

C/EBP α 在慢性髓性白血病患者中的表达及其作用机制研究

张贵丽 董菲 栾材富 张霞 邵会媛 刘杰 孙成铭

【摘要】 目的 研究转录因子CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)在慢性髓性白血病(CML)患者中的表达情况及其作用机制。方法 收集50例CML患者(慢性期33例,加速期7例,急变期10例)骨髓标本和20名正常对照者外周血标本,用RT-PCR方法检测C/EBP α 基因mRNA的表达情况及其与bcr-abl融合基因的相关性;观察伊马替尼对K562细胞C/EBP α 基因mRNA表达的影响;采用慢病毒转染的方法将重组pLVX-C/EBP α -3FLAG-Puro及空载体pLVX-EGFP-3FLAG-Puro慢病毒质粒转入K562细胞,构建稳定表达C/EBP α 的K562细胞株;用CCK-8试剂盒检测细胞增殖;RT-PCR方法检测Foxo3a、Bim基因的表达情况。结果 与正常对照者相比,CML患者C/EBP α mRNA表达显著下降($P<0.01$),并与bcr-abl融合基因表达呈负相关($r=-0.505, P<0.01$);RT-PCR和Western blot检测结果显示成功构建稳定表达C/EBP α 的K562细胞株;K562-C/EBP α 细胞增殖水平明显低于未处理K562细胞及K562-空载体细胞;K562-C/EBP α 细胞Foxo3a、Bim基因mRNA相对表达量分别为 1.06 ± 0.06 、 0.53 ± 0.07 ,均高于K562-空载体和K562细胞($P<0.01, P<0.05$)。结论 CML患者转录因子C/EBP α 表达水平下调,过表达C/EBP α 对K562细胞增殖有抑制作用。

【关键词】 白血病,髓系,慢性,BCR-ABL阳性; CCAAT增强子结合蛋白 α ; K562细胞; 细胞增殖

The expression and role of the transcription factor C/EBP α in chronic myeloid leukemia Zhang Guili, Dong Fei, Luan Caifu, Zhang Xia, Shao Huiyuan, Liu Jie, Sun Chengming. Department of Laboratory, Yantai Yuhuangding Hospital, Medical College, Qingdao University, Yantai 264000, China
Corresponding author: Sun Chengming, Email: 18953569897@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression and the possible mechanism of the transcription factor C/EBP α in chronic myeloid leukemia (CML). **Methods** Bone marrow samples from 50 CML patients (including 33 patients in chronic phase, 7 in accelerated phase and 10 in blast crisis) and peripheral blood specimens of 20 healthy donors were collected. The expression of C/EBP α gene and the effect of Imatinib on its expression was detected by RT-PCR. C/EBP α gene was inserted into lentivirus expression vector pLVX-EGFP-3FLAG-Puro by recombinant DNA technology to construct C/EBP α stable expression in K562 cells. Cell proliferation was assayed by CCK-8. The expressions of Foxo3a and Bim genes were detected by RT-PCR. **Results** The level of C/EBP α expression was significantly declined in CML patients compared with that of normal control group ($P<0.01$) and had negative correlation with bcr-abl expression (Spearman $r=-0.505, P<0.01$). The stable K562-C/EBP α cell line was successfully established and confirmed by RT-PCR and Western blot. Cell proliferation ability was lower in the K562-C/EBP α group than that in the non-transfection and mock-vehicle groups. The expressions of Foxo3a and Bim genes were 1.06 ± 0.06 and 0.53 ± 0.07 , respectively, which was higher than that of non-transfection and mock-vehicle groups ($P<0.01, P<0.05$). **Conclusion** C/EBP α expression was decreased in CML patients, overexpression of C/EBP α could inhibit K562 cell growth.

【Key words】 Leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive; CCAAT-enhancer-binding protein- α ; K562 cell; Cell growth

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.012

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011YY064)

作者单位:264000 烟台,青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院检验中心

通信作者:孙成铭,Email:18953569897@163.com

慢性髓性白血病(CML)的主要特征是形成bcr-abl融合基因,产生具有强酪氨酸激酶活性的bcr-abl融合蛋白,导致下游信号转导通路异常^[1-2]。目前,伊马替尼作为CML的一线治疗药物,疗效显著。但是随着伊马替尼耐药的逐渐加重,寻找新的治疗靶点成为了目前研究的热点。CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)是C/EBP转录因子家族的重要成员。近年来研究发现,C/EBP α 在肺癌、乳腺癌、宫颈癌、CML等多种肿瘤中表达下降^[3-6],部分急性髓系白血病(AML)患者出现C/EBP α 基因甲基化。C/EBP α 也是调控髓系祖细胞分化为成熟粒细胞的关键转录因子,C/EBP α 磷酸化后,髓系祖细胞粒系分化受阻^[7-8]。由此可见,C/EBP α 与血液系统肿瘤的发生关系密切。本研究中,我们检测CML患者中C/EBP α 的表达情况,并探讨C/EBP α 对CML细胞株K562细胞的作用及影响机制,为寻找CML的治疗新靶点提供思路。

