

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.008

## 糖基因 ST8SIA4 在人慢性粒细胞白血病多药耐药中的作用研究

张兆海<sup>1</sup>,张瑞红<sup>2</sup>

(1. 辽宁省本溪市金山医院检验科 117000; 2. 辽宁省本溪钢铁集团总医院手术室 117000)

**[摘要]** **目的** 通过研究糖基因 ST8SIA4 在人慢性粒细胞白血病(CML)细胞株 KCL22 及其耐阿霉素(ADR)细胞株 KCL22/ADR、CML 患者外周血单个核细胞(PBMC)中表达的差异,明确糖基因 ST8SIA4 与人 CML 多药耐药的相关性。**方法** 采用 RT-PCR 和 Western Blot 检测糖基因 ST8SIA4 在人 CML 及其耐药细胞株、CML 及 CML 耐药患者 PBMC 中的表达;特异性下调糖基因 ST8SIA4,检测干扰前、后 CML 细胞在体外对化疗药物的敏感性。**结果** 糖基因 ST8SIA4 在人 CML 及其耐药细胞株、CML 患者 PBMC 中表达水平比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );特异性下调 ST8SIA4 的表达,增加了 KCL22/ADR 细胞体内、体外的药敏性( $P < 0.05$ )。**结论** 人 CML 细胞株及 CML 患者 PBMC 中糖基因 ST8SIA4 的表达差异有统计学意义,这些特征性改变与 CML 多药耐药具有相关性。

**[关键词]** 糖基因 ST8SIA4;多药耐药;粒细胞白血病,慢性**[中图分类号]** R733.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)36-5074-03

## The correlation study of the glycogene ST8SIA4 in the multidrug resistance of human chronic myeloid leukemia

Zhang Zhaohai<sup>1</sup>, Zhang Ruihong<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Jinshan Hospital of Benxi City, Benxi, Liaoning 117000, China;

2. Operating Room, General Hospital of Benxi Iron, Benxi, Liaoning 117000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the differential expression of ST8SIA4 in the both chronic myeloid leukemia(CML) cell lines KCL22 and adriamycin resistant cell lines KCL22/ADR, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of CML patients, to clarify the correlation of ST8SIA4 and multidrug resistance of CML. **Methods** Using real-time PCR and Western blot for quantification of ST8SIA4, we compared the differential expression of ST8SIA4 in CML cell lines and PBMC of CML patients. The differentially expressed ST8SIA4 gene was silenced, and the chemosensitivity to anti-tumor drugs was analyzed in vitro. **Results** ST8SIA4 was differentially expressed in CML cell lines and PBMC of CML patients( $P < 0.05$ ). The altered level of ST8SIA4 was increased drug-resistant phenotype of KCL22/ADR cells both in vitro and in vivo( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of ST8SIA4 was different in CML cell lines and PBMC of CML patients, these characteristic alterations were associated with multidrug resistance in CML.

**[Key words]** glycogene ST8SIA4; multidrug resistance; myeloid leukemia, chronic

人慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种骨髓异常增生的恶性肿瘤,由于供体来源少、移植死亡率高、失败率高,移植治疗的应用受到了限制,故在临床上化疗成为了 CML 治疗的首选方法<sup>[1]</sup>。然而临床数据显示,大多数的 CML 患者对化疗药物都有一定的耐药性,阻碍了对 CML 的治疗<sup>[2]</sup>。现在已有资料显示,肿瘤耐药细胞表面糖链结构及表达都存在差异,而糖基化广泛存在于各种生理过程中<sup>[3]</sup>,N-糖基化修饰、糖基因(glycogene)的改变均与白血病多药耐药具有相关性<sup>[4]</sup>。唾液酸又名 N-乙酰基神经氨酸,唾液酸作为机体内重要的信息传递分子,可参与细胞表面糖蛋白和糖脂的唾液酸化修饰,在细胞黏附、抗原识别和信号传导等过程中发挥着重要的作用。有研究报道,ST8SIA1 在儿童急性淋巴细胞白血病中呈低表达<sup>[5]</sup>。人急性髓性白血病(AML)多药耐药与 ST8SIA4 的特征性改变具有相关性<sup>[6]</sup>。另外,唾液酸在细胞膜上的表达还与肿瘤的浸润和转移有密切的联系<sup>[7-8]</sup>。因此,本实验旨在探讨 ST8SIA 家族与 CML 多药耐药的相关性及其可能的机制,从而为诊断 CML 多药耐药提供新的检测标志物,为逆转 CML 多药耐药提供新策略。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要材料及试剂** CML 细胞株 KCL22,购自凯基公司(中国南京)。裸鼠(雄性,4 周龄,体质量 17~23 g,清洁级),胎牛血清、RPMI-1640 培养基、青霉素、链霉素(均由 GIBCO 公司提供),胰酶(Sigma 公司)、Trizol(Invitrogen 公司)、RT-

