

慢病毒载体上调 GADD45 α 增强 伊马替尼耐药株 K562IR 细胞的药物敏感性

刘雪妮, 王超, 程艳红, 杨鹏

摘要 目的 探讨通过慢病毒载体上调 GADD45 α 基因对伊马替尼(IM) 耐药株 K562IR 细胞的增殖、迁移及凋亡的影响。方法 培养 K562 细胞及伊马替尼耐药细胞 K562IR, 采用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR) 和 Western blot 法检测 K562 和 K562IR 细胞中 GADD45 α mRNA 和蛋白的表达水平; 采用过表达 GADD45 α 的慢病毒载体及对照载体转染于 K562IR 细胞中, 分别为 Lv-GADD45 α 和 Lv-NC, 通过 Western blot 检测上调后各组细胞 GADD45 α 蛋白表达水平, 并进一步用 CCK-8 法、Tanswell 法和 Annexin V-FITC/PI 双染法检测转染后细胞增殖、迁移和凋亡的变化。结果 K562IR 细胞中的 GADD45 α 蛋白和 mRNA 表达水平低于 K562 细胞, GADD45 α 基因转染后, Lv-GADD45 α 组细胞中的 GADD45 α 蛋白表达水平高于 Lv-NC 组。Lv-GADD45 α 组细胞在伊马替尼处理后, IC₅₀ 值低于 Lv-NC 组, 凋亡率高于 Lv-NC 组, 同时细胞迁移能力也下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 通过上调伊马替尼耐药株 K562IR 细胞中 GADD45 α 基因, 可以增强慢性髓系白血病细胞 K562IR 对于伊马替尼的敏感性, 抑制白血病细胞的增殖、促进其凋亡。

关键词 慢性粒细胞白血病; K562; GADD45 α ; 伊马替尼; 耐药性

中图分类号 R 733.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1920-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.014

慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML) 是早期多能造血干细胞来源的恶性骨髓增生性疾病, 它的细胞遗传学的特点是存在费城(Ph) 染色体 t(9;22)(q34;q11) 的相互易位, 这些染色体的易位诱导形成了一个独特的 BCR-ABL 基因^[1], 随后 ABL 蛋白的失调导致 CML 细胞增殖能力增强, 抗凋亡能力减弱, 并改变关键的黏附性^[2]。CML 在癌症治疗历史上的一个重大进展就是甲磺酸伊马替

尼(imatinib mesylate, IM) 的出现, 它是一种半特异性的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine-kinase inhibitor, TKI), 可以有效减少 BCR-ABL mRNA 的表达, 并产生极高的完全血清学反应(CHR) 和细胞遗传学反应(CCyR)^[3]。但是类似于其他化疗药物, IM 也会出现耐药性, 已知的耐药机制主要有 BCR-ABL 过表达与 BCR-ABL 扩增相关, 以及耐多药 P-糖蛋白(MDR-1) 过表达, 更常见的机制是在 BCR-ABL 激酶结构域的点突变的存在^[2]。GADD45 α 基因是一种重要的抑癌基因, 在 DNA 修复、细胞周期阻滞、凋亡、血管生成抑制、衰老、信号转导和 DNA 去甲基化中发挥重要作用^[4], GADD45 α 缺失可加速 BCR-ABL 驱动的 CML, 导致更具侵袭性的疾病发展^[5]。该课题组前期研究^[6] 表明, GADD45 α 基因上游起负调控作用的 miR-362-5p 在 IM 耐药的 K562 细胞(K562IR) 中的表达是在 IM 敏感的 K562 细胞中的 4.2 倍。因此, 该研究推测 CML 细胞 K562 对 IM 的耐药可能与 GADD45 α 表达调控有关, 该研究通过过表达基因等方法, 探讨 GADD45 α 对耐药株 K562IR 细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 人慢性髓系白血病细胞 K562、IM 耐药细胞 K562IR 购自中国科学院上海细胞生物学研究所, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 及 RPMI 1640 培养液均购自美国 Gibco 公司, 青霉素-链霉素(PS) 购自美国 Sigma 公司, CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo Molecular Technologies 公司, 慢病毒载体(滴度 9×10^8 TU/ml) 及对照载体(滴度 2×10^8 TU/ml) 均购自上海 Genepharma 公司, 嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司, 逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, Annexin V、PI 细胞凋亡抗体购自美国 BD 公司, RIP 裂解液、蛋白酶抑制剂及 BCA 蛋白定量检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司, Anti-GADD45 α 兔单克隆抗体和 HRP 标记的二抗购自德国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 荧光显微镜购自日

