

Bcr/abl 阳性慢性粒细胞白血病中 ASB2 和 Jak3 基因 mRNA 表达的研究*

邓亚云, 吴 薇, 张平安[△] (武汉大学人民医院检验科 430060)

【摘要】 目的 研究 Bcr/abl 阳性慢性粒细胞白血病(CML)患者骨髓中单个核细胞 ASB2 和 Jak3 基因 mRNA 的表达,探讨 Bcr/abl 阳性 CML 中蛋白泛素化与 Jak-STAT 信号通路的相关性。**方法** 收集初诊确诊为 Bcr/abl 阳性 CML 的患者 32 例(CML 组)及 34 例非白血病和健康人(对照组)作为研究对象,采集骨髓标本,采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 ASB2 mRNA 和 Jak3 mRNA 表达情况。**结果** CML 组骨髓细胞中 ASB2 mRNA、Jak3 mRNA 表达量相对于对照组分别升高了 29.9、548.7 倍,两组 ASB2 mRNA、Jak3 mRNA 表达量差异有统计学意义($P < 0.01$),且在 Bcr/abl 阳性 CML 患者中二者呈正相关($r = 0.571, P < 0.01$)。**结论** Bcr/abl 阳性 CML 患者骨髓细胞中 ASB2 与 Jak3 有异常表达,蛋白泛素化与 Jak-STAT 信号通路的交联可能与白血病的发生、发展有关,并且初次在人体骨髓细胞中证明 ASB2 与 Jak3 共同升高具有相关性。

【关键词】 Bcr/abl; 慢性粒细胞白血病; 骨髓; 单个核细胞; ASB2; Jak3

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.19.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)19-2814-03

Study on expression of ASB2 and Jak3 gene mRNA in Bcr/abl positive chronic myeloid leukemia* DENG Ya-yun, WU Wei, ZHANG Ping-an[△] (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective To study the expression level of ASB2 and Jak3 gene mRNA in bone marrow mononuclear cells of the patients with Bcr/abl positive chronic myeloid leukemia(CML) and to investigate the correlation between ubiquitination with Jak-STAT signaling pathway in CML. **Methods** The bone marrow sample was collected from 32 patients with newly diagnosed Bcr/abl positive CML(CML group) and 34 cases of non-leukemia and healthy individuals(control group), respectively. The expression levels of ASB2 mRNA and Jak3 mRNA were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The expression amounts of ASB2 mRNA and Jak3 mRNA in the bone marrow cells of the CML group were significantly increased by 29.9 and 548.7 times as compared with the control group($t = 19.4, 38.6, P < 0.01$), and the expression amounts of ASB2 mRNA and Jak3 mRNA had statistical difference between the two groups ($P < 0.01$), moreover ASB2 mRNA and Jak3 mRNA had positive correlation in the patients with Bcr/abl positive CML($r = 0.571, P < 0.01$). **Conclusion** ASB2 and Jak3 have the abnormal expression in bone marrow cells of Bcr/abl positive CML patients, suggesting that the crossing-linking between ubiquitination and Jak-STAT signaling pathway may be related with development and progression of leukemia. Moreover, besides, it is preliminarily proved that the common increase of ASB2 and Jak3 has correlation.

【Key words】 Bcr/Abl; chronic myeloid leukemia; bone marrow; mononuclear cell; ASB2; Jak3

P210 是一种由 Bcr/abl 基因编码的具有持续活性的酪氨酸激酶,被认为与慢性粒细胞白血病(CML)的发生有关,但人们对疾病进展中的分子机制仍然不明^[1-2]。为了探索 Bcr/abl 阳性 CML 的分子机制,本课题组研究了蛋白泛素化与 Jak-STAT 信号通路作用的关系。锚蛋白重复序列和细胞信号抑制因子盒蛋白(ASB)家族有 18 个成员,其功能为 ECSASB (Elongin B/C-Cullin-SOCS box protein) E3 泛素连接酶复合体的底物识别模块。通过与 Elongin C 相互作用,ASB 蛋白与 Elongin B、Cullin5 和 Rbx2 连接,使底物泛素化^[3]。众所周知,在 Bcr/abl 阳性 CML 和 CML 细胞系中 Jak2 异常激活^[4],而关于同家族成员 Jak3 的研究较少,仅仅只有 CML 中发现 Jak3 突变的研究^[1]。近年来,有研究发现在 HL-60 和 NB4 细胞系中 ASB2 的易位表达导致细胞的生长抑制并促进了细胞分

