

NLS-RAR α 对人白血病细胞NB4分化抑制及其机制的研究

肖春兰^{1,2} 刘北忠^{1,2} 徐婷¹ 单志灵² 淦柳根¹ 宋浩¹ 杨蓉² 李浏² 钟梁^{2*}

¹重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160;

²重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文旨在探讨带核定位信号的维甲酸受体 α (nuclear localization signal retinoic acid receptor alpha, NLS-RAR α)对人急性早幼粒白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)细胞株NB4分化的影响及其机制。免疫印迹实验检测全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)诱导的NB4细胞分化标志物C/EBP β 、CD11b和p38 α 蛋白质水平;利用慢病毒介导的NLS-RAR α 基因过表达,进一步用免疫印迹实验验证过表达效率并检测NLS-RAR α 对NB4细胞分化标志物C/EBP β 、CD11b和p38 α 蛋白质水平的影响;间接免疫荧光实验分析NLS-RAR α 与p38 α 的空间共定位;免疫共沉淀实验分析NLS-RAR α 与p38 α 的相互作用。结果显示,生理浓度和药理浓度的ATRA促进NB4细胞分化的同时也激活了p38 α ,且p38 α 的活性变化与髓系分化标志物C/EBP β 变化一致;髓系分化表面标志物CD11b表达量在药理浓度ATRA(1 μ mol/L)处理下达到最高;NLS-RAR α 抑制NB4细胞的分化,且只有在ATRA存在的条件下,NLS-RAR α 抑制NB4细胞的分化与下调p38 α 活性相关;NLS-RAR α 与p38 α 存在空间共定位且NLS-RAR α 与p38 α 直接相互作用。该研究结果提示,当存在ATRA诱导时,NLS-RAR α 与p38 α 直接相互作用后下调p38 α 的活性进而抑制NB4细胞的分化。

关键词 人急性早幼粒白血病; NLS-RAR α ; NB4细胞; ATRA; p38 α

Study of NLS-RAR α on Differentiation Inhibition and Its Mechanism of Human Leukemia Cell Line NB4

Xiao Chunlan^{1,2}, Liu Beizhong^{1,2}, Xu Ting¹, Shan Zhiling², Gan Liugen¹, Song Hao¹, Yang Rong², Li Liu², Zhong Liang^{2*}

¹Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

²Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This paper is to investigate the effects of NLS-RAR α on differentiation of human promyelocytic leukemia cell line NB4 and its potential mechanisms. The expressions of myeloid differentiation markers, C/EBP β and CD11b, p38 α induced by ATRA in NB4 cells were detected by Western blot. NLS-RAR α was overexpressed mediating by lentivirus and its efficiency of NLS-RAR α overexpress, the expressions of myeloid differentiation markers, C/EBP β and CD11b, p38 α were detected by Western blot. The localization of NLS-RAR α and its interaction with p38 α was analysed by indirect immunofluorescence assay and co-immunoprecipitation assay, respectively. Our results

收稿日期: 2016-03-14 接受日期: 2016-05-20

国家自然科学基金(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(批准号: 2011BA5037)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485388, E-mail: liubeizhong@cqmu.edu.cn

Received: March 14, 2016 Accepted: May 20, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and the Natural Science Foundation of Major Project of Chongqing (Grant No.2011BA5037)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485388, E-mail: liubeizhong@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-08-01 16:24:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160801.1624.012.html>

demonstrated that the two ATRA concentrations (physiological [10 nmol/L] and pharmacological [1 μ mol/L] concentrations) that we investigated promoted differentiation and activated p38 α in NB4 cells. Further, ATRA-induced expression of the myeloid differentiation marker, C/EBP β , was proportional to phosphorylated p38 α (p-p38 α). We also observed a higher peak in the surface of myeloid differentiation marker, CD11b, following treatment with pharmacological concentrations of ATRA (1 μ mol/L). NLS-RAR α also inhibited NB4 cell differentiation, more importantly, this effect was related to downregulation of the active form of p38 α in the presence of ATRA. Finally, co-localization of NLS-RAR α and p38 α in three-dimensional space was confirmed, and we found that NLS-RAR α could interact with p38 α directly. Taken together, these data indicated that NLS-RAR α inhibited ATRA-induced differentiation of NB4 cells by downregulating the active form of p38 α via a direct interaction with p38 α .

