基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.002771

RNA结合蛋白 ABCF1 在 AML 发生发展过程中的功能研究

吴 爽[1],罗文依[2],杨 健[1],余 佳[3],王东生[4]

(川北医学院 1. 基础医学院;2. 医学检验系,南充 637000;3. 中国医学科学院基础医学研究所,北京 100000;
4. 四川省肿瘤医院研究所检验科,成都 610000)

【摘 要】目的:研究 RNA 结合蛋白 ABCF1 在人急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)发生发展过程中的功能。**方法**:以临床初诊的 AML 患者为实验组,正常人为对照组,采用 RT-qPCR 检测 ABCF1 mRNA 在正常人外周血中单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)和 AML 患者骨髓有核细胞中的表达;用针对 ABCF1 的 2 个 shRNA 慢病毒颗粒感染人单核细胞白血病细胞株 THP-1,用 CCK-8 法检测 THP-1 细胞的增殖,用 PI、Annexin V 染色结合流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。利用 ss-m^{6}A 和 ss-A 探针进行 RNA pull-down 实验,分析 ABCF1 与 m^{6}A 的结合能力。**结果**:ABCF1 在实验组 AML 患者中的表达明显高于对照组(P<0.01),在 THP-1 细胞中抑制内源 ABCF1 的表达能够促进细胞凋亡(P<0.05),抑制细胞增殖(P<0.001),同时明显减少 S 期细胞的比例。与 ss-A 探针相比,ABCF1 蛋白具有特异的 m^{6}A 结合能力。**结论**:ABCF1 在 AML 细胞来源的 THP-1 细胞中发挥原癌基因作用,调控 THP-1 细胞的生理功能。

【关键词】RNA 结合蛋白;ABCF1;急性髓系白血病;细胞增殖

【中图分类号】R34 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2020-11-10

Function of RNA-binding protein ABCF1 in the development of human acute myeloid leukemia

Wu Shuang[1],*Luo Wenyi*[2],*Yang Jian*[1],*Yu Jia*[3],*Wang Dongsheng*[4]

(*1. School of Basic Medical Sciences;2. Department of Laboratory Medicine,North Sichuan Medical College;
3. Institute of Basic Medical Sciences,Chinese Academy of Medical Sciences;4. Department of Laboratory Medicine,Sichuan Cancer Hospital & Institute*)

【Abstract】*Objective*:To explore the function of RNA-binding protein ABCF1 in the development of human acute myeloid leukemia (AML). ***Methods***:The clinically diagnosed AML patients were enrolled in the experimental group,and normal people in the control group. The expression level of ABCF1 mRNA was respectively detected by RT-qPCR in peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) of normal people and bone marrow nucleated cells of AML patients. Human monocytic leukemia cell line THP-1 was infected with two shRNA lentivirus particles targeting ABCF1. The proliferation of THP-1 cells was detected by CCK-8 analysis,and apoptosis and cell cycle were detected by PI and Annexin V staining combined with flow cytometry. RNA pull-down test was carried out by using ss-m^{6}A and ss-A probes,and the binding ability of ABCF1 and m^{6}A was analyzed. ***Results***:The expression of ABCF1 in AML patients in experimental group was significantly higher than that in control group(P<0.01). ABCF1 knock-down significantly promoted apoptosis (P<0.05),and suppressed cell proliferation(P<0.001),as well as affected the cell cycle of THP-1 cells. ***Conclusion***:ABCF1 plays an important role of proto-oncogene in THP-1 cells derived from AML cells and regulates the physiological functions of THP-1 cells.

