

腺病毒介导的SD-HA对K562细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用机制

黄勇 张萍 杜莉 桂敏 冯文莉 彭智

【摘要】 目的 探讨融合蛋白SD-HA能否通过竞争结合BCR-ABL的第177位酪氨酸磷酸化位点(Y177p),调控与其相关的下游信号分子活性,进而抑制K562细胞增殖并诱导凋亡。方法 Western blot结合免疫共沉淀技术分析融合蛋白SD-HA与BCR-ABL的Y177p的相互作用,及其对下游信号途径Ras-MAPK和磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)-Akt的影响;Western blot分析融合蛋白SD-HA对细胞膜受体死亡途径级联反应caspase-8、caspase-3和PRAP的影响。结果 双向免疫共沉淀实验可检测到融合蛋白SD-HA能与Grb2竞争性结合BCR-ABL Y177p,形成复合物。融合蛋白SD-HA可降低活化Ras、磷酸化MAPK(p-MAPK)、p-ELK的表达水平,抑制Ras-MAPK信号途径;融合蛋白SD-HA还可降低p-Akt及Akt的底物p-GSK的表达水平,抑制PI3K-Akt信号途径,从而抑制K562细胞增殖;通过死亡效应结构域(DED)与caspases-8前体DED结合而寡聚化,激活caspases-8、caspase-3和PRAP,诱导K562细胞凋亡。结论 融合蛋白SD-HA抑制BCR-ABL-Y177与Grb2结合的策略,可作为慢性髓性白血病治疗新的切入点。

【关键词】 白血病,髓系,慢性; BCR-ABL融合蛋白; Src同源结构域2; 死亡效应结构域; 细胞增殖; 细胞凋亡

基金项目:国家自然科学基金(81501811)

Mechanisms of recombinant adenovirus-mediated SD-HA fusion protein proliferation inhibition and induced apoptosis of K562 cells Huang Yong, Zhang Ping, Du Li, Gui Min, Feng Wenli, Peng Zhi*. *Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China*

Corresponding author: Peng Zhi, Email: pzsoho@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate whether fusion protein SD-HA could regulate its downstream signaling molecule activity by competing with the phospho-BCR-ABL Y177 site, and its mechanisms to inhibit proliferation and induce apoptosis of K562 cells. **Methods** Co-immunoprecipitation interaction technology analysis of fusion protein SD-HA functioned by potently binding to the phospho-BCR-ABL Y177 site, Ras, MAPK and Akt activities were observed in the Ad5F35-SD-HA-treated cells. Western blot analyses of SD-HA fusion protein on cell membrane receptor pathway to death cascade caspase-8, caspase-3 and PRAP were performed. **Results** Exploration into the underlying mechanisms revealed that Ad5F35-SD-HA infection functioned by binding to the phospho-BCR-ABL Y177 site, which lead to a complex with Grb2. competitively disrupted the Grb2 SH2-phospho-BCR-ABL Y177 formation. The fusion protein SD-HA could reduce the activation of Ras and phosphorylation of MAPK (p-MAPK) and the expression level of p-ELK, inhibition of Ras-MAPK signaling pathway; SD-HA fusion protein could reduce p-Akt and Akt substrate p-GSK with inhibition of PI3K-Akt signaling pathway, thereby inhibiting the proliferation of K562 cells. Caspases-8-induced apoptosis signal could be activated by DED protein binding to DED domain of precursor caspases-8. **Conclusions** The strategy of fusion protein SD-HA inhibiting -Y177 BCR-ABL and Grb2 binding could be used as a novel entry point for the treatment of chronic myeloid leukemia.

