

[文章编号] 1000-4718(2006)12-2364-04

急性白血病患者同源结构域相互作用 蛋白激酶 2 的表达及其临床意义*

邢海燕, 张新伟, 田 征, 唐克晶, 秘营昌, 王 敏[△]

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] 目的: 探讨急性白血病患者中同源结构域相互作用蛋白激酶 2 (HIPK2) 基因的表达及其临床意义。方法: 应用半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测急性白血病患者 (AL) 及健康供者骨髓单个核细胞 (MNC) HIPK2 基因的表达。结果: ①初发 AL 患者 HIPK2 的相对转录水平为 0.364 ± 0.286 , 显著低于正常对照组 (1.160 ± 0.272) ($P < 0.01$); ②AML 患者中 M2b 的 HIPK2 的转录水平显著高于其它类型的 AML ($P < 0.05$); ③除 M2b 外的 AL 患者 HIPK2 的转录水平与 FAB 亚型、发病时外周血白细胞数、细胞或分子遗传学异常、乳酸脱氢酶水平、多药耐药基因 1 (mdr1) 表达、P170 表达及年龄等预后因素无显著相关性 ($P > 0.05$)。结论: HIPK2 在 AL 患者中低表达, 可能与 AL 的发生发展有关。

[关键词] 白血病; 基因, HIPK2; 基因表达

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

HIPK2 gene expression and its clinical significance in acute leukemia

XING Hai-yan, ZHANG Xin-wei, TIAN Zheng, TANG Ke-jing, BI Ying-chang, WANG Min

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, The Hospital of Hematopathy; Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Institute of Hematology, Tianjin 300020, China. E-mail: wangjxm@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) gene expression level and its clinical significance in acute leukemia (AL) patients. **METHODS:** HIPK2 mRNA was determined by semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (semi-quantitative RT-PCR) in patients with acute leukemia and healthy donors. The relative transcription level was compared between the study group and the control group. **RESULTS:** ① The relative expression level of HIPK2 mRNA in AL patients was 0.364 ± 0.286 , significantly lower than that in control (1.160 ± 0.272 , $P < 0.01$). ② HIPK2 gene expression level in M2b type was significantly higher than that in other acute myeloid leukemia (AML) subtypes ($P < 0.05$). ③ HIPK2 gene expression in AL, except M2b, had no relationship with the clinical prognostic factors such as cytogenetic or molecular aberrations, WBC counts, LDH, mdr1, P170 protein and age ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** AL has significantly lower HIPK2 mRNA expression as compared to normal control, which may be associated with leukemogenesis and/or disease progression of AL.

[KEY WORDS] Leukemia; Genes, HIPK2; Gene expression

同源结构域相互作用蛋白激酶 2 (homeodomain-interacting protein kinase 2, HIPK2) 是新近发现的一种核内丝氨酸/苏氨酸激酶, 它可以选择性使 p53 的 46 位丝氨酸磷酸化, 活化 p53, 并可通过多种途径增强 p53 的功能^[1,2]。不仅如此, 它还广泛参与转录调控而渐受重视。Pierantoni 等^[3]发现: 大多数甲状腺癌和乳腺癌患者低表达 HIPK2。由于血液系统恶

性疾病发病机制与实体瘤往往有很大区别, 而 HIPK2 在白血病患者中的研究甚少, 因而我们对初发急性白血病患者骨髓单个核细胞 (MNC) 的 HIPK2 基因转录水平进行检测, 并初步探讨其临床意义。

材 料 和 方 法

[收稿日期] 2005-04-01 [修回日期] 2005-06-28

* [基金项目] 天津市自然科学基金资助项目 (No. 043607311)

△通讯作者 Tel: 022-27307938-3169; E-mail: wangjxm@hotmail.com

1 研究对象

1.1 初治急性白血病患者 骨髓标本为本院门诊及住院的急性白血病(acute leukemia, AL)患者63例,其中男性35例,女性28例,年龄3-60岁,中位年龄23.0岁。患者根据MIC分型标准诊断^[4],急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)20例,急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)43例,其中M2a型8例,M2b7例,M39例,M4型9例,M5型8例。

1.2 对照组 健康供者10例。

2 MNC的分离和细胞总RNA的提取

2.1 MNC的分离 取肝素抗凝的骨髓3-5 mL,以Ficoll淋巴细胞分离液分离MNC,PBS洗涤2次,取 5×10^6 个细胞用于细胞总RNA提取。

2.2 细胞总RNA的提取 用Trizol(Invitrogen)试剂一步法提取细胞总RNA,12 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的质量,紫外分光光度仪测量吸光度值(A值)进行定量,调整总RNA浓度为1 g/L。