化^[5-6],以及在 Baf3 细胞系和 Lin⁻CD19⁺IgM⁻小鼠骨髓细胞中导致 JAK2、JAK3、E2A 的降解^[7-8],但这些实验均在细胞系中进行而非人骨髓细胞。本研究采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 32 例初诊 Bcr/abl 阳性 CML 患者骨髓中 ASB2 mRNA 及 Jak3 mRNA 的表达情况,以探讨二者作为白血病诊断、风险分层和指导治疗标志物的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 7 月至 2015 年 1 月以形态学、免疫学、遗传学、分子生物学(MICM)诊断标准确诊为 Bcr/abl 阳性 CML 初诊患者 32 例(CML 组)的骨髓标本,男 18 例,女 14 例;年龄 47~88 岁,平均(67.0±5.2)岁,34 例非白血病患者及健康人骨髓标本为对照组。

1.2 仪器与试剂 Trizol 和 SYBR Premix Ex Taq II 由

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200389)。

作者简介:邓亚云,男,在读硕士,主要从事细胞因子基因与感染性疾病研究。 △ 通讯作者, E-mail: zhangpingan@aliyun.com。

TaKaRa 公司提供,反转录试剂盒由 Thermo SCIENTIFIC 公司提供。PCR 分析仪由 Applied Biosystem Inc 公司生产,Ⅲ7 荧光定量 PCR 分析仪由 ABI 公司生产。

1.3 方法

表 1 基因 ASB2、Jak3 及 β-actin 的上、下游引物

目的基因	上游引物(5'~3')	下游引物(5'~3')	产物长度(bp)
ASB2(NM_001202429)	CGT GGT GCA GTT CTG TGA GT	GTG AGC CAG AGG TCT TGG AG	186
Jak3(U70065)	CCA CGG TCT GGG AAG TGT TTA	ACG AAT GAC GGC TCG GAA G	317
β-actin(NC_000007.14)	AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT	GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT	285

1.3.2 mRNA 提取和反转录 采集研究对象骨髓标本 2 mL,3 h 之内按照淋巴细胞分裂液(天津美德太平洋科技有限公司)说明书提取单个核细胞。Trizol 法提取总 mRNA。所得 RNA A_{260 nm}/A_{280 nm} 1.7,符合纯度要求。取 11 μL RNA 模板进行反转录,加入 1 μL Oligo 引物混匀并瞬时离心,65 ℃ 5 min,反应体系包括:4 μL Reaction Buffer,2 μL Mix,1 μL RI,1 μL RT。反应条件:42 ℃ 60 min,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。得到的 cDNA 产物放置在一 20 ℃ 保存备用。

1.3.3 RT-PCR 检测 反应体系:cDNA 1 μL,上、下游引物各 1 μL,SYBR Premix Ex Taq II 10 μL,ROX II 0.4 μL,ddH₂O 7.6 μL,总体积为 20 μL。扩增反应条件:94 ℃ 30 s 预变性,94 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 35 s,50 个循环。溶解曲线条件:95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。对 CML 组和对照组 2 个基因 mRNA 的表达采用 Ct 进行比较。扩增效率验证:对 2 个目的基因(ASB2、Jak3)进行了 10 倍稀释,稀释成 5 个梯度,目的基因和内参基因扩增效率相差小于 5%,且在 98%~102%,可以认为扩增效率近似相等。

1.4 统计学处理 RT-PCR 结果由荧光定量分析仪自动采集并给出目的基因和参比基因的 Ct 值,基因表达量采用试验组/对照组=2^{-ΔΔCt}表示,式中 ΔΔCt=ΔCt_{试验组}-ΔCt_{对照组},试验组及对照组 ΔCt=Ct_{目的基因}-Ct_{参比基因},ASB2 和 Jak3 mRNA 表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析进行组间比较,采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,相关性分析采用 Pearson 分析(正态分布)或 Spearman 分析(非正态分布)。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

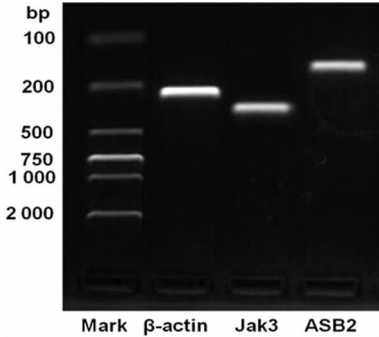
2.1 RT-PCR 分析 ASB2 和 Jak3 表达 将相当于 0.01~100 ng 总 RNA 的 cDNA 作为模板,进行 RT-PCR 扩增,制作标准

