

Twist-1 通过 *MPL* 促进髓系白血病细胞增殖和耐药

马艳萍, 王楠, 郭丹, 赵杨杨, 刘晓燕, 尹静, 任倩, 林永敏, 马小彤(中国医学科学院血液病医院 血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] **目的:**检测 *Twist-1* 与骨髓增生性白血病病毒癌基因(myeloproliferative leukemia virus oncogene, *MPL*) 在髓系白血病患者和髓系造血系统恶性肿瘤细胞系中表达的相关性, 并探讨 *Twist-1* 是否通过 *MPL* 对髓系白血病细胞增殖、耐药发挥促进作用。**方法:**选取中国医学科学院血液病医院 2005 年 1 月至 2008 年 12 月初次诊断为急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者的骨髓标本 41 例(其中 AML 23 例、CML 18 例), 用 Real-time PCR 检测 AML、CML 患者以及髓系造血系统恶性肿瘤细胞系中 *Twist-1* 和 *MPL* mRNA 的表达情况, 并分析其相关性。构建 *MPL* 过表达载体, 制备慢病毒并感染髓系白血病细胞系 K562、U937, 通过细胞计数实验、集落形成实验以及药物敏感实验评价其对白血病细胞增殖、集落形成能力以及耐药的影响, 并进一步确定 *Twist-1* 是否通过 *MPL* 发挥白血病促进作用。**结果:**在 U937 和 K562 细胞中过表达 *Twist-1* 明显增加 *MPL* 蛋白水平($P < 0.05$), 敲降 *Twist-1* 后 *MPL* mRNA 的表达水平明显下降($P < 0.01$); AML、CML 患者骨髓单核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMCs)中 *Twist-1* mRNA 表达与 *MPL* mRNA 表达水平呈显著正相关($P < 0.05$)。过表达 *MPL* 使 K562 和 U937 细胞对化疗药物柔红霉素及伊马替尼的敏感性显著降低($P < 0.01$), 且提高 K562-*MPL*、U937-*MPL* 的细胞增殖、集落形成数目(均 $P < 0.01$); 干扰 *Twist-1* 并过表达 *MPL* 显著降低髓系白血病细胞增殖和集落形成(均 $P < 0.01$)。**结论:***Twist-1* 通过 *MPL* 促进 AML、CML 白血病细胞的增殖、存活和耐药。

[关键词] *Twist-1* 基因; *MPL* 基因; 髓系白血病; 细胞增殖; 细胞存活

[中图分类号] R733.7; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)06-0588-07

Twist-1 promotes proliferation and drug resistance of myeloid leukemic cells via *MPL*

MA Yanping, WANG Nan, GUO Dan, ZHAO Yangyang, LIU Xiaoyan, YIN Jing, REN Qian, LIN Yongmin, MA Xiaotong (State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between myeloproliferative leukemia virus oncogene (*MPL*) and *Twist-1* in patients with acute myeloid leukemia (AML) and chronic myeloid leukemia (CML), and to explore whether *MPL* contributes to *Twist-1*-mediated cell proliferation and drug resistance of leukemia cells. **Methods:** Bone marrow specimens from 41 patients, who were first diagnosed as AML or CML in Hospital of Blood Diseases Affiliated to Chinese Academy of Medical Sciences between January 2005 and December 2008 (23 cases of AML, 18 cases of CML), were selected in this study. Expressions of *Twist-1* mRNA and *MPL* mRNA in hematopoietic tumor cell lines and bone marrow mononuclear cells (BMMCs) of patients with AML or CML were detected by Real-time PCR, and their correlation was analyzed. Lentiviral vector over-expressing *MPL* (pCDH1-*MPL*) were constructed and transduced into myeloid leukemia cell

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81670158, No. 81470278, No. 81600138);天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目(青年项目)(No. 15JCQNJC10300);协和青年科研基金滚动资助项目(No. 33320140066)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81670158, No. 81470278, No. 81600138), the Youth Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin (No. 15JCQNJC10300), and the Science-Technology Foundation for Young Scientists of Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College(No. 33320140066)

