

AHNAK 在多发性骨髓瘤治疗前后的表达变化及机制研究

郭丽影 姜丽波^(通讯作者) 纪春光 程岐岐 许玲玲 卢停

齐齐哈尔医学院附属第二医院血液科, 黑龙江齐齐哈尔, 161000;

摘要: 目的: 探索在多发性骨髓瘤 (MM) 治疗前及缓解后 AHNAK 基因的表达变化及机制研究。方法: 通过使用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 AHNAK 基因在 40 例初诊多发性骨髓瘤患者治疗前及完全缓解后骨髓中 AHNAK 基因的表达情况。结果: AHNAK 在初诊多发性骨髓瘤患者骨髓中相对表达量低于治疗后缓解组中的表达水平 ($P < 0.05$)。结论: AHNAK 基因在多发性骨髓瘤中的表达水平较缓解后表达水平低, 考虑 AHNAK 基因可能参与了多发性骨髓瘤的发生发展。

关键词: AHNAK; RT-PCR; 多发性骨髓瘤 MM

DOI: 10. 64216/3104-9656. 25. 02. 002

多发性骨髓瘤是一种异常单克隆免疫球蛋白形成, 导致多种脏器损害, 造成机体损伤的疾病^[1]。近年来随着科学技术的发展, 多发性骨髓瘤的病因及发病机制被大家慢慢了解。虽然很多新药如蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂、CAR-T 及自体干细胞移植等治疗手段均得到了很好的治疗效果, 但仍有部分患者治疗效果较差, 甚至出现耐药。我们根据临床相关检测, 基因突变及新的融合基因形成可能会增加多发性骨髓瘤耐药的发生。但多发性骨髓瘤的病因及发病机制仍未完全清楚。到目前认为是多种因素在多个层面、多个阶段的相互作用导致骨髓瘤的发生。AHNAK 又称桥粒联结蛋白 (desmoyok), 是一种大小约 700 kDa. 的支架蛋白^[2]。1992 年 Shtivelman 等^[3]在细胞系研究中发现 AHNAK 与肿瘤发生有关系, AHNAK 在肿瘤细胞伪足形成中有重要的作用。同时经过实验分析发现 AHNAK 基因在急性髓系白血病中的表达水平较对照组 (正常人) 有不同程度的差异。因此, 本研究将进一步检测 AHNAK 在多发性骨髓瘤治疗前后的表达变化, 从而更深一步探讨 AHNAK 在多发性骨髓瘤发病过程中的具体机制, 为治疗多发性骨髓瘤提供新的治疗思路及新的诊疗依据。

1 研究对象

于 2016 年 1 月至 2024 年 1 月在齐齐哈尔医学院附属第二医院血液科初诊的 40 例多发性骨髓瘤患者, 经过骨髓细胞形态学、免疫固定电泳、免疫分型、染色体等检查确诊为多发性骨髓瘤, 同时留取患者完全缓解后骨髓标本。30 例正常人用于正常对照组。用于检测的骨髓细胞来自临床检测的剩余标本, 均获得了患者的知情

同意。

1.1 研究方法

1.1.1 引物设计

PCR 引物是由沈阳莱博睿生物开发有限公司合成。

AHNAK: 上游引物序列 5'-TCCTGGCAAGGCATTCG-3', 下游引物序列 5'-GGTTGTCAAAGTAGATGGTGGC-3', 扩增产物长度为 233 bp。

内参 GAPDH: 上游引物序列: 5'-TTCGTCATGGGTGTGAAC-3', 下游引物序列: 5'-CTGTGGTCATGAGTCCTT-3', 内参扩增产物长度为 142bp。

1.1.2 主要试剂及仪器

淋巴细胞分离液、Trizol Reagent (ambion)、Fast King gDNA Dispelling RTSuperMix (TIANGEN)、Taqman qPCR PreMix (SYBR Green TIANGEN), PCR 仪器: Aria MX Real-Time PCR System (Agilent)。

1.1.3 分离骨髓单个核细胞

取骨髓 2-4ml 注入含有 EDTA 抗凝管内。根据说明书按照相应步骤分离及收集骨髓的单个核细胞。

1.1.4 总 RNA 提取

按照 Trizol Reagent (ambion) 说明书进行提取 RNA, 提取 RNA 的 A260 /A280 在 1.8-2.0 之间。

1.1.5 cDNA 逆转录

根据测定浓度将 RNA 均稀释至 200ng/ul, 根据 Fast King gDNA Dispelling RTSuperMix (TIANGEN) 的说明书进行 cDNA 的合成, 将合成的 cDNA 放置于 -20 °C 冰箱内保存。

1.1.6 实时荧光定量 RT-PCR 反应

按照 Talent qPCR PreMix (SYBR Green TIANGEN) 的说明书配制定量 PCR 反应的体系。在 20 μ L 反应体系中需要配置 2 \times Talent qPCR preMix 10 μ L, 1 \times Ro x 0.4 μ L, 其上、下游引物各 0.6 μ L (10 μ M), cDNA 反应产物按 1:10 倍稀释后取 2 μ L, 然后加入 RNase-free ddH₂O 补至 20 μ L。在 Aria MX Real-Time PCR System (Agilent) 上进行定量反应, 反应条件为预变性: 95 $^{\circ}$ C 3min, PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 15s, 40 个循环。每个样本设有 2 个复孔, 反应结束后, 从程序中读取 Ct 值 (threshold cycle)。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{正常人}}$ 。

1.2 统计学分析

实验结果采用 GraphPad prism 9 及 SPSS 25 软件进行分析。软件进行统计学分析, 采用秩和检验比较各组间的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