【Key words】RNA-binding protein;ABCF1;acute myeloid leukemia;cell proliferation

RNA结合蛋白通过与 RNA 相互作用来调节细胞的功能,在转录后基因表达调节中起重要作用。RNA 结合蛋白参与 RNA 剪接、多聚腺苷化作用、RNA 转运、维持 RNA 的稳定和降解、细胞内定位和翻译控制等 RNA 代谢的各个方面[1]。ABCF1 是定位于核内的 RNA 结合蛋白。ATP 结合盒(ATP-binding cassette,ABC)转运体介导多种模型系统的多药耐药和肿瘤干细胞特性,已经在肝癌、卵巢癌等恶性肿瘤的相关研究中被报道[2-3]。另有文献报道,ABCF1

作者介绍:吴 爽,Email:18227385909@163.com,
研究方向:RBP 对 AML 发生发展过程中的功能研究。
通信作者:王东生,Email:13990820268@163.com。
基金项目:四川省科技厅应用基础资助项目(编号:2016JY0171)。
优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210326.1429.003.html
(2021-03-29)

在生理状态和应激状态下都是通过 m^6A 促进翻译的关键蛋白，并且在 m^6A 介导的 mRNA 翻译中与 METTLE3 起协同作用[4]。

急性髓系白血病（acute myeloid leukemia，AML）是一类具有高度异质性的造血系统恶性肿瘤，表现为造血干细胞克隆紊乱，导致血细胞分化成熟的异常。最近研究表明，抗癌药物双甲酰亚胺对白血病细胞产生毒性作用的分子机制有抑制效果，调控靶点为部分依赖作为其靶向蛋白的 ABC50 蛋白（ABCF1）[5]，可见 ABCF1 在 AML 中具有深远的意义，其作用机制值得深入探究。为此，本研究旨在分析 RNA 结合蛋白 ABCF1 在 AML 中的表达情况，明确 ABCF1 在调控 AML 发生发展过程中的重要作用，有助于阐明 AML 的发生机制，为该病的诊断和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样本和细胞系 本研究已获医院伦理审查委员会的审查批准，并取得所有涉及此项研究对象的同意。以川北医学院附属医院血液内科 2018 年至 2019 年收集的临床初诊急性髓系白血病患者为实验组，健康人为对照组，分别分离实验组骨髓和对照组外周血单个核细胞作为实验材料。人单核细胞白血病细胞株 THP-1 来自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.1.2 试剂 感受态细胞及构建敲低质粒所需内切酶（NEB 公司）；293T 和 THP-1 细胞（ATCC）；抗兔 ABCF1 抗体（proteintech）；抗兔二抗（北京中衫金桥生物技术有限公司）；Lipofectamine 转染试剂、RPMI1640、DMEM、进口胎牛血清、M-MLV 反转录酶（Thermo-Fisher 公司）；Western blot 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒（碧云天生物技术公司）；质粒小提中量试剂盒（天根生化科技有限公司）；细胞增殖（Cell Counting kit-8，CCK-8）和凋亡检测试剂盒（东仁化学科技有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 构建 shRNA 载体 在 shRNA 在线设计网站设计 2 条 ABCF1 的 shRNA（sh3 FW：CCGGCGCTGTCATCTGGCTTAATAACTCGAGTTATTAAGCCAGATGACAGCGTTTTTG RV：AATTCAAAAACGCTGTCATCTGGCTTAATAACTCGAGTTATTAAGCCAGATGACAGCG sh4 FW：CCGGGCCAAGTTTATGTGGCCTATTCTCGAGAATAGGCCACATAAACTTGGCTTTTTG-RV：AATTCAAAAAGCCAAGTTTATGTGGCCTATTCTCGAGAATAGGCCACATAAACTTGGC），并在 shRNA 的两端连接酶切位点黏性末端，序列由天一辉远生物技术有限公司合成，合成的片段退火并与 PLKO.1 载体相连接。

1.2.2 质粒提取 将连接好的载体转化进感受态细胞，并接种于氨苄抗性平板放入 37℃孵箱孵育过夜，挑取单克隆至含有 LB 培养基的 15 mL 离心管中，摇床 200 r/min 过夜，次日送菌液测序鉴定。

1.2.3 慢病毒包装及感染 THP-1 细胞 使用转染试剂 Lipofectamine LTX 转染 293T 细胞，4~6 h 换液，48 h 后收集上清，用 0.45 μm 的过滤膜过滤，高速冷冻离心机 20 000*g*、2 h离心。去除上清，沉淀用无血清的 DMEM 培养基溶解，分装冻于-80℃冰箱中。慢病毒感染当天，将细胞状态较好的 THP-1 细胞平均铺在六孔板中，每个孔 1×10^6 个细胞，再将病毒液加入细胞中，轻轻混匀，然后加入 Polybreen。再次混匀后放入孵箱，12~16 h 后换新鲜有血清培养基。