[作者简介] 马艳萍(1990-),女,硕士生,主要从事白血病发生机制的研究,E-mail:1172327847@qq.com

[通信作者] 马小彤(MA Xiaotong, corresponding author),博士,教授,主要从事白血病发生机制的研究,E-mail: ma_xt@aliyun.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170603.1027.010.html>

lines K562 and U937. Effect of *MPL* on proliferation, colony formation and drug sensitivity of the leukemic cells were evaluated by cell counting, colony formation assay and MTT assay; in addition, whether *Twist-1* promote the proliferation of leukemia cells via *MPL* was further confirmed. **Results:** Over-expression of *Twist-1* significantly increased the protein expressions of *MPL* in U937 and K562 cell lines ($P < 0.05$) while knock-down of *Twist-1* significantly decreased the expression of *MPL* ($P < 0.01$). The mRNA expressions of *Twist-1* and *MPL* showed a significant positive correlation in BMMCs of patients with AML and CML ($P < 0.05$). Over-expression of *MPL* significantly reduced the drug sensitivity of K562 and U937 cells to daunorubicin and Imatinib ($P < 0.01$). Enforced expression of *MPL* in U937 and K562 cells promoted the cell growth and colony formation (all $P < 0.01$); *Twist-1* knockdown with *MPL* over-expression significantly impaired cell growth and colony formation of leukemia cells (all $P < 0.01$). **Conclusion:** *Twist-1* promoted proliferation, survival and chemotherapy resistance in the leukemia cells of AML and CML via *MPL*.

[**Key words**] *Twist-1*; *MPL*; myeloid leukemia; cell proliferation; cell survival

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(6): 588-594. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.003]

Twist-1 基因是碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族成员,在生物进化过程中高度保守^[1-2]。*Twist-1* 表达在一些中胚层来源的组织和器官中,并与其发育及前体细胞的成熟分化密切相关^[3-6]。有研究^[7-9]显示,*Twist-1* 在很多实体瘤的发生发展过程中发挥作用,能抑制化疗药物导致的肿瘤细胞凋亡和衰老,并促进肿瘤的上皮间充质转换和浸润侵袭。但是,*Twist-1* 在造血系统恶性肿瘤中的作用报道尚少。有研究^[10]证实,*Twist-1* 在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者骨髓单个核细胞及髓系白血病细胞系中高表达并促进白血病细胞增殖、集落形成以及耐药,从而抑制细胞凋亡,但其促进白血病发生发展的机制尚不明确。有文献^[11-13]报道,骨髓增生性白血病病毒癌基因(myeloproliferative leukemia virus oncogene, *MPL*; 又名 thrombopoietin receptor, 促血小板生成素受体)在髓系白血病患者中高表达,并与患者预后不良相关。为了探明介导 *Twist-1* 促白血病作用的下游分子机制,笔者在白血病细胞系 U937 中过表达 *Twist-1*,进行微阵列基因芯片分析下游变化基因,发现 *MPL* 表达显著升高。为明确 *Twist-1* 是否通过 *MPL* 发挥髓系白血病促进作用,本课题首先检测白血病患者中 *Twist-1* 与 *MPL* 表达的相关性,并进一步构建 *MPL* 过表达载体,感染髓系白血病细胞系,观察其对白血病细胞增殖、集落形成、耐药等生物学功能的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取中国医学科学院血液病医院 2005 年 1 月至 2008 年 12 月初次诊断为 AML、CML 患者的骨髓标本 41 例,其中 AML 23 例、CML 18 例,所有患者

均经 MICM (morphology; immunology, cytogenetics, molecular biology)分型综合确诊,诊断标准参照《血液病诊断及疗效标准》^[13]。入选患者男性 24 例、女性 17 例,年龄 19 ~ 74 岁,中位年龄 39 岁。

1.2 细胞系及主要试剂

造血系统恶性肿瘤细胞系 K562、U937、CEM 以及 HEK 293T 细胞系均由本实验室保存。过表达慢病毒载体 pCDH1、包装质粒 pPACKH1-GAG、pPACKH1-REV 及 pVSV-G 购于 SBI 公司,shRNA 特异慢病毒载体 pLL3.7、包装质粒 pMDL、RSV-Rev 购于 Addgene 公司;抗人 *MPL*-PE 抗体购于 Miltenyi Biotec 公司,SYBR green 法 Real-time PCR 试剂盒、*EcoR* I、*Not* I、*Xho* I 和 *Hpa* I 限制性内切酶以及相关缓冲液购于日本 TaKaRa 公司,胎牛血清、TRIzol 试剂、RPMI 1640 和 DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品,所有引物由华大基因公司合成。化疗药物柔红霉素(daunorubicin, DNR)、伊马替尼(imatinib)购于美国 Sigma 公司。

