

# PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白在NB4细胞及其裸鼠 移植瘤中定位的验证

朱新瑜<sup>1,2</sup> 刘北忠<sup>1,2\*</sup> 高远梅<sup>2</sup> 马鹏鹏<sup>2</sup> 王慧<sup>2</sup> 钟梁<sup>2</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160;

<sup>2</sup>重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 验证中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)切割PML-RAR $\alpha$ 后, PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的存在和定位。将质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞, 用Western blot法验证质粒转染成功; 提取电转染质粒成功的NB4细胞的胞浆蛋白, 用Western blot法检测NB4细胞中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达; 免疫荧光法和激光共聚焦检测电转染质粒成功的NB4细胞中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达及定位; 同时, 建立NB4细胞、K562细胞和电转染质粒成功的NB4细胞裸鼠皮下瘤模型, 用Western blot、免疫组化法检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白在移植瘤组织细胞中的表达与定位。结果表明, Western blot检测电转染质粒pCMV-HA-NE的NB4细胞成功表达NE蛋白; NE酶成功切割PML-RAR $\alpha$ , Western blot检测到电转染质粒pCMV-HA-NE的NB4细胞表达PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白; 免疫荧光和激光共聚焦均可检测到电转染质粒成功的NB4细胞中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白定位于细胞胞浆; Western blot和免疫组化法检测到电转染质粒成功的NB4细胞裸鼠移植瘤中的PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达且定位于细胞胞浆, 而NB4和K562细胞裸鼠皮下瘤中PML蛋白主要定位于细胞核。综上所述, 该文成功将质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞并用Western blot、免疫荧光、激光共聚焦、免疫组化验证PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白存在于NB4细胞胞浆, 这一现象可以为急性早幼粒细胞白血病的临床早期诊断与治疗提供新的依据。

**关键词** 急性早幼粒细胞白血病; PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白; NB4细胞

## Localization of PML (NLS<sup>-</sup>) Protein in NB4 Cells and Transplanted Tumors in Nude Mice

Zhu Xinyu<sup>1,2</sup>, Liu Beizhong<sup>1,2\*</sup>, Gao yuanmei<sup>2</sup>, Ma Pengpeng<sup>2</sup>, Wang Hui<sup>2</sup>, Zhong Liang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Medicine Diagnostics of Ministry of Education in Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To verify the existence and location of PML (NLS<sup>-</sup>) protein after PML-RAR $\alpha$  cleaved by neutrophil elastase (NE), the plasmid pCMV-HA-NE was electroporated into NB4 cells and NE protein was verified by Western blot. We extracted the cytoplasm protein of NB4-HA-NE cells and detected the PML (NLS<sup>-</sup>) protein by Western blot. Immunofluorescence assay and confocal laser microscopy were performed to localize the PML (NLS<sup>-</sup>) protein in the cytoplasm of NB4-HA-NE cells. Then, NB4, K562 and NB4-HA-NE cells were expressed in xenograft of nude mice. Western blot and immunohistochemistry were done to detect PML (NLS<sup>-</sup>) protein in the cy-

收稿日期: 2013-12-09 接受日期: 2014-02-26

国家自然科学基金(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(批准号: 2011BA5037)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 02385381906, E-mail: lbz2753@qq.com

Received: December 9, 2013 Accepted: February 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and the Key Project of Natural Science Fund Plan of Chongqing (Grant No.2011BA5037)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-85381906, E-mail: lbz2753@qq.com

网络出版时间: 2014-04-29 16:00 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0408.html>

toplasm of the NB4-HA-NE cells. The results indicated that NE protein was detected in the NB4 -HA-NE cells and PML (NLS<sup>-</sup>) protein was verified in the NB4-HA-NE cells by Western blot, which demonstrated that PML-RAR $\alpha$  was cut successfully by NE. Immunofluorescence assay and confocal laser microscopy showed that the PML (NLS<sup>-</sup>) protein was localized in the cytoplasm of NB4-HA-NE cells. Meanwhile, PML (NLS<sup>-</sup>) protein in nude mice was expressed and localized in the cytoplasm of NB4-HA-NE cells manifested by Western blot and immunohistochemistry, while PML protein was almost localized in the nucleus of NB4 and K562 cells in nude mice. In summary, the pCMV-HA-NE plasmid was successfully electransferred into NB4 cells and PML (NLS<sup>-</sup>) protein was verified to be in the cytoplasm of NB4-HA-NE cells with the use of Western blot, immunofluorescence, confocal laser microscopy and immunohistochemical techniques, which could provide new evidence for early diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia.

