

网络出版时间: 2023-09-19 17:38:51 网络出版地址: https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1409.001

◇基础医学研究◇

CLEC5A 调控 AKT1/mTOR 信号通路促进白血病细胞的增殖

丁书琴^{1,2}, 查丹彤¹, 齐欣³, 杨爱清², 周钢桥^{1,2,3}

摘要 目的 探讨 C 型凝集素结构域家族 5 成员 A (CLEC5A) 基因对白血病细胞系 THP-1 和 K562 细胞增殖、凋亡和周期进程的影响及其可能的作用机制。方法 通过基因表达谱交互分析 (GEPiA) 数据库分析白血病患者中 CLEC5A 的表达水平。采用包装了 CLEC5A 过表达质粒的慢病毒感染 THP-1 和 K562 细胞以过表达 CLEC5A, 采用小干扰 RNA (siRNA) 瞬时转染 THP-1 和 K562 细胞以敲低 CLEC5A。采用 CCK-8 实验与 EdU 实验检测细胞的增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期及过氧化氢 (H₂O₂) 刺激条件下的细胞凋亡。通过转录组测序和通路富集分析过表达 CLEC5A 基因后, 上调或下调表达的基因显著富集的信号通路。采用 Western blot 实验检测 AKT/mTOR 和 p53 信号通路中相关蛋白的表达水平。结果 CLEC5A 在人白血病骨髓组织中的表达水平显著高于健康人群。敲低 CLEC5A 可显著抑制 THP-1 和 K562 细胞的增殖 ($P < 0.01$) 和 S 期进程 ($P < 0.05$), 并促进 H₂O₂ 刺激条件下的细胞凋亡 ($P < 0.001$); 过表达 CLEC5A 则显著促进 THP-1 和 K562 细胞的增殖 ($P < 0.001$) 和 S 期进程 ($P < 0.01$), 并抑制 H₂O₂ 刺激条件下的细胞凋亡 ($P < 0.01$)。过表达 CLEC5A 后上调表达的基因显著富集于 AKT1/mTOR 等信号通路; 而下调表达的基因显著富集于细胞周期等信号通路。且 CLEC5A 可显著抑制 BAX 和 p53 基因的表达, 显著促进 BCL-2 基因的表达和 AKT1、mTOR 蛋白的磷酸化水平。结论 CLEC5A 可促进白血病细胞系 THP-1 和 K562 的细胞增殖和周期进程, 抑制细胞凋亡, 其作用机制可能与 AKT/mTOR 和 p53 信号通路相关。

关键词 THP-1 细胞; K562 细胞; CLEC5A; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号 R 733.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1613-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.001

白血病是一种常见的血液系统恶性肿瘤, 具有发病率高、预后差和病死率高的特点^[1]。目前, 治疗白血病的主要方法是化疗和骨髓移植术。但是, 化疗的副作用大且复发率高, 而骨髓移植配型成功的概率极低。近年来, 分子生物学的研究对破译这种疾病的发病机制起到了重要作用, 其中基因异常表达被认为是决定化疗反应和预后的最重要因素之一^[2]。因此, 寻找并鉴定白血病相关基因, 对白血病的靶向治疗、药物选择和预后判断具有重要的临床价值。

C 型凝集素结构域家族 5 成员 A (C-type lectin-domain family member A, CLEC5A) 是一种脾酪氨酸激酶偶联的 II 型膜蛋白, 主要由骨髓细胞表达, 在细胞生长过程中发挥重要的作用^[3]。CLEC5A 在多种恶性肿瘤患者中异常表达。CLEC5A 在胃癌、胶质母细胞瘤和卵巢癌等细胞系的恶性肿瘤组织中显著高表达^[4-5]。研究^[6]显示, CLEC5A 可通过促进 STAT5 活性以抑制原代人异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 1 和 2 亚型突变的急性髓细胞白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 细胞对 IDH 抑制药的分化反应。然而, CLEC5A 基因是否影响白血病细胞的生长及其具体的分子机制还未见报道。因此, 该研究以白血病细胞系 THP-1 和 K562 细胞为研究对象, 旨在探索 CLEC5A 对 THP-1、K562 细胞体外生长的影响, 并初步探索其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系与载体 人白血病细胞系 THP-1、K562 和人胚肾细胞系 HEK293T 来自北京军事医学研究院遗传学与整合组学实验室细胞库。载体包括用于基因过表达的 pLV-CLEC5A-EGFP-N 及对照载体 pLV-EGFP-N 购自北京英茂盛业科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 细胞培养基 DMEM 和 RPMI-1640 购自北京细工生物科技有限公司; 细胞培养用的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及消化细胞用

2023-05-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 8190061543)

作者单位: ¹ 安徽医科大学生命科学学院, 合肥 230032² 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心, 北京 100850³ 贵州大学医学院, 贵阳 550025

作者简介: 丁书琴, 女, 硕士研究生;

周钢桥, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhougq114@126.com

的 0.25% 胰蛋白酶购自上海第一生化药业有限公司; CCK-8 检测试剂盒购自北京庄盟国际生物公司; BeyoClick™ EdU-647 细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Lipofectamine 2000(货号: 11668027) 转染试剂购自上海赛默飞世尔科技有限公司; SYBR Green 荧光定量试剂盒(货号: KD4601) 购自美国 Kapa Biosystems 公司; 凋亡试剂盒(货号: 49392ES50) 购自上海钰森生物技术有限公司; 过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂) 溶液购自深圳容金科技有限公司(货号: 1914C600); *CLEC5A* 抗体(1:1 000, 货号: A2629) 购自成都博奥龙生物科技有限公司; 兔种属来源二抗(1:2 000, 货号: A25022)、鼠种属来源二抗(1:2 000, 货号: A25012) 均购自武汉亚科因生物科技有限公司; GAPDH 抗体(1:2 000, 货号: 60004-Ig)、AKT1 抗体(1:1 000, 货号: 80462-I-RR)、p-AKT1 抗体(1:500, 货号: 66444-I-Ig)、mTOR 抗体(1:1 000, 货号: 66888-I-Ig)、p-mTOR 抗体(1:500, 货号: 80596-I-RR)、p53 抗体(1:2 000, 货号: 60283-2-Ig)、BAX 抗体(1:2 000, 货号: 60267-I-Ig)、BCL-2 抗体(1:2 000, 货号: 60178-I-Ig) 均购自美国 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 临床相关性分析 本研究从基因表达谱交互分析(gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail>) 平台下载获得了来自 TCGA 和 GTEx 项目的 31 种癌组织和癌旁组织(9 736 个肿瘤样本、8 587 个正常样本)的 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq) 表达数据, 并采用 Wilcoxon 检验分析比较 *CLEC5A* 在癌和癌旁组织中的表达及其差异。