Keywords human acute promyelocytic leukemia; NLS-RAR α ; NB4 cells; ATRA; p38 α

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是一种髓系造血干细胞克隆增殖性疾病,其特征是早幼粒细胞白血病维甲酸受体 α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha, PML-RAR α)融合蛋白的形成阻碍粒细胞的分化成熟^[1-2]。PML-RAR α 融合基因是由位于15号染色体上的PML基因和位于17号染色体上的RAR α 基因易位形成^[3],而PML-RAR α 融合基因表达的PML-RAR α 融合蛋白可作为一种转录抑制因子调控粒系分化相关基因的表达^[4]。中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是由中性粒细胞合成的一种酶类^[5],其与许多疾病(如呼吸系统疾病)的发生相关,NE还参与免疫防御和炎症反应等^[6]。研究者发现,早期APL细胞中表达的NE能切割PML-RAR α 产生缺失核定位信号的PML(PML^{NLS})和具核定位信号的维甲酸受体 α (nuclear localization signal retinoic acid receptor alpha, NLS-RAR α)两种突变蛋白质,且这一切割作用对APL的发生、发展具有重要作用^[7-8]。本课题组成员早期研究证明,NLS-RAR α 能加速APL细胞增殖抑制其分化^[9-10]。p38MAPK是MAPK家族中成员,参与细胞的炎症反应、增殖、凋亡、分化等过程^[11],p38 α 是p38MAPK的一种亚型。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是公认的APL治疗药物^[12],其主要作用是促进APL细胞分化、抑制APL细胞增殖。ATRA的促分化作用与p38 α 的活性相关^[13]。在ATRA存在条件下,RAR α 可作为转录因子促进分化相关基因的表达,然而p38 α 与RAR α 直接相互作用抑制RAR α 的转录激活作用^[14]。基于以上,我们推测,NLS-RAR α 对APL细胞的抑制分化作用可能与NLS-RAR α 和p38 α 的相互作用及p38 α 活性相关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒及菌株 人早幼粒细胞白血病(APL)细胞株NB4、慢病毒介导NLS-RAR α 过表达的人早幼粒细胞白血病细胞株LV-NLS-RAR α -NB4、仅感染慢病毒的人早幼粒细胞白血病细胞株LV-NC-NB4、293T细胞、真核生物表达质粒pCMY-HA-NLS-RAR α 、空载质粒pCMY-Myc和感受态大肠杆菌DH5 α 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 培养NB4、LV-NLS-RAR α -NB4、LV-NC-NB4细胞的RPMI 1640培养基和胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;培养293T细胞的DMEM培养基购自美国Hyclone公司;培养293T细胞的胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;T4 DNA连接酶、Trizol试剂和PCR试剂PrimeSTARTMHS(Premix)均购自TaKaRa公司;ATRA购自美国Sigma公司;限制性内切酶Xho I和Not I购自英国NEB公司;转染试剂LipoFiterTM购自HANBIO公司;胶回收试剂盒和质粒小抽试剂盒购自Promega公司;兔抗人RAR α 多克隆抗体、Protein A/G PLUS-Agarose均购自Santa Cruz公司;兔抗人磷酸化p38 α 多克隆抗体(p-p38 α)购自美国Millipore公司;兔抗人多克隆抗体p38 α 、HA-Tag以及小鼠抗人单克隆抗体Myc-Tag、HA-Tag均购自美国CST公司;兔抗人C/EBP β 、CD11b多克隆抗体购自上海万类生物科技有限公司;小鼠抗人 β -actin单克隆抗体、HRP、TRITC标记的山羊抗兔IgG、HRP、FITC标记的山羊抗小鼠IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NB4、LV-NLS-RAR α -NB4、LV-

NC-NB4细胞选用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 293T细胞选用含10%胎牛血清的DMEM培养基在含5% CO₂、37 °C的细胞培养箱中培养, 每1~3 d传代换液。

1.2.2 Western blot法检测细胞中的蛋白质水平 提取细胞的总蛋白, BCA法测蛋白质浓度。取50 μg蛋白质上样, 经8%的SDS-PAGE电泳、转膜、5%的脱脂奶粉封闭2 h, 一抗4 °C封闭过夜后, TBST洗膜2次, 每次10 min, 再用TBS洗膜10 min, 二抗室温孵育1 h后, 洗膜(方法同前), ECL化学发光成像分析。

1.2.3 真核表达质粒pCMV-Myc-p38α表达质粒的构建 根据GenBank中登录的p38α基因编码区序列, 采用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物, 上游引物序列: 5'-TAA CTC GAG TAA TGT CTC AGG AGA GGC CCA CGT-3'; 下游引物序列: 5'-TAT TAA GCG GCC GCT CAG GAC TCC ATC TCT TCT TGG-3', 下划线部分分别是限制性酶Xho I和Not I的酶切位点。引物设计后送上海英潍捷基生物技术公司合成, 扩增片段大小为1 083 bp。以人急性白血病细胞株NB4的cDNA为PCR模板, 扩增产物为p38α的CDS区。PCR反应条件: 95 °C预变性5 min; 98 °C变性10 s, 68.8 °C退火30 s, 72 °C延伸80 s, 共29个循环; 最后72 °C再延伸5 min。反应系统: PrimeSTARTMHS(Premix)(5 μL)、cDNAs(50 ng)、p38α引物(约0.5 μmol/L, 0.3 μL)和ddH₂O(3.7 μL)。扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳分析, 在紫外灯照射下切取目的条带经胶纯化试剂纯化后, 双酶切(Xho I、Not I)目的片段和载体pCMV-Myc过夜, 纯化后再用T4连接酶于16 °C连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α, 经含100 μg/mL氨苄青霉素的固体LB平板培养, 筛选出单克隆细菌于液体LB培养基中继续培养12~14 h后提取质粒, 质粒经酶切和测序验证。