PCR 试剂盒、PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)、PCR 引物(大连宝生物公司)、ECL 试剂盒(Amersham Biosciences 公司)、PVDF 膜(Pall 公司)、兔抗小鼠多克隆抗体、辣根酶标记羊抗兔抗体(均由 Santa 公司提供)、其他试剂国产分析纯化。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** KCL22 细胞在含灭活的 10% 胎牛血清,1% 双抗(青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,链霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 RPMI-1640 培养基中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,含 5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中培养。采用体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击方法诱导 KCL22 细胞对阿霉素(ADR)的耐药。实验前 1 周,KCL22/ADR 细胞应在无 ADR 的培养基中培养,且使细胞的活力大于 90%。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。

**1.2.2 患者标本** 收集 2012 年 7 月至 2014 年 6 月来自本溪市金山医院和本溪钢铁集团总医院就诊的 28 例 CML 患者,其中,男 17 例,女 9 例,年龄 19~68 岁,中位年龄 45 岁。经入院检测,其中,11 例为 CML 非耐药(P-gp 检测为阴性,CML/-)患者,17 例为 CML 耐药(P-gp 检测为阳性,CML/+ )患者。所有的患者外周血标本应在未接受任何治疗前采集,并用人淋巴细胞分离液,分离外周血单个核细胞,分离出的细胞保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.2.3 RNA 提取和 RT-PCR** 常规 Trizol 法提取各标本的总 RNA,紫外分光光度计测定吸光度( $A_{260}$  和  $A_{280}$ ),以检测 RNA 含量和纯度,并置于 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存。取相同质量的 RNA

表 1 RT-PCR 扩增 6 种目的基因及 GAPDH 的引物序列

基因	引物序列	长度(bp)
ST8SIA1	5'-TAC TCT CTC TTC CCA CAG G-3';5'-GAC AAA GGA GGG AGA TTG C-3'	149
ST8SIA2	5'-GTG GTC TTC CTC ATC TTC G-3';5'-GAG GAG CCG TTT ATT ACA AC-3'	140
ST8SIA3	5'-ATT CTC TCA CCC AGG AAC TC-3';5'-CAA TCC GAA CAC TAT TCT TG-3'	141
ST8SIA4	5'-CAA GAA CTG AGG AGC ACC-3';5'-TTT CCA ACC TTC TAC ATT GTG-3'	140
ST8SIA5	5'-CCT TTG CCT TGG TGA CCT-3';5'-CAT GGA CAG CAC CTT CAC T-3'	152
ST8SIA6	5'-CGG CAA GCA GAA GAA TAT G-3';5'-GCT TTC CAC CTC GTA ACT C-3'	126
GAPDH	5'-CTC CCT CCA CCT TTG ACG CTG-3';5'-TCC TCT TGT GCT CTT GCT GG-3'	175

作为模板,以 20 μL 反转录体系,按照反转录试剂盒提供的说明书进行操作。将反转录得到的 cDNA 按照 TaKaRa RT-PCR 试剂盒说明构建 25 μL 反应体系,置于荧光定量 PCR 仪中 40 个循环,同时扩增管家基因 GAPDH 作为对照。根据比较 Ct 值法公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中,  $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})$ , 获得不同组间相关基因表达比值。所用到的引物见表 1。

**1.2.4 Western blot 分析** 用 2×电泳缓冲液裂解细胞,离心取上清,蛋白浓度由 BCA 法检测。煮沸变性的蛋白以每孔 40 μg 的含量点样,经浓缩胶为 6%、分离胶为 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。通过电转仪将凝胶上的蛋白样品移至 PVDF 膜上,37 °C 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。分别与 1:200 兔抗小鼠 ST8SIA 家族抗体、GAPDH 多克隆抗体 4 °C 孵育过夜。以 TTBS 洗膜 3 次,每次 10 min。然后加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3 000 稀释)37 °C 孵育 1 h,随后以 TTBS 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 发光试剂盒检测结果。