1.3.1 引物设计 利用美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站提供的 ASB2 和 Jak3 mRNA 序列和 BLAST 进行引物设计,见表 1。所有引物均由上海因维基生物技术有限公司合成。

曲线和溶解曲线。结果表明,ASB2、Jak3 及 β-actin 扩增曲线中溶解温度分别为 88、89、84 ℃ 左右,说明扩增产物为单一产物。ASB2、Jak3 及 β-actin 的标准曲线及二者的扩增效率为 98%~102%,可以认为扩增效率近似相等。

2.2 CML 组与对照组 ASB2 和 Jak3 基因 mRNA 的表达情况 对目的基因和参比基因的 Ct 值检测结果显示,CML 组 ASB2 mRNA、Jak3 mRNA 表达水平均高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1,CML 组和对对照组 ASB2 和 Jak3 mRNA 表达水平比较见表 2。

2.3 Bcr/abl 阳性 CML 患者 ASB2 和 Jak3 基因表达的相关性分析 对 Bcr/abl 阳性 CML 患者 ASB2 mRNA 表达量与 Jak3 mRNA 表达量进行了相关性分析,结果发现二者呈正相关(r=0.571,P<0.01)。



注:Mark、β-actin、Jak3、ASB2 分别为 DNA 标志物、Jak3 mRNA、ASB2 mRNA。

图 1 CML 组和对对照组 RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

表 2 CML 组和对对照组 ASB2 和 Jak3 mRNA 表达水平比较

组别	ASB2 mRNA			Jak3 mRNA		
	表达量	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}	表达量	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
CML 组	16.3±1.0*	-4.9	29.9	16.6±0.5*	-9.1	548.7
对照组	11.4±1.0	—	—	7.5±0.7	—	—

注:与对照组比较,*P<0.01;—表示无数据。

3 讨 论

尽管在近 20 年间才被发现,但 Jak-STAT 信号通路却是细胞生物学中最著名的信号通路之一。在随后的研究中,人们证明了 Jak-STAT 通路是通过细胞膜将胞外信号传输到细胞

核内。随着科研的深入,目前认为超过 50 种生长因子及细胞因子位于 Jak-STAT 信号通路下游,该信号通路广泛参与细胞增殖、分化、凋亡、生存和转移等重要细胞活动^[9]。哺乳动物主要含有 4 种 Jak 家族成员:Jak1、Jak2、Jak3 和 Tyk2,这些激酶

主要与位于膜近侧区的相对保守区域 Box1 和 Box2 识别模块结合^[10],参与受体和其特殊配体的一系列磷酸化作用。国内外研究发现,Bcr-Jak2 的融合蛋白及 Jak2 V617F 突变可导致 CML 酪氨酸激酶的异常调节,可能与 CML 的发病过程密切相关^[11],而人们对于 Jak3 在 CML 中的研究甚少。Jak3 主要在造血细胞系中表达,并且在 CML 患者骨髓细胞中存在 rs3008 和 rs3212713 突变^[5]。另有研究发现,Jak3 基因敲除小鼠表现出严重的联合免疫缺陷^[12-13],并且伴有骨髓造血的异常调节^[14]。此外,ASB2 蛋白被发现与 ElonginB/C/Cullin5 形成 E3 泛素酶复合体,其作用底物为 Jak2 和 Jak3^[15-16],导致底物蛋白的降解,但以上实验均在体外细胞系中进行,而非体内活细胞实验。

