

论著·基础研究

PRPS1 I72 位点突变对急性淋巴细胞白血病耐药性的影响及其机制研究

崔芷嫣^{1,2}, 陈尧^{1,2}, 陶悦^{1,2}, 沈树红¹, 李慧^{1,2}

1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心儿科转化医学研究所, 国家卫生健康委员会儿童血液肿瘤重点实验室, 上海 200127; 2. 上海市儿科临床分子诊断重点实验室, 上海 200127

[摘要] 目的·研究磷酸核糖焦磷酸合成酶1 (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1, *PRPS1*) I72 位点突变是否能使急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 细胞对巯嘌呤类化学治疗 (化疗) 药物 6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine, 6-MP)、6-硫代鸟嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG) 产生耐药性, 并解释其作用机制。方法·将临床上已发现的 *PRPS1* 基因的各突变 (I72F、R177S、V316L) 和 2 个 ALL 细胞系 (KOPN72bi 和 RS4;11) 中存在的 *PRPS1* 基因突变 (V208A、V289A) 分别插入融合了绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的载体 pGV303 中, 用已证明的对巯嘌呤类化疗药耐药的 *PRPS1* A190T 突变为阳性对照, 对该类药不耐药的空载体 pGV303 (Vector)、*PRPS1* 野生型 (wild type, WT) 及 *PRPS1* I72V 突变为阴性对照。将上述构建好的载体瞬时转染入 HEK-293T 细胞 (简称 293T 细胞) 中, 并采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 *PRPS1* 各突变体在 293T 细胞中的蛋白表达情况。采用药物敏感性实验检测并计算 6-MP 或 6-TG 对上述瞬转 *PRPS1* 各突变体的 293T 细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。随后, 除 *PRPS1* I72F 和 I72V 之外, 将第 72 位异亮氨酸 (isoleucine, I) 变成其他氨基酸的多个突变即 I72M、I72L、I72N、I72S、I72T 分别插入载体 pGV303 中, 瞬时转染入 293T 细胞后采用 Western blotting、药物敏感性实验检测各突变体在 293T 细胞中的蛋白表达情况以及 6-MP 或 6-TG 的 IC_{50} 。采用慢病毒感染法将 *PRPS1* WT、I72F、I72V、A190T 及载体 pGV303 感染 REH 细胞系, 通过流式细胞术分选 GFP 阳性细胞以获得 *PRPS1* 各突变体稳定表达的细胞, 并采用 Western blotting 及药物敏感性实验检测各突变体在 REH 细胞中的蛋白表达情况以及 6-MP 或 6-TG 的 IC_{50} , 用以验证 293T 细胞获得的药物敏感性实验结果。采用 Annexin V/DAPI 双染法评估各 REH 细胞系的凋亡情况, 并通过 Western blotting 检测各 REH 细胞系的 DNA 损伤相关蛋白 [S139 位点磷酸化的组蛋白 H2AX (phosphorylated H2AX-S139, γ -H2AX)、磷酸化的细胞周期检验点激酶 2 (phosphorylated check point kinase 2, pCHK2)] 和细胞凋亡相关蛋白聚 (腺苷二磷酸核糖) 聚合酶剪切体 [cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cleaved PARP] 的表达水平。使用 PDB 数据库 (Protein Data Bank) 中编号为 2HCR (PDB code 2HCR) 的 *PRPS1* 晶体结构图, 通过三维成像及 PyMOL 软件预测并绘制 I72 位点、I72V 和 I72F 的氨基酸残基及空间构象图。结果·Western blotting 结果显示, 瞬时转染的外源性 *PRPS1* 各突变蛋白在 293T 细胞中成功表达; 药物敏感性实验结果显示, 表达 *PRPS1* I72F、R177S、V316L、V208A 与阳性对照 A190T 的 293T 细胞对 6-MP 或 6-TG 的 IC_{50} 均远高于表达 V289A 及阴性对照 Vector、*PRPS1* WT、*PRPS1* I72V 的细胞 (均 $P=0.000$)。将第 72 位异亮氨酸变成其他氨基酸后, Western blotting 结果显示瞬时转染的外源性 *PRPS1* I72 位点的各突变蛋白在 293T 细胞中成功表达; 药物敏感性实验结果显示, 表达 *PRPS1* I72M、I72F、I72L、I72N、I72S、I72T 与 A190T 的 293T 细胞对 6-MP 或 6-TG 的 IC_{50} 均远高于表达 Vector、*PRPS1* WT、*PRPS1* I72V 的细胞 (均 $P=0.000$)。慢病毒感染 REH 细胞后, Western blotting 结果显示在已构建的稳定细胞系中 *PRPS1* WT、A190T、I72F、I72V 的蛋白高表达且表达量相似; 药物敏感性实验结果显示, 表达 *PRPS1* I72F、A190T 的 REH 细胞对 6-MP 或 6-TG 的 IC_{50} 均远高于表达 Vector、*PRPS1* WT、*PRPS1* I72V 的细胞 (均 $P=0.000$), 与 293T 细胞中瞬时转染得到的药物敏感性结果一致。Annexin V/DAPI 双染法、DNA 损伤和凋亡相关蛋白的 Western blotting 检测的结果均显示, 经 6-MP 处理后, 表达 *PRPS1* A190T、I72F 的 REH 细胞系的 DNA 损伤和凋亡率明显低于表达 Vector、*PRPS1* WT、*PRPS1* I72V 的细胞 (均 $P=0.000$)。蛋白结构分析结果显示, *PRPS1* I72F 会使 *PRPS1* 的空间构象发生改变。结论·*PRPS1* I72F、R177S、V316L、V208A、I72M、I72L、I72N、I72S、I72T 突变可使细胞获得对巯嘌呤类化疗药的耐药性, *PRPS1* V289A、I72V 突变不影响细胞对巯嘌呤类化疗药的敏感性。293T 中的药物敏感性实验结果和 REH 中的药物敏感性实验结

