

Ikaros 通过靶向 c-KIT 抑制 B-ALL 白血病细胞的增殖

宋娜¹⁾, 贾慧婕²⁾, 陈秋月²⁾, 邹亚文²⁾, 陈银泽²⁾, 齐金博¹⁾,
杨俊¹⁾, 邱艳艳¹⁾, 胡庆²⁾, 谷腾腾²⁾, 马晓艳²⁾, 王海军^{2)*}

(新乡医学院基础医学院¹⁾生物化学与分子生物学系,²⁾病理学系,河南新乡 453003)

摘要 Ikaros 是一种重要的造血细胞分化与发育调控因子,其基因结构、蛋白质活性的改变与淋巴细胞白血病的发生密切相关。致癌基因 *c-KIT* 与白血病的发生有直接联系,但 Ikaros 与 *c-KIT* 之间的调控关系尚未见报道。本研究报道,在人急性 B 淋巴细胞白血病 (B-acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 细胞中,Ikaros 可靶向调控 *c-KIT* 基因的转录与蛋白质表达。通过在人 B-ALL 细胞系 Nalm6 中分别高表达和 shRNA 干扰 Ikaros 后,qRT-PCR 与 Western 印迹结果显示,Ikaros 可直接抑制 *c-KIT* 基因的表达。双荧光素酶报告实验检测 Ikaros 及其突变体对 *c-KIT* 基因的直接靶向作用。结果显示,野生型 Ikaros 可明显抑制 *c-KIT* 的表达,而突变体则不能。进一步利用染色质免疫共沉淀技术 (chromatin-immunoprecipitation, ChIP),检测 Ikaros 对 *c-KIT* 上游启动子序列的结合活力。结果显示,Ikaros 蛋白在 *c-KIT* 的上游调控区约 -500 bp 处有明显的结合。Ikaros 通过靶向 *c-KIT* 上游启动子,抑制 *c-KIT* 表达,抑制 B-ALL 细胞的增殖,为临床治疗白血病提供了新思路。

关键词 核内转录因子 Ikaros; 致癌基因 *c-KIT*; 急性 B 淋巴细胞白血病; 基因表达与调控
中图分类号 Q819

Ikaros Inhibits Proliferation of B-ALL Leukemia Cells by Targeting c-KIT

SONG Na¹⁾, JIA Hui-Jie²⁾, CHEN Qiu-Yue²⁾, ZOU Ya-Wen²⁾, CHEN Yin-Ze²⁾, QI Jin-Bo¹⁾,
YANG Jun¹⁾, QIU Yan-Yan¹⁾, HU Qing²⁾, GU Teng-Teng²⁾, MA Xiao-Yan²⁾, WANG Hai-Jun^{2)*}

(¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology;²⁾ Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China)

Abstract Ikaros is a crucial regulator of the differentiation and development of hematopoietic cells, and it is closely related to the occurrence of lymphoid leukemia. The oncogene *c-KIT* also has a direct relationship with leukemia, but the interaction between Ikaros and *c-KIT* was unknown. Here, we reported that Ikaros regulated the transcription and protein abundance of *c-KIT* in B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells. Results displayed that Ikaros could directly inhibit *c-KIT* expression in human B-ALL Nalm6 cells by qRT-PCR and Western blotting. Dual luciferase reporter assays were performed to determine the targeting effect of Ikaros and its mutant on the *c-KIT* gene. The results showed that the wild-type Ikaros could significantly inhibit the expression of *c-KIT* compared with the control group, but the mutant Ikaros could not. Meanwhile, Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed and we found that the binding site of Ikaros on the promoter of *c-KIT* was at about -500 bp. We propose that Ikaros inhibits the expression of *c-KIT* and the proliferation of B-ALL cells by targeting the upstream

收稿日期: 2018-02-26; 修回日期: 2018-04-08; 接受日期: 2018-04-13

国家自然科学基金项目 (No. 81602132); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 201610472017, 201610472040); 河南省科技攻关项目 (No. 172102310584, 182102310242) 资助

* 通讯作者 Tel: 0373-3029123; E-mail: wnavy200299@163.com

Received: February 26, 2018; Revised: April 8, 2018; Accepted: April 13, 2018

Supported by National Science Foundation of China (No. 81602132); National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. 201610472017, 201610472040); Key Technologies Research and Development Program of Henan Province (No. 172102310584, 182102310242)

* Corresponding author Tel: 0373-3029123; E-mail: wnavy200299@163.com

promoter of *c-KIT*, which provides a new venue for leukemia therapy.