**Key words** acute promyelocytic leukemia; PML (NLS<sup>-</sup>) protein; NB4 cells

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓系白血病的一个特殊类型,是目前治愈率很高的恶性白血病。但是,如果诊断和治疗不及时,会导致较高的发病率和死亡率<sup>[1]</sup>。目前,对其诊断的金标准仍然是骨髓涂片检测,不仅费时还给病人带来痛苦。因此,寻求新的快速诊断方法显得迫切而必要。大量临床证据表明,98%以上的APL患者体内都表达PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白,该融合蛋白的形成干扰了野生型RAR $\alpha$ (维甲酸受体)的信号传递和早幼粒细胞白血病蛋白(promyelocytic leukemia, PML)及其核体(NBs)的正常结构与功能,在APL的发生发展中起了关键作用。但有研究表明,PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白并非都是作为一个整体起作用的,PML-RAR $\alpha$ 可以被中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)切割成约53 kDa和61 kDa大小的两种变异蛋白,即失去核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白与得到核定位信号的NLS-RAR $\alpha$ 蛋白<sup>[2]</sup>。Lane等<sup>[3]</sup>研究发现,单纯将PML-RAR $\alpha$ 导入不含NE的早期髓细胞中,此时融合基因未被裂解,其发生APL的概率远低于富含NE的早期髓细胞,仅为2%~3%。并且,陈竺等<sup>[4]</sup>发表的最新研究成果,在揭示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>靶向治疗APL有关分子机制的同时,指出几乎所有肿瘤的发生可能都与PML的异常定位有关。这些研究结果提示,PML-RAR $\alpha$ 的切割产物可能在早期对APL的发生发展起到关键性的作用。因此,本研究重点探讨了PML-RAR $\alpha$ 切割产物PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达和定位,由于APL细胞系NB4细胞不含有NE,因此我们将质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞,验证PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白是否存在于电转染质粒pCMV-HA-NE的APL细胞系NB4细胞浆中,

这一现象将为临床早期诊断和治疗APL奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、细胞和实验动物

质粒pCMV-HA-NE由本室保存;人急性早幼粒细胞白血病NB4细胞和慢性粒细胞白血病细胞系K562细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源库;人正常白细胞采用人外周血中性粒细胞分离液分离得到;BALB/c裸鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,雄性,6周龄,重量18~22 g,SPF级动物室饲养。

### 1.2 主要试剂

RPMI1640培养基(GIBCO公司);胎牛血清(FBS)(Hyclone公司);兔抗人PML多抗(Abcam公司);鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔二抗多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗人Histone H3多克隆抗体(Bio-world公司);细胞浆核蛋白提取试剂盒(碧云天生物技术有限公司);核染料PI(Sigma公司);人外周血中性粒细胞分离液、红细胞裂解液(天津灏洋生物公司);兔通用免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗人NE单抗(Epitomics公司)。

### 1.3 标本收集

正常人来源于实验室同学50例。

### 1.4 细胞培养

将NB4细胞置于含10% Gibco优质胎牛血清的RPMI1640培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内常规培养,每1~2 d换液传代,选择对数生长期的细胞用于后续实验。将K562细胞置于含10% Hyclone胎牛血清的1640培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内

常规培养, 每1~2 d换液传代, 选择对数生长期的细胞用于后续实验。

### 1.5 质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞

在处于对数生长期的NB4细胞中加入适量浓度的质粒pCMV-HA-NE至浓度为20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 上下吹打混匀, 将混合液移入相应规格的电转杯中, 按照预定条件设置参数(250 V, 10 ms, 0.4 mm cuvette), 将电转杯置于恒温培养箱中12 min, 然后从恒温箱中取出, 接种细胞悬液于预热的培养基中, 上下吹打混匀, 然后放培养箱中正常培养, 24 h后进行细胞的实验处理。

### 1.6 人外周血中性粒细胞的提取

取20 mL新鲜抗凝血, 与PBS稀释液1:1混匀后小心加于分离液上层, 1 800 r/min离心25 min。此时离心管中由上至下分四层: 第一层为血浆层、第二层为环状乳白色的单个核细胞层、第三层为略带浑浊的分离液层(富集一定量的中性粒细胞)、第四层为红细胞层。弃去第一层和第二层, 收集第三层和第四层, 放入含10 mL PBS的试管中, 充分混匀后, 以1 800 r/min离心30 min, 沉淀用红细胞裂解液反复洗涤3次, 然后再用PBS反复洗涤3次, 离心后沉淀即为所需的中性粒细胞。

### 1.7 胞浆蛋白和核蛋白的提取

分别收集电转染pCMV-HA-NE的NB4细胞、空载NB4细胞、NB4细胞、K562细胞、正常人中性粒细胞, PBS洗3次, 离心收集细胞, 吸尽上清, 留下细胞沉淀备用。每20  $\mu\text{L}$ 细胞沉淀加200  $\mu\text{L}$ 添加了2  $\mu\text{L}$  PMSF(蛋白酶抑制剂)的胞浆蛋白抽提试剂A, 剧震Vortex 5 s, 重悬细胞沉淀, 冰浴15 min, 然后加胞浆蛋白抽提试剂B 10  $\mu\text{L}$ , 冰浴1 min, 剧震Vortex 5 s, 4  $^{\circ}\text{C}$  40 000 r/min离心5 min, 立即吸取上清至预冷的EP管中, 即为抽提的胞浆蛋白。完全吸尽残余的上清, 加入50  $\mu\text{L}$ 添加了PMSF的核蛋白抽提试剂, 剧震Vortex 30 s, 把细胞沉淀完全悬浮并分散开, 然后放回冰浴, 每隔2 min再高速剧震Vortex 30 s, 共30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  16 000 r/min离心10 min, 立即吸取上清至预冷的EP管中, 即为抽提的核蛋白。

