

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002283

Fbxw7 在急性 T 淋巴细胞白血病中的表达及其对细胞生长的抑制作用

黄文强¹, 胡松元², 靳松³, 龙思方¹, 邹路红⁴, 严匡华⁵

(1. 黔南民族医学高等专科学校医学检验系, 都匀 550639; 2. 黔南州人民医院 黔南民族医学高等专科学校第一附属医院检验科, 都匀 558000; 3. 黔南州中医医院 黔南民族医学高等专科学校第二附属医院检验科, 都匀 558000; 4. 贵州医科大学第三附属医院检验科, 都匀 558000; 5. 河南大学第一附属医院血液科, 开封 475001)

【摘要】目的:观察 F 框/WD40 域蛋白 7(Fbxw7)在急性 T 淋巴细胞白血病中的表达,探讨其对细胞生长的影响及其机制。**方法:**采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 62 例急性 T 淋巴细胞白血病患者中的 Fbxw7 mRNA 表达情况,将携带 Fbxw7 的过表达慢病毒载体转至白血病 Jurkat 细胞后,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测其转染效果,MTT 法检测 Jurkat 细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞周期变化和细胞凋亡情况,Western blot 检测 c-Myc 蛋白和周期蛋白 E(Cyclin E)的表达。**结果:**急性 T 淋巴细胞白血病复发组患者和初发组患者中 Fbxw7 mRNA 表达水平较正常健康人明显降低 ($P<0.05$); 病毒转染后, Fbxw7 组(转染携带 Fbxw7 过表达慢病毒载体)中 Fbxw7 mRNA 和蛋白质的相对表达水平较对照组(未转染的细胞)、阴性组(转染对照慢病毒载体)明显升高($P<0.05$); 转染 24 h 后,细胞增殖受影响不明显($P>0.05$),而转染 48 h 和 72 h 后,细胞增殖明显受到抑制($P<0.05$); 转染 48 h 后,与对照组相比, Fbxw7 组 Jurkat 细胞中 G₀/G₁ 期细胞所占比例和细胞凋亡率明显升高, S 期和 G₂/M 期细胞所占百分比、c-Myc 和 Cyclin E 蛋白的相对表达量明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**Fbxw7 在急性 T 淋巴细胞白血病中低表达,上调其表达可抑制白血病 Jurkat 细胞增殖,促进细胞凋亡,其作用机制可能与下调 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白表达有关。

【关键词】急性 T 淋巴细胞白血病; Fbxw7; 细胞生长; 抑制作用

【中图分类号】R733.71

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-11-20

Expression of Fbxw7 in acute T lymphoblastic leukemia and its inhibitory effect on cell growth

Huang Wenqiang¹, Hu Songyuan², Jin Song³, Long Sifang¹, Zou Luhong⁴, Yan Kuanghua⁵

(1. Department of Medical Laboratory, Qiannan Medical College for Nationalities; 2. Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Qiannan/ The First Affiliated Hospital of Qiannan Medical College for Nationalities; 3. Department of Clinical Laboratory, Qiannan State Hospital of Traditional Chinese Medicine/ The Second Affiliated Hospital of Qiannan Medical College for Nationalities; 4. Department of Clinical Laboratory, The Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University; 5. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Henan University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of F-box and WD40 domain-containing 7(Fbxw7) in acute T lymphocyte leukemia and its effect on cell growth as well as its mechanism. **Methods:** The mRNA expression of Fbxw7 in 62 patients with acute T lymphocyte leukemia was detected by RT-PCR. The lentivirus vector carrying Fbxw7 overexpression was transferred to leukemia Jurkat cells and the effect of transfection was tested by RT-PCR and Western blot. And the proliferation of Jurkat cells was measured by MTT assay. The cell cycle and apoptosis were examined by flow cytometry, and the expression of c-Myc and Cyclin E protein was checked by Western blot. **Results:** Expression levels of Fbxw7 mRNA in relapse group and initial group were significantly lower than those in normal healthy group ($P<0.05$). After transfection, relative expression levels of Fbxw7 mRNA and protein in the Fbxw7 overexpression