1.2.4 瞬时转染 转染前将293T细胞种植到合适的培养皿中, 待293T细胞汇合度达到60%~80%时进行

质粒转染。质粒转染程序按照LipoFiter™(HANBIO)转染试剂说明。转染48 h后, 收集293T细胞进行下一步实验, 如提取RNA或提取总蛋白。

1.2.5 间接免疫荧光实验观察NLS-RARα和p38α的空间共定位 收集慢病毒介导的NLS-RARα过表达的LV-NLS-RARα-NB4细胞悬液, 离心, PBS清洗3遍。取适量的细胞沉淀均匀涂于小盖玻片上, 待稍干后用4%的甲醛固定20 min, 再用PBS洗3遍。滴入0.1% Triton覆盖细胞15 min以增加细胞膜的通透性, 10%山羊封闭血清封闭30 min后滴入兔抗人p38α(1:100; CST, 9218, USA)多克隆抗体和小鼠抗人HA-tag(1:100; CST, 2367, USA)单克隆抗体4 °C孵育过夜。滴入二抗(1:200; 北京中杉金桥生物技术有限公司): TRITC标记的山羊抗兔IgG、FITC标记的山羊抗小鼠IgG, 37 °C孵育1 h后PBS清洗3遍。滴入10%的DAPI(碧云天生物技术研究所)盖膜5 min后再用PBS清洗1遍, 最后用70%的甘油封闭, 置于激光共聚焦荧光显微镜下观察。PBS清洗的时间为5 min/遍。

1.2.6 免疫共沉淀实验验证NLS-RARα和p38α直接相互作用关系 质粒转染前1 d种植293T细胞于直径为10 cm的培养皿, 待细胞汇合度达到70%时进行转染。实验分A、B、C三组, A组共转染真核表达质粒pCMV-Myc-p38α和空载pCMV-HA质粒, B、C两组都共转染真核表达质粒pCMV-Myc-p38α和pCMV-HA-NLS-RARα。转染48 h后收集细胞, PBS洗3遍后加入700 μL细胞裂解液和7 μL蛋白酶抑制剂PMSF(碧云天), 超声裂解30 s后置冰上10 min, 离心, 每个实验组取上清液分别放于3个1.5 mL的EP管中, 分别命名为input(60 μL)、小鼠/兔抗人IgG(300 μL)和小鼠/兔抗人RARα/Myc-Tag(360 μL)。Input蛋白管中加入5×的SDS-PAGE上样缓冲液, 然后煮沸5 min保存备用。其他蛋白管中加入相应的IgG、anti-RARα/anti-Myc-Tag(2 μg)后4 °C摇晃过夜, 再加入Protein A/G PLUS-Agarose继续摇晃5 h, 离心, 去上清液, 用500 μL

表1 免疫共沉淀实验分组

Table 1 Groups of co-immunoprecipitation assay

组别 Group	共转染的质粒 Plasmids of cotransfection	IgG种类 Species of IgG	IP抗体 IP antibody	IB抗体 IB antibody
A	pCMV-Myc-p38α, pCMV-HA	Rabbit	anti-RARα	anti-Myc-Tag
B	pCMV-Myc-p38α, pCMV-HA-NLS-RARα	Rabbit	anti-RARα	anti-Myc-Tag
C	pCMV-Myc-p38α, pCMV-HA-NLS-RARα	Mouse	anti-Myc-Tag	anti-HA-Tag

IP: 免疫沉淀; IB: 免疫印迹。

IP: immunoprecipitation; IB: immunoblotting.

的细胞裂解液清洗珠子3遍, 弃上清, 加入25 μ L SDS-PAGE(2 \times)上样缓冲液后煮沸5 min后保存备用。

1.2.7 统计学分析 所有实验独立重复3次, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用SPSS 17.0进行显著性差异分析。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结果

