

• 研究论文 •

TRIB3通过抑制CTSZ介导的BCR-ABL降解促进急性淋巴细胞白血血病疾病进程

再吾力·叶尔江¹, 王 凤¹, 杨兆娜¹, 胡卓伟¹, 李 珂^{2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 费城染色体Ph阳性急性B淋巴细胞白血病(Ph⁺ B-ALL)是最常见的与染色体异常相关的急性淋巴细胞白血病, 该疾病常发于儿童和青壮年, 其治疗预后效果较差。研究表明, 假性激酶TRIB3 (tribbles homologue 3) 在肿瘤细胞中高表达, 高表达TRIB3能够促进多种肿瘤的发生发展, 但是TRIB3在Ph⁺ ALL疾病中的作用及分子机制并不清楚。本研究发现TRIB3在Ph⁺ ALL患者样本中表达上调, 高表达TRIB3与断裂点簇基区-Abelson酪氨酸激酶(BCR-ABL)蛋白水平呈现正相关。实验结果进一步表明, 敲除TRIB3能够降低BCR-ABL的表达并抑制Ph⁺ ALL的疾病进程。机制研究表明, TRIB3通过与溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶Z (CTSZ) 相互作用, 进而抑制CTSZ介导的BCR-ABL降解, 维持Ph⁺ ALL细胞的增殖和抵抗凋亡能力。综上, 本研究表明抑制TRIB3的表达来调控BCR-ABL蛋白水平可能作为Ph⁺ ALL潜在的治疗策略。本实验所有动物实验均通过中国医学科学院药物研究所伦理审查委员会审查。白血病患者血液样本实验通过中国医学科学院伦理委员会批准(伦理号: KT2019055-EC-1)。

关键词: 假激酶; 急性淋巴细胞白血病; 溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶Z; 蛋白质降解; 蛋白质-蛋白质相互作用
中图分类号: R733.71 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)11-2628-08

TRIB3 promotes B-ALL progression by suppressing CTSZ-mediated BCR-ABL degradation

YEERJIANG Zaiwuli¹, WANG Feng¹, YANG Zhao-na¹, HU Zhuo-wei¹, LI Ke^{2*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Philadelphia chromosome (Ph) positive (Ph⁺) B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common genetic abnormality associated with B-ALL and has been shown to confer the worst prognosis to both children and adults. Increasing evidence has revealed that high tribbles homologue 3 (TRIB3) expression contributes to multi-cancer development and progression, but the underlying role and molecular mechanisms of TRIB3 in Ph⁺ B-ALL remain unclear. Here, we report that TRIB3 expression was enhanced in Ph⁺ B-ALL patient samples and positively associated with the expression of breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase (BCR-ABL). We further demonstrated that deletion of TRIB3 attenuated the progression of Ph⁺ B-ALL by reducing BCR-ABL expression. Mechanistically, TRIB3 interacted with lysosomal cysteine proteinase cathepsin Z (CTSZ) to suppress CTSZ-mediated BCR-ABL degradation, which enhanced BCR-ABL activity, causing high proliferation of Ph⁺ B-ALL cells. Thus, our study indicated that inhibiting the expression of TRIB3 to regulate BCR-ABL kinase

收稿日期: 2020-08-18; 修回日期: 2020-09-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81872904); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-011).

*通讯作者 Tel: 86-10-83161187, E-mail: like1986@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1352

activity may be exploited as an additional target therapy for Ph⁺ ALL. Procedures for animal study were performed with approval of the Animal Care and Use Committee of the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College. The procedure of human leukemia sample was approved by the Ethics Committee of Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (KT2019055-EC-1).

Key words: pseudokinase; acute lymphocytic leukemia; lysosomal cysteine proteinase cathepsin Z; protein degradation; protein-protein interaction

急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的特点是淋巴细胞的异常增殖和分化, 导致正常的免疫反应失调和造血功能障碍。费城染色体 (Ph) 阳性 ALL 是最常见的遗传异常相关 ALL, 且已被证实在儿童和成人中均具有最坏的临床预后^[1,2]。Ph 阳性 ALL 存在广泛的基因突变, 最明显的特征是存在 Ph 染色体^[3]。Ph 染色体是由 9 号染色体与 22 号染色体发生长臂易位, *ABL* 基因转座到 22 号染色体上, 形成新的融合基因断裂点簇基区-Abelson 酪氨酸激酶 (*BCR-ABL*)。 *BCR-ABL* 编码一种异常的酪氨酸激酶 (TK) 蛋白, 该异常酪氨酸激酶改变了调节细胞增殖、存活和自我更新的相关信号通路, 促进含有费城染色体 (Ph) 细胞的肿瘤转化^[4]。虽然 Ph⁺ ALL 在任何年龄阶段均可发病, 但其发病率会随着年龄的增长逐渐升高^[5]。约 20%~25% 的成年 ALL 患者携带 *BCR-ABL* 融合基因, 这些患者在常规化疗后的预后非常差。造血干细胞移植 (SCT) 被认为是能够使 Ph⁺ ALL 患者完全缓解的金标准疗法^[6]。随着 *BCR-ABL* 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 甲磺酸伊马替尼被批准作为一线治疗药物后, Ph⁺ ALL 患者的预后明显改善。尽管取得以上进展, Ph⁺ ALL 患者经 SCT 或 TKI 治疗后仍经常复发^[7]。研究表明, 伊马替尼诱导溶酶体膜渗透性增加, 进而激活组织蛋白酶 B (cathepsin B), 并将其重新分配到白血病细胞的细胞质中, 最终直接促进 *BCR-ABL* 降解^[8]。因此, 在一线治疗的基础上, 探索调控 *BCR-ABL* 降解的具体机制, 可能为 Ph⁺ ALL 疗法带来新的治疗选择。

