

干扰PML对人髓系白血病THP-1细胞增殖和凋亡的影响及机制探讨

邹 琴 张帅帅 鲜敬荣 金红君 杨丽媛 高 芃 张 伶*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 早幼粒白血病(promyelocytic leukemia, *PML*)基因与维甲酸受体 α (retinoic acid receptor α , *RAR* α)基因形成*PML-RAR* α 融合基因是急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)发生的分子基础, 而*PML*在除APL外的其他髓系白血病亚型中的作用研究少见报道。为探讨*PML*在非APL的髓系白血病恶性表型中的调控作用及潜在机制, 该文首先通过qPCR和Western blot检测了5株非APL来源的髓系白血病细胞中*PML*的表达水平。接着将靶向*PML*基因的shRNA慢病毒(sh*PML* group)感染高表达*PML*的THP-1细胞; 同时, 设立未处理对照组(Mock group)和阴性对照组(Scramble group), 嘌呤霉素筛选稳定表达sh*PML*的细胞株。qPCR和Western blot检测shRNA干扰效率; CCK-8检测细胞体外增殖活性, 克隆形成实验检测细胞体外克隆形成能力; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot检测凋亡相关蛋白质Bcl-2、Bax水平和AKT及下游靶分子Foxo3a磷酸化蛋白质水平的改变。结果显示, 5株髓系白血病细胞中*PML* mRNA和蛋白质水平不同, 其中以THP-1细胞中的*PML*表达水平较高。靶向*PML*基因的shRNA慢病毒感染THP-1细胞后, *PML* mRNA和蛋白质水平均明显下降, 提示成功构建稳定表达sh*PML*的THP-1细胞株。与Mock组和Scramble组相比, sh*PML*组的细胞增殖能力显著增强($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$); 同时, 抗凋亡蛋白Bcl-2水平升高、促凋亡蛋白Bax水平降低; 此外, 干扰*PML*表达可增加pAKT(S473)及下游靶分子pFoxo3a(S253)的蛋白质水平, 而总AKT和Foxo3a的蛋白质水平未见明显变化。该研究的结果提示, *PML*基因可能通过调控AKT/Foxo3a信号通路活性抑制白血病的恶性表型, 表明*PML*在不同白血病亚型中发挥着不同的作用。

关键词 *PML*; 髓系白血病; 增殖; 凋亡; AKT

Effects of Promyelocytic Leukemia (*PML*) Gene Knockdown on Apoptosis and Proliferation of Human Myeloid Leukemia THP-1 Cells and Its Potential Mechanism

Zou Qin, Zhang Shuaishuai, Xian Jingrong, Jin Hongjun, Yang Liyuan, Gao Peng, Zhang Ling*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The fusion of promyelocytic leukemia (*PML*) gene and the retinoic acid receptor α (*RAR* α) gene

收稿日期: 2016-03-18 接受日期: 2016-05-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81271913)和重庆市研究生科研创新项目(批准号: CYS15134)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

Received: March 18, 2016 Accepted: May 19, 2016

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.81271913) and the Graduate Fellowship in Research Innovation from the Chongqing Municipal Education Commission (Grant No.CYS14115)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-08-01 16:25:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160801.1625.016.html>

resulting to oncogenic *PML-RAR α* was the main molecular mechanism in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia (APL), whereas few investigation are focused on the role of *PML* in acute myeloid leukemia subtypes other than APL. This study mainly aimed at investigating the role of *PML* in the proliferation and apoptosis activity of myeloid leukemia cells and its potential mechanism. Firstly, the levels of *PML* mRNA and protein in five myeloid leukemia cell lines were determined by qPCR and Western blot, respectively. Next, THP-1 cells with high *PML* expression were infected with shRNA lentivirus targeting *PML* (shPML group) and its negative control (Scramble group), followed by puromycin selection. THP-1 cells untreated were named as Mock group. shRNA efficiency was confirmed by qPCR and Western blot. Cell proliferation activity was assessed by CCK-8 *in vitro*; Colony formation ability was analysed by colony-forming assay. The apoptosis rate was determined by flow cytometry. The protein levels of apoptosis related proteins Bcl-2 and Bax were measured by Western blot. In addition, the expression of phosphorylated-AKT (pAKT) and phosphorylated-Foxo3a (pFoxo3a) were detected by Western blot. The results showed different levels of *PML* mRNA and protein in myeloid leukemia cell lines, and THP-1 cells exhibited higher *PML* expression. We transduced THP-1 cells with shRNA lentivirus targeting *PML* and confirmed knockdown of *PML* at mRNA and protein levels. Compared with Mock and Scramble groups, silencing *PML* significantly promoted cell proliferation activity and colony formation ability *in vitro* ($P<0.05$), and inhibited cell apoptosis ($P<0.05$). In addition, knockdown of *PML* up-regulated Bcl-2 protein levels and down-regulated Bax protein levels. Furthermore, suppressing *PML* significantly enhanced the levels of AKT phosphorylation at residues Ser473 and its downstream Foxo3a phosphorylation at residues Ser253 ($P<0.05$), but had no remarkable change of total protein levels of AKT and Foxo3a. These data provide evidence that *PML* as a tumor suppressor plays an important role in leukemogenesis involving AKT/Foxo3a signaling pathway, indicating the multiple role of *PML* in leukemia.

