

· 临床研究 ·

儿童急性淋巴细胞白血病及阿霉素所致 Jurkat 细胞凋亡时 WAVE1 表达研究

王卓¹, 胡婷¹, 曹励之¹, 康睿, 赵明一², 俞燕¹, 许望琼¹

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南师范大学, 湖南 长沙 410081)

[摘要] 目的 初步探讨 WASP 家族 Verprolin 同源蛋白 1 (WAVE1) 在急性淋巴细胞白血病 (ALL) 发病中可能的作用及意义。方法 运用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 半定量法和蛋白质印迹 (Western blotting) 分别检测 40 例 ALL 初治患儿、15 例化疗完全缓解半年、4 例复发、10 例非白血病患者 BMMCs 中 WAVE1 mRNA 和蛋白的表达水平。以不同浓度阿霉素处理 Jurkat 细胞: ①采用 MTT 法测细胞增殖; ②采用流式细胞仪检测细胞凋亡率; ③采用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 WAVE1 表达。结果 ALL 初治和复发患儿 BMMCs 均有 WAVE1 mRNA 和蛋白的表达, 对照和缓解组 BMMCs 中 mRNA 和蛋白低表达或无表达, 初治和复发组的 WAVE1 mRNA 和蛋白的表达水平显著高于化疗后缓解组和对照组 ($P < 0.01$)。阿霉素明显抑制 Jurkat 细胞增殖, 抑制作用呈剂量时间依赖效应 ($P < 0.05$); 阿霉素作用 24 h 后, 细胞凋亡随药物浓度增高而增加, 与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 细胞 WAVE1 mRNA 和蛋白表达水平随阿霉素处理浓度的增高而降低, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 WAVE1 在 ALL 患儿 BMMCs 中高表达; WAVE1 可能与儿童 ALL 病程相关, 它可能成为动态检测儿童 ALL 病情的一个新指标。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(5): 620-624]

[关键词] 急性淋巴细胞白血病; WAVE1; 凋亡; 儿童

[中图分类号] R733.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)05-0620-05

Expression of WAVE1 in childhood acute lymphocytic leukemia and in the apoptosis of Jurkat cells induced by adriamycin

WANG Zhuo, HU Ting, CAO Li-Zhi, KANG Rui, ZHAO Ming-Yi, YU Yan, XU Wang-Qiong. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Cao L-Z, Email: caolizhi318@hotmail.com)

Abstract: Objective To investigate whether WASP/Verprolin homologous protein 1 (WAVE1) plays a role in the pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** WAVE1 mRNA and protein expression in bone marrow mononuclear cells (BMMCs) was measured by RT-PCR and Western blotting respectively in 4 children with ALL relapse, 15 children with ALL in complete remission (CR) and 40 children with newly diagnosed ALL. Ten normal bone marrow samples were used as controls. Jurkat cells were treated with different concentrations of adriamycin (ADM). The cell proliferation was detected with MTT. The apoptosis rate was measured by flow cytometry. WAVE1 mRNA and protein expression of Jurkat cells treated with ADM was detected by RT-PCR and Western blotting respectively. **Results** WAVE1 was not expressed or weakly expressed in BMMCs from normal controls and patients with ALL in CR. Higher WAVE1 mRNA and protein expression was found in BMMCs from patients with newly diagnosed ALL and patients with relapse ALL when compared with the controls and the patients in CR ($P < 0.01$). ADM significantly inhibited the proliferation of the Jurkat cells and the inhibitory effect was dose- and time-dependent ($P < 0.05$). After ADM treatment for 24 hrs, the percentage of apoptosis cells increased significantly and WAVE1 mRNA and protein expression of Jurkat cells decreased significantly when compared with the untreated controls ($P < 0.05$). **Conclusions** The WAVE1 expression increased in children with ALL. WAVE1 may be related to the development of ALL and may be served as a marker for the evaluation of the severity of ALL in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(5): 620-624]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; WAVE1; Apoptosis; Child

[收稿日期] 2008-03-12; [修回日期] 2008-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (30571982, 30772353); 教育部博士点基金项目 (20070533042)。