2021-10-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH273)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院输血科, 合肥 230022

作者简介: 刘雪妮, 女, 硕士研究生;

杨鹏, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yang-peng00812@163.com

本 Olympus 公司, Western blot 电泳仪和凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司, 流式细胞仪、流式细胞分析软件和实时荧光定量 PCR 仪(qRT-PCR) 购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养及转染 细胞复苏后培养于 1640 完全培养基(10% FBS, 1% PS 和 RPMI 1640 的培养液) 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度下培养, 适时换液、传代。取对数期的细胞进行转染。将 K562 和 K562IR 细胞按 4×10^5 /孔接种于 24 孔板内。设置 K562 不做转染作为对照组、K562IR 分别转染慢病毒空载和含 GADD45 α 的慢病毒作为阴性对照组和实验组, 分别命名为 K562、Lv-NC 和 Lv-GADD45 α 将慢病毒稀释在细胞维持培养基中加入聚凝胺(5 μ g/ml), 后加入到相应的细胞孔板中, 12 ~ 24 h 移去细胞感染后的病毒液, 加入完全培养基 37 ℃ 5% CO₂ 过夜 72 h 后荧光显微镜观察 GFP 表达情况。

1.3 稳定表达细胞系的筛选 为了筛选出稳定表达的细胞株, 将慢病毒载体中设计 Puromycin 抗性, 将细胞置于含有 2 μ g/ml 的嘌呤霉素的新鲜培养基中, 每孔细胞密度不超过 25%, 每隔 2 ~ 3 d 移除和更换含有嘌呤霉素的培养基, 并进行细胞观察, 7 d 后再次观察 GFP 表达情况, 并收集细胞进行下一步实验。

1.4 GADD45 α 表达的检测 ① qRT-PCR 检测 GADD45 α 的 mRNA 水平: 收集处于对数生长期的各组细胞, PBS 洗 2 ~ 3 次后加入 TRIzol 试剂 1 ml 裂解 15 min, 加入三氯甲烷 1 ml, 低温下 12 000 r/min 离心 15 min, 加入等体积的异丙醇混合后, 静置 10 min, 低温下 12 000 r/min 离心 15 min 后取沉淀, 紫外分光光度计下检测 RNA 纯度。合成引物由上海生工生物工程公司提供, 序列引用先前实验^[6], GADD45 α Forward: 5'-GGGCGAATTCGGATCCGCCACCATGACTTTGGAGG-3', Reverse: 5'-TTGGAATTCGCGGCCGCTCACCGTTCAGGGAGATTAAT-3'; GAPDH Forward: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGCTCGTAT-3', Reverse: 5'-AGCCTTCTCCAT-GGTGGTGAAGAC-3'。反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃、10 s, 60 ℃、30 s, 72 ℃、15 s, 循环 40 次。② Western blot 检测细胞中 GADD45 α 蛋白的表达: 收集细胞后加入裂解液冰上裂解 30 min, 3 000 r/min 离心 30 min 后收集上清液, 并使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 调整各组蛋白浓度后进行上样, 经过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白、PVDF 转膜、5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 加入 GADD45 α (1 : 1 000) 和 β -ac-

tin(1 : 10 000) 一抗 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜处理 3 次后, 再加入辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗(1 : 1 000) 室温孵育 2 h, TBST 再次洗膜处理 3 次, 最后用 ECL 发光液中激发荧光, 显影并定影。分别计算出各组蛋白的相对表达量。

