

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001839

过表达 INPP4B 对人急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖和凋亡的影响及其潜在机制

金红君¹, 杨丽媛¹, 汪 路¹, 唐雨婷¹, 陶 瑶¹, 黄圣博¹, 敬一佩¹, 杨再林², 张 伶¹

(1. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室、重庆市重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第三医院检验科, 重庆 401120)

【摘要】目的:探讨二型磷脂酰肌醇 4 磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B)对人急性髓系白血病 THP-1 细胞体外增殖和凋亡的影响及潜在机制。**方法:**将携带 INPP4B 的重组质粒载体 pEAK-Flag/INPP4B 转染人 THP-1 细胞系(Flag-INPP4B 组),同时设立未处理组为对照(Mock 组)。采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测实验组和对照组细胞 INPP4B mRNA 和蛋白的表达水平;CCK-8 实验检测细胞体外增殖能力;流式细胞术检测细胞凋亡情况;Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2(Bcl-2-associated X/B-cell lymphoma-2, Bax/Bcl-2)以及磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)下游信号分子蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/AKT)和血清糖皮质激素调节激酶-3(serum and glucocorticoid regulated kinase-3, SGK3)蛋白的磷酸化水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞内 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P 的水平。**结果:**INPP4B 重组质粒载体转染 THP-1 细胞后, INPP4B 的 mRNA 和蛋白水平均明显上升(mRNA: $t=9.724$, $P=0.000$; 蛋白: $t=19.520$, $P=0.000$),提示在 THP-1 细胞中成功过表达 INPP4B。与 Mock 组相比, Flag-INPP4B 组细胞体外增殖能力明显增强($F=31.870$, $P=0.000$)。同时, 过表达 INPP4B 可明显降低细胞凋亡率($t=6.999$, $P=0.002$);使促凋亡蛋白 Bax 的表达水平下降($t=24.710$, $P=0.000$)、抗凋亡蛋白 Bcl-2 的蛋白表达水平增加($t=6.398$, $P=0.003$)。此外, 过表达 INPP4B 可增强 THP-1 细胞 SGK3 蛋白的磷酸化水平($t=10.470$, $P=0.000$), 而对 AKT 蛋白的磷酸化水平无明显影响($t=0.285$, $P=0.790$)。最后, 过表达 INPP4B 还可明显降低 THP-1 细胞中 PI(3,4)P₂ 的水平($t=4.515$, $P=0.011$), 同时明显升高 PI(3)P 的水平($t=5.681$, $P=0.005$)。**结论:**本研究结果表明过表达 INPP4B 可促进人急性髓系白血病 THP-1 细胞的体外增殖并抵抗凋亡, 其机制可能与 INPP4B 介导激活 PI3K/SKG3 信号通路有关, 这提示 INPP4B 可作为急性髓系白血病治疗的一个潜在靶点。

【关键词】二型磷脂酰肌醇 4 磷酸酶; 白血病; 增殖; 凋亡; PI3K 信号通路; 血清糖皮质激素调节激酶-3

【中图分类号】R733.71

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-06

Effects of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II overexpression on proliferation and apoptosis of human acute myeloid leukemia THP-1 cells and potential mechanism

Jin Hongjun¹, Yang Liyuan¹, Wang Lu¹, Tang Yuting¹, Tao Yao¹, Huang Shengbo¹,Jing Yipei¹, Yang Zailin², Zhang Ling¹

(1. College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (INPP4B) in the *in vitro* proliferation and apoptosis of human acute myeloid leukemia THP-1 cells and the potential mechanism. **Methods:** Human THP-1 cells were transfected with recombinant plasmid vector pEAK-Flag/INPP4B which carried INPP4B (Flag-INPP4B group), and untreated cells were established as control group (Mock group). Western blot and qRT-PCR were used to measure the protein and mRNA expression of INPP4B

