

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.003

· 基础研究 ·

敲除 *CIAPIN1* 基因提高白血病 K562 细胞对伊马替尼的敏感性

李倩^{1a,2}, 高伟^{1b} (1. 潍坊医学院 a. 医学检验学系; b. 临床医学院, 山东潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院 山东省临床检验重点专科, 山东 潍坊 261031)

[摘要] **目的:** 探讨靶向干扰细胞因子诱导凋亡抑制因子 1 (cytokine induced apoptosis inhibitor 1, *CIAPIN1*) 基因表达后慢性粒细胞性白血病 K562 细胞对伊马替尼的敏感性。 **方法:** 构建靶向 *CIAPIN1* 基因的 shRNA 干扰载体; 使用实时定量 PCR、Western blotting 以及免疫荧光评价 *CIAPIN1*-shRNA 组 (*CIAPIN1*-shRNA 转染) 和 scramble-shRNA 组 (scramble-shRNA 转染 K562 细胞) 干扰效率; 伊马替尼 (imatinib) 处理两组 K562 细胞后, MTT 法检测其增殖能力, 集落形成实验检测细胞克隆形成能力, 流式细胞术和 Western blotting 检测细胞周期、凋亡及凋亡相关蛋白的变化。 **结果:** shRNA 干扰可有效抑制 *CIAPIN1* 表达, *CIAPIN1*-shRNA 组的 *CIAPIN1* mRNA 表达量为 scramble-shRNA 组的 (29.74±4.03)%、*CIAPIN1* 蛋白表达量前者为后者的 (21.57±2.18)%。 *CIAPIN1* 表达下调能显著抑制伊马替尼对 K562 细胞的增殖和克隆形成, *CIAPIN1*-shRNA+imatinib 组的细胞克隆形成数为 (15.60±1.03) 个/视野, 克隆半径为 (2.63±0.55) μm , 均小于 scramble-shRNA+imatinib 组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。 *CIAPIN1*-shRNA+imatinib 组的细胞 G1 期细胞比例比 scramble-shRNA+imatinib 组明显增多, S 期细胞比例较 scramble-shRNA+imatinib 组明显减少 (均 $P<0.01$)。 *CIAPIN1*-shRNA+imatinib 组 K562 细胞凋亡率明显增加 ($P<0.01$)。敲除 *CIAPIN1* 能抑制细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、Bcl-x1、Bcl-2、Mcl-1 表达, 诱导细胞内细胞凋亡相关蛋白 p21、Bid、Bim 表达, 且与伊马替尼具有协同作用。 **结论:** *CIAPIN1* 表达下调可明显提高 K562 细胞对伊马替尼的敏感性, 该作用主要通过阻滞 K562 细胞周期及诱导凋亡相关蛋白表达实现。

[关键词] 细胞因子诱导凋亡抑制因子 1 基因; 慢性粒细胞白血病; K562 细胞; 伊马替尼; 药物敏感性

[中图分类号] R733.7; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0229-07

Knock-down of cytokine induced apoptosis inhibitor 1 gene sensitized leukemia K562 cells to imatinib

LI Qian^{1a,2}, GAO Wei^{1b} (1a. Department of Laboratory Medicine, 1b. Department of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China; 2. Key Discipline of Clinical Laboratory Medicine of Shandong Province, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261031, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the biological effects and the related mechanisms of cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (*CIAPIN1*) on the sensitivity of K562 chronic myeloid leukemia cells to imatinib. **Methods:** Specific short hairpin RNA (shRNA) interference vectors targeting *CIAPIN1* (*CIAPIN1*-shRNA) were constructed. Interference efficiency of interference group (K562 cells transfected with *CIAPIN1*-shRNA) and control group (K562 cells transfected with scramble-shRNA) was evaluated using Real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence staining. The interference group and control group were treated by 2 $\mu\text{mol/L}$ imatinib. Cell viability was detected using MTT assay. Colony formation ability was detected using cell colony forming experiment. Cell cycle and apoptosis was detected using Flow cytometry and Western blotting. **Results:** *CIAPIN1* expression was decreased effectively by specific shRNA targeting *CIAPIN1*. The *CIAPIN1* mRNA content in *CIAPIN1*-shRNA group accounted (29.74±4.03)% of scramble-shRNA group, while the *CIAPIN1* protein content in *CIAPIN1*-shRNA group accounted (21.57±2.18)% of scramble-shRNA group. *CIAPIN1* knock-down significantly enhanced the inhibitory activity of imatinib on proliferation and colony forming ability of K562 cells. The col-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81541093); 山东省自然科学基金项目资助 (No. ZR2015HL075); 山东省高等学校科研计划项目资助 (No. J17KA252); 山东省医药卫生科技发展计划项目资助 (No. 2015WS0056); 潍坊市科学技术发展计划项目资助 (No. 2014WS048)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81541093), the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2015HL075), the Shandong Provincial Foundation for Scientific Research Planning Project of College and University (No. J17KA252), the Shandong Provincial Foundation for Medical and Healthy Science Technology Development Program (No. 2015WS0056), and the Foundation of Weifang City for Scientific and Technological Development Program (No. 2014WS048)