1.2.4 细胞培养 悬浮细胞 THP-1 细胞重悬于 RPMI1640 完全培养基（10%胎牛血清，100×青链霉素混合液），贴壁细胞 293T 细胞放入 DMEM 完全培养基（10%胎牛血清，100×青链霉素混合液），细胞在 37℃、5%CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.2.5 Western blot 检测 ABCF1 的表达 将收集的 THP-1 细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍，加入 RIPA 细胞裂解液，冰浴 30 min，4℃、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清，使用 BCA 试剂盒蛋白定量，取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE，其余蛋白分装后-80℃保存。将凝胶上的蛋白样本转印的 PVDF 膜上，用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h。用一抗稀释液 1∶1 000 稀释的 ABCF1 一抗，1∶5 000 稀释的 β-actin 抗体，4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 遍后加辣根过氧化物酶标记的二抗，37℃室温孵育 2 h，DAB 法显影，分析蛋白表达。

1.2.6 实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测 mRNA TRIzol法提取细胞总 RNA。测定 RNA 样品的浓度和纯度，OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8~2.0。M-MLV 合成 cDNA 的第一链。相对定量的内参基因为 GAPDH，每个样品实验设计 3 个副孔，检测总体积为 20 μL。程序如下：94℃、10 s；58℃、10 s；72℃、20 s，共 50 个循环；94℃、15 s，64~94℃，缓慢升温，绘制熔解解离曲线。RT-qPCR 用到的引物见表 1。

1.2.7 CCK-8 法检测细胞增殖 感染 THP-1 细胞 2 d 后，重悬于新鲜的 1640 完全培养基（加入双倍双抗，10%胎牛血清），平均铺于 96 孔板中，每孔约 5 000 个细胞，3 个复孔，分别在 0、24、48、72 h 加入 10 μL CCK-8，37℃避光孵育 2 h，避免在孔中生成气泡，利用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度（optical density，OD）值。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 感染 THP-1 细胞 2 d 后，计数收集细胞，用预冷的 PBS 洗 2 遍后重悬于 1×结合缓冲液中，分别加入 5 μL 荧光标记的 Annexin V 和 PI 染色液，室温避光孵育 15 min，细胞过滤网过滤成团的细胞，然后快速上流式细胞仪 BD Accuri C6 检测，结果使用 C6 的软件进行分析。

1.2.9 THP-1 细胞系中的 RNA pull-down 收集三皿 10 cm^2 的 THP-1 细胞，每皿用约 500 μL 的 RIP 裂解液裂解细胞，冰上放置 30 min，每 10 min 吹吸混匀 1 次。12 000*g*、4℃离心 10 min，去除上清。蛋白定量（具体步骤见 BCA 蛋白浓度测

定试剂盒说明书）。RNA pull-down 实验要求细胞裂解液蛋白质浓度高于 2 mg/mL，然后将探针与磁珠结合，室温孵育 30 min，每隔 10 min 震荡 1 次，防止磁珠沉底，影响孵育连接效率。然后将裂解后定量的蛋白与 RNA 结合，磁珠所在的离心管置于磁力架上，去除上清。先用 20 mmol/L Tris（pH=7.5）溶液清洗磁珠 2 次，去上清后加入 100 μL 1×Protein-RNA Binding Buffer 清洗磁珠 1 次，配制 RNA-Protein 结合反应体系，并加入包被了 RNA 的磁珠上，轻柔混匀，于 4℃颠倒旋转混匀反应 1 h 以上。最后将反应完的离心管置于磁力架上，去除反应体系上清。用 1×Wash Buffer 清洗磁珠 2 次。洗涤完成后加入适当体积 1×蛋白质 Loading Buffer，100℃变性 10 min。并迅速放置于冰上 2 min，待冷却后再置于磁力架上，留存上清进行后续 Western blot 分析。