作者介绍:金红君, Email: 1542277209@qq.com,

研究方向: 血液系统肿瘤基础与临床。

通信作者:张 伶, Email: lingzhang@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81271913); 重庆市研究生科研创新资助项目(编号: CYS17155)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20180913.1326.004.html>
(2018-09-17)

in the experimental group and the control group; CCK-8 assay was used to assess *in vitro* proliferative capacity; flow cytometry was used to measure cell apoptosis; Western blot was used to measure the levels of apoptosis-related proteins Bcl-2-associated X/B-cell lymphoma-2 (Bax/Bcl-2) and the phosphorylation levels of downstream signal molecules of phosphoinositide-3 kinase (PI3K) protein kinase B (PKB/Akt) and serum and

glucocorticoid regulated kinase-3 (SGK3); ELISA was used to measure the levels of PI(3,4)P₂ and PI(3)P in cells. **Results:** After THP-1 cells were transfected with INPP4B recombinant plasmid vector, there were significant increases in the mRNA and protein expression of INPP4B (mRNA: $t=9.724, P=0.000$; protein: $t=19.520, P=0.000$), suggesting that INPP4B was successfully overexpressed in THP-1 cells. Compared with the Mock group, the Flag-INPP4B group had a significant increase *in vitro* proliferative capacity ($F=31.870, P=0.000$). Furthermore, INPP4B overexpression significantly reduced the apoptosis rate of THP-1 cells ($t=6.999, P=0.002$) and the expression of the pro-apoptotic protein Bax ($t=24.710, P=0.000$) and significantly increased the level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 ($t=6.398, P=0.003$). In addition, INPP4B overexpression significantly increased the phosphorylation level of SGK3 in THP-1 cells ($t=10.470, P=0.000$), while it did not affect the phosphorylation level of AKT ($t=0.285, P=0.790$). INPP4B overexpression also significantly reduced the level of PI(3,4)P₂ in THP-1 cells ($t=4.515, P=0.011$) and significantly increased the level of PI(3)P in THP-1 cells ($t=5.681, P=0.005$). **Conclusion:** INPP4B can promote *in vitro* proliferation of human acute myeloid leukemia THP-1 cells and inhibits cell apoptosis, possibly by mediating activation of the PI3K/SGK3 signaling pathway, which suggests that INPP4B might be a potential target for the treatment of acute myeloid leukemia.

【Key words】inositol polyphosphate 4-phosphatase type II; leukemia; proliferation; apoptosis; phosphoinositide-3 kinase signaling pathway; serum and glucocorticoid regulated kinase-3

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人最常见的急性白血病类型,临床和分子生物学特征具有高度异质性。目前采用高剂量化疗和造血干细胞移植可延长患者生存期,但在提高初治完全缓解率和克服缓解后复发方面仍存在局限性。尽管有后续的巩固治疗,AML预后依然很差^[1]。近年来的研究表明,AML在发生发展的过程中存在多种基因突变及信号途径调节异常^[2]。因此,深入研究AML发病的分子机制,可为细分和获取特异性生物标志物或治疗靶标提供新方向。

二型磷脂酰肌醇 4 磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B)是 PI3K 信号通路的一种负调控因子^[3],能水解 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4)P₂],使得 PI(3,4)P₂ 对 AKT 的招募和结合减少,从而抑制 AKT 的活化^[4],因此,INPP4B 可通过下调 PI3K/AKT 信号通路活性发挥抑癌功能^[5]。过去的研究已经在卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤细胞中证实了 INPP4B 的低表达^[6-7]。最近的研究发现,INPP4B 在 PIK3CA 突变型乳腺癌和结肠癌等部分实体肿瘤中高表达,并表现出促癌作用^[8-9]。然而,目前 INPP4B 在 AML 细胞中的生物学作用及分子机制尚不清楚。有研究表明,血清糖皮质激素调节激酶-3(serum and glucocorticoid-regulated kinase-3, SGK3)是一种新近发现的 PI3K 下游信号分子,能介导雌激素受体阳性乳腺癌细胞的体外增殖^[10]。重要的是 INPP4B 的水解产物 3-磷酸磷脂酰肌醇[PI(3)P]能够与 SGK3 蛋白结合,有助于 SGK3 的完全活化^[11]。因此,本研究以人急性髓系白血病 THP-1 细胞为实验对象,观察过表达 INPP4B 对白血病细胞体外增殖和凋亡的影响,并初步探讨 PI3K 通