【Key words】 Leukemia, myeloid, chronic; BCR-ABL fusion protein; Src homology 2; Death

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.04.012

作者单位:400010 重庆医科大学第二附属医院检验科(黄勇),血液科(张萍),感染科[杜莉、桂敏、彭智(现在中华肝脏病杂志编辑部)];
重庆医科大学检验医学部血液学教研室(冯文莉)

通信作者:彭智, Email: pzsoho@aliyun.com

effector domain; Proliferation; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81501811)

在前期研究中,我们通过基因重组技术,利用新型腺病毒载体 Ad5F35 具有高转染效率等优势^[1-2],将接头蛋白生长受体结合蛋白2(growth receptor bound protein 2, Grb2)的 Src 同源结构域2(Src homology 2, SH2)与 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated protein with death domain, FADD)的死亡效应结构域(death effector domain, DED)融合表达(携带 HA 标签的 SD-HA 融合蛋白),实验结果显示腺病毒介导的融合蛋白 SD-HA 可在 BCR-ABL 阳性慢性髓性白血病(CML)细胞中显示特异性抑制增殖和诱导凋亡的双重效应^[3-4]。本研究拟通过双向免疫共沉淀分析外源性 SD-HA 融合蛋白是否可以与内源性 BCR-ABL 的第 177 位酪氨酸磷酸化位点(Y177p)结合,形成异源二聚体,且通过 Western blot 和免疫共沉淀检测 BCR-ABL 蛋白及下游信号通路分子有丝分裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)、RAS 和 Akt 活性的变化,分析腺病毒介导的融合蛋白 SD-HA 对细胞膜死亡受体途径的激活,即 caspase 级联反应蛋白 caspase-8、caspase-3 及多聚 ADP-核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)的蛋白表达及活化情况,旨在进一步探讨腺病毒介导的治疗肽融合蛋白 SD-HA 抑制 CML 细胞恶性表型的具体分子机制。

材料与方法

1. 实验材料及仪器: Ad5F35 骨架质粒由瑞典 Fan 教授惠赠^[2],穿梭质粒 pAdTrack-CMV 由美国 He 教授惠赠。Lipofectamine 2000 为美国 Invitrogen 公司产品;鼠抗 HA 单克隆抗体、兔抗人 β -actin 抗

体、羊抗兔 IgG 抗体和 HRP 耦联的羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 公司。荧光倒置显微镜 Te2000-U 购自日本 Nikon 公司,凝胶成像系统 Gel Doc 1000、蛋白电泳槽和半干转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司。

2. SD-HA 及其突变对照 SmD-HA 的构建和鉴定:按照人 Grb2 基因的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号:NP_002077)、DED 基因的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号:NM_003824),用 primer5.0 软件辅助设计扩增人 SH2 及 DED 域基因 CDS 全长序列的 PCR 引物并经 Blast 软件比对后公司合成,实验用引物序列见表 1。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成、纯化。

PCR 扩增 SH2、DED 片段,SH2 循环参数:94 °C 预变性 5 min, 98 °C 10 s, 54 °C 10 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, -20 °C 保存备用。DED 用质粒 pGFP-FADD 为模板扩增(Andrew Thorburn 教授^[5]赠送), DED 循环参数:94 °C 预变性 5 min, 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, -20 °C 保存备用。

拼接 PCR 重组 SD-HA 及其突变对照 SmD-HA。分别用引物扩增 SH2、DED 后胶回收,然后将两个片段等摩尔混合,加入 Taq、dNTP,退火延长 5 个循环,然后加入扩增 SH2、DED 的引物(SH2 的 P1/DED 的 P2),进行常规 PCR 扩增 30 个循环。SH2-DED 的突变体 SmD(R86K)的构建同样采用拼接 PCR 技术,设计突变位点的拼接引物。将与 BCR-ABL Y177 结合很重要的 Grb2 第 86 位的精氨酸(R)突变成赖氨酸(K)。引物及 PCR 产物测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 引物序列及产物大小