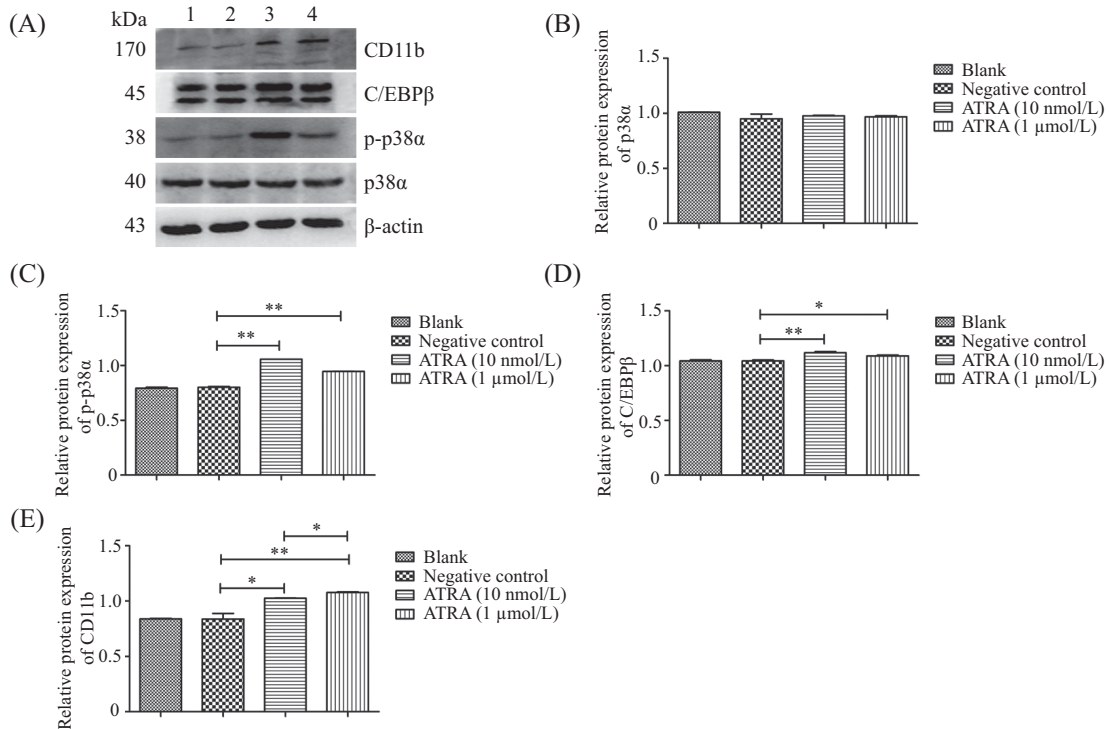
2.1 ATRA诱导的NB4细胞分化促进p38 α 磷酸化

全反式维甲酸(ATRA)是公认的促APL细胞分化的药物。因此, 我们用生理浓度的ATRA(10 nmol/L)和药理浓度的ATRA(1 μ mol/L)分别处理人APL细胞株NB4, 同时设置空白对照组(不予任何处理)和阴性对照组(仅予溶剂DMSO处理)。3 d后提取细胞总蛋白, Western blot检测总p38 α 和磷酸化p38 α (p-p38 α)水平以及髓系分化标志蛋白C/EBP β ^[15-16]、髓系表面分化标志物CD11b^[14,17-18]的表达水平(图1A)。由图1可看出, 与阴性对照组(只用DMSO处理)相比,

两种浓度的ATRA都使NB4细胞的磷酸化p38 α 蛋白、C/EBP β 和CD11b蛋白表达增加, 差异均有统计学意义。磷酸化p38 α 和C/EBP β 蛋白水平在生理浓度的ATRA(10 nmol/L)下表达最多, CD11b蛋白质水平在药理浓度的ATRA(1 μ mol/L)下表达最多; 总p38 α 蛋白质水平组间差异无统计学意义。

2.2 NLS-RAR α 抑制NB4细胞的分化

本课题组前期已经证实, NLS-RAR α 能促进急性早幼粒白血病细胞株HL60、NB4增殖, 抑制HL60分化^[9-10]。为了进一步探索NLS-RAR α 对NB4细胞分化的影响, 我们利用慢病毒介导NLS-RAR α 在NB4细胞(命名为LV-NLS-RAR α -NB4)中过表达(图2A), Western blot检测细胞分化标志物C/EBP β 和CD11b在各分组中的表达水平(图2B)。根据图1的结果, 两种不同浓度的ATRA处理NB4细胞时, CD11b在药理浓度ATRA(1 μ mol/L)下表达量最多。考虑到CD11b是最常用的细胞分化表面标志物, 因此, 我们进一步用ATRA(1 μ mol/L)处理LV-NLS-RAR α -NB4细胞及



A: 不同因素处理NB4细胞72 h后, Western blot分析蛋白表达水平, 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组[二甲亚砜(DMSO)处理]; 3: ATRA(10 nmol/L)处理组; 4: ATRA(1 μ mol/L)处理组; B-E: A图的统计学分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: Western blot analysis of the expressions of protein in NB4 cells treated with different factors for 72 h; 1: blank group; 2: negative control group (dimethylsulfoxide [DMSO]-treated); 3: the ATRA (10 nmol/L) treatment group; 4: ATRA (1 μ mol/L) treatment group; B-E: the statistical analysis of picture A; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图1 NB4细胞分化和p38 α 活性的相关分析

Fig.1 The correlation analysis between differentiation and activation of p38 α of NB4 cells

其对照组细胞。Western blot检测细胞分化标志物C/EBP β 和CD11b在各分组中的表达水平(图2C)。由图2的结果可以看出, 无论是否用ATRA处理NB4细胞, 与对照组比较, NLS-RAR α 抑制NB4细胞分化标志物(C/EBP β 、CD11b)的表达, 说明NLS-RAR α 对NB4细胞的分化有抑制作用。

