-1靶向沉默*CALR*基因,观察其对细胞生长和凋亡的影响,为下

一步阐明*CALR*在MDS发生中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 于重庆医科大学附属第一医院血液科收集2010年至2014年的34例MDS患者骨髓标本和8例非MDS患者骨髓标本。按照WHO分型诊断标准和MDS国际预后积分系统,将实验组34例患者分为高危组和低危组,另外取8例同期非MDS患者的骨髓标本作为对照组。其中,高危组18例(男性10例、女性8例),平均年龄56岁;低危组16例(男性9例、女性7例),平均年龄52岁;对照组8例(男性5例、女性3例),平均年龄54岁。

1.1.2 实验材料 SKM-1细胞、293T细胞、慢病毒载体系统包括GV248载体(11.5 Kb)、pHelper1.0 (12.0 Kb)及pHelper2.0(5.8 Kb)质粒购自上海吉凯基因技术有限公司。T4连接酶、限制性内切酶Age I、EcoR I购自NEB公司。DMEM、RPMI 1640、胎牛血清购自Gibco公司。Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司。质粒抽提试剂盒购自QIAGEN公司。总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白

定量试剂盒、兔抗人GAPDH多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗以及CCK-8试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。兔抗人CALR多克隆抗体购自Abcam公司。CALR及GAPDH上下游引物由上海生工生物工程有限公司合成。倒置荧光显微镜购自Leica公司。PCR仪、凝胶成像仪购自Bio-Rad公司。相关实验在眼科学重庆市重点实验室室内完成。

1.2 实验方法

1.2.1 反转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR) 取临床患者的骨髓标本、培养的SKM-1细胞株, Trizol提取RNA, 进行反转录, 将得到的cDNA稀释为20 ng/ μ L用于后续的PCR检测。RT-PCR实验在Bio-Rad CFX96上操作进行。使用TaKaRa公司的Real-time Master Mix试剂来检测目的基因的表达。其中以 β -actin为内参基因, CALR引物序列为: F: 5'-CCC TGA CCC TGA TGC TAA GA-3', R: 5'-GGC TTC CAC TCA CCC TTG TA-3'。

1.2.2 细胞培养 SKM-1细胞和包装细胞293T细胞分别用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基和DMEM培养基, 在37 °C、5% CO₂以及饱和湿度的细胞培养箱中培养。细胞传代时, 弃去培养基, PBS洗2遍, 1 200 r/min离心4 min, 弃上清, 培养基重悬细胞铺至培养皿中即可。

1.2.3 RNAi慢病毒载体的制备及包装 根据GenBank人CALR序列信息, RNAi在线软件设计3条RNA干扰靶序列、1条阴性对照序列(表1)。首先, 合成含干扰序列的单链DNA oligo, 退火配对产生双链, 通过T4 DNA连接酶连接Age I和EcoR I双酶切后的线性慢病毒载体, 转化感受态大肠杆菌, PCR筛选阳性克隆并进行测序鉴定完成RNAi慢病毒载体的制备。

常规培养293T细胞, 取对数期细胞于转染前

24 h用胰蛋白酶消化, 并调整细胞数为 6×10^5 /mL, 待细胞密度达70%~80%时 按Invitrogen公司的Lipofectamine 2000使用说明进行共转染。48 h后收集富含慢病毒的细胞上清液, 将其浓缩后分装保存在病毒管中, -80°C保存。取其中1管, 利用逐孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.4 3种CALR-RNAi重组慢病毒载体分别转染SKM-1细胞 取对数期生长的SKM-1细胞接种于24孔板用于病毒转染预实验, 培养24 h后, 用100、80、60等不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)的重组慢病毒转染细胞, 分别于第3~6 d观察荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况, 选择最佳MOI值及荧光表达最强时间。预实验结果最佳MOI=80, 转染后第5 d荧光表达最强。实验时取对数期生长的SKM-1细胞均匀接种于6孔板中, 每孔细胞数为 5×10^4 个, 设CALR-RNAi慢病毒干扰组、不加病毒的空白对照组和含阴性对照序列的空载体组(阴性对照组), 培养24 h后, 以感染复数(MOI)值为80分别感染干扰组及阴性对照组细胞, 培养箱内孵育10 h后, 更换新鲜培养液, 第5 d荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况, 流式细胞术检测SKM-1细胞转染效率。收集各组细胞, 提取RNA及蛋白, RT-PCR及Western blot技术分别检测各组细胞CALR mRNA和蛋白质的表达。Western blot用ECL化学发光法进行显影, 应用Quantity One软件(Bio-Rad公司产品)分析图像, 以GAPDH作为内参。