作者介绍: 黄文强, Email: 371353043@qq.com,

研究方向: 医学检验。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1047.030.html>

(2019-09-18)

group (transfected with Fbxw7 overexpressed lentivirus vector) were significantly higher than those in the control group (no transfected cells) and negative control group (transfected with control lentivirus vector) ($P<0.05$). Cell proliferation was not

significantly influenced ($P>0.05$) after transfection of 24 h, while was significantly inhibited after transfection of 48 h and 72 h ($P<0.05$). After transfection of 48 h, when compared with control and negative control groups, cell apoptosis and the proportion of cells in G_0/G_1 phase of Jurkat cells were significantly increased in Fbxw7 group, S phase and G_2/M phase were significantly decreased, and relative expression levels of c-Myc and Cyclin E were significantly decreased, all with statistically significant difference ($P<0.05$).

Conclusion: Fbxw7 is low expression in acute T lymphoblastic leukemia, its overexpression can inhibit the proliferation of Jurkat leukemia cells and promote cell apoptosis, and its mechanism may be related to the down-regulation of c-Myc and Cyclin E protein expression.

[Key words] acute T lymphocyte leukemia; F-box and WD40 domain-containing 7; cell growth; inhibition

急性 T 淋巴细胞白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 是一种来源于 T 淋巴细胞恶性转化使造血系统恶性克隆的遗传学高度异质性疾病。儿童和成人的发病率分别占 15% 和 25%, 近年来 T-ALL 在我国的发病率有上升趋势^[1-2]。T-ALL 主要的临床表现为原始细胞比例、外周血高白细胞计数升高、纵隔占位, 具有病情进展快和预后差等特点, 化疗是其主要的治疗方法。随着治疗研究的不断发展, 多药联合化疗也表现出较好的治愈率, 但其临床应用仍面临着耐药、毒副作用和复发等挑战, 因此研究 T-ALL 的发病机制、寻找新的治疗靶点对 T-ALL 的治疗具有重要意义。

F 框/WD40 域蛋白 7 (F-box and WD40 domain-containing 7, Fbxw7) 是 F 框蛋白家族的重要成员, 也是 SCF (SKIP-CUL-F 框) 类泛素连接酶 E3 复合体重靶蛋白识别的重要组分, 可通过靶向降解 c-Myc 和 Cyclin E 等多种癌蛋白, 在肿瘤细胞中发挥重要调控作用。大量研究显示, Fbxw7 在胃癌、肺癌和结直肠癌等多种肿瘤中发生突变、缺失或异常表达, 扮演抑癌基因的角色, 调控肿瘤细胞的增殖、凋亡等生理过程, 与肿瘤的发生发展密切相关^[3-5]。目前认为, 造血前体细胞的遗传基因改变导致细胞增殖过度和凋亡受阻可能是 T-ALL 发病的主要机制^[6-7]。近年来, Fbxw7 在 T-ALL 中的研究备受关注。有研究发现, Fbxw7 在 T 细胞白血病/淋巴瘤组织中呈现异常表达^[8]。为了探讨其在 T-ALL 中的作用机制, 本研究通过观察 Fbxw7 在 T-ALL 患者中的表达情况, 以体外实验的方式探讨其对急性 T 淋巴细胞白血病细胞增殖凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究资料

选取黔南民族医学高等专科学校第一附属医院、第二附属医院, 贵州医科大学第三附属医院与河南大学第一附属医

院血液科 2014 年 3 月至 2016 年 10 月确诊为 T-ALL 的患者 62 例, 所有患者均符合 2008 年 WHO 诊断标准。其中, 初发组: 初发患者 48 例, 男性 26 例, 女性 22 例, 年龄 22~62 岁, 平均年龄 (40.5 ± 12.3) 岁。复发组: 复发患者 14 例, 男性 8 例, 女性 6 例, 年龄 25~65 岁, 平均年龄 (43.0 ± 13.1) 岁。对照组: 选取 62 例体检正常健康人为对照, 男性 34 例, 女性 28 例, 年龄 24~53 岁, 平均年龄 (41.9 ± 9.6) 岁。3 组性别比和年龄差异均无统计学意义 ($\chi^2=0.039$, $P=0.344$; $F=1.216$, $P=0.087$), 具有可比性。