Keywords PML; myeloid leukemia; apoptosis; proliferation; AKT

早幼粒细胞白血病(promyelocytic leukemia, *PML*)基因全长35 Kb, 共有9个外显子, 编码的PML蛋白质主要定位于细胞核, 与p53、pRb、Daxx等蛋白质形成PML-核体(PML-nuclear bodies, PML-NBs)^[1], 发挥促进细胞凋亡^[2]、抑制细胞增殖和周期等细胞生长抑制作用^[3-4]。已往的研究显示, 淋巴瘤、前列腺癌以及乳腺癌等多种实体肿瘤组织中*PML*基因的表达缺失能促进疾病的发生、发展^[5]。在血液肿瘤中, 急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的重现性细胞遗传学异常特性导致15号染色体与17号染色体易位, 使得*PML*基因与维甲酸受体 α (retinoic acid receptor α , *RAR α*)基因融合形成*PML-RAR α* 融合基因, 该融合基因产生的融合蛋白PML-RAR α 可干扰野生PML和RAR α 蛋白质的正常生物学功能, 促进APL的发生^[6]。最近, Ito等^[7]在慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者骨髓样本中发现PML增高, 且该类患者临床上预后较差; 同时, 该作者在慢粒疾病模型中发现, 敲除*PML*后使白血病干细胞(leukemia-initiating cells, LICs)克隆形成能力显著减弱, LICs逐渐耗竭, 提示

PML在不同型别的髓系白血病中可能以不同的形式发挥不同的致病作用。急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人最常见的白血病, 具有高度异质性, 临床上有一部分的AML具有重现性细胞遗传学异常特征如APL伴t(15;17)特征, 然而仍有较多的AML亚型并没有特异性的染色体异常。在AML中, *PML*的研究目前多集中在APL上, 在其他AML亚型中的研究却少见报道。为此, 本研究首先观察*PML*在非APL来源的髓系白血病细胞株中的表达情况; 然后以急性髓系白血病细胞株THP-1为研究对象, 采用RNA干扰技术下调*PML*的表达, 观察白血病细胞体外增殖和凋亡的改变, 并初步探讨其分子机制, 为临床上髓系白血病的个体化治疗策略和研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人髓系白血病细胞株KG-1a、HL-60、THP-1和K562购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源库, 人髓系白血病细胞株OCI-AML3由美国安

德森癌症研究中心惠赠, 以上细胞株属于非APL来源的髓系白血病细胞株。胎牛血清购于上海熠晨生物科技有限公司。RPMI 1640普通培养基购于美国Gibco公司。引物由上海英骏公司合成。RNA提取试剂TRIzol、RT-PCR(reverse transcription-PCR)试剂盒购于日本TaKaRa公司。SYBR快速荧光定量PCR试剂盒购于KAPA Biosystems。蛋白裂解液RIPA、BCA蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。ECL发光试剂盒及PVDF膜购于美国Millipore公司。兔抗人PML多克隆抗体购于美国Abcam公司, 兔抗人Bax、兔抗人Bcl-2购于美国Santa Cruz公司, 兔抗人pAKT(S473)、兔抗人pFoxo3a(S253)、兔抗人AKT及Foxo3a抗体购于美国Cell Signaling Technology公司, 兔抗人 β -actin多克隆抗体购于Proteintech公司, 山羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司。CCK-8试剂盒购于日本Dojindo公司。甲基纤维素、嘌呤霉素购于美国Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人髓系白血病细胞株KG-1a、HL-60、OCI-AML3、THP-1和K562用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL)的RPMI 1640培养基于37 °C、含5% CO₂的恒温培养箱中, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 构建稳定表达shPML的THP-1细胞株 靶向PML基因的shRNA慢病毒和靶向无关序列的阴性对照慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司合成包装, 并进行测序鉴定和病毒滴度的测定。靶向PML基因的特异性shRNA序列为: 5'-CCC GCA AGA CCA ACA ACA T-3'。取对数期生长的THP-1细胞, 以 2×10^5 /mL的密度接种于24孔板中, 分为THP-1未处理组(Mock group)、THP-1阴性对照组(Scramble group)和THP-1感染组(shPML group)。向每孔中添加适量的慢病毒感染液(感染复数为100)和含5 μ g/mL的polybrene感染液, 每孔体系为100 μ L。感染12 h后换新鲜培养基继续培养2~3 d, 期间根据细胞的状态更换培养基; 感染约72 h后, 用荧光显微镜观察, 感染效率在80%左右时, 可加入嘌呤霉素筛选细胞, 继续培养7 d获得稳定细胞株。

1.2.3 定量PCR(qPCR) 收集各组细胞, TRIzol试剂抽提总RNA, 然后采用逆转录试剂盒逆转录成cDNA, β -actin为内参, RT-PCR扩增各组细胞中的PML

基因, 然后进行2%琼脂糖凝胶电泳, 采用Quantity One对结果进行分析; 进一步通过定量PCR(qPCR)定量检测PML基因的表达。根据GeneBank发布的PML序列(NM_033238.2)利用引物设计软件Primer 5设计PML特异性扩增引物。PML引物序列上游为: 5'-ACA TCT TCT GCT CCA ACC C-3'; 下游为: 5'-CGC CAA AGG CAC TAT CC-3'。qPCR反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 56.4 °C退火30 s, 循环39次, 72 °C充分延伸10 min; 熔解曲线条件: 65 °C~95 °C, 温度以0.5 °C/0.5 s的速率上升。实验独立重复3次。

