

## L型PML-RAR $\alpha$ 融合基因不同剪接体对ATO作用敏感性的研究

薛凤 覃艳红 任方刚 张耀方 陈秀花 徐智芳 常建梅  
许晶 高峰 李娟 尹彬 刘海霞 王宏伟

**Sensitivity of alternative spliceosomes of L-type PML-RAR $\alpha$  fusion gene to ATO** Xue Feng, Tan Yanhong, Ren Fanggang, Zhang Yaofang, Chen Xiuhua, Xu Zhifang, Chang Jianmei, Xu Jing, Gao Feng, Li Juan, Yin Bin, Liu Haixia, Wang Hongwei

Corresponding author: Wang Hongwei, Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Molecular Diagnosis and Treatment of Blood Diseases, Taiyuan 030001, China. Email: wanghw68@hotmail.com

急性早幼粒细胞白血病(APL)特征性标志是染色体t(15;17)(q22;q21)易位,并形成PML-RAR $\alpha$ 融合基因<sup>[1-3]</sup>。本课题组前期研究发现,PML基因第5、6外显子存在选择性剪接,可形成E5(+)/E6(+)(第5外显子和第6外显子均存在)、E5(-)/E6(+)(第5外显子缺失)、E5(-)/E6(-)(第5外显子和第6外显子均缺失)三种不同的剪接转录本,E5(-)/E6(-)剪接体表达量高的患者预后差,三种剪接体对全反式维甲酸(ATRA)表现出不同的敏感性,可能是由于E5(-)/E6(-)剪接体失去核定位信号而导致胞质定位,从而表现出对ATRA作用的敏感性较其他两种剪接体差<sup>[4-5]</sup>。

治疗APL的另一靶向药物三氧化二砷(ATO)有明确的抗白血病作用,主要通过作用于PML锌指结构域,使PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白被类泛素样蛋白SUMO修饰,进而通过蛋白酶体途径降解来发挥作用<sup>[6-7]</sup>。那么对ATRA有不同敏感性的E5(+)/E6(+),E5(-)/E6(+),和E5(-)/E6(-)三种剪接体对ATO作用的敏感性如何?本研究我们以APL细胞系NB4细胞<sup>[8-9]</sup>为研究对象,采用实时荧光定量PCR法对不同剂量ATO诱导细胞凋亡和分化过程中剪接体E5(+)/E6(+),E5(-)/E6(+),和E5(-)/E6(-)相对表达量的变化进行研究,观察各剪接体对ATO作用的敏感性,现报道如下。

### 材料与方 法

1. 研究材料及主要试剂:人APL细胞系NB4细胞为本实验室长期保存。ATO购自美国Sigma公司;PBS缓冲液购自武汉博士德生物工程有限公司;青霉素、链霉素双抗购自北京全式金生物技术有限公司;RPMI 1640培养液购自美国Hyclone公司;Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物科技股份有限公司;RNA提取试剂盒购自美国Omega公司;M-MuLV逆转录酶、Premix Ex Taq均购自宝生物工程(大连)有限公司。

2. ATO溶液制备:参照文献<sup>[10]</sup>方法,取60 mg ATO溶解于2 ml 1 mol/L的NaOH溶液中,PBS稀释至浓度为100  $\mu$ mol/L,-20  $^{\circ}$ C避光保存。

3. 实验分组:实验分为对照组和不同浓度药物处理组,每组设0、24、48、72、96 h 5个观察时间点。取对数生长期状态良好的NB4细胞,按每孔 $1 \times 10^6$ 个细胞接种于6孔板。对照组各孔内加入含10% FBS及双抗的RPMI 1640培养液3 ml;药物处理组包括5组,分别加入含终浓度为0.1、0.2、1.0、1.5和2.0  $\mu$ mol/L ATO的含10% FBS及双抗的RPMI 1640培养液3 ml。将各组细胞置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内避光孵育。实验设2个复孔。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡及分化情况:在培养0、24、48、72、96 h 5个时间点,收集各组约 $10^5$ 个NB4细胞2份,179 $\times$ g离心5 min,弃上清,用PBS洗涤两次,500  $\mu$ l Binding缓冲液悬浮细胞。1份按Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书检测细胞凋亡情况;1份加入2.5  $\mu$ l CD33-FITC和4.5  $\mu$ l CD11b-PE,混匀,室温避光反应15 min,检测细胞分化情况。实验设2个复管,重复2次。