路下游信号分子活性的改变,为进一步阐明 INPP4B 在白血病发生发展中的作用及靶向治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒及细胞系

INPP4B 重组质粒载体 pEAK-Flag/INPP4B 购于 Addgene (<http://www.addgene.org>)。人急性髓系白血病细胞株 THP-1 购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,由本实验室常规保存。

1.2 试剂

RPMI1640 普通培养基购于美国 Gibco 公司。Neofect™ 转染试剂购于北京零客创智生物科技有限公司。RNA 提取试剂 TRIzol、RT-PCR 试剂盒购于日本 Takara 公司。引物由上海英骏公司合成。SYBR 快速荧光定量 PCR 试剂盒由 KAPA Biosystems 购得。CCK-8 试剂盒由日本 Dojindo 公司购得。蛋白裂解液 RIPA 及 BCA 蛋白定量检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。兔抗人 INPP4B、AKT、p-AKT (Thr308)和 p-SGK3(Thr320)多克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 SGK3 和 β -actin 多克隆抗体购于 Proteintech 公司,兔抗人 Bax 和 Bcl-2 购于美国 Santa Cruz 公司,山羊抗兔 IgG 二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司购得。ECL 发光试剂盒和 PVDF 膜购于美国 Millipore 公司。人 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P ELISA 试剂盒购于上海润裕生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人急性髓系白血病细胞株 THP-1 用含 10%胎牛血清、青霉素/链霉素(100 U/mL)的 RPMI 1640 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,当培养至对数生长期时,收集细胞用于后续的实验。

1.3.2 细胞转染 采用 Neofect™ 转染试剂将质粒 pEAK-Flag/INPP4B 转染 THP-1 细胞,设立 pEAK-Flag/INPP4B 转

染组(Flag-INPP4B 组)及未处理组(Mock 组)。转染 48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.3.3 定量 PCR(qRT-PCR)检测 mRNA 表达水平 收集各组细胞,用 TRIzol 试剂抽提细胞总 RNA,检测浓度后用 RT-PCR 逆转录成 cDNA。以 β -actin 作为内参,qRT-PCR 扩增细胞中 INPP4B 的表达,用于 qRT-PCR 反应的引物序列见表 1。扩增反应条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 50 s,循环 39 次;72 °C 10 min。实验独立重复 3 次。相对定量值结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	序列(5'-3')
INPP4B	上游:5'-GGAAAGTGTGAGCGGAAAAG-3'
	下游:5'-CGAATTCGCATCCACTTATTG-3'
β -actin	上游:5'-TAGTTGCGTTACACCTTTCTTG-3'
	下游:5'-TGCTGTACCTTCACCGTTC-3'

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达水平 收集各组细胞,以 1 000 r/min 离心 3 min,留取细胞沉淀并用 PBS 洗涤 3 次。弃上清后加入适量 RIPA 裂解液充分裂解细胞,以 13 000 r/min 离心 30 min,取上清,BCA 法检测蛋白浓度。取 40 μ g 变性煮沸蛋白样品上样,用 10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,接着通过湿转仪将蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 3 h,分别加入一定稀释比例的抗 INPP4B、Bax、Bcl-2、p-AKT(Thr308)、AKT、p-SGK3(Thr320)和 SGK3 抗体,4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 2 次,TBS 洗膜 1 次,每次 10 min,接着加入相应的二抗室温孵育 1 h。最后用 ECL 化学发光试剂凝胶显影。实验以 β -actin 为内参,Western blot 条带用 Quantity One 软件进行统计分析。

1.3.5 CCK-8 检测细胞增殖 将各组 THP-1 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔,于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养,培养至第 0、12、24、48、72 小时,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,继续培养 3 h,于 450 nm 波长处测定每孔的吸光度(absorbance, A)值。以 A_{450 nm} 值为纵坐标、培养时间为横坐标绘制生长曲线图。实验独立重复 3 次。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将各组 THP-1 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中培养 48 h,收集各组细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤 3 次。用 500 μ L PBS 重悬细胞,加入 1 μ L Annexin V-PE 染液,混匀,室温避光反应 15 min;再加入 5 μ L 7-AAD 染液,混匀,室温避光反应 15 min,立即上流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验独立重复 3 次。