病例和方法

1. 病例:收集2013年3月至2015年3月我院门诊及住院的50例CML患者的骨髓标本。CML诊断参照文献^[9],其中慢性期(CP)33例,加速期(AP)7例,急变期(BP)10例。以20名健康志愿者外周血标本作为正常对照。本研究方案获得青岛大学医学院伦理委员会批准,并且所有入选者均被告知并签署了知情同意书。

2. 主要试剂:慢病毒载体pLVX-EGFP-3FLAG-Puro、CCK-8试剂盒购自上海生博医学生物工程科技有限公司;RNA提取TRIzol试剂、逆转录PCR及PCR试剂盒与胎牛血清均购自北京全式金生物技术有限公司;RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司;bcr-abl融合基因检测试剂盒购自上海源奇生物医药科技有限公司。

3. 细胞来源及处理:肾上皮细胞系293细胞、CML细胞株K562细胞均购自上海生博医学生物工程科技有限公司。参照文献^[10]方法构建转染C/EBP α 基因的K562细胞株(K562-C/EBP α 细胞)及转染空载体pLVX-EGFP-3FLAG-Puro的K562-空载体细胞。置于含10%灭活胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,常规换液传代。

4. CCK-8法检测细胞增殖:取对数生长期K562、K562-空载体及K562-C/EBP α 细胞,调整细胞密度为 5×10^4 /ml,接种于96孔板,每孔加入细胞悬

液100 μ l,每组细胞设3个时间组,分别培养6、24、48 h后,每孔加入CCK-8试剂10 μ l,继续培养4 h,用酶标仪检测450 nm处的吸光度值。绘制细胞增殖曲线。每组设3个复孔,实验重复3次。

5. 伊马替尼处理K562细胞:取未处理的对数生长期K562细胞,调整细胞密度为 5×10^5 /ml,接种于6孔板,每孔加细胞悬液2 ml。设A、B两组,A组加入终浓度为1 μ mol/L的伊马替尼溶液,为伊马替尼处理组;B组加入等体积RPMI 1640培养液,为对照组。培养3、6、9、24 h时收集细胞。每组设3个复孔,实验重复3次。

6. RT-PCR检测相关基因表达:使用TRIzol试剂盒按说明书提取各组细胞(CML患者及正常对照者,未处理K562、K562-空载体及K562-C/EBP α 细胞,伊马替尼处理组及对照组)RNA,应用逆转录试剂盒制备cDNA。以 β -actin为内参照,引物序列及产物长度见表1。PCR体系:2 \times Easy Taq Mix 10.5 μ l,上下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ l,cDNA 1.0 μ l,加双蒸水至25 μ l。 β -actin、Foxo3a条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。C/EBP α 条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s、61 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。Bim条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、62 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取PCR产物10 μ l于16 g/L琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统观察分析并拍照。

表1 RT-PCR引物序列

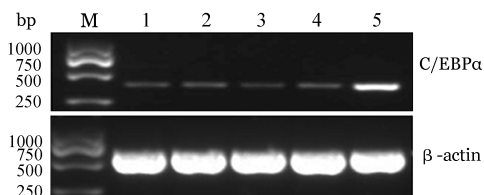
基因名称	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
β -actin	上游引物:GGCATCGTGATGGACTCCG	612
	下游引物:GCTGGAAGGTGGACAGCGA	
C/EBP α	上游引物:CACCGCTCCAATGCCTAC	372
	下游引物:CCCATCGCAGTGAGTTCCG	
Bim	上游引物:CGCCACTACCACCACTTGATTCT	480
	下游引物:GCCATACAAATCTAAGCCAGTAAATA	
Foxo3a	上游引物:ATGCGGGTCCAGAATGAG	532
	下游引物:GCGGGAGCGTGATGTTAT	

7. 统计学处理:采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;两者之间相关性分析采用Spearman方法进行分析;非正态分布计量资料采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. C/EBP α 基因在CML中的表达情况:CML患者C/EBP α mRNA的相对表达量为 0.24 ± 0.03 ,显著低于正常对照者(0.81 ± 0.06),差异有统计学意义($P<0.01$)。其中CP、AP及BP患者C/EBP α mRNA相对表达量分别为 0.28 ± 0.04 、 0.20 ± 0.06 及 0.15 ± 0.06 ,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。CML患者C/EBP α mRNA及bcr-abl融合基因表达水平呈负相关($r=-0.505, P<0.01$)。