1.2.10　分离外周血中的单个核细胞　准备全血，用 1×PBS 进行稀释，然后缓慢加至 Ficoll 分离液上方（Ficoll 与稀释后全血比为 1:2）。800*g* 离心 20 min。取分离液中间层白膜层，用 1×PBS 1 600 r/min、10 min 洗 2 遍。

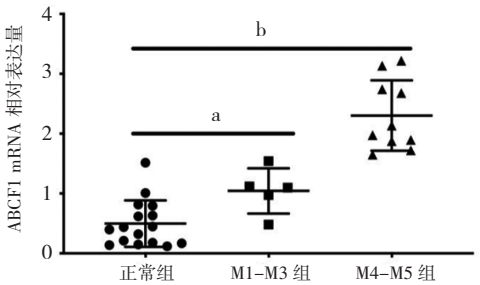
1.3　统计学处理

运用 Graph-Pad Prism（Version 6.01）进行数据处理。实验结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。符合正态分布的变量组间比较使用方差分析，2 组间比较用 *t* 检验。所有实验均重复 3 次及以上。

2　结　果

2.1　ABCF1 在 AML 患者骨髓单个核细胞中的 cDNA 表达上升

为了探索 ABCF1 与 AML 的关系，首先利用 qPCR 检测 16 个正常人的外周血和 16 个 AML 患者的骨髓单个核细胞 cDNA 中 ABCF1 的表达量，由于 16 个 AML 患者 FAB 分型中每个型别人数较少，所以将 AML 患者分为 2 组，其中 M1-M3 为第一组，M4-M5 为第二组。与正常组相比，无论是第一组还是第二组，ABCF1 的表达都有统计学差异（*P*<0.01，*P*<0.001），且第二组的差异较第一组更为明显（图 1）。

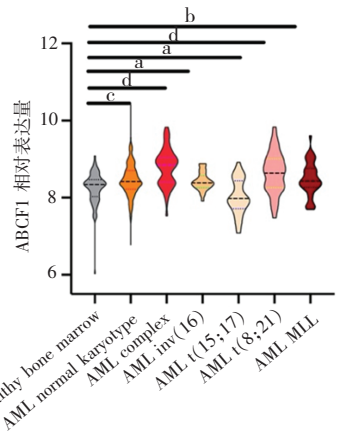


注：a，*P*<0.01；b，*P*<0.001

图 1　ABCF1 在正常人和 AML 患者中的表达差异

2.2　ABCF1 在特定的 AML 群体中表达有差异

利用 Bloodspot 数据库进一步分析 ABCF1 在不同亚型 AML 中的表达情况（图 2）。与正常髓组织（包括 Healthy bone marrow、AML normal karyotype 和 AML complex）相比，ABCF1 在 t（15;17）即 M3 型 AML 中表达下调，但是在所有其他亚型的 AML 患者中均明显上调，其中包括 t（8;21）即 M2 型及 MLL 易位的 AML（包括 M4 和 M5 型）。上述结果提示ABCF1 在这些 AML 中可能发挥促进肿瘤发展的作用。

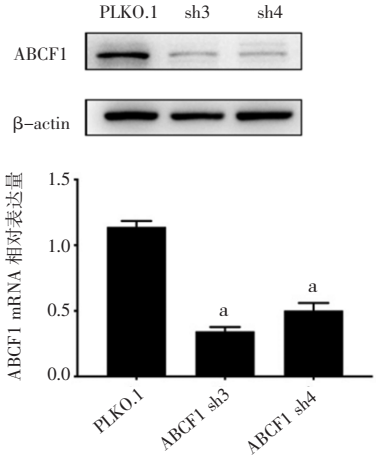


注：a，*P*<0.05；b：*P*<0.01；c：*P*<0.001

图 2　ABCF1 在不同类型 AML 中的表达

2.3　敲降内源 ABCF1 的表达抑制 AML 细胞的增殖能力

为了进一步研究 ABCF1 在 AML 发生发展中的作用，在 THP-1 细胞中构建 2 条位点特异性的 shRNA，均能明显在 RNA 和蛋白水平抑制 ABCF1 表达（*P*<0.001）（图 3），可用于后续功能实验。抑制 ABCF1 的表达可导致 THP-1 细胞增殖受阻（*P*<0.001）（图 4），凋亡增加（*P*<0.05）。流式细胞仪检测细胞周期，发现 DNA 复制期 S 期减少，G_1 期阻滞（图 5）。上述结果提示 ABCF1 在 THP-1 细胞中发挥原癌基因的作用，并且调控 THP-1 细胞的生理过程。