1.5 转染后细胞增殖能力的 CCK-8 法检测 采用 CCK-8 法检测药物对于各组细胞的半数抑制浓度 IC₅₀。培养处于对数生长期的各组细胞, 稀释密度为 2.0×10^5 /ml, 按 100 μ l/孔接种于 96 孔板, 每组设置 3 个复孔, 设置梯度浓度的 IM 干预, 终浓度为 0.0、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μ mol/L, 培养 24 h 后, 加入 CCK-8 试剂 100 μ l 后继续培养 2 h, 经过酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 A₄₅₀。并计算 IC₅₀。

1.6 转染后细胞凋亡的 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测 加入 10 μ mol/L 的 IM 处理 K562 和慢病毒载体处理后的 K562IR, 24 h 收集细胞后加入 Binding Buffer 重悬。而后加入 Annexin V-FITC 混匀避光反应 10 min, 再加入 PI 染色避光反应 10 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.7 转染后细胞迁移能力的 Transwell 法检测 取对数期的细胞加入 Transwell 小室, 24 孔板下室加入完全培养基和 10 μ mol/L IM 干预, 待培养 24 h 后取出小室, 弃去培养基, 甲醇固定后用 0.1% 的结晶紫染色, 棉签擦去上层未迁移的细胞后镜下观察。**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 并用 *t* 检验进行组间两两比较。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GADD45 α 在 K562 和 K562IR 细胞中的表达情况 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 K562 和 K562IR 细胞中 GADD45 α 的表达, 结果显示 K562 组细胞中的 GADD45 α 蛋白和 mRNA 表达水平高于 K562IR 细胞(*P* < 0.05) 结果见图 1。

2.2 转染效率检测 荧光图片显示(图 2) 细胞荧光效率达 85% 以上。采用 Western blot 检测转染后实验各组中 GADD45 α 的表达, 结果显示 Lv-GADD45 α 组细胞 GADD45 α 蛋白表达水平上调, 相比 Lv-NC 组差异有统计学意义(*P* < 0.05), 而 Lv-GADD45 α 组和 K562 组比较差异无统计学意义, 结果见图 3。