1.2.2 细胞培养 THP-1 和 K562 细胞使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养; HEK293T 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。培养条件均为 37 °C、5% CO₂, 并保持 95% 的湿度。

1.2.3 慢病毒包装与稳转株构建 将病毒包装质粒(pMD2. G、psPAX2) 与目的质粒共转染于 HEK293T 细胞, pLV-EGFP-N 转染细胞为对照组, pLV-*CLEC5A*-EGFP-N 转染细胞为过表达组 6~8 h 更换为完全培养基, 48 h 后收集病毒上清液, 用 0.25 μm 滤器过滤, 于 4 °C 静置 24 h 后感染 THP-1 和 K562 细胞 6~8 h 更换为完全培养基, 72 h 后加入嘌呤霉素(终浓度为 2 mg/L) 进行筛选。收集细胞用于后续实验。

1.2.4 siRNA 转染 将 Lipofectamine 2000 与设计好的靶向沉默 *CLEC5A* 的 siRNA 共同孵育 20 min 后, 滴加至 THP-1 和 K562 细胞培养皿, siNC 转染细胞作为阴性组, si*CLEC5A*-1、si*CLEC5A*-2 转染细胞为感染组 6~8 h 更换为完全培养基, 收集细胞用于后续实验。siRNA 序列见表 1。

表 1 siRNA 靶向序列

编号	序列(5'→3')
siNC	UUCUCGGAACGUGUCACGUTT
si <i>CLEC5A</i> -1	CCCAACGGCTTCATTACCA
si <i>CLEC5A</i> -2	CGACCATTGGCTAACAAA

1.2.5 细胞总蛋白的提取与 Western blot 实验 收集细胞, 加入混有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min 后, 在沸水中煮 10 min, 得到细胞总蛋白样本。选择 10% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶, 根据实验设计的顺序, 进行上样、电泳和转膜, 经 5% 的脱脂乳室温封闭 1 h, 4 °C 孵育特异性一抗过夜, 室温孵育二抗 1 h, 最后进行显影。

1.2.6 总 RNA 的提取与 qRT-PCR 实验 收集细胞, 提取细胞总 RNA, 进行 RNA 逆转录反应。采用 KAPA SYBR® FAST qRT-PCR 试剂盒, 根据说明书在 96 孔板中加入试剂、引物和逆转录完成的模板, 在 qRT-PCR 仪器上进行样本 Ct 值的检测, 最后通过 2^{-ΔΔCt} 进行归一化数据处理。引物序列见表 2。

表 2 实时定量 PCR 实验的引物信息

引物名称	序列(5'→3')
<i>CLEC5A</i>	F: AGGTGGCGTTGGATCAACAA
	R: TTAGGCCAATGGTCGCACAG
<i>AKT1</i>	F: AGCGACGTGGCTA TTGTGAA
	R: GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT
<i>mTOR</i>	F: ATGCTTGAACCCGGACCTG
	R: TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT
<i>p53</i>	F: CCTCCTGGCCCTGTGATCTT
	R: GGCGGGGTGTCCAATCAA
<i>BAX</i>	F: TGGAGATGAACTGGACAGCA
	R: GATCAGCTCGGGCACTTTAG
<i>BCL-2</i>	F: CTGGCATCTTCTCCTTCCAG
	R: ACATCTCTGCGAAGTCACGA
<i>ACTB</i>	F: AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT
	R: CCATCACGCCCTGGTGCCT

1.2.7 CCK-8 法检测细胞生长 取处于对数生长期的细胞接种于 48 孔板中, 分别在 4、24、48、72、96、120 h 加入 15 μl CCK-8 试剂原液, 37 °C 孵育 1 h 后, 收集 90 μl 反应液, 用酶标仪检测 450 nm 处的

吸光度。

1.2.8 EdU 法检测细胞增殖 取处于对数生长期的细胞,加入等量的 EdU 工作液(终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h 后,加入 Click 反应液,室温避光孵育 30 min,用 PBS 洗涤 2 遍。再加入 1 ml 混有 Hoechst 33342 的 PBS 溶液,室温避光孵育 10 min,用 PBS 洗涤 2 遍,上机进行流式检测。采用 FlowJo 7.6 软件分析数据。

1.2.9 Annexin-V 与 PI 双染法检测细胞凋亡 取处于对数生长期的细胞接种于 12 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后加入 H_2O_2 溶液(终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$)继续孵育 24 h。收集细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤 2 遍,再加入 100 μl Binding Buffer、2.5 μl AnnexinV-FITC 和 5 μl PI 重悬细胞,室温避光孵育 15 min,在 1 h 内上机进行流式检测。采用 FlowJo 7.6 软件分析数据。

1.2.10 流式细胞术检测细胞周期 收集处于对数生长期的细胞,加 300 μl PBS 重悬后,滴加 700 μl 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。用 PBS 洗涤 2 遍,加入核糖核酸酶 A 和 PI 染料的混合液重悬细胞,室温避光孵育 15 min 后上机进行流式检测。采用 FlowJo 7.6 软件分析数据。

1.2.11 转录组测序及基因表达定量分析 提取过表达 *CLEC5A* 及对照组的 THP-1 细胞中的 RNA,由北京贝瑞和康生物技术有限公司在 illumina nova6000 平台上采用 150PE 的双端配对策略进行 RNA-seq。采用 FastQC 软件和 trim-galoe 对测序数据进行质量评价并去除低质量的数据和接头序列,以 GRCh38/hg38 基因组序列为参考,采用 salmon 对通过质量评估的测序数据进行序列比对和定量^[7]。

利用 DESeq 软件进行基因差异表达分析,使用 Metascape 网站对显著表达基因进行功能富集分析^[8],以鉴定 *CLEC5A* 在白血病中影响的生物学过程和(或)信号通路。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用 Graph Pad Prism 9 软件进行图表绘制。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有的实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 *CLEC5A* 在白血病患者骨髓组织中的表达 对 GEPIA 平台中来自 TCGA 和 GTEx 项目的 31 种癌组织和相应癌旁组织(9 736 个肿瘤样本、8 587 个正常样本)的 RNA-seq 表达数据进行分析,探究 *CLEC5A* 的表达水平。结果显示,*CLEC5A* 在 AML 患者的骨髓组织中的 mRNA 表达水平高于健康人群($P < 0.05$),见图 1A。此外,在其他 8 种癌组织(如乳腺浸润性癌等)中 *CLEC5A* 的表达也均高于对应的癌旁组织($P < 0.05$),见图 1B。因此,推测 *CLEC5A* 可能在白血病中发挥促癌基因的功能。