1.3 细胞培养

造血系统恶性肿瘤细胞系中 K562 为慢性髓系白血病细胞系,U937 为急性髓系白血病细胞系,KG1-a 为髓系白血病细胞系,CEM 为淋系白血病细胞系。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640(HEK 293T 细胞为 DMEM)培养,置于 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的条件下,取对数生长期细胞进行检测。

1.4 过表达 pCDH1 构建过表达 *MPL* 重组慢病毒载体

据人 *MPL* 基因编码序列(coding sequence, CDS)序列设计 PCR 引物,具体序列见表 1。以 CEM 细胞 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因,1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收 PCR 产物。以 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切 PCR 回收产物和 pCDH1 载体,两者连接,构建过表达 *MPL* 重组慢病毒载体 pCDH1-*MPL*。

1.5 慢病毒制备和感染

将载体质粒与辅助质粒通过脂质体法共转染 HEK 293T 细胞,包装慢病毒。48、72 h 后收集病毒上清并浓缩。有限稀释法测定病毒滴度, -80 °C 保存备用。

表 1 PCR 引物的寡核苷酸序列
Tab. 1 Oligonucleotide sequences for PCR

Gene	Oligonucleotide sequence(5'-3')
MPL	F CTAGTCTAGAGCCACCATGCCCTCCTGGGCCCTC
	R CCGGAATTCTCAAGGCTGCTGCCAATAGC
Twist-1 ^a	F GTCCGCAGTCTTACGAGGAG
	R TGGAGGACCTGCTAGAGGAA
GAPDH ^a	F GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	R GAAGATGCTGATGGGATTTTC
MPL ^a	F TTTCTCCCGAACATTTGAGG
	R GTGCAGCGGAAAGAAGAGAC
CDKN2D ^a	F GTGCATCCCGACGCCCTCAAC
	R TGGCACCTTGCTTCAGCAGCTC
BCL-2 ^a	F TGAACCGGCATCTGCACAC
	R CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG
YB-1 ^a	F AAGTGATGGAGGCTGCTGAC
	R TTCTTCATTGCCGTCCTCTC
BMI-1 ^a	F GTATTCCCTCCACCTTCTTCTG
	R TGCTGATGACCCATTTACTGAT
NUMB ^a	F CTTTTACAAGAGAAGGATCATT
	R CAACGACTATCTTATCTGTTTCAG
SMAD3 ^a	F TGGACGCAGGTTCTCCAAAC
	R CCGGCTCGCAGTAGGTAAC
JMJD1C ^a	F CGACGCAGGTCCTCGTCCAA
	R TGGGCACGTGATAATGGCTGTG
AKT2 ^a	F ACAGCAAAGCAGGAGTATAAG
	R AAAGAGCAGGAACTACCAAT
TRIB3 ^a	F TGCCCTACAGGCACTGAGTA
	R GTCCGAGTGAAAAAGCGCTA

F: Forward primer; R: Reverse primer; a: Primers for Real-time PCR

1.5.1 MPL 过表达慢病毒的制备和感染 将 MPL 过表达病毒(pCDH1- MPL)感染 K562、U937 细胞,

同时以空载体病毒(pCDH1-vector)感染相同细胞作为对照。感染 48 h 后流式细胞仪分选蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein, BFP)阳性的细胞, BFP⁺ 细胞阳性率即为感染效率。

1.5.2 干扰 Twist-1 并过表达 MPL 慢病毒制备和感染 用已构建的含有 Twist-1 基因特异性干扰序列的 pLL3.7-shTwist-1(A、B)^[10] 感染 K562、U937 细胞,同时以含有随机对照序列的 pLL3.7-shScr(A、B)^[10] 感染相同细胞作为对照。感染 48 h 后流式细胞仪分选 GFP⁺ 细胞。将 MPL 过表达病毒(pCDH1-MPL)感染 GFP⁺ K562、U937 细胞,同时以空载体病毒(pCDH1-vector)感染相同细胞作为对照。感染 48 h 后流式细胞仪分选 GFP⁺ BFP⁺ 细胞,细胞阳性率即为感染效率。

1.6 Real-time PCR 检测干扰 Twist-1 对白血病细胞内 Twist-1 下游基因表达的影响

收集 GFP⁺ K562、U937 细胞,利用 TRIzol 试剂提取 RNA,测定 RNA 浓度,并反转录合成 cDNA,以 GAPDH 作为内参,Real-time PCR 检测各 Twist-1 下游各基因的表达(表 1),按 SYBR green 法 Real-time PCR 试剂盒说明书操作,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算均值作为相对表达量。