Key words nuclear transcription factor Ikaro; oncogene *c-KIT*; B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL); gene expression and regulation

致癌基因 *c-KIT* (cluster of differentiation 117, CD117), 简称为 KIT 或 Kit, 又名干细胞生长因子受体 (stem cell growth factor receptor, SCFR), 分子量 145 kD, 为 III 型跨膜蛋白酪氨酸激酶受体家族成员之一, 最早由 Yarden 等于 1987 年发现并克隆^[1-2]。c-KIT 正常情况下, 主要表达于造血干/祖细胞表面, 在维持造血干/祖细胞的存活、促进造血细胞的增殖与分化中发挥重要作用。此外, 在一些分化成熟的细胞, 例如: 肥大细胞、生殖细胞、黑色素细胞和消化道中的卡哈尔氏间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICCs) 亦有表达^[3]。近年来研究表明, c-KIT 信号转导通路的持续性激活 (通常为点突变) 与人类某些肿瘤的发生密切相关 (包括: 黑色素瘤、白血病、胃肠间质瘤、肥大细胞肿瘤、小细胞肺癌、神经胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌及其他妇科肿瘤等)^[4-7]。特别是在急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 中, c-KIT 的阳性表达率在 70% 左右, 在慢性粒细胞白血病急变期的患者中, 其表达率高达 80%^[8-10]。

Ikaro, 简称 IK, 是重要的血液细胞分化发育的核内转录调控因子^[11], 在造血细胞的早期以及造血祖细胞分化为 3 大血液细胞系时, 均需要 Ikaro 家族蛋白质的参与。Ikaro 蛋白的变异会直接导致机体血液系统疾病的发生 (如: 急性 T、B 淋巴细胞白血病)^[12-17]。人们已经发现, 在恶性血液系统患者中 (Pre-B acute lymphoblastic leukemia, 即: Pre-B ALL 白血病患者), 正是由于 *Ikaro* 基因的删除, 从而导致白血病的发生, 尽管其机制尚不清楚^[18]。Ikaro 抑制或激活特定基因的转录, 通过与其他转录调控因子协同结合, 形成转录复合物进而发挥其生物学活性。Ikaro 与 CtBP^[19, 20]、HDACs^[14]、SIN3A 等分子结合, 组成核小体重塑-去乙酰化酶复合物 (nucleosome remodeling-deacetylase, NuRD) 抑制相关基因的表达^[21]。另外, Ikaro 也可与 P-TEFb、GATA-1、SWI/SNF 等协同分子结合, 形成转录激活复合物, 进而促进基因的转录与表达^[22, 23]。

本文通过逆转录病毒高表达和 shRNA 干扰 Ikaro 表达, 以及染色质免疫共沉淀技术 (chromatin-immunoprecipitation, ChIP) 研究 Ikaro 与 c-KIT 在人急性 B 淋巴细胞白血病 (B-acute lymphoblastic

leukemia, B-ALL) 中的表达调控关系。结果表明, Ikaro 可以通过与 *c-KIT* 的上游启动序列特异性结合, 抑制靶基因 *c-KIT* 的表达, 最终抑制 B-ALL 细胞的增殖, 为临床治疗 B-ALL 白血病提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人急性 B 淋巴细胞白血病系 (B-ALL): Nalm6; 人急性 T 淋巴细胞白血病系 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL): CEM 和 MOLT4; 人急性髓系白血病细胞系 (AML): U937; 小鼠 *Ikaro*^{-/-} 细胞系: DN3。以上白血病细胞系培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640。HEK293T, 逆转录病毒包装细胞 Ampho 和 Eco 细胞系为本室保存, 培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM (Hyclone 公司)。B-ALL 白血病临床样本及正常人骨髓细胞临床样本均取自新乡医学院第一临床学院并征得患者知情同意。

c-KIT 抑制剂 ISCK03 (Sigma 公司), 肌动蛋白、c-KIT 抗体 (Santeruz 公司), ChIP 级兔 IgG、Ikaro 抗体 (Abcam 公司), HRP 标记的二抗购自 Bio-Rad 公司。转染相关试剂 CaCl₂、Polybrene、HEBS 均购于 Sigma 公司。荧光素酶报告载体 pGL4.15, pGL4.74 载体及检测试剂 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, 5 × 细胞裂解液购于 Promega 公司。pcDNA3.1, 人 Ikaro 表达载体 pcDNA3.1-hIK, 小鼠 Ikaro 表达载体 pcDNA3.1-mIK, 小鼠 Ikaro 突变型表达载体 pcDNA3.1-mIK-A465/7, 逆转录病毒载体 pMSCV-IRES-GFP (MIG) 和 pMSCV-IRES-GFP-Ikaro (MIG-IK) 均为本实验室保存。Ikaro shRNA 和 Ctrl shRNA 载体购自 OriGene 公司。细胞培养皿购自 Corning 公司, 总 RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司, 反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Scientific 公司。