[作者简介] 李倩 (1983-), 女, 博士, 讲师, 主要从事临床诊断的研究, E-mail: liqian@wfmuc.edu.cn

[通信作者] 高伟 (GAO Wei, corresponding author), 博士, 副教授, 主要从事白血病分子靶向治疗的研究, E-mail: gaowei@wfmuc.edu.cn

ony number and radius of the CIAPIN1-shRNA+imatinib group was (15.60 ± 1.03) and $(2.63 \pm 0.55) \mu\text{m}$, which were all less than those of the scramble-shRNA+imatinib group. The knock down also increased the activity of imatinib to block the cell cycle at G1 phase and to promot apoptosis of cells. The cell ratio at G1 phase of the CIAPIN1-shRNA+imatinib group was obviously increased while the ratio at S phase was obviously decreased compared with those of scramble-shRNA+imatinib group. Hoechst33258 staining and flow cytometry showed that the proportion of apoptotic K562 cells in the CIAPIN1-shRNA+imatinib group increased. The results of Western blotting showed that *CIAPIN1* knock-down not only up-regulated the expressions of apoptosis related proteins (p21, Bid and Bim), but also repressed expressions of cell cycle related proteins (Cyclin D1, Bcl-xl, Bcl-2 and Mcl-1), which had synergistic effects with imatinib. **Conclusion:** *CIAPIN1* knock-down significantly sensitized K562 cells to imatinib treatment, and the mechanism might be related with cell cycle arrest and expression of apoptosis-associated proteins.

[Key words] cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (*CIAPIN1*); chronic myeloid leukemia; K562 cell; imatinib; drug sensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 229-235. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.003]

细胞因子诱导凋亡抑制因子1(cytokine induced apoptosis inhibitor 1, CIAPIN1)是RAS信号转导通路中的一个新调节分子,能抑制因IL-3等细胞因子诱导的细胞凋亡^[1-2],其广泛存在于正常组织细胞中^[3],在恶性肿瘤,如肝癌、胃癌、肺癌等细胞中也有表达^[4-5]。*CIAPIN1*表达下调能抑制血管内皮细胞增殖,降低肿瘤组织中微血管密度,抑制肿瘤组织的生长和扩散^[6]。在弥漫性大B细胞淋巴瘤及白血病细胞中,*CIAPIN1*表达升高可明显促进肿瘤细胞增殖,降低患者预后指数^[7]。下调*CIAPIN1*表达可逆转人乳腺癌细胞、胃癌细胞、肠癌细胞、早幼粒白血病细胞等的多重耐药性,并可调节相关耐药基因的表达^[8-11]。慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是发生于造血干细胞水平的一种恶性克隆性疾病,病因是由于形成*BCR-ABL*融合基因^[12-13]。伊马替尼(imatinib)可以通过竞争性结合BCR-ABL上的ATP结合位点,抑制BCR-ABL活性,特异性切断信号转导,抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡^[14]。一般CML患者慢性期对伊马替尼表现出显著的血液学和细胞遗传学改善,但随着病情发展,逐渐表现出耐药。伊马替尼耐药性的产生主要是由于药物与BCR-ABL相互作用位点的突变造成的,同时多种ABC转运蛋白的表达上调也是伊马替尼产生耐药性的重要因素^[15-16]。探讨*CIAPIN1*与伊马替尼耐药性的相互关系,为治疗伊马替尼耐药性患者指出新的方向。本研究选用*BCR-ABL*阳性人类髓性白血病K562细胞为研究对象,应用RNA干扰技术沉默K562细胞的*CIAPIN1*基因表达,探讨在K562细胞中干扰*CIAPIN1*基因对伊马替尼敏感性的影响,并初步探索其相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人类髓性白血病K562细胞系购自中国医学科学院血液学研究所。K562细胞培养使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,置于37℃、5% CO₂饱和

湿度条件下培养。RPMI 1640培养基、遗传霉素G418及胎牛血清购自Gibco公司,TRIzol™试剂、RNA逆转录试剂盒及Lipofectamine™2000核酸转染试剂盒购自Invitrogen公司,SYBR Green实时定量试剂盒购自罗氏公司,抗CIAPIN1抗体购自Abcam公司,抗Cyclin D1、p21、Bcl-xl、Bcl-2、Mcl-1、Bid、Bim及GAPDH抗体购自Cell Signaling Technology公司。*CIAPIN1*和*GAPDH*PCR引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。*CIAPIN1*上游引物为5'-AGT-GGTCTGGGATAAGTC-3',下游引物为5'-CCT-GGGACTAAACCTGAC-3';*GAPDH*上游引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物为5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。伊马替尼购自中国医学科学院血液学研究所。