1.3.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P 表达 收集各组细胞,以 1 000 r/min 离心 3 min,PBS 洗涤 3 次,弃上清,加入 100 μ L RIPA 裂解液,500 r/min 离心 30 min,留取上清。采用人 PI(3,4)P₂ ELISA 试剂盒和人 PI(3)P ELISA 试剂盒,分别检测各组细胞中 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P 的水平。

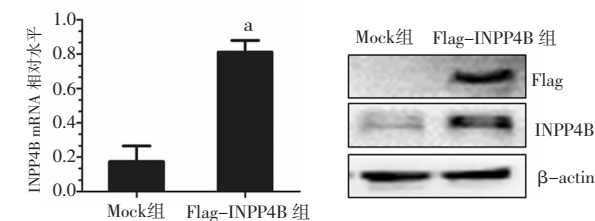
1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 t 检验,CCK-8 实验结果采用两因素重复方差分析,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

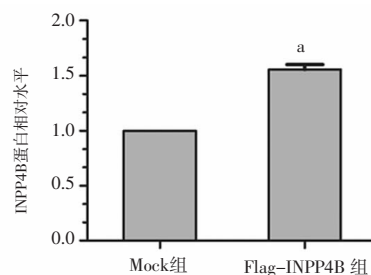
2.1 白血病 THP-1 细胞系中过表达 INPP4B

将重组质粒 pEAK-Flag-INPP4B 转染人急性髓系白血病 THP-1 细胞,qRT-PCR 定量检测 INPP4B 表达水平。结果显示,THP-1 细胞中有一定程度 INPP4B mRNA 的表达,过表达 INPP4B 可使白血病细胞 INPP4B mRNA 水平(0.812 ± 0.067)较对照组(0.174 ± 0.091)明显升高($t=9.724, P=0.000$),如图 1A 所示。Western blot 结果显示,在过表达 INPP4B 的 Flag-INPP4B 组细胞中,可见外源性 Flag 标签蛋白的表达(图 1B),同时 INPP4B 蛋白相对水平(1.556 ± 0.045)较 Mock 组明显升高,差异具有统计学意义($t=19.520, P=0.000$),如图 1C 所示。以上结果显示,转染 INPP4B 能够上调 THP-1 细胞中 INPP4B 的 mRNA 和蛋白水平,这表明在白血病细胞株 THP-1 中成功过表达 INPP4B。



a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

A. INPP4B mRNA 相对表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)



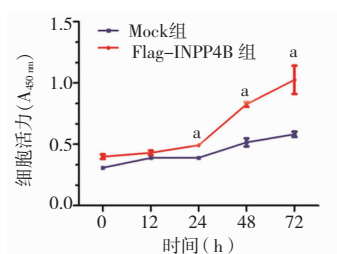
a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

C. 统计分析 INPP4B 蛋白相对水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

图 1 转染 INPP4B 质粒对 THP-1 细胞内 INPP4B mRNA 和蛋白表达水平的影响

2.2 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞体外增殖的影响

为探讨过表达 INPP4B 对白血病细胞体外增殖的影响,采用 CCK-8 法观察过表达 INPP4B 后 THP-1 细胞的生长情况。结果显示,体外培养 12 h 时,Flag-INPP4B 组 A_{450 nm} 值(0.411 ± 0.019)较对照 Mock 组(0.389 ± 0.001)无明显差异;当继续培养至 24、48 和 72 h 时,Flag-INPP4B 组 A_{450 nm} 值(24 h: 0.492 ± 0.011 ; 48 h: 0.826 ± 0.020 ; 72 h: 1.025 ± 0.116)较 Mock 组值(24 h: 0.391 ± 0.011 ; 48 h: 0.516 ± 0.033 ; 72 h: 0.582 ± 0.022)明显升高,差异具有统计学意义($F=31.870, P=0.000$)(图 2),这表明过表达 INPP4B 可促进 THP-1 细胞的体外增殖能力。