1.7 流式细胞术检测过表达 Twist-1 对白血病细胞内 MPL 蛋白表达的影响

将 Twist-1 过表达病毒(pCDH1-Twist-1)感染 K562、U937 细胞,同时以空载体病毒(pCDH1-vector)感染相同细胞作为对照。感染后 72 h 用抗人 MPL-PE 抗体标记,流式细胞仪分析 GFP⁺ K562 和 GFP⁺ U937 细胞中 MPL 蛋白的表达。

1.8 Real-time PCR 检测 Twist-1、MPL 在 AML、CML 患者中的表达

收集 AML、CML 白血病患者骨髓单个核细胞,利用 TRIzol 试剂提取 RNA,测定 RNA 浓度,并反转录合成 cDNA,以 GAPDH 作为内参,Real-time PCR 检测 Twist-1、MPL 基因的表达(具体序列见表 1)。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算均值作为相对表达量,分析 Twist-1、MPL 基因表达之间的相关性。

1.9 观察 MPL 表达对肿瘤细胞增殖能力的影响

将病毒感染后的 K562 细胞(1 × 10⁴/ml)、U937 细胞(1 × 10⁵/ml)接种于 96 孔板中,每孔 100 μl,各设 3 个复孔,每天计数孔内细胞,共 9 d,取 3 孔的均值绘制生长曲线。

1.10 观察 MPL 表达对肿瘤细胞集落形成能力的影响

将病毒感染后的 K562 细胞(2 × 10³/ml)、U937

细胞($5 \times 10^3/\text{ml}$)加入集落培养体系,接种于平底96孔板中培养14 d。大于50个细胞的细胞丛为一个集落,计数各孔的集落数。

1.11 MTT 法检测 *MPL* 表达对肿瘤细胞药物敏感性的影响

将病毒感染后的 K562 细胞($2 \times 10^5/\text{ml}$)、U937 细胞($4 \times 10^5/\text{ml}$)接种于96孔板中,每孔100 μl ,各设3个复孔,培养24 h后加入含有不同浓度化疗药物(柔红霉素、伊马替尼)的新鲜培养基,分别检测培养24、48、72 h后570 nm 波长处的光密度(*D*)值,Graphpad prism 计算50%抑制浓度(IC_{50})。

1.12 微阵列基因芯片分析

收集 *Twist-1* 过表达病毒(pCDH1-*Twist-1*)和空载体病毒(pCDH1-vector)感染后的 U937 细胞,利用美国昂飞公司人转录组基因表达芯片2.0(Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array 2.0, HTA2.0)进行微阵列分析。基因芯片数据收录于GEO(Gene Expression Omnibus)数据库中,编号为GSE68362,以表达变化至少为1.2倍定义差异表达的基因。

1.13 统计学处理

应用SPSS 22.0软件分析,正态计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用*t*检验,非正态分布计量资料以中位数(全距)表示,两组间比较采用两独立样本比较的秩和检验(Mann-Whitney, *U*检验),相关分析采用双变量相关性分析(Spearman 相关)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 *Twist-1* 明显提高白血病细胞 *MPL* 蛋白水平

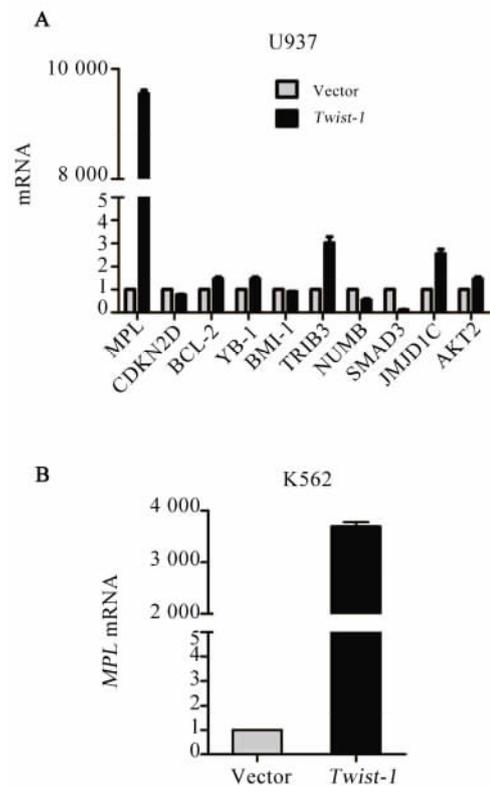
微阵列芯片分析结果显示,*Twist-1* 过表达病毒(pCDH1-*Twist-1*)感染 U937 细胞后,376个基因显著上调,547个基因显著下调。从中选择了部分对细胞生长和耐药有重要调控作用的基因,进行 Real-time PCR 验证,结果(图1A、B)显示,*Twist-1* 过表达组 *MPL* mRNA 的表达水平较对照组显著增加(均 $P < 0.01$)。

