

下调 ATM/hnRNPK 信号降低髓系白血病细胞阿霉素耐药

张进芳*, 钟明艳, 杨泉, 冯贝, 李兴东

南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)儿童血液科, 广东广州 510080

摘要:目的 探索共济失调毛细血管扩张突变蛋白(ATM)/核内不均一的核糖核蛋白K(hnRNPK)信号在调控细胞自噬参与髓系白血病细胞阿霉素耐药中的作用机制。方法 用Western blot法检测ATM在阿霉素敏感和耐药细胞株中的表达水平差异。ATM抑制剂及RNA干扰技术抑制ATM在耐药株中的表达水平。在ATM表达调变前后,使用CCK8法检测耐药细胞株对阿霉素药物敏感性,以及使用Western blot法检测人微管相关蛋白轻链3 I/II(LC3 I/II)及hnRNPK的表达水平。结果 ATM在阿霉素耐药细胞株中的表达水平较敏感株明显增高,ATM抑制剂及RNA干扰法降低ATM的表达水平后,耐药株对阿霉素的敏感性可以恢复,且自噬蛋白LC3 II及hnRNPK的表达与ATM的表达变化一致。结论 ATM/hnRNPK信号异常调控细胞自噬参与髓系白血病细胞阿霉素耐药。

关键词: ATM/hnRNPK; 细胞自噬; 白血病; 阿霉素; 耐药

中图分类号: R733.71 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.12.1638

Down-regulation of ATM/hnRNPK signaling reduces adriamycin resistance of myeloid leukemia

ZHANG Jinfang*, ZHONG Mingyan, YANG Quan, FENG Bei, LI Xingdong

Department of Paediatric Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences,
Southern Medical University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To explore the role of ATM/hnRNPK signaling in the adriamycin resistance of acute myeloid leukemia. **Methods** Expression of ATM was examined in the adriamycin resistant and sensitive leukemia cell strains with Western blot. ATM expression was down-regulated by RNAi and ATM inhibitor in the adriamycin resistant cell strains. Expression level of hnRNPK and LC3 I/II was detected by Western blot and adriamycin sensitivity was measured by CCK8 assay before and after modulation of ATM expression. **Results** ATM was overexpressed in adriamycin resistant leukemia cell strains. The decreased expression of ATM restored the sensitivity to adriamycin. Expression level of LC3 II and hnRNPK was consistent with the modulation of ATM expression. **Conclusions** The ATM/hnRNPK signaling pathway may play a role in the occurrence of adriamycin resistance in acute myeloid leukemia by regulating autophagy.

Key words: ATM/hnRNPK; autophagy; leukemia; adriamycin; drug resistance

儿童急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的治疗仍以化疗为主, 蒽环类药物依然具有重要地位, 化疗药物耐药是影响急性髓系白血病临床疗效和预后的关键因素, 而细胞自噬是调控白血病细胞耐药的重要机制^[1]。课题组既往的研究结果发现, 髓系白血病阿霉素 (adriamycin, ADM) 耐药与不均一的核糖核蛋白 K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNPK) 的过表达及细胞自噬水平升高相关^[2-3], 文献及生物信息学挖掘发现共济失调毛细血管扩张突变蛋白 (ataxia-telangiectasia mutated, ATM) 可能是调控 hnRNPK 的上游分子^[4-5], 因此推测, ATM/hnRNPK 信号可能在调控细胞自噬及形成白血病细胞阿霉素耐药机制中发挥作用。在耐药的髓系白血病细胞中 ATM/hnRNPK 信号高表达, 调控细胞自噬为优势状态, 使白血病细胞可以通过自我更新抵抗化疗药物杀伤作用形成耐药表型。本文拟从细胞株中观察 ATM 的表达水平变化与细胞自噬及白血病细胞阿霉素耐药的关系, 调变 ATM 的表达后检测 hnRNPK 的表达变化以明确 ATM/hnRNPK 的上下游关系, 并进一步观察 ATM/hnRNPK 信号的表达变化对自噬及白血病细胞阿霉素耐药的逆转程度。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

野生型人早幼粒白血病细胞系 HL60, 阿霉素耐药的 HL60 细胞株 HL60/ADM, 野生型人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 和阿霉素耐药的 K562 细胞株 K562/ADM (均为广东省人民医院儿科培养); CCK8 试剂 (碧云天生物技术公司); 兔抗人 ATM、hnRNPK、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain, LC3) I/II、甘油醛 3 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 及辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗抗体 (Cell Signaling 公司); 转染试剂 X-treme GENE siRNA (罗氏公司); 自噬抑制剂 3 甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA)、巴弗洛霉素 A1 (bafilomycin A1, Baf-A1) 以及 ATM 抑制剂 KU-55933 (Abcam 公司); RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司); RNA 提取试剂 TRIzol、反转录 PrimeScript RT reagent Kit、PCR 反应