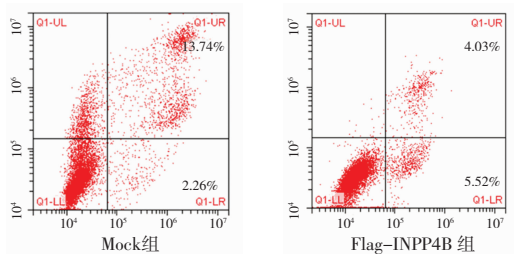


a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

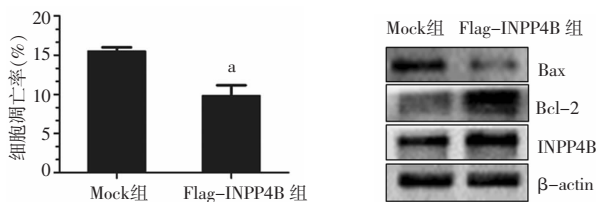
图 2 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞体外增殖的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.3 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞凋亡的影响

为了观察过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞凋亡的影响,利用流式细胞术检测 THP-1 细胞的凋亡率。结果显示,Flag-INPP4B 组 THP-1 细胞凋亡率为 $[(9.82 \pm 1.32)\%]$ 明显低于 Mock 对照组 $[(15.51 \pm 0.49)\%]$ (图 3A), 差异具有统计学意义 ($t=6.999, P=0.002$) (图 3B)。此外,采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达水平。结果显示,与 Mock 组相比,Flag-INPP4B 组细胞中促凋亡蛋白 Bax 水平明显降低,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平明显升高 (图 3C)。蛋白量化结果显示,Flag-INPP4B 组 Bax 蛋白相对水平 (0.572 ± 0.030) 较 Mock 组明显降低 ($t=24.710, P=0.000$), 而 Bcl-2 蛋白相对水平 (1.314 ± 0.085) 明显升高 ($t=6.398, P=0.003$), 均具有统计学差异 (图 3D)。上述结果提示,过表达 INPP4B 能够抑制 THP-1 细胞发生凋亡,改变凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的表达。

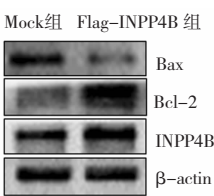


A. 流式细胞术检测 THP-1 细胞的凋亡

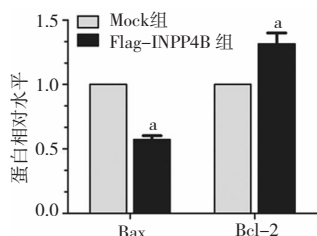


a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

B. 统计分析 THP-1 细胞的凋亡率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)



C. 凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达水平



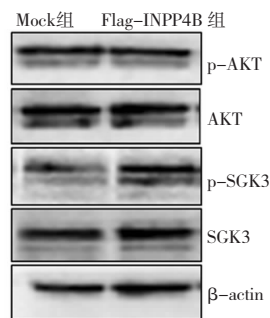
a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

D. 统计分析凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 相对水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

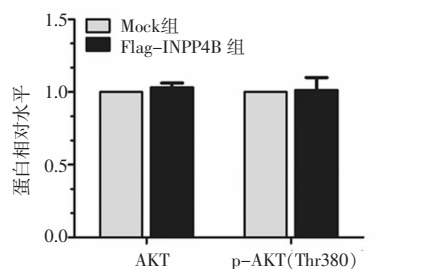
图 3 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞凋亡的影响