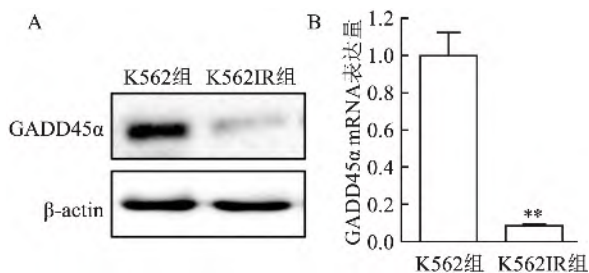


图1 qRT-PCR和Western blot法检测K562和K562IR细胞中GADD45α mRNA和蛋白的表达

A: 蛋白表达结果; B: mRNA表达结果; 与K562组比较: ** $P < 0.01$

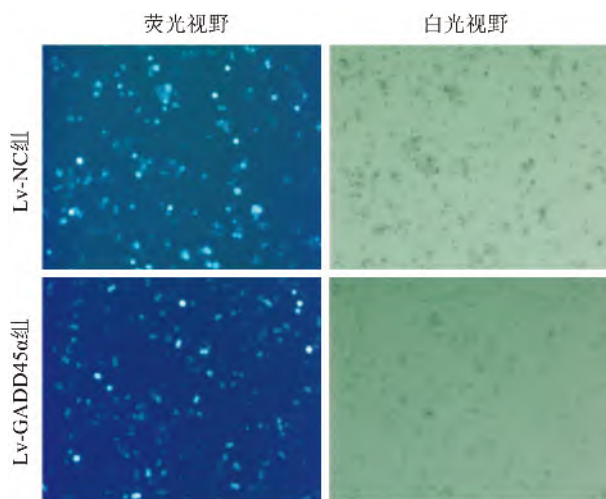


图2 荧光显微镜下观察Lv-NC组、Lv-GADD45α组细胞 ×200

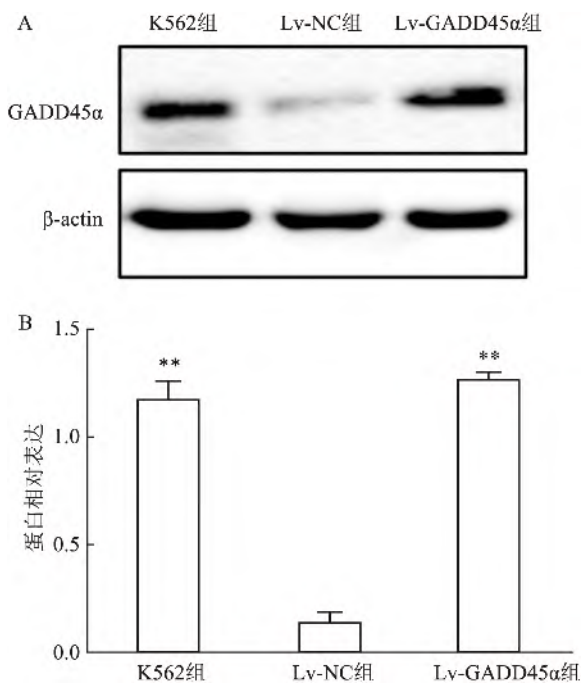


图3 Western blot检测K562组、Lv-NC组、Lv-GADD45α组中GADD45α蛋白的表达

A: 蛋白表达结果; B: 蛋白表达相对水平; 与Lv-NC组比较: ** $P < 0.01$

2.3 GADD45α基因上调后细胞增殖能力的变化

利用终浓度为0.0、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 的IM干预K562、Lv-NC、Lv-GADD45α组后细胞存活率下降。3组的 IC_{50} 分别为10.08 $\mu\text{mol/L}$ 、50.56 $\mu\text{mol/L}$ 、18.72 $\mu\text{mol/L}$ 。从结果来看,Lv-GADD45α组的存活率低于Lv-NC组,结果见图4。

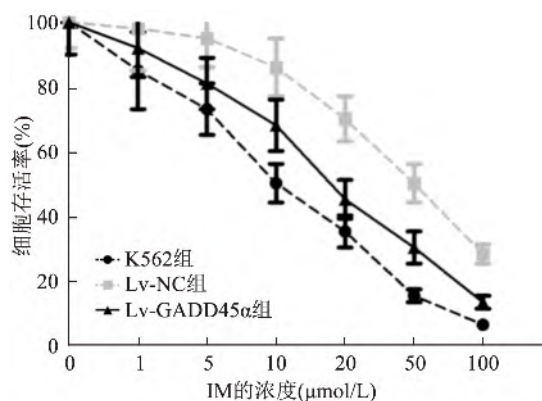


图4 CCK-8法检测不同浓度IM处理的各组细胞存活率

2.4 GADD45α基因上调后细胞体外凋亡的变化

以10 $\mu\text{mol/L}$ 的IM为测试剂量,分别干预K562、Lv-NC、Lv-GADD45α组细胞,检测在耐药剂量下细胞凋亡的试验结果。结果显示,K562组和Lv-GADD45α组凋亡率与Lv-NC组相比差异有统计学意义($P < 0.01$, $F = 1.44, 0.96$, $t = 11.42, 7.76$),结果见图5。