试剂 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa 公司); siRNA ATM (invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及分组处理: 将 K562, HL60 细胞培养于 10% 胎牛血清 RPMI-1640 细胞培养液, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱, K562/ADM, HL60/ADM 细胞中则常规加入 0.8 μg/mL ADM 培养, 收集对数增殖期细胞进行实验。RNA 干扰法建立低表达 ATM 的 K562/ADM 和 HL60/ADM 细胞株: 将 (1~4) × 10⁵ 细胞接种于 6 孔板, 细胞贴壁率在 24 h 后可达 70%~90%, 将 X-treme GENE siRNA 转染试剂用无血清培养基稀释, 并按照 5:1 比例和 ATM siRNA 混合, 转染试剂/siRNA 复合物 (200 μL, 转染浓度 50 nmol/L) 制备后, 加入 6 孔板中并进行 37 °C 24 h 孵育, 更换胎牛血清培养基, 继续培养 3~8 h, PCR 及 Western blot 检测 ATM 的表达水平, 命名为 K562/ADM-ATM-siRNA, HL60/ADM-ATM-siRNA, 相应空白干扰对照组为: K562/ADM-control-siRNA, HL60/ADM-control-siRNA。ATM 抑制剂 KU-55933 作用浓度为 10 μmol/L, 自噬抑制剂 3-MA 作用浓度为 5 mmol/L, 自噬抑制剂 Baf-A1 作用浓度为 10 nmol/L。

1.2.2 Western blot 检测 ATM, hnRNPK, LC3 I/II 表达: 参照 Bio-Rad 仪器操作手册, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 上样量为 80 μg, 5% BSA 封闭 1 h 后, 分别与抗 ATM, hnRNPK, 抗 LC3 I/II 和抗 GAPDH 抗体 4 °C 孵育过夜。加 HRP 标记的二抗后在暗室曝光和显影。经凝胶成像系统扫描各电泳条带, 读取吸光度代表蛋白质的含量。校正结果为目标蛋白与内参 GAPDH 的比值, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 ATM/hnRNPK 表达: 收集对数增殖期细胞, TRIzol 法提取总 RNA (3 × 10⁷ 细胞/mL), 反转录为 cDNA, 荧光定量 PCR 反应使用 SYBR Premix Ex Taq 体系, 按说明书执行, 上机 ABI7500 PCR 仪检测, 反应条件为: 95 °C 5 s, 60 °C 45 s, 40 个循环。GAPDH 为内参。

1.2.4 CCK8 法检测细胞活力: 按照 CCK8 试剂进行操作, 将各组细胞加入 96 孔板, 每孔细胞数调整为 5 × 10⁴/100 μL, 孵育 24 h 后, 加入梯度浓度阿霉素 (0~62.5 μg/mL), 48 h 检测细胞活力, 细胞抑制率按公式 $[1 - (A_{\text{treated}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100\%$

计算。加入二甲基亚砷处理及未处理细胞均作为对照组。

1.3 统计学分析

数据处理使用 SPSS 13.0 统计软件, 各组数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组之间的比较, 如果方差不齐, 使用 *t'* 检验, 如果方差齐, 使用 *t* 检验, 多组之间的比较, 如果方差不齐, 用近似 Welch 法, 如果方差齐, 则用单因素方差分析。组内多重比较, 如果方差不齐则用 Dunnett's T3 法, 如果方差齐采用 LSD 法。

2 结果

2.1 ATM 在阿霉素耐药白血病细胞株中过表达

耐药株 K562/ADM, HL-60/ADM 中 ATM 表达量显著高于野生型 K562, HL-60 细胞 ($P < 0.05$)

