

CD74 基因表达对急性髓系白血病细胞增殖与侵袭的抑制作用*

王箐 王静波* 李静静 万春超 张岚

航天中心医院血液科, 北京 100049

摘要 目的:探讨白细胞分化抗原 74(CD74)基因表达对急性髓系白血病(AML)细胞增殖、侵袭及巨噬细胞移动抑制因子(MIF)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路的影响。方法:收集 83 例 AML 患者的骨髓样本(AML 组)、25 例正常供者的骨髓样本(对照组)及人 AML 细胞系 HL60、MOLM-13、THP-1、U-937、人原代正常骨髓单个核细胞(BM-MC)为研究对象,Western blot 检测 AML 骨髓样本及各细胞系中 CD74 蛋白表达;利用 Lipofectamine™2000 转染试剂盒对 MOLM-13 细胞进行转染,并分为空白组(细胞不进行转染)、si-NC 组(将 si-NC 转染于细胞)、si-CD74 组(将 si-CD74 转染于细胞);Western blot 检测各组细胞中 CD74、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)及 MIF/ERK 信号通路相关蛋白 MIF、磷酸化细胞外信号调控蛋白激酶(p-ERK)、ERK 表达水平;CCK-8 法检测各组 MOLM-13 细胞在 0、24、48、72 h 的增殖情况;Transwell 实验检测各组 MOLM-13 细胞侵袭情况。结果:与对照组比较,AML 组骨髓细胞中 CD74 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),CD74 蛋白在 HL60、MOLM-13、THP-1、U-937 细胞系中均高表达,且在 MOLM-13 细胞系中表达量最高。与空白组和 si-NC 组比较,si-CD74 组 MOLM-13 细胞的 OD450 值(在 24、48、72 h 时)、细胞侵袭数目、CD74、MMP-9、MIF 和 p-ERK 蛋白表达显著降低(P 均 < 0.05),但空白组与 si-NC 组比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论:干扰 AML 细胞中 CD74 表达,可抑制细胞增殖与侵袭,其作用机制可能与抑制 MIF/ERK 信号通路有关。

关键词 急性髓系白血病;白细胞分化抗原 74;细胞增殖;细胞侵袭;巨噬细胞移动抑制因子/细胞外信号调节激酶信号通路

中图分类号 R733.71

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20230212

Inhibitory effect of CD74 gene expression on proliferation and invasion of acute myeloid leukemia cells WANG Zheng, WANG Jing-bo*, LI Jing-jing, WAN Chun-chao, ZHANG Lan. Department of Hematology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China

Corresponding author: WANG Jing-bo, E-mail: wangjingbo29@sohu.com

Abstract Objective: To investigate the effects of leukocyte differentiation antigen 74 (CD74) gene expression on the proliferation, invasion and macrophage migration inhibitory factor (MIF)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway in acute myeloid leukemia (AML) cells. Methods: Bone marrow samples from 83 AML patients (AML group), bone marrow samples from 25 normal donors (control group) and human AML cell lines HL60, MOLM-13, THP-1, U-937, and bone marrow mononuclear cell(BMMC) were collected as the research objects. Western blotting was used to detect the CD74 protein expression in AML bone marrow samples and cell lines. MOLM-13 cells were transfected with lipofectamine™2000 transfection kit and divided into blank group (without transfecting), si-NC group (transfecting with si-NC), si-CD74 group (transfection with si-CD74). Western blotting was used to detect the expression levels of CD74, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and MIF/ERK signaling pathway related proteins MIF, p-ERK and ERK in each group of cells, CCK-8 method was used to detect the proliferation of MOLM-13 cells in each group at 0, 24, 48, 72 h, and Transwell experiment was used to detect MOLM-13 cell invasion in each group. Results: Compared with the control group, the expression level of CD74 protein in the bone marrow of the AML group was significantly increased ($P < 0.05$). CD74 protein was highly expressed in HL60, MOLM-13, THP-1, U-937 cell lines, and was highest in MOLM-13 cell line. Compared with the blank group and the si-NC group, the OD450 value (at 24, 48, 72h), cell invasion number, expression of CD74, MMP-9, MIF and p-ERK proteins in

*基金项目:北京市科技计划项目(No: Z171100001017103)

*通信作者:王静波,E-mail:wangjingbo29@sohu.com,北京市海淀区玉泉路 15 号

MOLM-13 cells in the si-CD74 group were significantly reduced ($P < 0.05$). There was no significant difference between the blank group and the si-NC group ($P > 0.05$). Conclusion: Interfering with the expression of CD74 in AML cells can inhibit cell proliferation and invasion. This mechanism may be related to the inhibition of MIF/ERK signaling pathway.