2.3 NLS-RAR α 下调ATRA诱导的NB4细胞的p38 α 蛋白质磷酸化

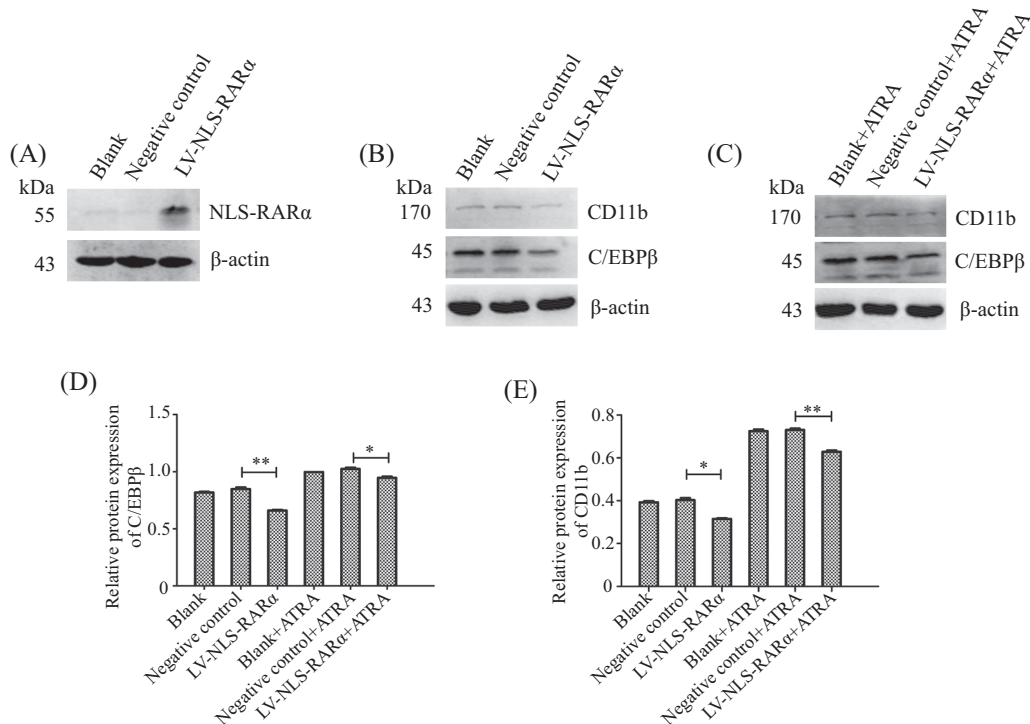
前期我们已证明, ATRA促进NB4细胞的分化与p38 α 的活性相关, 且NLS-RAR α 能抑制NB4细胞的分化, 那么NLS-RAR α 引起的NB4细胞分化受抑是否与p38 α 的活性改变相关? 因此, 我们对结果2.2部分各组中总的p38 α 蛋白质和磷酸化p38 α 蛋白质(p-p38 α)水平进行Western blot检测。结果显示, 无论有无用ATRA(1 μ mol/L)处理细胞, 各分组中p38 α 蛋白水平差异无统计学意义; 只有当ATRA(1 μ mol/L)处理细胞情况下, 与对照组相比, LV-NLS-RAR α -NB4细胞组的p-p38 α 蛋白表达水平下降且差异显著(图3)。

2.4 NLS-RAR α 蛋白质和p38 α 蛋白质在NB4细胞中空间共定位

培养慢病毒介导的NLS-RAR α 在NB4细胞中过表达的LV-NLS-RAR α -NB4细胞, 采用间接免疫荧光实验观察NLS-RAR α (anti-HA-Tag/FITC)和p38 α (anti-p38 α /TRITC)的空间定位(图4)。由图观察出, FITC标记的NLS-RAR α (绿色)和TRITC标记的p38 α (红色)大部分在细胞核内表达(DAPI核染蓝色), 融合之后出现较强的黄色荧光。这说明, 在NB4细胞中NLS-RAR α 和p38 α 空间位置很接近, 存在共定位现象。

2.5 NLS-RAR α 蛋白质与p38 α 蛋白质直接相互作用

既然NLS-RAR α 能抑制NB4细胞的分化, 且在ATRA存在时, 这种抑制作用与下调p-p38 α 水平有关, 并且在NB4细胞中NLS-RAR α 和p38 α 存在共定位, 因此, 我们进一步采用免疫共沉淀实验探索NLS-RAR α 和p38 α 是否存在直接相互作用关系。由图5看出, 以与免疫共沉淀所用抗体属性相同的IgG作为阴性对照, 仅转染Myc标签的pCMV-p38 α 质粒

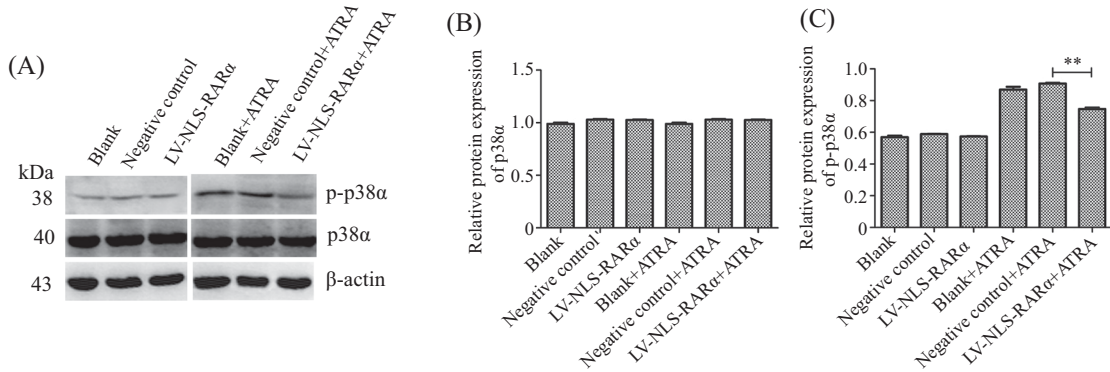


A: 不同组NLS-RAR α 蛋白的表达; B: 不同组CD11b、C/EBP β 蛋白的表达; C: 不同组经ATRA(1 μ mol/L)处理后CD11b、C/EBP β 蛋白的表达; Blank组: NB4细胞不做任何处理; Negative control组: NB4细胞只感染空病毒; LV-NLS-RAR α 组: NB4细胞感染LV-NLS-RAR α 。D、E: 不同组中CD11b、C/EBP β 蛋白的表达统计图, * P <0.05, ** P <0.01。

