

· 论 著 ·

GSK-3 β 、PTEN、PLK1 在儿童急性髓系白血病中的表达及意义王 妍,徐酉华 Δ ,胡艳妮,孙艳辉,金 鑫,杨桂存(重庆医科大学附属儿童医院/儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/儿科学重庆市重点实验室/
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地 400014)

摘要:目的 探讨糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)、与张力蛋白同源的位于第 10 号染色体磷酸酶基因(PTEN)、Polo 样激酶 1(PLK1)在儿童急性髓系白血病(AML)中的表达及意义。方法 RT-PCR 方法检测实验组(33 例初诊 AML 患儿的骨髓)和对照组(10 例正常骨髓)骨髓单个核细胞(BMMNC)中 GSK-3 β mRNA、PTEN mRNA、PLK1 mRNA 的表达,ELISA 方法检测 GSK-3 β 蛋白及 P-GSK-3 β 的表达。结果 实验组中 GSK-3 β mRNA、GSK-3 β 蛋白、PLK1 mRNA 的表达量高于对照组($P=0.012$; $P=0.014$; $P=0.040$);PTEN mRNA、P-GSK-3 β 的表达量低于对照组($P=0.012$; $P=0.002$)。GSK3 β 蛋白与 PTEN mRNA 的表达呈负相关($r=-0.415$, $P=0.016$);GSK-3 β mRNA、GSK3 β 蛋白与 PLK1 mRNA 的表达成呈正相关($r=0.388$, $P=0.026$; $r=0.427$, $P=0.013$)。外周血白细胞计数增高者 GSK-3 β 蛋白表达增高;临床危险度高者 GSK-3 β mRNA、GSK-3 β 蛋白的表达增高,P-GSK-3 β 的表达降低。结论 在儿童 AML 中,GSK-3 β 和 PLK1 可能起癌基因的作用,PTEN 可能起抑癌基因的作用。

关键词: GSK-3 β ; PTEN; PLK1; 前体细胞淋巴瘤母细胞白血病淋巴瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3347-03

Expression and clinical significance of GSK-3 β , PTEN, PLK1 in pediatric acute myeloid leukemiaWang Yan, Xu Youhua Δ , Hu Yanni, Sun Yanhui, Jin Xin, Yang Guicun

(Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University/ Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing/Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of GSK-3 β , PTEN and PLK1 in pediatric AML. **Methods** Experiment group was bone marrows of 33 cases incipient children with AML. Control group was 10 cases normal bone marrows. GSK-3 β , PTEN and PLK1 gene expressions in BMMNC of the two groups were tested using semi quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) technique. GSK-3 β protein and P-GSK-3 β expressions were tested by ELISA. **Results** The expression of GSK-3 β mRNA, GSK-3 β protein, PLK1 mRNA in BMMNC of children with AML was higher than that of control group($P=0.012$; $P=0.014$; $P=0.040$); The expression of PTEN mRNA, P-GSK-3 β was lower than the control group($P=0.012$; $P=0.002$); GSK-3 β protein had a negative correlation with PTEN mRNA($r=-0.415$, $P=0.016$); GSK-3 β mRNA, GSK-3 β protein had a positive correlation with PLK1 mRNA($r=0.388$, $P=0.026$; $r=0.427$, $P=0.013$). The expression of GSK-3 β protein was high in which had high peripheral white blood cell counts; both the expressions of GSK-3 β mRNA and GSK-3 β protein were high in which had high risk; but the expression of P-GSK-3 β were low. **Conclusion** In pediatric AML, GSK-3 β and PLK1 may play a role of oncogene and PTEN may play a role of tumor suppressor gene.

Key words: GSK-3 β ; PTEN; PLK1; precursor cell lymphoblastic leukemia-lymphoma

急性白血病是儿童最常见的恶性肿瘤,传统的化疗和干细胞移植使儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的 5 年生存率达到 80%,而急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患儿的 5 年生存率只接近 60%^[1]。新型分子靶向化疗药物具有更强的抗肿瘤活性,且对正常细胞不良反应小。因此,寻找儿童 AML 的有效分子作用靶点至关重要。

糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)是一种多功能的胞浆丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,研究证实它是治疗 2 型糖尿病^[2]、阿尔茨海默病^[3]的有效药物靶点,并且与癌症的发生、发展密切相关^[4],但其在白血病中起激活作用还是抑制作用尚不明确。PTEN 是第 1 个呈双专一性磷酸酶活性的抑癌基因,它作为 GSK3 β 的上游基因,可调控 GSK3 β 的表达^[5]。在成人急性白血病中存在与张力蛋白同源的位于第 10 号染色体磷酸酶基因(PTEN)基因的表达缺失^[6],但儿童 ALL 患者骨髓标本中 PTEN 蛋白的表达高于非恶性疾病儿童^[7]。Polo 样激酶 1