1.2 Western 印迹检测 c-KIT 对白血病细胞增殖的影响

将 Nalm6、U937、CEM 和 MOLT4 细胞按每孔 10⁴ 细胞/100 μL 均匀分加至 96 孔细胞板中, 处理组添加终浓度为 20 μmol/L 的 c-KIT 抑制剂

ISCK03,对照组为 DMSO,放置培养箱培养。3 d 后取出细胞板,每孔加 10 μ L Western 印迹细胞增殖检测试剂(Roche 公司),置于 37℃ 培养箱孵育 4 h,用酶标仪测取 A_{440} 值,观察 c-KIT 在白血病细胞增殖中的作用。

1.3 总 RNA 的提取和实时定量 PCR(qPCR)

细胞总 RNA 提取按 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明操作,利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。实时定量 PCR 反应在 StepOne Plus(ABI)仪器进行。引物:人 18s RNA: F: GTAACCCGTTGAACCCATT, R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG; 人 *Ikaros*: F: CCCAAGTTTCAGGGAAGGAAA, R: TCATCGCCCTCATCTGGAGTA; 人 *c-KIT*: F: AAACACGGCTTAAGCAATTCCA, R: GCGTGTCTGTTCTTCTTTCC; 小鼠 *GAPDH*: F: CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCA, R: CCATTCTCGGCCTTGACT GT; 小鼠 *Ikaros*: F: GGGCCTCCTTTACCCAGAAA, R: CACCCGAGTGCA GCTTGA; 小鼠 *c-KIT*: F: TCCTACGTGGTGCCAA CCA, R: TTCCATGATGGCAGGAGTCA。

1.4 shRNA 干扰

Ikaros-shRNA 敲减转染利用 Neon™ system 进行。转染 3 d,进行细胞分选。获得的细胞用于提取 RNA 及后续试验。

1.5 逆转录病毒包装、侵染 Nalm6 细胞

逆转录病毒包装的转染体系配置:DNA 质粒 20 μ g($X \mu$ L); 2.0 mol/L $CaCl_2$ 100 μ L; ddH₂O 400- $X \mu$ L,总计 500 μ L。向上述混合液中加入 500 μ L 2 \times HEBS,混匀,室温静置 15 min。将 1 mL 转染混合液加入到生长至 30% 的 Ampho 细胞中,37℃ 继续培养。转染后第 3 d,收集病毒液,开始侵染靶细胞。

逆转录病毒侵染靶细胞,用加入 HEPS(1 \times) 和聚凝胺(12.5 μ g/mL) 的病毒液重悬 Nalm6 细胞,1 mL/孔均分至 24 孔板中,2 500 r/min,32℃ 离心 2 h。离心结束后,轻轻吸除病毒液,加 1 mL 细胞培养基,放置于 37℃ 培养 72 h。收集细胞,进行细胞分选。将分选的细胞提取 RNA 和蛋白质,用于后续试验。

1.6 荧光素酶报告检测

HEK293T 细胞转染相应的荧光素酶报告载体。相关试剂配制:被动缓冲液 1:5 稀释,细胞裂解缓冲液,终止缓冲液。HEK293T 细胞转染 24 h,用被动缓冲液室温裂解 15 ~ 20 min。取 20 μ L 于 1.5 mL 离心管中(注意:尽量避免吸取细胞碎片)。加入

50 μ L 细胞裂解缓冲液,混匀,测量荧光活性。加入 50 μ L 终止缓冲液,读数。最后进行数据分析,观察 *Ikaros* 对 c-KIT 的转录抑制作用。

1.7 染色质免疫共沉淀(ChIP)及 qChIP 检测

收集细胞置室温 2 000 g,5 min 离心,收集 4×10^7 个细胞,用 4℃ 培养液重悬细胞并转移至 15 mL 离心管中,冰浴 10 min;用 1% 甲醛溶液进行交联。反应结束,用 0.125 mol/L 甘氨酸终止;离心获得细胞沉淀,用 10 mL 的 L1 溶液(50 mmol/L Hepes-KOH, pH7.5,140 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,10% 甘油,0.5% NP-40,0.25% Triton X-100)在 4℃ 裂解细胞 10 min。之后,离心 3 000 r/min,10 min,4℃。将获得的细胞沉淀用 10 mL 的 L2 溶液(0.2 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L EGTA,10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)在室温进一步裂解 10 min。离心 3 000 r/min,10 min,4℃;用 900 μ L 超声裂解液(1 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L EGTA,10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)重悬细胞沉淀,并进行超声裂解,再加 10% 甘油。ChIP 反应体系的配置:DNA 样品与 1% Triton X-100、0.1% deoxycholate 和 1 \times TE,以及特异性抗体包被的磁珠混合,IgG 作为阴性对照,4℃,过夜。次日,在磁力架上回收磁珠,用 RIPA 溶液清洗。在 0.6 mol/L NaCl 溶液中进行去交联,最后获得 ChIPed DNA。qChIP(real-time PCR of ChIPed DNA),即通过实时定量 PCR 方法进行检测。c-KIT qChIP 引物: F: TCGGGGCTCAATTCCTAAC, R: CAATAAAGGTCC ACTGCC。通过本实验检查 *Ikaros* 在 c-KIT 上游启动调控序列区域的结合情况。