A: the expressions of NLS-RAR α in different groups; B: the expressions of CD11b, C/EBP β in different groups; C: the expressions of CD11b, C/EBP β in different groups after treating with ATRA(1 μ mol/L). Blank group: non-manipulated NB4 cells; Negative control group: NB4 cells infected with lentivirus only; LV-NLS-RAR α group: NB4 cells infected with NLS-RAR α -lentivirus; D,E: the statistical analysis of CD11b, C/EBP β in different groups; * P <0.05, ** P <0.01.

图2 NLS-RAR α 对NB4细胞分化的影响

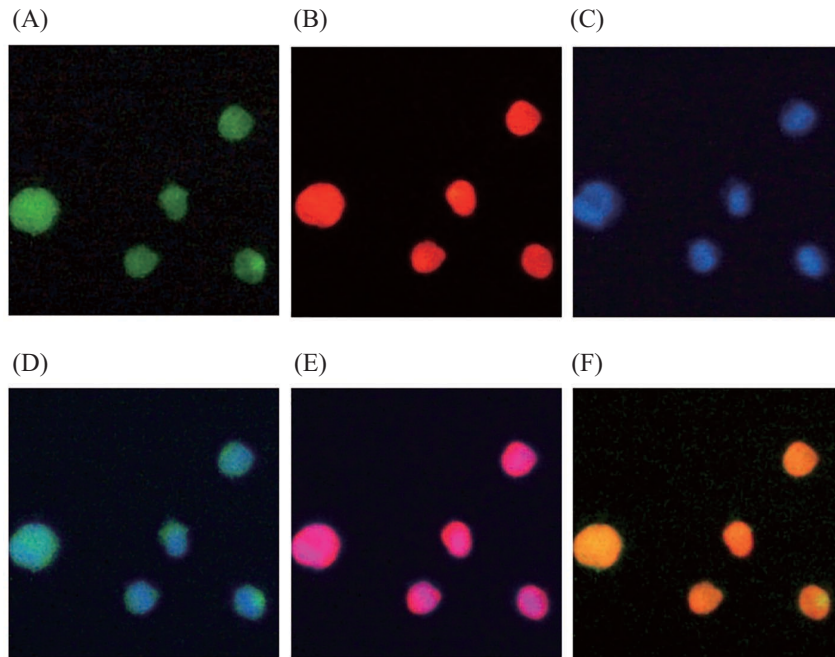
Fig.2 Effects of NLS-RAR α on differentiation of NB4 cells



A: 不同组p38 α 、p-p38 α 蛋白质水平; B: p38 α 蛋白质水平的统计图; C: p-p38 α 蛋白质水平的统计图, ** $P < 0.01$ 。

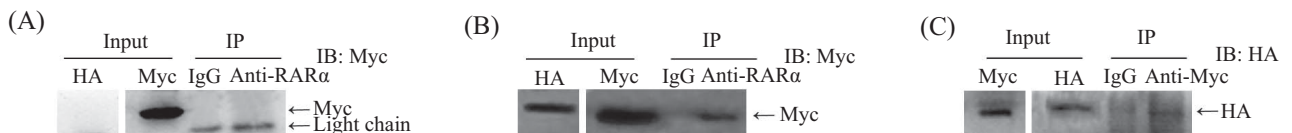
A: the protein levels of p38 α , p-p38 α in different groups; B: the statistical analysis of p38 α in different groups; C: the statistical analysis of p-p38 α in different groups; ** $P < 0.01$.

图3 NLS-RAR α 对NB4细胞中p38 α 蛋白质水平的影响
Fig.3 Effects of NLS-RAR α on p38 α protein level of NB4 cells



A: NLS-RAR α 在NB4细胞中的空间定位; B: p38 α 在NB4细胞中的空间定位; C: NB4细胞核染; D: A、C融合图; E: B、C融合图; F: A、B融合图。
A: the localization of NLS-RAR α in NB4 cells; B: the localization of p38 α in NB4 cells; C: nuclear staining of NB4 cells; D: merged by A and C; E: merged by B and C; F: merged by A and B.

图4 NLS-RAR α 蛋白质和p38 α 蛋白质在NB4细胞中的空间定位观察(100 \times)
Fig.4 Observation of the localization of NLS-RAR α and p38 α in NB4 cells (100 \times)



A、B: RAR α 抗体免疫沉淀NLS-RAR α , Western blot检测p38 α (带Myc标签); C: Myc标签抗体免疫沉淀p38 α , Western blot检测NLS-RAR α (带HA标签)。Western blot分析质粒共转染情况(input)。

A,B: NLS-RAR α was immunoprecipitated by anti-RAR α and p38 α (an Myc-tagged version) was detected by Western blot; C: p38 α was immunoprecipitated by anti-Myc-Tag and NLS-RAR α (an HA-tagged version) was detected by Western blot. The cotransfection of plasmids (input) was determined with Western blot analysis.

