基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1358-03

CML 细胞 eIF4E 和 Trib2 基因 mRNA 表达分析

黄莲芬[1],冯文莉[2],万根平[1],罗红伟[2]

(1.广州市妇女儿童医疗中心 广州市儿童医院检验科,广州 510120;2.重庆医科大学医学检验系 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:为了探索慢性粒细胞白血病(Chronic myelogenous leukemia,CML)急变机理,寻求新的治疗靶标,我们对获得的 9 例 CML 病人骨髓标本以及 CML 急性红系变细胞株中 K562 细胞株中 eIF4E 基因和 Trib2 基因的表达水平进行初步检测,为进一步的研究奠定基础。方法:分离骨髓单个核细胞,用 Trizol 裂解提取 RNA,RT-PCR 检测 eIF4E 基因和 trib2 基因 mRNA 的表达水平。结果:初步分析显示部分 CML 病人 eIF4E 基因 mRNA 表达水平很高,为 CML 疾病进展机制进一步研究奠定了基础。结论:部分 CML 病人骨髓标本中 eIF4E 和 TRIB2 基因 mRNA 表达水平较高,eIF4E 和 trib2 有可能成为 CML 病人新的治疗靶点。

【关键词】慢性粒细胞白血病;真核细胞翻译起始因子 4E;Trib2

【中国图书分类法分类号】R730.231,R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-15

mRNA expression of eIF4E and Trib2 gene in CML patients and K562 cells

HUANG Lian-fen, et al

(*Department of Laboratory Medicine, Guangzhou Children Hospital, Guangzhou Women and Children Medical Center*)

【Abstract】*Objective*: To explore the mechanism of CML-BC and the corresponding new therapeutic targets by investigating the mRNA expression of eIF4E and trib2 gene in 9 CML patients and K562 cells. *Methods*: After isolation of BM mononuclear cells and the following RNA extraction, RT-PCR was taken to show the mRNA expression of eIF4E and trib2 gene in 9 CML patients and K562 cells. *Results*: Electrophoresis analysis showed that both mRNA expression of eIF4E and trib2 gene were high in some CML patients especially in CML-BC and K562 cells, which laid foundation for further investigation on CML development. *Conclusion*: Both mRNA expression of eIF4E and trib2 gene were high in some CML patients and K562 cells, they may be the possible therapeutic targets for CML patients.

【Key words】Chronic myelogenous leukemia; Eukaryotic translation initiation factor-4E; Tribbles 2

慢性粒细胞白血病,简称慢粒(Chronic myelogenous leukemia,CML)是一种造血干细胞的恶性克隆性增殖性疾病。在我国,慢性白血病以 CML 多见,发病率约为 1~2 人/10 万人,主要表现为乏力、消瘦、低热、肝脾肿大及骨髓粒细胞恶性增殖,以 25~50 岁间发病率最高。CML 起病缓慢,约 75%~85% 的 CML 患者在 1~5 年由稳定期转入急变期,一旦急变后,半数以上病例在 3 个月内死亡,仅个别病例生存期能超过 1 年。近年来,由于酪氨酸激酶抑制剂格列卫等新药(又称 STI571)的临床应用,CML 病情可以得到一定控制,但是由于该药十分昂贵,亦存在耐药问题,而传统的异基因造血干细胞移植、干扰素及联合化疗仍然不能满足 CML 治疗现状,CML 如何预防急变以及急变治疗仍待研究。急变机理目前尚不清楚,现普遍认为,CML 急变涉及多基因、多调控的异常。

作者介绍:黄莲芬(1982-),女,硕士,
研究方向:白血病致病机理和基因治疗。

通讯作者:冯文莉,女,教授,E-mail: fengwlcqmu@sina.com。

eIF4E 过表达具有恶性转化能力,Min Zhang 等在 2006 年的 Blood 年会上报道在 CML 晚期的病人,eIF4E 表达和磷酸化以 BCR-ABL 依赖方式升高,而 Topisirovic 研究表明 CML 急变期而非 CML 慢性期 eIF4E 表达水平升高[1]。另外,Karen Kee-shan 等研究显示,trib2 基因在小鼠干细胞中的异常高表达可以抑制其向髓系分化,从而导致移植了这些干细胞的小鼠发生急性髓细胞白血病,其机制初步证明是与其通过降低C/EBP α 蛋白水平有关[2]。为了探索 CML 急变的机理从而寻求慢粒急变后新的分子治疗靶点,我们检测了 CML 病人骨髓单个核细胞和 CML 急变细胞株 K562 细胞中的这两个基因的转录表达水平,为进一步的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M-MLV 逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶,OligdT,dNTP,