1.2.5 细胞生长和凋亡的检测 取CALR-RNAi(3)慢病毒感染后的SKM-1细胞, 调整细胞密度至 5×10^4 /mL, 向每96孔中加入100 μ L细胞液, 实验分组同前, 每组设置3个复孔。接下来连续5 d用CCK-8法检测细胞增殖情况(即向每孔加入CCK-8试剂10 μ L, 于37 °C细胞培养箱内孵育2 h后, 用酶标仪在450 nm波长下读取光密度值(D_{450}), 并绘制出

表1 设计的3条干扰RNA序列

Table 1 Three interference RNA sequences

名称 Name	靶序列(5'→3') Target sequence (5'→3')	GC含量(% GC content (%)
CALR-RNAi(1)	TCT CAG AAT TTG AGA ACA T	31.58
CALR-RNAi(2)	TCC ACC GTA AGA TGA AGA A	42.11
CALR-RNAi(3)	GTT CAG CAA TAA AGG GAA A	36.84
NC-RNAi	TTC TCC GAA CGT GTC ACG T	52.63

生长曲线)。细胞凋亡检测利用Annexin V/7-AAD双染法进行测定,约 10^6 个细胞经胰蛋白酶溶液消化后用冰冷的PBS润洗1次,随后用400 μ L加样缓冲液重悬,加入Annexin V和7-AAD各5 μ L,随后利用流式细胞仪进行凋亡检测。用Western blot方法检测凋亡因子cleaved-caspase-3的表达。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 离心收集细胞,用PBS清洗2次,然后加入预冷的75%乙醇,4 $^{\circ}$ C固定过夜,将固定好的细胞在含50 μ g/mL RNA酶的PI染液中室温孵育30 min,用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.2.7 定量和数据的统计学分析 两组独立数据之间的统计学分析采用*t*-test检验,定量分析采用卡方检验,所有定量实验数据均以均值 \pm 标准差表示。当 $P < 0.05$ 时,认为两组数据之间具有统计学意义上的显著差异; $P < 0.01$ 时,认为差异极其显著。

2 结果

2.1 临床MDS样本及SKM-1细胞*CALR*表达下降

应用RT-PCR技术检测34例低、高危MDS患者标本的*CALR*表达,绝大多数标本*CALR*基因表达明显降低,显著低于正常对照组($P < 0.01$)。同时,检测到人MDS细胞株SKM-1细胞中*CALR*表达较正常对照明显降低($P < 0.01$)(图1)。

2.2 *CALR*-RNAi慢病毒载体在SKM-1细胞中的转染效率

荧光显微镜下,*CALR*-RNAi(2)、*CALR*-RNAi(3)

慢病毒干扰组可见大量绿色荧光细胞,流式细胞术检测转染效率均在70%以上(图2),证明这两组*CALR*-RNAi慢病毒载体成功转染了SKM-1细胞。而*CALR*-RNAi(1)慢病毒干扰组则少见绿色荧光细胞,流式细胞术检测转染效率在50%以下,予以舍弃。