假性激酶 tribbles 蛋白家族成员 TRIB1、TRIB2 和 TRIB3 参与多种炎症疾病和肿瘤进程, 作为应激感受器的角色发挥重要作用^[9]。在急性髓系白血病 (AML) 中, TRIB1 和 TRIB2 作为重要的调控因子参与疾病的发生发展^[10,11]。研究表明, TRIB1 与丝裂原活化蛋白激酶 1 (MEK1) 相互作用, 促进 MEK1 的磷酸化并诱导转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 降解, 促进 AML 的发生发展。TRIB2 被鉴定为致癌基因家族成员之一, 在小鼠中通过诱导 C/EBPA 失活而导致 AML 的发生^[12]。TRIB3 是假性激酶家族成员, 也被称为关键的“应激调节开关”, 通过与细胞内信号和功能蛋白的相互作用,

将稳态、代谢性疾病和癌症联系起来^[13-16]。本课题组前期研究表明, TRIB3 在 AML 样本中表达上调, 并且 TRIB3 蛋白表达水平与急性早幼粒白血病 (APL) 疾病进展及药物耐受呈正相关, TRIB3 通过维持早幼粒细胞白血病-维甲酸受体融合蛋白 (PML-RARA) 的蛋白稳定性从而维持 APL 起始细胞的自我更新能力, 参与 APL 发生和疾病进展^[17-19]。多项研究表明, TRIB3 可作为潜在的肿瘤治疗靶点, 在肿瘤细胞中降低 TRIB3 的表达可显著抑制肿瘤的发生发展^[20,21]。然而, TRIB3 在 Ph⁺ ALL 疾病过程中的作用及机制尚未阐明。

近几年, 蛋白质质量控制已成为肿瘤领域的研究热点之一。蛋白质质量控制失调, 例如泛素蛋白酶体降解系统 (UPS) 和自噬 (autophagy) 的功能障碍, 导致促肿瘤蛋白的大量聚集并促进肿瘤发生发展^[22]。组织蛋白酶 Z (cathepsin Z, CTSZ) 是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶, cDNA 全长为 1.4 kb, 编码 306 个氨基酸。CTSZ 具有类木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶的所有特征, 包括“催化三联体”的高度保守残基。CTSZ 与已报道的哺乳动物木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶的同源性仅为 26.35%, 并且有一个异常短的前肽, 这表明它是该家族中一个新的亚家族成员^[23]。在正常细胞中, CTSZ 主要负责细胞内蛋白质的降解和转运。有研究表明, CTSZ 在实体瘤中表达上调, 高表达的 CTSZ 能促进肿瘤的发生发展^[24], 但是, CTSZ 在白血病中的功能尚不明确。因此, 本研究旨在探究 TRIB3 与 CTSZ 在原发性 Ph⁺ ALL 白血病中的作用, 探讨 TRIB3 通过与 CTSZ 的相互作用调控 *BCR-ABL* 表达和活性的分子机制, 并寻找 *BCR-ABL* 相关白血病潜在的分子靶向治疗策略。

材料与方法

患者样本 原代患者样本从中国医学科学院血液研究所和血液病医院获得。根据赫尔辛基宣言, 所有参与者均获得知情同意, 并且获得了血液学研究所和血液病医院伦理审查委员会的批准。

原代白血病细胞的分离 使用 Percoll 通过梯度离心法分离白血病患者骨髓样本中的单个核细胞 (PBMC)。具体操作为: ① 将 10×PBS 与 Percoll 按照 1:9 比例混

合, 配制成密度为 $1.129\ 4\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Percoll 悬液, 上述配制的悬液是 100% Percoll (淋巴细胞分离液)。② 将 100% Percoll 悬液用 $1\times\text{PBS}$ 稀释, 而获得适宜密度进行细胞分离, 因为稀释度与密度线性相关, 70%、60%、50%、40%、30% 和 20% Percoll 的密度分别为 1.090、1.077、1.067、1.056、1.043 和 $1.031\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。③ 通过从高到低稀释度的叠加, 形成每个比重相对应的浓度梯度, 从而可以区分不同梯度的 PBMC 细胞。