图5 NLS-RAR α 蛋白质和p38 α 蛋白质的相互作用分析
Fig.5 Interaction analysis of NLS-RAR α and p38 α

时, RAR α 抗体不能共沉淀p38 α (带Myc标签, 图5A), 只有共转染HA标签的pCMV-NLS-RAR α 质粒和Myc标签的pCMV-p38 α 质粒时, RAR α 抗体才能共沉淀p38 α (带Myc标签, 图5B), 说明p38 α 是被转染表达的NLS-RAR α 而不是被细胞内原本表达的RAR α 沉淀下来的(因RAR α 抗体既能与RAR α 也能与NLS-RAR α 结合), 且共转染以上两种真核表达质粒时, Myc抗体能将NLS-RAR α 共沉淀下来(图5C), 说明NLS-RAR α 也能被p38 α 沉淀下来。以上结果说明, NLS-RAR α 和p38 α 确实存在直接相互作用关系。

3 讨论

ATRA能促进APL细胞分化抑制其增殖, 且这些效应与p38 α 活性存在相关性^[13-14], 但研究者并没有同时用不同浓度的ATRA处理细胞进而比较这些效应与p38 α 活性的关系。为了进一步验证ATRA引起的细胞分化程度与p38 α 活性水平相关性, 我们同时用生理浓度和药理浓度的ATRA(10 nmol/L、1 μ mol/L)处理APL细胞株NB4, 免疫印迹技术检测各处理组细胞的分化标志物CD11b和C/EBP β 以及MAPK家族成员p38 α 及其活性形式p-p38 α 水平。结果进一步表明, ATRA促进NB4细胞分化与p38 α 的活性有关; 且结果发现, 与对照组比较, 两种不同浓度的ATRA促进NB4细胞分化的同时升高了p-p38 α 水平, 但p38 α 水平变化不明显; p-p38 α 变化趋势与C/EBP β 一致, 峰值都出现在生理浓度ATRA(10 nmol/L)处理时; CD11b的表达峰值出现在药理浓度ATRA(1 μ mol/L)处理时。因最常用的髓系分化表面标志物——CD11b和p-p38 α 峰值出现时ATRA浓度的不一致性, 所以我们认为, 虽然总体上ATRA促进NB4细胞分化的同时促进p38 α 磷酸化, 但分化程度与p38 α 磷酸化程度并不是简单的正比例关系, 只有在一定ATRA浓度范围内, ATRA引起的NB4细胞分化程度可能与p38 α 的活化程度存在正比例关系, 这种假设也在某种程度上吻合了Gianni等^[14]的研究结果, 同时用ATRA(10 nmol/L)和p38 α 抑制剂处理的NB4细胞分化程度高于仅用ATRA(10 nmol/L)处理的NB4细胞的分化程度。

MAPK家族和AKT信号途径在KG1a细胞的克隆形成、血管形成、肌细胞的分化都同时发挥重要作用^[19-22], NLS-RAR α 能加速APL细胞株HL60增殖、抑制其分化, 其作用机制与AKT通路的激活相关^[9-10]。因此我们推测, NLS-RAR α 抑制APL细胞分

化的机制也可能与MAPK家族相关。我们利用慢病毒介导NLS-RAR α 在APL细胞株NB4中成功过表达, 免疫印迹实验分析MAPK家族蛋白p38 α 、p-p38 α 及髓系细胞分化标志物的表达。实验结果表明, NLS-RAR α 能抑制ATRA诱导的NB4细胞分化, 且其机制与p38 α 活性形式p-p38 α 水平下调有关; 当无ATRA诱导时, NLS-RAR α 也能抑制NB4细胞分化, 但因p38 α 、p-p38 α 水平都没有明显改变, 所以, 我们认为其机制与p38 α 活性改变无直接联系。

既然NLS-RAR α 抑制ATRA诱导的NB4细胞分化与p38 α 相关, 那么NLS-RAR α 和p38 α 两者之间是以何种方式作用的, 是我们进一步需要探讨的。经过查阅文献, 我们发现, 在COS7细胞中RAR α 能与p38 α 直接相互作用而影响RAR α 的转录激活效应, 且直接相互作用不依赖ATRA^[14], 说明在APL细胞中RAR α 可能与p38 α 直接相互作用影响APL细胞生物学功能, 如分化与增殖。基于文献, 我们认为, 在RAR α 上增加了核定位信号的NLS-RAR α 也可能与p38 α 直接相互作用而影响p38 α 的活性, 进而影响APL细胞的生物学功能, 间接免疫荧光实验和外源性免疫共沉淀实验证实了这一设想。中性粒细胞弹性蛋白酶切割PML-RAR α 产生PML^{NLS}和NLS-RAR α , 这种作用发生在早期APL模型小鼠白血病细胞中^[7], 因此我们大胆推测, 对ATRA敏感的早期APL的发生发展可能是由于NLS-RAR α 和p38 α 直接相互作用后下调p38 α 活性而导致的; 而对ATRA耐药的早期APL, 虽然NLS-RAR α 也能与p38 α 直接作用, 但不会影响p38 α 的活性, 其发生发展可能由其他途径导致的, 如AKT通路, 这也是我们需要进一步探讨的难点和重点。

综上所述, NLS-RAR α 能抑制NB4细胞的分化, 其机制可能是: 当无ATRA诱导时, NLS-RAR α 通过MAPK通路之外的途径抑制NB4细胞的分化, 如激活AKT通路^[10]; 当存在ATRA诱导时, NLS-RAR α 与p38 α 直接相互作用后下调p38 α 的活性进而抑制NB4细胞的分化, 这对早期APL的发生发展机制的探索提供了重要线索, 也为APL诊疗靶点的筛选奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Yoo SJ, Seo EJ, Lee JH, Seo YH, Park PW, Ahn JY. A complex, four-way variant t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 167(2): 168-71.