RNA 提取试剂等购自 TaKaRa 公司，1640 干粉培养基购自 GIBCO 公司，L- 谷氨酰胺购自 Sigma 公司，胎牛血清购自杭州四季青公司。

1.2 引物设计

根据人 eIF4E 基因 mRNA 序列（NM_001968）和 trib2 基因 mRNA（NM_021643）设计各自的引物，序列见表 1，由上海生工合成，用无菌 TE 融解配成 100 pmol/μl 储存液，-20 ℃保存。

表 1 eIF4E 和 trib2 引物序列及产物

基因	引物序列	产物长度
eIF4E	5'-acggaatctaatcaggaggt-3'	246 bp
	5'-ttcccacataggctcaata-3'	
trib2	5'-agactccgaacttgtcgcat-3	247 bp
	5'-cgctcaaagaacacataggct-3'	
β-actin	5'-gtggacatccgcaaagac-3'	302 bp
	5'-aaagggtgtaacgcaactaa-3'	

1.3 方法

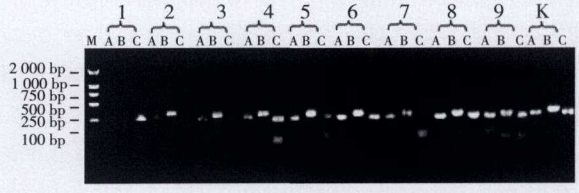
1.3.1 骨髓单个核细胞的分离 2006~2007 年重庆医科大学附属第一，第二医院血液科 CML 病人骨髓标本共 9 例，操作方法：在一个离心管 A 加入预先室温平衡后的 Ficoll 液 4 ml，在另一离心管 B 中取抗凝骨髓 2 ml，再加入等量的 Hank's 液轻轻混匀后将其轻轻沿壁加到已加 Ficoll 液的 A 离心管中，注意要使两者液面边界清晰，于 2 000 r/min 水平离心 20 min，用巴氏吸管轻轻吸取单个核细胞层，吸出的单个核细胞悬液加入 Hank's 液，2 000 r/min 离心 10 min 后，重复再洗涤细胞 1 次，离心去上清后用于提取骨髓 RNA。

1.3.2 骨髓总 RNA 提取 根据 Trizol 法提取总 RNA 步骤，提取骨髓总 RNA。

1.3.3 RT-PCR 检测 eIF4E 和 trib2 基因 mRNA 表达 CML 病人骨髓单个核细胞提取总 RNA 后，紫外分光光度计测定 RNA 纯度，并计算其含量。取 1 μg 总 RNA，按照 TaKaRa M-MLV 逆转录试剂盒说明书将其逆转录成 cDNA，cDNA 产物放 -20℃保存备用。eIF4E 和 trib2 引物经 Primer Premier 5.0 引物设计软件自行设计，eIF4E 基因引物序列 P1：5'-acggaatc-taatcaggaggt-3'，P2：5'-ttcccacataggctcaata-3'，目的片段的大小为 246 bp，trib-2 基因引物序列 P1：5'-agactccgaacttgtcg-cat-3，P2：5'-cgctcaaagaacacataggct-3'，目的片段的大小为 247 bp，β-actin 引物序列 β-actin 引物序列：P1：5'-gtgga-catccgcaaagac-3'，P2：5'-aaagggtgtaacgcaactaa-3'，目的片段大小为：302 bp，PCR 扩增采用 20 μl 体系，内含 1 μl cDNA，10 pmol 引物，2 μl 10 × PCR 缓冲液，1.6 μl 25 mmol/L $MgCl_2$，2 μl 2.5 μmol/L dNTP，Taq 酶 1 U。扩增条件两者均为：94℃ 预变性 3 min，再 94℃ 20 s、56℃ 30 s、72℃ 20 s 34 个循环，再 72℃ 延伸 10 min，以 β-actin 内参基因作为内对照，扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察分析。

