

激活蛋白-1家族JunB、c-Jun、c-Maf、c-Fos 在多发性骨髓瘤中的表达

燕法红, 邱志远, 李乾鹏, 张晓婷, 刘洋, 王宝宏

(潍坊医学院第一附属医院/潍坊市人民医院血液内科, 山东 潍坊 261041)

摘要:目的 观察转录因子激活蛋白-1(AP-1)家族成员JunB、c-Jun、c-Maf、c-Fos在初诊多发性骨髓瘤(MM)中的表达情况。方法 选取我院2019年11月-2020年12月收治的初诊MM患者26例作为MM组,另选同期14例骨髓无恶性细胞的患者作为对照组,应用实时荧光定量PCR(RT-PCR)法检测两组骨髓JunB、c-Jun、c-Maf、c-Fos mRNA的表达水平,比较其差异。结果 MM组JunB mRNA表达水平高于对照组[(0.0845±0.0416)vs(0.0538±0.0181)],差异有统计学意义($P<0.05$);MM组c-Jun mRNA表达水平高于对照组[(0.0018±0.0011)vs(0.0005±0.0002)],差异有统计学意义($P<0.05$);两组c-Maf mRNA、c-Fos mRNA表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 JunB、c-Jun在多发性骨髓瘤患者中表达上调,可能在其发病中起到一定作用,有望成为新的治疗靶点。

关键词:激活蛋白-1;JunB;c-Jun;c-Maf;c-Fos;多发性骨髓瘤

中图分类号:R733.3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.23.012

文章编号:1006-1959(2021)23-0044-03

Expression of Activator Protein-1 Family JunB, c-Jun, c-Maf, c-Fos in Multiple Myeloma

YAN Fa-hong, QIU Zhi-yuan, LI Qian-peng, ZHANG Xiao-ting, LIU Yang, WANG Bao-hong

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Weifang Medical University/Weifang People's Hospital, Weifang, 261041, Shandong, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression levels of activator protein-1 (AP-1) transcription factor member JunB, c-Jun, c-Maf and c-Fos in newly diagnosed multiple myeloma (MM). Methods A total of 26 newly diagnosed MM patients admitted to our hospital from November 2019 to December 2020 were selected as the MM group, and 14 patients with no malignant cells in bone marrow during the same period were selected as the control group. The expression levels of JunB, c-Jun, c-Maf and c-Fos mRNA in bone marrow of the two groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR), and the differences were compared. Results The JunB mRNA expression level in the MM group was higher than that in the control group [(0.0845±0.0416) vs (0.0538±0.0181)], and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of c-Jun mRNA in the MM group was higher than that in the control group [(0.0018±0.0011) vs (0.0005±0.0002)], and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression levels of c-Maf mRNA and c-Fos mRNA between the two groups ($P>0.05$). Conclusion The expression of JunB and c-Jun is up-regulated in patients with multiple myeloma, which may play a role in its pathogenesis, and is expected to become a new therapeutic target.

Key words: Activator protein-1; JunB; c-Jun; c-Maf; c-Fos; Multiple myeloma

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种克隆性浆细胞异常增殖的恶性疾病,在我国血液系统恶性肿瘤中居于第2位^[1]。MM可引起贫血、骨痛、肾损害等一系列症状,多发生于老年人,严重威胁患者生命安全。近年来,随着新的药物不断应用,患者的预后得到了明显改善,但仍然是一种不可治愈的疾病,深入开发新的靶向药物是MM治疗领域的重点。转录因子是细胞内致癌信号通路的交汇点,在多种实体和血液系统恶性肿瘤中存在失调。转录因子激活蛋白-1家族(activator protein-1, AP-1)以二聚体形式结合TPA反应元件和相关的DNA元件如cAMP反应元件,从而调节一系列生理过程,并在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。随着对AP-1在肿瘤病理生理作用的研究逐渐深入,其家族成员近年来成为被积极开发的药物靶点^[2]。AP-1为一类含有碱性亮氨酸拉链的转录因子家族,由Jun蛋白家族