2.3 RNAi干扰*CALR*表达的有效靶序列筛选

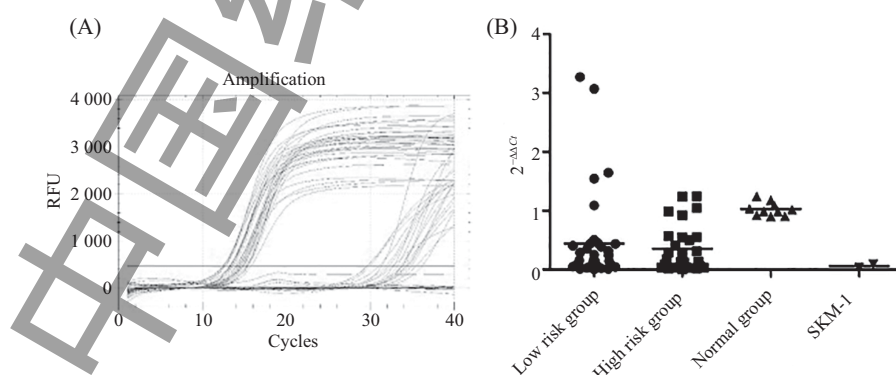
RT-PCR检测转染后第5 d实验组*CALR* mRNA水平,结果显示,与阴性对照组及空白对照组相比,*CALR*-RNAi(3)慢病毒载体能有效降低*CALR* mRNA水平[(0.40 ± 0.11), $P < 0.01$]。Western blot检测结果也证实,*CALR*-RNAi(3)能有效敲低*CALR*水平,确定其为最佳靶点(图3)。

2.4 *CALR*-RNAi(3)对SKM-1细胞生长和细胞凋亡的影响

在SKM-1细胞中转染*CALR*-RNAi(3)慢病毒及阴性对照慢病毒,通过CCK-8法检测SKM-1细胞的生长,发现*CALR*-RNAi(3)通过下调*CALR*可促进SKM-1细胞生长,细胞生长第5 d统计学差异显著($P < 0.05$)(图4)。Annexin V/7-AAD双染法经流式细胞术检测凋亡细胞,发现*CALR*-RNAi(3)组较阴性对照组和空白对照组细胞凋亡减少(图5),存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.5 流式细胞术检测各组细胞周期情况

流式细胞仪检测各组细胞周期分布情况,结果显示,*CALR*-RNAi(3)组 G_0/G_1 期细胞比例(45.25 ± 4.45)%低于空白对照组(54.12 ± 1.36)%和阴

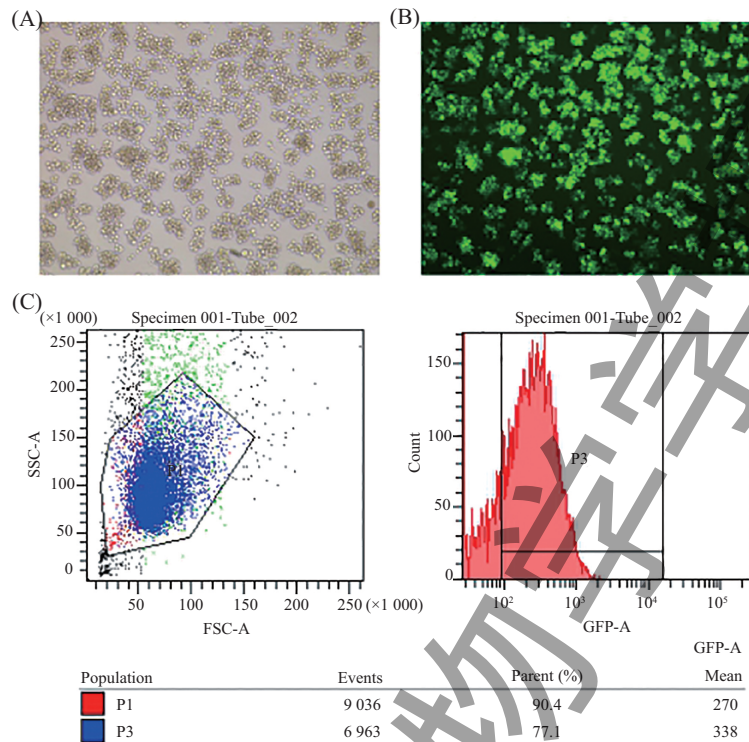


A: RT-PCR原始数据图; B: 低、高危组MDS患者标本及人MDS细胞株SKM-1中*CALR*的表达分析。

A: RT-PCR raw data; B: *CALR* mRNA level of different groups.