1.2 定制CIAPIN1基因干扰载体及其对照载体

根据NCBI基因库中*CIAPIN1*基因的核苷酸序列(GenBank: NM 020313.2),利用Ambion公司提供的在线软件,按照siRNA序列设计原则,选择合适的siRNA靶位点,设计靶向*CIAPIN1*基因的干扰序列shRNA-CIAPIN1为5'-GTAGCAAAGTGAAGACAGCA-3',阴性对照非特异性序列scramble-CIAPIN1为5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT-3';将序列提交给上海吉玛公司,选取PGPU6/GFP/Neo质粒,定制*CIAPIN1*基因特异性干扰载体pGPU6-shRNA-CIAPIN1及其对照载体pGPU6-scramble-CIAPIN1。

1.3 细胞转染和伊马替尼药物处理

实验分为*CIAPIN1*基因干扰组(CIAPIN1-shRNA组)、阴性对照组(scramble-shRNA组)、*CIAPIN1*基因干扰加伊马替尼处理组(CIAPIN1-shRNA+imatinib组)和阴性对照加伊马替尼处理组(scramble-shRNA+imatinib组)4组。

取对数生长期K562细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,接种于6孔板。按照Lipofectamine™2000试剂盒说明书操作,将pGPU6-shRNA-CIAPIN1干扰载体和pGPU6-scramble-CIAPIN1对照载体(1 μg/孔)分别转染至CIAPIN1-shRNA组和scramble-shRNA-

NA 组 K562 细胞。转染 24 h 后除去原培养基,加入含 G418(5 mg/ml)的新鲜培养基进行培养筛选。一般筛选 2 周后即可获得 G418 抗性的阳性 K562 细胞克隆。PGPU6/GFP/Neo 质粒中含有绿色荧光蛋白(*GFP*)基因,在流式细胞仪上分选出 GFP 阳性细胞后,在倒置荧光显微镜下观察载体中绿色荧光蛋白基因表达情况,并初步目测转染效率。分选出的细胞可以扩大培养并冻存,培养方法同未经转染的 K562 细胞。

取 CIAPIN1-shRNA 组和 scramble-shRNA 组对数生长期的细胞悬液,分别接种于 6 孔板(5×10^4 个/孔),置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后,加入 10 mmol/L 的伊马替尼母液至终浓度 2 μmol/L,继续培养 24 h 后的细胞分别作为 CIAPIN1-shRNA+imatinib 组和 scramble-shRNA+imatinib 组。

1.4 实时定量 PCR 法检测转染前后 K562 细胞 *CIAPIN1* mRNA 的表达

离心收集对数生长期 CIAPIN1-shRNA 组和 scramble-shRNA 组细胞,分别使用 TRIzol™ 试剂提取细胞总 RNA;将 2 μg 总 RNA 逆转录形成 cDNA,按照 SYBR Green 实时定量试剂盒说明书操作,以 *GAPDH* 为内参照,进行 qPCR 检测 *CIAPIN1* mRNA 表达。反应条件为:95 °C 10 s,95 °C 5 s,60 °C 34 s,共 40 个循环;目的基因相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值法。

1.5 Western blotting 法检测 CIAPIN1 和 K562 细胞周期及凋亡相关蛋白的表达

离心收集对数生长期 CIAPIN1-shRNA 组、scramble-shRNA 组、CIAPIN1-shRNA+imatinib 组和 scramble-shRNA+imatinib 组细胞,分别使用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度,并将蛋白裂解液进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量为 30 μg/泳道。使用湿转法转移蛋白至硝酸纤维素膜,用含 10% 脱脂奶粉的 TBS 封闭液室温封闭 1 h,加入一抗(CIAPIN1、*GAPDH*、Cyclin D1、p21、Bcl-x1、Bcl-2、Mcl-1、Bid 或 Bim 兔抗体,1:1 000)孵育过夜,再加入 HRP 标记的抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,使用 ECL 化学发光法显色,扫描结果。

1.6 免疫荧光法检测 *CIAPIN1* 表达

收集对数生长期 CIAPIN1-shRNA 组和 scramble-shRNA 组细胞,计数后转移至 EP 管中,PBS 清洗后用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用预冷的 PBS 清洗。0.5% Triton 透膜处理 15 min,PBS 清洗。封闭液封闭 30 min,PBS 清洗。用稀释好比例的 CIAPIN1 兔抗体孵育细胞,4 °C 过夜。PBS 清洗后用稀释好比例的 PE 标记的抗兔二抗避光孵育 40 min,PBS 清洗。用 1 μg/ml 的 DAPI 避光复染细胞,室温孵育 10 min,PBS

清洗。加入 50~100 μl PBS,调整细胞密度后将细胞放入共聚焦小皿中,用共聚焦显微镜检测细胞内 CIAPIN1 的表达。

1.7 MTT 实验检测细胞增殖能力

离心收集对数生长期的 CIAPIN1-shRNA 组、scramble-shRNA 组、CIAPIN1-shRNA+imatinib 组和 scramble-shRNA+imatinib 组细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬,计数。接种于 96 孔板(5×10^3 个/孔),每组设 6 个复孔。共接种 4 个 96 孔板,分别于培养后 0、1、2 和 3 d 每孔加 20 μl MTT(5 mg/ml),继续孵育 4 h。加甲瓚裂解液(100 μl/孔),继续孵育 8 h 至甲瓚全部溶解,置于微量振荡器上轻轻震荡摇匀 10 min,用酶标仪测定 570 nm 处光密度(*D*)值,以时间为横坐标、*D* 值为纵坐标绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次。