5. 实时荧光定量PCR检测PML-RAR $\alpha$ 融合基因不同剪接体相对表达量:收集药物处理组和对照组培养不同时间的NB4细胞,按RNA Kit试剂盒提取总RNA,验证浓度和纯度后,取样品总RNA 1  $\mu$ g,依据M-MuLV试剂盒说明进行逆转录反应。由于三种剪接体的特殊性,及荧光定量PCR片段大小的限制(<150 bp),将相同亚细胞定位的E5(+)/E6(+),及E5(-)/E6(+),剪接体表达总量用E6(+),表示,并将探针与共同的下游引物设计在RAR $\alpha$ 的第3外显子区域,而通过分别位于PML第4、6外显子上的两个特异上游引物,将剪接体E6(+),和E5(-)/E6(-)进行区分。引物探针序列参照文献<sup>[5]</sup>设计,均由上海基康生物技术有限公司合成。PCR体系:

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.06.019

基金项目:山西省自然科学基金(2013021034-3、2014011048-11);国家自然科学基金青年项目(81400139);山西省高等学校科技创新项目(20141107)

作者单位:030001 太原,血液病分子诊疗山西省重点实验室、山西医科大学第二医院血液病研究所

通信作者:王宏伟,Email:wanghw68@hotmail.com

cDNA 2  $\mu$ l, Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ l, DEPC水 8.5  $\mu$ l, 上、下游引物 (E5-6-F、E5-6-R、E6+F、E6+R) 各 0.5  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), TaqMan 探针 1  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), 共 25  $\mu$ l。以 ABL 为内参。反应条件: 预变性 95  $^{\circ}$ C 10 s; 变性 95  $^{\circ}$ C 15 s, 退火 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 45 个循环。为了更为直观比较各剪接体表达量变化, 将 E5(-)E6(-) 剪接体相对表达量采用剪接体表达量/内参 ABL 表达量 $\times 10^4$  进行表示, E6(+) 剪接体相对表达量采用剪接体表达量/内参 ABL 表达量 $\times 10^2$  进行表示。

6. 统计学处理: 应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。数据符合正态分布, 采用均数 $\pm$ 标准差描述, 应用重复测量的方差分析比较多组数据间的差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. ATO 分化与凋亡最佳浓度的确定: 随着 ATO 作用时间的延长, 各浓度组 NB4 细胞呈现不同的分化与凋亡趋势, 0.2  $\mu$ mol/L ATO 处理组 NB4 细胞 CD11b 的表达上升最为显著(表 1), 而 1.5  $\mu$ mol/L ATO 处理组 NB4 细胞细胞凋亡最明显(表 2)。由此确定 ATO 作用于 NB4 细胞呈现分化与凋亡

的最佳浓度分别为 0.2  $\mu$ mol/L 和 1.5  $\mu$ mol/L。

2. E6(+), E5(-)E6(-) 剪接体表达量变化: 结果见表 3, 1.5  $\mu$ mol/L ATO 作用于 NB4 细胞, 随着作用时间的延长 E6(+), E5(-)E6(-) 剪接体的表达量均呈逐渐下降趋势, 且各时间点与对照组相比差异有统计学意义(P<0.05)(表 3); 0.2  $\mu$ mol/L ATO 作用于 NB4 细胞, 随着药物作用时间的延长 E6(+), E5(-)E6(-) 剪接体表达量下降趋势不明显, 且各时间点与对照组相比差异无统计学意义(P>0.05)(表 4)。同一浓度、同一时间点 E6(+), E5(-)E6(-) 剪接体表达量下降程度差异均无统计学意义(P>0.05)。这一结果提示, 各剪接体对不同浓度 ATO 作用的敏感性差异无统计学意义。