2.2 *CLEC5A* 过表达与敲低细胞株的鉴定 qRT-PCR 技术及 Western blot 实验结果显示,成功构建了稳定过表达 *CLEC5A* 的 THP-1 和 K562 细胞($t_{\text{THP-1}} = 11.500$ 、 $t_{\text{K562}} = 11.080$;均 $P < 0.001$);成功筛选了瞬时敲低 *CLEC5A* 的 THP-1 和 K562 细胞株($t_{\text{THP-1-siCLEC5A-1}} = 6.577$ 、 $t_{\text{THP-1-siCLEC5A-2}} = 14.090$; $t_{\text{K562-siCLEC5A-1}} = 10.260$ 、 $t_{\text{K562-siCLEC5A-2}} = 7.727$;均 $P < 0.01$)。见图 2。

2.3 *CLEC5A* 对白血病细胞的增殖影响 CCK-8

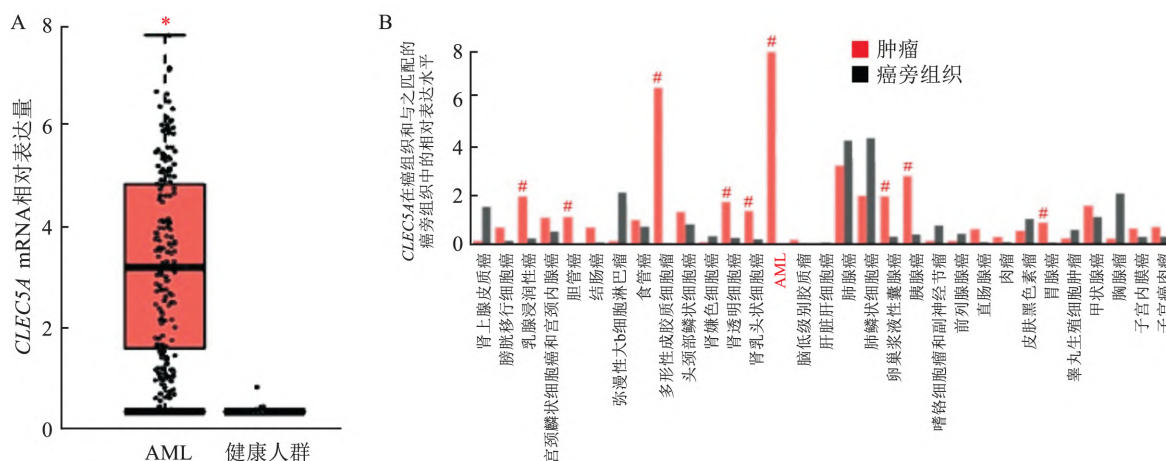


图 1 *CLEC5A* 在白血病和其他肿瘤患者中的表达情况

A: 白血病患者和健康人骨髓组织中 *CLEC5A* mRNA 表达水平; B: 31 种癌组织及其相应癌旁组织中 *CLEC5A* 基因表达水平; 与健康人群比较: * $P < 0.05$; 与癌旁组织比较: # $P < 0.05$

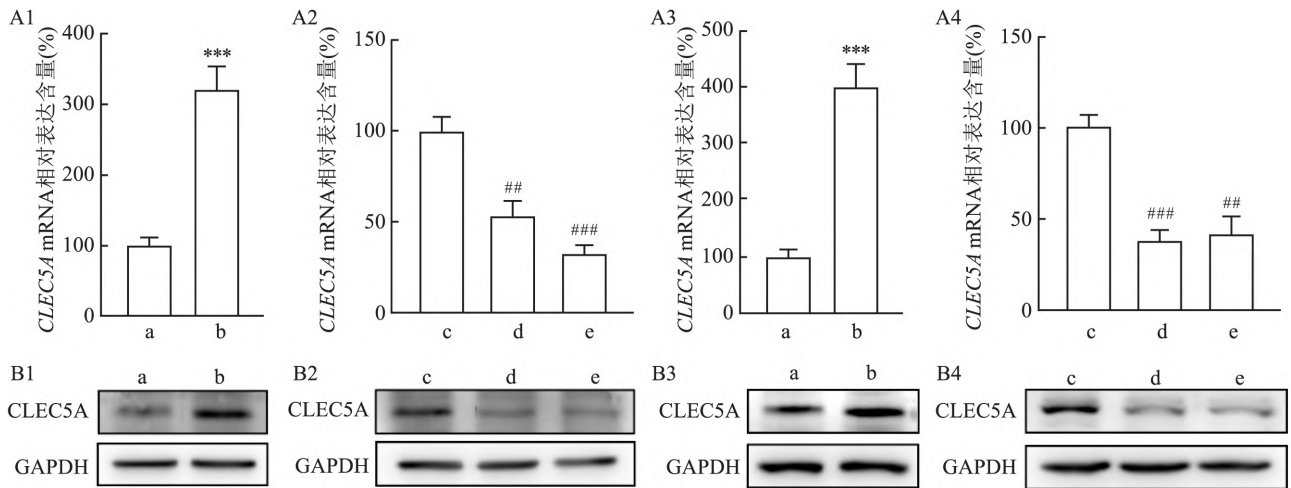


图2 THP-1 和 K562 细胞中 CLEC5A 过表达与敲低效果的鉴定

A1、A2: qRT-PCR 实验检测 THP-1 细胞中 CLEC5A 的 mRNA 表达水平; A3、A4: qRT-PCR 实验检测 K562 细胞中 CLEC5A 的 mRNA 表达水平; B1、B2: Western blot 实验检测 THP-1 细胞中 CLEC5A 的蛋白表达水平; B3、B4: Western blot 实验检测 K562 细胞中 CLEC5A 的蛋白表达水平; a: pLV-EGFP-N 组; b: pLV-CLEC5A-EGFP-N 组; c: siNC 组; d: siCLEC5A-1 组; e: siCLEC5A-2 组; 与 pLV-EGFP-N 组比较: *** $P < 0.001$; 与 siNC 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