1.8 统计学方法

实验所得数据用平均值 \pm 标准差表示,用 SPSS18.0 统计学软件进行分析处理,不同组间差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。其中,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 c-KIT 在白血病细胞中高表达并促进细胞增殖

选取 B-ALL 白血病临床样本($n = 17$),正常人骨髓细胞($n = 13$)为对照,通过 qPCR 检测 c-KIT 在 B-ALL 白血病细胞中的表达情况。结果显示,与正常人骨髓(normal bone marrow,NBM)细胞相比较,B-ALL 白血病病人细胞中的 c-KIT 表达升高 10.24 倍(** $P < 0.01$)(Fig. 1A),说明 c-KIT 在 B-ALL 中

异常高达,可能对白血病的发生发展有促进作用。为了进一步验证 c-KIT 在白血病细胞中的促增殖效应,利用 c-KIT 的特异性抑制剂 ISCK03 处理白血病

细胞^[24, 25]。结果显示,通过 ISCK03 处理 72 h, Nalm6、U937、CEM 和 MOLT4 的增殖得到明显抑制 (Fig. 1B)。

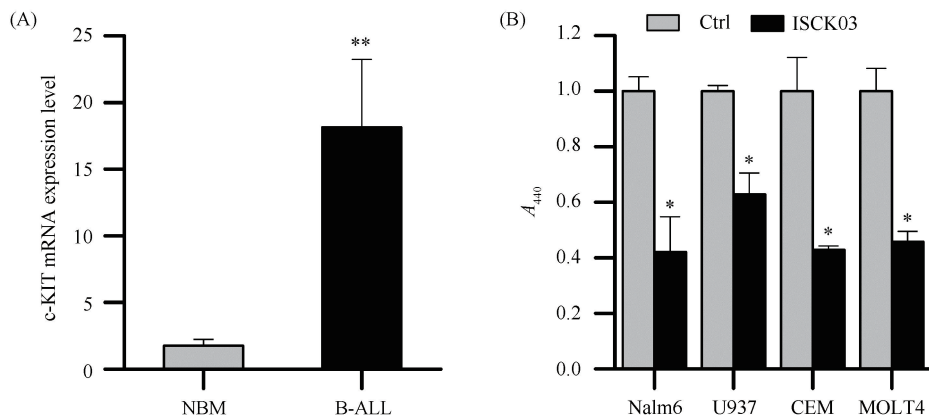


Fig. 1 c-KIT promotes B-ALL cell proliferation (A) Detection the *c-KIT* mRNA transcription level in clinical patient samples, including NBM ($n = 13$) and B-ALL ($n = 17$), with real-time PCR. ** $P < 0.01$, B-ALL vs. NBM. NBM: normal bone marrow; B-ALL: B-acute lymphoblastic leukemia. (B) The effects of ISCK03 on the leukemia cell proliferation, including Nalm6, U937, CEM and MOLT4, were detected with cell proliferation and cytotoxicity assays. * $P < 0.05$, ISCK03 vs. Ctrl. ISCK03: a specific c-KIT inhibitor. The cells were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ ISCK03 for 72 hours before examined

2.2 Ikaros 抑制致癌基因 *c-KIT* 的表达

通过上述结果证实, c-KIT 可以促进白血病细胞的增殖,抑制 c-KIT 可以明显抑制白血病细胞的增殖。为了进一步观察抑癌因子 Ikaros 对 c-KIT 的表达调控作用,通过逆转录病毒高表达和 shRNA 干扰 Ikaros 的表达后,检测 *c-KIT* 基因的表达情况。

结果显示,在人 B-ALL 细胞系 Nalm6 中,通过逆转录病毒(MIG-IK)高表达 Ikaros 可使其提高 3.5 倍 (** $P < 0.01$),而 c-KIT 的表达仅为对照组的 0.37 倍 (* $P < 0.05$) (Fig. 2A)。为了进一步检测 Ikaros 对 *c-KIT* 的转录抑制,利用小鼠 DN3 细胞。DN3 是 IK^{-/-} 细胞,通过在 DN3 细胞中高表达 Ikaros 可以直接检测 Ikaros 对 *c-KIT* 的表达调控作用。利用逆转录病毒(MIG-mIK)高表达鼠源 Ikaros。结果显示,与对照组相比较, Ikaros 表达提高 11.5 倍 (** $P < 0.01$),而 c-KIT 的表达仅为对照组的 1/2 倍 (* $P < 0.05$) (Fig. 2B)。