1.2 主要试剂

急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞系 (上海中科院细胞库), RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司), Fbxw7 引物。携带 Fbxw7 过表达的慢病毒和对照慢病毒载体 (上海吉凯基因科技有限公司), MTT 检测试剂盒 (美国 Gibco 公司), 细胞周期检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物有限公司)。Fbxw7 抗体、c-Myc 抗体、细胞周期蛋白 E (Cyclin E) 抗体、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (美国 Abcam 公司)。

1.3 方法

1.3.1 Fbxw7 表达检测 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 Fbxw7 表达。经患者本人同意后, 在无菌条件下采集患者或正常健康人的骨髓标本于抗凝管中, 经无菌生理盐水稀释后, 混匀。在预先加有淋巴细胞分离液的离心管中, 加入等体积骨髓稀释液 (沿壁滴加), 于低速离心机中离心, 收集中间白膜层即为单核细胞。其中, 初发患者为初发组, 复发患者为复发组, 正常健康人为对照组。将单核细胞洗涤后, 用无菌生理盐水重悬细胞, 以 10^6 个/mL 细胞浓度溶于小牛血清冻存液中, 置于 -80°C 条件下存储备用。取单个核细胞至含有去 RNA 酶的 EP 管中, 以 Trizol 裂解细胞提取总 RNA, 以紫外分光光度计检测其浓度及纯度。根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板链, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为 95°C 预变性 5 min (1 个循环), 95°C 变性 45 s (30 个循环), 60°C 退火 45 s (30 个循环), 72°C 延伸 45 s (30 个循环), 72°C 总延伸 10 min (1 个循环)。其中 Fbxw7 引物上游序列为 5'-CTACCCAAAAGTAATCATCTT-AAGTG-3', 下游序列为 5'-CCCAACCATGACAAGATTTC-3'; 反应体系为 20 μL , 其中, 上下引物各为 1 μL , 2xTaq PCR Mastermix 为 12.5 μL , DNA 2 μL , 加灭菌水补至 20 μL 。

1.3.2 细胞培养及转染 将 Jurkat 细胞接种于加有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基上,置于设定条件为 5%CO₂、37℃ 细胞孵箱中进行培养。当细胞几乎铺满整个培养瓶时,以 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取生长状态良好的对数生长期细胞,胰酶消化后,加培养基调整细胞浓度为 10⁶ 个/mL。将细胞随机分为 3 组,即 Fbxw7 组、阴性组和对照组。根据慢病毒转染试剂盒,以摸索的感染复数(100)加入慢病毒颗粒(携带 Fbxw7 过表达慢病毒和对照慢病毒载体)和基因转染增强剂后放置于细胞孵箱中培养,以转染携带 Fbxw7 过表达慢病毒的细胞为 Fbxw7 组,转染对照慢病毒载体的细胞为阴性组,未做处理的细胞为对照组。培养 24 h 后,更换培养液,待感染效率大于 80% 后进行后续实验。

1.3.3 转染效果检测 以 RT-PCR 检测上述各组细胞中 Fbxw7 mRNA 的相对表达量,步骤见 1.2.1。再采用 Western blot 检测 Fbxw7 蛋白的相对表达量,步骤如下:取转染后生长良好的 Jurkat 细胞,胰酶消化后加培养基制成细胞悬液。取 24 孔细胞培养板,每孔加入细胞悬液 500 μL,常规培养至细胞融合度约为 70% 时,除去培养液。洗涤后,加入预冷的多聚甲醛固定 30 min。弃固定液洗涤后,加入 Triton X-100 裂解细胞,充分反应 30 min 后,离心弃上清,采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测所提取的蛋白浓度和纯度。以浓度为 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,转 PVDF 膜后,置于 TBST 溶解的浓度为 5% 的脱脂奶粉中封闭 2 h。洗膜后加入 Fbxw7 抗体(1:1 000)和 β-actin 抗体(1:2 000),4℃ 孵育过夜;次日,加二抗(1:2 000)37℃ 下孵育 1 h。避光下,以 ECL 化学发光试剂显影,凝胶成像仪扫描,分析计算 Fbxw7 蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.3.4 细胞增殖检测 采用(MTT 比色法检测细胞的增殖情况。取对数生长期的 Jurkat 细胞,以胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,取细胞浓度为 3×10⁵ 个/mL 的细胞悬液 1 mL 种植于 96 孔细胞培养板上,按照上述转染分组,在分别转染 24、48 和 72 h 时加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,反应 4 h 后加入二甲基亚砜 200 μL,反应 10 min。以酶标仪于 450 nm 处检测各孔的光密度值。实验重复 3 次。