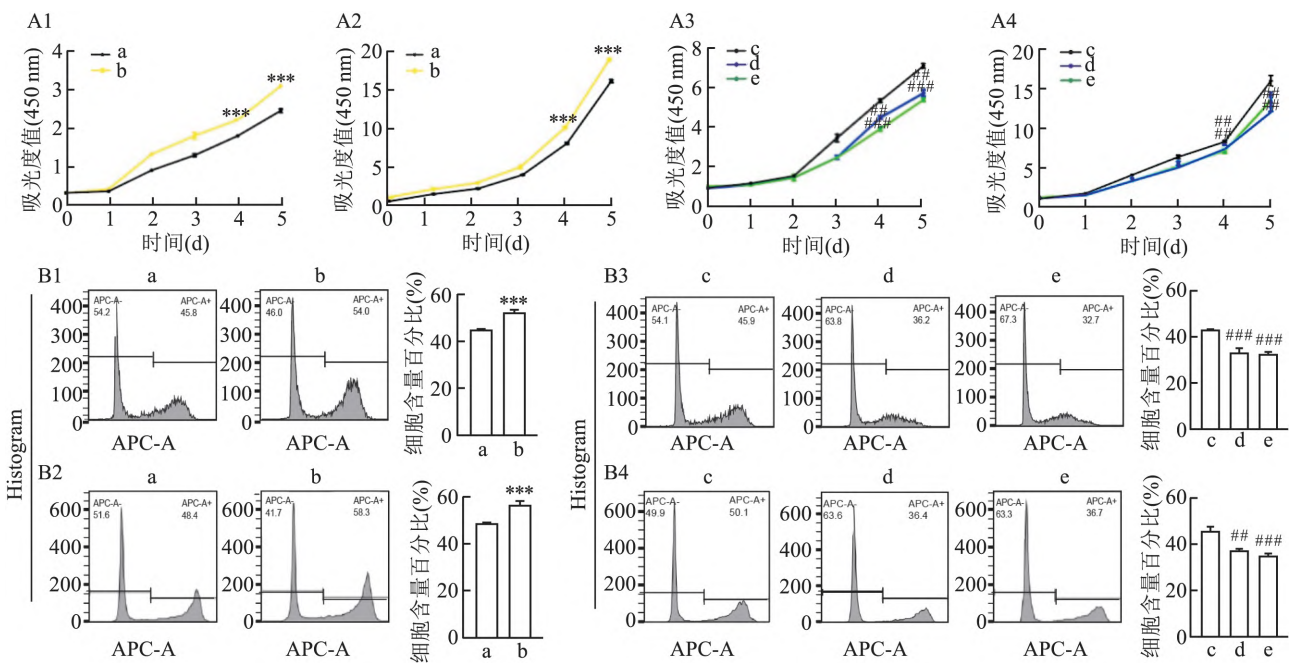


图3 CLEC5A 对白血病细胞的增殖能力的影响

A1: 过表达 CLEC5A 对 THP-1 细胞的细胞活力的影响; A2: 过表达 CLEC5A 对 K562 细胞的细胞活力的影响; A3: 敲低 CLEC5A 对 THP-1 细胞的细胞活力的影响; A4: 敲低 CLEC5A 对 K562 细胞的细胞活力的影响; B1: 过表达 CLEC5A 对 THP-1 细胞的增殖能力的影响; B2: 过表达 CLEC5A 对 K562 细胞的增殖能力的影响; B3: 敲低 CLEC5A 对 THP-1 细胞的增殖能力的影响; B4: 敲低 CLEC5A 对 K562 细胞的增殖能力的影响; a: pLV-EGFP-N 组; b: pLV-CLEC5A-EGFP-N 组; c: siNC 组; d: siCLEC5A-1 组; e: siCLEC5A-2 组; 与 pLV-EGFP-N 组比较: *** $P < 0.001$; 与 siNC 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

和 EdU 实验结果显示, 过表达 CLEC5A 可显著促进 THP-1 和 K562 细胞的增殖能力, 见图 3A1、A2 ($t_{THP-1} = 18.030$, $t_{K562} = 14.960$; 均 $P < 0.001$)。其中, 增殖细胞比例分别由 45.8%、48.4% 增加到了 54.0%、

58.3%, 见图 3B1、B2 ($t_{THP-1} = 12.200$, $t_{K562} = 8.791$; 均 $P < 0.001$); 而敲低 CLEC5A 则显著抑制 THP-1 和 K562 细胞的增殖能力, 见图 3A3、A4 ($t_{THP-1-siCLEC5A-1} = 20.760$, $t_{THP-1-siCLEC5A-2} = 12.080$;

$t_{K562-siCLEC5A-1} = 5.400$ 、 $t_{K562-siCLEC5A-2} = 6.190$; 均 $P < 0.01$ 。其中增殖细胞比例分别由 45.9%、50.1% 减少到了 36.2%、32.7% 和 36.4%、36.7%，见图 3B3、B4 ($t_{THP-1-siCLEC5A-1} = 7.041$ 、 $t_{THP-1-siCLEC5A-2} = 8.726$ ； $t_{K562-siCLEC5A-1} = 10.070$ 、 $t_{K562-siCLEC5A-2} = 22.700$; 均 $P < 0.01$)。结果提示，*CLEC5A* 可增强白血病细胞 THP-1 和 K562 的增殖能力。

2.4 *CLEC5A* 对白血病细胞凋亡的影响 采用 Annexin V-FITC 结合 PI 双染法,检测 H₂O₂ 刺激条

件下 扰动 *CLEC5A* 基因对 THP-1 和 K562 细胞凋亡的影响。结果显示,过表达 *CLEC5A* 可显著抑制 THP-1 和 K562 细胞的凋亡,凋亡细胞比例分别由 22.8%、47.7% 减少到了 12.9%、34.0%，见图 4A1、A2 ($t_{THP-1} = 7.461$ 、 $t_{K562} = 24.970$; 均 $P < 0.01$)。敲低 *CLEC5A* 可显著促进 THP-1 和 K562 细胞的凋亡,凋亡细胞比例分别由 24.2%、52.9% 增加到了 34.8%、31.1% 和 66.7%、68.6%，见图 4B1、B2 ($t_{THP-1-siCLEC5A-1} = 14.900$ 、 $t_{THP-1-siCLEC5A-2} = 9.376$;