## 讨 论

目前研究表明, 90% 以上人类基因经历选择性剪接, 与各类疾病均有一定的相关性<sup>[11]</sup>, 且不同基因剪接异构体对药物作用的敏感性可有不同<sup>[5]</sup>。如在成人急性淋巴细胞白血病(ALL)中, 由于糖皮质激素受体(GR)存在选择性剪接, 形成四种转录本 GR $\alpha$ 、GR $\beta$ 、GR $\gamma$  和 GR-P, 这些不同转录本在糖皮质激素(GC)抵抗及 ALL 进展过程中发挥不同的作用,

表 1 不同浓度三氧化二砷(ATO)作用于 NB4 细胞不同时间后 CD11b 的阳性率(%),  $\bar{x}\pm s$

| 组别              | ATO 处理时间        |                 |                 |                 |                  |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
|                 | 0 h             | 24 h            | 48 h            | 72 h            | 96 h             |
| 对照组             | 0.15 $\pm$ 0.07 | 0.10 $\pm$ 0.00 | 0.10 $\pm$ 0.00 | 0.20 $\pm$ 0.14 | 0.10 $\pm$ 0.00  |
| ATO 处理组         |                 |                 |                 |                 |                  |
| 0.1 $\mu$ mol/L | 0.45 $\pm$ 0.07 | 1.00 $\pm$ 0.42 | 0.45 $\pm$ 0.49 | 0.85 $\pm$ 0.21 | 0.75 $\pm$ 0.64  |
| 0.2 $\mu$ mol/L | 0.50 $\pm$ 0.14 | 4.75 $\pm$ 0.35 | 7.90 $\pm$ 1.27 | 9.25 $\pm$ 0.35 | 10.65 $\pm$ 0.50 |
| 1.0 $\mu$ mol/L | 0.65 $\pm$ 0.07 | 1.40 $\pm$ 0.71 | 3.45 $\pm$ 0.64 | 3.30 $\pm$ 0.71 | 3.25 $\pm$ 0.35  |
| 1.5 $\mu$ mol/L | 0.45 $\pm$ 0.21 | 1.05 $\pm$ 0.21 | 1.25 $\pm$ 0.21 | 0.70 $\pm$ 0.14 | 0.60 $\pm$ 0.14  |
| 2.0 $\mu$ mol/L | 0.15 $\pm$ 0.07 | 0.20 $\pm$ 0.14 | 0.40 $\pm$ 0.42 | 0.70 $\pm$ 0.28 | 0.35 $\pm$ 0.35  |

注: 每组设 2 个复孔, 实验重复 2 次

表 2 不同浓度三氧化二砷(ATO)作用于 NB4 细胞不同时间后细胞凋亡率(%),  $\bar{x}\pm s$

| 组别              | ATO 处理时间        |                 |                  |                  |                  |
|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
|                 | 0 h             | 24 h            | 48 h             | 72 h             | 96 h             |
| 对照组             | 0.25 $\pm$ 0.21 | 0.20 $\pm$ 0.14 | 0.35 $\pm$ 0.35  | 0.40 $\pm$ 0.42  | 0.50 $\pm$ 0.57  |
| ATO 处理组         |                 |                 |                  |                  |                  |
| 0.1 $\mu$ mol/L | 0.70 $\pm$ 0.14 | 0.65 $\pm$ 0.07 | 0.70 $\pm$ 0.28  | 0.85 $\pm$ 0.49  | 1.30 $\pm$ 0.28  |
| 0.2 $\mu$ mol/L | 0.55 $\pm$ 0.07 | 1.10 $\pm$ 0.28 | 1.05 $\pm$ 0.07  | 1.40 $\pm$ 0.14  | 1.55 $\pm$ 0.21  |
| 1.0 $\mu$ mol/L | 0.60 $\pm$ 0.14 | 1.75 $\pm$ 0.35 | 2.75 $\pm$ 0.35  | 18.40 $\pm$ 2.26 | 21.00 $\pm$ 1.41 |
| 1.5 $\mu$ mol/L | 0.65 $\pm$ 0.21 | 2.20 $\pm$ 0.42 | 3.00 $\pm$ 1.41  | 18.25 $\pm$ 2.47 | 46.50 $\pm$ 2.12 |
| 2.0 $\mu$ mol/L | 1.35 $\pm$ 0.92 | 3.85 $\pm$ 1.63 | 13.35 $\pm$ 2.33 | 0.30 $\pm$ 0.14  | 0.25 $\pm$ 0.07  |