1.2.4 Western blot 收集各组细胞, 以800 r/min离心5 min, 细胞经PBS洗涤3次, 弃上清, 加入RIPA裂解液裂解细胞, 提取总蛋白质, BCA法检测蛋白质浓度。取50 μ g变性煮沸的蛋白质样品上样, 经10%的SDS-PAGE凝胶电泳分离后, 通过湿转仪将蛋白质转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h后, 加入相应的一抗(1:1 000稀释), 4 °C孵育过夜, TBST洗膜2次, TBS洗膜1次, 每次10 min。然后加入相应的二抗室温孵育1 h, TBST洗膜2次, TBS洗膜1次, 每次10 min。最后用ECL化学发光试剂凝胶成像显影。实验设 β -actin为内参, 对Western blot条带用Quantity One软件进行统计分析。

1.2.5 CCK-8实验 收集各组细胞, 按 2×10^3 /孔接种于96孔板中, 每组设5个复孔, 于37 °C、5% CO₂温箱中孵育, 培养第0、1、2、3、4 d时每孔加入10 μ L CCK-8试剂后继续培养2 h, 于450 nm波长下测定对应孔的吸光度(D)值。以吸光度值为纵坐标、培养时间为横坐标绘制生长曲线图。实验独立重复3次。

1.2.6 克隆形成实验 收集各组细胞, 离心后用适量含20% FBS的RPMI 1640培养基重悬、计数。计算每孔接种300个细胞所需的细胞悬液的量(V_1)和每孔需要加入的含20% FBS的RPMI 1640培养基的量(V_2), 其中 $V_2 = 750 \mu\text{L} - V_1$, 每组做3~5个复孔; 每孔再加750 μ L配好的2.7%的甲基纤维素(无菌), 枪头轻轻搅拌混匀, 置细胞培养箱常规培养7~14 d。每天观察细胞的生长情况, 待细胞形成集落后, 停止培养, 倒置显微镜下观察集落形态并计数克隆形成个数, 同时拍照记录。克隆形成率=克隆形成个数/细胞接种数 $\times 100\%$ 。实验独立重复3次。

1.2.7 流式细胞术 第1 d收集各组细胞, 离心重悬, 以 1×10^6 /孔接种于6孔板中, 置于细胞培养箱中培养。48 h后收集各组细胞于离心管中, 800 r/min离心

5 min, 弃上清, 细胞经PBS洗涤2次, 再用1 mL PBS重悬于EP管中, 采用流式细胞术Annexin V和7-AAD双染料结合法检测细胞凋亡率。实验独立重复3次。

1.2.8 统计学分析 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示, 利用SPSS 17.0和GraphPad Prism 5软件进行统计学分析, 多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 髓系白血病细胞株中内源性PML的检测

qPCR及Western blot检测髓系白血病细胞株KG-1a、HL-60、OCI-AML3、THP-1和K562内源性PML的表达。结果显示, 5株白血病细胞中存在不同的PML mRNA水平, 其中THP-1细胞中PML mRNA水平较高, 与HL-60细胞相比, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1A); Western blot进一步证实, THP-1细胞中存在较高的PML蛋白质水平(图1B)。因此, 后续试验将以THP-1细胞为实验对象, 观察下调PML的表达对白血病细胞增殖和凋亡的影响。

2.2 慢病毒介导的shRNA干扰THP-1细胞PML mRNA和蛋白质水平

shRNA干扰慢病毒感染THP-1细胞后采用RT-PCR定性检测PML基因的表达。结果显示, shPML组和两个对照组中均可见PML条带, 约200 bp, 与预期产物大小一致(图2A)。与Mock组和Scramble

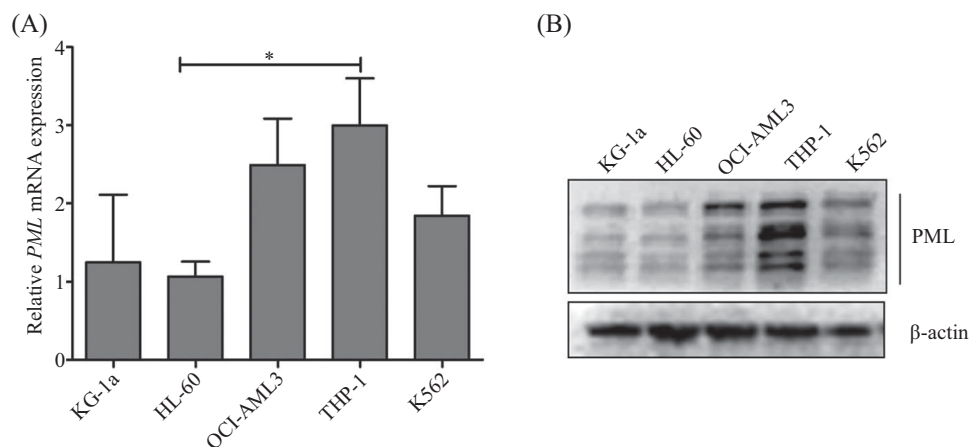
组相比, shPML组PML条带明显减弱; 进一步通过qPCR定量检测PML的mRNA水平的改变, shPML组细胞中PML mRNA水平较两个对照组显著下降($P < 0.01$), 而Mock组和Scramble组间PML mRNA水平无显著性差异($P > 0.05$)(图2B)。此外, Western blot进一步证实了shPML组PML蛋白质水平低于Mock组和Scramble组(图2C)。以上结果提示, 慢病毒介导的shRNA干扰能够下调THP-1细胞PML的mRNA和蛋白质水平, 说明成功构建了稳定表达shPML的THP-1细胞株。