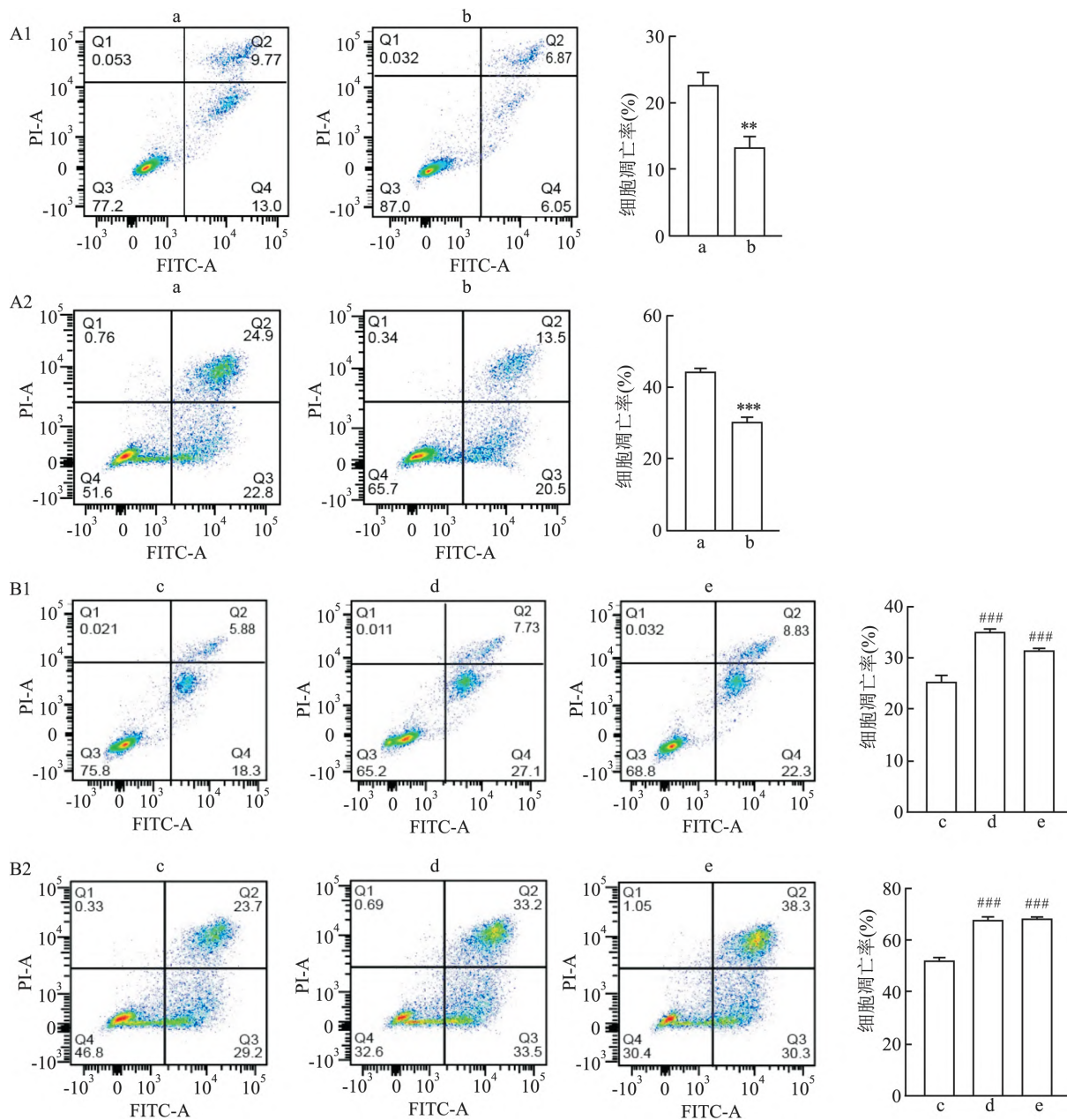


图 4 *CLEC5A* 对白血病细胞凋亡的影响

A1: 过表达 *CLEC5A* 对 THP-1 细胞凋亡的影响; A2: 过表达 *CLEC5A* 对 K562 细胞凋亡的影响; B1: 敲低 *CLEC5A* 对 THP-1 细胞凋亡的影响; B2: 敲低 *CLEC5A* 对 K562 细胞凋亡的影响; a: pLV-EGFP-N 组; b: pLV-*CLEC5A*-EGFP-N 组; c: siNC 组; d: si*CLEC5A*-1 组; e: si*CLEC5A*-2 组; 与 pLV-EGFP-N 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 siNC 组比较: ### $P < 0.001$

$t_{K562-siCLEC5A-1} = 24.860$ 、 $t_{K562-siCLEC5A-2} = 36.680$; 均 $P < 0.001$ 。以上结果提示, *CLEC5A* 可抑制白血病细胞的凋亡。

2.5 *CLEC5A* 对白血病细胞周期进程的影响
 采用流式细胞术, 观察扰动 *CLEC5A* 基因后对 THP-1 和 K562 细胞周期的影响。结果显示, 过表达 *CLEC5A* 后, THP-1 和 K562 细胞的 G1 细胞比例显著减少, 分别由 56.2%、38.0% 减少至 43.0%、27.7% ($t_{THP-1} = 22.440$ 、 $t_{K562} = 25.230$; 均 $P < 0.001$), S 细胞比例显著增加, 分别由 34.8%、54.2% 增加至 43.9% 和 63.3%, 见图 5A1、A2 (t_{THP-1}

$= 5.920$ 、 $t_{K562} = 16.980$; 均 $P < 0.01$); 反之, 敲低 *CLEC5A* 后, THP-1 和 K562 细胞的 G1 细胞比例显著增加, 分别由 54.7%、32.6% 增加至 60.9%、60.3% 和 37.7%、38.4% ($t_{THP-1-siCLEC5A-1} = 6.278$ 、 $t_{THP-1-siCLEC5A-2} = 5.900$; $t_{K562-siCLEC5A-1} = 2.880$ 、 $t_{K562-siCLEC5A-2} = 3.281$; 均 $P < 0.05$), S 细胞比例显著减少, 分别由 36.7%、55.1% 减少至 24.4%、28.8% 和 51.8%、50.7%, 见图 5B1、B2 ($t_{THP-1-siCLEC5A-1} = 3.987$ 、 $t_{THP-1-siCLEC5A-2} = 4.478$; $t_{K562-siCLEC5A-1} = 8.137$ 、 $t_{K562-siCLEC5A-2} = 9.632$; 均 $P < 0.05$)。上述结果提示, *CLEC5A* 能够显著促进白血病细胞的周期进程。