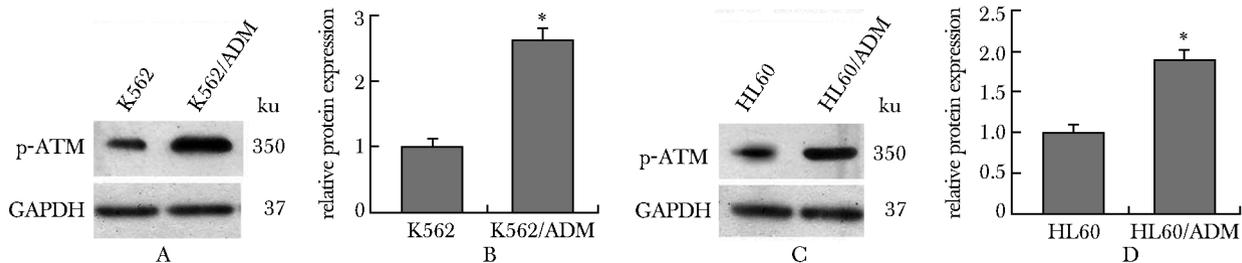
(图 1A~D)。

2.2 阿霉素耐药白血病细胞株中自噬增强, 抑制自噬水平后 ATM/hnRNPK 表达降低

阿霉素耐药的 K562/ADM, HL60/ADM 细胞中, LC3 II 的表达量显著高于野生型 K562, HL60 细胞(图 2A~C) ($P < 0.05$)。自噬抑制剂 3-MA 以及 Baf-A1 可以减低耐药株 K562/ADM、HL60/ADM 中 LC3 II 表达水平, 3-MA 以及 Baf-A1 作用下检测 ATM 及 hnRNPK 的表达, 结果在耐药株 K562/ADM、HL60/ADM 中, ATM 及 hnRNPK 表达水平降低(图 2A~C) ($P < 0.05$)。

2.3 下调 ATM 表达后 hnRNPK 和 LC3 II 表达降低

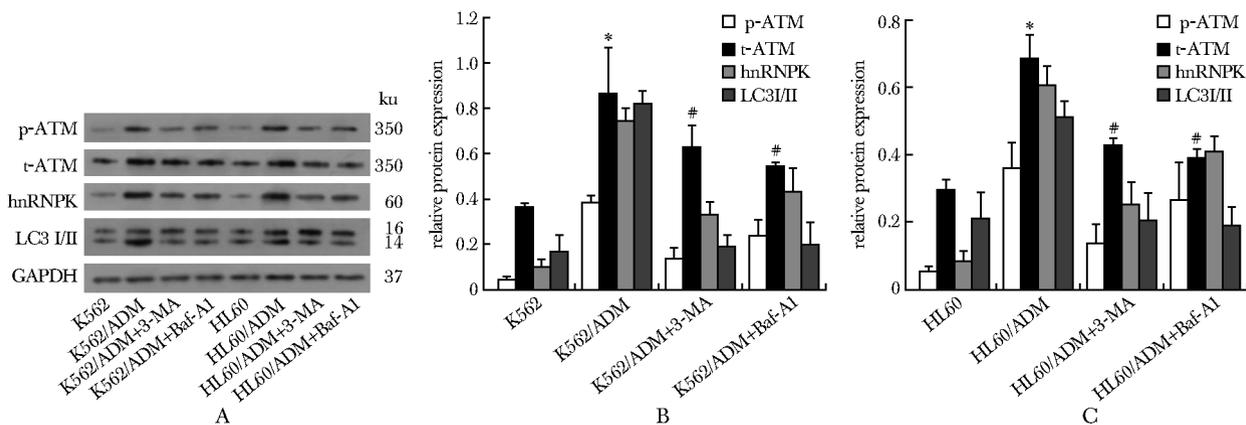
K562/ADM-ATM-siRNA、HL60/ADM-ATM-siRNA



A, B. Western blot assay and quantitative analysis of p-ATM expression in K562 and K562/ADM cell lines; C, D. Western blot assay and quantitative analysis of p-ATM expression in HL60 and HL60/ADM cell lines; * $P < 0.05$ compared with K562 or HL60.

图 1 Western blot 法检测 p-ATM 在各细胞株中的表达水平

Fig 1 Expression level of p-ATM in cell strains analyzed by Western blot



A. expression level of ATM, hnRNPK and LC3 I / II in cell lines as examined by Western blot before and after 3-MA/Baf-A1 treated; B, C. quantitative analysis of protein expression in cell lines; * $P < 0.05$ compared with K562 or HL60, # $P < 0.05$ compared with K562/ADM or HL60/ADM.