图1 RT-PCR检测MDS患者标本及人MDS细胞株SKM-1中*CALR*表达

Fig.1 *CALR* mRNA level of MDS patients and SKM-1 cell line were detected by RT-PCR

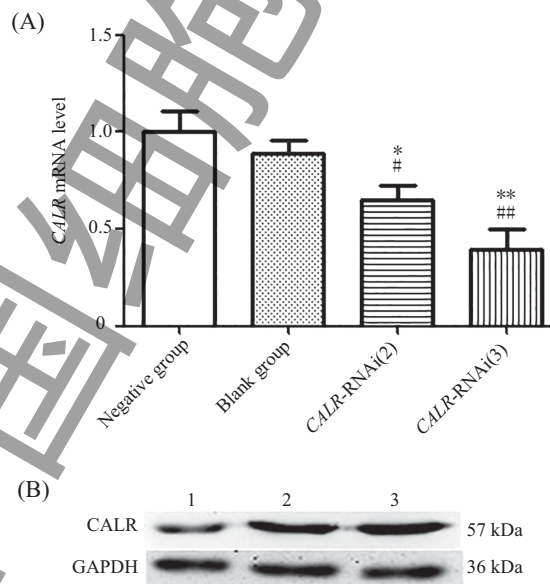


A: 白光下观察*CALR*-RNAi重组慢病毒感染SKM-1细胞(100×); B: 绿色荧光下观察*CALR*-RNAi重组慢病毒感染SKM-1细胞(100×); C: 流式细胞术检测转染效率。P1: 通过检测的细胞; P3: 表达绿色荧光的细胞; 转染率: 85.28%。

A: under the white light observe the infection efficiency of SKM-1 cells by recombinant lentiviral vector *CALR*-RNAi (100×); B: under the fluorescence observe the infection efficiency of SKM-1 cells by recombinant lentiviral vector *CALR*-RNAi (100×); C: the transfection efficiency detected by flow cytometry. P1: cells of through the detection; P3: cells of expressing green fluorescent protein (GFP); the transfection efficiency was 85.28%.

图2 *CALR*-RNAi重组慢病毒转染SKM-1细胞株

Fig.2 The infection efficiency of SKM-1 cells by recombinant lentiviral vector *CALR*-RNAi

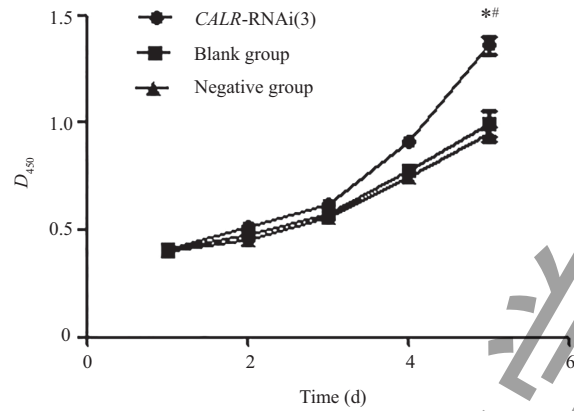


A: RT-PCR检测*CALR* mRNA表达, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与阴性对照组比较。 $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, 与空白对照组比较。B: Western blot检测*CALR* 蛋白质水平。1: *CALR*-RNAi(3)慢病毒干扰组; 2: 空白对照组; 3: 阴性对照组。

A: *CALR* mRNA level of different groups was detected by RT-PCR. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs negative group. $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ vs blank groups. B: *CALR* protein expression in different groups was detected by Western blot. 1: *CALR*-RNAi(3) transfected group; 2: blank group; 3: negative group.

图3 *CALR*-RNAi重组慢病毒转染SKM-1细胞对*CALR* mRNA及蛋白质水平的影响

Fig.3 The effect on *CALR* mRNA and protein levels in SKM-1 cells infected by *CALR*-RNAi