1.8 细胞集落形成实验检测细胞克隆形成能力

从 -20 °C 冰箱中将甲基纤维素取出,置于室温融化,根据说明书加入 IMDM 培养基(含 10% 胎牛血清),剧烈混匀后静置待用。离心收集对数生长期的 CIAPIN1-shRNA 组、scramble-shRNA 组、CIAPIN1-shRNA+imatinib 组和 scramble-shRNA+imatinib 组细胞,用 PBS 清洗,计数,重悬细胞于 IMDM 培养基中,将细胞密度调整至 1×10^5 个/ml,倍比稀释 2~3 个不同的细胞密度以保证每孔能产生 150~200 个细胞集落数。将 20 μl 细胞悬液加入到制备好的甲基纤维素溶液中,混匀后铺于 24 孔板中(1 ml/孔)。置于 37 °C 培养箱中培养,每 2 d 在甲基纤维素凝胶表面加入少量 IMDM,防止凝胶中水分的蒸发。培养 7~10 d 后观察并拍照观察细胞克隆形成能力。

1.9 流式细胞术检测细胞周期以及凋亡

离心收集对数生长期的 CIAPIN1-shRNA 组、scramble-shRNA 组、CIAPIN1-shRNA+imatinib 组和 scramble-shRNA+imatinib 组细胞,经 PBS 清洗后重悬,将细胞密度调整至 1×10^6 个/ml。取 1 ml 细胞悬液,离心沉淀细胞,去除上清后加入相应染液。检测细胞周期的细胞加入预冷 70% 乙醇 1 ml,4 °C 过夜,离心收集细胞,用 PBS 清洗去除乙醇,加入 500 μl 染色缓冲液、10 μl RNaseA 和 25 μl PI,37 °C 避光孵育 30 min;检测细胞凋亡的细胞依次加入 Annexin V-APC 以及 PI 各 5 μl 并混匀,冰上孵育 15 min,用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。实验重复 3 次。

1.10 Hoechst33258 染色定性检测 K562 细胞凋亡

离心收集 CIAPIN1-shRNA 组、scramble-shRNA 组、CIAPIN1-shRNA+imatinib 组和 scramble-shRNA+imatinib 组细胞于 1.5 ml 离心管内,加入 0.5 ml 固定液,于 4 °C 固定 10 min,离心除去固定液,轻缓悬浮细

胞,滴加并尽可能使细胞分布均匀于载玻片上,均匀滴上0.5 ml Hoechst33258染色液,染色5 min,使用荧光显微镜检测,镜下观察呈蓝色的正常细胞核和浓染、发白的凋亡细胞核。