注: 每组设 2 个复孔, 实验重复 2 次

表 3 1.5  $\mu$ mol/L 三氧化二砷(ATO)处理 NB4 细胞凋亡过程中 E6(+), E5(-)E6(-) 剪接体相对表达量的变化( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | E6(+)            |                   |                  |                              |                              | E5(-)E6(-)        |                   |                   |                              |                              |
|---------|------------------|-------------------|------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|------------------------------|
|         | 处理 0 h           | 处理 24 h           | 处理 48 h          | 处理 72 h                      | 处理 96 h                      | 处理 0 h            | 处理 24 h           | 处理 48 h           | 处理 72 h                      | 处理 96 h                      |
| ATO 处理组 | 24.44 $\pm$ 9.11 | 10.35 $\pm$ 8.58  | 4.66 $\pm$ 1.31  | 0.27 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup> | 0.32 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup> | 20.27 $\pm$ 15.40 | 9.92 $\pm$ 11.28  | 7.10 $\pm$ 7.30   | 0.11 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup> | 0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup> |
| 对照组     | 24.44 $\pm$ 9.11 | 29.97 $\pm$ 18.07 | 14.67 $\pm$ 7.55 | 13.17 $\pm$ 11.17            | 5.39 $\pm$ 0.50              | 20.27 $\pm$ 15.40 | 20.58 $\pm$ 20.57 | 17.44 $\pm$ 14.89 | 22.89 $\pm$ 29.39            | 4.06 $\pm$ 1.34              |

注: <sup>a</sup>与对照组比较, P<0.05。每组设 2 个复孔, 实验重复 2 次

表4 0.2 μmol/L 三氧化二砷(ATO)处理NB4细胞分化过程中E6(+)、E5(-)E6(-)剪接体相对表达量的变化(̄x±s)

| 组别     | E6(+)      |             |            |             |           | E5(-)E6(-)  |             |             |             |           |
|--------|------------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
|        | 处理0 h      | 处理24 h      | 处理48 h     | 处理72 h      | 处理96 h    | 处理0 h       | 处理24 h      | 处理48 h      | 处理72 h      | 处理96 h    |
| ATO处理组 | 24.44±9.11 | 13.01±0.70  | 11.44±8.17 | 14.75±14.06 | 3.80±1.13 | 20.27±15.40 | 15.67±17.67 | 12.78±21.70 | 13.51±24.45 | 0.55±0.42 |
| 对照组    | 24.44±9.11 | 29.97±18.07 | 14.67±7.55 | 13.17±11.17 | 5.39±0.50 | 20.27±15.40 | 20.58±20.57 | 17.44±14.89 | 22.89±29.39 | 4.06±1.34 |

注:每组设2个复孔,实验重复2次

GRα、GRγ高表达与GC抵抗相关而GR-P低表达与GC抵抗相关<sup>[12]</sup>。本课题组前期研究发现的PML-RARα融合基因三种剪接体E5(+)/E6(+)、E5(-)/E6(+)、E5(-)/E6(-),由于不同的亚细胞定位而表现出对ATRA作用具有不同的敏感性<sup>[5]</sup>。因此,明确不同剪接体对不同药物作用的敏感性,对于指导临床用药及个体化治疗有重要的意义。

ATO在治疗APL中的作用表现突出,目前认为其抗白血病机制在于促进细胞凋亡、诱导细胞分化、抑制细胞增殖以及抑制骨髓微血管生成等。本研究结果显示,0.2 μmol/L ATO作用NB4细胞后CD11b的表达随作用时间增加呈逐渐上升的趋势,1.5 μmol/L ATO作用后细胞凋亡率随作用时间增加呈明显上升的趋势,与文献[8,13]报道一致。随后我们用荧光定量PCR法检测了剪接体E6(+)、E5(-)E6(-)表达水平,结果表明,最佳分化浓度0.2 μmol/L ATO作用NB4细胞不同时间,各剪接体表达量下降不明显;最佳凋亡浓度1.5 μmol/L ATO作用组E6(+)、E5(-)E6(-)剪接体的表达量呈明显的下降趋势,且同一浓度、同一时间点E6(+)、E5(-)E6(-)两种剪接体表达量下降程度无差异,提示各剪接体虽具有不同的亚细胞定位,但对于ATO表现出同样的敏感性,可能与此药物作用靶点位于各剪接体共有区域的PML基因有关。