引物名称	正义引物 P1(5'→3')	反义引物 P2(5'→3')	产物大小 (bp)
SH2	CGGGGTACCGCCACCATGTGGTTTTTTGGCAAA ATCCCCAG	ACGCGATATCTTCTATGTCCCGCAGGAATATCTG	294
DED-HA	CGGGGTACCGCCACCATGCCGTTCTGGTGCTG CTGCAC	CCCAAGCTTCTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA ctcGTCGTCGACGCGCCGACGAGGT	306
拼接 Linker	SH2- Linker- P2:ACCACCACCAGAACCACCACCAC CTTCTATGTCCCGCAGGAATATCTG	DED- Linker- P1:GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTCCGT TCCTGGTGCTGCTGCAC	308
Sm- R86K-L	CTCTACTCTCTTTGATAAGAAAG	CTTTCTATCAAAGAGAGTGAGAG	308

3. 细胞培养及实验分组:表达 BCR-ABL 的 K562 细胞株用含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱,常规换液传代,后续实验研究取对数生长期的细胞进行。实验分为 4 组:融合蛋白 SD-HA 组、突变对照 SmD-HA 组、空载体对照组和磷酸盐缓冲液(PBS)处理对照组。

4. 重组腺病毒对 K562 细胞转染效率观察:感染 24、48 h 后,各组病毒与 Polybrene(终浓度为 4 μg/ml)混合后感染 K562 细胞,荧光显微镜观察细胞的荧光数,筛选感染条件,通过预实验观察不同病毒滴度对细胞的转染效率,病毒感染复数(MOI)为每个细胞感染的病毒颗粒数,我们选择 MOI 为 10⁴ 来感染细胞。采用流式细胞术检测荧光蛋白表达,以未转染病毒 K562 细胞为对照,确定 48、96 h 转染效率,实验数据用流式细胞仪软件 Multicycle for windows 分析。

5. 免疫共沉淀分析融合蛋白 SD-HA 与 p-BCR-ABL (Tyr 177)蛋白质的相互作用:腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染 K562 细胞 96 h 后,收集各实验组细胞,PBS 洗涤,采用试剂盒蛋白提取试剂裂解细胞,按 ProFound™ Mammalian HA-Tag IP/Co-IP 试剂盒说明,具体步骤如下:抗 HA 预包被的琼脂糖珠与各实验组的全细胞裂解液 4 °C 免疫共沉淀反应 4 h 后,琼脂糖珠结合的沉淀物用 2×非还原性样本缓冲液洗脱,用 120 g/L 的 SDS-PAGE 分离,转膜至 PVDF 膜,用抗磷酸化 Bcr (p-Bcr) Tyr 177 抗体或抗 HA 抗体作为一抗,辣根过氧化物酶耦联的羊抗鼠或羊抗兔 IgG 分别为二抗。用 ECL 化学发光底物进行显色,化学发光成像仪中显像,Bio-Rad 凝胶成像系统分析成像结果。注意实验全程加磷酸酶抑制剂。

6. Western blot 法检测 BCR-ABL 下游信号分子的酪氨酸磷酸化水平:提取各实验组全细胞蛋白,检测 BCR-ABL 下游信号分子 MAPK、Akt 蛋白及其磷酸化蛋白 p-MAPK、p-Akt 的表达变化情况,采用常规 Western blot 法检测,实验全程需加磷酸酶抑制剂。Bio-Rad 凝胶成像系统对各蛋白条带的吸光度(A)值进行检测,以肌动蛋白(Actin)为内参照蛋白,对各实验组目的条带表达进行标准化,实验设 PBS 处理组表达水平为 1,以反映各处理组蛋白的抑制率。蛋白抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{实验组}}/A_{\text{Actin}})/(A_{\text{PBS 处理组}}/A_{\text{Actin}})] \times 100\%$ 。

7. BCR-ABL 下游信号分子 Ras、MAPK 及 Akt 激酶活性分析:参照 Ras 活性检测试剂盒(美国

Pierce 公司产品)说明书进行实验,采用 ECL 化学发光底物显色,Bio-Rad 凝胶成像系统照相并分析实验结果。提取各实验组全细胞裂解液用于检测总 Ras 蛋白,剩余裂解液与 10 μl 的 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸(pH 8)和 5 μl 的 10 mmol/L GTPγS 30 °C 孵育 15 min 后,加入琼脂糖珠(预包被 GST-Raf1-RBD 蛋白),冰浴 1 h 后进行免疫反应。洗脱结合蛋白。用 Western blot 法检测总 Ras 蛋白水平和 GST-结合 Ras(活化 Ras)水平,分析 Ras 激酶活化情况。