Key words Acute myeloid leukemia; Cluster of differentiation 74; Cell proliferation; Cell invasion; Macrophage migration inhibitory factor/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种造血干细胞的恶性克隆性疾病^[1],有研究认为该病的发生与若干基因之间存在显著的相关性^[2]。白细胞分化抗原 74 (cluster of differentiation 74, CD74)是一种Ⅱ型跨膜蛋白,有报道沉默 CD74 的表达可抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭及血管生成^[3],而巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路中的 MIF 可通过激活并上调 ERK 的磷酸化水平来促进肿瘤的发生发展和侵袭转移^[4]。但 CD74 基因表达对 AML 细胞增殖、侵袭及 MIF/ERK 信号通路的影响尚不清楚。本研究检测了 CD74 在 AML 骨髓及不同细胞系中的表达,利用 RNA 干扰技术沉默 CD74 的表达并观察细胞的增殖与侵袭情况,以探究其内部的分子机制。

材料与方法

临床样本和主要细胞系 收集 2017 年 5 月至 2019 年 5 月在航天中心医院血液科初次确诊为 AML 患者的骨髓细胞样本,共计 83 例作为 AML 组;收集同期 25 例正常供者的骨髓细胞样本作为对照组。本研究经医院伦理委员会批准,在收集标本前均已获得所有受试者书面知情同意。人 AML 细胞系 HL60、MOLM-13、THP-1、U-937 均购自中国科学院上海细胞库,人原代正常骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cell, BMMC)由本院提供,且已获得供者知情同意。

主要试剂与仪器 CD74 siRNA (si-CD74)及其阴性对照 (si-NC)均由广州基迪奥生物科技有限公司构建;蛋白提取试剂盒、2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠(butyleanoacrylate, BCA)试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒均购自赛默飞世尔科技中国有限公司;CCK-8 试剂盒购自默沙克生物科技有限公司;Transwell 小室购自北京萌壮科技有限公司;洛斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RP-MI)-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自 Sigma-Aldrich 公司;增强化学发光(enhanced

chemiluminescence, ECL)化学发光试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;CD74、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、MIF、p-ERK、ERK、GAPDH 兔多克隆抗体(anti-CD74、anti-MMP-9、anti-MIF、anti-p-ERK、anti-ERK、anti-GAPDH)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(HRP 标记的羊抗兔二抗)均购自美国 Abcam 公司;CO₂ 培养箱购自德国 SIGMA 公司。

细胞培养与转染 将 BMMC、HL60、MOLM-13、THP-1、U-937 均置于含 10% FBS、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中,并在 37℃、含有 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞融合度达到 70% ~ 80% 时,收集 MOLM-13 细胞并调整细胞浓度为 2×10^6 个/孔,利用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒对细胞进行分组转染,分组为:空白组(细胞不进行转染)、si-NC 组(将 si-NC 转染于细胞)、si-CD74 组(将 si-CD74 转染于细胞),每组设置 6 个复孔。

Western blot 检测细胞中 CD74、MMP9、MIF、ERK、p-ERK 蛋白表达 使用预冷的放射免疫沉淀测定(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解缓冲液裂解组织和细胞 30 min 后,在 4℃ 下以 10 000 转/min,离心 15 min,获得的上清即为总蛋白。利用 BCA 测定试剂盒检测蛋白质的浓度,将等量的蛋白质(50 μg)加入到 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中进行电泳分离,并转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用含有 5% 脱脂牛奶的吐温-20 的 Tris-缓冲盐(tris-buffered saline tween-20, TBST)封闭 1 h 后,将膜与一抗 anti-CD74 (1:2 000)、anti-MMP9 (1:3 000)、anti-MIF (1:2 500)、anti-ERK (1:1 000)、anti-p-ERK (1:1 000)、anti-GAPDH (1:2 000)于 4℃ 孵育过夜,然后与 HRP 标记的二抗(1:3 000)于室温下孵育 1 h,使用 ECL 检测试剂盒观察蛋白质。对蛋白质条带进行扫描,以 GAPDH 为内参,对蛋白质的灰度值进行量化分析。每个样品设置 6 个复孔。