(PLK1)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,可促进有丝分裂的进程,其抑制剂 BI2536 已经进入 AML 的 I 期临床实验阶段^[8]。有研究认为 GSK-3 β 可能是 PLK1 的负调控因子,在维系 PLK1 的功能方面发挥作用^[9]。本课题组研究 GSK-3 β 、PTEN、PLK1 在儿童 AML 的表达和临床的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验组为 2012 年 3~9 月重庆医科大学附属儿童医院血液科收治的 33 例初诊 AML 患儿骨髓(M1 2 例, M2 15 例, M3 6 例, M4 1 例, M5 6 例, M6 2 例, M7 1 例;中位年龄 6 岁 2 个月)。按形态学、免疫学、染色体、基因(MICM)分型标准诊断。根据患儿的临床以及实验室指标按危险度分型将实验组分为高危组、中危组、低危组,每组 11 例。对照组为 10 例骨科手术切除骨中抽吸的正常骨髓。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 无菌操作取骨髓液 2~3 mL,肝素抗凝,聚

表 1 GSK-3 β 、PTEN、PLK1、 β -actin 的引物及目的片段大小

项目	上游引物	下游引物	大小(bp)
GSK-3 β	5'-GGC TAC CAT CCT TAT TCC TCC T-3'	5'-GTC CAC GGT CTC CAG TAT TAG C-3'	101
PTEN	5'-TTG AAG ACC ATA ACC CAC CAC AG-3'	5'-CAT TAC ACC AGT TCG TCC CTT TC-3'	134
PLK1	5'-CCC CTC ACA GTC CTC AAT AAG-3'	5'-AAT AGT CCA CCC ACT TGC TGA-3'	238
β -actin	5'-AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG ACC-3'	5'-GCC AGG TCC AGA CGC AGG AT-3'	196

蔗糖(FicoLL)液(相对密度 1.077 g/mL)分离骨髓单个核细胞(BMMNC),取约 5×10^6 个细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,混匀后 -80°C 保存。

1.2.2 裂解骨髓单个核细胞 离心沉淀细胞,加 1 mL 裂解液 RL 充分裂解细胞。分别收集水相中的总 RNA 及有机相中的总蛋白。

1.2.3 RT-PCR 检验 按北京百泰克生物技术有限公司高纯总 RNA 快速提取试剂盒说明书提取 RNA。按大连宝生物技术有限公司逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 说明书进行反转录。GSK-3 β 、PTEN、PLK1、 β -actin 的引物及目的片段大小见表 1,PCR 条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;然后 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s;GSK-3 β 、PLK1、 β -actin 均为 55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,PTEN 60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物分析 取 PCR 产物 8 μL 在 25~30 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,100 V 电泳 45 min。用紫外投射仪观察并用粘胶成像仪照相,照片经 Metamorphose Imaging Sight 软件进行分析并读取吸光度值,分别取 GSK-3 β 、PTEN、PLK1 与 actin 吸光度比值(GSK-3 β /actin,PTEN/actin,PLK1/actin)进行半定量分析。

1.2.5 酶联免疫吸附实验(ELISA) 采用 ELISA 双抗体夹心法对有机相中的 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 水平进行定量分析。操作步骤严格按上海沪尚生物有限公司 GSK-3 β 及 P-GSK-3 β ELISA 试剂盒使用说明进行。选择 450 nm 波长,在酶标仪上测定 A 值,以标准品 A 值绘制标准曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用 *t* 检验;组间两两比较采用 *F* 检验;两组间的相关性研究采用 Pearson 相关检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

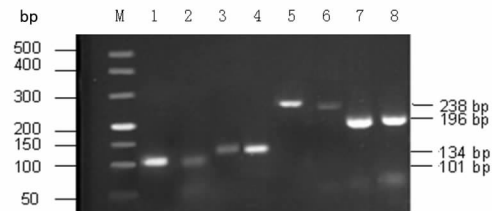
2 结果

2.1 GSK-3 β mRNA、PTEN mRNA、PLK1 mRNA 在两组 BMMNC 的表达 实验组 GSK-3 β mRNA 和 PLK1 mRNA 的平均表达量较对照组的平均表达量高($P<0.05$);实验组 PTEN mRNA 的平均表达量较对照组的平均表达量低($P<0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 两组 GSK-3 β 、PTEN、PLK1 的 PCR 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GSK-3 β mRNA	PTEN mRNA	PLK1 mRNA
实验组	33	0.55 \pm 0.16	0.50 \pm 0.16	0.71 \pm 0.18
对照组	10	0.41 \pm 0.09	0.63 \pm 0.25	0.57 \pm 0.18
<i>P</i>		0.012	0.012	0.040