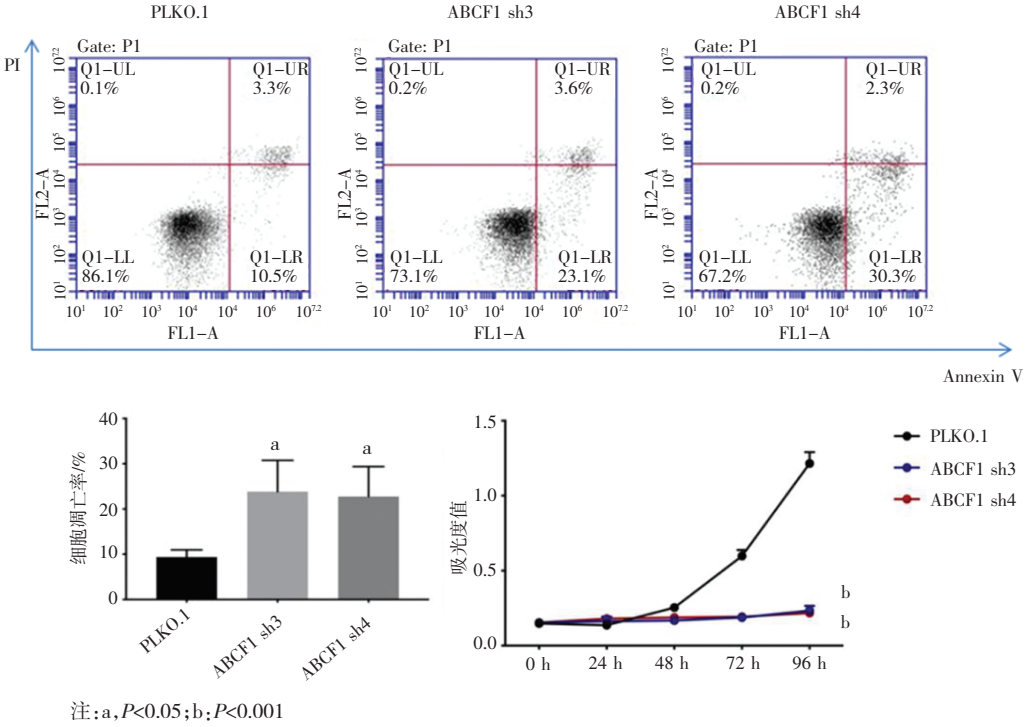


注：a，*P*<0.001

图 3　抑制 THP-1 细胞内源 ABCF1 的表达

2.4　ABCF1 显示与 m^6A 的特异结合特征

为了进一步研究 ABCF1 的功能及其机制，利用体外合成的 m^6A 和 A 2 种探针（图 6A）在 THP-1 细胞的裂解液中进行 RNA pull-down 实验。实验结果表明 ABCF1 作为 m^6A的reader 特异性地与 m^6A 结合而不与 A 结合（图 6B），其中YTHDF1 为经典的 m^6A 的 reader 作为本次实验的阳性对照[6]。