1.3.5 细胞周期和凋亡检测 采用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的变化。取转染 48 h 后的各组细胞,以胰蛋白酶消化,离心洗涤后,加入 500 μL 结合缓冲液制成细胞悬液。根据细胞周期检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒分别染色处理,充分混匀后避光处理 15 min,上流式细胞仪检测各组细胞周期变化和细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.3.6 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白检测 采用 Western blot 检测 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白的表达。收集转染后的各组细胞,按照 1.2.3 中的方法操作,其中,加入稀释浓度为 1:1 000 的 c-Myc、Cyclin E 和 β-actin 抗体,低温过夜反应后,再加入稀释浓度为 1:2 000 的二抗。然后检测各组细胞目的蛋白的相对表达水平。实验重复 6 次。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。数据以均数 ± 标准

差($\bar{x} \pm s$)形式表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,并以 LSD-*t* 检验进行多重比较。重复测量数据行重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

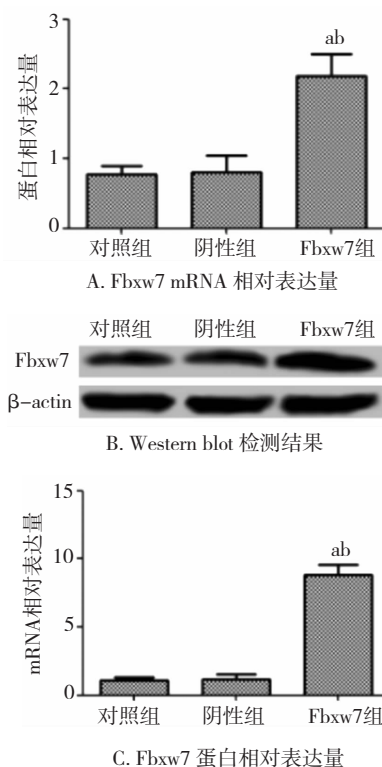
2 结果

2.1 Fbxw7 mRNA 在白血病患者中的表达

Fbxw7 mRNA 在白血病患者中的表达数据:对照组 3.59 ± 0.72,初发组 1.24 ± 0.26,复发组 1.12 ± 0.32,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较:与对照组相比,复发组和初发组中 Fbxw7 mRNA 表达水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),复发组与初发组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 转染效果鉴定

蛋白相对表达量在白血病患者中的表达数据:对照组 0.84 ± 0.11,阴性组 0.92 ± 0.24,Fbxw7 组 2.19 ± 0.28,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较:与对照组和阴性组相比,Fbxw7 组蛋白相对表达量明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组与阴性组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。mRNA 相对表达量在白血病患者中的表达数据:对照组 0.90 ± 0.10,阴性组 0.99 ± 0.31,Fbxw7 组 8.13 ± 0.81,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较:与对照组和阴性组相比,Fbxw7 组蛋白相对表达量明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组与阴性组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与阴性组相比, $P<0.05$