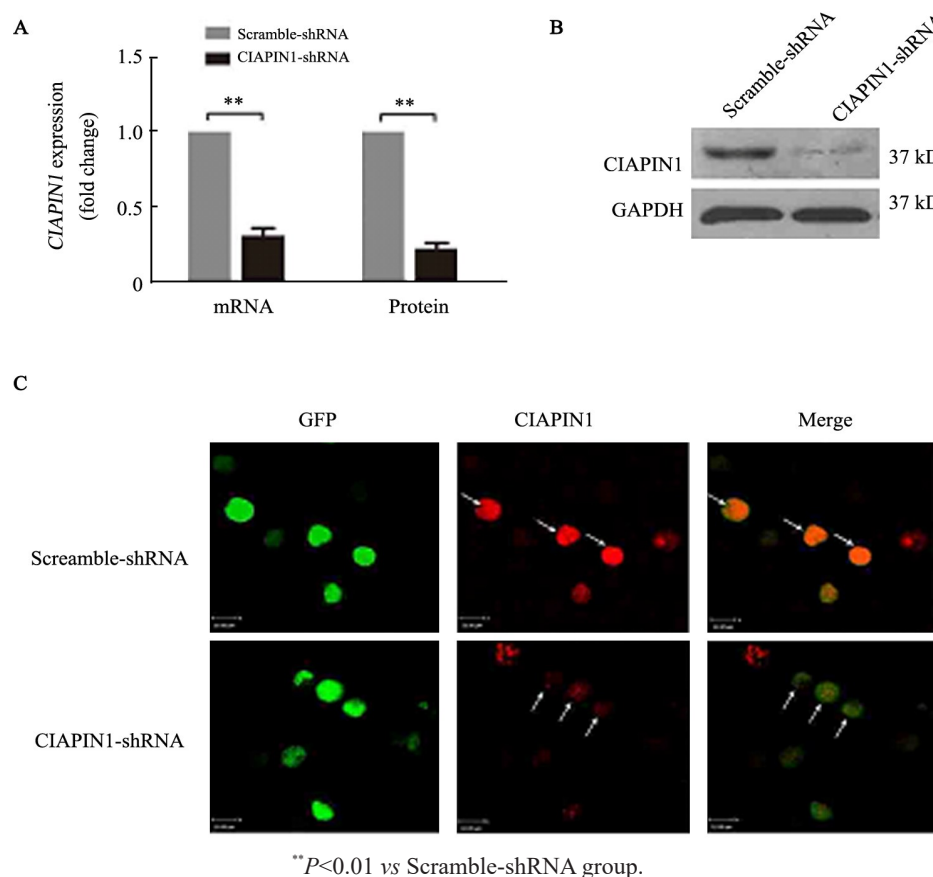
1.11 统计学处理

采用GraphPad Prism 5统计学软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA干扰可有效下调K562细胞*CIAPIN1*的表达
qPCR检测结果(图1A)显示,CIAPIN1-shRNA组的*CIAPIN1* mRNA含量为scramble-shRNA组的

(29.74 ± 4.03)%; Western blotting检测结果(图1B)显示,CIAPIN1-shRNA组的CIAPIN1蛋白表达量为scramble-shRNA组的(21.57 ± 2.18)%。CIAPIN1-shRNA组*CIAPIN1*的mRNA和蛋白表达量显著低于scramble-shRNA组(均 $P < 0.01$)。免疫荧光技术检测后(图1C),由于PGPU6/GFP/Neo质粒中含有GFP基因,观察时CIAPIN1-shRNA组和scramble-shRNA组细胞均呈绿色,CIAPIN1蛋白经过免疫荧光染色被染成红色。CIAPIN1-shRNA组的CIAPIN1红色荧光信号和重叠后的荧光信号明显低于scramble-shRNA组,说明shRNA干扰能有效下调K562细胞中*CIAPIN1*的表达水平。



A: mRNA and protein expressions of *CIAPIN1*; B: Expression of CIAPIN1 protein detected by Western blotting assay; C: Images of immunofluorescence assay under laser scanning confocal microscopy(×40)

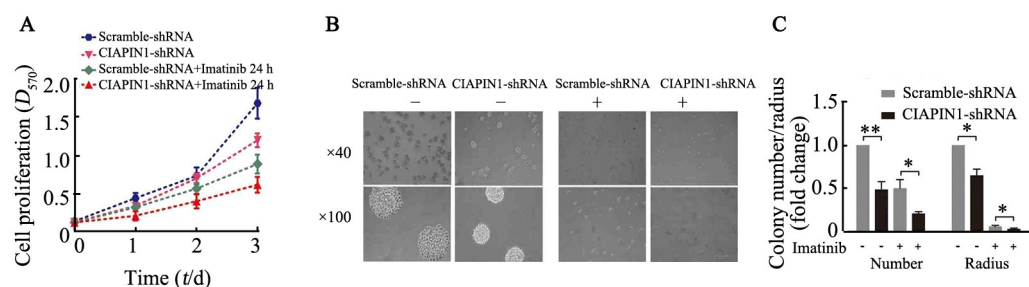
图1 shRNA干扰能有效下调K562细胞中CIAPIN1的表达水平

Fig. 1 The expression level of CIAPIN1 in K562 cells was effectively down-regulated by shRNA interference

2.2 干扰*CIAPIN1*表达协同伊马替尼抑制K562细胞的增殖和克隆形成能力

MTT检测结果(图2A)表明,CIAPIN1表达下调能够有效抑制经伊马替尼处理后K562细胞的增殖能力。细胞克隆形成实验检测结果表明,scramble-shRNA+imatinib组的细胞克隆形成数为(37.75 ± 7.40)个/视野,克隆半径为(5.49 ± 0.88) μm 。CIAPIN1-shR-

NA+imatinib组的细胞克隆形成数为(15.60 ± 1.03)个/视野,克隆半径为(2.63 ± 0.55) μm ,CIAPIN1-shRNA+imatinib组的细胞克隆形成数和克隆半径最小,且均小于scramble-shRNA+imatinib组的细胞克隆形成数,说明经伊马替尼处理后,CIAPIN1表达下调能够有效抑制K562细胞的克隆形成能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图2B、C)。



A: Cell proliferation ability detected by MTT; B: Pictures of colony forming assay for K562 cells of various groups;

C: Statistic analysis of colony number and colony radius for K562 cells of various groups;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Scramble-shRNA or Scramble-shRNA+imatinib group

图2 *CIAPIN1* 表达下调能够有效抑制 K562 细胞的克隆形成能力

Fig. 2 The colony formation of K562 cells was effectively inhibited by down-regulating *CIAPIN1*