2.4 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞 AKT 和 SGK3 磷酸化水平的影响

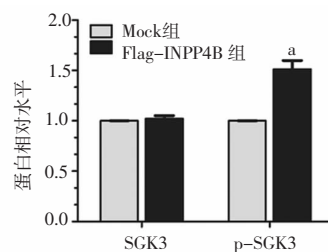
为了探讨过表达 INPP4B 对 PI3K 下游信号分子 AKT 和 SGK3 蛋白磷酸化水平的影响, Western blot 检测 THP-1 细胞中 AKT 和 SGK3 蛋白水平。结果显示,与 Mock 组相比,过表达 INPP4B 对 AKT 总蛋白及其磷酸化水平均无明显影响 ($t_{AKT}=1.848, P_{AKT}=0.138; t_{p-AKT}=0.285, P_{p-AKT}=0.790$) (图 4A、B)。此外,Flag-INPP4B 组 SGK3 总蛋白水平较 Mock 组无明显变化 ($t_{SGK3}=1.270, P_{SGK3}=0.273$), 但是 SGK3 蛋白磷酸化水平较 Mock 组明显升高 (图 4A); 同时,蛋白量化结果显示 p-SGK3 相对水平明显升高 (1.154 ± 0.085), 差异具有统计学意义 ($t_{p-SGK3}=10.470, P_{p-SGK3}=0.000$) (图 4C)。以上结果提示, INPP4B 可增强 PI3K 下游信号分子 SGK3 的激活而不影响 AKT 的活化。



A. AKT 和 SGK3 蛋白及其磷酸化水平



B. 统计分析 AKT 及其磷酸化蛋白相对表达水平



a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

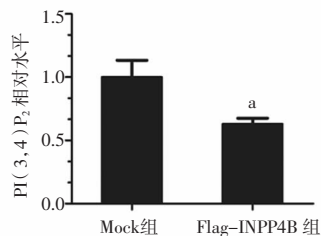
C. 统计分析 SGK3 及其磷酸化蛋白相对水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

图 4 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞 AKT 和 SGK3 蛋白磷酸化水平的影响

2.5 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P 水平的影响

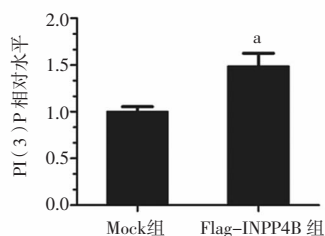
为了进一步探讨 INPP4B 介导 SGK3 活化的机制,采用 ELISA 检测过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞中 PI(3,4)P₂ 和

PI(3)P 水平的影响。结果表明,与 Mock 组比较,Flag-INPP4B 组细胞中 PI(3,4)P₂ 的相对水平(0.631 ± 0.045)明显降低($t=4.515, P=0.011$) (图 5A),而 PI(3)P 相对水平(1.486 ± 0.139)明显升高($t=5.681, P=0.005$) (图 5B)。以上结果提示过表达 INPP4B 可增加 THP-1 细胞中 PI(3)P 的积累。



a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

A. 统计分析 PI(3,4)P₂ 的相对水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)



a: Flag-INPP4B 组与 Mock 组比较, $P < 0.05$

B. 统计分析 PI(3)P 的相对水平

图 5 过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞内 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P 水平的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

AML 是血液系统发病率最高的恶性疾病,具有较高的死亡率及复发率。因此,明确 AML 细胞恶性增殖和凋亡抵抗的分子机制对阐明白血病的发病机制及制定有效的治疗策略具有重要意义。近年的临床研究发现,INPP4B 与 AML 患者的预后不良密切相关^[12-13]。因此,本研究探讨 INPP4B 对人 AML 细胞株 THP-1 体外增殖和凋亡的影响及其潜在机制。

作为 PI3K 信号通路的重要抑癌蛋白,INPP4B 在乳腺癌等多种实体肿瘤中呈现功能失调或低表达^[14]。在血液系统肿瘤中,研究发现 INPP4B 在伴有唐氏综合征的急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)细胞中表达缺失^[15],同时也有研究者指出,INPP4B 在 BCR/ABL1 阳性的 ALL 细胞中高表达^[16]。然而,INPP4B 在 AML 中的研究少有报道。在本研究中,将外源性 INPP4B 表达质粒转染人急性髓系白血病 THP-1 细胞。结果显示,过表达