图1 转染携带 Fbxw7 过表达慢病毒载体后 Fbxw7 的表达

2.3 过表达 Fbxw7 对细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测转染后各组细胞的增殖情况, 结果见表 1。整体比较(两因素重复测量方差分析)结果显示, 组间、时间及交互作用均有统计学差异($P<0.05$)。进一步组间比较: 转染 24 h 后, 对照组和阴性组 Fbxw7 表达差异无统计学意义($P>0.05$), Fbxw7 组和对照组 Fbxw7 表达差异无统计学意义($P>0.05$), Fbxw7 组和阴性组 Fbxw7 表达差异无统计学意义($P>0.05$); 转染 48 h 后, 对照组和阴性组 Fbxw7 表达差异无统计学意义($P>0.05$), Fbxw7 组 Fbxw7 表达低于对照组和阴性组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 转染 72 h 后, 对照组和阴性组 Fbxw7 表达差异无统计学意义($P<0.05$), Fbxw7 组 Fbxw7 表达低于对照组和阴性组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。组内比较结果显示, 对照组: 转染后 48 h 和 72 h Fbxw7 表达高于转染后 24 h, 差异有统计学意义($P<0.05$); 阴性组: 转染后 48 h 和 72 h Fbxw7 表达高于转染后 24 h, 差异有统计学意义($P<0.05$); Fbxw7 组: 转染后 48 h 和 72 h Fbxw7 表达高于转染后 24 h, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 过表达 Fbxw7 对细胞周期及细胞凋亡的影响

转染 48 h 后流式细胞仪检测各组细胞中细胞周期变化和细胞凋亡情况, 结果见表 2 和图 2。整体比较知: 各指标整体差异均有统计学意义($P<0.05$)。进一步组间比较: 阴性组处于 G_0/G_1 期低于对照组, Fbxw7 组处于 G_0/G_1 期高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), Fbxw7 组处于 G_0/G_1 期低于阴性组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 阴性组和 Fbxw7 组处于 S 期低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), Fbxw7 组处于 S 期低于阴性组, 差异有统计学意义($P<0.05$); Fbxw7 组处于 G_2/M 期低于对照组和阴性组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 对照组处于 G_2/M 期低于阴性组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 过表达 Fbxw7 对 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测转染 48 h 后各组细胞中 c-Myc 和 Cyclin E 蛋白的表达情况, 结果见表 3、图 3。整体比较知: 各指标整体差异均有统计学意义($P<0.05$)。进一步组间比较: c-Myc 蛋白相对表达量方面, Fbxw7 组低于对照组和阴性

表 1 过表达 Fbxw7 对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	对照组($n=6$)	阴性组($n=6$)	Fbxw7组($n=6$)
24 h	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02
48 h	0.53 ± 0.02	0.52 ± 0.05	0.40 ± 0.03
72 h	0.68 ± 0.05	0.65 ± 0.07	0.51 ± 0.05
组间 F, P	38.818, 0.000		
时间 F, P	203.634, 0.000		
交互 F, P	6.573, 0.002		
组间比较 LSD- t, P	阴性组 vs. 对照组	Fbxw7组 vs. 对照组	Fbxw7组 vs. 阴性组
24 h	1.362, 0.203	1.715, 0.117	0.018, 0.986
48 h	0.459, 0.656	8.828, 0.000	5.034, 0.001
72 h	0.840, 0.421	5.902, 0.000	4.013, 0.002
时点比较 t, P	对照组	阴性组	Fbxw7组
48 h vs. 24 h	18.377, 0.000	10.374, 0.000	6.720, 0.001
72 h vs. 24 h	21.167, 0.000	15.687, 0.000	12.346, 0.000

注: 整体分析为两因素重复测量方差分析, 资料球形性校正采用 HF 系数法。组间精细比较为 LSD- t 检验, 显著性标记 a, b 分别为和对照组、阴性组同时点相比各指标整体差异均有统计学意义($P<0.05$)。时间精细比较为差值 t 检验, 显著性标记 t 为和组内第 1 时间点比较 $P<\alpha'$, α' 为 Bonferroni 校正后的检验水准, 即 $0.05/n=0.025$, n 为时间维度上精细比较的次数 2

表 2 上调 Fbxw7 表达对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	6	36.68 ± 0.26	52.43 ± 0.33	11.15 ± 0.14
阴性组	6	36.17 ± 0.15 ^a	51.81 ± 0.18 ^a	11.88 ± 0.21 ^a
Fbxw7组	6	42.21 ± 0.28 ^{ab}	48.57 ± 0.23 ^{ab}	9.33 ± 0.17 ^{ab}
整体分析	F, P	1 214.008, 0.000	403.262, 0.000	333.796, 0.000
阴性组 vs. 对照组	LSD- t, P	3.747, 0.002	4.278, 0.001	7.138, 0.000
Fbxw7 组 vs. 对照组	LSD- t, P	40.677, 0.000	26.453, 0.000	17.936, 0.000
Fbxw7 组 vs. 阴性组	LSD- t, P	44.423, 0.000	22.175, 0.000	25.074, 0.000