PCR 结束后由 PCR 仪记录目的基因和内参的熔解曲线、扩增曲线及 CT 值等。熔解曲线表示 PCR 产物是否单一。扩增曲线表示各个标本是否有扩增, 表示标本均有明显扩增, 扩增率较高。反应结束后, 从计算机中读取 Ct 值, 每个样本 2 个复孔取平均 CT 值后, 计算 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 值, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{正常人}}$ 。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量。用 GraphPad prism 9 及 SPSS 25 软件进行分析。结果提示 AHNK 在初诊多发性骨髓瘤 (MM) 患者骨髓中相对表达量低于治疗后缓解组中的表达水平 ($P < 0.05$)。

3 讨论

对于多发性骨髓瘤来说, 很多研究均表明, 疾病的发生、发展受多种因素的调控, 同时我们也发现很多种基因的表达的高或低表达参与多发性骨髓瘤发生及发展, 很多基因的改变与骨髓瘤患者的预后相关。AHNAK 蛋白在不同的细胞中亚细胞定位不同, 包括细胞核是、细胞质、高尔基体或脂膜, 如在上皮细胞 AHNK 定位于脂膜上, 表现出细胞间粘附的作用。在非上皮细胞主要定位于细胞核和细胞质中而发挥生理作用。AHNAK 目前所涉及的细胞过程或细胞途径尚未完全明确, 包括血脑屏障的生成、细胞结构的形成、细胞迁移的参与、以及

在心脏钙通道及肌膜修复的调节中均发挥相关作用^[4]。目前有报道 AHNK 参与许多种肿瘤的通路, 发挥其生物学作用, 并作为独立预后因子的潜在临床意义^[5,6]。AHNAK 首次发现是肿瘤相关蛋白, 但肿瘤患者大多死亡原因是转移性疾病。故 AHNK 的研究也更多聚焦于肿瘤转移。上皮-间质转化 (EMT) 参与肿瘤转移的最初发展, 原发性肿瘤中上皮特性的丧失, 以及间充质细胞功能的获得, 会使细胞迁移和侵袭活动增加。AHNAK 在多种转移性肿瘤组织中的表达增强且促进肿瘤转移。Zhang 等^[7]研究结果显示, 在胰腺导管腺癌 (PDAC) 中 AHNK 的上调介导了 EMT 的发生且被认为是 PDAC 的驱动基因, 与不良预后正相关。在肝细胞癌 (HCC) 中, Liu 等^[8]研究证实 circ-0008194 可能作为吸附 miR-190a 的海绵, 从而促进 AHNK 的表达, 进一步参与了 HCC 的转移。Cai 等^[9]研究发现, 过表达 AHNK 可以抑制卵巢癌的发展和转移。该作用主要通过抑制 Wnt/ β 连环蛋白通路实现的。因此。通过上述实验及论述表明, AHNK 与肿瘤相关性有关。多发性骨髓瘤属于血液恶性肿瘤中的一种。在临床中比较常见, 同时恶性程度也比较高。在我们临床中多发性骨髓瘤其机制并不明确。因此本实验通过比较。AHNAK 在多发性骨髓瘤治疗前后的表达不同, 来明确 AHNK 在多发性骨髓瘤中的作用。我们通过上述实验提示多发性骨髓瘤前后 AHNK 的表达量的不同, AHNK 在初诊多发性骨髓瘤患者骨髓中相对表达量低于治疗后缓解组中的表达水平 ($P < 0.05$)。因此考虑其异常表达可能与多发性骨髓瘤的发生发展, 同时也为多发性骨髓瘤发病机制和临床研究提供了一定的线索。我们会进一步研究 AHNK 在多发性骨髓瘤中扮演的角色, 为多发性骨髓瘤的发病机制提供更多的线索。

参考文献

- [1] 陈灏珠, 钟南山, 陆再英. 内科学. 9 版. 北京. 人民卫生出版社. 2020: 592-596.
- [2] Lee, I. H., et al, AHNK-mediate Activation of Phospholipase C- η 1 through Protein Kinase C. 27 9(25): p. 26645-26653.
- [3] Shtivelman E, Cohen FE, Bishop JM. A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2-microns polyionic rod structure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(12): 547

2-5476.

[4] Lee, I. H., et al., AHNAK functions as a tumor suppressor via modulation of TGF β /Smad signaling pathway. 33(38):p. 4675-4684.

[5] Jung, L. H., et al., Function of AHNAK protein in aortic smooth muscle cell migration through Rac activation. 2012(2):p. 2.

[6] Shin, J. H., Increased Cell Proliferations and Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus of AHNAK Deficient Mice. 2015. 40(7):p. 1457-62.

[7] Zhang Z, Liu X, Huang R, et al. Upregulation of nucleoprotein AHNAK is associated with poor outcome of pancreatic ductal adenocarcinoma prognosis via mediating epithelial-mesenchymal tr

ansition. J Cancer, 2019, 10:3860-3870.

[8] Liu W, Pan Y, Zhu H, et al. CircRNA-0008184 functions as a ceRNA to promote invasion of hepatocellular carcinoma via inhibiting miR-190a/AHNAK signaling pathway. J Clin Lab Anal, 2022, 36:e24286.

[9] Cai Y, Hu Y, Yu F, et al. AHNAK suppresses ovarian cancer progression through the Wnt/beta-cateini signaling pathway. Aging (Albany NY), 2021, 13:23579-23587.

项目名称: AHNAK 在多发性骨髓瘤治疗前后表达变化及相关机制研究; 项目编号: LSF GG-2024036