(c-Jun、JunB和JunD)、Fos蛋白家族(c-Fos、FosB、Fra1和Fra2)、ATF蛋白家族(ATF2、ATF3/LRF1、B-ATF、JDP1、JDP2)和Maf蛋白家族(c-Maf、MafA、MafB、MafF/G/K和Nrl)中的蛋白亚基形成同源或异源二聚体。AP-1在浆细胞生物学及MM的发病机制中发挥了重要调控作用^[3]。但相较于其他实体肿瘤,目前研究尚少。本研究主要观察最常见的AP-1家族成员JunB、c-Jun、c-Fos、c-Maf mRNA在初诊MM患者骨髓中的表达情况,探讨这些AP-1家族成员在MM发病机理中的意义,为MM新药研发提供理论基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取潍坊医学院第一附属医院2019年11月-2020年12月收治的初诊MM患者26例作为MM组,其中男15例,女11例,年龄39~82岁,中位年龄66岁。MM诊断及分期标准参照《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)》^[4]。另选取同期14例骨髓无恶性细胞的患者为对照组,其中男7例,女7例,年龄18~70岁,中位年龄55岁,包括干细胞供者、缺铁性贫血、原发性免疫性血小板减少症、骨髓正常的淋巴瘤患者。

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2017WS415)

作者简介:燕法红(1977.6-),山东寿光人,博士,副主任医师,主要从事血液病的诊治研究

通讯作者:王宝宏(1972.2-),山东诸城人,硕士,主任医师,主要从事血液病的诊治研究

1.2 主要试剂与仪器 Trizol 购自中国艾科瑞生物科技有限公司、PrimeScript RT Master Mix 购自日本 TaKaRa 公司、TB GreenPremix Ex Taq 购自日本 TaKaRa 公司、RT-PCR 引物由华大基因科技股份有限公司合成、LightCycler480 荧光定量 PCR 仪购自瑞士罗氏公司。

1.3 方法

1.3.1 骨髓有核细胞提取与冻存 MM 组和对照组行常规骨髓穿刺,采集骨髓液 2 ml,置于 EDTA 抗凝管中,加入红细胞裂解液,室温静置 10 min,1500 r/min 离心 10 min,PBS 洗涤 2 次,弃上清,细胞沉淀中加入 Trizol,置于 -80 ℃ 冰箱冻存备用。

1.3.2 RT-PCR 检测 JunB、c-Jun、c-Maf、c-Fos mRNA 表达水平 按照反转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix 说明逆转录 RNA 为 cDNA,反应条件为 37 ℃ 15 min;85 ℃ 5 s;4 ℃ 保存。然后进行 PCR 反应,按照 TB GreenPremix Ex Taq 试剂盒说明书进行,反应条件为变性 95 ℃ 30 s,一个循环;PCR 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;融解 95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,95 ℃,1 个循环;降温 50 ℃ 30 s,1 个循环。JunB 基因上游引物序列为:5'-ACGACTCATACACAGCTACGG-3',下游引物序列为 5'-GCTCGGTTTCAGGAGTTTG-

TAGT-3'。c-Jun 基因上游引物序列为:5'-ACTCG-GACCTCCTCACCTCG-3',下游引物序列为 5'-TGTTTAAGCTGTGCCACCTGTT-3'。c-Maf 基因上游引物序列为:5'-CAGCTCACGATTCCTGGGG-3',下游引物序列为 5'-CAGCGGCTTGGGTACTCA-3'。c-Fos 基因上游引物序列为:5'-CAGTCAGAT-CAAGGGAAGCCACAGACATCT-3',下游引物序列为 5'-GAATAAGATGGCTGCAGCCAAATGCCGCA-3'。内参 β -actin 上游引物序列为 5'-CTCTTCCAGC-CTTCCTTCCT-3',下游引物序列为 5'-AGCACTGTGTGTGGCGTACAG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示 mRNA 的相对表达量。