注: 整体分析为两因素重复测量方差分析, 资料球形性校正采用 HF 系数法。组间精细比较为 LSD- t 检验, 显著性标记 a, b 分别为和对照组、阴性组同时点相比各指标整体差异均有统计学意义($P<0.05$)

组,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组和阴性组差异无统计学意义($P>0.05$);CyclinE 蛋白相对表达量方面,Fbxw7 组低于对照组和阴性组,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组和阴性组差异无统计学意义($P>0.05$)。

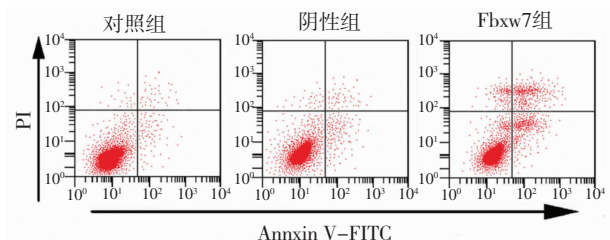
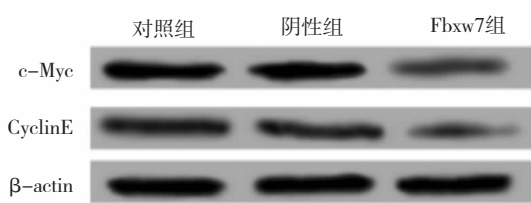


图2 上调 Fbxw7 表达对细胞凋亡的影响

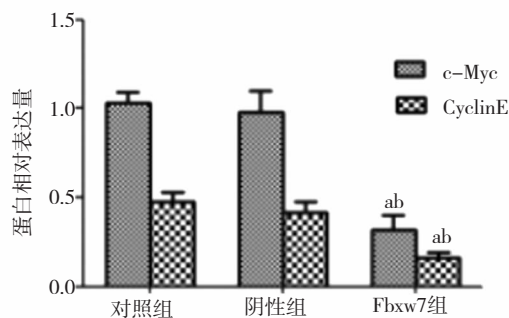
表3 过表达 Fbxw7 对 c-Myc 和 Cyclin E 表达的影响

组别	例数	c-Myc蛋白 相对表达量	CyclinE蛋白 相对表达量
对照组	6	0.99 ± 0.11	0.49 ± 0.11
阴性组	6	0.91 ± 0.23	0.40 ± 0.10
Fbxw7组	6	0.32 ± 0.14 ^{ab}	0.18 ± 0.03 ^{ab}
整体分析	F, P	28.773, 0.000	19.966, 0.000
阴性组 vs. 对照组	LSD- t, P	0.813, 0.429	1.770, 0.097
Fbxw7 组 vs. 对照组	LSD- t, P	6.938, 0.000	6.138, 0.000
Fbxw7 组 vs. 阴性组	LSD- t, P	6.125, 0.000	4.369, 0.00

注:整体分析为两因素重复测量方差分析,资料球形性校正采用 HF 系数法。组间精细比较为 LSD- t 检验,显著性标记 a、b 分别为和对照组、阴性组同时点相比各指标整体差异均有统计学意义($P<0.05$)