2.3 干扰PML对THP-1细胞体外增殖活性的影响

为探讨干扰PML对THP-1细胞体外增殖活性的影响, 采用CCK-8法观察细胞的生长情况。结果显示, shPML组的细胞增殖能力增强, 并在培养第2 d和第4 d其增殖能力显著强于Mock组和Scramble组($P < 0.05$), 两个对照组间细胞增殖活性无显著性差异($P > 0.05$)(图3), 提示下调PML表达可促进THP-1细胞的体外增殖活性。

2.4 干扰PML对THP-1细胞克隆形成能力的影响

为进一步证明干扰PML能够增强THP-1细胞的体外增殖活性, 通过克隆形成实验观察单个细胞体外集落形成能力。结果显示, 在倒置显微镜下观察到shPML组细胞集落明显变大(图4A); 同时, shPML组细胞的克隆形成率($39.333\% \pm 0.048\%$)显著高于Mock组($12.800\% \pm 0.044\%$)和Scramble组($9.866\% \pm 0.045\%$), 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而

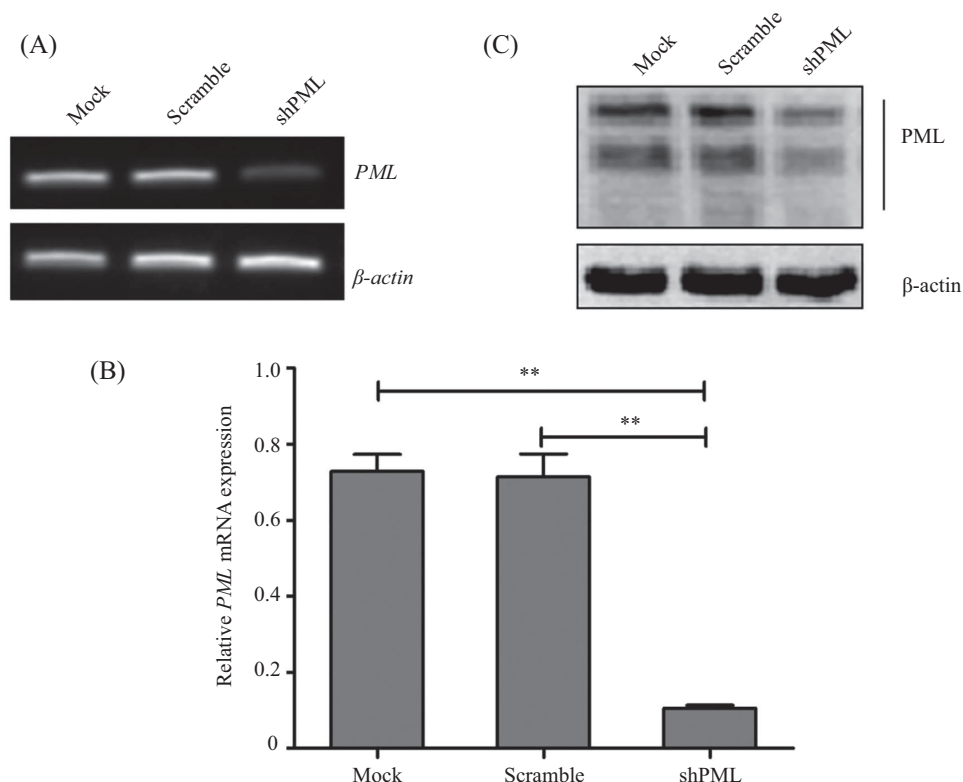


A: qPCR检测5株髓系白血病细胞中PML的mRNA水平, β -actin为内参, $*P < 0.05$; B: Western blot检测5株髓系白血病细胞中PML蛋白质水平, β -actin为内参。

A: the mRNA levels of PML in five myeloid leukemia cell lines were analysed by qPCR, normalized to β -actin. $*P < 0.05$; B: the protein levels of PML in five myeloid leukemia cell lines were measured by Western blot, normalized to β -actin.