- 2 Kamimura T, Miyamoto T, Harada M, Akashi K. Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci* 2011; 102(11): 1929-37.
- 3 Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, Frankel SR, Murty VV, *et al.* Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991; 66(4): 663-74.
- 4 Nitto T, Sawaki K. Molecular mechanisms of the antileukemia activities of retinoid and arsenic. *J Pharmacol Sci* 2014; 126(3): 179-85.
- 5 El-Ouriaghli F, Sloand E, Mainwaring L, Fujiwara H, Keyvanfar K, Melenhorst JJ, *et al.* Clonal dominance of chronic myelogenous leukemia is associated with diminished sensitivity to the antiproliferative effects of neutrophil elastase. *Blood* 2003; 102(10): 3786-92.
- 6 马国尔, 郑金旭. 中性粒细胞弹性蛋白酶研究现状. 江苏大学学报(医学版)(Ma Guoer, Zhen Jinxu. The current study of neutrophil elastase. *Journal of Jiangsu University, Medicine Edition*) 2006; 16(3): 262-5.
- 7 Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase cleaves PML-RARalpha and is important for the development of acute promyelocytic leukemia in mice. *Cell* 2003; 115(3): 305-18.
- 8 Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase is important for PML-retinoic acid receptor alpha activities in early myeloid cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(1): 23-33.
- 9 Hu XX, Zhong L, Zhang X, Gao YM, Liu BZ. NLS-RARalpha promotes proliferation and inhibits differentiation in HL-60 cells. *Int J Med Sci* 2014; 11(3): 247-54.
- 10 宋浩, 李浏, 钟梁, 蒋开玲, 阳小群, 杨蓉, 等. NLS-RAR α 通过激活AKT调节白血病细胞NB4的增殖. 基础医学与临床(Song Hao, Li Liu, Zhong Liang, Jiang Kailing, Yang Xiaoqun, Yang Rong, *et al.* NLS-RAR α regulates the proliferation of leukemia cell NB4 by activating AKT pathway. *Basic & Clinical Medicine*) 2016; 36(1): 41-6.
- 11 张奇, 白晓东, 付小兵. P38MAPK信号通路研究进展. 感染、炎症、修复(Zhang Qi, Bai Xiaodong, Fu Xiaobing. The newest studies on P38MAPK signaling pathway. *Infection, Inflammation, Repair*) 2005; 6(2): 121-3.
- 12 Watts JM and Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: What is the new standard of care? *Blood Rev* 2014; 28(5): 205-12.
- 13 Qian X, He J, Zhao Y, Lin M. Inhibition of p38 MAPK phosphorylation is critical for bestatin to enhance ATRA-induced cell differentiation in acute promyelocytic leukemia NB4 Cells. *Am J Ther* 2016; 23(3): 680-9.
- 14 Gianni M, Peviani M, Bruck N, Rambaldi A, Borleri G, Terao M, *et al.* p38alphaMAPK interacts with and inhibits RARalpha: Suppression of the kinase enhances the therapeutic activity of retinoids in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2012; 26(8): 1850-61.
- 15 Duprez E, Wagner K, Koch H and Tenen DG. C/EBPbeta: A major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J* 2003; 22(21): 5806-16.
- 16 Yamanaka R, Lekstrom-Himes J, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG. CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis (Review). *Int J Mol Med* 1998; 1(1): 213-21.
- 17 Zeng C, Xu Y, Xu L, Yu X, Cheng J, Yang L, *et al.* Inhibition of long non-coding RNA NEAT1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. *BMC Cancer* 2014; 14: 693.
- 18 Wang Y, Jin W, Jia X, Luo R, Tan Y, Zhu X, *et al.* Transcriptional repression of CDKN2D by PML/RARalpha contributes to the altered proliferation and differentiation block of acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1431.
- 19 Kale VP. Differential activation of MAPK signaling pathways by TGF-beta1 forms the molecular mechanism behind its dose-dependent bidirectional effects on hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 2004; 13(1): 27-38.
- 20 Cabane C, Coldefy AS, Yeow K, Derijard B. The p38 pathway regulates Akt both at the protein and transcriptional activation levels during myogenesis. *Cell Signal* 2004; 16(12): 1405-15.
- 21 Alisi A, Spaziani A, Anticoli S, Ghidinelli M, Balsano C. PKR is a novel functional direct player that coordinates skeletal muscle differentiation via p38MAPK/AKT pathways. *Cell Signal* 2008; 20(3): 534-42.
- 22 Serra C, Palacios D, Mozzetta C, Forcales SV, Morante I, Ripani M, *et al.* Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation. *Mol Cell* 2007; 28(2): 200-13.