图 2 ATM, hnRNPK, LC3 I / II 在各细胞株中的蛋白表达水平以及 3-MA/Baf-A1 作用后的表达变化

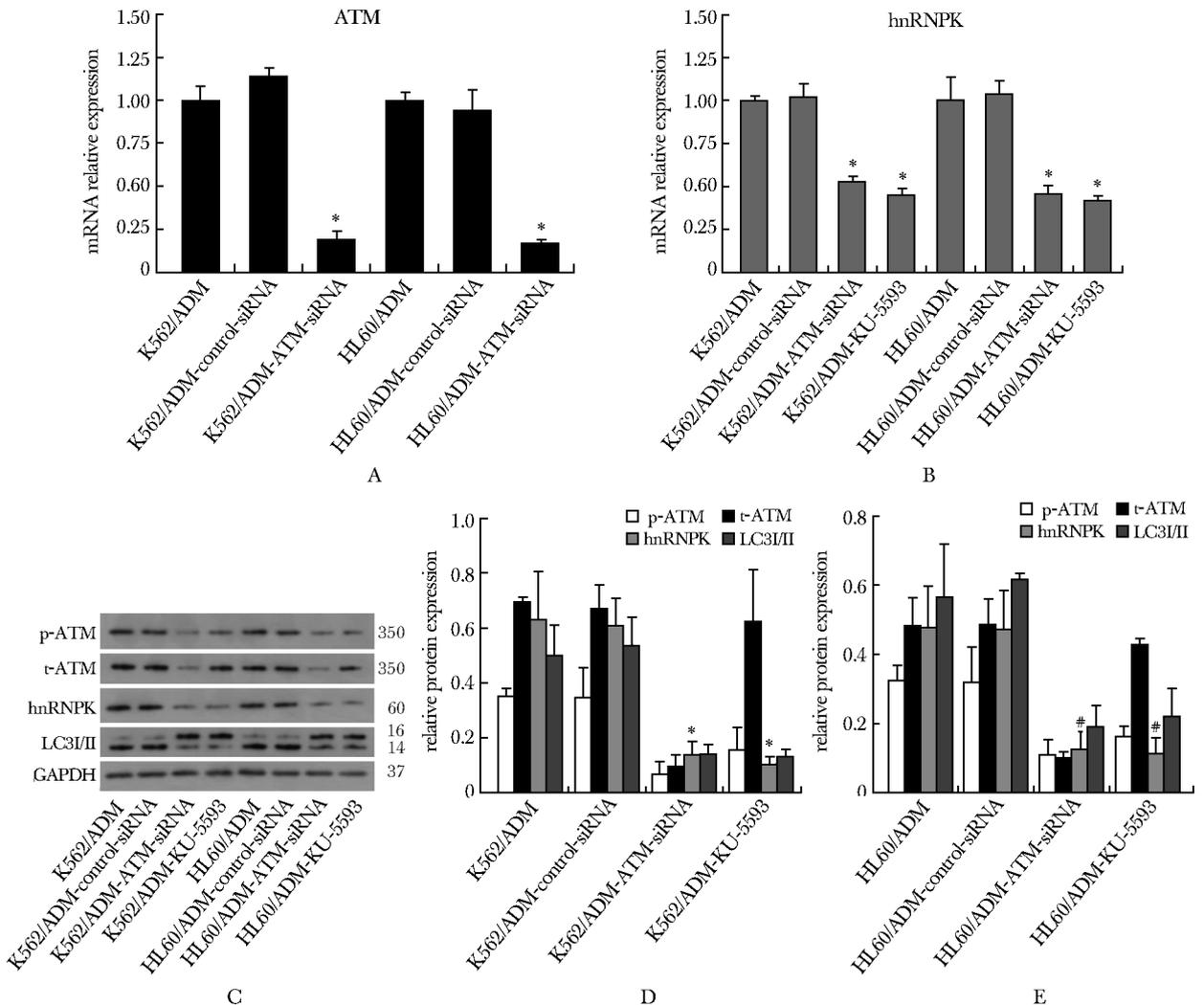
Fig 2 Expression level of ATM, hnRNPK and LC3 I / II in cell strains effected by 3-MA/Baf-A1

细胞株中 ATM 表达较 K562/ADM、HL60/ADM 细胞株减低,较空白对照 K562/ADM-control-siRNA、HL60/ADM-control-siRNA 细胞株减低(图 3A, C~E) ($P<0.05$)。与 K562/ADM 和 HL60/ADM 细胞系比较, hnRNPk 及自噬蛋白 LC3 II 在 K562/ADM-ATM-siRNA 及 HL60/ADM-ATM-siRNA 细胞株中表达均降低 ($P<0.05$), 而在 K562/ADM-control-siRNA 及 HL60/ADM-control-siRNA 细胞株中表达无明显变化(图 3B, C~E) ($P>0.05$)。