质粒构建和重组蛋白 用标准分子克隆法在 pcDNA3.1-HA 载体上构建 HA 标记的 TRIB3。Myc 或 His 标签的 BCR-ABL 是在 pcDNA3.1-Myc-His (-B) 载体上通过标准分子克隆方法构建。

细胞系 BV173 (人 Ph^+ ALL 细胞系) 和 HEK 293T (人胚肾细胞系) 均购自中国科学院上海细胞生物研究所, 使用前均通过 STR 图谱鉴定, 并进行支原体和细胞活力检测。BV173 细胞的培养条件为: 10% 热灭活胎牛血清 (FBS, Gibco 公司) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司) 中, 并置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中。

转染与细胞分选 为构建稳定敲低 TRIB3 的 BV173 细胞系, 使用转染试剂 (Lipofectamine®2000) 根据说明书的转染方法, 将 control-shRNA 和 TRIB3-shRNA1/2 质粒分别转染到 BV173 细胞中。转染 24 h 后, 使用含有 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 潮霉素 (Calbiochem 公司) 的培养基筛选转染 TRIB3-shRNA 的 BV173 细胞系, 培养 7 天后, 挑取单细胞克隆, 传代 2~3 次, 经 Western blot 验证 TRIB3 敲低后, 用于后续实验。

细胞生长与凋亡分析 将细胞消化、离心后计数, 然后将其均匀接种到 96 孔板中, 2 000 个细胞/孔, 做 3 个平行孔。通过 Celigo Imaging Cytometer 测量细胞数量, 测量时间 3~5 天, 根据不同天数的细胞数, 绘制细胞增长的时间曲线, 生长曲线测定重复 3 次。并使用 Vi-Cell XR 细胞活力分析仪 (Beckman Coulter) 进行定量。对给予伊马替尼或阴性对照的 BV173 细胞进行细胞凋亡测定。收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, Annexin V-FITC/PI 染色 (BD-Biosciences), 流式细胞术检测 (BD-Biosciences 公司)。

蛋白免疫印迹 采用 Western blot 法检测患者白血病细胞中 TRIB3、CTS2、BCR-ABL 等蛋白水平。将含 TRIB3、CTS2、BCR-ABL 等蛋白的 PVDF 膜与一抗 (1:1 000) 孵育, 再与辣根过氧化物酶结合二抗 (1:2 000) 孵育。根据制造商的说明 (Pierce 公司), 使用增强化学发光检测目标蛋白质。使用 Quantity One 软件 (Bio-Rad Laboratories 公司), 以 GAPDH 为内参, 对图像中的阳性条带进行半定量。

免疫沉淀反应 将细胞收集到 10 mL 离心管中, 在

$4\ ^\circ\text{C}$ 条件下, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 去上清, 往细胞沉淀中加入适量 CO-IP 细胞裂解液, 转移至 1.5 mL 离心管中, 轻轻弹匀细胞悬液, 放置在冰上裂解 30 min; 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 之后吸取蛋白上清; 将蛋白上清液分为两部分, 取 $50\ \mu\text{L}$ 上清于新的 1.5 mL 离心管, 加入 Loading Buffer 在 $98\ ^\circ\text{C}$ 金属浴变性 10 min; 在剩下的蛋白上清中加入适量抗体和琼脂糖, 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵育过夜; 用 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度离心 5 min, 去掉上清, 加入 CO-IP 洗液清洗沉淀, 重复 5 遍; 加入 $2\times$ 上样缓冲液 $30\ \mu\text{L}$, $98\ ^\circ\text{C}$ 金属浴变性 10 min。

细胞周期检测 取对数生长期细胞分别接种于 12 孔板, 24 h 之后, 收集细胞, $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入 75% 的乙醇在 $4\ ^\circ\text{C}$ 固定 4 h 以上。取已固定的细胞 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 将细胞用 PBS 洗涤 2 次并重悬于 $100\ \mu\text{L}$ 染色缓冲液中。然后在 PI 染色缓冲液 (PI: $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; RNase: $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 中避光温育 15 min。流式细胞仪对样品进行测试。通过 CellQuest 软件 (Becton Dickinson 公司) 分析流式细胞术的数据。

动物实验 NOD-SCID 小鼠 (4~6 周龄, 雄性) 购自南京模式动物中心 [中国南京, 动物许可证编号: SCXK (苏) 2018-0008]。该小鼠在中国医学科学院药物研究所 SPF 条件的动物设施中饲养。在动物研究中, 实验小鼠在分组前被标记出来, 然后由一个独立的研究人员随机分成几组。样本量是根据以往使用相同细胞株和处理的经验预先确定的。所有动物实验均经中国医学科学院动物实验伦理委员会批准, 并按照中国医学科学院动物保护与利用委员会的指导方针进行。