按照 Akt 激酶或 p44/42 MAP 激酶试剂盒(美国 Cell Signaling Technology 公司产品)操作说明,检测 MAPK 和 Akt 激酶活性。Bio-Rad 凝胶成像系统检测各实验组蛋白条带的 A 值,以内参照蛋白条带的 A 值作为参照,实验设 PBS 处理组激酶活性为 1。激酶活性抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{实验组}}/A_{\text{内参蛋白}})/(A_{\text{PBS 处理组}}/A_{\text{内参蛋白}})] \times 100\%$ 。

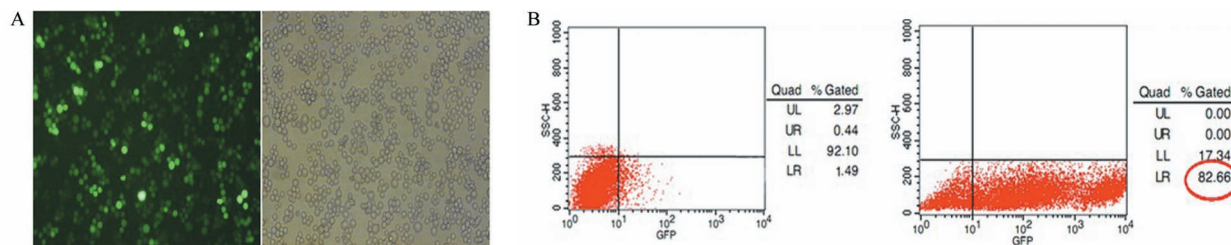
8. Western blot 法分析 caspase 级联反应蛋白的表达及活化:腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染 K562 细胞 96 h,收集各实验组细胞,PBS 洗涤,提取蛋白,Western blot 法分析各实验组凋亡膜受体死亡途径的相关凋亡蛋白 caspase-8、caspase-3 和 PARP 蛋白及活化降解片段的表达。

结 果

1. 重组腺病毒转染效率分析:各实验组分别感染 K562 细胞后,荧光显微镜观察,可见每个视野中大多数细胞表达绿色荧光蛋白(GFP)(图 1A 所示为 48 h 感染情况)。再将感染病毒 24、48、96 h 的细胞用 PBS 洗涤 3 次,流式细胞术检测细胞表达 GFP 的比率,定量分析病毒对细胞的转染效率均大于 80% (图 1B 所示为 48 h 感染结果)。

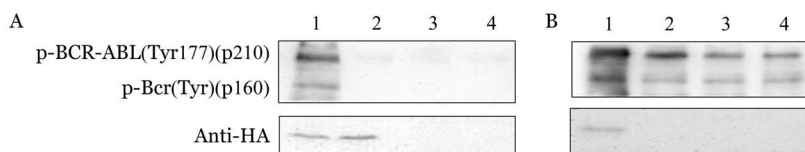
2. 双向免疫共沉淀分析融合蛋白 SD-HA 与 p-BCR-ABL (Tyr 177)蛋白质的相互作用:用抗 HA 抗体进行免疫标记,带 HA 标签的融合蛋白 SD-HA 可将 p-BCR-ABL (Tyr 177)沉淀形成复合物,而 SmD-HA 不能(图 2A);p-BCR-ABL (Tyr 177)与各实验组蛋白裂解液发生免疫反应,也可沉淀携带 HA 标签的 SD-HA 蛋白,与之发生免疫共沉淀反应(图 2B)。而对对照组病毒转染 K562 细胞后,均不能与 p-BCR-ABL (Tyr 177)蛋白发生免疫共沉淀反应。

