

· 论 著 ·

XPD/ERCC2 mRNA 在柔红霉素处理的 THP-1 细胞系及急性髓系白血病患者中表达的研究

闫寒冰, 王晓鸥, 邓娜, 樊华

中国医科大学附属第四医院血液内科, 辽宁 沈阳 110000

摘要: **目的** 探讨柔红霉素对人着色性干皮病基因组 D(XPD)[又称切除修复交叉互补基因 2(ERCC2)]的影响,以及 XPD/ERCC2 基因与急性髓系白血病发病、缓解的相关性。**方法** 检测并比较急性髓系白血病 THP-1 细胞系采用不同浓度(0.025、0.05、0.25、1.25 $\mu\text{mol/L}$)、不同作用时间(12、24 h)柔红霉素处理后的 XPD/ERCC2 mRNA 的相对表达量。检测并比较急性髓系白血病初诊组(26 例)、完全缓解组(21 例)及缺铁性贫血(35 例)三组患者骨髓单个核细胞 XPD/ERCC2 mRNA 的相对表达量。**结果** THP-1 细胞系用 0.025、0.05、0.25、1.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度盐酸柔红霉素处理 12 h 时,XPD/ERCC2 mRNA 相对表达量分别是 0.949 ± 0.184 、 1.738 ± 0.495 、 1.629 ± 0.191 、 2.376 ± 0.908 ,处理 24 h 时相对表达量分别为 1.394 ± 0.128 、 2.298 ± 0.698 、 2.318 ± 0.089 、 4.156 ± 1.617 ,THP-1 细胞系 XPD/ERCC2 mRNA 相对表达量随柔红霉素浓度的递增和作用时间的递增而递增,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。初诊组、完全缓解组、缺铁性贫血组患者髓单个核细胞中 XPD/ERCC2 mRNA 相对表达量比较无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** XPD/ERCC2 mRNA 在 THP-1 细胞系中的相对表达量,随柔红霉素药物浓度增加而增加,随药物作用时间增加而增加,其表达与急性髓系白血病患者的发病、缓解无相关性。

关键词: 人着色性干皮病 D 组基因/切除修复交叉互补基因 2; 柔红霉素; 急性髓系白血病; THP-1 细胞系

中图分类号: R 733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)07-0912-04

Expressions of XPD/ ERCC2 mRNA in THP-1 cell line treated with daunorubicin and in patients with acute myeloid leukemia

YAN Han-bing, WANG Xiao-ou, DENG Na, FAN Hua

Department of Hematology, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110000, China

Corresponding author: FAN Hua, E-mail: fanhua66cn@163.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of daunorubicin on human xeroderma pigmentosum group D(XPD), also known as excision repair cross-complementing group 2(ERCC2) gene and the association of XPD/ERCC2 gene with pathogenesis and remission of acute myeloid leukemia(AML). **Methods** The relative expression levels of XPD/ERCC2 mRNA in AML THP-1 cell line treated with daunorubicin in different concentrations (0.025, 0.05, 0.25, 1.25 $\mu\text{mol/L}$) and different action time (12 h, 24 h) were detected and compared, and its relative expression levels in bone marrow mononuclear cells in newly diagnosed AML group ($n = 26$), AML in complete remission group ($n = 21$) and iron deficiency anemia group ($n = 35$) were detected and compared. **Results** The relative expression levels of XPD/ERCC2 mRNA in THP-1 cell lines treated with different concentrations of daunorubicin (0.025, 0.05, 0.25, 1.25 $\mu\text{mol/L}$) were 0.949 ± 0.184 , 1.738 ± 0.495 , 1.629 ± 0.191 , 2.376 ± 0.900 for 12 h and 1.394 ± 0.128 , 2.298 ± 0.698 , 2.318 ± 0.089 , 4.156 ± 1.617 for 24 h respectively, which increased progressively with the increase of concentrations of daunorubicin and action time of daunorubicin. (all $P < 0.05$). There were no significant differences in the relative expression levels of XPD/ERCC2 mRNA in bone marrow mononuclear cells of newly diagnosed AML group, AML in complete remission group and iron deficiency anemia group ($P > 0.05$). **Conclusions** The relative expression level of XPD/ERCC2 mRNA in THP-1 cell line increases with the increase of concentration and action time of daunorubicin. There is no association of XPD/ERCC2 mRNA expression with pathogenesis and remission of acute myeloid leukemia.