2.3 cDNA的合成 40 μ L体系,含有RNA 4 μ g,50 μ mol/L Oligo(dT)₁₆ 2 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L,0.1 μ mol/L DTT 4 μ L,30 U RNA酶抑制剂(TaKaRa),于65 $^{\circ}$ C水浴5 min,37 $^{\circ}$ C水浴2 min,加入200 U MMLV(Invitrogen),37 $^{\circ}$ C水浴60 min,70 $^{\circ}$ C 15 min终止反应,所得cDNA -20 $^{\circ}$ C保存备用。

3 半定量PCR反应

HIPK2引物用Primer3软件设计,正义链引物:5'-cgg gag ttc att gac ctg tt-3',反义链引物:5'-tat gga gac ttc ggg att gg-3',扩增片段344 bp。以 β -actin为内对照,正义链引物:5'-ctg caa tga gct gcg tgt ggc-3',反义链引物:5'-cag gtc cag acg cag gat ggc-3',扩增片段274 bp。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。总反应体系为50 μ L,含有cDNA 5 μ L,1 \times PCR缓冲液,dNTPs 100 μ mol/L,引物各0.4 μ mol/L,Taq酶(TaKaRa)1.25 U。扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性40 s,54 $^{\circ}$ C退火40 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,各待检基因循环数经过优化以确保各自反应处于指数增长期,其中HIPK2为32个循环, β -actin为24个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

4 PCR产物分析

4.1 HIPK2产物的确定 HIPK2的PCR产物经胶小量回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)回收,Hinf I酶切鉴定,预计酶切片段为52 bp和292 bp。PCR产物同时经上海博亚生物技术有限公司测序证实。

4.2 HIPK2 mRNA相对水平检测 以10 μ L PCR

扩增产物于1.0%琼脂糖凝胶上以100 V稳压电流电泳45 min左右,EB染色,GEL-PRO analyzer 2.0分析软件对各目条带的吸光度值进行分析,计算HIPK2相对转录水平(相对转录水平 = $A_{\text{HIPK2}}/A_{\beta\text{-actin}}$)。

5 病历资料分析

患者的外周血白细胞数、染色体、融合基因、乳酸脱氢酶(LDH)、多药耐药基因mdr1、P170等临床项目均由本院临床监测中心按常规方法检测。

6 统计学处理

应用SPSS 11.0软件,对计数资料进行K-S正态性检验,符合正态分布。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间显著性分析采用t检验,相关分析采用Pearson相关。

结 果

1 急性白血病患者与对照组HIPK2 mRNA的表达

AL患者HIPK2 mRNA RT-PCR部分结果见图1。PCR产物经Hinf I酶切结果见图2。PCR产物经测序证实确为HIPK2转录片段。

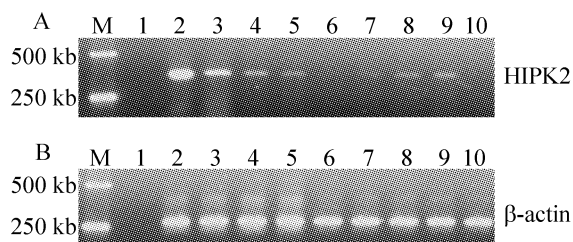


Fig 1 The expression of HIPK2 and β -actin. A: HIPK2; B: β -actin. M: marker DL2000; 1: negative control; 2: normal donor; 3-10: AL patients.

图1 HIPK2与 β -actin mRNA的表达

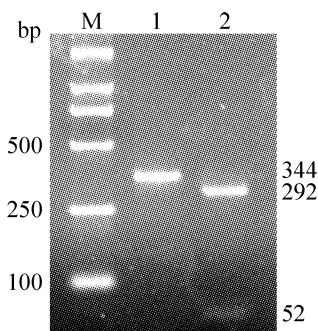


Fig 2 Amplified product of HIPK2 was digested by Hinf I to yield fragments of 52 and 292 bp. M: marker DL2000; 1: HIPK2 PCR product; 2: fragments of HIPK2 digested by Hinf I.