A. Western blot 检测结果



B. 蛋白相对表达量

注:a:与对照组相比, $P<0.05$;b:与阴性组相比, $P<0.05$

图3 过表达 Fbxw7 对 c-Myc 和 CyclinE 表达的影响

3 讨论

Fbxw7 基因又称 FBW7、AGO 和 hCDC4,位于人类 4q31.3 染色体上,该位点在白血病、胃癌和卵巢癌等多种肿瘤中易发生缺失或突变^[9-10]。大量研究显示,Fbxw7 与肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和凋亡等密切相关。Sun 等^[11]通过构建 Fbxw7 过表达的重组载体质粒,观察其对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖凋亡的影响,发现过表达 Fbxw7 可抑制 MCF-7 细胞增殖、侵袭和迁移,使 MCF-7 细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期,并促进细胞凋亡。Tu 等^[12]在肝癌细胞中发现,Fbxw7 的缺失与肝癌肿瘤大小、高病理分级、TNM 分期和静脉浸润等不良预后密切相关,Fbxw7 通过调控 YAP 基因表达诱导肝癌细胞凋亡和抑制生长。近年来,有研究发现 Fbxw7 突变与 T 淋巴细胞白血病患者总生存时间有关,且与 Notch1 突变有一定的相关性,Fbxw7 单独突变组患者的总生存时间比无突变组延长,而 Fbxw7/Notch1 突变组与无突变组间无统计学差异^[13]。在 T 细胞急性淋巴细胞白血病中,通过活化的 miR-233 靶向调控 Fbxw7 表达发挥抑制肿瘤的作用^[14]。推测 Fbxw7 除了靶向 Notch1 外,还可靶向降解如 Cyclin E、c-Myc 和 c-Jun 等多个调控细胞周期进程的蛋白,进而影响肿瘤的发生发展。目前,关于 Fbxw7 在急性 T 淋巴细胞白血病中的作用研究较少。本研究通过观察 Fbxw7 在 T-ALL 中的表达,以体外实验的方法分析其对 Jurkat 细胞增殖凋亡的影响。研究结果发现,T-ALL 复发组患者和初发组患者中 Fbxw7 mRNA 表达水平较正常健康人明显降低,各指标整体差异均有统计学意义。构建慢病毒质粒上调其表达后,MTT 法检测 Jurkat 细胞的增殖明显受到抑制,并且流式细胞仪检测细胞周期在 G₀/G₁ 期发生阻滞,细胞凋亡率明显升高,各指标整体差异均有统计学意义。结果反向表明,Fbxw7 在急性 T 淋巴细胞白血病中发挥抑癌基因作用,各指标整体差异均有统计学意义。

c-Myc 蛋白是一种原癌基因 *myc* 编码的蛋白家族中的重要成员,常以二聚体形式识别特异性 DNA 序列,在肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和血管形成等过程中发挥转录调节功能^[15]。Cyclin E 是一种细胞周期从 G₁ 期向 S 期过渡的重要调控因子,通过激活并与细胞周期蛋白依赖性激酶 2 结合,在细胞

有丝分裂过程中发挥调控 G₁/S 期的作用, 过度表达的 Cyclin E 可因染色体不稳定, 引起或促进癌症的发生^[16]。有研究发现, *c-Myc* 基因在 T 淋巴母细胞淋巴瘤/白血病的发展中可能发挥着重要作用, 并且与预后效果差有关, 干扰 *c-Myc* 表达可以抑制 Jurkat 细胞增殖, 促进细胞凋亡^[17-18]。还有研究发现, Cyclin E 在急性白血病初发者及复发者中的表达明显升高, 各指标整体差异均有统计学意义, 可见 *c-Myc* 和 Cyclin E 与白血病的发生发展关系密切^[19]。为了探讨 Fbxw7 在白血病中的作用机制, 查阅文献发现, Fbxw7 可调控 *c-Myc* 和 Cyclin E 的表达, 进而发挥抑癌基因的作用^[20]。Zeng 等^[21]研究 Fbxw7 在胃癌中的作用时发现, 过表达 Fbxw7 可通过降解 *c-Myc* 和 Cyclin E 发挥促凋亡和抑生长作用。本研究通过 Western blot 检测转染后细胞中 *c-Myc* 和 Cyclin E 蛋白的表达发现, Fbxw7 组细胞中的 *c-Myc* 和 Cyclin E 蛋白表达水平明显下降。结果提示, 过表达 Fbxw7 可能通过下调 *c-Myc* 和 Cyclin E 蛋白表达, 抑制细胞增殖和促进细胞凋亡, 各指标整体差异均有统计学意义。

综上所述, Fbxw7 在急性 T 淋巴细胞白血病中低表达, 上调其表达可抑制白血病 Jurkat 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其作用机制可能与下调 *c-Myc* 和 Cyclin E 蛋白的表达有关。本研究仅对 Fbxw7 在急性 T 淋巴细胞白血病中的作用做了初步探讨, 其更深更细的作用机制还需要进一步深入研究, 以期对急性 T 淋巴细胞白血病的诊断、治疗及预后判断提供新的方向。