2. 伊马替尼对C/EBP α 基因表达的影响:结果见图1,伊马替尼处理3、6、9、24 h的K562细胞C/EBP α mRNA相对表达水平分别为 0.028 ± 0.008 、 0.034 ± 0.010 、 0.041 ± 0.013 、 0.230 ± 0.071 。伊马替尼处理24 h时C/EBP α mRNA表达水平明显高于对照组(0.025 ± 0.004),差异有统计学意义($P<0.05$)。



M: Marker; 1: 对照组; 2~5: 分别为伊马替尼处理3、6、9、24 h
图1 伊马替尼处理K562细胞不同时间C/EBP α mRNA表达水平

3. C/EBP α 过表达对K562细胞增殖的影响:CCK-8法培养细胞的增殖曲线见图2, K562-C/EBP α 细胞培养0、6、24、48 h后细胞增殖水平分别为 0.056 ± 0.005 、 0.088 ± 0.010 、 0.290 ± 0.031 、 0.792 ± 0.091 ,其中培养48 h细胞增殖水平明显低于未处理K562细胞(0.792 ± 0.091)及K562-空载体细胞(1.338 ± 0.075),差异均有统计学意义($P<0.05$)。

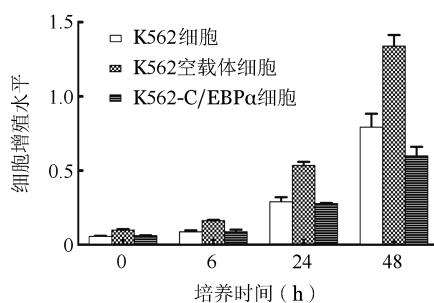
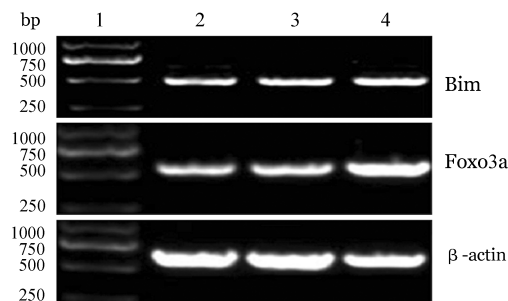


图2 CCK-8法检测不同处理组K562细胞增殖曲线

4. 相关基因的表达情况:K562-C/EBP α 细胞Foxo3a mRNA的相对表达量为 1.06 ± 0.06 ,显著高于K562-空载体(0.54 ± 0.06)和K562细胞(0.43 ± 0.08),

差异有统计学意义($P<0.01$)。K562-C/EBP α 细胞Bim mRNA的相对表达量为 0.53 ± 0.07 ,高于K562-空载体(0.26 ± 0.03)和K562细胞(0.21 ± 0.01),差异有统计学意义($P<0.05$)(图3)。



1: DL2000; 2: K562细胞; 3: K562-空载体细胞; 4: K562-C/EBP α 细胞
图3 不同处理组K562细胞凋亡相关基因Bim、Foxo3a mRNA的表达情况

讨 论

C/EBP α 基因位于染色体19q13.1,是亮氨酸拉链转录因子家族成员之一,在CML的发生和粒细胞的增殖分化中起着重要的调控作用^[11-12]。C/EBP α 是髓系细胞生成的关键因子^[13],同时也是细胞增殖抑制因子,其抑制增殖的途径主要有^[14]:①与细胞周期素偶联激酶抑制因子p21作用,提高p21活性;②与亮氨酸拉链碱性区Max蛋白相互作用,稳定周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)的抑制物,抑制CDK2和CDK4活性;③与游离的E2F相互作用,抑制E2F活性而阻断细胞周期进程。大约有10%的AML会出现C/EBP α 的突变,N-端突变则导致p42蛋白减少,p30蛋白增多,从而影响C/EBP α 的正常功能^[15-16]。目前研究发现C/EBP α 突变主要存在于AML中,在CML中尚未发现有关突变情况^[17]。

CML患者C/EBP α 表达下调的机制主要是bcr-abl融合蛋白通过诱导多聚胞嘧啶结合蛋白E2的异常表达,降低C/EBP α mRNA的水平^[6,18]。本研究中,CML患者C/EBP α mRNA相对表达量显著低于正常对照者,并与bcr-abl融合基因表达水平呈负相关,与上述结论一致。但是C/EBP α mRNA的表达水平在CML的各个分期之间差异无统计学意义,可能与样本量较少有关。伊马替尼主要是针对bcr-abl融合蛋白的靶向药物,可以降低酪氨酸激酶的活性,诱导bcr-abl⁺细胞凋亡,达到治疗CML的目的。本研究我们用伊马替尼处理K562细胞,测得C/EBP α 的表达水平增加,可能是伊马替尼降低了bcr-abl蛋白的酪氨酸激酶活性,阻断了下游信号通