2.2 GSK-3 β 蛋白及 P-GSK-3 β 蛋白在两组 BMMNC 的表达情况 实验组 GSK-3 β 蛋白的平均浓度较对照组的平均浓度高($P<0.05$);实验组 P-GSK-3 β 蛋白的平均浓度较对照组的平均浓度低($P<0.01$)。见表 3。



M:Marker DL500;1:实验组 GSK3 β PCR 产物;2:对照组 GSK3 β PCR 产物;3:实验组 PTEN PCR 产物;4:对照组 PTEN PCR 产物;5:实验组 PLK1 PCR 产物;6:对照组 PLK1 PCR 产物;7:实验组 β -actin PCR 产物;8:对照组 β -actin PCR 产物。

图 1 两组 GSK-3 β 、PTEN、PLK1 的 PCR 检测结果表 3 两组 GSK-3 β 、P-GSK-3 β 的 ELISA 检测结果(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GSK-3 β	P-GSK-3 β
实验组	33	2 553.40 \pm 358.59	294.17 \pm 40.53
对照组	10	2 204.02 \pm 283.52	350.53 \pm 53.32
<i>P</i>		0.014	0.002

2.3 GSK-3 β mRNA、PTEN mRNA、PLK1 mRNA、GSK-3 β 蛋白及 P-GSK-3 β 与临床指标的相关性 实验组 GSK-3 β mRNA、PTEN mRNA、PLK1 mRNA、GSK-3 β 蛋白及 P-GSK-3 β 的表达与性别、肝脾是否肿大均无明显相关性,仅 GSK-3 β 蛋白的表达与外周血白细胞计数增高呈正相关($P=0.011$)。临床危险度高则 GSK-3 β mRNA[高危组高于中危组($P=0.012$),高危组高于低危组($P=0.000$)],GSK-3 β 蛋白[高危组高于中危组($P=0.012$),高危组高于低危组($P=0.003$)],PLK1 mRNA[高危组高于低危组($P=0.009$)]表达相应增高。临床危险度高则 P-GSK-3 β 表达减低[高危组低于中危组($P=0.047$),高危组低于中危组($P=0.036$)]。PTEN mRNA 的表达与临床危险度分型无明显相关性。

2.4 GSK-3 β 与 PTEN mRNA、PLK1 mRNA 表达的相关性 本研究中 GSK-3 β mRNA、P-GSK3 β 与 PTEN mRNA 的表达无明显相关性($r=-0.265, P=0.136; r=0.023, P=0.899$),GSK-3 β 蛋白与 PTEN mRNA 的表达呈负相关($r=-0.415, P=0.016$)。GSK-3 β mRNA、GSK-3 β 蛋白与 PLK1 mRNA 的表达呈正相关($r=0.388, P=0.026; r=0.427, P=0.013$),P-GSK3 β 与 PLK1 mRNA 的表达无明显相关性($r=-0.319, P=0.070$)。

3 讨论

分子靶向药物在白血病治疗中发挥越来越重要的作用。近来研究表明 GSK-3 β 为癌基因,使用 GSK-3 β 的抑制剂 BIO 后 TF-1、U937、K562 和 HL60 细胞大量凋亡,但不影响正常造血干细胞的活性^[10]。另有研究表明 GSK-3 β 为抑癌基因,在 APL 中,ATO 激活 GSK-3 β 诱导 Mcl-1 降解进而诱导 NB4 细

胞分化^[11]。本课题组前期研究表明儿童 ALL 中 GSK-3 β 起癌基因的作用^[12]。本实验结果显示儿童 AML 中 GSK-3 β 在基因及蛋白水平均高表达,且表达水平与临床分型呈正相关,GSK-3 β 蛋白与外周血白细胞计数呈正相关;P-GSK-3 β 低表达,与临床分型呈负相关。因此,GSK-3 β 在儿童 AML 中可能同样起癌基因的作用。

本研究中儿童 AML 骨髓标本中 PTEN mRNA 的表达量明显低于对照组,其在儿童 AML 中可能起抑癌作用,但其表达量与临床指标无相关性。

PLK1 目前被认为是肿瘤治疗过程中有价值的作用靶点,在 AML 动物模型中,PLK1 的特异性的抑制剂 NMS-P937 联合阿糖胞苷口服后,可使其较好地长期存活^[13];在成人 AML 中 PLK1 高表达,与不良预后呈明显正相关^[14]。本研究中儿童 AML 骨髓标本中 PLK1 mRNA 的表达量同样明显高于对照组,且其表达量与临床分型呈一定正相关,表明 PLK1 在儿童 AML 中可能同样起癌基因的作用。