将 *Twist-1* 过表达病毒(pCDH1-*Twist-1*)感染 K562、U937 细胞,流式细胞仪检测结果显示,U937 过表达 *Twist-1* 后 *MPL* 蛋白水平增加了($43.8 \pm 4.1\%$)($P < 0.05$),K562 过表达 *Twist-1* 后 *MPL* 蛋白水平增加了($30.5 \pm 3.2\%$)($P < 0.05$)。在 U937 和 K562 细胞中敲降 *Twist-1*, Real-time PCR 检测结果显示,*MPL* mRNA 的表达水平分别下降了6.17倍

和14.3倍(均 $P < 0.01$)。

2.2 *Twist-1* mRNA 表达与 *MPL* mRNA 表达水平呈正相关

通过 Real-time PCR 检测 AML、CML 患者骨髓单个核细胞样本中 *Twist-1* 及 *MPL* mRNA 表达水平,分析两者间的相关性,结果(图2A、B)显示,*Twist-1* mRNA 表达与 *MPL* mRNA 表达水平呈显著正相关。



A: U937 cells; B: K562 cells

图1 *Twist-1* 过表达的 U937、K562 细胞中 *MPL* mRNA 表达水平升高

Fig.1 *Twist-1* over-expression promoted expression of *MPL* mRNA in K562 and U937 cells

2.3 过表达 *MPL* 对髓系白血病细胞的影响

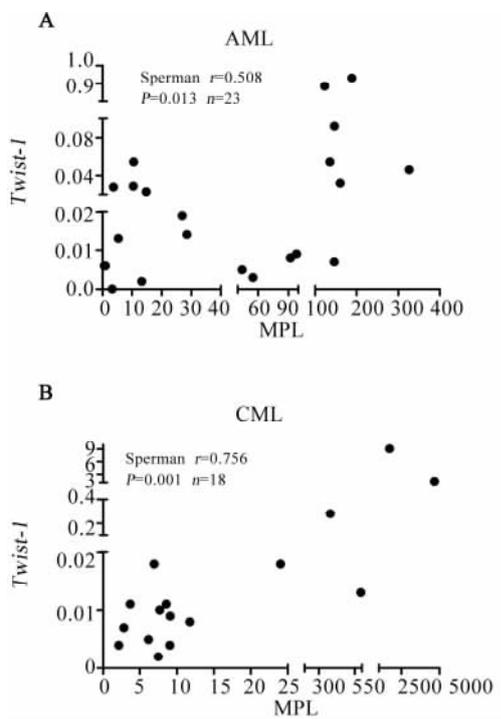
2.3.1 成功构建 *MPL* 过表达的髓系白血病细胞

构建 *MPL* 过表达慢病毒载体,感染 K562、U937 细胞的感染效率为: K562-*MPL*($89.77 \pm 3.78\%$), K562-Vector($89.16 \pm 2.12\%$), U937-*MPL*($70.34 \pm 4.19\%$), U937-Vector($72.43 \pm 3.08\%$)。Real-time PCR 检测 *MPL* mRNA 表达结果显示,K562、U937 细胞过表达组(*MPL*)较对照组(Vector)*MPL* mRNA 相对表达水平上升227倍。

2.3.2 过表达 *MPL* 促进 K562-*MPL*、U937-*MPL* 细

胞的增殖、集落形成 在 K562 和 U937 细胞中过表达 *MPL*, 观察发现(图 3), *K562-MPL*、*U937-MPL* 的细胞增殖水平、集落形成数目均显著高于感染空载体的对照组 ($P < 0.01$)。

殖的抑制及集落形成能力降低的影响(图 5A、B、C)。



A: The scatter plots represent the correlation of the *Twist-1* and *MPL* at mRNA level in AML saMPLes;
B: The scatter plots represent the correlation of the *Twist-1* and *MPL* at mRNA level in CML saMPLes