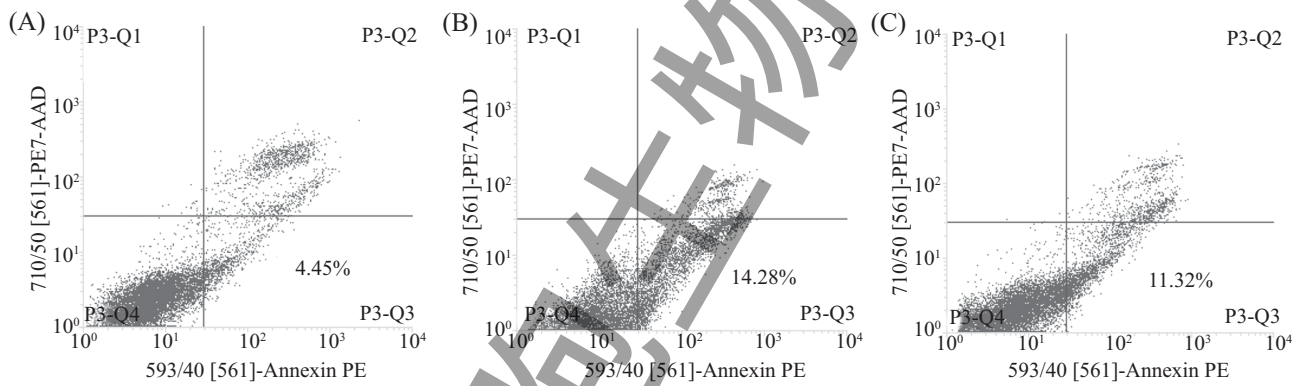


* $P < 0.05$, 与空白对照组比较; # $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

* $P < 0.05$ vs blank group; # $P < 0.05$ vs negative group.

图4 *CALR*-RNAi(3)对SKM-1细胞生长的影响

Fig.4 Effect of *CALR*-RNAi(3) on growth of SKM-1 cells

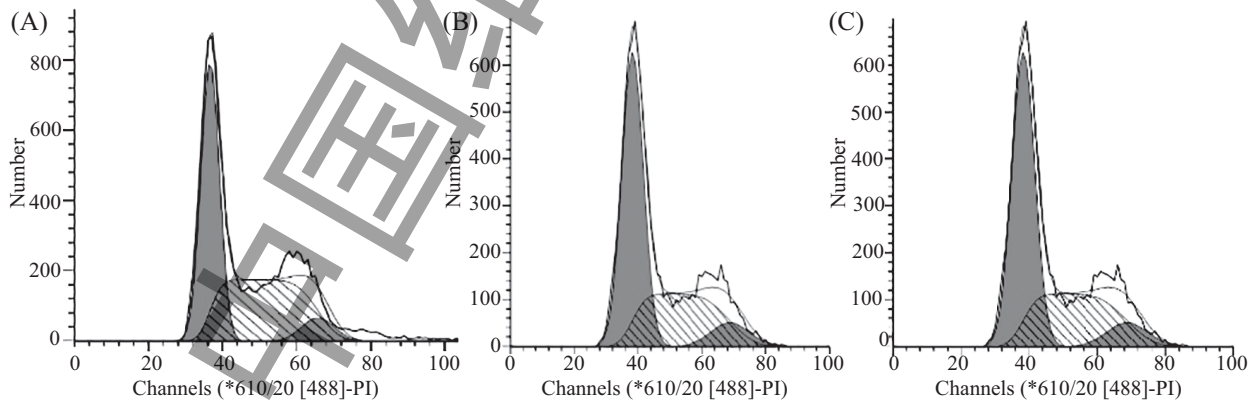


A: *CALR*-RNAi(3)慢病毒转染组; B: 阴性慢病毒转染组; C: 空白对照组。

A: *CALR*-RNAi(3) group; B: negative group; C: blank group.

图5 流式细胞术检测SKM-1细胞凋亡

Fig.5 The apoptosis rate of SKM-1 cells assessed by flow cytometry

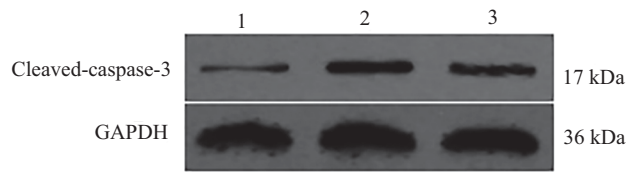


A: *CALR*-RNAi(3)慢病毒干扰组; B: 空白对照组; C: 阴性对照组。

A: *CALR*-RNAi(3) group; B: blank groups; C: negative group.