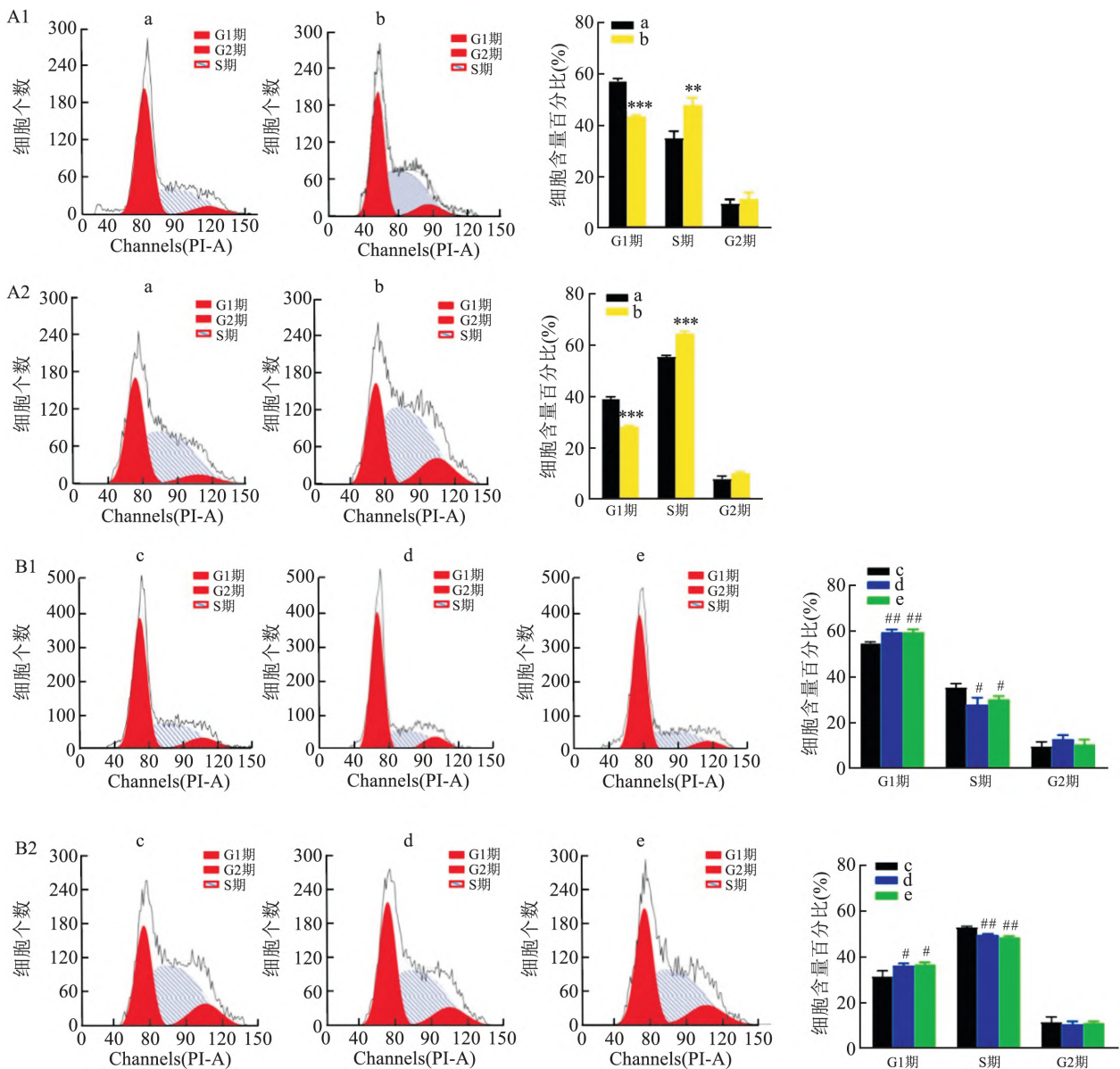


图5 *CLEC5A* 对白血病细胞周期的影响

A1: 过表达 *CLEC5A* 对 THP-1 细胞周期的影响; A2: 过表达 *CLEC5A* 对 K562 细胞周期的影响; B1: 敲低 *CLEC5A* 对 THP-1 细胞周期的影响; B2: 敲低 *CLEC5A* 对 K562 细胞周期的影响; a: pLV-EGFP-N 组; b: pLV-*CLEC5A*-EGFP-N 组; c: siNC 组; d: si*CLEC5A*-1 组; e: si*CLEC5A*-2 组; 与 pLV-EGFP-N 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 siNC 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.6 CLEC5A 影响白血病细胞的 AKT/mTOR 和 p53 信号通路 为探索 CLEC5A 促进白血病进展的作用机制,在 THP-1 细胞中过表达 CLEC5A 并进行 RNA-seq 分析。差异表达基因分析显示,过表达 CLEC5A 后,显著下调 902 个基因的表达,上调 1 373 个基因的表达,见图 6A。再分别对上调表达基因和下调表达基因进行功能富集分析。结果显示, CLEC5A 负调控的基因显著富集于细胞周期等信号通路,见图 6B; CLEC5A 正调控的基因显著富集于 AKT1/mTOR 等信号通路,见图 6C。通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验,在 THP-1 和 K562 细胞系

中验证了 CLEC5A 对 AKT1、mTOR、p53 和凋亡相关基因 BAX、BCL-2 的影响。结果显示,在 THP-1 和 K562 细胞中过表达 CLEC5A 基因后, BAX 和 p53 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低, BCL-2 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高, AKT1 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平显著升高。相反,在 THP-1 和 K562 细胞中敲低 CLEC5A 基因后, BAX 和 p53 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高, BCL-2 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低, AKT1 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平显著降低,见图 6D ~ G。