[基金项目] 国家自然科学基金 (82070159); 上海市自然科学基金 (22ZR1440000); 浦东新区科技发展基金 (PKJ2020-Y05)。

[作者简介] 崔芷嫣 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: cuicui0724@163.com。

[通信作者] 李慧, 电子信箱: lihui@scmc.com.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (82070159); Natural Science Foundation of Shanghai (22ZR1440000); Science and Technology Commission of Pudong New Area Foundation (PKJ2020-Y05)。

[Corresponding Author] LI Hui, E-mail: lihui@scmc.com.cn。

果一致, 证明293T细胞可以作为检测 *PRPS1* 突变对巯嘌呤类化疗药物耐药性的快速研究模型。*PRPS1* I72 位点突变对巯嘌呤类化疗药耐药性的影响可能与 *PRPS1* 结构发生改变有关。

[关键词] 急性淋巴细胞白血病; 耐药复发; 磷酸核糖焦磷酸合成酶1; 巯嘌呤

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.08.005 [中图分类号] R73-3 [文献标志码] A

Effects of *PRPS1* I72 mutations on drug resistance in acute lymphoblastic leukemia and its mechanisms

CUI Zhiyan^{1,2}, CHEN Yao^{1,2}, TAO Yue^{1,2}, SHEN Shuhong¹, LI Hui^{1,2}

1. Key Laboratory of Pediatric Hematology and Oncology of National Health Commission, Pediatric Translational Medicine Institute, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Clinical Molecular Diagnostics for Pediatrics, Shanghai 200127, China