随后利用 shRNA 干扰技术在 Nalm6 细胞中下调 Ikaros 的表达。与对照组相比较, Ikaros 表达仅为对照组的 35% (* $P < 0.05$),而 c-KIT 的表达却提高了 3 倍 (** $P < 0.01$) (Fig. 2C)。Western 印迹进一步证实,当 Ikaros 表达升高时明显抑制 c-KIT 的表达,而 Ikaros 表达受到抑制后, c-KIT 的表达则相对升高 (Fig. 2D)。

以上研究表明,上调 Ikaros 的表达可以导致

c-KIT 转录与表达的下降,进而抑制白血病细胞的增殖。Ikaros 能否抑制 c-KIT? 利用荧光素酶报告实验进一步检测 Ikaros 对 *c-KIT* 基因的转录抑制作用。通过构建 c-KIT promoter-Luciferase 载体,将其与 Ikaros 表达载体共转染 HEK293T 细胞。结果显示,与对照组相比较,人 Ikaros (hIK) 和小鼠 Ikaros (mIK) 均明显抑制 *c-KIT* 启动子的启动活性,其启动活性仅为正常对照的 38% (* $P < 0.05$),而小鼠 Ikaros 突变体 mIK-A465/7^[11] 由于 Ikaros 的第 465 的 Val(V) 和第 467 位的 Phe(F) 突变为 Ala(A) 之后,其生物学活性被抑制,与 hIK 和 mIK 相比较,突变体 mIK-A465/7 不能明显抑制 *c-KIT* 启动子的启动活性,其启动活性为正常对照的 70% (Fig. 3)。这说明 Ikaros 可以直接通过与 *c-KIT* 启动子结合,抑制其基因转录与表达。

2.3 Ikaros 通过与 c-KIT 上游启动序列结合抑制其表达

通过以上结果说明, c-KIT 在人 B-ALL 白血病细胞的发生与发展过程中发挥重要作用,抑癌基因 Ikaros 可通过抑制 c-KIT 的转录与翻译进而抑制白血病细胞的增殖。Ikaros 可通过对 c-KIT 启动子的转录抑制进而抑制其表达。Ikaros 是通过何种方式与 c-KIT 上游启动序列结合,以及潜在结合位点在何处? 利用染色质免疫共沉淀技术 (ChIP) 进一步探究 Ikaros 抑制 c-KIT 的作用机制。首先,通过生