Key words: Human xeroderma pigmentosum group /excision repair cross-complementing group2; Daunorubicin; Acute

myeloid leukemia; Human monocytic leukemia cell lines

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia)是一类造血干、祖细胞异常增殖的血液系统恶性疾病。柔红霉素是急性髓系白血病基础化疗药物,通过与 DNA 结合,阻碍 DNA 合成和依赖 DNA 的 RNA 合成反应,从而阻止肿瘤细胞的生长^[1]。人着色性干皮病基因组 D(xeroderma pigmentosum group D,XPD)又称切除修复交叉互补基因 2(excision repair cross-complementing group 2,ERCC2),是一种重要的 DNA 修复基因,参与真核生物转录起始和 DNA 核苷酸切除修复作用^[2-3],有研究显示 XPD/ERCC2 基因可能与多种肿瘤存在相关性,DNA 修复能力低于一般人群平均水平的个体对肿瘤易感,DNA 修复能力的个体差异可能是决定肿瘤遗传易感性极其重要的因素,DNA 修复基因在防止基因组突变、肿瘤发生中起着重要作用,同时也将影响患者对蒽环类化疗药物的敏感性^[2,4-5]。本研究探讨柔红霉素对 XPD/ERCC2 的影响,以及 XPD/ERCC2 基因与急性髓系白血病发病、缓解的相关性,并报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 急性髓系白血病 THP-1 细胞系来自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。急性髓系白血病患者为 2015 年 11 月至 2016 年 4 月期间于我院就诊并确诊的 47 例,男性 28 例,女性 19 例;中位年龄 44 岁。诊断标准参照 8 版《内科学》确定,诊断为急性髓系白血病 M2、M3、M4、M5。其中初诊组 26 例、完全缓解组 21 例。选择同期诊断为缺铁性贫血的 35 例作对照组,男 18 例,女 17 例;中位年龄 55 岁。病例组及对照组用 EDTA 抗凝管采集 2 ml 骨髓液。三组患者一般情况见表 1。

表 1 急性髓系白血病两组与缺铁性贫血患者一般情况 (例)

组别	例数	性别 男/女	年龄		分型			
			≤44 岁	>44 岁	M2	M3	M4	M5
初诊组	26	18/8	11	15	7	5	3	11
完全缓解组	21	10/11	13	8	5	6	5	5
缺铁性贫血组	35	18/17	15	20	—	—	—	—

1.2 试剂 PRM1640 培养基(Hyclone),胎牛血清(CLARK),培养细胞 RNA 提取试剂盒、RNAprep Pure 血液总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司),DNA marker DL 2000、real-time PCR 试剂盒、逆转录试剂盒(TakaRa),柔红霉素(海正辉瑞制药),引物(大连宝生物工程有限公司)XPD/ERCC2 正义链:GCTCCCGCAAAAACCTGTGTAT,反义链:CTGTG-