CCK-8 法检测细胞增殖 将空白组、si-NC 组、si-CD74 组细胞浓度调整为 2×10^3 个/孔后接种于

96 孔细胞培养板中,分别在细胞转染 0、24、48、72 h 向每孔中加入 10 μ L CCK-8 试剂。37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,利用分光光度计测量 450 nm 处的吸光度(即 OD450 值),每组设置 6 个复孔。

Transwell 小室法检测细胞侵袭能力 将空白组、si-NC 组、si-CD74 组细胞浓度调整为 1 $\times$ 10⁵ 个/孔,悬浮在不含 FBS 的 200 μ L RPMI-1640 培养基中孵育 24 h 后转移至 Matrigel 包被的 Transwell 小室的上腔室中,于 37 $^{\circ}$ C 下放置 30 min,然后将 500 μ L 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基添加到下腔室中,并在 37 $^{\circ}$ C 下温育 48 h,用棉签除去上腔室表面的细胞,并将下腔室表面的细胞在室温下用 4% 多聚甲醛固定 5 min,0.1% 结晶紫染色。随机选取 5 个视野,在光学显微镜下观察侵袭细胞数目,每组设置 6 个复孔。

统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计学软件进行分析,计量资料均采用($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差进行分析,进一步 2 组间比较利用 SNK-*q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

CD74 蛋白在 AML 细胞系及骨髓细胞中的表达
AML 组患者骨髓细胞中 CD74 蛋白表达水平显著高于对照组(*P* < 0.05),见图 1、表 1;与 BMMC 细胞比较,HL60、MOLM-13、THP-1、U-937 细胞中 CD74 蛋白表达升高,且在 MOLM-13 细胞中表达量最高。因此,选用 MOLM-13 细胞进行后续实验研究,见图 2、表 2。

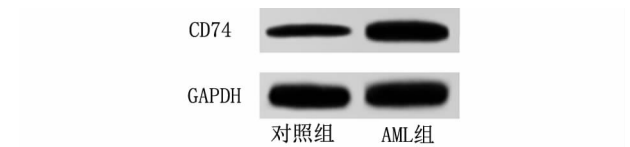
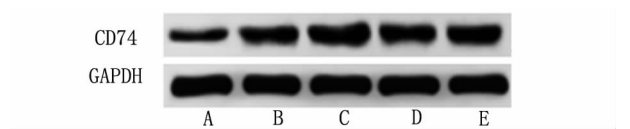


图 1 Western blot 检测 AML 骨髓细胞中 CD74 蛋白的表达
表 1 AML 组与对照组骨髓细胞中 CD74 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例	CD74/GAPDH
对照组	25	0.13 $\pm$ 0.01
AML 组	83	0.85 $\pm$ 0.14
<i>t</i> 值	—	46.967
<i>P</i> 值	—	<0.001

抑制 CD74 表达对 MOLM-13 细胞中 CD74 蛋白表达的影响 si-CD74 组 MOLM-13 细胞中 CD74 蛋白表达水平显著低于空白组和 si-NC 组(*P* < 0.05),而空白组和 si-NC 组中 CD74 蛋白表达水平比较,差异无显著统计学意义(*P* > 0.05),见图 3、表 3。



A: BMMC 细胞; B: HL60 细胞; C: MOLM-13 细胞; D: THP-1 细胞; E: U-937 细胞
图 2 Western blot 检测细胞中 CD74 蛋白的表达
表 2 各细胞中 CD74 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

细胞	CD74/GAPDH
BMMC 细胞	0.21 $\pm$ 0.02
HL60 细胞	0.69 $\pm$ 0.12 *
MOLM-13 细胞	0.92 $\pm$ 0.18 *
THP-1 细胞	0.75 $\pm$ 0.11 *
U-937 细胞	0.84 $\pm$ 0.12 *
<i>F</i> 值	31.453
<i>P</i> 值	<0.001