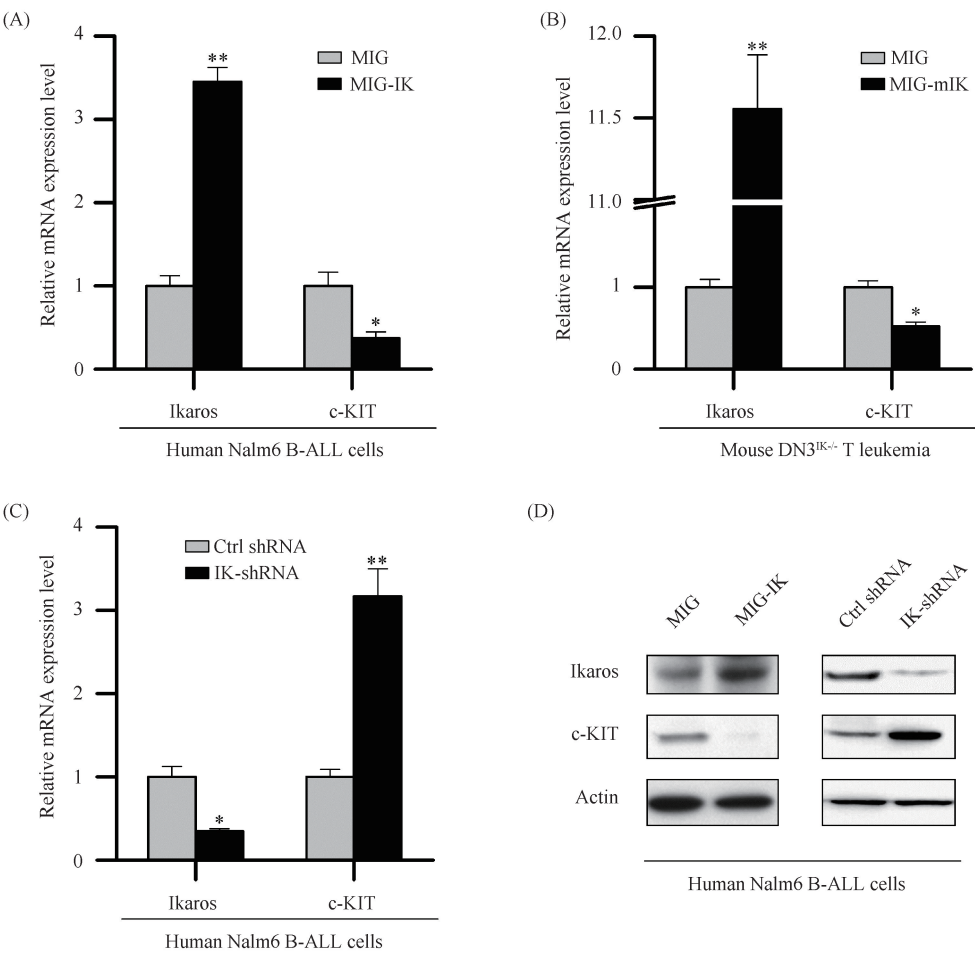


Fig. 2 Ikaros inhibits c-KIT expression Cells were grown and transfected with retrovirus MIG-IK plasmids in human B-ALL Nalm6 or MIG-mIK in mouse DN3 (T leukemia) cells for overexpression of Ikaros, or shRNA for knockdown Ikaros. c-KIT and Ikaros transcription and protein levels were detected. (A) MIG (control) and MIG-IK -transfected in Nalm6 cells. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, MIG-IK vs. MIG. (B) MIG (control) and MIG-mIK-transfected in DN3^{IK/-} cells. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, MIG-IK vs. MIG. (C) shRNA knockdown Ikaros in Nalm6 cells. Scrambled RNA as the control shRNA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, IK-shRNA vs. Ctrl-shRNA. (D) Western blotting was used to detect Ikaros and c-KIT protein levels in Nalm6 cells. β -Actin was used as the loading control

物信息学以及 Ikaros 特异性结合基序 (binding motif)GGGA 或 TCCC 序列^[11],分析 Ikaros 在 c-KIT 上游调控序列 (upstream regulatory element, URE) 中可能的结合位点,再通过 ChIP 及 qChIP 检测。结果表明,在 Nalm6、U937、CEM、MOLT4 白血病细胞系中,Ikaros 在 c-KIT 上游调控序列约 -500 bp 处有明显的结合力 (Fig. 4)。这说明, Ikaros 可通过与 c-KIT 上游特定调控序列结合,而抑制其基因转录与表达。

3 讨论

c-KIT 基因的突变及异常表达在白血病细胞的发生与发展中发挥重要作用^[26, 27]。Wang 等^[28]研究表明,在结肠癌中 c-KIT 信号通路激活可促进

AP-1 蛋白入核,并与 Claudin-3 上游启动序列结合进而促进其表达,最终促进结肠癌发展。最近, Li 等^[29]研究表明, c-KIT⁺ 的脂肪间充质干细胞 (ASCs) 可以通过增强 IL-3、SDF-1 和 VEGF-A 的表达,促进乳腺癌细胞的生长以及癌组织的血管生成。此外,长非编码 RNA (long noncoding RNA) CCDC26 通过促进 c-KIT 的表达进而促进白血病细胞的增殖^[24]。关于 c-KIT 在人 B-ALL 型白血病中的研究尚不完全明了。本文通过检测 B-ALL 患者的 c-KIT 的表达水平以及细胞增殖实验,发现 c-KIT 可能在 B-ALL 白血病中具有重要的促生长作用。

Ikaros 是人体造血系统重要的抑癌基因^[11]。Ikaros 通过与核内相关协同蛋白质结合形成转录抑制或激活复合物,通过引发组蛋白的修饰改变,以及

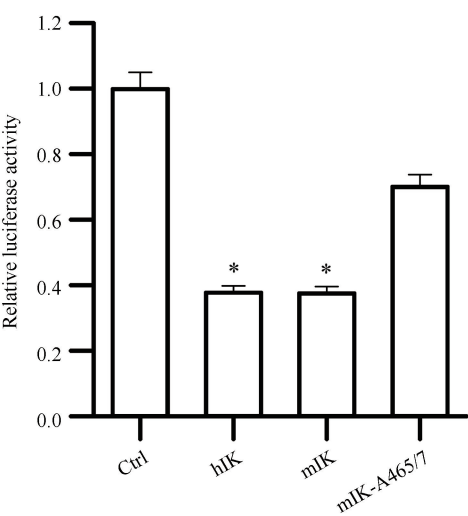


Fig. 3 The effect of Ikaros on *c-KIT* transcription as measured by luciferase assays HEK293T cells were transfected with pGL4.15-*KIT* promoter and pcDNA3.1-Ikaros plasmids. pGL4.74 was used as the system internal control. After transfection for 24 hours, the cells were lysed in lysis buffers, followed by Glo-Max (Promega) for fluorescence detection. **P* < 0.05, hIK or mIK vs. Ctrl. hIK: human Ikaros; mIK: mouse Ikaros; mIK-A465/7: mouse Ikaros mutant