**1.2.5 RNA 干扰分析** 取 1 mL(约  $1 \times 10^4$  个)对数期生长的 KCL22 或 KCL22/ADR 细胞悬液于 24 孔板中,在 37 °C,含 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1~2 d 使细胞达到 60%~80% 的汇合度。取 100 μL 无血清的 RPMI-1640 培养液与 1 μg 带 shRNA 的质粒混匀,再加入 2 μL TurboFect 转染试剂混匀,最后取 100 μL 该混合液加入孔板中,轻轻混匀,置于 37 °C 孵箱中培养 24~48 h。待转染完成之后,收集细胞,RT-PCR、Western blot 分析检测干扰效果。

**1.2.6 体外药敏实验** 采用 MTT 法检测白血病细胞对抗肿瘤药物的敏感性。取对数生长期细胞( $1 \times 10^4$  个)接种于 96 孔培养板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。分别加入不同浓度梯度的抗肿瘤药物阿霉素、长春新碱和紫杉醇继续培养 72 h。各孔再加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h。各孔再加入 100 μL 三联裂解液终止培养,过夜。应用酶标仪于 570 nm 波长处测定各孔光密度(OD)值。计算 IC<sub>50</sub> 值,即抗肿瘤药物的半数抑制浓度。实验中设阴性对照孔(不加抗肿瘤药物)和调零孔(只加细胞培养液和抗肿瘤药物,不加细胞)。

**1.2.7 体内药敏实验** 细胞培养后分为 6 组:KCL22、KCL22/ADR、KCL22-control shRNA、KCL22/ADR-control shRNA、KCL22/ADR-ST8SIA4 shRNA、KCL22-ST8SIA6 shRNA 组,然后从腋窝下注射癌细胞培养液(细胞数约  $1 \times 10^7$ ),待瘤块直径达 5 mm×5 mm 时开始给予 ADR 抗肿瘤治疗。空白对照组每隔 3 d 腹腔注射生理盐水,ADR 治疗组每隔 3 d 腹腔注射 ADR(4 mg/kg)。观察 3 周,杀鼠取瘤体质量体积。

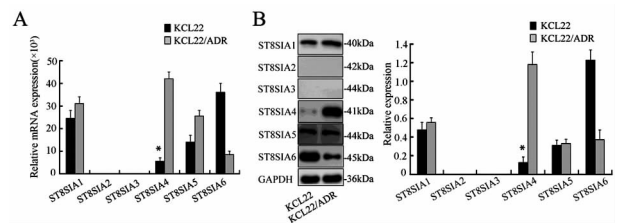
**1.2.8 免疫组织化学实验** 采用 SP 法进行免疫组织化学法染色,经过不同处理的小鼠处死后瘤体固定于 10% 多聚甲醛 24 h 以上,随后浸蜡、包埋和切片。固定好的瘤体经二甲苯和不同梯度乙醇脱蜡水化,用柠檬酸缓冲液进行高压抗原修复,

3% 过氧化氢阻断过氧化物酶,PBS 洗 3 次,滴加封闭液进行封闭。一抗按 1:50~1:100 比例稀释,孵育 2 h。将生物素化鼠抗兔 IgG 二抗滴加于组织切片上,37 °C 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,DAB 显色,随后苏木精复染核,梯度乙醇常规脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜下观察细胞核或细胞质出现棕色染色颗粒即为阳性结果。在 400 倍视野下计数 3 个视野的阳性细胞数,取其平均值。

**1.3 统计学处理** 所采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。每一项实验至少有 3 次结果。数值用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 ST8SIA4 在 CML 中的差异表达** RT-PCR 结果显示,在 KCL22/ADR 细胞中,ST8SIA4 的表达量较 KCL22 细胞显著增加,约为 5.2 倍(图 1A)。Western blot 分析进一步验证了蛋白表达水平同样的趋势(图 1B)。