小动物活体成像 在小鼠急性白血病细胞侵袭模型中, 应用荧光素酶标记细胞, 用活体动物成像仪监测白血病细胞对小鼠各脏器的受累程度。具体操作步骤: 小鼠成像实验前, 对每只小鼠腹腔注射 $125\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 荧光素, 并将小鼠放入气体麻醉装置。等小鼠麻醉后, 将小鼠放入小动物活体成像仪, 并进行动物成像实验。

统计学分析 实验结果以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 采用 t 检验各组间差异。* $P < 0.05$, 与对照组相比有显著差异, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 与对照组相比有极显著差异。实验平行操作, 重复 3 次。

结果

1 TRIB3 与 BCR-ABL 表达在 Ph^+ ALL 样本中呈正相关

为了分析 TRIB3 在 Ph^+ ALL 疾病中的作用, 本研究首先使用蛋白印迹法检测 Ph^+ ALL 患者骨髓样本中的 TRIB3 蛋白表达水平。研究结果表明, Ph^+ ALL 患

者样本来源的细胞中 TRIB3 蛋白表达水平明显高于正常人骨髓来源细胞 (图 1A 和 B)。融合蛋白 BCR-ABL 酪氨酸激酶是目前 Ph⁺ ALL 最重要的致癌蛋白以及治疗靶点, 本研究进一步检测 Ph⁺ ALL 细胞中 TRIB3 和 BCR-ABL 的蛋白表达水平, 并分析这两种蛋白在 Ph⁺ ALL 患者样本中的相关性。结果显示, Ph⁺ ALL 细胞中表达上调的 TRIB3 和 BCR-ABL 的蛋白表达水平趋势类似 (图 1C)。通过分析 23 例 Ph⁺ ALL 患者样本中 TRIB3 和 BCR-ABL 表达的相关性, 发现 TRIB3 与 BCR-ABL 的蛋白表达水平呈明显正相关 (图 1D)。以上结果表明, 与正常人相比, Ph⁺ ALL 患者样本中 TRIB3 表达水平明显增加, 并且其表达水平与 BCR-ABL 蛋白水平呈正相关, 提示 TRIB3 可能在 BCR-ABL 特异性表达的 Ph⁺ ALL 疾病中发挥特异性作用。

2 TRIB3 通过促进白血病细胞增殖, 抑制白血病细胞凋亡参与 Ph⁺ ALL 疾病进程

为了进一步研究 TRIB3 在 Ph⁺ ALL 中的作用, 本研究首先构建了稳定敲低 TRIB3 的 BV173 细胞系, 研究 TRIB3 对 Ph⁺ ALL 细胞增殖和凋亡的影响。实验结果显示, 敲低 TRIB3 的 Ph⁺ ALL 细胞增殖能力明显减弱 (图 2A), 其细胞凋亡比例却明显增加 (图 2B), 以上结果表明, TRIB3 可能通过维持 Ph⁺ ALL 细胞的增殖活性及抵抗细胞发生凋亡的能力来参与 Ph⁺ ALL 疾病进程。为进一步探究 TRIB3 在 Ph⁺ ALL 疾病进程中的作用, 本研究通过尾静脉注射的方法将稳定表达 control-shRNA 和 TRIB3-shRNA 的 BV173 细胞分别移植到免疫缺陷小鼠体内。使用小动物活体成像仪器观察肿瘤细胞植入 5 周后小鼠体内白血病细胞的分布情况和小鼠各种器官的受累程度。实验结果显示, 移植 BV173

细胞的小鼠多种器官被白血病细胞浸润, 并且小鼠脏器的受累程度比较严重。然而, 接种敲低 TRIB3 的 BV173 细胞 (TRIB3-shRNA) 的小鼠脏器的受累程度明显下降 (图 2C), 该组荷瘤小鼠的生存周期显著延长 (图 2D)。以上研究表明, 敲低 TRIB3 抑制 Ph⁺ ALL 荷瘤小鼠的疾病进展。

3 TRIB3 通过抑制 BCR-ABL 泛素化和降解维持 BCR-ABL 的活性

由于在 Ph⁺ ALL 患者样本中 TRIB3 与 BCR-ABL 表达水平呈正相关, 本研究首先检测敲低 Ph⁺ ALL 细胞中 TRIB3 的表达对 BCR-ABL 活性的影响, 发现敲低 Ph⁺ ALL 细胞中 TRIB3 的表达能够明显抑制 BCR-ABL 激酶的活性, 表现为 BCR-ABL 信号通路中 BCR-ABL、细胞信号转导和转录活化蛋白 5 (STAT5) 和 CRK 样蛋白 (CRKL) 蛋白的磷酸化水平下降 (图 3A)。BCR-ABL 蛋白降解依赖于泛素连接酶介导的泛素化, 过表达 TRIB3 能够明显降低 BCR-ABL 的泛素化水平 (图 3B), 延长 BCR-ABL 蛋白的降解半衰期 (图 3C)。以上研究结果表明, TRIB3 主要通过抑制 BCR-ABL 的泛素化和降解, 从而维持 BCR-ABL 的活性。