注:与 BMMC 细胞比较, * *P* < 0.05

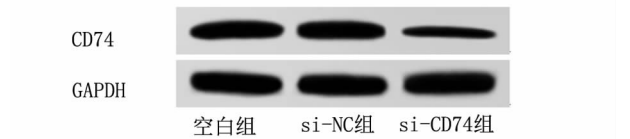


图 3 Western blot 检测细胞中 CD74 蛋白的表达
表 3 各组 MOLM-13 细胞中 CD74 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	CD74/GAPDH
空白组	0.88 $\pm$ 0.15 *
si-NC 组	0.86 $\pm$ 0.17 *
si-CD74 组	0.21 $\pm$ 0.03
<i>F</i> 值	50.008
<i>P</i> 值	<0.001

注:与 si-CD74 组比较, * *P* < 0.05

抑制 CD74 表达对 MOLM-13 细胞增殖的影响
与空白组和 si-NC 组比较,si-CD74 组 MOLM-13 细胞在 0 h 的 OD450 值无明显变化(*P* > 0.05)、在 24、48、72 h 的 OD450 值显著降低(*P* 均 < 0.05),空白组和 si-NC 组在 0、24、48、72 h 的 OD450 值差异不显著(*P* 均 > 0.05),见表 4。

抑制 CD74 表达对 MOLM-13 细胞侵袭的影响
与空白组和 si-NC 组比较,si-CD74 组 MOLM-13 细胞侵袭数目减少,MMP9 蛋白表达水平降低(*P* < 0.05);空白组与 si-NC 组 MOLM-13 细胞侵袭数目及 MMP9 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05),见图 4、5 和表 5。

抑制 CD74 表达对 MIF/ERK 信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组和 si-NC 组比较,si-CD74 组 MOLM-13 细胞中 MIF、p-ERK 蛋白表达水平显著降低(*P* 均 < 0.05),ERK 蛋白表达无显著差异(*P*

表 4 各组 MOLM-13 细胞在 0、24、48、72 h 的 OD450 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
空白组	0.23 ± 0.04	0.57 ± 0.07 *	1.34 ± 0.21 *	1.87 ± 0.19 *
si-NC 组	0.24 ± 0.05	0.55 ± 0.08 *	1.30 ± 0.19 *	1.88 ± 0.20 *
si-CD74 组	0.26 ± 0.06	0.34 ± 0.04	0.72 ± 0.11	1.03 ± 0.18
F 值	0.545	22.651	23.480	39.489
P 值	0.591	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 si-CD74 组比较, * $P < 0.05$

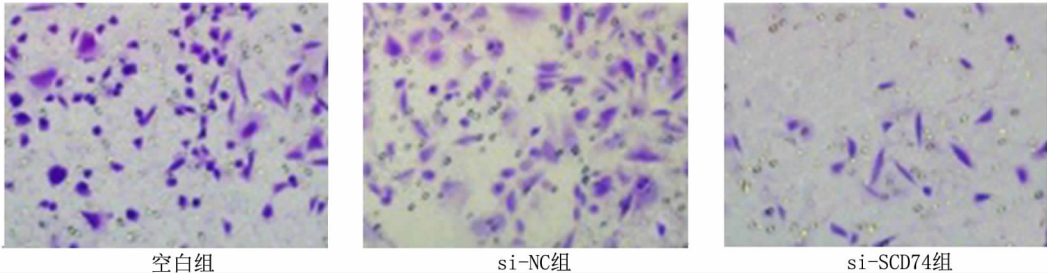


图 4 Transwell 实验检测抑制 CD74 表达对 MOLM-13 细胞侵袭的影响

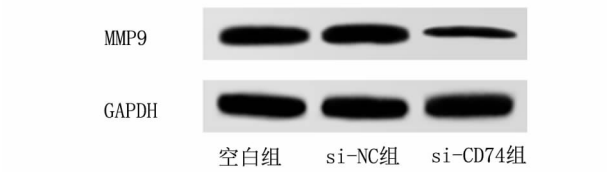


图 5 Western blot 检测各组 MOLM-13 细胞中侵袭相关标志物 MMP9 蛋白表达

表 6 各组 MOLM-13 细胞中 MIF、ERK、p-ERK 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MIF/GAPDH	ERK/GAPDH	p-ERK/ERK
空白组	0.76 ± 0.11 *	0.95 ± 0.15	0.57 ± 0.09 *
si-NC 组	0.79 ± 0.10 *	0.93 ± 0.16	0.59 ± 0.08 *
si-CD74 组	0.17 ± 0.02	0.92 ± 0.13	0.23 ± 0.03
F 值	97.787	0.065	26.891
P 值	<0.001	0.938	<0.001