2.5 GADD45α基因上调后迁移能力的变化 使用等剂量10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的IM对各组细胞进行干预,通过Transwell迁移小室检测各组细胞的迁移能力,观察小室底膜上下室侧附着的细胞,取6个视野进行观察和拍照,同时进行细胞计数。结果显示K562组和Lv-GADD45α组细胞穿过的数目低于Lv-NC组细胞,K562组和Lv-GADD45α组相对于Lv-NC组细胞迁移能力下降($P < 0.01$, $F = 2.46, 2.57$, $t = 11.89, 9.01$),结果见图6。

3 讨论

IM目前被认为是慢性阶段CML患者的一线治疗药物,也是CML晚期快速缓解的首选药物,尽管通常是短期缓解,然而,约有1/3的患者在接受IM治疗时会产生对IM的耐药性^[7]。而在后来出现的第二代TKI尼洛替尼(nilotinib)、达沙替尼(dasatinib)等虽然在治疗过程中会比IM出现更低的初级

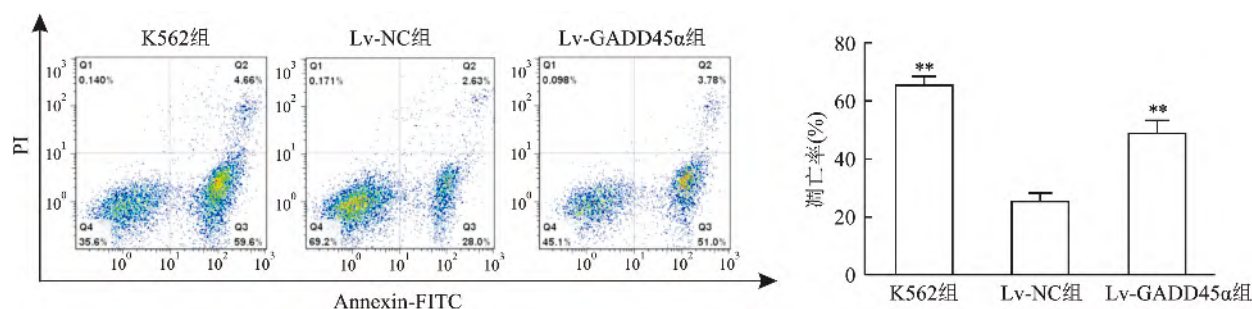
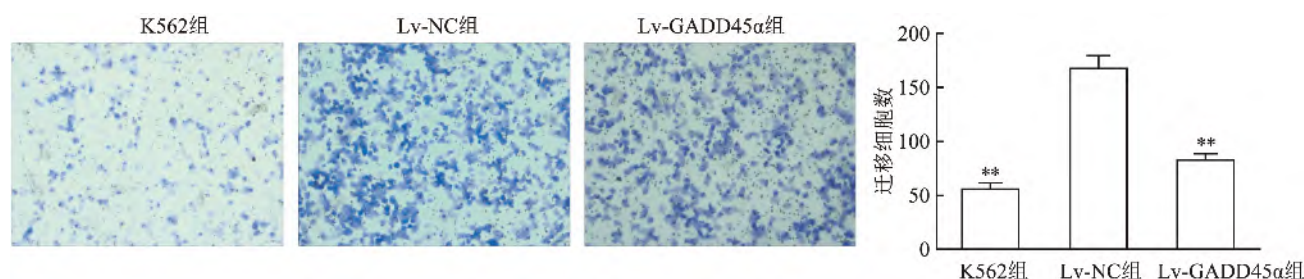


图5 流式细胞仪检测 K562 组、Lv-NC 组、Lv-GADD45α 组细胞凋亡率

与 Lv-NC 组比较: ** $P < 0.01$ 图6 Transwell 法检测 K562 组、Lv-NC 组、Lv-GADD45α 组的侵袭能力 结晶紫染色 $\times 100$ 与 Lv-NC 组比较: ** $P < 0.01$