4 TRIB3 与 CTSZ 相互作用抑制 BCR-ABL 蛋白降解

由于 TRIB3 能够抑制 BCR-ABL 降解维持其稳定性, 本研究进一步探讨 TRIB3 调控 BCR-ABL 蛋白降解的具体机制。既往研究表明, TRIB3 通过蛋白质-蛋白质相互作用发挥多种生物学作用^[25], 通过酵母双杂交实验筛选与 TRIB3 存在相互作用的蛋白质, 结果显示, 组织蛋白酶 Z (CTS Z) 可能与 TRIB3 存在潜在相互作用。免疫共沉淀方法验证 BV173 白血病细胞中 CTSZ

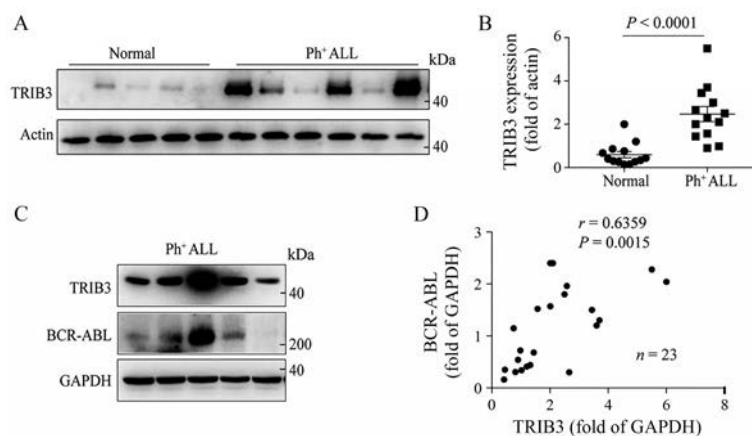


Figure 1 Tribbles homologue 3 (TRIB3) expression is positively associated with BCR-ABL in Ph⁺ ALL cells. A, C: TRIB3 expression was detected by Western blot (WB) in the bone marrow of Ph⁺ ALL or healthy donors. The data are the means \pm SEM of 3 assays; B: Statistical significance of TRIB3 expression was determined by student's *t*-test in the indicated groups; D: Correlation between TRIB3 and BCR-ABL expressions in leukemia cells derived from Ph⁺ ALL patients ($n = 23$). Ph: Philadelphia chromosome; BCR-ABL: Breakpoint cluster region-Ablon tyrosine kinase; ALL: Acute lymphoblastic leukemia

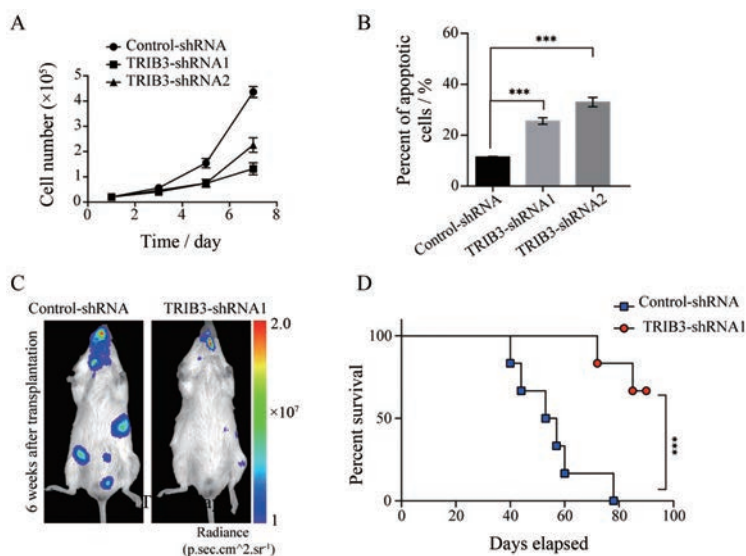


Figure 2 Silencing TRIB3 induces proliferation inhibition and apoptosis in Ph⁺ ALL cells. A: Growth curves of BV173 control-shRNA and TRIB3-shRNA1/2 cells. At different time, BV173 control-shRNA and TRIB3-shRNA1/2 cells were counted using a cell counter. $n = 5$, mean \pm SEM; B: Apoptosis assay of BV173 control-shRNA and TRIB3-shRNA1/2 cells. $n = 3$, mean \pm SEM; C: The progression of BV173 control-shRNA and TRIB3-shRNA1 cells *in vivo* was evaluated with IVIS Spectrum imaging. NOD-SCID mice were injected i.v. with 1×10^6 luciferase-labeled BV173 cells with or without TRIB3 depletion. Data are representative images of mice at the indicated time; D: Survival rate was analyzed by Kaplan-Meier at the end of 90 days. Statistical significance between two groups was determined by *t*-test; *** $P < 0.001$

