

## 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 μl, Premix Ex Taq 12.5 μl, DEPC水 8.5 μl, 上、下游引物 (E5-6-F、E5-6-R、E6+F、E6+R) 各 0.5 μl (10 μmol/L), TaqMan 探针 1 μl (10 μmol/L), 共 25 μl。以 ABL 为内参。反应条件: 预变性 95 °C 10 s; 变性 95 °C 15 s, 退火 60 °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×10<sup>4</sup> 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×10<sup>2</sup> 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±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 μmol/L ATO 处理组 NB4 细胞 CD11b 的表达上升最为显著 (表 1), 而 1.5 μmol/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 μmol/L 和 1.5 μmol/L。

2. E6(+), E5(-)E6(-) 剪接体表达量变化: 结果见表 3, 1.5 μmol/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 μmol/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 GRα、GRβ、GRγ 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±0.07	0.10±0.00	0.10±0.00	0.20±0.14	0.10±0.00
ATO 处理组					
0.1 μmol/L	0.45±0.07	1.00±0.42	0.45±0.49	0.85±0.21	0.75±0.64
0.2 μmol/L	0.50±0.14	4.75±0.35	7.90±1.27	9.25±0.35	10.65±0.50
1.0 μmol/L	0.65±0.07	1.40±0.71	3.45±0.64	3.30±0.71	3.25±0.35
1.5 μmol/L	0.45±0.21	1.05±0.21	1.25±0.21	0.70±0.14	0.60±0.14
2.0 μmol/L	0.15±0.07	0.20±0.14	0.40±0.42	0.70±0.28	0.35±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±0.21	0.20±0.14	0.35±0.35	0.40±0.42	0.50±0.57
ATO 处理组					
0.1 μmol/L	0.70±0.14	0.65±0.07	0.70±0.28	0.85±0.49	1.30±0.28
0.2 μmol/L	0.55±0.07	1.10±0.28	1.05±0.07	1.40±0.14	1.55±0.21
1.0 μmol/L	0.60±0.14	1.75±0.35	2.75±0.35	18.40±2.26	21.00±1.41
1.5 μmol/L	0.65±0.21	2.20±0.42	3.00±1.41	18.25±2.47	46.50±2.12
2.0 μmol/L	1.35±0.92	3.85±1.63	13.35±2.33	0.30±0.14	0.25±0.07

注: 每组设 2 个复孔, 实验重复 2 次

表 3 1.5 μmol/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±9.11	10.35±8.58	4.66±1.31	0.27±0.27 <sup>a</sup>	0.32±0.35 <sup>a</sup>	20.27±15.40	9.92±11.28	7.10±7.30	0.11±0.23 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
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: <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)