[Abstract] Objective·To study whether mutations at the I72 site of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (*PRPS1*) can induce resistance in acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells to thiopurine chemotherapy drugs 6-mercaptopurine (6-MP) and 6-thioguanine (6-TG), and explain their mechanisms of action. **Methods**·The *PRPS1* gene mutations (I72F, R177S and V316L) found in clinical practice and *PRPS1* gene mutations (V208A and V289A) present in two ALL cell lines (KOPN72bi and RS4;11) were constructed into the vector pGV303 fused with green fluorescent protein (GFP), respectively. The *PRPS1* A190T mutation that has been proven to be resistant to thiopurine chemotherapy drugs was used as the positive control, and the empty vector pGV303 (Vector), *PRPS1* wild-type (WT) and *PRPS1* I72V were used as the negative controls. The various mutants of *PRPS1* were transiently transfected into HEK-293T cells (referred to as 293T cells), and the expression of these exogenous *PRPS1* was detected by Western blotting. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 6-MP or 6-TG on the above 293T cell lines transiently transfected with *PRPS1* mutants was detected and calculated by drug sensitivity experiments. Subsequently, in addition to *PRPS1* I72F and I72V, multiple mutations I72M, I72L, I72N, I72S and I72T were constructed into the vector pGV303, respectively, by changing the isoleucine (I) at position 72 into other amino acids. The various mutants were transiently transfected into 293T cells, respectively, and the protein expression of each mutant and IC_{50} values of 6-MP or 6-TG were detected by Western blotting and drug sensitivity experiments. *PRPS1* WT, I72F, I72V, A190T and pGV303 vectors were transfected into REH cell lines by lentivirus infection, and GFP-positive cells were sorted by flow cytometry to obtain cells with stable expression of *PRPS1* mutants. The protein expression of each mutant in REH cells and IC_{50} values of 6-MP or 6-TG were detected by Western blotting and drug sensitivity experiments to verify the results of drug sensitivity experiments obtained by 293T cells. Annexin V/DAPI double staining was used to evaluate the apoptosis of each REH cell line, and Western blotting was used to detect the levels of DNA damage-related proteins [phosphorylation at S139 of histone H2AX (phosphorylated H2AX-S139, γ -H2AX), phosphorylated check point kinase 2 (pCHK2)], and apoptosis-related protein cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (cleaved PARP) in each REH cell line. The diagrams of amino acid residues and spatial conformations of I72 locus, I72V and I72F were predicted and drawn through three-dimensional imaging and PyMOL software by using the crystal structure data of *PRPS1*-numbered 2HCR (PDB code 2HCR) in the PDB (Protein Data Bank) database. **Results**·Western blotting results showed that the transiently transfected exogenous *PRPS1*-mutated proteins were successfully expressed in 293T cells. The drug sensitivity experiment results showed that the IC_{50} values of 6-MP or 6-TG in 293T cells expressing *PRPS1* I72F, R177S, V316L, V208A and the positive control A190T were much higher than those in cells expressing V289A and the negative control Vector, *PRPS1* WT and I72V (all $P=0.000$). After mutating the isoleucine (I) at position 72 with other amino acids, Western blotting results showed successful expression of exogenous *PRPS1*-mutated proteins at position I72 after transient transfection in 293T cells. Drug sensitivity experiments revealed the IC_{50} values of 6-MP or 6-TG in 293T cells expressing *PRPS1* I72M, I72F, I72L, I72N, I72S, I72T and positive control A190T were much higher than those in cells expressing negative control Vector, *PRPS1* WT and I72V (all $P=0.000$). Western blotting results showed that the protein expression levels of *PRPS1* WT, A190T, I72F and I72V in the REH stable cell lines constructed by lentivirus were high and similar. The drug sensitivity experiment results showed that the IC_{50} values of 6-MP or 6-TG in REH cells expressing *PRPS1* I72F and positive control A190T were much higher than those in cells expressing negative control Vector, *PRPS1* WT and I72V (all $P=0.000$), which was consistent with the drug sensitivity results obtained by transient transfection in 293T cells. The results of Annexin V/DAPI double staining method and the detection of DNA damage and apoptosis-related proteins by Western blotting showed that after 6-MP treatment, the DNA damage and apoptosis rates of REH cell lines expressing *PRPS1* A190T and I72F were significantly lower than those of cells expressing negative control Vector, *PRPS1* WT and I72V (all $P=0.000$). The protein structure analysis results showed that *PRPS1* I72F could change the conformation of *PRPS1*. **Conclusion**·The *PRPS1* I72F, R177S, V316L, V208A, I72M, I72L, I72N, I72S and I72T mutations can confer drug resistance to the thiopurine chemotherapy drugs in cells, while the *PRPS1* V289A and I72V mutations do not affect cell sensitivity to the thiopurine chemotherapy drugs. The drug sensitivity experiment results in 293T cells are consistent with those in REH cells, demonstrating that 293T cells can serve as a rapid research model for detecting the resistance of *PRPS1* mutations to thiopurine chemotherapy drugs. The effects of the *PRPS1* I72 mutations on the resistance of the thiopurine chemotherapy drugs may be related to changes in the structure of *PRPS1*.

[Key words] acute lymphoblastic leukemia (ALL); drug resistance and relapse; phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (*PRPS1*); thiopurine

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是一种以早期淋巴干细胞或祖细胞的异常克隆性增殖并伴随骨髓中正常造血细胞的耗竭为特征的白血病^[1]。研究^[2]显示, ALL在成人和儿童中均可发生, 在儿童中最为常见, 占儿童急性白血病的75%~80%。目前, 随着危险度分层的联合治疗方案的实施, 儿童ALL的长期存活率已提高至90%以上^[3], 但仍有约15%的患儿在接受治疗后出现复发且预后很差^[4]。因此, 耐药、复发是儿童ALL治疗失败和患儿死亡的重要原因, 探究其耐药、复发机制并优化治疗方案对于ALL患儿意义重大。