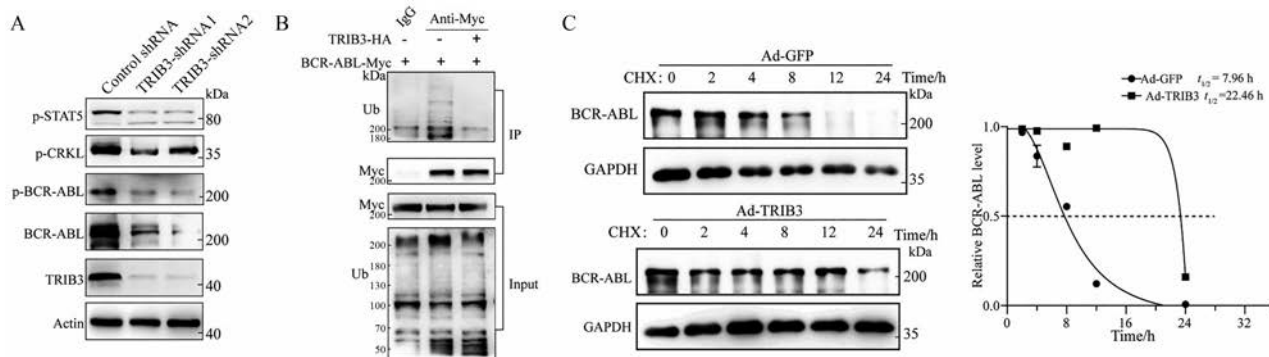


Figure 3 TRIB3 represses ubiquitylation and degradation of BCR-ABL. A: Silencing TRIB3 decreases the activity of the BCR-ABL pathway. The expression levels of p-BCR-ABL, p-STAT5, and p-CRKL were detected by WB in BV173 control-shRNA and TRIB3-shRNA1/2 cells. The data are representative immunoblots of 3 assays; B: The effect of TRIB3 on BCR-ABL ubiquitylation *in vivo*. HEK293 cells were transfected with TRIB3 and BCR-ABL expressing plasmids and extracts of transfected cells were IP with anti-Myc Ab. BCR-ABL ubiquitylation was detected by immunoblotting; C: HEK293T cells were transfected with BCR-ABL plasmid. Then these cells were infected with TRIB3- or GFP-adenovirus and incubated with cycloheximide (CHX) for different time

与 TRIB3 存在结合 (图4A), 并且两者在 BV173 细胞中存在明显共定位 (图4B)。此外, 使用免疫共沉淀方法检测 BV173 细胞裂解液, 结果发现组织蛋白酶 CTSZ 与 BCR-ABL 存在明显的相互作用 (图4C), 而在 BV173 细胞中过表达 TRIB3 则妨碍 BCR-ABL 与 CTSZ 的相互作用 (图4D), 这一结果提示, TRIB3 可能参与组织蛋白酶 CTSZ 介导的 BCR-ABL 蛋白降解调控。使用稳定敲低 TRIB3 的 BV173 细胞, 结果发现, 敲低 TRIB3 促进 BCR-ABL 降解, 降低 BCR-ABL 蛋白稳定性, 在

此基础上进一步敲低 CTSZ, 则可反转敲低 TRIB3 促进 BCR-ABL 蛋白降解的作用 (图4E)。以上研究结果表明, TRIB3 通过与 CTSZ 相互作用抑制 BCR-ABL 蛋白降解, 增强其蛋白稳定性和活性, 促进 B-ALL 的疾病进展。