[作者简介] 王卓, 男, 博士研究生, 医师。主攻方向: 小儿白血病。

[通讯作者] 曹励之, 教授, 中南大学湘雅医院儿科, 邮编: 410008。

白血病是我国儿童和青少年最常见的恶性疾病,其中以急性淋巴细胞白血病最多见,占儿童白血病70%左右。近年来流行病学研究显示白血病发病率和死亡率呈上升趋势,其病因仍不清楚^[1]。有报道^[2]发现30%~40%的中国儿童ALL病人发生6号染色体杂合性缺失(lose of heterozygosity, LOH),表现染色体6q异常,在儿童ALL发病中起到重要作用。Wiskott-Aldrich综合征(WAS)是X连锁遗传病,主要特征为免疫缺陷和血小板减少^[3]。WASP家族Verprolin同源蛋白1(WASP/Verprolin homologous protein 1, WAVE1)是WASP家庭新成员,于1998年被克隆分离^[4],位于6q21-22,其主要功能是参与肌动蛋白聚合,从而参与细胞骨架重排。细胞骨架不但在控制细胞变性、细胞运动、细胞迁移等多种生命活动中发挥重要作用^[5],而且在细胞凋亡调控中发挥重要作用和白血病的耐药有关系^[6,7],WAVE1是否与白血病发病有关,尚未见报道。化疗药物是细胞凋亡的诱导剂,阿霉素是一种抗肿瘤药物,对多种肿瘤均有作用。我们采用RT-PCR,Western blotting等技术方法初步探讨WAVE1在儿童ALL中的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 材料与细胞

为2006年1~12月在湘雅医院儿科住院和门诊确诊为ALL的40例患者,男26例,女14例,年龄最小为5个月,最大为14岁,中位年龄为7.7岁,诊断标准依据FAB标准^[8],再选取其中患儿化疗骨髓完全缓解后半年来15例,复发(骨髓完全缓解后复发,原始+幼稚细胞 $\geq 30\%$)4例。另选取非白血病且骨髓象正常的小儿骨髓10例为对照,其中,男6例,女4例,年龄最小为3岁,最大13岁。以上标本检测WAVE1 mRNA表达水平。再取相同数量标本检测WAVE1蛋白表达水平。

1.2 RT-PCR检测WAVE1 mRNA的表达

用TRIzol试剂盒(Invitrogen公司)按说明提取总RNA。用鸟类成髓细胞瘤病毒反转录酶(Takara公司产品)逆转录成cDNA;用2 μL 的逆转录产物作为模板,依据文献及生物信息学知识,利用Primer Express 3.0设计软件,设计引物(引物购自上海生物工程公司),WAVE1扩增片段为205bp(上游:5'-TCTGGGCTACATCCA ACTCC-3';下游:5'-CCTGTTCACGCTGCTCTTCT-3'), GAPDH扩增片段为

343bp(上游:5'-AATCCCATCACCATCTTCC-3';下游:5'-CATCACGCCACAGTTTCG-3')。

PCR反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,54.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,31个循环(GAPDH为23个循环)。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳电泳、EB染色、拍照、扫描后通过Band Leader软件分析灰度质。

1.3 Western blotting分析

用2 \times SDS加样缓冲液裂解细胞,收集蛋白质,采用考马斯亮兰法进行蛋白定量。经100 g/L SDS-PAGE电泳分离、转膜和20 g/L白蛋白4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜后,依次加入一抗[山羊抗WAVE1多克隆抗体(BD Biosciences公司);鼠抗GAPDH单克隆抗体(康成公司)、相应二抗(博士德公司),室温孵育2 h,DAB显色、拍照、扫描后采用Gel-PRO Analyzer软件进行蛋白半定量分析。

1.4 细胞培养及处理分组

人T系急性淋巴细胞白血病细胞株Jurkat细胞由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。实验分组:①未处理对照组:细胞株在含10%小牛血清的RP-MI 1640(Invitrogen公司)培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养,3~4 d换液1次。②阿霉素处理组:不同浓度(0.25,0.5,1,2,4 $\mu\text{mol/L}$)阿霉素处理细胞。

1.5 MTT法检测细胞增殖

将对数生长期的Jurkat细胞按每孔 1×10^4 细胞接种于96孔板,培养24 h;吸弃培养液,加入含有阿霉素的培养液,终浓度依次为0.25,0.5,1,2,4 $\mu\text{mol/L}$,对照组不加阿霉素,空白对照以1640液替代细胞悬液;分别在加药培养24,48,72 h后,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μL 继续培养4 h,吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,使紫色结晶体完全溶解;在酶标仪上于490 nm波长处(参考波长为630 nm)测定各孔的吸光度值;各时间点实验均重复3次,每样本设5复孔,结果取平均值。计算细胞存活率=加药组A值/对照组A值 $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞仪细胞凋亡分析