图1 髓系白血病细胞株中内源性PML的表达

Fig.1 The endogenous expression of PML in myeloid leukemia cell lines

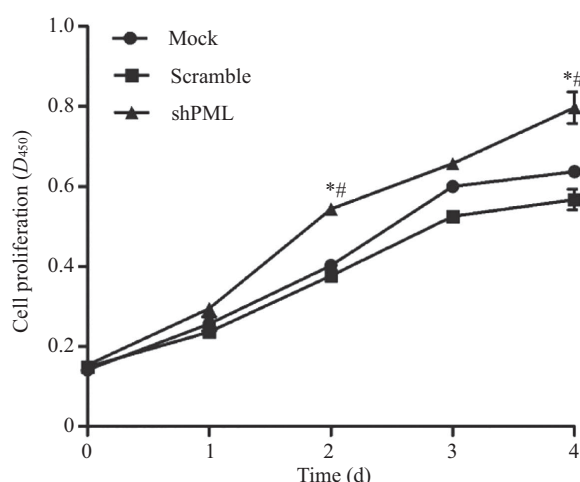


A: 靶向PML基因的shRNA慢病毒感染THP-1细胞, RT-PCR定性检测PML基因的表达, 以 β -actin为内参; B: qPCR定量检测PML mRNA水平, 以 β -actin为内参; C: Western blot检测PML的蛋白质水平, 以 β -actin为内参。Mock代表未处理组, Scramble代表阴性对照组, shPML代表shRNA干扰慢病毒实验组。** $P < 0.01$ 。

A: THP-1 cells were infected with shRNA lentivirus targeting *PML* and its negative control, RT-PCR was performed to detect *PML* gene expression, normalized to β -actin; B: qPCR was performed to analyze *PML* mRNA levels, normalized to β -actin; C: Western blot was performed to measure PML protein levels, normalized to β -actin. Mock means THP-1 cells untreated group, Scramble means shRNA negative control group, shPML means shRNA lentivirus group. ** $P < 0.01$.

图2 shRNA干扰慢病毒对THP-1细胞PML mRNA和蛋白质水平的影响

Fig.2 The effect of shRNA lentivirus targeting PML on the mRNA and protein levels of PML in THP-1 cells

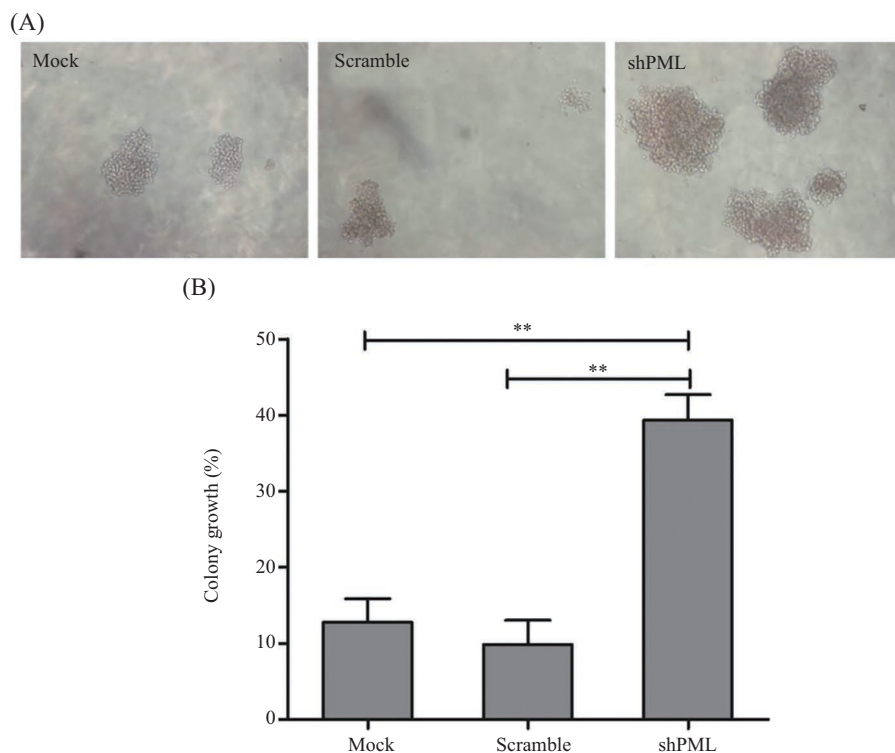


靶向PML的shRNA干扰慢病毒转染THP-1细胞, CCK-8法检测细胞增殖活性。* $P < 0.05$, 与Mock组相比; # $P < 0.05$, 与Scramble组相比。

The cell proliferation activity of THP-1 cells infected with shRNA lentivirus targeting *PML* and negative control were analysed by CCK-8. * $P < 0.05$ compared with Mock group; # $P < 0.05$ compared with Scramble group.

图3 干扰PML对THP-1细胞体外增殖活性的影响

Fig.3 The effect of PML knockdown on THP-1 cells proliferation activity *in vitro*