图2 HIPK2 PCR产物的Hinf I酶切结果

2 各组HIPK2 mRNA变化

初发AL组HIPK2 mRNA相对水平为 $0.364 \pm$

0.286, 显著低于正常对照组 (1.160 ± 0.272) ($P < 0.01$)。表明: 初发 AL 的单个核细胞 HIPK2 mRNA 表达比正常人显著降低。其中 ALL 组与 AML 组分别为 0.352 ± 0.298 和 0.388 ± 0.263 , 两组相比没有显著差异 ($P > 0.05$)。

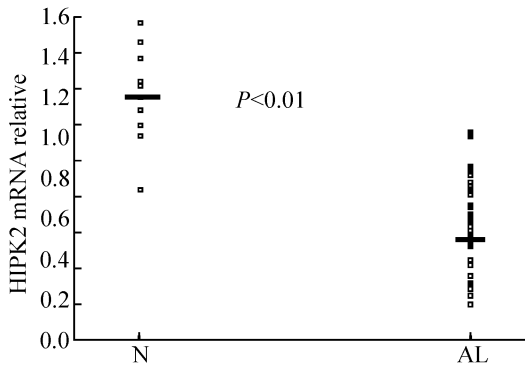


Fig 3 HIPK2 gene expression in bone marrow MNC of patients with AL and normal donors. N; normal donors; AL; AL patients; “-” shows mean value .

图3 HIPK2 mRNA 在 AL 患者和正常供者中的相对表达情况

3 HIPK2 基因表达与 AL 患者年龄、性别之间的关系

17 例儿童 (<14 岁) AL 组的 HIPK2 mRNA 相对水平为 0.338 ± 0.246 , 46 例成人为 0.373 ± 0.301 ; 28 例女性为 0.400 ± 0.274 , 35 例男性为 0.335 ± 0.301 , 组间比较差异均无显著 ($P > 0.05$)。

4 HIPK2 基因转录水平与发病时白细胞数之间的关系

13 例高白细胞 ($WBC > 100 \times 10^9$ cells/L) AL 与其余 50 例 AL 的 HIPK2 mRNA 相对水平分别为 0.351 ± 0.291 和 0.367 ± 0.287 , 两组相比没有显著差异 ($P > 0.05$)。

5 HIPK2 基因转录水平与 FAB 分型之间的关系

7 例 M2b 患者的 HIPK2 mRNA 表达水平为 0.640 ± 0.324 , 明显低于正常供者 ($P < 0.01$), 但显著高于其它 AML 亚型 ($P < 0.01$)。

6 HIPK2 基因表达与 AML 临床预后因素的关系

HIPK2 基因转录水平与 AL 发病时 LDH 水平高低、mdr1 基因及 P170 蛋白的表达等预后因素均无显著相关 (相关系数分别为 $r = -0.235$ 和 $r = -0.408$, $P > 0.05$)。

讨 论

p53 基因是目前已知的、最为重要的抑癌基因。许多恶性肿瘤的发生发展与 p53 功能的丧失有关, 如: 超过一半的实体瘤患者存在 p53 缺失或突变, 而

在急性白血病中仅 10% 的病例有类似情况, 提示 p53 在急性白血病中的异常有别于其它恶性肿瘤, 可能还存在某些调节机制的改变而导致 p53 功能受损^[5,6]。

HIPK2 是新近发现的 p53 的一个重要修饰蛋白, 从人类到美丽线虫高度保守。人类 HIPK2 定位于染色体 7q33 - q35, 其编码蛋白与小鼠氨基酸序列 98% 同源。该蛋白属于 DYRK 激酶 (双重特异性酪氨酸磷酸激酶) 家族, 能够增强同源蛋白转录活性, 其 192 - 520 为一个蛋白激酶基序, 583 - 798 为同源相互作用结构域, 其中 221 位赖氨酸高度保守, 在激酶基序与 ATP 的结合中极其重要, 一旦突变, 激酶活性完全丧失^[2,7]。

Fukunaga - Takenaka 等^[8] 发现低浓度一氧化氮选择性阻断 p53 的 46 位丝氨酸磷酸化后, 能够减少紫外线诱发的人类 p53 野生型结肠肿瘤细胞系凋亡, 表明 p53 的 46 位丝氨酸磷酸化在 p53 发挥功能时起重要作用。HIPK2 选择性磷酸化 p53 的 46 位丝氨酸, HIPK2 缺失或反义寡核苷酸阻断 HIPK2 也可削弱紫外线诱发的凋亡^[2]。Di Stefano 等^[9] 发现: 顺铂能够促进 HIPK2 蛋白的表达并增强其激酶活性, 用丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂 SB203580 和 RNA 干扰阻断 HIPK2 后, 可有效抑制顺铂诱导的凋亡, 提示 HIPK2 对 p53 的磷酸化在顺铂诱发的细胞凋亡中起关键作用。