GCATTTCCCATCG(117 bp),GAPDH 正义链:ACT-TCAACAGCGACACCCACT,反义链:GCCAAATTCGT-TGTCATACCAG(104 bp)。

1.3 细胞培养及给药方案 急性髓系白血病 THP-1 细胞系用 10% 胎牛血清 RPM1640 培养基,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,每 2~3 天换液或传代。实验剩余细胞-80℃深低温冰箱冻存。将对数生长期细胞用台盼蓝染色计数活细胞数。取 0.5×10⁶个/ml 接种于六孔板中,分别以 0、0.025、0.05、0.25、1.25 μmol/L^[6]终浓度柔红霉素处理细胞 12 h、24 h,分别收集细胞。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测 XPD/ERCC2 mRNA 的相对表达量 应用培养细胞总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,应用 RNAprep Pure 血液总 RNA 提取试剂盒提取所有研究对象细胞 RNA,cDNA 反转录试剂盒合成 cDNA 反应体系,以 0 μmol/L 柔红霉素组为对照,Real-time PCR 检测柔红霉素处理的 THP-1 细胞系以及急性髓系白血病患者骨髓单个核细胞 XPD/ERCC2 mRNA 的相对表达量。反应条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火延伸 30 s。基因表达量分析采用 2^{-ΔΔCT}法^[7]行相关数据的处理,全部管家基因平均 CT 值为对照,ΔΔCT=ΔCT_{实验样本}-ΔCT_{校准样本},ΔCT=CT_{目的基因}-CT_{内参基因}。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件。试验数据结果计量资料予以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态及方差齐性检测,偏态数据先行自然对数转换为近似正态,三组患者间 XPD/ERCC2 mRNA 表达水平的比较采用单因素方差分析,柔红霉素处理的 THP-1 细胞系 XPD/ERCC2 mRNA 表达水平的比较采用重复测量资料的多因素方差分析。设定 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度柔红霉素、不同处理时间 THP-1 细胞系 XPD/ERCC2 mRNA 的表达水平比较 THP-1 细胞系用 0.025、0.05、0.25、1.25 μmol/L 浓度盐酸柔红霉素处理 12 h 时 XPD/ERCC2 mRNA 相对表达量分别是 0.949±0.184、1.738±0.495、1.629±0.191、2.376±0.908(P<0.05),处理 24 h 时相对表达量分别为 1.394±0.128、2.298±0.698、2.318±0.089、4.156±1.617(P<0.05)。XPD/ERCC2 mRNA 相对表达量随柔红霉素浓度递增而递升,随作用时间递增

而递升,差异均有统计学意义。见图 1。

2.2 急性髓系白血病患者初诊组、完全缓解组及对照组骨髓单个核细胞 XPD/ERCC2 mRNA 表达水平

XPD/ERCC2 mRNA 在急性髓系白血病初诊组、完全缓解组和缺铁性贫血患者骨髓单个核细胞中的相对表达量分别为 1.934 ± 2.211 、 1.113 ± 1.373 、 0.978 ± 1.739 ,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

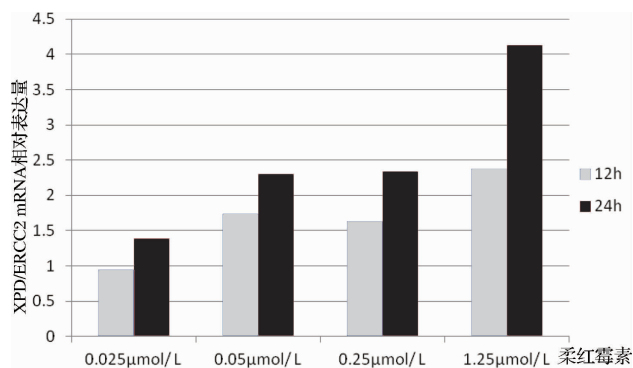


图 1 不同浓度柔红霉素、不同处理时间 THP-1 细胞系 XPD/ERCC2 mRNA 表达水平

3 讨论

XPD 基因是一种重要的 DNA 修复基因,其编码蛋白是 ATP 依赖的 DNA 解螺旋酶,为转录因子 II H (TF II H) 的核心成份,TF II H 有 10 个亚基蛋白,分别是 P62、P52、P44、P34 和 P8 构建的核心区,以及细胞周期蛋白 H (cyclin H)、MAT1、细胞周期蛋白依赖性激酶 7 (CDK7) 二个 CDK 活化激酶及其 (CAK) 区^[8]。XPD 解螺旋酶通过锚定 CAK 激酶 (cyclin H, MAT1, CDK7) 与 TF II H 相连接^[8]。XPD 在转录起始以及核苷酸损伤修复时都起重要作用。在核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 时, XPD 发挥 5'→3'解螺旋酶活性负责打开受损的 DNA 双螺旋, XPD 维持 TF II H 复合物结构的稳定,并促进转录活性的放大^[2-3,8-9]。XPD 基因缺陷可导致 Cockayne 综合征及毛发低硫营养不良^[8,10],着色性干皮病 (XP) 患者的高致癌性也说明了 DNA 修复功能的缺陷与肿瘤存在必然联系。有学者研究将构建的 XPD 反义表达质粒导入 NER 途径功能正常的肺腺癌细胞株 A549 中,结果肺癌细胞 DNA 损伤修复能力减低^[11]。张庆燕等^[12]将 XPD 转染人肝癌 HepG2 细胞后,会抑制肝癌细胞的增殖,并促进其凋亡。既往研究提示,下调淋巴细胞中 XPD mRNA 表达,是头颈部肿瘤和食管癌的高危因素^[13]。推测 XPD 的异常表达或缺失可能与肿瘤的发生发展及肿瘤细胞增殖、凋亡甚至化疗药物抗药性的产生有密切关系。