### 1.8 PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白表达的检测

1.8.1 Western blot法 提取胞浆蛋白和核蛋白用BCA法定量, 分别取80  $\mu\text{g}$ 蛋白, 经5%浓缩胶浓缩和12%的分离胶分离后, 电转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭后, 加入兔抗人PML多抗(5%脱脂奶粉1:1 000稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。先用TBST洗2次, 每次10 min, 再

用TBS洗10 min。加入羊抗兔多抗(5%脱脂奶粉1:1 000稀释), 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 然后洗膜(步骤同上)。最后于暗室化学发光显影成像。

1.8.2 免疫荧光法 分别收集电转染pCMV-HA-NE的NB4细胞、空载NB4细胞、NB4细胞、K562细胞、正常人中性粒细胞(相同的量 $1 \times 10^3$ ), 用PBS洗3次, 各取10  $\mu\text{L}$ 进行涂片, 用4%的多聚甲醛固定20 min, PBS漂洗3次, 再用0.1% Triton透膜处理15 min。10%山羊血清室温封闭30 min, 加上兔抗人PML抗体(封闭血清1:300), 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS漂洗3次, 加上荧光二抗(封闭血清1:300), 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。PBS漂洗3次, 加入核染色液PI 5 min, PBS漂洗3次, 用70%甘油封固, 荧光显微镜下观察, NIS-Elements BR图像分析软件处理, 红色代表细胞核, 绿色代表PML蛋白。

1.8.3 激光共聚焦 使用免疫荧光的切片, 以徕卡TCS-ST2激光共聚焦显微镜检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白在胞浆的表达情况。以红绿双色荧光通道扫描观察。绿光的激发波长为488 nm, 在600 nm波长以上观察。红光的激发波长为540 nm, 在600 nm波长以上观察。每张切片选取荧光表达最强的10个视野观察, 红色代表细胞核, 绿色代表PML蛋白。

### 1.9 裸鼠模型的建立及免疫组化

体外培养细胞株电转染pCMV-HA-NE的NB4细胞、未转染pCMV-HA-NE的NB4细胞、K562细胞, 将处于对数期的各种细胞( $1 \times 10^6$ )混悬于100  $\mu\text{L}$ 无血清RPMI1640培养基中, 接种于9只裸鼠右前肢肩背部近腋窝皮下, 建立裸鼠移植瘤模型。裸鼠随机分为3组, 每组3只。一周后处死动物, 完整取出瘤块, 一部分用0.25%胰酶消化3 min获取转染pCMV-HA-NE的NB4细胞、未转染pCMV-HA-NE的NB4细胞和K562细胞; 另一部分移植瘤标本在4%多聚甲醛充分固定24 h, 脱水, 石蜡包埋, 完整切片。组织切片在60  $^{\circ}\text{C}$ 温箱中过夜, 石蜡切片脱蜡、水化、蒸馏水冲洗, 抗原修复, 微波修复(柠檬酸盐)中火7 min、停6 min、中火7 min, 自然冷却至室温, PBS冲洗3 $\times$ 3 min。干燥, 用画圈笔在组织周围画圈, 滴加3%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温10 min, PBS冲洗3 $\times$ 3 min。除去PBS, 切片上滴加山羊血清封闭30 min。弃去, 滴加兔抗人PML抗体(PBS 1:300), 置湿盒内4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS冲洗3 $\times$ 3 min。除去PBS, 切片上滴加生物素二抗, 室温下孵育30 min, PBS冲洗3 $\times$ 3 min。除去PBS, 切片上滴加HRP标记生物素工作液, 室温下孵育60 min, PBS

冲洗3×3 min。除去PBS, 切片上滴加DAB显色液, 于显微镜下观察染色效果, 自来水冲洗终止显色。放入苏木素染色13 s, 轻甩, 放入碳酸锂10 s返蓝, 自来水冲洗, PBS冲洗3×3 min。除去PBS, 干燥, 二甲苯透明30 min, 滴树脂封片。

### 1.10 蛋白测定

将获取的组织消化后的电转染pCMV-HA-NE的NB4细胞、未转染pCMV-HA-NE的NB4细胞和K562细胞, 用Western blot法检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白表达。方法如前所述。