由北京鼎国生物技术公司协助完成。参考该公司流式细胞检测说明收集细胞。收集细胞于10 mL离心管中,1 000 r/min常温下离心5 min,弃上清,用预冷的磷酸盐缓冲液重悬细胞,同上离心后弃上清。用80%乙醇重悬并固定细胞,力求单细胞化。

1.7 阿霉素对细胞 WAVE1 mRNA 及蛋白的影响

用 RT-PCR 和 Western blotting 法检测,方法同前。

1.8 统计学分析

采用 SPSS12.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 ALL 组及对照组 BMBCs 中 WAVE1 mRNA 表达结果

WAVE1 mRNA 平均灰度值分别为:对照 (3.650 ± 0.611)%、初治 (77.63 ± 1.208)%、缓解 (4.362 ± 0.698)%、复发 (72.35 ± 1.406)%。在 ALL 的 BMBCs 初治和复发中,WAVE1 mRNA 表达水平显著增高,而对照组以及 ALL 完全缓解组 BMBCs 中 WAVE1 低表达或不表达 ($P < 0.01$)。见图 1。

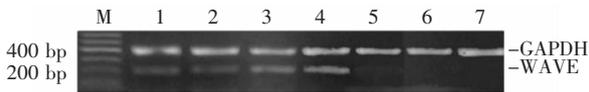


图 1 BMBCs 中 WAVE1 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果。M:标准参照物;1~3:初治;4:复发;5:缓解;6~7:对照。

2.2 ALL 组及对照组 BMBCs 中 WAVE1 蛋白表达结果

WAVE1 蛋白平均灰度值分别为:对照 (2.45 ± 0.206)%、初治 (81.29 ± 4.235)%、缓解 (4.23 ± 0.293)%、复发 (79.18 ± 4.015)%。在 ALL 的 BMBCs 初治和复发中,WAVE1 蛋白表达水平显著增高,在正常对照组以及 ALL 完全缓解组 BMBCs 中 WAVE1 表达低或检测不到 ($P < 0.01$)。与 mRNA 表达趋势相似。见图 2。

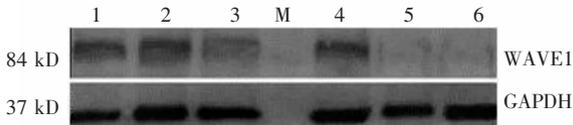


图 2 BMBCs 中 WAVE1 蛋白的 Western blotting 产物结果。M:标准参照物 1~2:初治;3:缓解;4:复发;5~6:正常对照。

2.3 细胞增殖能力分析

采用 MTT 检测细胞率。结果显示,阿霉素作用 24 h 后,各浓度阿霉素均能抑制 JurKat 细胞增殖,6

个浓度之间随剂量增大其抑制增殖作用越显著 ($P < 0.05$),具有浓度依赖性。根据 MTT 实验结果,在 24 h 培养最低浓度条件下,观察到阿霉素对 JurKat 细胞增殖产生影响,所以,选择 24 h 为以下实验的时间点(图 3)。

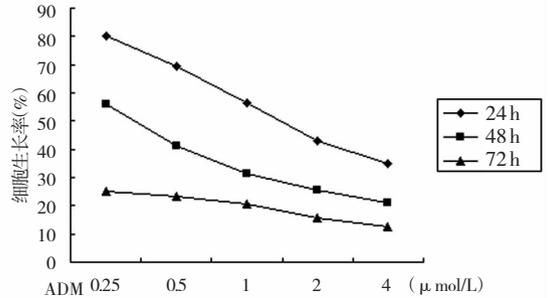


图 3 阿霉素处理 JurKat 细胞后细胞生长率

2.4 阿霉素处理后细胞凋亡结果

用流式细胞仪检测阿霉素处理 24 h 细胞的凋亡百分率,结果表明:随着药物浓度增高,JurKat 细胞株的凋亡率有所增高,均高于对照组(均 $P < 0.05$)(图 4)。