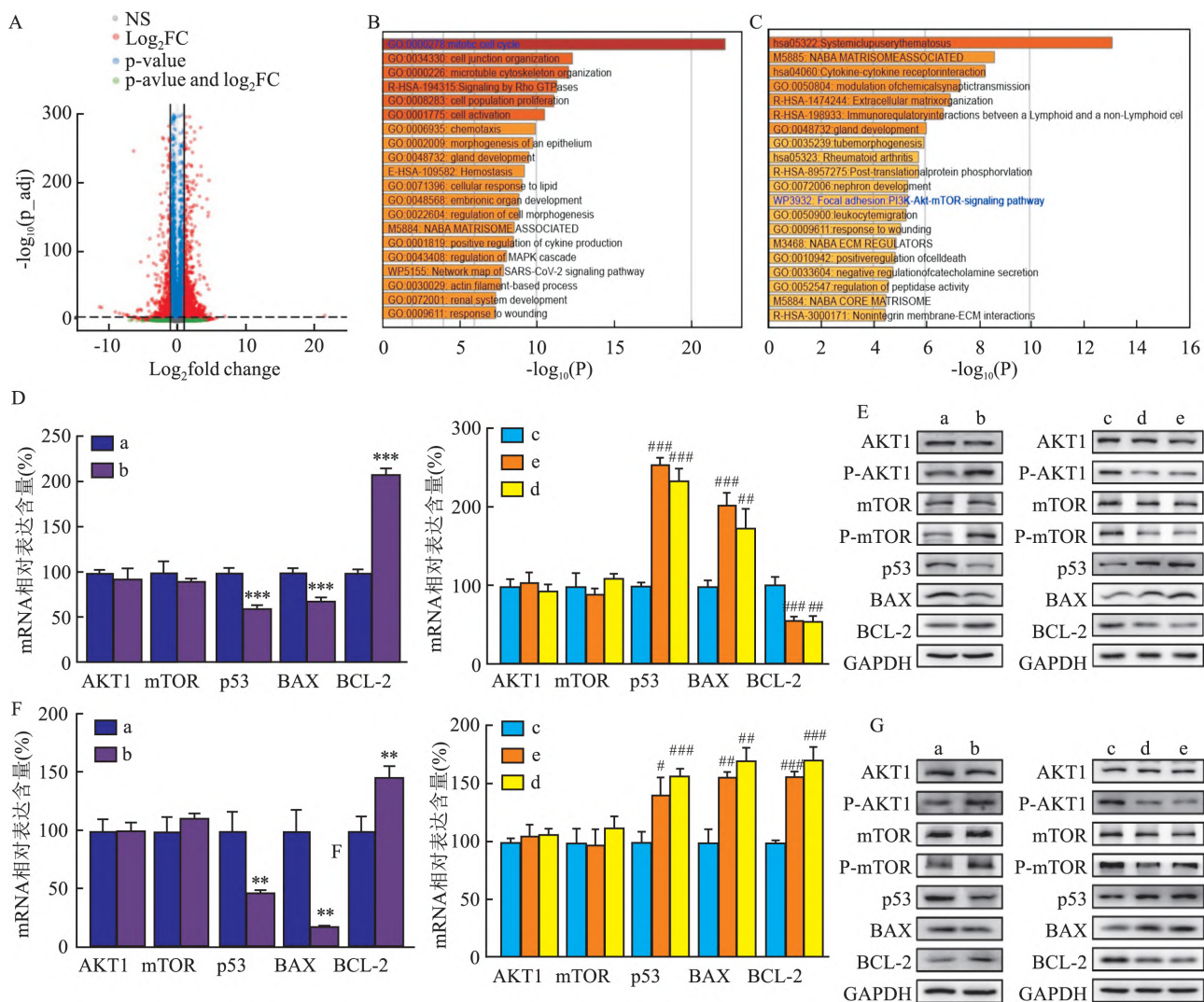


图 6 扰动 CLEC5A 对 AKT/mTOR 和 p53 信号通路中相关蛋白表达的影响

A: 火山图显示差异基因; B: 下调表达的 902 个基因的功能富集分析; C: 上调表达的 1 373 个基因的功能富集分析; D: 在 THP-1 细胞中扰动 CLEC5A 后对 AKT/mTOR 和 p53 信号通路相关 mRNA 表达水平的影响; E: 在 THP-1 细胞中扰动 CLEC5A 后对 AKT/mTOR 和 p53 信号通路相关蛋白表达水平的影响; F: 在 K562 细胞中扰动 CLEC5A 后对 AKT/mTOR 和 p53 信号通路相关 mRNA 表达水平的影响; G: 在 K562 细胞中扰动 CLEC5A 后对 AKT/mTOR 和 p53 信号通路相关蛋白表达水平的影响; a: pLV-EGFP-N 组; b: pLV-CLEC5A-EGFP-N 组; c: siNC 组; d: si-CLEC5A-1 组; e: si-CLEC5A-2 组; 与 pLV-EGFP-N 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 siNC 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3 讨论

白血病是儿童期最常见的癌症类型,约占15岁以下儿童癌症总数的30%,病死率高达39%^[7]。阐明白血病的发病机制,将为白血病的防治提供理论依据。本研究在白血病细胞系中初步探索了 *CLEC5A* 基因对细胞增殖、凋亡和周期进程的影响,并通过生物信息学分析和功能实验,初步提示了该基因可能通过 p53 和 AKT/mTOR 信号通路促进白血病的发生发展。

CLEC5A 为 C 型凝集素蛋白家族成员之一,在黄病毒感染中主要发挥促炎作用^[9],而在肿瘤的发生发展中主要影响细胞的生长和转移^[4-5,10]。有研究发现,*CLEC5A* 可显著促进胃癌^[5]、胶质母细胞瘤^[4] 细胞的增殖和周期进程,抑制其细胞凋亡。也有研究显示,*CLEC5A* 基因可显著抑制肝细胞癌^[10]、肝胆管细胞癌^[11]、骨肉瘤^[12] 细胞的增殖和转移。说明 *CLEC5A* 在不同肿瘤中可发挥不同的作用。最新的一项研究^[6] 表明,*CLEC5A* 的敲除可显著促进 AML 细胞的分化,克服其耐药性,提示 *CLEC5A* 在白血病中可能发挥促癌基因的作用。白血病发生的原因主要是造血干细胞的恶性增殖^[13],因此,本研究进行了 *CLEC5A* 与白血病细胞增殖方面的研究。结果发现,*CLEC5A* 的表达变化可调控白血病细胞 THP-1 和 K562 的增殖、凋亡和周期进程。当过表达 *CLEC5A* 时,能够显著促进白血病细胞的细胞活力、增殖能力和周期进程,在 H₂O₂ 刺激条件下抑制细胞凋亡。当敲低 *CLEC5A* 后,作用结果与之相反。这些结果均提示 *CLEC5A* 在白血病细胞中可能发挥促癌基因的功能。

为揭示 *CLEC5A* 在白血病中发挥促癌功能的机制,本研究利用转录组测序和功能富集分析发现,*CLEC5A* 的过表达与 AKT1/mTOR 等信号通路的激活、细胞周期等信号通路的抑制显著相关。已有报道发现^[4-5],*CLEC5A* 基因敲除后,可降低 SGC7901、MGC803 和 U251 细胞中 AKT1、mTOR 蛋白的磷酸化水平,提示 *CLEC5A* 可通过 AKT1/mTOR 信号通路调控胃癌细胞和胶质母细胞瘤的增殖。本研究 Western blot 实验结果显示,过表达 *CLEC5A* 的 THP-1 和 K562 细胞中,AKT1、mTOR 蛋白的磷酸化水平显著高于对照组,提示 *CLEC5A* 通过促进 AKT1/mTOR 信号通路调控白血病细胞的增殖。本研究还发现,*CLEC5A* 敲低后白血病细胞的 G1 期比例增加,S 期细胞比例增加,说明 *CLEC5A* 可能通过缩短