A:RT-PCR 结果;B:Western blot 结果。

图 1 ST8SIA4 在 KCL22 和 KCL22/ADR 细胞中的差异表达

通过对 28 例临床患者 PBMC 分析,ST8SIA2、ST8SIA3 几乎不表达;ST8SIA1 和 ST8SIA5 有较高的表达量,但耐药与非耐药患者间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而 ST8SIA4 的表达在耐药与非耐药标本间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 ST8SIA4 在 CML 患者标本中的表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

基因	相对 mRNA 的表达( $\times 10^3$ )		P
	CML	CML/MDR	
ST8SIA1	23.28 ± 1.92	24.06 ± 2.76	0.181
ST8SIA2	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.083
ST8SIA3	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.108
ST8SIA4	23.87 ± 4.82	38.65 ± 5.34	0.001
ST8SIA5	16.97 ± 2.51	18.01 ± 4.18	0.214

**2.2 特异性下调 ST8SIA4 表达对 KCL22/ADR 细胞耐药性的影响** 与 KCL22/ADR 细胞及 KCL22/ADR-control shRNA 细胞相比,干扰 ST8SIA4 后的 KCL22/ADR 细胞株在 mRNA 和蛋白水平上表达均显著降低,见图 2。

进一步验证下调 ST8SIA4 对 KCL22/ADR 细胞抗肿瘤药物化学敏感性的影响,体外药敏实验结果显示(图 3A),作用于 KCL22/ADR-ST8SIA4 shRNA1 细胞的抗肿瘤药物的 IC<sub>50</sub> 值明显低于 KCL22/ADR-control shRNA 细胞的 IC<sub>50</sub> 值。体内药敏实验显示(图 3B),干扰 ST8SIA4 后,KCL22/ADR 细胞平均瘤体体积减小。免疫组织化学结果显示,干扰后的 KCL22/ADR 细胞的 ST8SIA4 的阳性表达率明显下降(图 3C)。

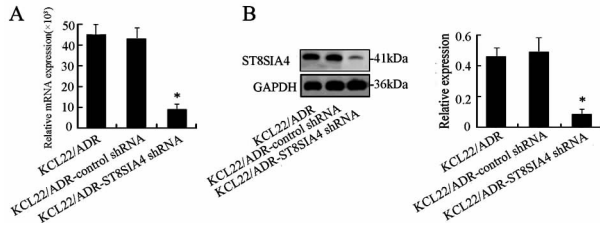
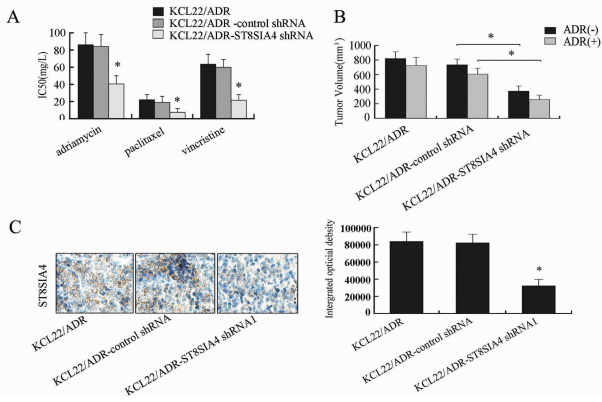