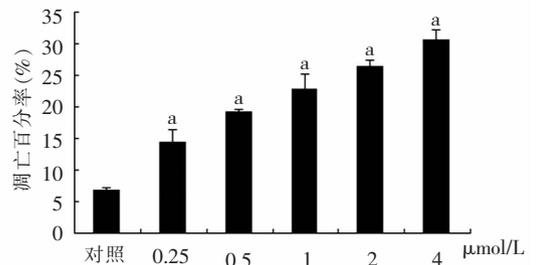


图 4 阿霉素处理 JurKat 细胞后凋亡率 ($\bar{x} \pm s$) a: $P < 0.05$

2.5 RT-PCR 检测阿霉素对 Jurkat 细胞中 WAVE1 mRNA 表达结果

阿霉素处理 24 h 后随浓度增高 WAVE1 mRNA 表达逐渐降低,与对照组比较差异均有显著性(均 $P < 0.05$)。见图 5a,b。

2.6 Western blotting 法检测阿霉素对 Jurkat 细胞中 WAVE1 蛋白表达结果

阿霉素处理 24 h 后随浓度增高 WAVE1 蛋白表达逐渐降低,与对照组比较均有显著性差异(均 $P < 0.05$),图 6a,b。

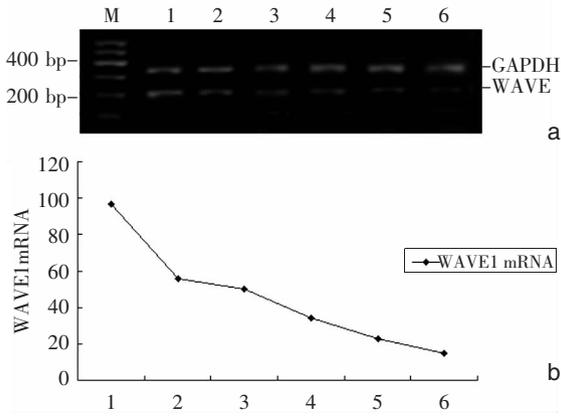


图5 24 h 各组浓度 JurKat 细胞 WAVE1 mRNA 的 RT-PCR 结果 M:标准参照物;1:正常对照;2~6:分别为 0.25, 0.5,1,2,4 $\mu\text{mol/L}$

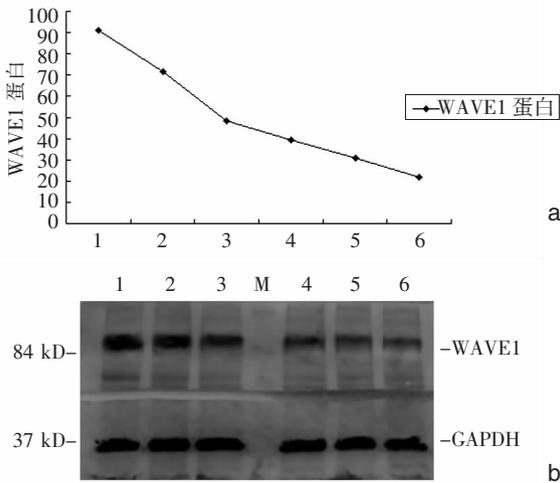


图6 Western blotting 法检测各组细胞 WAVE1 蛋白的表达 M:标准参照物;1:正常对照;2~6:分别为 0.25,0.5,1,2, 4 $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

ALL 是我国儿童和青少年常见的恶性血液病,揭示 ALL 的发病机制,对于防治儿童 ALL 具有非常重要的意义。过去 10 年国内外主要关注的是识别白血病细胞中染色体异常,分离染色体异常累及的基因,阐明他们的致病的分子机制和与临床的关系。文献报道而通白血病的相关基因主要有:RAS^[9]、MYC^[10]、HOX11^[11]、TAL1^[12] 等癌基因, p53^[13] 肿瘤抑制基因, GRIK2 基因^[14], p73^[15] 基因, CDKN2/INK4A/P16^[16] 基因、TEL-AML1 融合基因^[17]、ETV6/AML1^[10] 融合基因等。虽然有众多的研究,但是白血病发生发展的完整的分子机制远未阐明。寻找和发现新的白血病致病相关基因成为当

前的研究热点。

WAVE1 蛋白作为一新型肌动蛋白调节蛋白,属于 WASP 家族,广泛参与细胞信号传导、调控肌动蛋白聚合以及细胞骨架重排^[18,19]。小鼠多组织 Northern blotting 分析显示 WAVE1 在脑组织中强表达,在睾丸中低表达,在卵巢、结肠、肾、胰腺、胸腺、小肠、外周血中表达极低或不表达^[4]。然而,到目前为止,很少有文献报道病理情况下 WAVE1 的改变。

本实验结果显示 WAVE1 在对照组 BMMCs 和缓解组不表达,而儿童 ALL 病人 BMMCs 高表达 WAVE1,提示 WAVE1 可能参与了儿童 ALL 的发病,更为重要的是我们发现 WAVE1 与白血病病程相关,活动期(包括初治和复发患儿) WAVE1 的表达持续增高,完全缓解期 WAVE1 低表达。因此,检测 WAVE1 水平可能成为动态监测儿童白血病活动情况的一个新指标。