S/G2 期转换而促进白血病细胞的增殖能力。研究^[14-15] 报道,p53 可通过调控细胞周期以控制细胞的增殖生长,BCL-2 和 BAX 是调节程序性细胞死亡的两个核心参与者,BCL-2 具有抗凋亡特性,BAX 具有促凋亡特性。因此本研究进一步探讨 *CLEC5A* 对 p53、BAX、BCL-2 基因表达的影响,发现 *CLEC5A* 显著抑制 p53、BAX 基因的表达,促进 BCL-2 基因的表达,提示 *CLEC5A* 通过调控 p53 信号通路促进白血病细胞的周期进程,抑制其凋亡。以上结果提示,*CLEC5A* 可能通过调控 p53 和 AKT1/mTOR 信号通路参与调控白血病细胞的增殖、凋亡和周期进程,但针对 *CLEC5A* 与 p53 和 AKT1/mTOR 通路间的具体调控机制,还需进一步的实验研究。

综上所述,本研究初步探索了 *CLEC5A* 在白血病细胞中的功能和作用机制,初步提示其可能通过调控 p53 和 AKT1/mTOR 通路发挥促癌作用,为未来白血病新的诊治措施的研发提供了理论依据。

参考文献

- [1] Juliusson G, Hough R. Leukemia [J]. *Prog Tumor Res* 2016; 43: 87-100.
- [2] Bispo J A B, Pinheiro P S, Kobetz E K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(6): a034819.
- [3] Sung P S, Chang W C, Hsieh S L. *CLEC5A*: A promiscuous pattern recognition receptor to microbes and beyond [J]. *Adv Exp Med Biol* 2020, 1204: 57-73.
- [4] Fan H W, Ni Q, Fan Y N, et al. C-type lectin domain family 5, member A (*CLEC5A*, MDL-4) promotes brain glioblastoma tumorigenesis by regulating PI3K/Akt signaling [J]. *Cell Prolif* 2019, 52(3): e12584.
- [5] Wang Q H, Shi M Q, Sun S Q, et al. *CLEC5A* promotes the proliferation of gastric cancer cells by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2020, 524(3): 656-62.
- [6] Liu A C H, Cathelin S, Yang Y T, et al. Targeting STAT5 signaling overcomes resistance to IDH inhibitors in acute myeloid leukemia through suppression of stemness [J]. *Cancer Res* 2022, 82(23): 4325-39.
- [7] Namayandeh S M, Khazaei Z, Najafi M L, et al. GLOBAL leukemia in children 0-14 statistics 2018: incidence and mortality and human development index (HDI): GLOBOCAN sources and methods [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020, 21(5): 1487-94.
- [8] 张静,程敏,金倩,等.多聚嘧啶区结合蛋白1通过调控基因的可变剪切促进胆管癌细胞的生长、迁移及侵袭能力 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* 2022, 38(7): 899-910.
- [9] Chen S T, Li F J, Hsu T Y, et al. *CLEC5A* is a critical receptor in innate immunity against listeria infection [J]. *Nat Commun* 2017, 8(1): 299.

- [10] 林杰, 区活辉, 王卫东, 等. 过表达 *CLEC5A* 基因抑制肝细胞癌增殖和转移并逆转上皮-间质转化[J]. 南方医科大学学报 2023, 43(1): 85-91.
- [11] 林杰, 王卫东, 区活辉, 等. *CLEC5A* 抑制肝胆管细胞癌增殖和转移的作用研究[J]. 天津医药 2021, 49(7): 678-82.
- [12] Lu J H, Chen W K, Liu H, et al. Transcription factor CEBPB inhibits the proliferation of osteosarcoma by regulating downstream target gene *CLEC5A*[J]. J Clin Lab Anal 2019, 33(9): e22985.
- [13] 左安兰. 白血病的防治[J]. 开卷有益: 求医问药 2021, 383(10): 25-6.
- [14] Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer[J]. Cancers (Basel) 2018, 10(6): 154.
- [15] Vardiyan R, Ezati D, Anvari M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax[J]. Clin Exp Reprod Med 2020, 47(3): 155-60.

***CLEC5A* promotes the proliferation of leukemia cells by regulating the AKT1/mTOR signaling pathway**

Ding Shuqin^{1,2}, Zha Dantong¹, Qi Xin³, Yang Aiqing², Zhou Gangqiao^{1,2,3}

(¹School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Proteomics, National Center for Protein Sciences, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850; ³Medical College, Guizhou University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To investigate the effects of C-type lectin domain family 5, member A (*CLEC5A*) on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of leukemia cell lines THP-1 and K562, and the underlying mechanism. **Methods**

The expression of *CLEC5A* in leukemia patients was investigated in the GEPIA database. Recombined plasmid containing *CLEC5A* was transfected into THP-1 and K562 cells for overexpression of *CLEC5A*. Small interfering RNA (siRNA) was used to knock down the endogenous *CLEC5A* in leukemia cells. CCK-8 and EdU assays were used to assess the leukemia cells proliferation. Flow cytometry was used to assess cell cycle. Flow cytometry was used to assess cell apoptosis under hydrogen peroxide (H_2O_2) stress. The RNA sequencing (RNA-seq) and pathway enrichment analysis were used to analyze the signal pathways of significant enrichment of up-regulated or down-regulated genes after knocking down *CLEC5A* gene. Protein expression levels of several members in AKT1/mTOR and p53 signaling pathways were detected by Western blot assays. **Results** *CLEC5A* was significantly up-regulated in bone marrow tissues of leukemia patients compared to the matched non-tumor tissues of healthy individuals. Knock-down of *CLEC5A* significantly reduced the proliferation (all $P < 0.01$) and S phase progression (all $P < 0.05$) and increased the apoptosis (all $P < 0.001$) under H_2O_2 stress in THP-1 and K562 cells. Conversely, overexpression of *CLEC5A* significantly increased the proliferation (all $P < 0.001$) and S phase progression (all $P < 0.01$) and reduced the apoptosis (all $P < 0.01$) under H_2O_2 stress in THP-1 and K562 cells. The up-regulated genes were significantly enriched in AKT1-mTOR and other signal pathways after knocking down *CLEC5A*, while the down-regulated genes were significantly enriched in cell cycle signal pathways. *CLEC5A* in leukemia cells significantly reduced the genes expression levels of BAX and p53, and significantly induced the gene expression levels of BCL-2 and phosphorylation levels of AKT1 and mTOR proteins. **Conclusion** *CLEC5A* increases the cell cycle and proliferation and inhibits cells apoptosis in THP-1 and K562 cells, and the mechanism may be related to activating the AKT/mTOR and p53 signaling pathways.

Key words THP-1 cell; K562 cell; *CLEC5A*; cell proliferation; cell apoptosis; cell cycle