讨论

急性淋巴细胞白血病患者治疗失败率、复发率和中枢神经系统的侵袭率均远高于其他类型的白血病患

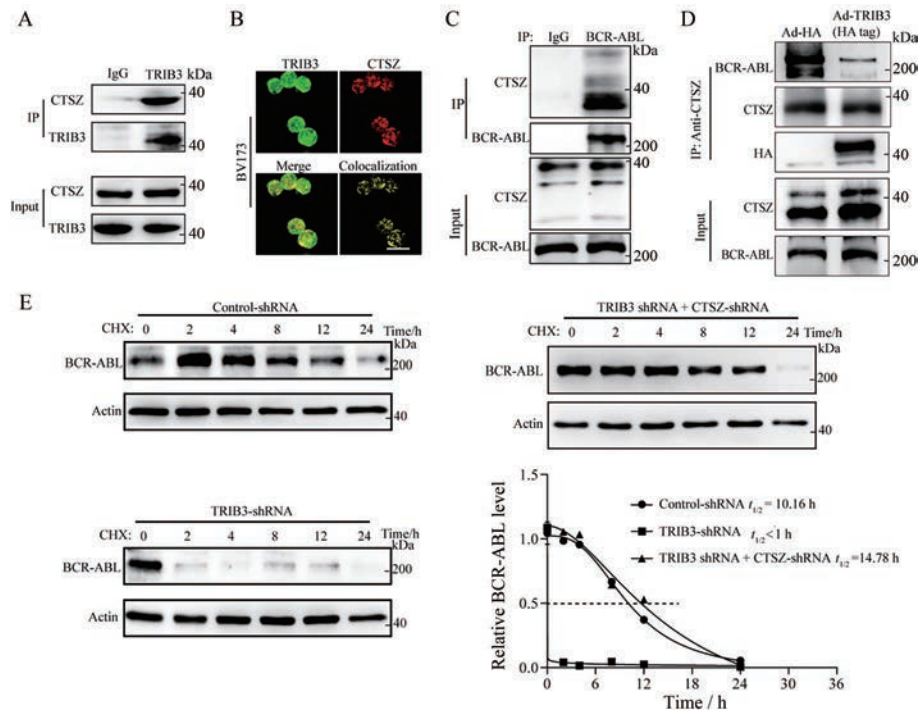


Figure 4 TRIB3 interacts with cysteine proteinase cathepsin Z (CTS Z) to interfere with BCR-ABL degradation. A: The interaction of TRIB3 and CTS Z was evaluated by Co-IP assay. Extracts of BV173 cells were CO-IP with normal IgG or anti-TRIB3 antibody and blotted with anti-CTS Z Ab; B: Immunofluorescence (IF) was performed to detect the co-localization of TRIB3 and CTS Z in BV173 cells. Representative images were shown. Scale bar, 2 μm ; C: The interaction of CTS Z and BCR-ABL was evaluated by Co-IP assay. Extracts of BV173 cells were IP with normal (IgG) or anti-BCR-ABL and blotted with anti-CTS Z antibody; D: The effect of TRIB3 on the interaction of BCR-ABL/CTS Z; E: The effects of CTS Z on the degradation of BCR-ABL in TRIB3 depleted cells. BV173 cells with TRIB3 or/and CTS Z depletion were treated with CHX ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the indicated time. The indicated proteins were detected by immunoblotting to detect the stability of BCR-ABL

者^[2]。大约 20%~25% 的成年急性淋巴细胞白血病患者携带 *BCR-ABL* 融合基因, 该类型患者在常规化疗后的预后较差^[26]。虽然造血干细胞移植是费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病 (Ph^+ ALL) 患者的核心治疗选择, 但伊马替尼为 (Ph^+ ALL) 患者的治疗提供了新的选择^[2]。伊马替尼治疗不仅使 Ph^+ ALL 患者有更好的机会接受造血干细胞移植, 而且可以改善造血干细胞移植后患者的预后^[27]。然而, Ph^+ ALL 患者造血干细胞移植后仍然存在复发, 并且存在无复发死亡的病例。此外, Ph^+ ALL 患者造血干细胞移植后其治疗成功率并不高, 只有 20% 患者能长期生存^[26]。因此, 需要探索和研发针对 Ph^+ ALL 患者新的治疗策略。

假激酶 TRIB3 促进实体瘤发生和转移的重要作用已被证实^[28,29], 此外, 越来越多的研究也表明 TRIB3 能够促进白血病的发生发展。本课题组前期研究表明, TRIB3 通过稳定癌蛋白 PML-RAR α 和抑制 p53 介导衰老, 从而促进急性早幼粒白血病的发病及疾病进程^[20]; TRIB3 与转录因子 TWIST1 相互作用介导急性早幼粒白血病的耐药性^[27,30]。本研究发现, TRIB3 在 Ph^+ ALL

患者样本中高表达, 并且与 BCR-ABL 的表达呈正相关。抑制 TRIB3 基因或者蛋白表达能够抑制 Ph^+ ALL 细胞的增殖和侵袭能力, 这提示 TRIB3 可以作为 Ph^+ ALL 治疗的潜在靶点。

BCR-ABL 调节细胞内多种蛋白酪氨酸磷酸化水平, 抑制微丝肌动蛋白的功能, 扰乱细胞内正常信号通路并抑制细胞凋亡。多篇文献已报道调控 BCR-ABL 表达或活性的具体机制^[31,32], 其中溶酶体蛋白酶 B (CTS B) 被报道参与三氧化二砷介导的 BCR-ABL 蛋白降解^[33]。CTS Z 作为肿瘤促进因素在内质网应激依赖性凋亡途径中发挥重要作用^[24], 其是否参与原癌蛋白降解调控的作用和机制并不清楚。本研究报道 BCR-ABL 作为 CTS Z 的潜在降解底物, TRIB3 与 CTS Z 相互作用妨碍 CTS Z 介导 BCR-ABL 降解, 维持 BCR-ABL 的活性, 进而促进 Ph^+ ALL 疾病进程。该研究可能为 Ph^+ ALL 的治疗提供潜在的理论基础和治疗策略。