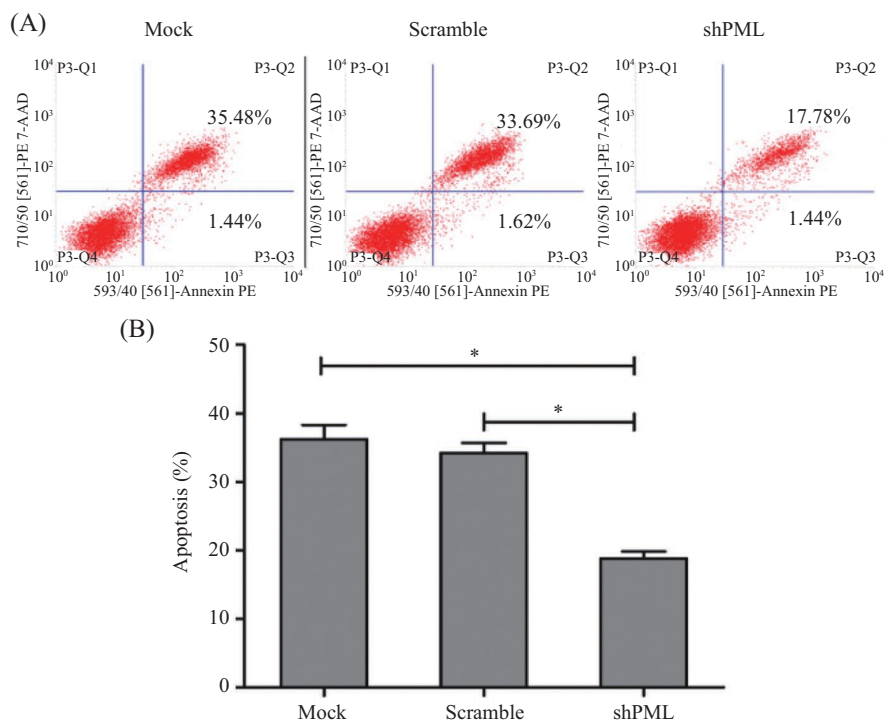


A: 倒置显微镜下观察细胞集落形态(100×); B: 统计学分析细胞克隆形成率, ** $P < 0.01$ 。

A: the morphology of cell colonies were observed under microscope (100×); B: cell colony efficiency was analysed by statistics, ** $P < 0.01$.

图4 干扰*PML*对THP-1细胞克隆形成能力的影响

Fig.4 The effect of *PML* knockdown on colony formation ability of THP-1 cells

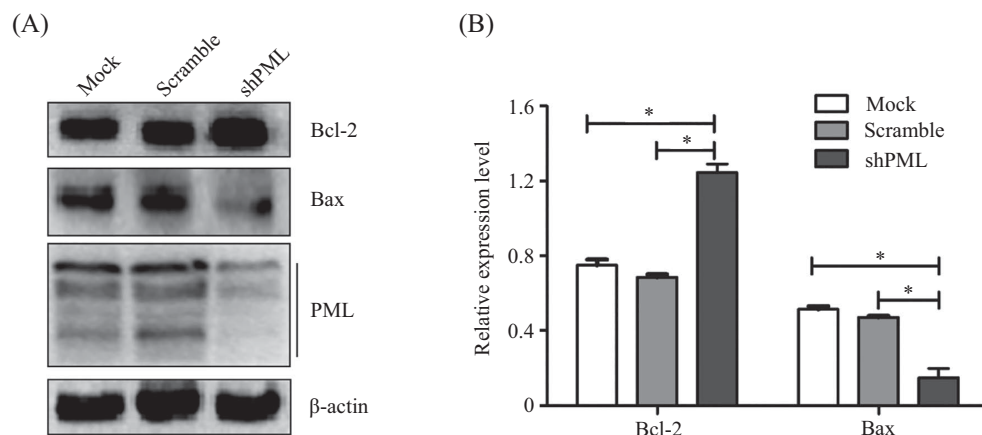


A: 流式细胞术检测干扰*PML*后各组细胞的凋亡情况; P3-Q1代表碎片或损伤细胞, P3-Q2代表细胞早期凋亡率, P3-Q3代表细胞晚期凋亡率, P3-Q4代表阴性对照组的正常细胞。B: 统计学分析各组细胞的凋亡率, * $P < 0.05$ 。

A: the apoptosis was analysed by flow cytometry; P3-Q1 stands for fragment or damaged cells; P3-Q2 stands for percentages of early apoptotic cells, P3-Q3 stands for percentages of terminal apoptotic cells, P3-Q4 stands for normal cells in negative control group. B: apoptosis rate was analysed by statistics, * $P < 0.05$.

图5 干扰*PML*对THP-1细胞凋亡的影响

Fig.5 The effect of *PML* knockdown on apoptosis of THP-1 cells

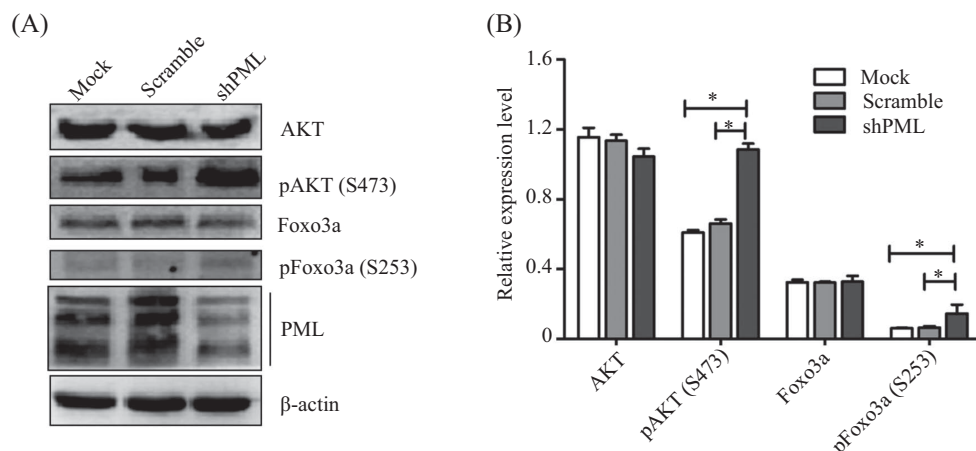


A: Western blot检测干扰PML后凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax水平的改变; B: 各组细胞中凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的相对水平, * $P<0.05$ 。

A: the levels of cell apoptosis related proteins Bcl-2 and Bax expression were determined by Western blot; B: the relative levels of Bcl-2 and Bax proteins was analysed by statistics, * $P<0.05$.