为了探索 ASB2 与 Jak3 在 Bcr/abl 阳性 CML 中的关系,本课题组检测分析了 Bcr/abl 阳性 CML 患者骨髓中单个核细胞标本,CML 组 ASB2 mRNA、Jak3 mRNA 表达水平较对照组分别升高了 29.9 倍和 548.7 倍,CML 组与对照组 ASB2 mRNA、Jak3 mRNA 表达水平差异有统计学意义($P<0.01$)。ASB2 基因表达的显著升高,激活了 E3 泛素酶体系,可能导致肿瘤因子的降解,与 Jak-STAT 信号通路形成负反馈调节,与 CML 的发生机制密切相关。SOCS 盒连接蛋白的激活也被认为与 Jak 家族蛋白的 JH1 激酶区域相互作用,具有抑制激酶活性的功能^[17-18],其功能导致 STATs 基因失活,使下游基因表达调控受阻。有趣的是,本研究发现 CML 组 Jak3 mRNA 转录水平较对照组显著升高,这个结果是否能说明 Jak3 与 CML 的 rs3008 和 rs3212713 突变有关,需进行更深入的研究。进一步分析 ASB2 mRNA 与 Jak3 mRNA 表达水平的相关性,发现二者呈正相关($r=0.571, P<0.01$),这个结果证明 Bcr/abl 阳性 CML 中蛋白泛素化与 Jak-STAT 信号通路具有较高相关性。

本研究首次在 Bcr/abl 阳性 CML 骨髓细胞中研究蛋白泛素化与 Jak-STAT 信号通路的相互作用,为白血病的发病机制研究提供了新的视野。ASB2 参与 Jak-STAT 信号通路的调节,可能在调节肿瘤因子和原癌基因的过程中起重要作用,其在 Bcr/abl 阳性 CML 发生、发展中如何激活泛素化,作用的底物种类有多少,是后期研究的方向。进一步的研究需要跟踪不同 Asb2-Jak3 表达模式的患者及他们后期的肿瘤发展。

参考文献

- [1] Kim DH, Xu W, Ma C, et al. Genetic variants in the candidate genes of the apoptosis pathway and susceptibility to chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2019, 113(11): 2517-2525.
- [2] 郭杰. 酪氨酸激酶抑制剂治疗慢性粒细胞白血病的进展[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(20): 2761-2763.
- [3] Kohroki J, Nishiyama T, Nakamura T, et al. ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes[J]. FEBS Lett, 2005, 579(30): 6796-6802.
- [4] Xie S, Wang Y, Liu J, et al. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation[J]. Oncogene,

2001, 20(43): 6188-6195.

- [5] Kohroki J, Fujita S, Itoh N, et al. ATRA-regulated Asb-2 gene induced in differentiation of HL-60 leukemia cells[J]. FEBS Lett, 2001, 505(2): 223-228.
- [6] Guibal FC, Moog-Lutz C, Smolewski P, et al. ASB-2 inhibits growth and promotes commitment in myeloid leukemia cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 218-224.
- [7] Heuze ML, Guibal FC, Banks CA, et al. ASB2 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cullin 5 and Rbx1 to reconstitute an E3 ubiquitin ligase complex[J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 5468-5474.
- [8] McDaniel TG, Spurlock DM. Ankyrin repeat and suppressor of cytokine signaling(SOCS) box-containing protein(ASB) 15 alters differentiation of mouse C2C12 myoblasts and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase and Akt[J]. J Anim Sci, 2008, 86(11): 2897-2902.
- [9] 王凤梅. JAK 信号通路抗肿瘤治疗[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(5): 589-591.
- [10] Wells JA, de Vos AM. Hematopoietic receptor complexes[J]. Annu Rev Biochem, 1996, 65(1): 609-634.
- [11] Warsch W, Walz C, Sexl V. JAK of all trades: JAK2-STAT5 as novel therapeutic targets in BCR-ABL1 chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2013, 122(13): 2167-2175.
- [12] Nosaka T, van Deursen JM, Tripp RA, et al. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3[J]. Science, 1995, 270(5237): 800-802.
- [13] Park SY, Saijo K, Takahashi T, et al. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice[J]. Immunity, 1995, 3(6): 771-782.
- [14] Grossman WJ, Verbsky JW, Yang L, et al. Dysregulated myelopoiesis in mice lacking Jak3[J]. Blood, 1999, 94(3): 932-939.
- [15] Wu W, Sun XH. A mechanism underlying notch induced and ubiquitin-mediated Jak3 degradation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(48): 41153-41162.
- [16] Nie L, Xu M, Vladimirova A, et al. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities[J]. EMBO J, 2003, 22(21): 5780-5792.
- [17] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop[J]. EMBO J, 1999, 18(5): 1309-1320.
- [18] Nicola NA, Greenhalgh CJ. The suppressors of cytokine signaling(SOCS) proteins: important feedback inhibitors of cytokine action[J]. Exp Hematol, 2000, 28(10): 1105-1112.

(收稿日期: 2015-01-26 修回日期: 2015-04-15)