Wang 等^[10] 研究发现 P53 的重要拮抗基因 Mdm2 (murine double minutes) 在白血病患者中表达升高, 可使 P53 泛素化降解而失活。HIPK2 过表达不仅能够下调 Mdm2 的蛋白表达 而且可以拮抗 Mdm2 对 P53 的降解, 提高 P53 的稳定性。

HIPK2 不仅能够与 P53 结合, 而且能够与 P53 家族的其它成员 P63 和 P73 结合, 强化这些蛋白在细胞周期调节、促凋亡及抑制集落形成方面的作用^[11]。

Wang 等^[12] 通过 Northern 杂交发现: 与正常人造血组织相比, 白血病细胞系 HL - 60、K562 和 MOLT - 4 及 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji 和 Daudi 细胞中 HIPK2 转录水平下调。本研究发现, 初发 AL 患者 MNC 中 HIPK2 基因表达远低于正常人, 其中有近 1/3 的患者 HIPK2 的表达为阴性, 提示 HIPK2 在 AL 中转录水平的过度下调可能与 AL 的发生发展有密切关系。AML 中的 M2b HIPK2 的表达明显高于其它亚型, 提示这一亚型的良好预后可能与 HIPK2 的较高表达有一定关系。HIPK2 基因转录水平与 AL 发病时的年龄、LDH 水平、mdr1 基因及 P170 蛋白的表

达等预后因素均无显著相关,其与 AL 患者临床预后的关系有待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Kim YH, Choi CY, Lee SJ, et al. Homeodomain – interacting protein kinases, a novel family of co – repressors for homeodomain transcription factors [J]. J Biol Chem, 1998, 273(40): 25875 – 25879.
- [2] D’Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, et al. Homeodomain – interacting protein kinase – 2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 11 – 19.
- [3] Pierantoni GM, Bulfone A, Pentimalli F, et al. The homeodomain – interacting protein kinase 2 gene is expressed late in embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(3): 942 – 947.
- [4] 张之南,沈 悌 主编. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 184 – 214.
- [5] Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance [J]. Hum Mutat, 2003, 21(3): 277 – 284.
- [6] Lu X. p53: a heavily dictated dictator of life and death [J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(1): 27 – 33.
- [7] Hofmann TG, Moller A, Sirma H, et al. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain – interacting protein kinase – 2 [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 1 – 10.
- [8] Fukunaga – Takenaka R, Fukunaga K, Tatemichi M, et al. Nitric oxide prevents UV – induced phosphorylation of the p53 tumor – suppressor protein at serine 46: a possible role in inhibition of apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308(4): 966 – 974.
- [9] Di Stefano V, Rinaldo C, Sacchi A, et al. Homeodomain – interacting protein kinase – 2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin – mediated apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2004, 293(2): 311 – 320.
- [10] Wang Y, Debatin KM, Hug H. HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels [J]. BMC Mol Biol, 2001, 2(1): 8 – 17.
- [11] Kim EJ, Park JS, Um SJ. Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2002, 277(35): 32020 – 32028.
- [12] Wang Y, Hofmann TG, Runkel L, et al. Isolation and characterization of cDNAs for the protein kinase HIPK2 [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1518(1 – 2): 168 – 172.

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办,安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文,辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003、2005 年两届国家期刊奖百种重点期刊奖,第 1、第 2 届国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖,第 1、第 2、第 3 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖,第 1 届华东地区优秀期刊一等奖,第 2 届华东地区最佳期刊奖。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项奖金资助。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊;被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版,2004 版均选定为药理学类核心期刊;被国际核心期刊研究会确定为核心期刊;被国家科委科技信息研究所确定为科技论文统计源期刊即中国科技核心期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract(美国)、《PЖ》(俄罗斯)、Biochemical Abstract(美国)、Index Medicus(美国)、EMBASE/Excerpta Medica(荷兰)、Kunst and Wissen(德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international (CAB international, 英国)等收录利用。连续 9 年进入《CA 千种表》。

医师用药要懂药理,药师药研人员要更懂药理。中国药学报,医师药师都需要

本刊为月刊,大 16 开 128 页,彩色铜版纸印刷,每期定价 15.00 元(零售:20 元/期),全年 180.00 元。邮发代号:26 – 52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至我刊编辑部(零售价:每期 20 元),免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:0551 – 5161221、5161222,电子邮箱:cpb@ahmu.edu.cn