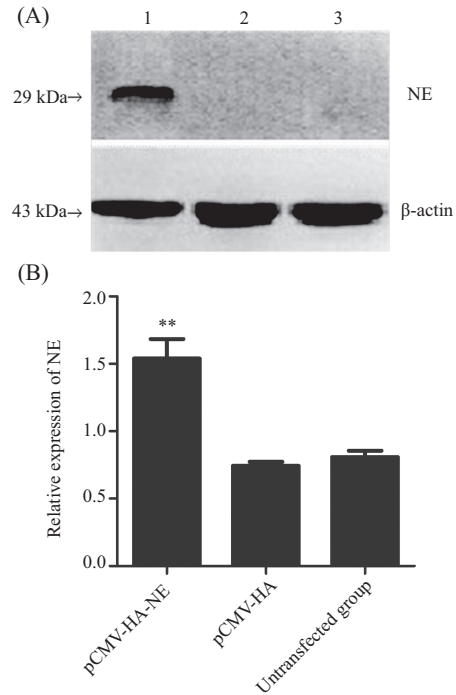
### 1.11 统计学方法

Western blot实验独立重复3次, 结果均用Quantity One进行灰度分析, 用目的基因吸光度值/内参吸光度值来计算, 实验数据以均数±标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两样本比较采用*t*检验, 以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞后NE表达检测

如图1所示, pCMV-HA-NE组在约29 kDa附近

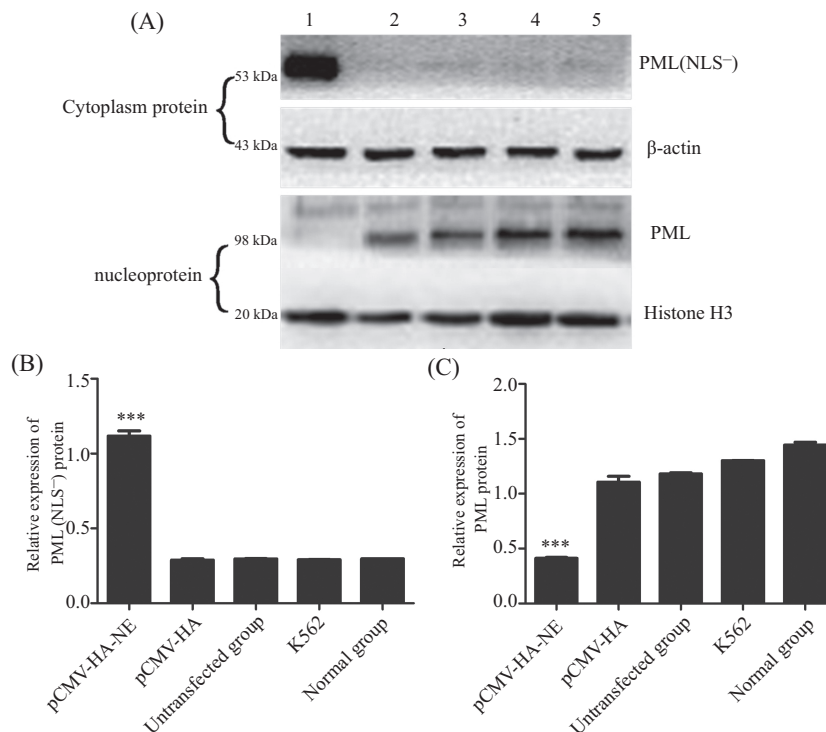


1: pCMV-HA-NE组; 2: pCMV-HA组; 3: 未转染组。\*\**P*<0.01, 与pCMV-HA组及未转染组相比。

1: pCMV-HA-NE group; 2: pCMV-HA group; 3: untransfected group. \*\**P*<0.01 compared with pCMV-HA and untransfected groups.

图1 Western blot验证转染细胞中的NE

Fig.1 Expression of NE in NB4 cells detected by Western blot



1: pCMV-HA-NE组; 2: pCMV-HA组; 3: 未转染组; 4: K562组; 5: 正常人组。\*\*\**P*<0.001, 与其他组相比。

1: pCMV-HA-NE group; 2: pCMV-HA group; 3: untransfected group; 4: K562 group; 5: normal group. \*\*\**P*<0.001 compared with other groups.

图2 Western blot法检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白水平的表达及定位

Fig.2 The expression and localization of PML(NLS<sup>-</sup>) protein detected by Western blot

出现了与NE蛋白分子量大小相近的特异性条带,与pCMV-HA组和未感染组比较差异显著( $P<0.01$ ),说明pCMV-HA-NE组中NE蛋白成功表达。 $\beta$ -actin作为细胞浆蛋白内参,其蛋白分子量约43 kDa。

## 2.2 Western blot检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达及定位

pCMV-HA-NE组在约53 kDa处出现了与PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白分子量相近的特异性条带,而在约98 kDa处几乎没有出现与PML蛋白分子量相近的条带,说明PML蛋白失去了核定位信号,由胞核转移到胞浆成为PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白,证明了电转染pCMV-HA-NE的NB4细胞中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白主要表达于胞浆;在空载组、