ATM 激酶抑制剂 KU55933 抑制耐药株中 ATM 的表达,与 K562/ADM 和 HL60/ADM 细胞株比较, hnRNPk 及自噬蛋白 LC3 II 在 K562/ADM-KU55933 及 HL60/ADM-KU55933 细胞株中表达均降低(图 3B, C~E) ($P<0.05$)。

2.4 下调耐药细胞株中 ATM 表达后药物敏感恢复

相同阿霉素浓度处理 24 h, 相比 K562/ADM 和 HL60/ADM 细胞, K562/ADM-ATM-siRNA、K562/

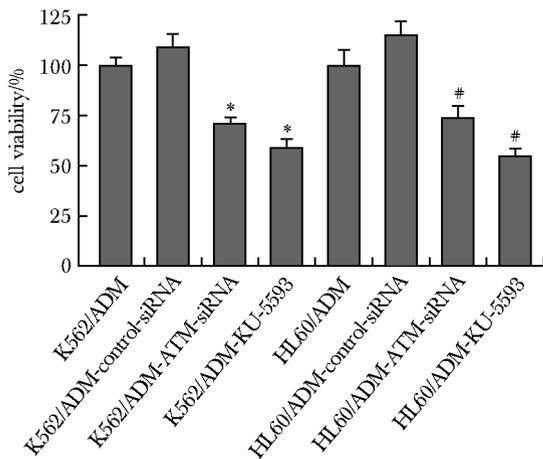


A, B. RT-qPCR detection of mRNA expression of ATM and hnRNPk in K562/ADM and HL60/ADM cells; C-E. Western blot assay and quantitative analysis of protein expression of p-ATM, t-ATM, hnRNPk and LC3 I / II in each group; * $P<0.05$ compared with K562/ADM or K562/ADM-control-siRNA; # $P<0.05$ compared with HL60/ADM or HL60/ADM-control-siRNA

图 3 各细胞株在 ATM 表达调变前后 hnRNPk 以及 LC3 I / II 的表达变化

Fig 3 Expression of hnRNPk and LC3 I / II when ATM was down regulated in cell strains

ADM-KU55933、HL60/ADM-ATM-siRNA、HL60/ADM-KU55933 细胞株的细胞活力明显下降,即对于阿霉素的药物敏感性有所恢复($P < 0.05$),而在 K562/ADM-control-siRNA 以及 HL60/ADM-control-siRNA 的细胞活力无明显变化(图 4)。



* $P < 0.05$ compared with K562/ADM or K562/ADM-control-siRNA, # $P < 0.05$ compared with HL60/ADM or HL60/ADM-control-siRNA.

图 4 CCK8 法检测各细胞株 ADM 敏感性

Fig 4 ADM sensitivity of cell strains examined by CCK8 assay

3 讨论

目前,蒽环类药物耐药是影响儿童急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)预后的主要因素,难治性白血病长期生存率仍只有 50% 左右^[6]。白血病细胞耐药机制复杂,至今未完全阐明,已知包括骨髓微环境异常,细胞粘附异常、凋亡受阻等^[7]。

ATM 蛋白是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,分子量约为 350 ku,属于磷脂酰肌醇激酶样蛋白激酶(phosphatidylinositol 3 kinase-like kinase, PIKK)家族^[8-9]。研究提示,ATM 参与 DNA 损伤修复、细胞

周期调控、细胞凋亡等一系列生物学过程^[10]。ATM 蛋白还可参与氧化还原平衡、调控 Ca^{2+} 与 K^+ 的迁移、胰岛素信号途径、促进线粒体自噬等^[11]。文献报道,细胞质内的 ATM 作为活性氧(reactive oxygen species, ROS)感受器,可降低雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)对自噬的抑制,促进自噬发生^[12]。在肿瘤耐药研究中,ATM 过表达是软组织肉瘤 ATR 抑制剂耐药的驱动因素,联合 ATM 及 ATR 抑制剂可逆转软组织肉瘤耐药^[13]。综上,ATM 蛋白在自噬及肿瘤细胞耐药机制中均发挥作用,但其在白血病阿霉素耐药中的机制研究较少。