作者贡献: 再吾力·叶尔江、王凤和杨兆娜负责细胞和动物实验等; 李珂负责实验设计和论文的撰写; 胡卓伟负责论

文的指导及审阅。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Abou Dalle I, Kantarjian HM, Short NJ, et al. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia at first relapse in the era of tyrosine kinase inhibitors [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94: 1388-1395.
- [2] Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2017, 130: 2064-2072.
- [3] Pui CH, Roberts KG, Yang JJ, et al. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2017, 17: 464-470.
- [4] Soverini S, Bassan R, Lion T. Treatment and monitoring of Philadelphia chromosome-positive leukemia patients: recent advances and remaining challenges [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 39.
- [5] Slayton WB, Schultz KR, Kairalla JA, et al. Dasatinib plus intensive chemotherapy in children, adolescents, and young adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of children's oncology group trial AALL0622 [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 2306.
- [6] Man LM, Morris AL, Keng M. New therapeutic strategies in acute lymphocytic leukemia [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2017, 12: 197-206.
- [7] Liew E, Ghosh S, Saini L. Use of tyrosine kinase inhibitors post-allogeneic stem cell transplant in patients with Philadelphia or BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis [J]. *Blood*, 2016, 128: 2778.
- [8] Citalan-Madrid AF, Cabral-Pacheco GA, Martinez-de-Villarreal LE, et al. Proteomic tools and new insights for the study of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Hematology*, 2019, 24: 637-650.
- [9] Eyers PA, Keeshan K, Kannan N. Tribbles in the 21st century: the evolving roles of tribbles pseudokinases in biology and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27: 284-298.
- [10] Richmond L, Keeshan K. Pseudokinases: a tribble-edged sword [J]. *FEBS J*, 2019. DOI: 10.1111/febs.15096.
- [11] Sakai S, Miyajima C, Uchida C, et al. Tribbles-related protein family members as regulators or substrates of the ubiquitin-proteasome system in cancer development [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, 16: 147-156.
- [12] Guan H, Shuaib A, Leon DD, et al. Competition between members of the tribbles pseudokinase protein family shapes their interactions with mitogen activated protein kinase pathways [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32667.
- [13] Hong B, Zhou J, Ma K, et al. TRIB3 promotes the proliferation and invasion of renal cell carcinoma cells *via* activating MAPK signaling pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 587.
- [14] Fischer Z, Das R, Shipman A, et al. A Drosophila model of insulin resistance associated with the human TRIB3 Q/R polymorphism [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10: 1453-1464.
- [15] Ord T, Ord T. Mammalian pseudokinase TRIB3 in normal physiology and disease: charting the progress in old and new avenues [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2017, 18: 819-842.
- [16] Mondal D, Mathur A, Chandra PK. Tripping on TRIB3 at the junction of health, metabolic dysfunction and cancer [J]. *Biochimie*, 2016, 124: 34-52.
- [17] Li K, Wang F, Cao WB, et al. TRIB3 promotes APL progression through stabilization of the oncoprotein PML-RAR α and inhibition of p53-mediated senescence [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 697-710.e7.
- [18] Li K, Wang F, Hu ZW. Targeting TRIB3 and PML-RAR α interaction against APL [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 52012.
- [19] Li K, Wang F, Hu ZW. Targeting pseudokinase TRIB3 brings about a new therapeutic option for acute promyelocytic leukemia [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 4: e1337547.
- [20] Hua F, Shang S, Yang Y, et al. TRIB3 interacts with β -catenin and TCF4 to increase stem cell features of colorectal cancer stem cells and tumorigenesis [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156: 708-721.
- [21] Yu JM, Sun W, Wang ZH, et al. TRIB3 supports breast cancer stemness by suppressing FOXO1 degradation and enhancing SOX2 transcription [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 5720.
- [22] Driscoll JJ, Minter A, Driscoll DA, et al. The ubiquitin proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11: 242-246.
- [23] Akkari L, Gocheva V, Quick ML, et al. Combined deletion of cathepsin protease family members reveals compensatory mechanisms in cancer [J]. *Genes Dev*, 2016, 30: 220-232.
- [24] Dera AA, Ranganath L, Barraclough R, et al. Cathepsin Z as a novel potential biomarker for osteoporosis [J]. *Sci Rep*, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46068-0.
- [25] Wang HQ, Li YH. Progress in the study of the function of tribbles homologous protein 3 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1986-1994.
- [26] Comoli P, Basso S, Riva G, et al. BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph⁺ ALL patients on tyrosine-kinase inhibitors [J]. *Blood*, 2017, 129: 582-586.
- [27] Chen H, Liu K, Xu L, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in the imatinib era [J]. *Leukemia*, 2017, 59: 136-141.
- [28] Hua F, Mu R, Liu J, et al. TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124: 3235-3246.
- [29] Hua F, Li K, Yu JJ, et al. TRB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7951.

- [30] Peeke SZ, Gritsman K. Twist of fate for acute promyelocytic leukemia: TRIB3-TWIST1 interaction promotes resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 6018-6020.
- [31] Kang KW, Jung JH, Hur W, et al. The potential of exosomes derived from chronic myelogenous leukaemia cells as a biomarker [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38: 3935-3942.
- [32] Badger J, Grover P, Shi H, et al. c-Abl tyrosine kinase adopts multiple active conformational states in solution [J]. *Biochemistry*, 2016, 55: 3251-3260.
- [33] Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, et al. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide [J]. *Blood*, 2012, 120: 3555-3562.