磷酸核糖焦磷酸合成酶 (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, PRPS) 是核苷酸合成途径中的限速酶, 可催化核糖-5-磷酸合成磷酸核糖焦磷酸 (phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP), 而PRPP是核苷酸合成的前体^[5]。PRPS1是PRPS发挥功能的最主要的亚型, 且在人体绝大部分组织中均有表达^[6]。生理状态下, PRPS1是一个由3个同源二聚体构成的六聚体, 呈高度对称的螺旋状结构^[7]; 其中, 每个同源二聚体都含有1个活性位点和2个高度保守的变构调节位点^[8]。迄今为止, 在PRPS1基因中发现的突变均为错义突变, 且PRPS1基因突变会导致其编码的蛋白结构发生改变, 进而影响PRPS1活性。相关研究^[9-11]显示, 升高或降低PRPS1的活性会导致个体的嘌呤、嘧啶核苷酸代谢紊乱, 进而诱发一系列疾病, 如进行性神经性腓骨肌萎缩症、X染色体连

锁非综合征性感音神经性耳聋2型、Arts综合征等。本课题组的前期研究^[12]显示, ALL患儿存在多位点的复发特异性PRPS1基因突变, 这也是儿童ALL研究领域中的首次发现。

6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine, 6-MP)、6-硫代鸟嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG) 是最常用的巯嘌呤类化学治疗 (化疗) 药物, 也是ALL联合化疗法的主要药物; 作为前体性药物, 二者均可通过嘌呤补救途径转化为细胞毒性的硫鸟嘌呤核苷酸掺入正在合成的DNA中, 引起DNA的错配修复, 最终导致DNA双链断裂及细胞凋亡^[13]。研究^[12]发现, 突变的PRPS1基因所编码的PRPS1突变体蛋白可通过解除ADP/GDP对PRPS1的负反馈抑制使PRPS1活性上升, 最终导致ALL细胞对6-MP、6-TG耐药; 其中, PRPS1 A190T突变是ALL中PRPS1的热点突变。目前, 临床上已新发现了诸多PRPS1突变位点, 但其对药物敏感性的影响尚不明确。

本研究通过体外细胞实验检测了ALL患者中存在的未验证功能变化的新突变PRPS1 I72F、R177S和V316L (相关信息见表1) 以及来自2个ALL细胞系 (KOPN72bi和RS4;11, 相关信息见表2) 中的新突变PRPS1 V208A、V289A^[14]对巯嘌呤类药物敏感性的影响, 同时对PRPS1 I72位点改变为不同氨基酸 (相关信息见表3) 后引起ALL细胞对巯嘌呤类化疗药产生不同的药物敏感性的可能机制做了初步探讨, 以期为临床上ALL的复发治疗提供一定的启示。

表1 ALL患者中未验证功能变化的PRPS1突变的信息

Tab 1 Information of PRPS1 mutations with unverified functional changes in patients with ALL

Sample ID	Gender	Immuno-phenotype	Allele change	Amino acid change	Relapse time/d	Time of relapse ^①	Subtype
CCCG2018	M	B-ALL	A>T	I72F	638	early relapse	BCR_ABL1
ALL208	M	B-ALL	A>C	R177S	341	early relapse	PAX5_MPRIP
ALL086	M	B-ALL	G>C	V316L	427	early relapse	ETV6_RUNX1

Note: ^①Early relapse means <36 months after initial diagnosis of ALL, and late relapse means ≥36 months after completion of primary treatment.

表2 已报道的ALL细胞中未验证功能变化的PRPS1突变的信息

Tab 2 Information of reported PRPS1 mutations with unverified functional changes in ALL cells

ALL cell line	Lineage	Gene	Mutation	Amino acid change
KOPN72bi	BCP-ALL	PRPS1	c.623T>C	V208A
RS4;11	BCP-ALL	PRPS1	c.866T>C	V289A

Note: BCP-ALL—B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.