2 结 果

K562 细胞和 9 例 CML 骨髓病人标本中 trib2，β-actin，eIF4E 3 个基因 RT-PCR 电泳结果如图 1 所示。实验显示，在 K562 细胞中高表达 eIF4E mRNA，在第 5、6、8、9 这些病人中 eIF4E mRNA 呈类似 K562 细胞中的高表达，K562 细胞中 trib2 mRNA 表达较高，在第 4、6、8、9 例 CML 病人 trib2 mRNA 表达呈类似 K562 细胞的高表达，而 eIF4E 和 trib2 mRNA 在第 2 和第 4 例病人同时表达较低，而在第 6、8、9 例病人中则同时呈类似 K562 细胞的高表达。已知这些 CML 病人中，6 和 8 这两例病人处于急变期，9 号病人处于加速期，其它病人处于慢性期。可见，CML 病人之间这两个基因的转录表达有一定差异，这两个基因可能与 CML 发生发展有关。



M 为 DL2000marker，K 为 k562 细胞，1~9 为 CML 病人骨髓标本，A、B、C 分别代表 eIF4E，β-actin，trib2 基因

图 1 K562 细胞和 9 例 CML 骨髓病人标本中 trib2，β-actin，eIF4E 3 个基因 RT-PCR 电泳图

3 讨 论

CML 作为一特殊的血液系统肿瘤，慢性期可以持续若干年，而最后致死性的急变期仅仅持续几个月，由于 STI571 耐药的出现，以及急变后病情迅速恶化，如何延缓急变，探索急变的机理以及寻求新的分子治疗靶点和 CML 治疗小分子药物的开发是目前研究的热点。

eIF4E 是翻译启动因子复合体 eIF4F 的关键部分，是细胞中蛋白质合成的限速步骤。现在发现越来越多的人类肿瘤中有 eIF4E 的过量表达，eIF4E 在某些肿瘤中已经作为疾病诊断和预后的一项指标。eIF4E 的过表达显著地改变了细胞表型，促进肿瘤增殖，抑制凋亡，诱导细胞转化、肿瘤形成和转移[3]，阻滞分化[4]，与疾病进展相关。CML 的致病机理是 BCR/ABL 融合蛋白，急变期 hnRNPK 表达水平呈 BCR-ABL 依赖方式升高，在 Hela 细胞中 RNA 结合蛋白 K（hnRNP K）蛋白转录调节 eIF4E 表达而诱导细胞发生恶性转化[5]。而CML 急变时 hnRNP K 蛋白促进 MYC 蛋白翻译[6]，而 MYC 蛋白能调节 eIF4E 基因转录[7]，已知 CML 急变时 P53 表达缺失，而 P53 蛋白通过结合 MYC 蛋白而抑制 eIF4E 基因转录[8]。在 K562 细胞中，hnRNP K shRNA 能降低 eIF4E mRNA 表达水平，具有一定的细胞效应[9]。双向蛋白电泳发现，eIF4E 表达差异在具有和不具有形成转移癌能力的细胞株之间非常明显。2006 年 11 月份 BLOOD 杂志举办的年会上有报道，在

CML 晚期和急变期 eIF4E 基因表达和 209 位丝氨酸磷酸化呈 BCR/ABL 依赖方式升高，在部分 CML 病人和 CML 急变期病人骨髓单个核细胞中 eIF4E 高表达。eIF4F 复合物是 CML 急变一个重要的治疗靶标，而 eIF4E 是该复合物重要的组成部分，在帽依赖翻译中起限速作用[10]。我们检测 eIF4E 在 CML 以及 CML 急变前期病人骨髓单个核细胞中表达水平，这将为我们为进一步探索 CML 新的治疗靶标提供实验依据。