柔红霉素是急性髓系白血病基础化疗药物,能直

接与 DNA 结合,阻碍 DNA 合成和依赖 DNA 的 RNA 合成反应,从而阻止肿瘤细胞的生长^[1]。本研究结果显示,柔红霉素作用于 THP-1 细胞系, XPD/ERCC2 mRNA 表达量随浓度增加而增加,随作用时间增加而增加。从 NER 角度推测柔红霉素作用后的细胞株反应性增加 XPD/ERCC2 基因表达,可为将来研究柔红霉素药物敏感性提供参考,也与汤春辉等^[14]研究卵巢癌实体瘤组织经过培养,分别加入阿霉素、环磷酰胺等抗癌药物 ERCC2 基因表达量不同程度增加的研究结果类似。

既往研究提示 XPD 低表达与多种恶性肿瘤的发病及预后有相关性。砷中毒患者皮肤组织癌前病变组和癌变组 XPD mRNA 相对表达量低于正常对照组,同时这部分患者血液中 XPD mRNA 相对表达量也低于对照组^[15]。在头颈癌患者的癌组织中,特别是具有吸烟史的癌症组织中观察到 XPD mRNA 表达水平降低, XPD 下调与苯并芘暴露和人类头颈癌生存率相关^[13]。汤春辉等^[14]发现卵巢癌患者癌组织 XPD/ERCC2 在部分卵巢癌实体瘤患者中低表达。何昌霞等^[16]在晚期胃癌患者的研究中发现, ERCC2 阳性表达者,其缓解率均较阴性表达者低。总结以上结论中恶性肿瘤的 XPD 基因表达减低,有以下几方面原因:(1)外界毒物刺激,如苯并芘等,毒物可与启动子上异物反应元件 (XRE) 结合,调控目的基因表达,而 XPD 启动子基因序列中发现有类似与 XRE 样的结构序列,导致毒物通过 XPD 基因启动子上类 XRE 样结构途径,降低 XPD 表达^[13];(2)由于遗传的改变或基因多态性, Wolfe 等^[17]研究发现 R156R、D312N 和 K751Q 多态性与 XPD 基因表达有相关性。

与上述研究不同的是,本研究中 XPD/ERCC2 mRNA 在急性髓系白血病初诊、完全缓解患者中及缺铁性贫血组表达并无差异,考虑与以下原因有关:(1)推测 XPD/ERCC2 基因为 DNA 修复基因,但是 DNA 修复途径有多种,弱化了 XPD 基因的作用。(2)以往研究均为实体肿瘤组织与癌旁正常组织的基因表达差异,但是血液系统疾病骨髓中肿瘤细胞负荷存在差异,可能影响实验结论。(3)目前关于 XPD 基因与白血病的许多研究集中在基因多态性方面,但是有关 XPD 基因表达与基因多态性的相关性研究尚未见报道, Shi 等^[18]研究显示 XPD T751G 突变在急性髓系白血病发病中是一危险因素。但是汤芳芳等^[19]发现 XPD T751G 突变基因型与急性淋巴细胞白血病发病无明显相关性。Kuptsova-Clarkson 等^[20]研究发现, XPD 基因密码子 312 和 751 突变基因型和含有至少一个等位基因单倍型,可更好地预测治疗反

应,在继发性急性髓系白血病患者中,XPD 312 Asn/Asn 和 XPD 751 Gln/Gln 基因型达到完全缓解的几率更高。因此关于急性髓系白血病中 XPD 基因表达与 XPD 突变之间的关系将成为下一步研究的重点。(4)或由于本研究样本量少的局限。因此有待扩大研究样本作进一步探讨。