表3 PRPS1 I72位点的随机突变

Tab3 Random mutations at PRPS1 I72 locus

Amino acid change	Allele change
I72M	C>G
I72V	A>G
I72F	A>T
I72L	A>C
I72N	T>A
I72S	T>G
I72T	T>C

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与质粒 人胚肾细胞系 HEK-293T (简称 293T)、人急性 B 淋巴细胞白血病细胞系 REH 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

慢病毒包装质粒 pMD2.G 和 psPAX2 均购自美国 Addgene 公司, 携带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标签的 pGV303 质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。重组质粒 pGV303 PRPS1 WT (携带野生型 PRPS1 基因编码区序列)、pGV303 PRPS1 A190T (携带具有 A190T 突变位点的 PRPS1 基因编码区序列) 由本实验室前期构建。重组质粒 pGV303 PRPS1 I72V、I72F、R177S、V316L、V208A、V289A、I72M、I72L、I72N、I72S、I72T (分别携带具有 I72V、I72F、R177S、V316L、V208A、V289A、I72M、I72L、I72N、I72S、I72T 突变位点的 PRPS1 基因编码区序列) 均由本实验室通过 KOD 高保真酶以 pGV303 PRPS1 WT 质粒为模板进行环状 PCR 构建而成 (所有质粒均进行了 DNA 测序, 以确保质粒构建正确)。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM 培养基、1×磷酸盐缓冲液 (1×PBS)、1×胰蛋白酶-EDTA 溶液 (1×TE)、青霉素-链霉素、RPMI 1640 培养基 (Gibco, 美国), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (苏州依科赛生物科技股份有限公司), IRDye[®] 800CW 荧光标记的山羊抗兔 IgG (LI-COR, 美国), Cell Titer-Glo 试剂盒 (Promega, 美国), 6-MP、6-TG (Sigma, 美国), 多功能成像系统 (Bio-rad, 美国), Annexin V/DAPI 凋亡检测试剂盒 (BD, 美国), jetPRIME[®] 转染试剂及缓冲液 (Polyplus-transfection, 法国), MoFlo XDP 超速流式细胞分选仪 (Beckman Coulter, 德国), 多功能酶标仪 (Biotek, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 293T 细胞 (贴壁细胞) 采用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基进行培养。REH 细胞 (悬浮细胞) 采用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基进行培养。所有细胞的培养条

件均为 37 °C、5% CO₂, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 瞬时转染及蛋白表达检测 根据 jetPRIME[®] 转染试剂说明书配制 jetPRIME[®] 转染混合液, 分别向其中添加重组质粒 (包括 pGV303 PRPS1 WT、A190T、I72V、I72F、R177S、V316L、V208A、V289A、I72M、I72L、I72N、I72S、I72T) 以及空载体 pGV303, 制备含上述 14 种质粒的转染混合液。将 293T 细胞以 1×10⁶ 个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后向其中分别添加上述 14 种转染混合液, 继续培养 24 h 后使用荧光显微镜检测各转染后细胞的 GFP 阳性率。待 GFP 阳性率 ≥70% 时, 使用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 293T 细胞中各外源性 PRPS1 的表达, 以转染 pGV303 空载体的细胞为阴性对照; 待外源性 PRPS1 均有良好表达后, 收集细胞并用于后续实验。

1.2.3 药物敏感性实验检测 经 6-MP 或 6-TG 处理的各 293T 细胞的 IC₅₀ 分别将 “1.2.2” 部分获得的能够表达 pGV303 蛋白以及 pGV303 PRPS1 WT、A190T、I72V、I72F、R177S、V316L、V208A、V289A、I72M、I72L、I72N、I72S 和 I72T 蛋白的 293T 细胞重悬为单细胞并计数, 以 4×10³ 个/孔接种于 96 孔板中。培养 24 h 后, 分别向其中添加待测药物 6-MP 或 6-TG, 6-MP 或 6-TG 的质量终浓度均依次为 0、0.02、0.05、0.14、0.41、1.23、3.70、11.11、33.33、100 μg/mL; 每个浓度、每种细胞均设置 3 个复孔。药物处理 72 h 后, 使用 Cell Titer-Glo 试剂盒测定其细胞活力, 使用多功能酶标仪读取相对发光强度 (relative light unit, RLU)。以各组中药物质量终浓度为 0 的细胞的 RLU 作为空白对照, 计算各浓度药物下的细胞存活率 (cell viability, CV) 及半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 实验重复 3 次。选取表达 pGV303 PRPS1 A190T 蛋白的 293T 细胞为对 6-MP 或 6-TG 耐药的阳性对照, 表达 pGV303 蛋白、pGV303 PRPS1 WT 和 I72V 蛋白的 293T 细胞为对 6-MP 或 6-TG 不耐药的阴性对照。当待检测细胞 IC₅₀ > 阴性对照 IC₅₀ 且 P < 0.05 时, 我们认为该细胞对该药物具有耐药性。