3. 重组腺病毒介导的 SD-HA 对 MAPK 蛋白激酶活性的影响:Western blot 法检测各实验组总 MAPK 及 p-MAPK 蛋白水平,各实验组的总 MAPK



A: 荧光显微镜观察($\times 100$); B: 流式细胞术分析

图1 腺病毒转染 K562 细胞 48 h 转染效率



A: 带 HA 标签的融合蛋白 SD-HA 能与 p-BCR-ABL (Tyr 177) 发生免疫沉淀; B: p-BCR-ABL (Tyr 177) 能免疫沉淀 SD-HA 蛋白。1: 融合蛋白 SD-HA 组; 2: 突变对照 SmD-HA 组; 3: 空载体对照组; 4: PBS 处理对照组

图2 双向免疫共沉淀验证融合蛋白 SD-HA 与 p-BCR-ABL (Tyr 177) 蛋白质的相互作用

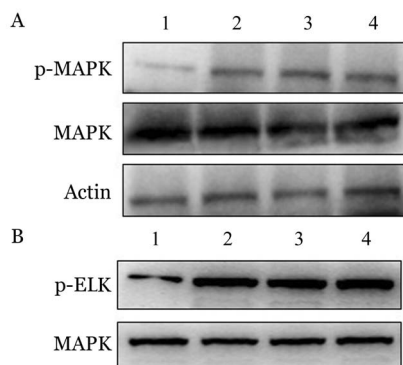
及 p-MAPK 蛋白条带 A 值通过与其对应的 Actin 条带的 A 值对比, 可见细胞内源的 MAPK 蛋白水平变化不大, 但融合蛋白 SD-HA 组 p-MAPK 水平明显降低, 蛋白抑制率约为 50%。我们用 MAPK 底物磷酸化分析法, 进一步验证 MAPK 激酶活性的变化, 用总 MAPK 蛋白作为参考, 用于校正蛋白上样, 同样证实融合蛋白 SD-HA 的转导可以明显减低 MAPK 的底物磷酸化 ELK (p-ELK) 的水平, 从而降低 MAPK 激酶活性(激酶活性抑制率约为 40%)(图 3)。

4. 重组腺病毒介导的 SD-HA 对 Akt 蛋白激酶活性的影响: 经重组腺病毒处理细胞 96 h 后, 提取各组细胞总蛋白, Western blot 检测结果显示, 与各对照组相比, 融合蛋白 SD-HA 组细胞内源性总 Akt 表达

无明显变化, 但 p-Akt 表达明显减低(蛋白抑制率为 44.0%)。为进一步验证 Akt 激酶活性变化, 我们分析了 Akt 底物磷酸化 GSK (p-GSK) 的表达水平, 结果显示, 融合蛋白 SD-HA 组与各对照组比较, p-GSK 表达水平明显减低(激酶活性抑制率为 52.3%)(图 4)。

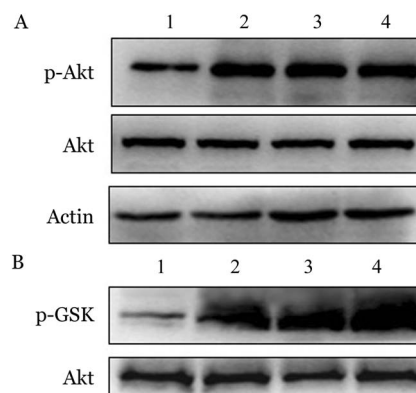
5. 重组腺病毒 Ad5F35 介导的 SD-HA 对 Ras 蛋白激酶活性的影响: Western blot 检测各组细胞总 Ras 蛋白和 GST-结合 Ras (代表活化 Ras 蛋白激酶) 水平, 分析 Ras 激酶活性, 抗 GST 用于校正蛋白上样量, 结果显示, 与各对照组相比, 融合蛋白 SD-HA 组细胞内 GST-结合 Ras (活化 Ras) 水平减低(激酶活性抑制率为 60.0%)(图 5)。