2.3 干扰 *CIAPIN1* 表达协同伊马替尼阻滞 K562 细胞周期进展

流式细胞术检测结果(图3)表明,经伊马替尼处理 24 h 后,CIAPIN1-shRNA+imatinib 组的细胞 G1 期细胞比例比 scramble-shRNA+imatinib 组明显增多 $[(40.53 \pm 1.60)\% \text{ vs } (26.61 \pm 1.38)\%, P < 0.01]$; CIAPIN1-shRNA+imatinib 组的细胞 S 期细胞比例比 scramble-shRNA+imatinib 组明显减少 $[(30.64 \pm 2.20)\% \text{ vs } (48.56 \pm 1.18)\%, P < 0.01]$ 。上述结果说明,经伊马替尼处理后,CIAPIN1 表达下调能够有效阻滞 K562 细胞周期的进展,且对伊马替尼敏感性的显著改变,而伊马替尼处理与否对各组细胞 G2 期细胞比例无明显影响。

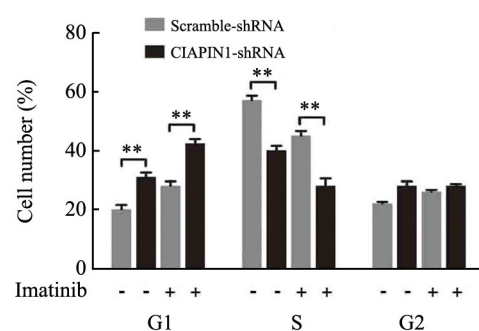
2.4 干扰 *CIAPIN1* 表达协同伊马替尼促进 K562 细胞凋亡

Hoechst33258 的染色结果(图4A)显示,经伊马替尼处理后,CIAPIN1-shRNA+imatinib 组的 K562 细胞致密浓染以及颜色发白的细胞比例明显增多,提示凋亡细胞比例增加。流式细胞术检测结果(图4B、C)表明,scramble-shRNA+imatinib 组 APC⁺PI⁻、APC⁺PI⁺、APC⁻PI⁺细胞比例均较 scramble-shRNA 组明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明伊马替尼对于 *CIAPIN1* 干扰前后的细胞凋亡均有促进作用。CIAPIN1-shRNA+imatinib 组的 K562 细胞早期凋亡以及中晚期凋亡均高于 scramble-shRNA+imatinib 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明干扰 *CIAPIN1* 表达可以促进伊马替尼处理 K562 细胞的凋亡。

2.5 干扰 *CIAPIN1* 表达协同伊马替尼能显著抑制 K562 细胞周期相关蛋白表达和促进细胞凋亡相关蛋白表达

Western blotting 检测结果提示,经伊马替尼处理后,CIAPIN1 表达下调能够显著抑制 K562 细胞内细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、Bcl-x1、Bcl-2 及 Mcl-1 的

表达水平(图5A),能够显著促进细胞内细胞凋亡相关蛋白 p21、Bid 以及 Bim 的表达水平(图5B)。



** $P < 0.01$ vs Scramble-shRNA group treated with or without imatinib

图3 伊马替尼处理后 *CIAPIN1* 表达下调能有效阻滞 K562 细胞周期进展

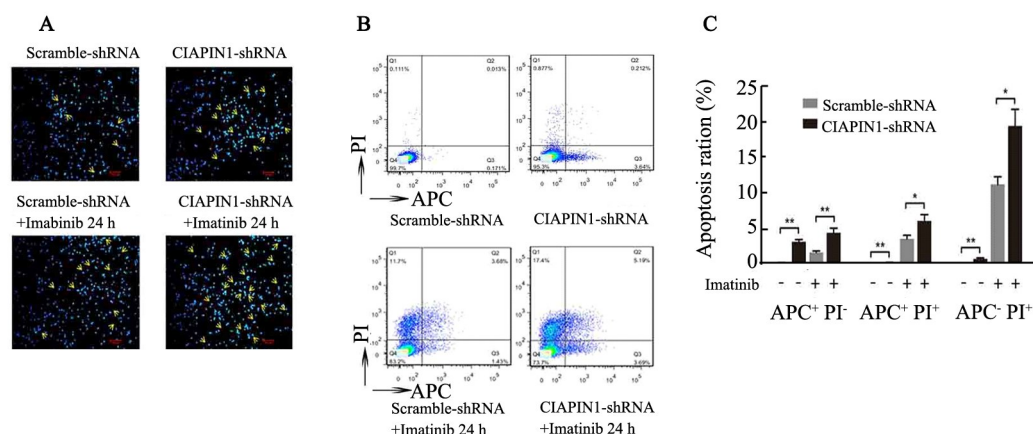
Fig. 3 *CIAPIN1* knock-down could effectively block the cell cycle of K562 cells at G1 phase after imatinib treatment

3 讨论

造血干细胞的致癌性转变导致了 CML 的发生,通过 t(9; 22) (34; q11) 染色体易位形成 *BCR-ABL* 融合基因,表达融合蛋白。该蛋白能催化细胞多种蛋白质酪氨酸磷酸化,激活细胞内一系列信号转导通路以及 RAS、PI3K、AKT、JNK 及 SRC 家族激酶及其各自的下游信号通路。伊马替尼为苯胺嘧啶的衍生物,选择性作用于酪氨酸激酶,与 ATP 竞争性结合 ABL 激酶的 ATP 结合位点,可有效抑制 ABL, PDGFR(血小板源性生长因子受体), *c-Kit* 和 *Arg*(*abl* 相关基因)酪氨酸激酶的磷酸化过程^[17],可对 *BCR-ABL* 阳性细胞的增殖形成特异性抑制并诱导细胞凋亡。尽管大多数 CML 初期患者对伊马替尼有明显的血液和细胞遗传学反应,但相当一部分患者,尤其是加速期和急变期患者能够对伊马替尼产生原发或获得性耐