INPP4B 能够明显提高 THP-1 细胞的体外增殖能力。Dzneladze 等^[12]发现在人 AML 细胞株 OCI-AML2 和 OCI-AML3 中过表达 INPP4B,能够促进细胞的体外增殖和克隆形成能力。此外,高表达 INPP4B 能够增加白血病患者原始细胞对阿糖胞苷的化疗抵抗,从而促进细胞的体外存活^[13]。本研究中我们还发现,过表达 INPP4B 可使 THP-1 细胞的凋亡率明显降低,同时促凋亡蛋白 Bax 表达减少而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加。这提示 INPP4B 可能通过促进白血病细胞增殖和抑制凋亡来发挥促癌作用。来自临床的研究表明,高表达 INPP4B 的 AML 患者通常预示着预后不良,并且 INPP4B 表达水平可作为 AML 患者预后判断的独立指标^[13]。以上结果提示,INPP4B 可能在 AML 的发病机制中发挥重要作用。

PI3K 信号通路已被证实在多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[17]。研究表明,约 50% 以上的 AML 患者存在 PI3K 信号通路异常激活^[18]。INPP4B 是 PI3K 信号通路上的重要负调控因子,可通过抑制 AKT 的磷酸化激活发挥抑癌作用^[19]。为此,本研究首先观察过表达 INPP4B 对 THP-1 细胞中 AKT 磷酸化水平的影响。结果发现,过表达 INPP4B 后 THP-1 细胞中 AKT 总蛋白及其磷酸化水平并无显著改变。事实上,Rijal 等^[13]通过分析 AML 临床样本及白血病细胞株发现,INPP4B 的内源性表达水平与 AKT 的磷酸化水平无明显相关性。这提示在白血病细胞中 INPP4B 可能通过介导非 AKT 依赖的信号途径来发挥作用。SGK3 是 PI3K 信号通路上另一种重要的下游信号分子,具有与 AKT 相似的结构和功能,在肿瘤细胞的恶性增殖、侵袭和转移等过程中发挥重要作用^[20-21]。本研究发现,过表达 INPP4B 能够明显上调 THP-1 细胞中 SGK3 的磷酸化水平。已知 INPP4B 能够通过其脂质磷酸酶活性水解 PI(3,4)P₂ 产生 PI(3)P,PI(3)P 可与 SGK3 结合以促进 SGK3 的完全激活^[22]。因此进一步检测了过表达 INPP4B 对 PI(3,4)P₂ 和 PI(3)P 水平的影响。结果发现,过表达 INPP4B 可明显降低 THP-1 细胞中 PI(3,4)P₂ 的水平,同时升高 PI(3)P 的水平。Chi 等^[23]报道 INPP4B 能够通过激活 SGK3 而非 AKT,促进黑色素瘤细胞的恶性生长。此外,Guo 等^[9]发现在结肠癌中 INPP4B 能够通过其丝苏氨酸蛋白磷酸酶活性去磷酸化 PTEN 蛋白,降低抑癌蛋白 PTEN 的稳定性,进而增强结肠癌细胞的体外增殖能力。同时,也有研究者证实,INPP4B 可介导激活 DNA 修复蛋白 ATM 和

BRCA1,进而增强 AML 患者的化疗抵抗^[24]。事实上,INPP4B 可能通过上述分子机制参与肿瘤的发生发展之外,肿瘤细胞中 INPP4B 的异常表达还受到多种信号分子的调控。Zhang 等^[25]研究表明,干扰素调节因子 IRF 可作为转录因子与 INPP4B 的启动子结合,从而促进 AML 中 INPP4B 的表达。此外,Guo 等^[9]发现在结肠癌中,转录因子 Est-1 也能与 INPP4B 的启动子结合,进而从转录水平促进 INPP4B 表达上调。因此,INPP4B 可能通过多种分子机制参与调控白血病细胞的恶性转化。