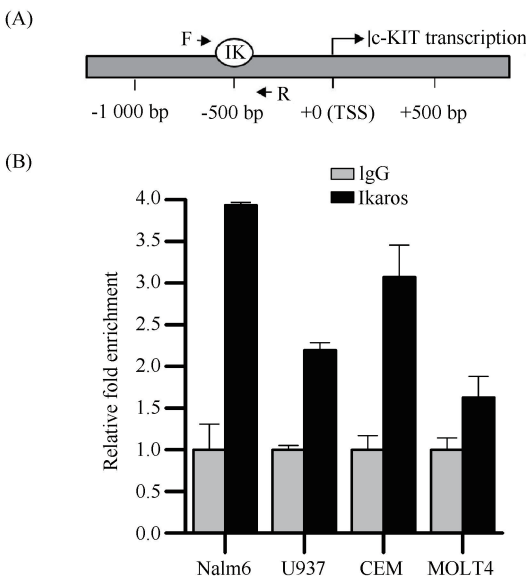


Fig. 4 ChIP and qChIP validation of Ikaros binding to the 5'-URE of *c-KIT* The cells were sonicated and immunized with Ikaros antibodies, then the Ikaros-DNA complex was immunoprecipitated. The pulled-down DNA amount was examined by real-time PCR. (A) The schematic diagram of Ikaros binding to the -500 bp of the *c-KIT* promoter region. F, qChIP forward primer; R, qChIP reverse primer; IK, Ikaros; TSS, transcription start site. (B) Ikaros qChIP results in Nalm6, U937, CEM and MOLT4 leukemia cell lines

染色质结构重塑进而调控靶基因的表达。Wang 等^[14]研究发现, Ikaros 通过与核内协同蛋白-组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1) 组成复合物, 与 KDM5B 上游启动序列特异性结合, 通过引起组蛋白 H3K27me3 升高、H3K9ac 降低, 引起染色质的结构重塑, 而最终抑制致癌基因 *KDM5B* 的表达。Schjerven 等^[30]发现, 突变的 Ikaros 可以使 BCR-ABL1 + Pre-B ALL 细胞增值相关蛋白质细胞周期蛋白 D1、CDK6 的表达水平增加, 而抑制细胞周期的 P21 蛋白表达则相对下降。同时也阐明, Ikaros 抑制 *c-KIT* 的表达依赖于 Ikaros 蛋白的 4 个锌指结构。

本文通过逆转录病毒高表达, 以及 shRNA 干扰技术低表达 Ikaros 探究其与致癌基因 *c-KIT* 的表达调控关系。结果发现, Ikaros 可以直接抑制 *c-KIT* 的表达。利用荧光素酶报告实验证实, 野生型的 Ikaros 可以特异性与 *c-KIT* 上游启动序列结合, 进而抑制其基因转录与表达。进一步通过 Ikaros ChIP 试验发现, Ikaros 蛋白可与 *c-KIT* 上游启动子区域约-500 bp 处结合, 调控其基因转录与表达。当然, Ikaros 与 *c-KIT* 上游启动子序列结合后, 具体通过何种机制和途径与组蛋白修饰发生何种改变, 以及染色质结构重塑等最终抑制 *c-KIT* 的表达, 还需要进一步深入研究。综上所述, 本文研究发现, 在人 B-ALL 白血病细胞中, Ikaros 可通过抑制 *c-KIT* 的转录与表达, 抑制白血病细胞的生长, 为临床治疗 B-ALL 白血病提供了一定的理论基础和实验依据。

参考文献 (References)

[1] Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, *et al.* Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand [J]. *EMBO J*, 1987, **6**(11): 3341-3351

[2] Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, *et al.* The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus [J]. *Nature*, 1988, **335** (6185): 88-89

[3] Liang J, Wu YL, Chen BJ, *et al.* The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2013, **9**(5): 435-443

[4] Cao K, Li M, Miao J, *et al.* CCDC26 knockdown enhances resistance of gastrointestinal stromal tumor cells to imatinib by interacting with c-KIT [J]. *Am J Transl Res*, 2018, **10**(1): 274-282

[5] Amagai Y, Matsuda A, Jung K, *et al.* A point mutation in the extracellular domain of KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 9775

[6] Wang YY, Zhou GB, Yin T, *et al.* AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(4): 1104-1109