参 考 文 献

- [1] Deborah B, Valentina S, Erich P, et al. Aberrant signaling pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1904.
- [2] 刘 玲, 王晓桃. 急性淋巴细胞白血病的诊断治疗新进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(17): 3148-3150.
- [3] Li H, Wang Z, Zhang W, et al. FBXW7 regulates tumor apoptosis, growth arrest and the epithelial-to-mesenchymal transition in part through the RhoA signaling pathway in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1): 39-55.
- [4] 林凯容, 杨学习, 吴英松, 等. 基于 Ion Torrent 测序平台技术的肿瘤基因检测及临床应用[J]. *广东医学*, 2016, 37(4): 481-485.
- [5] Cao J, Ge MH, Ling ZQ. FBXW7 tumor suppressor: a vital regulator contributes to human tumorigenesis[J]. *Medicine*, 2016, 95(7): e2496.
- [6] 关 伟, 靖 彧, 于 力. 分子遗传学和表观遗传学异常在 T 淋巴母细胞淋巴瘤/白血病中的预后价值的研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(2): 587-591.
- [7] Izykowska K, Zawada M, Nowicka K, et al. Submicroscopic genomic rearrangements change gene expression in T-cell large granular lymphocyte leukemia[J]. *Eur J Haematol*, 2014, 93(2): 143-149.
- [8] Mihashi Y, Mizoguchi M, Takamatsu Y, et al. C-MYC and its main ubiquitin ligase, FBXW7, influence cell proliferation and prognosis in adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(8): 1139.
- [9] Han Y, Lu S, Yu F, et al. A comparative analysis and guidance for individualized chemotherapy of stage II and III colorectal cancer patients based on pathological markers[J]. *Sci Rep*, 2016, 15(6): 37240.
- [10] Jardim DL, Wheeler JJ, Hess K, et al. FBXW7 mutations in patients with advanced cancers: clinical and molecular characteristics and outcomes with mTOR inhibitors[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89388.
- [11] Sun Y, Lin X, Chang H. Proliferation inhibition and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells under the influence of colchicine[J]. *J BUON*, 2016, 21(3): 570-575.
- [12] Tu K, Yang W, Li C, et al. FBXW7 is an independent prognostic marker and induces apoptosis and growth arrest by regulating YAP abundance in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1): 110.
- [13] 郭 星, 张 闰, 葛 峥, 等. FBXW7 在成人 T 细胞性急性淋巴细胞白血病中的突变研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(3): 612-618.
- [14] Mansour MR, Sanda T, Lawton LN, et al. The TAL1 complex targets the FBXW7 tumor suppressor by activating miR-223 in human T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(8): 1545.
- [15] 陈善萍, 王俊利, 韦贵将. 肿瘤分子标志物 *c-myc* 基因的研究进展[J]. *右江医学*, 2016, 44(2): 211-213.
- [16] 张桂东, 尹清臣. Cyclin E/CDK2 及 p27 在胃癌细胞周期 G₁/S 调控中的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(3): 251-253.
- [17] Zhang Y, Li J, Xi Y, et al. Significance of C-myc expression in T-lymphoblastic lymphoma/leukemia and its relation with prognosis[J]. *Chin J Pathol*, 2015, 44(8): 571.
- [18] 刘庭波, 骆晓峰, 胡建达, 等. C-MYC siRNA 对急性淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞凋亡的诱导作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(4): 879-883.
- [19] 梁翠微, 龚五星, 曲亚丽, 等. 急性白血病细胞周期调节因子的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2011, 40(18): 1775-1777.
- [20] 黄会杰, 郑 芳, 徐方平, 等. 肿瘤抑制基因 FBW7 在肿瘤发病过程中的作用和机制[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(3): 214-216.
- [21] Zeng C, Huang L, Huang H, et al. FBXW7 induced cell apoptosis and growth retardation through degradation of *c-Myc* and Cyclin E in gastric cancer[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2014, 41(3): 153-157.

(责任编辑: 冉明会)