空白组、K562细胞及正常人外周血中性粒细胞中,在约53 kDa处几乎没有出现与PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白分子量相近的条带,而在约98 kDa处出现与PML蛋白分子量相近的条带,说明野生型的PML蛋白主要在胞核表达,经统计学分析差异显著( $P<0.001$ )。 $\beta$ -actin可以作为细胞浆蛋白内参,其蛋白分子量约43 kDa, Histone H3为核内参,其蛋白分子量约20 kDa(图2)。

## 2.3 免疫荧光检测PML(NLS<sup>-</sup>)的表达及定位

pCMV-HA-NE组NB4细胞胞浆中可见明显的点状绿色PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白,而胞核中没有明显的绿色荧光;在空载组、未转染组、K562细胞及人外周血中性粒细胞中见胞核点状分布绿色PML蛋

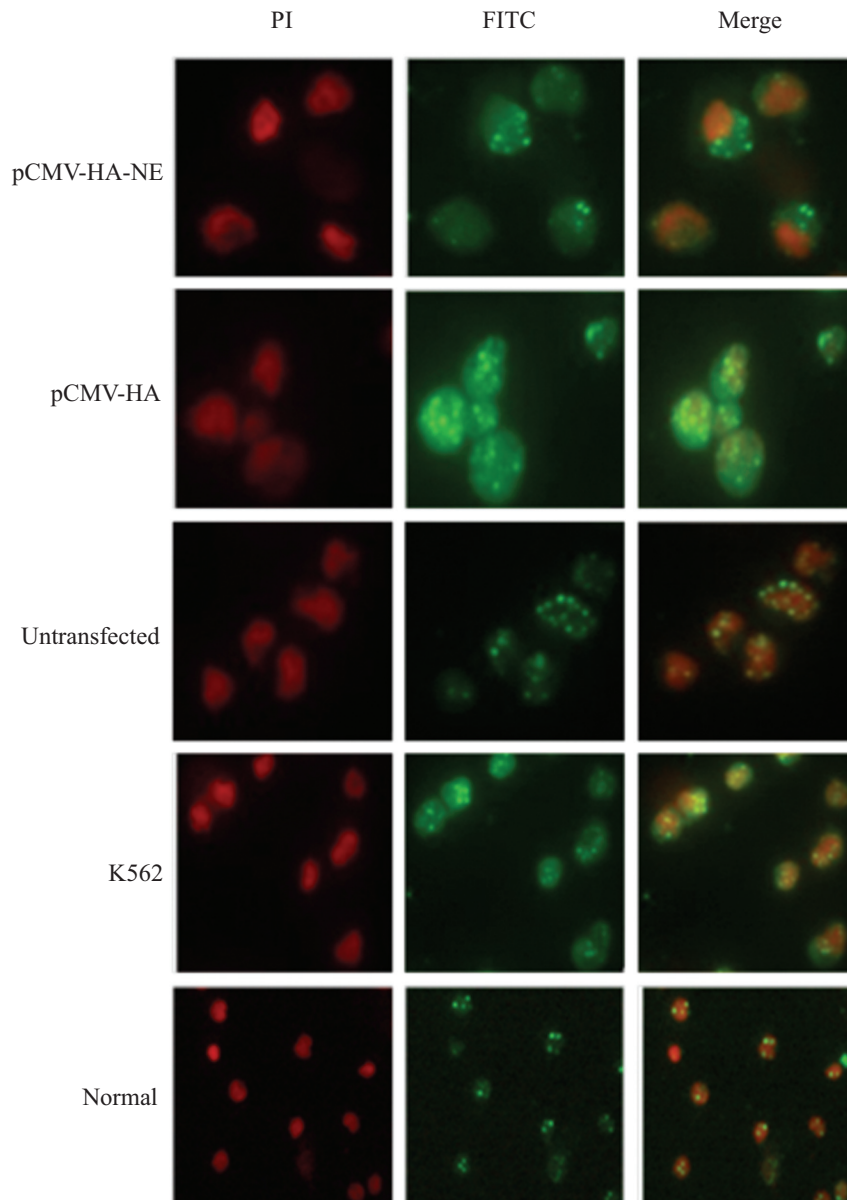


图3 免疫荧光法检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达(400 $\times$ )

Fig.3 Expression and localization of PML(NLS<sup>-</sup>) protein detected by immunofluorescence (400 $\times$ )