耐药和突变发生,但尚未转化为长期的总体生存优势^[8-9]。越来越多的证据表明,并非所有的 IM 耐药都来自 BCR-ABL 激酶结构域突变,已有研究^[10]表明,血红素加氧酶-1 通过干扰哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路诱导自噬形成,导致 CML 发生 IM 耐药。因此,研究这些非突变机制在 CML 耐药中具有重要意义。

GADD45α 是一种广泛表达的核蛋白,与参与 DNA 修复、细胞周期调节、凋亡、衰老和自噬的细胞蛋白发生物理作用,并且它的缺失显示了基因组的不稳定性和增加了对致癌物的敏感性,促进肿瘤的发生^[11]。GADD45α 在维持造血干细胞基因组完整性方面的作用是至关重要的,而其作为血液恶性肿瘤的肿瘤抑制因子的作用模式,除了提供 DNA 修复和基因组稳定性外,诱导分化则是 GADD45α 在造血系统中的主要抗白血病作用^[12]。GADD45α 的上调是多种化疗药物抗肿瘤活性的重要步骤,例如多西紫杉醇、姜黄素等,而 GADD45α 的沉默可能会削弱这些药物的治疗效果^[13]。该课题组前期研究^[5]表明,miR-362-5p 是 GADD45α 反向调控的 miRNA,其在 K562IR 中的表达高于 K562 细胞中的表达,当 IM 抑制 BCR-ABL 活性后可降低 K562 细胞中 miR-362-5p 的表达水平。因此,该研究推测在慢性粒细

胞白血病中对 IM 的耐药可能与 GADD45α 的表达有关。

该研究考察了 K562 和 K562IR 细胞中 GADD45α 的 mRNA 和蛋白的表达的情况, GADD45α 在 IM 敏感的 K562 细胞中高表达,高于 K562IR 细胞,这与之前的研究^[5]结果一致,提示 GADD45α 可能参与了细胞发生耐药的过程。进一步通过慢病毒转染的方法上调了耐药细胞株中 GADD45α 基因,并通过 Western blot 检测细胞转染效率,结果显示相比对照组和 Lv-NC 组, Lv-GADD45α 组中 GADD45α 的表达上调。同时为了进一步研究上调 GADD45α 对 K562IR 的影响,该研究通过不同浓度的 IM 对各分组细胞进行干预,检测不同组细胞的存活率、凋亡率和侵袭能力,结果表明 Lv-GADD45α 细胞组的凋亡率增高,存活率和侵袭能力降低。结果显示, GADD45α 的低表达可能是慢性髓细胞白血病细胞 K562 产生耐药的一种机制。

已有研究^[14]表明,在 BCR-ABL 转化髓系祖细胞中,当 GADD45α 缺失时会高度激活 p38MAPK、PI3K/AKT 和 STAT5 信号通路,促进细胞的增殖和减少凋亡。因此,当 GADD45α 基因上调后,可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路降低了表达