本课题组既往的研究提示,hnRNPK 可能通过 苳氯素 1(Beclin 1)调节自噬水平,hnRNPK 过表达与慢性粒细胞白血病伊马替尼耐药相关,与髓系白血病阿霉素耐药相关^[14]。文献及生物信息学 STRING 数据库分析预测,ATM 与 hnRNPK 可能相互作用^[5],ATM/hnRNPK 信号与髓系白血病阿霉素耐药机制值得进一步研究。本文以细胞株为研究对象,发现 ATM 蛋白在阿霉素耐药细胞株中过表达,且 ATM 过表达与自噬增强有关,下调 ATM 表达后,细胞株自噬减低及阿霉素耐药逆转,表明,ATM 过表达是髓系白血病细胞阿霉素耐药的 因素之一,可能与自噬增强有关。ATM 调变前后 hnRNPK 的表达变化与其保持一致,与自噬蛋白 LC3 II 的表达一致,抑制自噬后,ATM/hnRNPK 信号表达亦可降低,表明,ATM/hnRNPK 信号轴表达增高对于自噬及耐药有增强作用,验证了 ATM/hnRNPK 信号与自噬及髓系白血病耐药相关性。但本研究结果局限于细胞株,仍需要动物实验及骨髓样本进一步验证。

综上,本文探索了 ATM/hnRNPK 信号调控细胞自噬及在髓系白血病阿霉素耐药中的作用,为克服髓系白血病阿霉素耐药提供了可能的新靶点。

参考文献:

[1] Rosti G, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia: which, when, for whom? [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14:

141-154.

[2] Zhang J, Liu X, Lin Y, et al. HnRNPK contributes to drug resistance in acute myeloid leukemia through the reg-

- ulation of autophagy [J]. *Exp Hematol*, 2016, 44: 850-856.
- [3] Zhang J, Liu X, Yin C, *et al.* hnRNPK/Beclin1 signaling regulates autophagy to promote imatinib resistance in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *Exp Hematol*, 2022, 108: 46-54.
- [4] Blasius M, Bartek J. ATM targets hnRNPK to control p53 [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12: 1162-1163.
- [5] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, *et al.* The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 6: D638-D646.
- [6] Egan G, Chopra Y, Mourad S, *et al.* Treatment of acute myeloid leukemia in children: a practical perspective[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2021, 68: 1-13.
- [7] 向彩霞, 黄彬涛, 郝建. 抗凋亡抑制剂维奈克拉在治疗髓系白血病的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2023, 43: 833-836.
- [8] Jette NR, Kumar M, Radhamani S, *et al.* ATM-deficient cancers provide new opportunities for precision oncology [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 687. doi:10.3390/cancers12030687.
- [9] Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more[J]. *Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 197-210.
- [10] Derheimer FA, Kastan MB. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584: 3675-3681.
- [11] Ditch S, Paull TT. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response[J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37:15-22.
- [12] Alexander A, Cai SL, Kim J, *et al.* ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4153-4158.
- [13] Spalato-Ceruso M, Laroche-Clary A, Perret R, *et al.* Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified ATM signaling network genes as critical drivers for resistance to ATR inhibition in soft-tissue sarcomas: synthetic lethality and therapeutic implications [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2023,12:51. doi:10.1186/s40164-023-00416-z.
- [14] Zhang J, Jin Z, DU Q, *et al.* Analysis of altered proteins related to blast crisis in chronic myeloid leukemia by proteomic study[J]. *Int J Lab Hematol*, 2012, 34: 267-273.

本刊稿件格式要求(2)

2.1 摘要:一般以第三人称撰写,采用“结构式摘要”,包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)4部分。摘要应具有独立性和自明性,宜300~400字。英文缩写在摘要中首次出现时用“中文全称(英文缩写)”格式。关键词5个以内。在关键词下行标注中图分类号(按中国图书馆分类法第四版查阅)。中、英文摘要及关键词应一致。

2.2 引言:应引用近期参考文献,概述该领域的国内外研究现状及存在的主要问题,明确提出本研究的立题依据、目的及意义,一般400字以内。英文缩写在正文中首次出现时用“中文全称(英文全称,英文缩写)”格式。

2.3 方法:新方法或有特殊程序者应写明白。常用方法或可引用参考文献者不必详述,写明“见参考文献[文献序号]”即可。

2.4 结果:只列实验结果,不重复方法,不对结果进行分析、评述。图、表均须有中、英文题目,题目应具有自明性,图表的标目需写完整,图表内的内容及注释只用英文(注:短篇综述和医学教育栏目的图表内容及注释只用中文)。表格使用“三线表”;计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,注明例数(n);图的标准值线分别在横坐标的上侧及纵坐标的右侧;镜下图片应清晰易辨,标明放大倍数。

2.5 讨论:应紧扣实验结果进行讨论,不重复具体方法和结果,一般在800字以内。