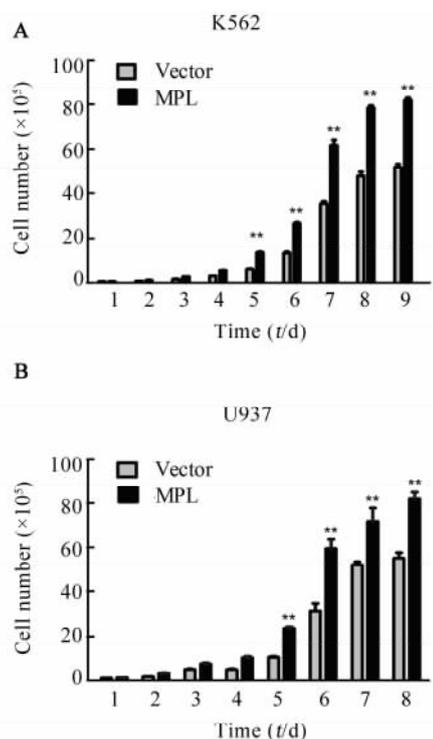
图 2 *Twist-1* 与 *MPL* mRNA 在髓系白血病患者骨髓单个核细胞中的表达呈正相关

Fig. 2 Positive correlation between *Twist-1* and *MPL* mRNA level in BMNCs of patients with myeloid leukemia

2.3.3 过表达 *MPL* 降低 K562 及 U937 细胞对药物的敏感性 检测细胞对药物敏感性结果(图 4)显示,过表达 *MPL* 使 K562 细胞对化疗药物伊马替尼的敏感性显著降低 (IC_{50} : 0.127 vs 0.348 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$),使 U937 细胞对化疗药物柔红霉素的敏感性也显著降低 (IC_{50} : 0.373 vs 1.450 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$)。

2.4 干扰 *Twist-1* 并过表达 *MPL* 显著降低髓系白血病细胞增殖和集落形成

Twist-1 敲降后显著降低了 K562 和 U937 细胞所形成集落的数目(图 5A, $P < 0.01$),也显著抑制了 K562 和 U937 细胞的增殖(图 5B、C, $P < 0.01$);但在干扰 *Twist-1* 的同时过表达 *MPL*,可部分挽救由 *Twist-1* 表达降低所导致的对 K562 和 U937 细胞增



** $P < 0.01$ vs Vector group

A: K562 cells; B: U937 cells

图 3 过表达 *MPL* 促进 K562 及 U937 细胞增殖
Fig. 3 *MPL* over-expression promoted proliferation of K562 and U937 cells

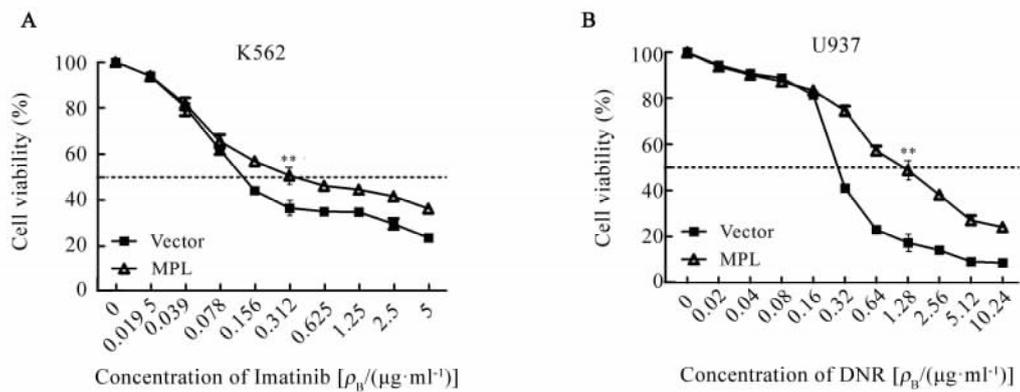
3 讨论

白血病是一类造血干细胞克隆性疾病,克隆性白血病细胞因为增殖失控、分化障碍、凋亡受阻等机制在骨髓和其他造血组织中大量增殖累积,同时抑制正常造血功能。其中,AML 是临床表现和预后均具有较大异质性的恶性克隆性肿瘤^[14-16],CML 是一种存在 BCR-ABL 基因重排的造血干细胞疾病^[17]。近年研究^[18-19]证明,许多基因及分子的改变,如基因表达的变化、基因突变等在髓系白血病的诊断和危险分层中发挥重要作用,但除个别类型白血病的发生机制及相关治疗手段取得显著进展外,大多数类型白血病患者仍会复发并最终导致死亡。因此,进一步寻找新的调控白血病发生发展的基因,对于阐明白血病的发生机制,开发有效治疗新靶点仍具有重要意义^[20-23]。