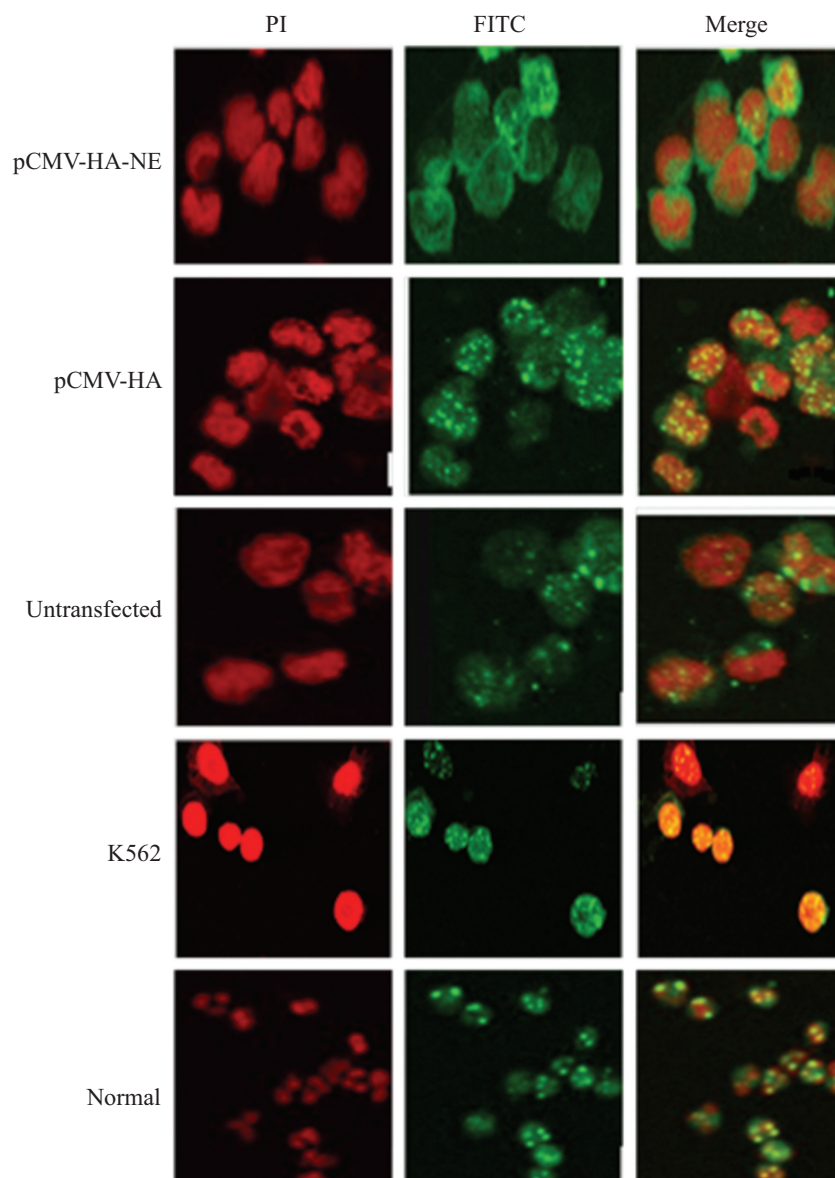
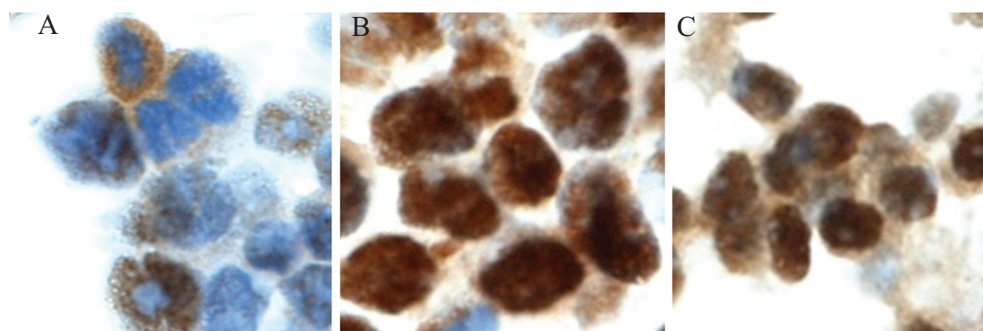


图4 激光共聚焦显微镜观察不同细胞浆中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达(400×)

Fig.4 Expression and localization of PML (NLS<sup>-</sup>) protein detected by laser scanning confocal microscope (400×)