6. Western blot 分析重组腺病毒介导的 SD-HA



A: p-MAPK 表达分析; B: MAPK 激酶活性分析。1: 融合蛋白 SD-HA 组; 2: 突变对照 SmD-HA 组; 3: 空载体对照组; 4: PBS 处理对照组

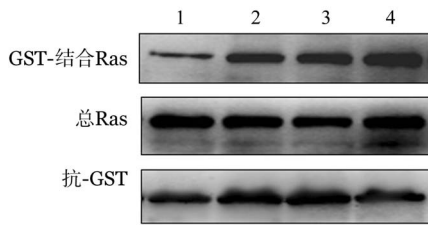
图3 Western blot 法检测融合蛋白 SD-HA 对 K562 细胞磷酸化 MAPK(p-MAPK) 及 MAPK 激酶活性的影响



A: p-Akt 表达分析; B: Akt 激酶活性分析。1: 融合蛋白 SD-HA 组; 2: 突变对照 SmD-HA 组; 3: 空载体对照组; 4: PBS 处理对照组

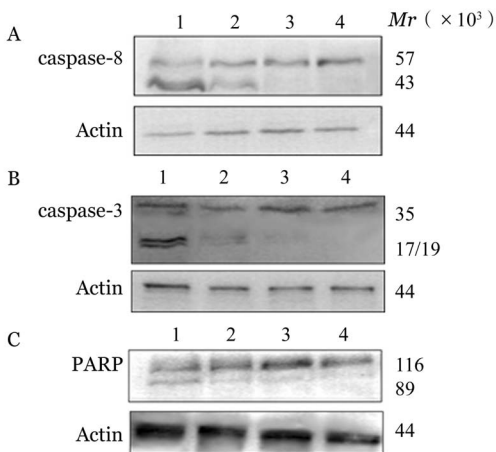
图4 Western blot 法检测融合蛋白 SD-HA 对 K562 细胞磷酸化 Akt (p-Akt) 及 Akt 激酶活性的影响

对 K562 细胞 caspase 级联反应蛋白表达及活化的影响: Western blot 检测结果如图 6 所示, 融合蛋白 SD-HA 组可见 caspase-8 蛋白出现明显的相对分子质量 43×10^3 活化降解片段, caspase-3 蛋白出现明显的相对分子质量 17×10^3 和 19×10^3 的活化降解片段 (图 6B), PARP 蛋白出现相对分子质量 89×10^3 的活化降解片段, 突变对照 SmD-HA 组 caspase-8、caspase-3 和 PARP 的活化降解片段条带隐约可见, 空载体对照组和 PBS 处理组降解片段未见。



1: 融合蛋白 SD-HA 组; 2: 突变对照 SmD-HA 组; 3: 空载体对照组; 4: PBS 处理对照组

图 5 Western blot 法检测融合蛋白 SD-HA 对 K562 细胞 Ras 激活活性的影响



A: 各组细胞 caspase-8 级联反应蛋白水平; B: 各组细胞 caspase-3 级联反应蛋白水平; C: 各组细胞 PARP 级联反应蛋白水平。1: 融合蛋白 SD-HA 组; 2: 突变对照 SmD-HA 组; 3: 空载体对照组; 4: PBS 处理对照组

图 6 Western blot 法检测各组细胞 caspase 级联反应蛋白水平

讨 论

CML 持续表达强酪氨酸激酶活性的 BCR-ABL 融合蛋白, 其 N 端第 177 位酪氨酸位点 (Y177) 是 BCR-ABL 癌蛋白与各种信号通路中接头蛋白结合的重要位点^[5]。BCR-ABL 通过其 Y177p 自身酪氨酸磷酸化后, 与接头蛋白 Grb2 的 SH2 特异性结合, 再通过 Grb2 的 N 端和 C 端的 SH3 结构域结合下游的 Gab2、Sos 分子, 分别激活磷脂酰肌醇 3-激酶