图 2 特异性下调 ST8SIA4 在 KCL22/ADR 细胞中的表达



A: 体外药敏实验; B: 体内药敏实验; C: 免疫组织化学结果。

图 3 特异性下调 ST8SIA4 表达对 KCL22/ADR 细胞耐药性的影响

### 3 讨论

白血病是一类常见的严重危害人类健康的造血系统恶性肿瘤<sup>[9]</sup>。化疗是白血病治疗必不可少的手段之一,白血病细胞对化疗药物的敏感性是决定化疗的关键,寻找新的治疗白血病耐药细胞株的靶点,对白血病的治疗具有重要意义<sup>[10]</sup>。白血病细胞常对临床上传统使用的多种化疗药物呈现出其内源性或获得性的药物耐受性,即多药耐药性(multidrug resistance, MDR),也是目前白血病治疗中最大的难题<sup>[11]</sup>。本研究糖基因 ST8SIA4 在 CML 耐药与非耐药患者标本间,以及 CML 细胞株 KCL22 与 KCL22/ADR 间 mRNA 和蛋白的表达差异,探讨糖基因 ST8SIA4 介导白血病多药耐药的可能机制。结果表明糖基因 ST8SIA4 在耐药患者中 mRNA 表达水平明显高于非耐药患者;下调糖基因 ST8SIA4 表达水平增加了 KCL22/ADR 细胞体内、体外对肿瘤药物的敏感性,减小平均肿瘤体积。糖基因是一组编码糖基转移酶、糖苷酶等糖类相关的基因<sup>[12]</sup>。唾液酸转移酶是糖基转移酶中的一类,唾液酸作为识别位点,参与细胞识别及信息传递,其表达调控还与肿瘤细胞的多药耐药性密切相关<sup>[13]</sup>。在各类型肿瘤的治疗过程中,异常表达的唾液酸化的糖复合物通常作为潜在的治疗靶点,肿瘤细胞膜上唾液酸化的糖复合物的异常表达通常导致恶性肿瘤细胞特性的改变<sup>[14]</sup>。而唾液酸糖基转移酶是催化唾液酸化的糖复合物合成必不可少的因素之一。在近期的报道中,ST8SIA4 蛋白的高表达在肿瘤的发生、发展过程中也有很大的作用,在急性粒细胞白血病细胞株及其耐 ADR 细胞株中,ST8SIA4 的表达量具有显著差异<sup>[15]</sup>。尽管临床上对 CML 患者的化疗已有明显的改善和提高,但肿瘤细胞的多药耐药仍然

是一个重大挑战。本研究进一步证实 ST8SIA4 在 CML 及其耐药患者 PBMC 中的差异表达。因此,差异表达的 ST8SIA4 基因可成为潜在的 CML 耐药标志物,从而为寻求逆转药物提供新策略和靶点。

### 参考文献

- [1] Liu J, Gao L, Zhang X, et al. Clinical efficiency of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation combined with imatinibin treatment of Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia[J]. J Third Mil Med Univ, 2012, 34(24): 2453-2455.
- [2] 房丽君, 涂怀军, 李剑. MSC 通 CXCL12/CXCR4 轴介导 CML 细胞对 TKI 耐药的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志 2015, 23(4): 1221-1224.
- [3] 邴振, 卢愿, 孙立荣, 等. 异常糖链糖蛋白在肿瘤发生发展中的作用及检测进展[J]. 齐鲁医学杂志, 2015, 30(2): 245-252.
- [4] 苗小艳, 马红叶, 张旭, 等. N-糖基化修饰在髓性白血病耐药中的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(5): 506-510.
- [5] Mondal S, Chandra S, Mandal C. Elevated mRNA level of hST6Gal I and hST3Gal V positively correlates with the high risk of pediatric acute leukemia[J]. Leuk Res, 2010, 34(4): 463-470.
- [6] 苗小艳, 魏巍, 杨光, 等. 唾液酸糖基转移酶 ST8SIA4 对 NB4/ADR 细胞耐药性的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(7): 761-765.
- [7] Schultz MJ, Swindall AF, Bellis SL. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans[J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(3-4): 501-518.
- [8] Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, et al. Sialidase and malignancy; a minireview[J]. Glycoconj J, 2004, 20(3): 189-198.
- [9] Deschler B, Luebbert M. Acute myeloid leukemia; Epidemiology and etiology[J]. Cancer, 2006, 107(9): 2099-2107.
- [10] 莫建华, 吴士良, 陈克平, 等. 不同白血病细胞 N-乙酰氨基乳糖转移酶 I-VII mRNA 的表达[J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(2): 173-174, 177.
- [11] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2006, 355(23): 2408-2417.
- [12] Narimatsu H. Construction of a human glycogene library and comprehensive functional analysis[J]. Glycoconj J, 2004, 21(1/2): 17-24.
- [13] Schauer R. Sialic acids; fascinating sugars in higher animals and man[J]. Zoology (Jena), 2004, 107(1): 49-64.
- [14] Zhu Y, Srivastana U, Ullah A, et al. Suppression of a sialyltransferase by antisense DNA reduces invasiveness of human colon cancer cells in vitro[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1536(2/3): 148-160.
- [15] Ma H, Zhou H, Song X, et al. Modification of sialylation is associated with multidrug resistance in human acute myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2015, 34(6): 726-740.