图6 干扰PML对THP-1细胞内凋亡相关蛋白质表达水平的影响

Fig.6 The effect of PML knockdown on levels of apoptosis related proteins in THP-1 cells



A: Western blot检测干扰PML后细胞中AKT、Foxo3a及其磷酸化水平的改变; B: AKT、Foxo3a及其磷酸化蛋白质的相对表达水平, * $P<0.05$ 。

A: the protein levels of AKT, Foxo3a, pAKT (S473) and pFoxo3a (S253) were determined by Western blot; B: the relative levels of AKT, Foxo3a, pAKT (S473) and pFoxo3a (S253) were analysed by statistics, * $P<0.05$.

图7 干扰PML基因对AKT/Foxo3a信号通路活性的影响

Fig.7 The effect of PML knockdown on the activity of AKT/Foxo3a signaling pathway

两个对照组间克隆形成率无显著性差异(图4B)。

2.5 干扰PML对THP-1细胞凋亡及其凋亡相关的蛋白质水平的影响

为观察干扰PML对THP-1细胞凋亡的影响, 利用流式细胞术检测细胞凋亡率。图5显示, shPML组细胞凋亡率($18.83\% \pm 1.39\%$)显著低于Mock组($36.19\% \pm 2.98\%$)和Scramble组($34.19\% \pm 2.09\%$), 差异具有统计学意义($P<0.05$), 而两个对照组间细胞凋亡率无显著性差异。此外, 利用Western blot检测了细胞凋亡相关的蛋白质Bcl-2、Bax的水平。结果发现, 与Mock和Scramble组相比, shPML组细胞抗凋亡蛋白Bcl-2的水平显著升高($P<0.05$), 促凋亡蛋白Bax

的水平显著降低($P<0.05$)(图6)。

2.6 干扰PML对AKT/Foxo3a信号通路活性的影响

为探讨PML调控THP-1细胞增殖和凋亡的分子机制, 利用Western blot检测重要信号通路AKT/Foxo3a及其磷酸化水平的改变。结果发现, 干扰PML表达可增强pAKT(S473)及下游靶分子pFoxo3a(S253)的蛋白质水平, 而总AKT和Foxo3a的蛋白质水平未见明显变化(图7), 提示AKT/Foxo3a信号通路可能参与了PML对白血病细胞恶性表型的调控。

3 讨论

PML蛋白质可通过形成PML-NBs发挥抑制细

胞增殖、促进细胞凋亡的作用。淋巴瘤、前列腺癌等实体肿瘤细胞中PML基因的表达缺失往往能够促进疾病的发展。在血液肿瘤中, PML与RAR α 形成融合基因是APL发生的分子基础。急性髓系白血病是成人最常见的白血病, 具有高度异质性, 临床上包括多种白血病亚型。PML基因在非APL的髓系白血病亚型中扮演了怎样的角色呢? 本文以髓系白血病细胞株THP-1为实验对象, 探讨下调PML的表达对髓系白血病细胞增殖和凋亡的影响。

首先, 我们检测了5株髓系白血病细胞内源性PML的表达水平。实验结果显示, 髓系白血病细胞株中存在不同的PML mRNA和蛋白水平。Western blot结果图中, PML蛋白质呈现多个条带是因为PML基因在转录水平上的选择性剪切而产生不同亚型的PML蛋白质分子, 其分子量在50~110 kDa^[8]。由于THP-1细胞中PML的表达水平较高, 因此, 后续实验我们以THP-1细胞株为研究对象, 探讨下调PML对白血病细胞增殖和凋亡方面的影响。本研究通过RNA干扰技术下调了PML mRNA和蛋白质水平, 成功构建了稳定表达shPML的THP-1细胞株。Guo等^[9]通过siRNA沉默技术成功下调人脐静脉内皮细胞PML的表达, 并发现PML可通过调控核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)而发挥抗氧化应激作用。在本研究中发现, 下调PML的表达可增强细胞的体外增殖活性和降低细胞凋亡率。有文献报道, 在人胃肠癌细胞中干扰PML使得Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)水平下调, 从而降低YAP的促凋亡作用^[10]; 在HeLa细胞中, 过表达PML则能有效抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡^[11]。这些研究和本实验结果提示, PML在髓系白血病等多种肿瘤细胞中发挥肿瘤抑制作用。Bcl-2和Bax是凋亡调控的关键分子, 实验结果表明, 干扰PML表达可上调抗凋亡蛋白Bcl-2水平、下调促凋亡蛋白Bax水平。Gao等^[12]研究发现, 在急性髓系白血病细胞株HL-60中抑制PML表达能够上调Bcl-2蛋白质水平, 下调Bax蛋白质水平, 发挥抑制细胞凋亡的作用。这提示, 下调PML促进白血病细胞的恶性转化可能与调控Bcl-2和Bax基因的表达有关。