本实验室在前期工作中验证^[10]了 *Twist-1* 高表

达于 AML、CML 患者骨髓单个核细胞,通过白血病细胞系 U937、K562 中过表达及敲降实验,证实 *Twist-1* 的高表达会促进白血病细胞的增殖耐药。但 *Twist-1* 促进白血病发生发展的作用机制尚未阐明。本研究发现,*Twist-1* 与 *MPL* 在 AML、CML 患者骨髓单个核细胞及髓系白血病细胞系中均有高表达,且两者的表达呈明显正相关性,在白血病细胞系中过表达及敲降 *Twist-1*,*MPL* 的表达均发生相应改变。提示 *Twist-1* 可能与 *MPL* 密切相关。虽然有文献^[11-12]报道 *MPL* 在髓系白血病患者中高表达,并

与患者预后不良相关,但其对白血病细胞增殖、耐药等生物学功能的影响报道尚少。为了探讨 *Twist-1* 是否通过 *MPL* 发挥作用,本研究首先构建 *MPL* 过表达载体,感染髓系白血病细胞系,观察 *MPL* 对白血病细胞增殖、集落形成、耐药等生物学功能的影响,发现与牟雅堃等^[10]报道的 *Twist-1* 的作用相一致,能促进白血病细胞生长、集落形成以及耐药。在干扰 *Twist-1* 的同时过表达 *MPL* 可部分挽救由 *Twist-1* 表达降低所导致的对 K562 和 U937 细胞增殖以及集落形成能力的抑制。

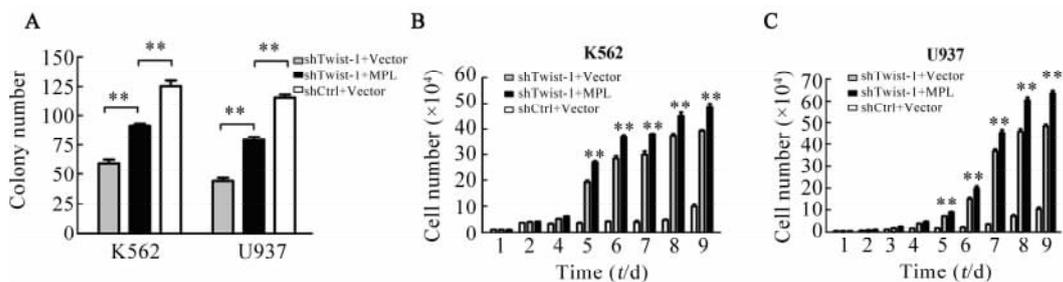


** $P < 0.01$ vs Vector group

A: K562 cells; B: U937 cells

图 4 过表达 *MPL* 降低 K562 及 U937 细胞对药物的敏感性

Fig. 4 Over-expression of *MPL* reduced the drug sensitivity of K562 and U937 cells



** $P < 0.01$ vs shTwist-1 + vector or shCtrl + vector

A-C: Control or shTwist-1 transfected K562 and U937 cells were further transduced with retrovirus vectors expressing *MPL*-BFP or vector-BFP. Colony formation (A) and cell proliferation (B,C) were determined by colony-forming assay and cell counting assay, respectively

图 5 *Twist-1* 通过 *MPL* 促进 K562 和 U937 细胞集落形成和细胞增殖

Fig. 5 *Twist-1* promoted colony formation and cell proliferation of K562 and U937 cells by *MPL*

总之,本研究发现 *Twist-1* 与 *MPL* 在 AML、CML 患者白血病细胞和髓系造血系统恶性肿瘤细胞系中的表达呈明显正相关性,*MPL* 具有促进白血病细胞增殖、耐药的作用,并证实 *Twist-1* 部分通过 *MPL* 促

进 AML、CML 白血病细胞的增殖、存活。本研究阐明了 *Twist-1* 在髓系白血病发生发展中作用的下游分子机制,为深入了解白血病的发病机制提供了新线索。

[参 考 文 献]

[1] THISSE B, MESSAL M, PERRIN-SCHMITT F. The twist gene: isolation of a drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern[J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15 (8): 3439-3453. DOI : 10.1093/nar/15.8.3439.