[7] Lau ST, Hansford LM, Chan WK, *et al.* Prokineticin signaling

- is required for the maintenance of a de novo population of c-KIT⁺ cells to sustain neuroblastoma progression[J]. *Oncogene*, 2015, **34**(8): 1019-1034
- [8] 沈红强, 汤永民, 杨世隆, 等. CD117 在白血病细胞上的表达分析[J]. 中华血液学杂志 (Shen HQ, Tang YM, Yang SL, *et al.* Analysis of CD117 expression on leukemia cells [J]. *Chin J Hematol*), 2003, **24**(5): 228-230
- [9] Gao X, Lin J, Gao L, *et al.* High expression of c-kit mRNA predicts unfavorable outcome in adult patients with t(8;21) acute myeloid leukemia [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(4): e0124241
- [10] Ahmadi A, Poorfathollah AA, Aghaiipour M, *et al.* Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemias [J]. *Tumour Biol*, 2014, **35**(7): 6763-6768
- [11] 王海军, 宋娜, 钟加滕. 核内转录因子 IKAROS 与血液肿瘤[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Wang HJ, Song N, Zhong JT. Nuclear transcription factor IKAROS and hematologic tumor [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2017, **33**(4): 342-347
- [12] Zhang W, Kuang P, Li H, *et al.* Prognostic significance of IKZF1 deletion in adult B cell acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis [J]. *Ann Hematol*, 2017, **96**(2): 215-225
- [13] Yao QM, Liu KY, Gale RP, *et al.* Prognostic impact of IKZF1 deletion in adults with common B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *BMC Cancer*, 2016, **16**: 269
- [14] Wang H, Song C, Ding Y, *et al.* Transcriptional regulation of JARID1B/KDM5B histone demethylase by Ikaros, histone deacetylase 1 (HDAC1), and casein kinase 2 (CK2) in B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(8): 4004-4018
- [15] Song C, Gowda C, Pan X, *et al.* Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia [J]. *Blood*, 2015, **126**(15): 1813-1822
- [16] Wang H, Ouyang H, Lai L, *et al.* Pathogenesis and regulation of cellular proliferation in acute lymphoblastic leukemia - the role of Ikaros [J]. *J BUON*, 2014, **19**(1): 22-28
- [17] Wang H, Song C, Gurel Z, *et al.* Protein phosphatase 1 (PP1) and casein kinase II (CK2) regulate Ikaros-mediated repression of TdT in thymocytes and T-cell leukemia [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, **61**(12): 2230-2235
- [18] Davis KL. Ikaros; master of hematopoiesis, agent of leukemia [J]. *Ther Adv Hematol*, 2011, **2**(6): 359-368
- [19] Koipally J, Georgopoulos K. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(26): 19594-19602
- [20] Dorman K, Shen Z, Yang C, *et al.* CtBP1 interacts with Ikaros and modulates pituitary tumor cell survival and response to hypoxia [J]. *Mol Endocrinol*, 2012, **26**(3): 447-457
- [21] Zhang J, Jackson AF, Naito T, *et al.* Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2011, **13**(1): 86-94
- [22] Bottardi S, Zmiri FA, Bourgoin V, *et al.* Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(9): 3505-3519
- [23] O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, *et al.* An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(20): 7572-7582
- [24] Hirano T, Yoshikawa R, Harada H, *et al.* Long noncoding RNA, CCDC26, controls myeloid leukemia cell growth through regulation of KIT expression [J]. *Mol Cancer*, 2015, **14**: 90
- [25] Na YJ, Baek HS, Ahn SM, *et al.* [4-t-butylphenyl]-N-(4-imidazol-1-yl phenyl) sulfonamide (ISCK03) inhibits SCF/c-kit signaling in 501mel human melanoma cells and abolishes melanin production in mice and brownish guinea pigs [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, **74**(5): 780-786
- [26] Gao X, Lin J, Gao L, *et al.* High expression of c-kit mRNA predicts unfavorable outcome in adult patients with t(8;21) acute myeloid leukemia [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(4): e0124241
- [27] Edling CE, Hallberg B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**(11): 1995-1998
- [28] Wang Y, Sun T, Sun H, *et al.* SCF/C-Kit/JNK/AP-1 signaling pathway promotes claudin-3 expression in colonic epithelium and colorectal carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(4): 765
- [29] Li W, Xu H, Qian C. c-Kit-positive adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote the growth and angiogenesis of breast cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2017, **2017**: 7407168
- [30] Schjerven H, Ayongaba EF, Aghajanianfah A, *et al.* Genetic analysis of Ikaros target genes and tumor suppressor function in BCR-ABL1⁺ pre-B ALL [J]. *J Exp Med*, 2017, **214**(3): 793-814