参考文献

- [1] 陈旺. DNA 拓扑异构酶 II α 拟天然产物抑制剂的设计合成与抗肿瘤活性研究[D]. 济南:山东大学,2015.
- [2] Abdulrahman W, Iltis I, Radu L, et al. ARCH domain of XPD, an anchoring platform for CAK that conditions TFIIH DNA repair and transcription activities[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): E633 – E642.
- [3] Fishburn J, Tomko E, Galburt E, et al. Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIH and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(13): 3961 – 3966.
- [4] 张凌云, 罗忠金, 张吉翔. XPD 基因多态性与肺癌[J]. *江西医学院学报*, 2006, 46(3): 180 – 182.
- [5] 陈亦欣, 文飞球, 曹华, 等. DNA 修复基因 XPD 基因型与铂类药物化疗敏感性的关系[J]. *肿瘤基础与临床*, 2011, 24(3): 204 – 206.
- [6] 覃凤娟. 探讨 NPM1 突变对白血病细胞化疗敏感性的影响及其分子机制[D]. 重庆:重庆医科大学,2012.
- [7] Rao X, Lai D, Huang X. A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis[J]. *J Comput Bioinforma Biomath*, 2013, 3(3): 71 – 85.
- [8] Kuper J, Braun C, Elias A, et al. In TFIIH, XPD helicase is exclusively devoted to DNA repair[J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(9): e1001954.
- [9] Fuss JO, Tainer JA. XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2011, 10(7): 697 – 713.
- [10] Stettler K, Li X, Sandrock B, et al. A Drosophila XPD model links cell cycle coordination with neuro-development and suggests links to cancer[J]. *Dis Mod Mech*, 2014, 8(1): 81 – 91.
- [11] 蒋易, 周李承, 吴晓明, 等. 核苷酸切除修复基因 XPD 反义 RNA 表达载体的构建及功能研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2003, 32(3): 242 – 245.
- [12] 张庆燕, 赵慧, 罗文, 等. 人剪切修复基因 XPD 肝癌对人 HepG2 细胞中 Rb 和 MAD2 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(5): 798 – 803.
- [13] Lin CS, Chiou WY, Lee KW, et al. Xeroderma pigmentosum, complementation group D expression in H1299 lung cancer cells following benzo[a]pyrene exposure as well as in head and neck cancer patients[J]. *J Toxicol Environ Health Part A*, 2016, 79(1): 39 – 47.
- [14] 汤春辉, 顾星星. 卵巢癌实体瘤 ERCC2 表达与肿瘤发生及耐药的关系[J]. *肿瘤研究与临床*, 2004, 16(1): 14 – 16.
- [15] 肖芸, 张爱华, 黄晓欣. XPD mRNA 及蛋白表达与燃煤型砷中毒关系[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(3): 318 – 320.
- [16] 何昌霞, 顾康生. 晚期胃癌化疗中含铂类药物敏感性与切除修复交叉互补基因 2 和 P53 蛋白表达的相关性[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(23): 2309 – 2310, 2313.
- [17] Wolfe KJ, Wickliffe JK, Hill CE, et al. Single nucleotide polymorphisms of the DNA repair gene XPD/ERCC2 alter mRNA expression[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17(11): 897 – 905.
- [18] Shi JY, Ren ZH, Jiao B, et al. Genetic variations of DNA repair genes and their prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(1): 233 – 238.
- [19] 汤芳芳, 欧阳建, 徐勇, 等. XPA、XPC、XPD、XRCC1 基因单核苷酸多态性与急性淋巴细胞白血病易感性的关系[J]. *中华内科杂志*, 2011, 50(10): 859 – 862.
- [20] Kuptsova-Clarkson N, Ambrosone CB, Weiss J, et al. XPD DNA nucleotide excision repair gene polymorphisms associated with DNA repair deficiency predict better treatment outcomes in secondary acute myeloid leukemia[J]. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2010, 1(4): 278 – 294.

收稿日期:2017-02-11 修回日期:2017-03-06 编辑:石嘉莹