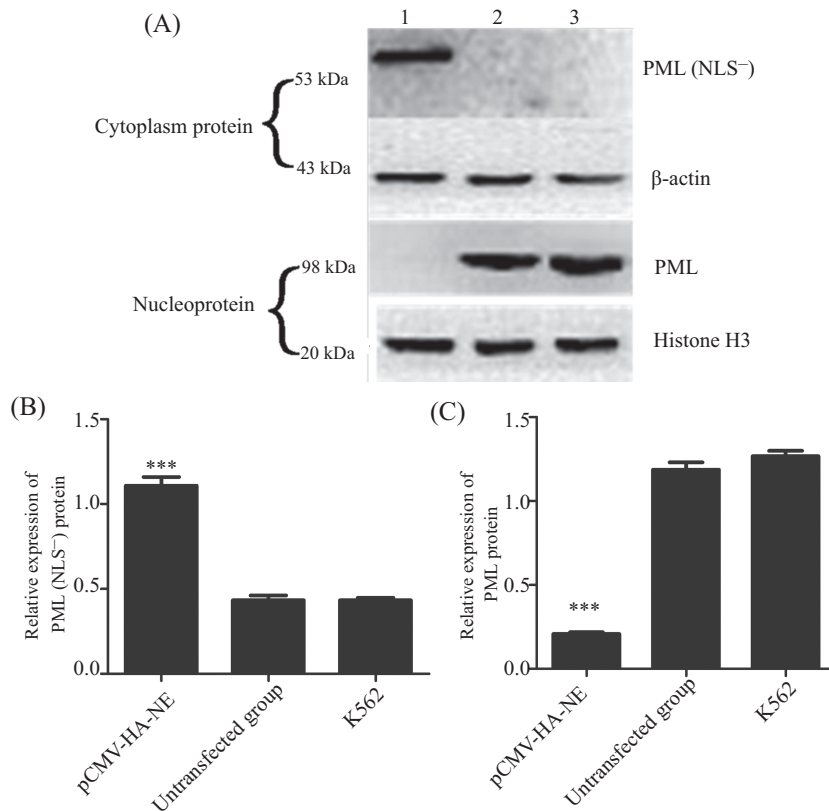


A: pCMV-HA-NE组; B: 未转染组; C: K562组。

A: pCMV-HA-NE group; B: untransfected group; C: K562 group.

图5 免疫组化法检测裸鼠移植瘤中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白表达(1 000×)

Fig.5 Expression of PML (NLS<sup>-</sup>) protein in nude mice model detected by immunohistochemistry (1 000×)



1: pCMV-HA-NE组; 2: 未转染组; 3: K562组。\*\*\* $P < 0.001$ , 与未转染组和K562组相比。

1: pCMV-HA-NE group; 2: untransfected group; 3: K562 group. \*\*\* $P < 0.001$  compared with untransfected group and K562 group.

图6 Western blot法检测裸鼠移植瘤中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白水平的表达

Fig.6 Expression of PML(NLS<sup>-</sup>) protein in nude mice model detected by Western blot

白, 而胞浆中没有明显的点状绿色荧光, 说明电转染pCMV-HA-NE的NB4细胞中的NE酶切割PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白, 使得PML蛋白失去核定位信号变为PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白, 位置也相应地由胞核转移到胞浆(图3)。

#### 2.4 激光共聚焦显微镜观察不同细胞中PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达

pCMV-HA-NE组NB4细胞胞浆中可见明显的片状绿色PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白, 而胞核中没有明显的点状分布的绿色荧光; 在其他组中均可见胞核点状分布绿色PML蛋白, 而胞浆中没有明显的荧光, 说明NB4-HA-NE细胞中的NE酶切割PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白, 使得PML蛋白失去核定位信号变为PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白, 位置相应的由胞核转移到胞浆(图4)。

#### 2.5 PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白在裸鼠移植瘤中的表达

2.5.1 免疫组化法检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白 pCMV-HA-NE组NB4细胞胞浆中可见明显PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白的表达, 而胞核中几乎看不到PML蛋白的表达, 未转染组和K562细胞组可见PML蛋白几乎全部在胞核

表达。说明胞核中的PML蛋白失去核定位信号转移到了胞浆成为PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白(图5)。

2.5.2 Western blot法检测PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白 pCMV-HA-NE组在约53 kDa处出现与PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白分子量相近的特异性条带, 而在未转染组和K562细胞组明显低于pCMV-HA-NE组的表达。说明NE切割PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白使得PML失去了核定位信号成为PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白, 从胞核转移到胞浆。未转染组和K562细胞, 在约53 kDa处没有出现与PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白分子量相近的条带, 而在约98 kDa处出现与PML蛋白分子量相近的条带, 说明野生型的PML蛋白主要在胞核表达。经统计学分析差异显著( $P < 0.001$ )。 $\beta$ -actin作为浆内参, 其蛋白分子量约43 kDa, Histone H3为核内参, 其蛋白分子量约20 kDa(图6)。

### 3 讨论

APL是急性髓系白血病的一个亚型, 其临床特点是出血倾向严重, 常易并发弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC), 导致早

期死亡, 严重危害患者生命。然而, 随着全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)和三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO或As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)的应用, 情况已大为改观, 完全缓解率明显提高, 治疗相关死亡率大大降低<sup>[5]</sup>。尽管目前对于APL的临床治疗取得了很大的进展, 但仍有12%~30%患者会复发, 并对维甲酸的治疗产生耐药<sup>[6]</sup>。因此, 进一步探明APL的分子发生机制, 由此探寻特异性的药物干预环节和关键性诊疗靶点, 开辟分子诊断与靶向治疗的新途径或新方法显得十分必要而迫切。目前, 我国对APL的研究主要停留在PML-RAR $\alpha$ 融合基因或蛋白的检测、维A酸和砷剂对细胞凋亡与分化现象的观察以及对PML-RAR $\alpha$ 融合基因的影响等重复层面<sup>[7-8]</sup>, 对APL的早期诊断和治疗并未见明显改善。令人兴奋的是, Lane等<sup>[3]</sup>发现, PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白可以被中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)切割成约53 kDa和61 kDa大小的两种变异蛋白, 即NLS缺失的PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白与NLS-RAR $\alpha$ 蛋白, 并证明NE的这一切割作用对APL的发生发展起了很重要的作用。