Trib2 最初是犬的甲状腺细胞中的磷蛋白，为了探索 Trib2 在造血发生中的作用，Karen Keeshan 等用逆转录病毒在鼠造血祖细胞中表达这个基因来研究其体内外对生长和分化的调节作用，这导致髓系祖细胞在体外具有持久生长能力，体内则诱导发生急性粒细胞白血病（Acute myelogencus leukamia，AML），Trib2 的一重要转化功能是通过失活 C/EBPα 而发生的[2]。此外，对 285 例 AML 病人样本微点阵资料分析表明在一些亚群中 Trib2 表达升高伴发成簇的 C/EBPα 高频突变[2]，这些数据表明 Trib2 是白血病的原癌基因，导致 C/EBPα 信号通路失调[2]。CML 急变期区别于慢性期的典型特征是粒系分化受阻，出现大量的原始细胞，导致病情恶化，CML 急变后 C/EBPα 蛋白水平基本缺失，研究报道诱导表达 C/EBPα 可以诱导急变细胞向成熟的粒系分化。Danilo perrotti 发现 CML 急变时，RNA 结合蛋白 hnRNP E2 在翻译水平沉默 C/EBPα 表达，通过干扰 hnRNP E2 蛋白表达可以诱导 C/EBPα 蛋白表达上调，从而恢复细胞向粒系分化的能力[11]。hnRNP E2 诱骗寡核甘酸作用于 CML 红系变细胞株 K562，发现细胞增殖能力降低，细胞有向晚期粒系分化的倾向[12]。Trib2 高表达抑制脂肪细胞分化与其对 AKT 和 C/EBP的抑制有关[13]。

我们检测的骨髓标本多数是血液科住院病人，这些病人虽多数以 CML 收治住院，或是 CML 复发住院，但是有些病人在短期内发生急变。本实验结果显示在 K562 细胞株中高表达 eIF4E mRNA，在部分病人骨髓细胞（5、6、8、9）eIF4E mRNA 呈类似 CML 急变细胞株 K562 中的高表达。另外，K562 细胞中 trib2 mRNA 表达较高，在部分 CML 病人骨髓细胞中（4、6、8、9）trib2 mRNA 表达呈类似 K562 细胞的高表达，而 eIF4E 和 trib2 mRNA 在第 2 和第 4 例病人同时表达较低，而在第 6、8、9 例病人中则同时呈类似 K562 细胞的高表达。已知 6 和 8 这两例病人处于急变期，9 号病人处于加速期，其它病人处于慢性期，结合实验结果分析初步显示，CML 急变期和加速期病人中，eIF4E 和 trib2 这两个基因转录表达均较高，在部分慢性期病人则有高有低，而 K562 细胞株中 eIF4E 和 trib2 基因表达均较高，这两个基因的表达可能与 CML 病情恶化和疾病进展有关。但由于病例数有限，更多的情况需要进一步研究阐明。以上实验结果为我们进一步探索 CML 急变机理和急变分化受阻机制和寻找新的 CML 急变治疗途径提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Topisirovic I, Guzman M L, McConnell M J. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(24): 8992-9002.

[2] Keeshan K, He Y P, Bas J W. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPα and causes acute myelogenous leukemia[J]. Cancer Cell, 2006, 10(5): 401-411.

[3] Wang G P, Liu C. Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) andangiogenesis: prognostic markers for breast cancer[J]. BMC Cancer, 2006, 231(6): 1-12

[4] Montserrat B D, Grech G, Lindern M. Translation initiation factor 4E inhibits differentiation of erythroid progenitors[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(19): 8496-8506.

[5] Lynch M, Chen L, Michael J, et al. hnRNP K Binds a corepoly pyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(15): 6436-6453.

[6] Notari M, Neviani P, Perrotti D. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation [J]. Blood, 2006, 107(6): 2507-2516.

[7] Jones R M, Branda J, Johnston K A. An essential E box in thepromoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(9): 4754-4564.

[8] Zhu N, Gu L, Findley H W. Transcriptional repression of theeukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53[J]. Biochem Biophys Res Commun., 2005, 335(4): 1272-1279.

[9] 黄莲芬，冯文莉，罗红伟，等. hnRNP K shRNA 对 K562 细胞效应的初步研究[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(9)：1079-1084.

[10] Prabhu S, Saadat D, Zhang M. A novel mechanism for Bcr-Abl action: Bcr-Abl-mediated induction of the eIF4F translation initiation complex and mRNA translation. [J]. Oncogene, 2007, 26(8): 1188-1200.

[11] Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPα expression through inhibitory action of hnRNP E2[J]. Nature Genetics, 2002, 30(1): 48-58.

[12] 陈新敏，冯文莉，赵世巧，等. HnRNP E2 诱骗 RNA 对白血病 K562 细胞增殖的影响及其可能机制[J]. 癌症，2006，25(7)：793-797.

[13] Naiki T, Saijou E, Miyaoka Y. TRB2, a mouse tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting AKT and C/EBP beta[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 24075-24082.

（责任编辑：关蕴良）