[2] MASSARI M E, MURRE C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 429-440. DOI : 10.1128/mcb.20.2.429-440.2000.

[3] QIN Q, XU Y, HE T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist-1 and underlying molecular mechanisms[J]. *Cell Res*, 2012,22(1): 90-106. DOI : 10.1038/cr.2011.144.

[4] BATE M, RUSHTON E, CURRIE D A. Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in drosophila[J]. *Development*, 1991,113(1):79-89.

[5] CURRIE D A, BATE M. The development of adult abdominal muscles in drosophila : myoblasts express twist and are associated with nerves[J]. *Development*, 1991, 113(1): 91-102.

[6] MURRAY S S, GLACKIN C A, WINTERS K A, et al. Expression of helix-loop-helix regulatory genes during differentiation of mouse osteoblastic cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1992,7(10): 1131-1138. DOI : 10.1002/jbmr.5650071004.

[7] BECK B, LAPOUGE G, RORIVE S, et al. Different levels of Twist-1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression [J]. *Stem Cell*, 2015, 16(1): 67-79. DOI : 10.1016/j.stem.2014.12.002.

[8] LIANG Y, HU J, LI J, et al. Epigenetic activation of Twist-1 by MTDH promotes cancer stem-like cell traits in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17): 3672-3680. DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-15-0930.

[9] BURNS T F, DOBROMILSKAYA I, MURPHY S C, et al. Inhibition of Twist-1 leads to activation of oncogene-induced senescence in oncogene-driven non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(4): 329-338. DOI : 10.1158/1541-7786.mcr-12-0456.

[10] 牟雅堃, 王楠, 赵杨杨, 等. Twist-1 在髓系白血病细胞中的表达及作用研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(2): 168-174. DOI : 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.003.

[11] SCHRODER J K, KOLKENBROCK S, TINS J, et al. Analysis of thrombopoietin receptor (c-MPL) mRNA expression in de novo acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2000, 24(5): 401-409. DOI: 10.1016/S0145-2126(99)00201-5.

[12] DONG-FENG Z, TING L, YONG Z, et al. The TPO/c-MPL path-

way in the bone marrow may protect leukemia cells from chemotherapy in AML patients[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 20(2): 309-317. DOI: 10.1007/s12253-013-9696-z.

[13] 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: 103-138.

[14] LOWENBERG B, DOWNING J R, BURNETT A. Acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(14): 1051-1062. DOI: 10.1056/NEJM199909303411407.

[15] PASQUALUCCI L, LISO A, MARTELLI M P, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification[J]. *Blood*, 2006, 108(13): 4146-4155. DOI : 10.1182/blood-2006-06-026716.

[16] 姚超, 钱程. CAR-T 细胞在肿瘤治疗中的机遇与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(1): 6-11. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.003.

[17] DOHNER H, ESTEY EH, AMADORI S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults; recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net[J]. *Blood*, 2010, 115(3):453-474. DOI : 10.1182/blood-2009-07-235358.

[18] SAWYERS C L. Chronic myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (17): 1330-1340. DOI : 10.1056/NEJM199904293401706.

[19] 丁利娟, 黄河. CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发急性淋巴细胞白血病的进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2017,24(1): 12-17. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.004.

[20] JOSEPHINE M E. Targeting stem cells in chronic myeloid leukemia with a PPAR-γ agonist[J]. *N Engl J Med*, 2015,373(20): 1973-1975. DOI: 10.1056/NEJMcibr1511276.

[21] 童春容. 第二代 CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发急性 B 淋巴细胞白血病的经验及问题[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(1):18-21. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.005.

[22] RADICH J. Structure, function, and resistance in chronic myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(3):305-306. DOI : 10.1016/j.ccr.2014.08.010.

[23] LEYUAN M, YI S, ROBERT B, et al. A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(252): 4531-4536. DOI : 10.1126/scitranslmed.3009073.

[收稿日期] 2017 -01 -30 [修回日期] 2017 -04 -20
 [本文编辑] 王映红

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 封二
 上海厦泰生物科技有限公司 封三
 索尼(中国)有限公司生命科学业务部 封四
 上海细胞治疗工程技术研究中心集团 后插页