(phosphoinositide3-kinases, PI3K)-AKT 途径、RAS-MAPK 途径的细胞转导信号, 致细胞恶性转化^[5]。

鉴于 Grb2 在 CML 细胞信号传导中的重要地位, 有研究组针对 Grb2 的 SH3 结构域设计二聚肽 peptidimer-c, 阻止 Grb2 与下游分子的连接^[6-7]; Kardinal 等^[8]合成能与 Grb2 的 SH3 结构域作用的膜转导肽 HAGBP, 竞争性抑制 Grb2 与 Sos 的结合, 抑制 Ras 信号途径活化, 从而达到抑制肿瘤细胞 Ras 依赖性增殖的目的。而该实验存在一些不足, 合成的治疗肽只竞争性抑制了 Grb2 SH3 结构域 N 端与 Sos 的结合, 对其结构域 C 端介导的信号传导无作用, 不能充分阻断 BCR-ABL-Y177 磷酸化后经 Grb2 介导的信号传导, 故抑制 CML 细胞增殖作用有限。

近年来, 通过多种途径诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的重要手段, 而利用调节凋亡相关信号通路的方式诱导肿瘤细胞凋亡已经成为肿瘤研究的热点^[9-10]。在细胞凋亡的膜死亡受体途径中, 凋亡蛋白 caspase 的激活是细胞发生凋亡的关键一步, 而 FADD 通过其 DED 募集 caspase-8 前体蛋白, 从而启动 caspase-8 前体蛋白寡聚化又是 caspase-8 激活的关键^[11]。

我们前期研究证实, 外源性转入 SH2 蛋白可竞争性结合 BCR-ABL 激酶区以外的 Y177p 位点, 抑制 Grb2-Y177p 复合物形成, 从而抑制 RAS-MAPK、PI3K-Akt 信号途径的活化^[2]。所以, BCR-ABL 的 Y177p 位点可能成为治疗 CML 的一个新切入点。进一步研究中, 我们将 SH2 和 DED 融合表达的 SD-HA 蛋白转入 CML 细胞株 KU812、K562, 实验结果显示, SD-HA 可以特异性抑制 CML 细胞增殖和诱导其凋亡^[9]。

本研究以含有 BCR-ABL 融合基因的 CML 急变的细胞株 K562 为模型, 分析腺病毒 AD5F35 所介导的融合蛋白 SD-HA 对 CML 细胞抑制增殖、促进凋亡具体的作用机制。双向免疫共沉淀实验证实融合蛋白 SD-HA 可与 BCR-ABL 的 Y177p 蛋白相互作用, 形成复合物, 竞争性抑制接头蛋白 Grb2 与 BCR-ABL-Y177p 的结合, 从而阻断 Grb2 将 BCR-ABL 癌蛋白信息向下游信号途径传递。进一步分析其下游信号途径, 融合蛋白 SD-HA 能抑制 Grb2 下游细胞增殖信号途径分子 Ras、MAPK 和 AKT 的活化, 即下调其磷酸化蛋白水平, 减低激酶活性, 抑制 CML 细胞增殖。

Western blot 结果显示 caspase 级联反应蛋白 caspase-8、caspase-3 和 PARP 的活化, 推测可能是融

合蛋白SD-HA的SH2结构域与BCR-ABL-Y177p结合后,通过其携带的结构域DED在一定的空间范围内大量聚集,容易使携带的DED与caspases-8前体DED结合而寡聚化,形成异源性二聚体,从而激活caspase-8诱导的细胞凋亡信号,活化caspase-3,下游信号分子PARP活化,切断胞核内的染色体,启动细胞的程序性死亡,诱导细胞凋亡。