在临床标本中观察到,WAVE1 表达增高,可能与白血病发病相关,进一步在细胞株中观察其对白血病细胞的影响。我们阿霉素处理 Jurkat 细胞后,MTT 比色实验显示随着阿霉素浓度的增高和处理时间延长,肿瘤细胞数目逐渐减少。流式细胞仪检测细胞凋亡率随浓度逐渐增加,RT-PCR 和 Western blotting 法结果表明随着药物浓度的升高,其 WAVE1 蛋白 mRNA 和蛋白的表达降低,说明阿霉素诱导 Jurkat 细胞凋亡,初步推测阿霉素可能通过下调 WAVE1 的表达而诱导细胞凋亡。

综上所述,WAVE1 在白血病细胞系和 ALL 患者 BMMCs 细胞中表达增高,深入阐明 WAVE1 与白血病致病分子的机制和与临床的关系,可能为改进白血病的防治提供新的思路与实验线索。

[参 考 文 献]

- [1] 陈东周,叶冬青. 儿童白血病的危险因素[J]. 国外医学·儿科学分册, 2004, 31 (4): 206-208.
- [2] 郭碧赞,曹励之,张朝霞. 儿童急性淋巴细胞性白血病 6q21 区域微缺失的研究及其与临床的关系[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(3):89-97.
- [3] Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. Identification of two human WAVE/ SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/ 3 complex[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 260(1):296-302.
- [4] Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempski H, et al. Two novel activating mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia[J]. Blood, 2006, 108(7):2182-2189.
- [5] Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton[J]. Nat Rev Mol Cell Sci, 2007, 8(1):37-48.
- [6] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. Science,

- 1998, 279 (5350):509-514.
- [7] Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton; a key regulator of apoptosis and ageing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(7):583-589.
- [8] 胡亚美,江载芳.实用儿科学[M].第七版.北京:人民卫生出版社,2005,2006.
- [9] Perentesis JP, Bhatia S, Boyle E, Shao Y, Shu XO, Steinbuch M, et al. RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2004, 18(4):685-692.
- [10] Harrison CJ. The genetics of childhood acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 2000, 13(3):427-439.
- [11] Watt PM, Hoffmann K, Greene WK, Brake RL, Ford J, Kees UR. Specific alternative HOX11 transcripts are expressed in paediatric neural tumours and T-cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Gene*, 2003, 323:89-99.
- [12] Bruggemann M, van der Velden VH, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, et al. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2004, 18(4):709-719.
- [13] Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK, Panicker KR, Pillai MR. Mutant p53 protein, Bcl-2/Bax ratios and apoptosis in paediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126(1):62-67.
- [14] Sinclair PB, Sorour A, Martineau M, Harrison CJ, Mitchell WA, O'Neill E, et al. A fluorescence in situ hybridization map of 6q deletions in acute lymphocytic leukemia; identification and analysis of a candidate tumor suppressor gene[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12):4089-4098.
- [15] Meier M, den Boer ML, Meijerink JP, Broekhuis MJ, Passier MM, van Wering ER, et al. Differential expression of p73 isoforms in relation to drug resistance in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Leukemia*, 2006, 20(8):1377-1384.
- [16] Zuna J, Muzikova K, Hrusak O, Sary J, Trka J. Significance of real-time quantitative PCR detection of p16 gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Haematologica*, 2002, 87(6):668-669.
- [17] Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, Sibut V, Mottier S, Ly Sunnam B, et al. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8:385.
- [18] Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1):37-48.
- [19] Kim Y, Sung JY, Ceqlia I, Lee KW, Ahn JH, Halford JM, et al. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology[J]. *Nature*, 2006, 442(7104):814-817.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

欢迎订阅 2009 年《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊和国际权威检索机构美国MEDLINE、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊,是《中国医学文摘·儿科学》引用的核心期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》和《万方数据——数字化网络期刊》全文收录。已被复旦大学、浙江大学、中南大学和中国医科大学等国内著名大学认定为儿科核心期刊。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、社区医师园地、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊2009年起将改为月刊,每月15日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年72元。邮发代号:国内42-188;国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免审稿费,审稿周期短(4~8周)。请登录本刊网站了解详情。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-4327402 传真:0731-4327922 Email:ddek7402@163.com

投稿网址:http://www.cjcp.org