图6 流式细胞术检测*CALR*-RNAi(3)对SKM-1细胞周期的影响

Fig.6 Effect of *CALR*-RNAi(3) on cell cycle distribution of SKM-1 cells



1: *CALR*-RNAi(3)组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组。

1: *CALR*-RNAi(3) group; 2: negative group; 3: blank group.

图7 Western blot检测各组中cleaved-caspase-3蛋白质水平

Fig.7 The protein level of cleaved-caspase-3 was evaluated by Western blot analysis

性对照组(54.67 ± 1.26)%, 且差异均具有统计学意义($P < 0.05$); 而*CALR*-RNAi(3)组S期细胞比例为(46.15 ± 2.99)%, 明显高于空白对照组和阴性对照组[(38.42 ± 2.11)%和(36.23 ± 3.25)%, $P < 0.05$, 图6]。

2.6 Western blot检测cleaved-caspase-3蛋白质的水平

用Western blot检测各组细胞中cleaved-caspase-3的表达。结果显示, 与阴性对照组和空白对照组相比, cleaved-caspase-3水平在*CALR*-RNAi(3)组中明显降低(图7)。

3 讨论

近年来, 有研究发现, 一些无数量改变的染色体异常在肿瘤发生中起着重要作用^[4], 这类异常主要是单亲二体(uniparental disomy, UPD)。UPD是指一条染色体的2个拷贝均来自于同一亲本。在人体中, UPD发生于体细胞有丝分裂过程中的重组错误, 它的出现可产生纯合子而致隐形突变或转录异常, 可能与MDS的发病及其向白血病恶性转化以及不良预后密切相关^[5]。文献报道, 采用SNP芯片技术(single nucleotide polymorphism arrays)发现, 位于19号染色体的p12-q32区段存在单亲二体, 这种染色体异常仅见于MDS患者骨髓细胞中的CD34⁺造血干/祖细胞及外周血中的粒细胞, 淋巴细胞则无此异常^[4]。*CALR*基因便位于MDS患者19号染色体上的UPD区域, 编码由417个氨基酸组成的呈酸性的Ca²⁺结合蛋白即钙网蛋白(Calreticulin, CALR)。早期对*CALR*基因的研究主要集中在对其编码蛋白CALR的研究上, CALR的N-端1~180氨基酸区域, 被证实是一种很有潜力的血管生成抑制因子, 又被称为血管形成抑制素(vasostatin), 能抑制多种肿瘤的生长,

也能促进细胞凋亡从而诱导特异性的免疫应答^[6]。而另一些对乳癌和肺癌的研究中则显示^[7], *CALR*与*CALR*高表达促进了瘤细胞的迁移和黏附, 提示*CALR*基因也可能作为促癌基因发挥作用。可见, *CALR*基因是一种多功能基因, 在不同肿瘤中作用差异较大, 具有细胞特异性。因此, 阐明其在MDS中的作用及分子调控机制很有必要。

目前, 对于*CALR*基因在MDS中的研究仅见于少数几篇有关突变方面的报道, 对*CALR* mRNA和蛋白质水平方面的研究尚未见报道。本研究发现, 在绝大多数MDS患者骨髓标本及人MDS细胞株SKM-1中, *CALR*基因表达较正常对照组明显降低。由此推测, *CALR*作为抑癌基因参与MDS的发生, 在MDS发病过程中起着重要作用。正确构建理想的实验模型是深入研究*CALR*基因功能的关键, 本研究构建了3个*CALR*-RNAi慢病毒载体, 其中2个成功转染人MDS细胞系SKM-1细胞。SKM-1为表型正常的MDS细胞株, 免疫表型为CD34⁺/CD33⁺/HLA-DR⁺。已证实, SKM-1是研究MDS发病及向白血病转化机制的理想细胞模型^[8]。通过RT-PCR及Western blot等一系列实验证实, *CALR*-RNAi(3)慢病毒载体是干扰*CALR*基因表达的最佳靶向序列, 能有效抑制*CALR* mRNA及蛋白质在SKM-1细胞中的表达, 干扰效果明显。进一步将筛选出的*CALR*-RNAi(3)慢病毒载体体外转染SKM-1细胞, CCK-8实验结果显示, 转染*CALR*-RNAi(3)慢病毒的SKM-1细胞组较阴性对照组和空白对照组生长明显加快。采用流式细胞术检测各组细胞周期和凋亡情况, 结果显示, 转染*CALR*-RNAi(3)慢病毒后, 实验组G₀/G₁期细胞比例减少, S期细胞比例增加, 同时细胞早期凋亡明显减少, 说明*CALR*基因可能通过影响细胞的周期