药,从而影响该药的治疗效果。其耐药机制的阐明已成为亟待攻克的课题和科研热点。CML尤其是急变期患者在应用伊马替尼时遇到的一大困难就是原

发或继发性耐药,临床疗效欠佳,持续几个月就会复发。提高耐药患者对伊马替尼的敏感性,就能够解决伊马替尼治疗中的困难,提高患者的疗效。

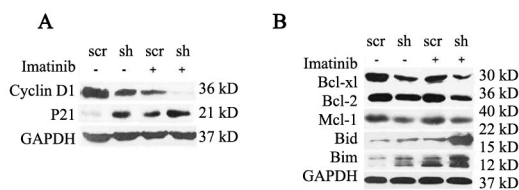


A: Hoechst33258 staining ($\times 200$); B and C: Apoptosis was detected by Annexin V-APC/PI staining

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Scramble-shRNA group or Scramble-shRNA+imatinib group

图4 干扰 *CIAPIN1* 表达可以促进伊马替尼处理 K562 细胞的凋亡

Fig. 4 The apoptosis of K562 cells after imatinib treatment could be promoted by interfering *CIAPIN1* expression



Imatinib-scr: Scramble-shRNA group

Imatinib+scr: Scramble-shRNA+imatinib group

Imatinib-sh: *CIAPIN1*-shRNA group

Imatinib+sh: *CIAPIN1*-shRNA+imatinib group

图5 *CIAPIN1* 表达下调能抑制细胞周期相关蛋白的表达及促进细胞凋亡相关蛋白的表达

Fig. 5 *CIAPIN1* knockdown repressed the expressions of cell cycle-related proteins, and promoted the expressions of apoptosis-related proteins

CIAPIN1 基因定位于16号染色体长臂(16q1.3-2.1),有8个外显子和7个内含子,mRNA长1.7 kb。RAS信号途径是与细胞增殖相关的信号转导通路,Shibayma等^[1]最早发现 *CIAPIN1* 可能是RAS信号转导通路中独立于凋亡调节分子家族Bcl-2、caspase等之外的一个新的调节分子。Hao等^[3]研究发现,*CIAPIN1* 基因广泛分布于胎儿和成人的各种正常组织中。*CIAPIN1* 主要定位于细胞质和细胞核中,并明显分布于核仁中,对细胞的增殖和分化具有重要的调控作用^[18]。蔺亚妮等^[19]证实shRNA干扰 *CIAPIN1* 基因在K562细胞表达后能够抑制细胞体内和体外的增殖。

伊马替尼通过抑制 *BCR-ABL* 阳性细胞增殖,促进细胞凋亡来发挥作用,而 *CIAPIN1* 作为新近发现的凋亡相关因子,是否能够介导CML细胞对伊马替尼敏感性的改变,其功能的发挥是通过怎样的机制,值得进一步的研究和探索。本研究观测到干扰 *CIAPIN1* 表达可明显提高K562细胞对伊马替尼药物敏感性,为CML的基因治疗提供新的理论靶点和依据。G1/S调控点可以决定细胞增殖还是进入静止期,或是发生细胞凋亡。因此干扰 *CIAPIN1* 表达引起细胞G1/S期阻滞可能改变调控路径和信号转导途径,使细胞向凋亡方向发展,进而抑制K562细胞的增殖。

MDR-1 和 *MRP-1* 是伊马替尼耐药相关基因。研究前期检测了 *MDR-1* 和 *MRP-1* 在 *CIAPIN1*-shRNA组和scramble-shRNA组中的表达情况,发现两者的表达增加没有显著差异。因此,*CIAPIN1* 可能并非通过影响 *MDR-1* 和 *MRP-1* 耐药相关蛋白的表达,而是通过其他方式影响其他耐药蛋白的表达提高细胞对伊马替尼药物的敏感性。研究^[20]发现,*CIAPIN1* 表达下调对凋亡和周期有显著影响,提高伊马替尼敏感性可能是通过 *CIAPIN1* 调控细胞周期和凋亡相关蛋白表达实现的。本研究检测伊马替尼处理后细胞周期和凋亡相关蛋白的表达发现,伊马替尼处理后,干扰 *CIAPIN1* 的K562细胞内细胞周期相关蛋白Cyclin D1、Bcl-x1、Bcl-2和Mcl-1表达下降,细胞凋亡相关蛋白p21、Bid和Bim表达升高,提示干扰 *CIAPIN1* 表达可能是通过调控细胞周期和细胞凋亡相关蛋白的表

达提高 K562 细胞对伊马替尼的敏感性。

综上所述, K562 细胞对伊马替尼的敏感性可在 *CIAPIN1* 表达下调后得到明显提高, 并且可能涉及细胞周期和凋亡相关蛋白表达的变化, 但其具体分子机制仍需进一步研究探讨。