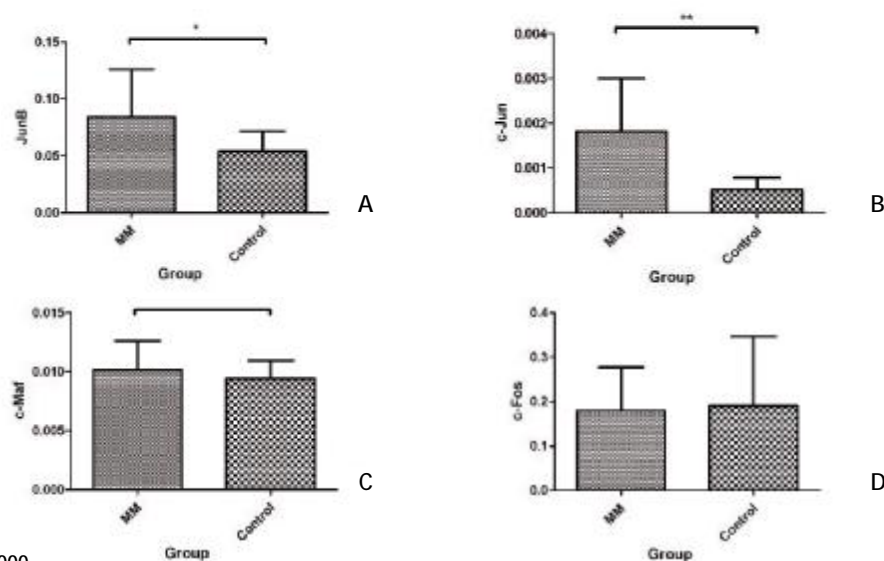
1.4 统计学方法 应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,比较采用独立样本的 t 检验,应用 GraphPad Prism5 软件作图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

MM 组 JunB、c-Jun mRNA 的表达水平高于对照组,其中 c-Jun 升高最多,超过对照组的 3 倍。JunB 次之,较对照组升高约 1.5 倍,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组 c-Maf mRNA、c-Fos mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1、图 1。

表 1 两组骨髓 JunB、c-Jun、c-Maf、c-Fos mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	JunB	c-Jun	c-Maf	c-Fos
MM 组	0.0845 \pm 0.0416	0.0018 \pm 0.0011	0.0102 \pm 0.0025	0.1800 \pm 0.0978
对照组	0.0538 \pm 0.0181	0.0005 \pm 0.0002	0.0094 \pm 0.0015	0.1910 \pm 0.1556
t	2.616	4.028	0.985	-0.277
P	0.013	0.000	0.331	0.784



注: * $P=0.013$, ** $P=0.000$

图 1 两组骨髓 JunB、c-Jun、c-Maf、c-Fos mRNA 表达水平比较

3 讨论

近年来,多项研究发现 AP-1 家族成员在 MM 的发病机制中发挥重要作用,针对 AP-1 的靶向治疗成为 MM 治疗的研究热点。Fan F 等^[4]观察了 AP-1

家族的 JunB、c-Jun、c-Fos、c-Maf 在 MM 发病及耐药机制中的作用,发现 JunB 作用最为突出。MEK/MAPK 与 NF κ B 依赖性 JunB 表达对 MM 细胞的增殖与存活至关重要,JunB 还可诱导 MM 细胞对激素

与硼替佐米耐药。此外,JunB可提高VEGF、VEGFB、IGF1等促血管生长因子的表达,促进MM血管新生,从而促进肿瘤生长^[5,6]。JunB也可通过影响成骨细胞与破骨细胞的数量与功能参与MM骨病的发生^[7]。本研究发现JunB在初诊MM患者中表达上调,与既往研究结果一致,说明JunB表达异常在MM的发病机制中发挥重要作用。

c-Jun作为原癌基因,在多种肿瘤中发现表达上调。如c-Jun N端激酶(N-terminal Kinase, JNK)在霍奇金淋巴瘤细胞中呈高活性,有助于细胞循环周期不可控从而促进肿瘤细胞增殖^[8]。然而,在关于MM的研究中,多位学者发现c-Jun起到抑制MM发展的作用。MM患者比正常患者c-Jun/Fos活性降低^[9]。低水平c-Jun的MM患者比正常患者以及高水平c-JunMM患者预后更好,药物诱导c-Jun表达可抑制MM细胞增殖并诱导其凋亡^[10]。Mcl-1128-350片段通过诱导c-Jun易位至细胞核可触发MM细胞死亡^[11]。JNK诱导c-Jun结合到p53启动子区域的AP-1结合位点,上调p53,可诱发细胞凋亡^[12]。本研究发现,c-Jun在MM患者中表达上调,与既往关于MM的研究不一致,可进一步扩大病例深入研究,明确c-Jun在MM发病中的确切作用。