信号转导通路异常在白血病的发病机制中占有重要的地位。研究发现, 临床上50%~80%的急性髓系白血病患者存在AKT分子的持续性激活, 且该类患者的无病生存率和总体生存率明显降低^[13], 靶

向AKT信号通路已成为治疗白血病的重要途径之一。Foxo转录因子家族作为AKT常见的下游靶分子之一, 在抑制细胞凋亡和细胞周期、血管形成以及细胞迁徙等方面发挥着重要的调控作用^[14]。为探讨AKT/Foxo3a信号通路是否参与了PML对白血病细胞增殖与凋亡的调控, 我们首先检测了干扰PML后THP-1细胞AKT、Foxo3a及其磷酸化水平的改变。结果表明, 干扰PML后AKT及下游靶分子Foxo3a的磷酸化水平升高, 而总AKT和Foxo3a水平未见明显变化。Trotman等^[15]报道, 在前列腺癌细胞中, 下调PML表达能够增强AKT的磷酸化水平。Chatterjee等^[16]证实, 在HEK293细胞中, 激活酪蛋白激酶2(casein kinase 2, CK2)促进PML蛋白质的降解, 使得核内AKT激活, pFoxo3a维持在较高水平。我们的实验结果结合上述文献报道提示, PML可能通过调控AKT/Foxo3a信号通路来影响肿瘤细胞的增殖与凋亡表型。PML可能通过何种分子机制调控AKT磷酸化水平的改变呢? Yang等^[17]报道, 肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)作为泛素连接酶(E3)可以泛素化修饰AKT信号分子, 进而增强AKT的磷酸化水平。PML蛋白质作为TRIM(tripartite motif)家族的一员, 其N-端结构包含具有泛素化连接酶特性所必要的RING结构域, 提示了PML蛋白质可能具有E3连接酶活性^[8]。此外, Trotman等^[15]发现, 内源性的PML与AKT存在相互作用。我们接下来的研究重点将放在白血病细胞中PML与AKT是否存在相互作用, 以及PML是否能够作为E3连接酶调控AKT分子的泛素化进而影响其磷酸化水平。

本研究结果证实, 下调PML表达能够促进髓系白血病细胞的体外增殖和抵抗凋亡。AKT/Foxo3a信号通路可能参与了此过程。Ito等^[7]研究发现, 高表达PML的慢性髓系白血病患者临床上预后较差, 这提示在不同的髓系白血病型别中PML可能发挥不同的调控作用。随后, 我们将在临床样本和动物实验中进一步观察PML对髓系白血病发生发展的影响, 以期为临床上髓系白血病的个体化治疗策略和研究奠定基础。

参考文献 (References)

- 1 Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP. The mechanisms of PML-nuclear body formation. Mol Cell 2006; 24(3): 331-9.

- 2 Kriehoff-Henning E, Hofmann TG. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(11): 2185-94.
- 3 Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 2006; 175(3): 415-26.
- 4 Lai HK, Borden KL. The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* 2000; 19(13): 1623-34.
- 5 Gurrieri C, Capodieci P, Bernardi R, Scaglioni PP, Nafa K, Rush LJ, *et al.* Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 269-79.
- 6 Goddard AD, Borrow J, Freemont PS, Solomon E. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 1991; 254(5036): 1371-4.
- 7 Ito K, Bernardi R, Morotti A, Matsuoka S, Saglio G, Ikeda Y, *et al.* PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* 2008; 453(7198): 1072-8.
- 8 Jensen K, Shiels C, Freemont PS. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 2001; 20(49): 7223-33.
- 9 Guo S, Cheng X, Lim JH, Liu Y, Kao HY. Control of antioxidative response by the tumor suppressor protein PML through regulating Nrf2 activity. *Mol Biol Cell* 2014; 25(16): 2485-98.
- 10 Xu Z, Chen J, Shao L, Ma W, Xu D. Promyelocytic leukemia protein enhances apoptosis of gastric cancer cells through Yes-associated protein. *Tumour Biol* 2015; 36(10): 8047-54.
- 11 Mu ZM, Le XF, Vallian S, Glassman AB, Chang KS. Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. *Carcinogenesis* 1997; 18(11): 2063-9.
- 12 Gao YM, Zhong L, Zhang X, Hu XX, Liu BZ. PML(NLS⁻) inhibits cell apoptosis and promotes proliferation in HL-60 cells. *Int J Med Sci* 2013; 10(5): 498-507.
- 13 Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, *et al.* Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: Its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 2003; 17(5): 995-7.
- 14 Dansen TB, Burgering BM. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol* 2008; 18(9): 421-9.
- 15 Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* 2006; 441(7092): 523-7.
- 16 Chatterjee A, Chatterjee U, Ghosh MK. Activation of protein kinase CK2 attenuates FOXO3a functioning in a PML-dependent manner: Implications in human prostate cancer. *Cell Death Dis* 2013; 4: e543.
- 17 Yang WL, Wang J, Chan CH, Lee SW, Campos AD, Lamothe B, *et al.* The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 2009; 325(5944): 1134-8.