致谢: 本论文得到潍坊医学院教师公派教师国内访学项目经费资助, 特此表示衷心感谢。

【参 考 文 献】

- [1] WANG J, XU H, WANG Q, et al. *CIAPIN1* targets Na^+/H^+ exchanger 1 to mediate MDA-MB-231 cells' metastasis through regulation of MMPs via ERK1/2 signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 333(1): 60-72. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.02.012.
- [2] HUANG Z, SU G F, HU W J, et al. The study on expression of *CIAPIN1* interfering hepatocellular carcinoma cell proliferation and its mechanisms[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(13):3054-3060.
- [3] HAO Z, LI X, QIAO T, et al. Distribution of *CIAPIN1* in normal fetal and adult human tissues[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(4): 417-426. DOI: 10.1369/jhc.5A6753.2005.
- [4] LI X, PAN Y, FAN R, et al. Adenovirus-delivered *CIAPIN1* small interfering RNA inhibits HCC growth in vitro and in vivo[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(8): 1587-1593. DOI: 10.1093/carcin/bgn052.
- [5] HAO Z, LI X, QIAO T, et al. Downregulated expression of *CIAPIN1* may contribute to gastric carcinogenesis by accelerating cell proliferation and promoting cell cycle progression[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(11): 1064-1070. DOI: 10.4161/cbt.8.11.8796.
- [6] WANG J, LI Q, WANG C, et al. Knock-down of *CIAPIN1* sensitizes K562 chronic myeloid leukemia cells to Imatinib by regulation of cell cycle and apoptosis-associated members via NF- κ B and ERK5 signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 99: 132-145. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.12.002.
- [7] SHIZUSAWA T, SHIBAYAMA H, MURATA S, et al. The expression of anamorsin in diffuse large B cell lymphoma: possible prognostic biomarker for low IPI patients[J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(1): 113-121. DOI: 10.1080/10428190701713697.
- [8] LU D, XIAO Z, WANG W, et al. Down regulation of *CIAPIN1* reverses multidrug resistance in human breast cancer cells by inhibiting MDR1[J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7595-7611. DOI: 10.3390/molecules17067595.
- [9] HAO Z, LI X, QIAO T, et al. *CIAPIN1* confers multidrug resistance by upregulating the expression of MDR-1 and MRP-1 in gastric cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(3): 261-266. DOI: 10.4161/cbt.5.3.2381.
- [10] ZHANG Y F, LI X H, SHI Y Q, et al. *CIAPIN1* confers multidrug resistance through up-regulation of MDR-1 and Bcl-L in LoVo/Adr cells and is independent of p53[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(4): 1091-1098. DOI: 10.3892/or.2011.1148.
- [11] LI X, HONG L, ZHAO Y, et al. A new apoptosis inhibitor, *CIAPIN1* (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1), mediates multi-drug resistance in leukemia cells by regulating MDR-1, Bcl-2, and Bax[J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(6): 741-750. DOI: 10.1139/O07-141.
- [12] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2007: 135-139.
- [13] 饶若, 吴莉芳, 金丽华, 等. 211例慢性粒细胞白血病染色体核型分析[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(1): 79-81. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2017.01.027.
- [14] CHANG X, ZHOU L, CHEN X, et al. Impact of imatinib on the fertility of male patients with chronic myelogenous leukaemia in the chronic phase[J/OL]. *Target Oncol*, 2017, 12(6): 827-832[2017-11-05]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11523-017-0521-6>. DOI: 10.1007/s11523-017-0521-6.
- [15] RITCHIE E, NICHOLS G. Mechanisms of resistance to imatinib in CML patients: a paradigm for the advantages and pitfalls of molecularly targeted therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, 6(8):645-657. DOI: 10.2174/156800906779010209.
- [16] NOGUCHI K, KATAYAMA K, SUGIMOTO Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics[J/OL]. *Pharmacogenomics Pers Med*, 2014, 7:53-64[2017-11-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921828/>. DOI: 10.2147/PGPM.S38295.
- [17] NURMIO M, KALLIO J, TOPPARI J, et al. Adult reproductive functions after early postnatal inhibition by imatinib of the two receptor tyrosine kinases, c-kit and PDGFR, in the rat testis[J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25(4): 442-446. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.03.004.
- [18] HAO Z, LI X, QIAO T, et al. Subcellular localization of *CIAPIN1* [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(12): 1437-1444. DOI:10.1369/jhc.6A6960.2006.
- [19] 蔺亚妮, 王建, 李庆华, 等. *CIAPIN1* 基因对 K562 细胞增殖能力的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(3): 671-674. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2014.03.018.
- [20] DHARMAPURI G, DONETI R, PHILIP G H, et al. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways[J]. *Leuk Res*, 2015, 39(7): 696-701. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.02.013.

【收稿日期】 2017-11-17

【修回日期】 2018-01-09

【本文编辑】 韩丹