关于c-Maf在MM发病机制中的研究,目前认为它作为原癌基因,对MM的发生起到推动作用。约有10%~15%的MM患者存在t(14;16)染色体易位,该遗传学异常可累及16q23区域的c-Maf,使Maf蛋白高表达。研究发现c-Maf在MM细胞中表达上调^[13]。徐冬等^[14]应用c-Maf siRNA抑制c-maf基因的表达后,可明显抑制MM细胞系RPMI8226的增殖活性及侵袭力。c-Maf可促进MM细胞的增殖、迁移、侵袭以及与骨髓基质细胞的粘附,并诱导对硼替佐米耐药,它还通过增加VEGF的产生促进血管生成。c-Maf在MM细胞中的表达普遍上调,已被作为一个潜在的治疗靶点^[15]。本研究并未发现MM患者c-Maf mRNA表达水平与正常对照组有差异,考虑可能Fan F等^[16]的研究类似,其在MM发病中的重要性不及JunB、c-Jun等其他AP-1家族成员。

关于c-Fos与MM的关系,目前研究认为其主要与MM骨病的发生密切相关,而其他功能少见报道。c-Fos是参与破骨细胞分化的重要转录因子,c-Fos缺失可导致破骨细胞分化障碍。Fan F等^[16]的研究观察到c-Fos mRNA及蛋白在MM细胞中表达微弱。在本研究中,亦未发现初诊MM患者骨髓有核细胞中c-Fos mRNA表达异常,考虑除了影响骨病之外,c-Fos在MM的发病机制中作用不显著。

综上所述,AP-1家族成员JunB、c-Jun在初诊MM中表达上调,在MM的发病机制中可能发挥重要作用,而c-Maf、c-Fos未发现明显异常,研发关于

JunB、c-Jun的靶向药物可能为MM的治疗提供新策略。

参考文献:

- [1]中国医师协会血液科医师分会.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)[J].中华内科杂志,2020,59(5):341-346.
- [2]范凤娟,江沁月,孙春艳,等.《转录因子JunB/AP-1调节多发性骨髓瘤在骨髓微环境中的细胞增殖与耐药》解读[J].临床血液学杂志,2018,31(7):491-494.
- [3]Fan F,Podar K.The Role of AP-1 Transcription Factors in Plasma Cell Biology and Multiple Myeloma Pathophysiology[J].Cancers (Basel),2021,13(10):2326.
- [4]Fan F,Bashari MH,Morelli E,et al.The AP-1 transcription factor JunB is essential for multiple myeloma cell proliferation and drug resistance in the bone marrow microenvironment[J].Leukemia,2017,31(7):1570-1581.
- [5]Fan F,Malvestiti S,Vallet S,et al.JunB is a key regulator of multiple myeloma bone marrow angiogenesis [J].Leukemia,2021,35(12):3509-3525.
- [6]Yoshitomi Y,Ikeda T,Saito T,Takatsuji H,et al.Emerging Role of AP-1 Transcription Factor JunB in Angiogenesis and Vascular Development[J].Int J Mol Sci,2021,22(6):2804.
- [7]Kenner L,Hoebertz A,Bell FT,et al.Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects[J].J Cell Biol,2004,164(4):613-623.
- [8]Leventaki V,Drakos E,Karanikou M.c-JUN N-terminal kinase (JNK) is activated and contributes to tumor cell proliferation in classical Hodgkin lymphoma [J].Hum Pathol,2014,45(3):565-572.
- [9]Miannay B,Minvielle S,Roux O,et al.Logic programming reveals alteration of key transcription factors in multiple myeloma [J].Sci Rep,2017,7(1):9257.
- [10]Chen L,Wang S,Zhou Y,et al.Identification of early growth response protein 1 (EGR-1) as a novel target for JUN-induced apoptosis in multiple myeloma[J].Blood,2010,115(1):61-70.
- [11]Fan F,Tanon G,Bashari MH,et al.Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1 (128-350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation[J].Cancer Lett,2014,343(2):286-294.
- [12]Saha MN,Jiang H,Yang Y,et al.Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma[J].PLoS One,2012,7(1):e30215.
- [13]Rasmussen T,Knudsen LM,Dahl IM,et al.C-MAF oncogene dysregulation in multiple myeloma: frequency and biological relevance[J].Leuk Lymphoma,2003,44(10):1761-1766.
- [14]徐冬,吕晓伟,毕作木,等.沉默c-maf基因对多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226增殖和侵袭力的影响[J].中国肿瘤临床,2014,41(14):890-894.
- [15]Qiang YW,Ye S,Chen Y,et al.MAF protein mediates innate resistance to proteasome inhibition therapy in multiple myeloma [J].Blood,2016,128(25):2919-2930.

收稿日期:2021-09-29;修回日期:2021-10-08

编辑/成森