注：a，$P<0.05$；b：$P<0.001$

图 4　ABCF1 对 THP-1 细胞增殖和凋亡的影响

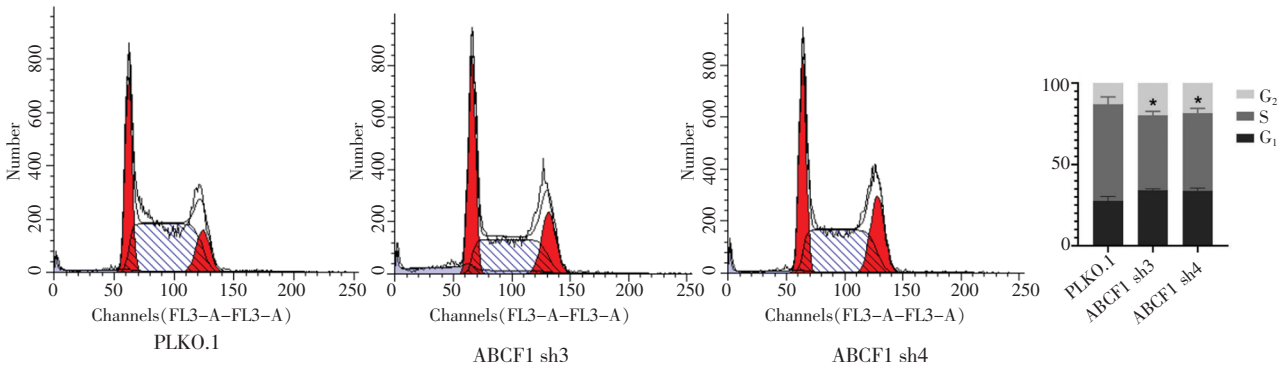
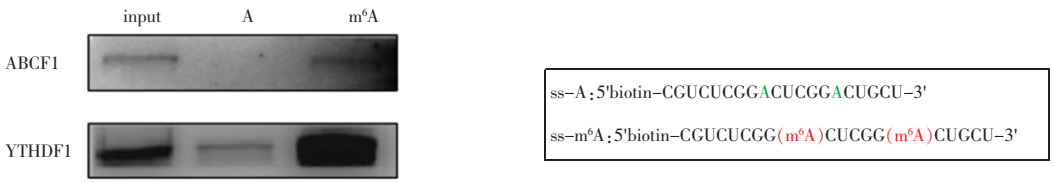


图 5　ABCF1 对 THP-1 细胞周期的影响



A. ABCF1 在人单核细胞株中 RNA pull-down 的蛋白电泳结果　　B. SS-A 和 SS-m^{6}A 探针序列

图 6　ABCF1 显示与 m^{6}A 特异结合

3　讨　论

AML是造血系统的髓系前体细胞产生的恶性克隆性增生疾病，在全世界范围内依然有较高的发病率和病死率。目前对 AML 的治疗除了传统化疗外，还有针对某些基因如 CD33、FLT3 等的靶向治疗，均取得了一定的进展。AML 的发生发展过程包括哪些详细的分子机制还需进一步探索[7-8]。研究发现 RNA 结合蛋白通过与 mRNA 结合，从而发挥正

向或负向调节作用，这种作用已经在所有的生物学领域被广泛研究，涉及生理学、病理学及癌症等领域[9]。ABCF1 是一种 ABC 转运体家族蛋白，已被证明可以调节先天性免疫反应，是自身免疫性胰腺炎和关节炎的高危基因。与 ABC 转运体其他家族不同的是，ABCF1 缺乏跨膜结构域，并且 ABCF1 被认为是发育过程中的一个重要基因[10]。在最新的 ABCF1 研究中，ABCF1 作为免疫和炎症的潜在调节剂能够通过调节巨噬细胞的先天免疫应答从而切断促炎途径，调节败血症的死亡率，抑制低血压引起的肾循环衰竭[11]。并且早在 2018 年就有研究发现ABCF1 作为炎症细胞因子途径的翻译调节因子，可能在介导抗抑郁反应中起作用[12]。