综上,我们推测,在APL中L型PML-RARα融合基因三种剪接体对ATO作用敏感且无明显差异,其表达量下降可能主要是通过ATO促凋亡途径发挥作用而实现的,从而将胞质定位的对ATRA作用敏感性差的E5(-)E6(-)剪接体进行降解,故临床上表现出ATRA与ATO两药联合治疗后突出的疗效。下一步我们将构建单一剪接体的慢病毒表达体系,在单克隆细胞水平对各剪接体对ATO作用的敏感性进行进一步探讨。

参考文献

[1] Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, et al. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL[J]. *Oncogene*, 2001, 20(49):7146-7153. DOI: 10.1038/sj.onc.1204762.

[2] Chen GQ, Shi XG, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose-dependent dual effects on APL cells[J]. *Blood*, 1997, 89(9):3345-3353.

[3] Cai X, Yu Y, Huang Y, et al. Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2003, 17(7):1333-1337. DOI: 10.1038/sj.leu.

2402983.

[4] 覃艳红, 王宏伟, 张志平, 等. PML-RARα融合基因L型选择性剪接与急性早幼粒细胞白血病患者预后的关系[J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(1):44-47. DOI: 10.3321/j.issn:0253-2727.2008.01.010.

[5] Tan Y, Bian S, Xu Z, et al. The short isoform of the long-type PML-RARA fusion gene in acute promyelocytic leukaemia lacks sensitivity to all-trans-retinoic acid[J]. *Br J Haematol*, 2013, 162(1):93-97. DOI: 10.1111/bjh.12362.

[6] Hirano S, Tadano M, Kobayashi Y, et al. Solubility shift and SUMOylation of promyelocytic leukemia (PML) protein in response to arsenic (III) and fate of the SUMOylated PML[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 287(3):191-201. DOI: 10.1016/j.taap.2015.05.018.

[7] Li J, Zou WX, Chang KS. Inhibition of Sp1 functions by its sequestration into PML nuclear bodies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e94450. DOI: 10.1371/journal.pone.0094450.

[8] Ozpolat B, Akar U, Zorrilla-Calancha I, et al. Death-associated protein 5 (DAP5/p97/NAT1) contributes to retinoic acid-induced granulocytic differentiation and arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(7):915-928. DOI: 10.1007/s10495-008-0222-9.

[9] Mandegary A, Mehrabani M. Effects of arsenic trioxide, all-trans-retinoic acid and dexamethasone on NB4 cell line [J]. *Daru*, 2010, 18(4):303-309.

[10] Ouyang J, Xu XH, Chen JH, et al. Involvement of protein phosphatase 2A in arsenic trioxide-induced differentiation and apoptosis of NB4 cells[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2008, 30(6):411-419. DOI: 10.1358/mf.2008.30.6.1186086.

[11] Chen J, Weiss WA. Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy[J]. *Oncogene*, 2015, 34(1):1-14. DOI: 10.1038/onc.2013.570.

[12] Sun X, Fang M, Guan Y, et al. Changes of glucocorticoid receptor isoforms expression in acute lymphoblastic leukemia correlate with glucocorticoid resistance[J]. *Pharmazie*, 2015, 70(5):316-321.

[13] Nayak S, Shen M, Bunaciu RP, et al. Arsenic trioxide cooperates with all trans retinoic acid to enhance mitogen-activated protein kinase activation and differentiation in PML-RARα negative human myeloblastic leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(9):1734-1747. DOI: 10.3109/10428194.2010.501535.

(收稿日期:2016-11-28)

(本文编辑:刘爽)