和凋亡从而促进SKM-1细胞生长。与我们的研究结果类似, Kobayashi等^[9]的研究结果表明, 上调*CALR*基因表达编码蛋白质可介导肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)释放导致肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)产生, 从而促进细胞凋亡。此外, de Bruyn等^[10]的报道也表明, *CALR*基因通过表达编码蛋白与TNF家族成员FasL结合形成FasL/钙网蛋白复合体, 介导细胞凋亡。

Caspase家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中caspase-3为关键的执行分子, 它在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能^[11]。*Caspase-3*正常以酶原(32 kDa)的形式存在于胞质中, 在凋亡的早期阶段, 它被激活, 活化的*caspase-3*由2个大亚基(17 kDa)和2个小亚基(12 kDa)组成, 裂解相应的胞质、胞核底物, 最终导致细胞凋亡。为证实*CALR-RNAi*(3)对细胞凋亡的影响, 我们通过Western blot检测了各组细胞中cleaved-caspase-3的表达。结果显示, *CALR-RNAi*(3)组的cleaved-caspase-3水平降低, 活化的*caspase-3*减少从另一个侧面说明, 干扰*CALR*基因表达可以降低SKM-1细胞凋亡的发生。以上结果证明, *CALR*基因在MDS细胞中发挥着抑癌因子的作用, 但其具体的作用机制尚不明确。近年来, 很多研究发现, JAK2/STAT5信号通路在MDS发病中的起到至关重要的作用, 研究认为该通路的激活是MDS造血细胞增殖、分化、凋亡的重要机制之一^[12]。研究报道, *CALR*可能与STAT5介导的凋亡途径有关^[13], 我们将在后续研究中作进一步验证。

参考文献 (References)

- 1 肖志坚. 骨髓增生异常综合征研究进展. 临床血液学杂志 (Xiao Zhijian. Research progress of myelodysplastic syndrome. J Clin Hematol) 2013; 4: 440-3.
- 2 Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med 2013; 369(25): 2379-90.
- 3 Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, *et al.* Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med 2013; 369(25): 2391-405.
- 4 Wang L, Fidler C, Nadig N, Giagounidis A, Della Porta MG, Malcovati L, *et al.* Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with de l(5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays. Haematologica 2008; 93(7): 994-1000.
- 5 Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. Oncogene 2013; 32(7): 805-18.
- 6 Liu R, Gong J, Chen J, Li Q, Song C, Zhang J, *et al.* Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer. Cancer Immunol Immunother 2012; 61(6): 855-64.
- 7 Lu YC, Chen CN, Wang B, Hsu WM, Chen ST, Chang KJ, *et al.* Changes in tumor growth and metastatic capacities of J82 human bladder cancer cells suppressed by down-regulation of calreticulin expression. Am J Pathol 2011; 179(3): 1425-33.
- 8 Nakagawa T, Matozaki S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS. Leuk Lymphoma 1995; 17(3/4): 335-9.
- 9 Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nakagawa H, Jin A, *et al.* A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. Biochem Biophys Res Commun 2014; 453(4): 798-803.
- 10 de Bruyn M, Wiersma VR, Helfrich W, Eggleton P, Bremer E. The ever-expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity. Front Oncol 2015; doi: 10.3389/fonc.2015.00035.
- 11 Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. Neurosci Bull 2012; 28(1): 14-24.
- 12 Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, *et al.* Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. Blood 2014; 123(22): e123-33.
- 13 Shi F, Shang L, Pan BQ, Wang XM, Jiang YY, Hao JJ, *et al.* Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin-1 expression via STAT5A. Clin Cancer Res 2014; 20(23): 6153-62.