本研究首先进行了AML的病例调查及bloodspot数据分析。病例调查选择了 16 个正常人的外周血标本和 16 个 AML 患者的骨髓标本提取单个核细胞中的 cDNA，利用 RT-qPCR 分别检测了ABCF1 在 32 个标本中的表达量。结果发现，与正常对照组相比，ABCF1 在 AML 患者中的表达明显高于正常人。然后在 bloodspot 网站上对 ABCF1 在白血病中的表达量进行调研，结果显示在不同类型的 AML 中 ABCF1 的表达具有选择性，ABCF1 除了在 t(15;17) APL 中表达下调之外，在其他 AML 群体中均表达上调，并且在 t(8;21)以及 MLL 易位的 AML 中明显上调。因此，在 THP-1 细胞中通过敲除下调 ABCF1 对 ABCF1 的功能进行研究，结果显示下调 ABCF1 之后明显抑制了 THP-1 细胞增殖，促进THP-1 细胞凋亡，同时细胞周期的运行也受到抑制。这些结果共同证明 ABCF1 能够在 AML 细胞发挥原癌基因功能。由此推断，ABCF1 这一经典的 RNA 结合蛋白可能是 AML 诊断和治疗的有效靶点之一。Cieślak M 等[5]研究报道 ABCF1 是新型沙利度胺类似二甲酰胺的靶向蛋白，而抑制内源 ABCF1 的表达降低HeLa 细胞对药物的敏感性。该研究与本研究互为补充，明确了基于抑制 ABCF1 治疗 AML 的可行性。

目前 ABCF1 的作用机制还不完全明确。2017 年的一项研究发现 ABCF1 与 m^6A 修饰密切相关，能够与 METTL3 协同作用，促进 5' 端 m^6A 修饰的 mRNA 促进不依赖 eIF4F 的翻译[4]。本研究也发现 ABCF1 作为 m^6A 的 reader 特异性地与 m^6A 结合而不与 A 结合，后续需进一步探索其在白血病免疫机制和基质细胞调控中的作用。

综上所述，本研究不但阐明了 ABCF1 对 AML 细胞生存和增殖的重要性，也初步探索了其在 AML 细胞中与 m^6A 的关系，为后续研究 ABCF1 如何调控 AML 发生发展的机制提供了良好的思路。

参 考 文 献

[1] Ye J，Blelloch R. Regulation of pluripotency by RNA binding proteins[J]. Cell Stem Cell，2014，15(3)：271-280.

[2] Fung SW，Cheung FY，Yip CW，et al. The ATP-binding cassette transporter ABCF1 is a hepatic oncofetal protein that promotes chemoresistance，EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett，2019，457：98-109.

[3] Seborova K，Vaclavikova R，Soucek P，et al. Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses[J]. Cancer Med，2019，8(2)：606-616.

[4] Coots RA，Liu XM，Mao Y，et al. m^6A facilitates eIF4F-independent mRNA translation[J]. Mol Cell，2017，68(3)：504-514.

[5] Cieślak M，Kaźmierczak-Barańska J，Królewska-Golińska K，et al. New thalidomide-resembling dicarboximides target ABC50 protein and show antileukemic and immunomodulatory activities[J]. Biomolecules，2019，9(9)：446.

[6] Shi H，Zhang X，Weng YL，et al. m^6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1[J]. Nature，2018，563(7730)：249-253.

[7] Medinger M，Passweg JR. Acute myeloid leukaemia genomics[J]. Br J Haematol，2017，179(4)：530-542.

[8] Leick MB，Levis MJ. The future of targeting FLT3 activation in AML[J]. Curr Hematol Malig Rep，2017，12(3)：153-167.

[9] Ciafrè SA，Galardi S. microRNAs and RNA-binding pro-teins：a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer[J]. RNA Biol，2013，10(6)：935- 942.

[10] Wilcox SM，Arora H，Munro L，et al. The role of the innate immune response regulatory gene ABCF1 in mammalian embryogenesis and development[J]. PLoS One，2017，12(5)：e0175918.

[11] Arora H，Wilcox SM，Johnson LA，et al. The ATP-binding cassette gene ABCF1 functions as an E2 ubiquitin-conjugating enzyme controlling macrophage polarization to dampen lethal septic shock[J]. Immunity，2019，50(2)：418-431.e6.

[12] Qu L，Jiang Y，Cheng C，et al. Crystal structure of ATP-bound human ABCF1 demonstrates a unique conformation of ABC proteins[J]. Structure，2018，26(9)：1259-1265.e3.

（责任编辑：周一青）