注:与 si-CD74 组比较, * $P < 0.05$

表 5 各组 MOLM-13 细胞侵袭数目及 MMP9 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞侵袭数目(个)	MMP9 蛋白
空白组	98.45 ± 11.36 *	0.82 ± 0.16 *
si-NC 组	96.52 ± 12.28 *	0.81 ± 0.17 *
si-CD74 组	17.31 ± 2.35 *	0.19 ± 0.03
F 值	135.210	42.314
P 值	<0.001	<0.001

注:与 si-CD74 组比较, * $P < 0.05$

均 > 0.05);空白组与 si-NC 组 MOLM-13 细胞中 MIF、ERK、p-ERK 蛋白表达比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05),见图 6、表 6。

讨 论

AML 是一种高度异质性和侵袭性的疾病。CD74 是一种多功能性细胞因子,在免疫应答中以分子伴侣的形式与主要的组织相容性复合物 II 型蛋白结合,介导抗原呈递过程^[5]。CD74 在多种肿瘤中高表达,且与患者不良预后密切相关^[6];下调 CD74 的表达可抑制胃癌细胞 BGC-823 增殖和 DNA 合成,诱导细胞发生凋亡^[7];CD74 低表达可抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,其可能作为胰腺癌治疗的新靶点^[8]。本研究显示,CD74 蛋白在 AML 患者骨髓细胞中的表达水平显著高于对照组,CD74 蛋白在 AML 细胞系 HL60、MOLM-13、THP-1、U-937 中均高表达,且在 MOLM-13 细胞中表达量最高。因此,选用 MOLM-13 细胞进行后续实验。利用 RNA 干扰技术抑制 CD74 的表达后,发现 MOLM-13 细胞增殖、侵袭能力减弱。基质金属蛋白酶(MMPs)是锌和钙依赖性蛋白水解酶,可破坏细胞外基质并破坏基质的降解平衡,从而降低基底膜等组织屏障的防御功能。MMP-9 作为 MMPs 家族的重要成员,它可以通过降解细胞外基质和基底膜来促进肿瘤的侵

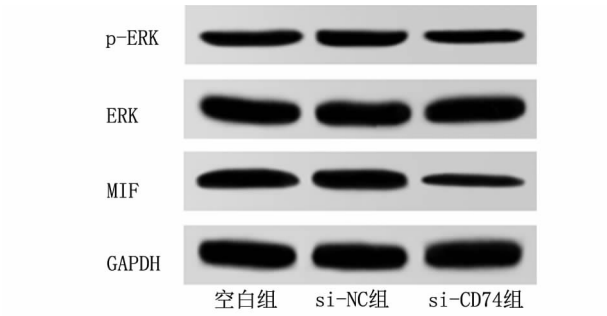


图 6 Western blot 检测各组细胞中 MIF、ERK、p-ERK 蛋白表达

袭,被认为是肿瘤侵袭的重要分子标记物^[9]。有研究发现干扰 CD74 表达可以抑制肺癌细胞的增殖和迁移,并且当 CD74 表达下调时,MMP-9 的表达也被抑制^[10],与本研究结果一致,本研究证实干扰 CD74 表达能抑制 MOLM-13 细胞侵袭。提示 CD74 在 AML 中起着促肿瘤的作用,下调 CD74 表达可抑制 MOLM-13 细胞的增殖、侵袭。以往研究显示,CD74 依赖性信号网络越活跃,AML 患者的存活率越低^[11];CD74 蛋白在 AML 患者中高表达,且与细胞存活调节因子酪蛋白裂解酶 P、CD44 呈正相关^[12],表明 CD74 在 AML 中具有促癌作用。