我们在前期试验中分别构建了PML与PML(NLS<sup>-</sup>)、RAR $\alpha$ 与NLS-RAR $\alpha$ 的真核表达, 并通过细胞转染与间接免疫荧光标记技术进行细胞内定位研究, 结果发现, 两者的细胞定位确实发生了显著改变, 原来位于胞浆的RAR $\alpha$ 因为带上了NLS全部转移到了胞核中, 而原本位于胞核的PML因缺失NLS转移到了胞浆中。NB4细胞具有典型的t(15;17)(15q22;17q21)染色体易位及PML-RAR $\alpha$ 融合基因特征, 被广泛用于APL研究的细胞模型。而K562属人慢性髓原白血病细胞株, 没有PML-RAR $\alpha$ 融合基因, 可以作为对照组细胞。本研究运用质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞, 然后采用Western blot、免疫荧光、激光共聚焦和免疫组化四种方法检测融合蛋白的切割产物PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白, 证实其存在于NB4-HA-NE细胞中, 并定位在胞浆。同时我们后期也用个例临床初诊APL病人标本证明了PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白确实存在于APL病人中性粒细胞的胞浆中。研究表明, 人体野生型的PML蛋白主要是促进肿瘤细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[9-12]</sup>。干扰PML(NLS<sup>-</sup>)的表达, 可减弱HL-60细胞的增殖能力并促进细胞的凋亡<sup>[13]</sup>, 提示这个切割产物可以促进APL的发展。因此, 我们设想可以将PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白作为早期诊断和治疗APL的新的靶标, 改变现在诊疗中存在的问题。

综上, 本研究验证了质粒pCMV-HA-NE电转染NB4细胞的胞浆中含有PML(NLS<sup>-</sup>)蛋白, 该项发现为临床早期诊断和治疗APL提供了新的思路和方法, 也为研究APL机制提供了新的途径。后期我们会加大临床标本量去进一步证明该结果。

## 参考文献 (References)

- 1 Mohamed M, Dun K, Grabek J. Atypical features in a patient with acute promyelocytic leukaemia: A potential diagnostic pitfall. *BMJ Case Rep* 2013; doi:10.1136/bcr-2013-200152.
- 2 Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase is important for PML-Retinoic acid receptor  $\alpha$  activities in early myeloid cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(1): 23-33.
- 3 Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase cleaves PML-RAR $\alpha$  and is important for the development of acute promyelocytic leukemia in mice. *Cell* 2003; 115(3): 305-18.
- 4 Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZRV, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR $\alpha$  oncoprotein by directly binding PML. *Science* 2010; 328(5975): 240-3.
- 5 Xin L, Wan-jun S, Zeng-jun L, Yao-zhong Z, Yun-tao L, Yan L, et al. A survival study and prognostic factors analysis on acute promyelocytic leukemia at a single center. *Leuk Res* 2007; 31(6): 765-71.
- 6 Laurenzana A, Pettersson F, Miller Jr W H. Role of PML/RAR $\alpha$  in the pathogenesis of APL. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2007; 3(4): 499-505.
- 7 Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, de Thé H. Curing APL through PML/RAR $\alpha$  degradation by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Trends Mol Med* 2012; 18(1): 36-42.
- 8 主鸿鹤, 秦亚溱, 赖悦云, 石红霞, 刘艳荣, 江滨, 等. 维甲酸和砷剂联合诱导急性早幼粒细胞白血病中PML-RAR $\alpha$ 表达上调不影响预后. *中国实验血液学杂志*(Zhu Honghu, Qin Yazhen, Lai Yueyun, Shi Hongxia, Liu Yanrong, Jiang Bin, et al. Expression of PML-RAR $\alpha$  is up-regulated during ATRA and arsenics combined induction without influence on long-term prognosis of acute promyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Hematology*) 2013; 21(4): 872-8.
- 9 Mu ZM, Chin KV, Liu JH, Lozano G, Chang KS. PML a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 1994; 14(10): 6858-67.
- 10 Ahn MJ, Langenfeld J, Moasser MM, Rusch V, Dmitrovsky E. Growth suppression of transformed human bronchial epithelial cells by all-trans-retinoic acid occurs through specific retinoid receptors. *Oncogene* 1995; 11(11): 2357-64.
- 11 Koken MH, Linares-Cruz G, Quignon F, Viron A, Chelbi-Alix MK, Sobczak-Thopot J, et al. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 1995; 10(7): 1315-24.
- 12 Le XF, Yang P, Chang KS. Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J Biol Chem* 1996; 271(1): 130-5.
- 13 Gao YM, Zhong L, Zhang X, Hu XX, Liu BZ. PML(NLS(-)) inhibits cell apoptosis and promotes proliferation in HL-60 cells. *Int J Med Sci* 2013; 10(5): 498-507.