BCR/ABL 的慢性髓系白血病细胞的耐药性,具体的机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Singh V K , Coumar M S. Chronic myeloid leukemia: existing therapeutic options and strategies to overcome drug resistance [J]. *Mini Rev Med Chem* ,2019 ,19(4) : 333 – 45.
- [2] Apperley J F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia [J]. *Lancet Oncol* ,2007 ,8(11) : 1018 – 29.
- [3] Stagno F , Stella S , Spitaleri A , et al. Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia: frontline treatment and long-term outcomes [J]. *Expert Rev Anticancer Ther* ,2016 ,16(3) : 273 – 8.
- [4] Shi Q , Sutariya V , Varghese G S , et al. GADD45 α -targeted suicide gene therapy driven by synthetic CArG promoter E9NS sensitizes NSCLC cells to cisplatin , resveratrol , and radiation regardless of p53 status [J]. *Onco Targets Ther* ,2019 ,12: 3161 – 70.
- [5] Mukherjee K , Sha X , Magimaidas A , et al. Gadd45a deficiency accelerates BCR-ABL driven chronic myelogenous leukemia [J]. *Oncotarget* ,2017 ,8(7) : 10809 – 21.
- [6] Yang P , Ni F , Deng R Q , et al. MiR-362-5p promotes the malignancy of chronic myelocytic leukaemia *via* down-regulation of GADD45 α [J]. *Mol Cancer* ,2015 ,14: 190.
- [7] Aloisi A , Di G S , Stagno F , et al. BCR-ABL nuclear entrapment kills human CML cells: *ex vivo* study on 35 patients with the combination of imatinib mesylate and leptomycin B [J]. *Blood* ,2006 ,107(4) : 1591 – 8.
- [8] Hochhaus A , Saglio G , Hughes T P , et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib *vs* imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENEST-and trial [J]. *Leukemia* ,2016 ,30(5) : 1044 – 54.
- [9] Cortes J E , Saglio G , Kantarjian H M , et al. Final 5-year study results of DASISION: the dasatinib versus imatinib study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients trial [J]. *J Clin Oncol* ,2016 ,34(20) : 2333 – 40.
- [10] Cao L , Wang J , Ma D , et al. Heme oxygenase-1 contributes to imatinib resistance by promoting autophagy in chronic myeloid leukemia through disrupting the mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother* ,2016 ,78: 30 – 8.
- [11] Wingert S , Rieger M A. Terminal differentiation induction as DNA damage response in hematopoietic stem cells by GADD45A [J]. *Exp Hematol* ,2016 ,44(7) : 561 – 6.
- [12] Wingert S , Thalheimer F B , Haetscher N , et al. DNA-damage response gene GADD45A induces differentiation in hematopoietic stem cells without inhibiting cell cycle or survival [J]. *Stem Cells* ,2016 ,34(3) : 699 – 710.
- [13] Tamura R E , de Vasconcellos J F , Sarkar D , et al. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis [J]. *Curr Mol Med* ,2012 ,12(5) : 634 – 51.
- [14] Sha X , Hoffman B , Liebermann D A. Loss of Gadd45b accelerates BCR-ABL-driven CML [J]. *Oncotarget* ,2018 ,9(70) : 33360 – 7.

Upregulation of GADD45 α by Lentivirus vector enhances the drugsensitivity of imatinib-resistant K562IR cells

Liu Xueni , Wang Chao , Cheng Yanhong , et al

(*Dept of Blood Transfusion , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the effects of up-regulation of GADD45 α by Lentivirus vector on the proliferation , migration and apoptosis of imatinib-resistant K562IR cells. **Methods** K562 cells and imatinib-resistant K562IR cells were cultured. The expression levels of GADD45 α mRNA and protein in K562 and K562IR cells were detected by qRT-PCR and Western blot. The Lentivirus vector that over-expressed GADD45 α and control were transfected in K562IR cells , respectively Lv-GADD45 α and Lv-NC. The expression level of GADD45 α in each group was detected by Western blot , and the changes in cell proliferation , migration and apoptosis after transfection were further detected by CCK-8 , Tanswell and Annexin V-FITC/PI double staining. **Results** The expression levels of GADD45 α protein and mRNA in K562IR cells were lower than those in K562 cells. After GADD45 α was transfected , the expression levels of GADD45 α in Lv-GADD45 α group were higher than those in Lv-NC group. After imatinib treatment , the IC₅₀ value of Lv-GADD45 α group was lower than that of Lv-NC group , the apoptosis rate of cells in Lv-GADD45 α group was higher than that of the Lv-NC group , and the cell migration ability also decreased , with statistically significant difference ($P < 0.05$) . **Conclusion** By up-regulating GADD45 α in imatinib-resistant K562IR cells , the sensitivity of K562IR to imatinib in chronic myeloid leukemia cells is enhanced , leading to proliferation inhibition and the apoptosis of chronic myeloid leukemia cells.

Key words chronic myeloid leukemia; K562; GADD45 α ; imatinib; drug resistance