综上所述,本研究通过在人 AML THP-1 细胞中过表达 INPP4B,发现 INPP4B 能够促进白血病细胞的体外增殖和凋亡抵抗,其机制可能与 INPP4B 介导的 PI3K/SGK3 信号通路激活有关。下一步将在动物模型中观察 INPP4B 对白血病发生发展的重要作用。深入研究 INPP4B 的作用机制可能为 AML 的诊治提供一个新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Yang X, Wang J. Precision therapy for acute myeloid leukemia[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1):3.
- [2] Falini B, Sportoletti P, Brunetti L, et al. Perspectives for therapeutic targeting of gene mutations in acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics[J]. Br J Haematol, 2015, 170(3):305-322.
- [3] Ferron M, Vacher J. Characterization of the murine Inpp4b gene and identification of a novel isoform[J]. Gene, 2006, 376(1):152-161.
- [4] Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis; implications for therapeutic strategies in leukemia[J]. Blood, 2012, 119(4):911-923.
- [5] Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, et al. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling[J]. Cancer Cell, 2009, 16(2):115-125.
- [6] Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, et al. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor[J]. Cancer Discov, 2015, 5(7):730-739.
- [7] Hodgson MC, Shao LJ, Frolov A, et al. Decreased expression and androgen regulation of the tumor suppressor gene INPP4B in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(2):572-582.
- [8] Gasser JA, Inuzuka H, Lau AW, et al. SGK3 mediates INPP4B-dependent PI3K signaling in breast cancer[J]. Mol Cell, 2014, 56(4):595-607.
- [9] Guo ST, Chi MN, Yang RH, et al. INPP4B is an oncogenic regulator in human colon cancer[J]. Oncogene, 2016, 35(23):3049-3061.
- [10] Wang Y, Zhou D, Phung S, et al. SGK3 is an estrogen-inducible kinase promoting estrogen-mediated survival of breast cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(1):72-82.
- [11] Rodgers SJ, Ferguson DT, Mitchell CA, et al. Regulation of PI3K effector signalling in cancer by the phosphoinositide phosphatases[J]. Biosci Rep, 2017, 37(1). DOI:10.1042/BSR20160432.
- [12] Dzieladze I, He R, Woolley JF, et al. INPP4B overexpression is associated with poor clinical outcome and therapy resistance in acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2015, 29(7):1485-1495.
- [13] Rijal S, Fleming S, Cummings N, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II (INPP4B) is associated with chemoresistance and poor outcome in AML[J]. Blood, 2015, 125(18):2815-2824.
- [14] Agoulnik IU, Hodgson MC, Bowden WA, et al. INPP4B: the new kid on the PI3K block[J]. Oncotarget, 2011, 2(4):321-328.
- [15] Lundin C, Hjorth L, Behrendtz M, et al. High frequency of BTG1 deletions in acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2012, 51(2):196-206.
- [16] Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling[J]. Blood, 2003, 102(8):2951-2959.
- [17] Liu P, Cheng H, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(8):627-644.
- [18] Brenner AK, Andersson Tvedt TH, Bruserud Ø. The complexity of targeting PI3K-Akt-mTOR signalling in human acute myeloid leukaemia; the importance of leukemic cell heterogeneity, neighbouring mesenchymal stem cells and immunocompetent cells[J]. Molecules, 2016, 21(11):E1512.
- [19] Li Chew C, Lunardi A, Gulluni F, et al. In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K-AKT signaling at endosomes[J]. Cancer Discovery, 2015, 5(7):740-751.
- [20] Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, et al. Second AKT; the rise of SGK in cancer signalling[J]. Growth Factors, 2010, 28(6):394-408.
- [21] Tessier M, Woodgett JR. Role of the Phox homology domain and phosphorylation in activation of serum and glucocorticoid-regulated kinase-3[J]. J Biol Chem, 2006, 281(33):23978-23989.
- [22] Moniz LS, Vanhaesebroeck B. AKT-ing out; SGK kinases come to the fore[J]. Biochem J, 2013, 452(3):e11-13.
- [23] Chi MN, Guo ST, Wilmott JS, et al. INPP4B is upregulated and functions as an oncogenic driver through SGK3 in a subset of melanomas[J]. Oncotarget, 2015, 6(37):39891-39907.
- [24] Wang P, Ma D, Wang J, et al. INPP4B-mediated DNA repair pathway confers resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia[J]. Tumour Biol, 2016, 37(9):12513-12523.
- [25] Zhang F, Zhu J, Li J, et al. IRF2-INPP4B axis participates in the development of acute myeloid leukemia by regulating cell growth and survival[J]. Gene, 2017, 627:9-14.

(责任编辑:唐秋姗)