本研究结果证实:BCR-ABL阳性K562细胞转入新型重组腺病毒载体Ad5F35-SD-HA后,可高效表达融合蛋白SD-HA,并与Grb2的SH2结构域竞争性结合BCR-ABL-Y177p,抑制BCR-ABL-Y177磷酸化所依赖的Ras-PI3K增殖信号。并且通过其DED寡聚化,引起caspase-8前体活化,激活caspase-8及其caspase-8依赖的凋亡信号,从而诱导CML细胞凋亡。研究结果提示,抑制BCR-ABL-Y177与Grb2结合的策略作为CML治疗新靶点具有可行性。

参考文献

- [1] Li C, Guan X, Du T, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4 + T- cells by gene editing of CCR5 using adenovirus- delivered CRISPR/Cas9 [J]. J Gen Virol, 2015, 96 (8):2381-2393. DOI: 10.1099/vir.0.000139.
- [2] Na M, Fan X. Design of Ad5F35 vectors for coordinated dual gene expression in candidate human hematopoietic stem cells [J]. Exp Hematol, 2010, 38 (6):446- 452. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.03.007.
- [3] Peng Z, Luo HW, Yuan Y, et al. Growth of chronic myeloid leukemia cells is inhibited by infection with Ad- SH2- HA adenovirus that disrupts Grb2- Bcr- Abl complexes [J]. Oncol Rep, 2011, 25(5):1381-1388. DOI: 10.3892/or.2011.1197.
- [4] 彭智, 桂敏, 冯文莉, 等. 腺病毒介导的SD-HA融合蛋白表达对慢性粒细胞白血病细胞增殖和凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34 (15):1922- 1924. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4430.2013.15.002.
- [5] Gillis LC, Berry DM, Minden MD, et al. Gads (Grb2- related adaptor downstream of Shc) is required for BCR-ABL- mediated lymphoid leukemia [J]. Leukemia, 2013, 27 (8):1666- 1676. DOI: 10.1038/leu.2013.40.
- [6] Gril B, Vidal M, Assayag F, et al. Grb2-SH3 ligand inhibits the growth of HER2 + cancer cells and has antitumor effects in human cancer xenografts alone and in combination with docetaxel [J]. Int J Cancer, 2007, 121 (2): 407- 415. DOI: 10.1002/ijc.22674.
- [7] Ye YB, Lin JY, Chen Q, et al. The cytotoxicity of a Grb2- SH3 inhibitor in Bcr- Abl positive K562 cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(11):2080-2091. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.12.021.
- [8] Kardinal C, Konkol B, Lin H, et al. Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2- SoS complexes [J]. Blood, 2001, 98 (6):1773- 1781.
- [9] Tran P, Nguyen C, Klempner SJ. Targeting the phosphatidylinositol-3-kinase pathway in gastric cancer: can omics improve outcomes? [J]. Int Neurourol J, 2016, 20(Suppl 2):S131-140. DOI: 10.5213/inj.1632740.370.
- [10] Carrà G, Torti D, Crivellaro S, et al. The BCR- ABL/NF- κB signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias [J]. Oncotarget, 2016, 7 (40): 66287-66298. DOI: 10.18632/oncotarget.11507.
- [11] Thomas LR, Henson A, Reed JC, et al. Direct binding of Fas- associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor- related apoptosis- inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (31):32780-32785. DOI: 10.1074/jbc.M401680200.

(收稿日期:2017-11-08)

(本文编辑:王叶青)

更正

发表于本刊2018年第39卷第3期“中国急性早幼粒细胞白血病诊疗指南(2018年版)”一文第180页“(二)预后分层”更正为:

1. ATRA联合化疗作为一线治疗模式下的预后分层:

(1) 低危:WBC $\leq 10 \times 10^9/L$, PLT $\geq 40 \times 10^9/L$ 。

(2) 中危:WBC $\leq 10 \times 10^9/L$, PLT $< 40 \times 10^9/L$ 。

(3) 高危:WBC $> 10 \times 10^9/L$ 。

2. ATRA联合砷剂作为一线治疗模式下的预后分层:

(1) 低危:WBC $\leq 10 \times 10^9/L$ 。

(2) 高危:WBC $> 10 \times 10^9/L$ 。