肿瘤中抑癌基因 PTEN 主要通过两种作用途径调控 GSK-3 β 的表达:一种为通过降低对 PI3K/AKT 信号通路的抑制,增强 AKT 对 GSK-3 β 的抑制性磷酸化,GSK-3 β 的表达减少^[5];一种为通过增强对 cdc42 活性的抑制,降低 cdc42 信号通过对 GSK-3 β 的抑制作用,GSK-3 β 的表达增加^[15]。本研究初步显示儿童 AML 中,GSK-3 β 蛋白与 PTEN mRNA 的表达呈现一定负相关。因此,儿童 AML 中,PTEN 可能主要通过 cdc42 信号通路调控 GSK-3 β 的转录后水平的表达。

在肺癌中,GSK-3 β 的抑制剂 LiCl 能增强 PLK1 的启动子活性,促进 PLK1 的表达,提示 GSK-3 β 可能是 PLK1 的负调控因子^[9]。而本研究结果显示 GSK-3 β mRNA、GSK-3 β 蛋白与 PLK1 mRNA 的表达呈正相关。本课题组前期研究表明儿童 ALL 中 GSK-3 β 高表达,且其正向调控 NF- κ B 信号通路^[12]。Lin 等^[16]研究表明 NF- κ B 的亚基 RelA 通过直接与 PLK1 的启动子结合,增强 PLK1 的转录。因此,在儿童 AML 中,GSK-3 β 可能通过正向调控 NF- κ B 信号通路从而增强 PLK1 的转录。

综上所述,儿童 AML 中,GSK-3 β 和 PLK1 可能起癌基因的作用,而 PTEN 起抑癌基因的作用,三者在白血病中的作用机制有待进一步探讨,可能成为儿童 AML 危险度分型的指标及靶向治疗的有效作用靶点。

参考文献:

[1] Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemia: an update[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(5):551-565.

[2] Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, et al. Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice[J]. *Diabetes*, 2003, 52(1):21-28.

[3] Gandy JC, Melendez-Ferro M, Bijur GN, et al. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) expression in a mouse model of Alzheimer's disease: a light and electron microscopy study [J]. *Synapse*, 2013, 67(6):313-327.

[4] Miyashita K, Nakada M, Shakoori A, et al. An emerging strategy for cancer treatment targeting aberrant glycogen

synthase kinase 3 beta [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009, 9(10):1114-1122.

- [5] Al-Khoury AM, Ma Y, Togo SH, et al. Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42):35195-35202.
- [6] 沈权,陈泽,刘旭萍,等. 抑癌基因 PTEN mRNA 在白血病细胞中的表达及意义[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(8):493-496.
- [7] Gauffin F, Diffner E, Gustafsson B, et al. Expression of PTEN and SHP1, investigated from tissue microarrays in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 26(1):48-56.
- [8] Wäsch R, Hasskarl J, Schnerch D, et al. BI_2536—targeting the mitotic kinase Polo-like kinase 1 (Plk1)[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 184:215-218.
- [9] 周琼,白明,辛建保,等. 氯化锂抑制 A549 细胞增殖及其对 Polo 样激酶 1 转录活性的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(10):832-838.
- [10] Holmes T, O'Brien TA, Knight R, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition preserves hematopoietic stem cell activity and inhibits leukemic cell growth[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5):1288-1297.
- [11] Wang R, Xia L, Gabrilove J, et al. Downregulation of Mcl-1 through GSK-3 β activation contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. [J]. *Leukemia*, 2013, 27(2):315-324.
- [12] Hu Y, Gu X, Li R, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition induces nuclear factor- κ B-mediated apoptosis in pediatric acute lymphocyte leukemia cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29:154-159.
- [13] Valsasina B, Beria I, Alli C, et al. NMS-P937, an orally available, specific small-molecule polo-like kinase 1 inhibitor with antitumor activity in solid and hematologic malignancies[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(4):1006-1016.
- [14] Renner AG, Dos Santos C, Recher C, et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells [J]. *Blood*, 2009, 114(3):659-662.
- [15] Deevi R, Fatehullah A, Jagan I, et al. PTEN regulates colorectal epithelial apoptosis through Cdc42 signalling [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(9):1313-1321.
- [16] Lin DC, Zhang Y, Pan QJ, et al. PLK1 is transcriptionally activated by NF- κ B during cell detachment and enhances anoikis resistance through inhibiting β -catenin degradation in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13):4285-4295.