路对C/EBP α 的抑制作用,使C/EBP α 水平上调。

在本实验中,我们利用逆转录病毒感染K562细胞,成功构建了稳定表达C/EBP α 的细胞株K562-C/EBP α 细胞,且发现K562-C/EBP α 细胞Foxo3a、Bim mRNA的表达量均高于K562-空载体和K562细胞组,可能机制是转入C/EBP α 可上调Foxo3a基因表达,进一步作用于下游靶基因Bim,从而促进细胞凋亡。Foxo3a是转录因子Foxo家族的成员之一,具有明显的肿瘤抑制作用,其主要靶分子有细胞死亡调节因子(如Bim)、细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子(如P27^{kip1})和FasL^[19-20]。Foxo3a转录因子能抑制AML细胞株HL-60细胞的生长和增殖,上调Bim mRNA和蛋白表达,诱导细胞凋亡^[21]。Ferrari-Amorotti等^[22]发现C/EBP α 可以通过调控Foxo3a在K562细胞凋亡过程中发挥作用。目前,关于C/EBP α 、Foxo3a单个基因在CML中的表达及作用有较多的研究,但是否存在C/EBP α -Foxo3a-Bim信号通路对CML进行调控,还需进一步实验来加以论证。

综上所述,伊马替尼可以上调K562细胞C/EBP α 的表达水平,C/EBP α 表达上调可以抑制K562细胞增殖,促进凋亡相关基因Foxo3a、Bim的表达。因此,或可利用上调CML患者C/EBP α 的表达,来干预CML细胞的增殖或凋亡途径,从而为CML的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining[J]. Nature, 1973, 243(5405): 290-293.
- [2] Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment [J]. N Engl J Med, 2003, 349(15): 1451-1464.
- [3] 刘颖汇, 朱彦君. 转录因子CCAAT/增强子结合蛋白- α (C/EBP α)与肺癌[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(12):2655-2657.
- [4] Sato A, Yamada N, Ogawa Y, et al. CCAAT/enhancer-binding protein- α suppresses lung tumor development in mice through the p38 α MAP kinase pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57013.
- [5] Pan Z, Zheng W, Zhang J, et al. Down-regulation of the expression of CCAAT/enhancer binding protein α gene in cervical squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014,14:417.
- [6] Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBP α expression through inhibitory action of hnRNP E2 [J]. Nat Genet, 2002, 30(1):48-58.
- [7] Ross SE, Radomska HS, Wu B, et al. Phosphorylation of C/EBP α inhibits granulopoiesis[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(2): 675-686.
- [8] Chang JS, Santhanam R, Trotta R, et al. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBP α -driven myeloid differentiation [J]. Blood, 2007, 110(3):994-1003.
- [9] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2013年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(5):464-470.
- [10] 邵会媛, 栾材富, 刘杰, 等. 稳定表达转录因子增强子结合蛋白 α 基因的白血病细胞株的构建及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5):636-641.
- [11] Shimokawa T, Nunomura S, Fujisawa D, et al. Identification of the C/EBP α C-terminal tail residues involved in the protein interaction with GABP and their potency in myeloid differentiation of K562 cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1829(11):1207-1217.
- [12] Fragiasso V, Chiodo Y, Ferrari-Amorotti G, et al. Phosphorylation of serine 21 modulates the proliferation inhibitory more than the differentiation inducing effects of C/EBP α in K562 cells [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(5): 1704-1713.
- [13] Wang H, Iakova P, Wilde M, et al. C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4 [J]. Mol Cell, 2001, 8(4):817-828.
- [14] Zaragoza K, Bégay V, Schuetz A, et al. Repression of transcriptional activity of C/EBP α by E2F-dimerization partner complexes[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(9): 2293-2304.
- [15] Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17):5303-5307.
- [16] Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia [J]. Nat Genet, 2001, 27(3):263-270.
- [17] Zhang SJ. The role of aberrant transcription factor in the progression of chronic myeloid leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(8): 1463-1469.
- [18] Chang JS, Santhanam R, Trotta R, et al. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBP α -driven myeloid differentiation [J]. Blood, 2007, 110(3):994-1003.
- [19] Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:925350.
- [20] Hui RC, Gomes AR, Constantinidou D, et al. The forkhead transcription factor FOXO3a increases phosphoinositide-3 kinase/Akt activity in drug-resistant leukemic cells through induction of PIK3CA expression [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(19):5886-5898.
- [21] 陈佳琳, 张丽平, 孙成铭, 等. FOXO3a转录因子对白血病HL60细胞增殖和凋亡的影响研究[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3):290-293.
- [22] Ferrari-Amorotti G, Mariani SA, Novi C, et al. The biological effects of C/EBP α in K562 cells depend on the potency of the N-terminal regulatory region, not on specificity of the DNA binding domain [J]. J Biol Chem, 2010, 285(40): 30837-30850.

(收稿日期:2015-04-20)

(本文编辑:刘爽)