黄耀星等^[13]报道在 MIF/ERK 信号通路中,MIF 可激活 ERK 磷酸化级联反应,发挥信号传导作用。MIF 是许多炎症和免疫性疾病的重要介质,具有促炎作用,可参与机体免疫及炎症反应^[14]。ERK 的激活发生在大多数癌症类型中,其激活后能调节大多数癌症的发生发展^[15]。本研究显示,下调 CD74 表达后可明显抑制 MIF/ERK 信号通路中 MIF、p-ERK 蛋白表达水平,提示抑制 CD74 表达可能通过调控 MIF/ERK 信号通路中 MIF、p-ERK 蛋白表达来抑制 MOLM-13 细胞的增殖、侵袭。

参考文献

- 1 许琳蔚,邢学仰,陶红芳,等.弥漫大 B 细胞淋巴瘤继发急性髓系白血病 1 例并文献复习[J].内科急危重症杂志,2020,26(5):438-440.
- 2 Li H,Tian Y,Li X,et al. Knockdown of IARS2 inhibited proliferation of acute myeloid leukemia cells by regulating p53/p21/PCNA/eIF4E pathway[J]. Oncol Res,2019,27(6):673-680.
- 3 Gai JW,Wahafu W,Song L,et al. Expression of CD74 in bladder cancer and its suppression in association with cancer proliferation, invasion and angiogenesis in HT-1376 cells[J]. Oncol Lett,2018,15(5):7631-7638.
- 4 周鸣,余蕾,李琴山,等. MIF 基因沉默对肝癌细胞系增殖凋亡及 ERK/RSK2 信号通路的影响[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(19):22-27.
- 5 Gil-Yarom N,Radomir L,Sever L,et al. CD74 is a novel transcription regulator[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2017,114(3):562-567.
- 6 Fernandez-Retana J,Zamudio-Meza H,Rodriguez-Morales M,et al. Gene signature based on degradome-related genes can predict distal metastasis in cervical cancer patients[J]. Tumour Biol,2017,39(6):1-10.
- 7 李启阳,王馨梦,富帅,等. CD74 小干扰 RNA 通过 NF- κ B 途径诱导胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 现代预防医学,2019,46(6):1079-1082+1095.
- 8 黄耀星,贾林,王康玮,等. CD74 低表达对人胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中华生物医学工程杂志,2017,25(5):363-368.
- 9 Ma C,Wu B,Huang X,et al. SUMO-specific protease 1 regulates pancreatic cancer cell proliferation and invasion by targeting MMP-9[J]. Tumor Biology,2014,35(12):12729-12735.
- 10 Reha J,Mukkamalla S,Rathore R,et al. Adequate lymph node evaluation in the elderly is associated with improved survival in patients with stage I-III colon cancer: a validation study using the national cancer data base[J]. Eur J Surg Oncol,2018,44(1):148-156.
- 11 Yasinska IM,Sumbayev VV. Alliance of galectin-3 and CD74 biochemical networks as a crucial component of survival machinery operated by human acute myeloid leukaemia cells[J]. EBioMedicine,2019,44(1):2-3.
- 12 Ruvo PP,Hu CW,Qiu Y,et al. LGALS3 is connected to CD74 in a previously unknown protein network that is associated with poor survival in patients with AML[J]. EBioMedicine,2019,44(1):126-137.
- 13 黄耀星,贾林,余丹纯,等. CD74/MIF 信号通路对 Capan-2 细胞神经侵袭力及 HIF-1 α 表达的影响[J]. 广州医科大学学报,2018,46(6):20-24.
- 14 Krishnan V,Schaar B,Tallapragada S,et al. Tumor associated macrophages in gynecologic cancers[J]. Gynecol Oncol,2018,149(1):205-213.
- 15 韩慧慧,刘旸,陈红霞,等. METTL3 对肝内胆管癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 军事医学,2021,45(9):667-674.

(2021-06-21 收稿 2022-03-03 修回)

《内科急危重症杂志》2023 年各期重点号

第 1 期 消化系统疾病

第 2 期 血液病及风湿性疾病

第 3 期 神经及感染性疾病

第 4 期 肾脏及内分泌疾病

第 5 期 呼吸系统疾病

第 6 期 心血管疾病