1.2.4 慢病毒包装、细胞感染及蛋白表达检测 将重组质粒 pGV303 PRPS1 WT、A190T、I72F、I72V

及空载体 pGV303 分别与包装慢病毒质粒 pMD2.G 和 psPAX2 混合后, 添加至配制好的 jetPRIME[®] 转染混合液中, 以制备含上述 5 种质粒的慢病毒转染混合液。将 293T 细胞以 4×10^6 个/皿接种于培养皿中, 培养 24 h 后向其中分别添加上述 5 种慢病毒转染混合液, 培养 48、72 h 后收集上清液并进行浓缩。

向 REH 细胞 (2×10^6 个) 中分别添加上述 5 种病毒原液 (100 μ L) 进行感染, 培养 24 h 后换液。待细胞生长至合适密度时, 用 MoFlo XDP 超速流式细胞分选仪分选出 GFP 阳性表达的细胞并继续进行培养, 使用 Western blotting 检测 REH 细胞中各外源性 PRPS1 的表达, 以转染 pGV303 空载体的细胞为阴性对照。待外源性 PRPS1 均有良好表达后, 取生长状态良好并处于对数生长期的 REH 细胞用于后续研究。

1.2.5 药物敏感性实验检测 经 6-MP 或 6-TG 处理的各 REH 细胞的 IC_{50} 分别将“1.2.4”部分获得的能够表达 pGV303 蛋白以及 pGV303 PRPS1 WT、A190T、I72F 和 I72V 蛋白的 REH 细胞重悬为单细胞并计数, 以 1.2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中进行培养, 而后分别向其中加入待测药物 6-MP 或 6-TG, 继续培养 72 h 后使用 Cell Titer-Glo 试剂盒测定其细胞活力, 并计算 CV 及 IC_{50} 。其中, 药物浓度、实验处理等均与“1.2.3”部分相一致。选取表达 pGV303 PRPS1 A190T 蛋白的 REH 细胞为对 6-MP 或 6-TG 耐药的阳性对照, 表达 pGV303 蛋白、pGV303 PRPS1 WT 和 I72V 蛋白的 REH 细胞为对 6-MP 或 6-TG 不耐药的阴性对照。细胞耐药性评判原则亦同前。

1.2.6 Annexin V/DAPI 双染法检测细胞凋亡 分别将“1.2.4”部分获得的 5 种 REH 细胞以 2×10^6 个/孔接种于 12 孔板中; 其中, 用 10 μ g/mL 的 6-MP 处理 48 h 的细胞为实验组, 不做处理的为对照组。经计数后收集各组细胞, 采用 Annexin V/DAPI 凋亡检测试剂盒对上述细胞进行染色, 并于流式细胞仪上检测其凋亡率。实验组和对照组均设置 3 个复孔。

1.2.7 Western blotting 检测 REH 细胞中 DNA 损伤和细胞凋亡相关蛋白的表达 采用 Western blotting 对“1.2.6”部分中实验组细胞的 DNA 损伤和细胞凋亡相关蛋白进行检测, 具体操作参照说明书进行。其中, 使用的一抗 (兔抗人抗体) 为 β -actin、细胞周期检验点激酶 2 (check point kinase 2, CHK2) 抗体、磷酸

化的 CHK2 (phosphorylated CHK2, pCHK2) 抗体、H2AX 抗体、S139 位点磷酸化的组蛋白 H2AX (phosphorylated H2AX-S139, γ -H2AX) 抗体、聚 (腺苷二磷酸核糖) 聚合酶剪切体 [cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cleaved PARP] 抗体、total PARP (总 PARP) 抗体, 工作浓度均为 1:1 000; 使用的二抗为 IRDye[®] 800CW 荧光标记的山羊抗兔 IgG, 工作浓度为 1:100 000。

1.2.8 蛋白质结构分析 采用蛋白质三维结构建模技术对 PRPS1 I72 位点、PRPS1 I72F 和 I72V 的氨基酸残基及空间构象进行分析, 具体步骤如下: ①使用 PDB 数据库查找 PRPS1 I72 位点的蛋白质结构图, 采用 PDB 数据库中编号为 2HCR (PDB code 2HCR) 的 PRPS1 蛋白结构图为本文 PRPS1 I72 位点的蛋白质结构图。②基于 PDB code 2HCR 的晶体结构, 使用三维成像技术模拟 PRPS1 I72F、PRPS1 I72V 的氨基酸残基及空间构象, 并使用 PyMOL 软件绘制相应氨基酸残基及空间构象图。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行各项数据分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

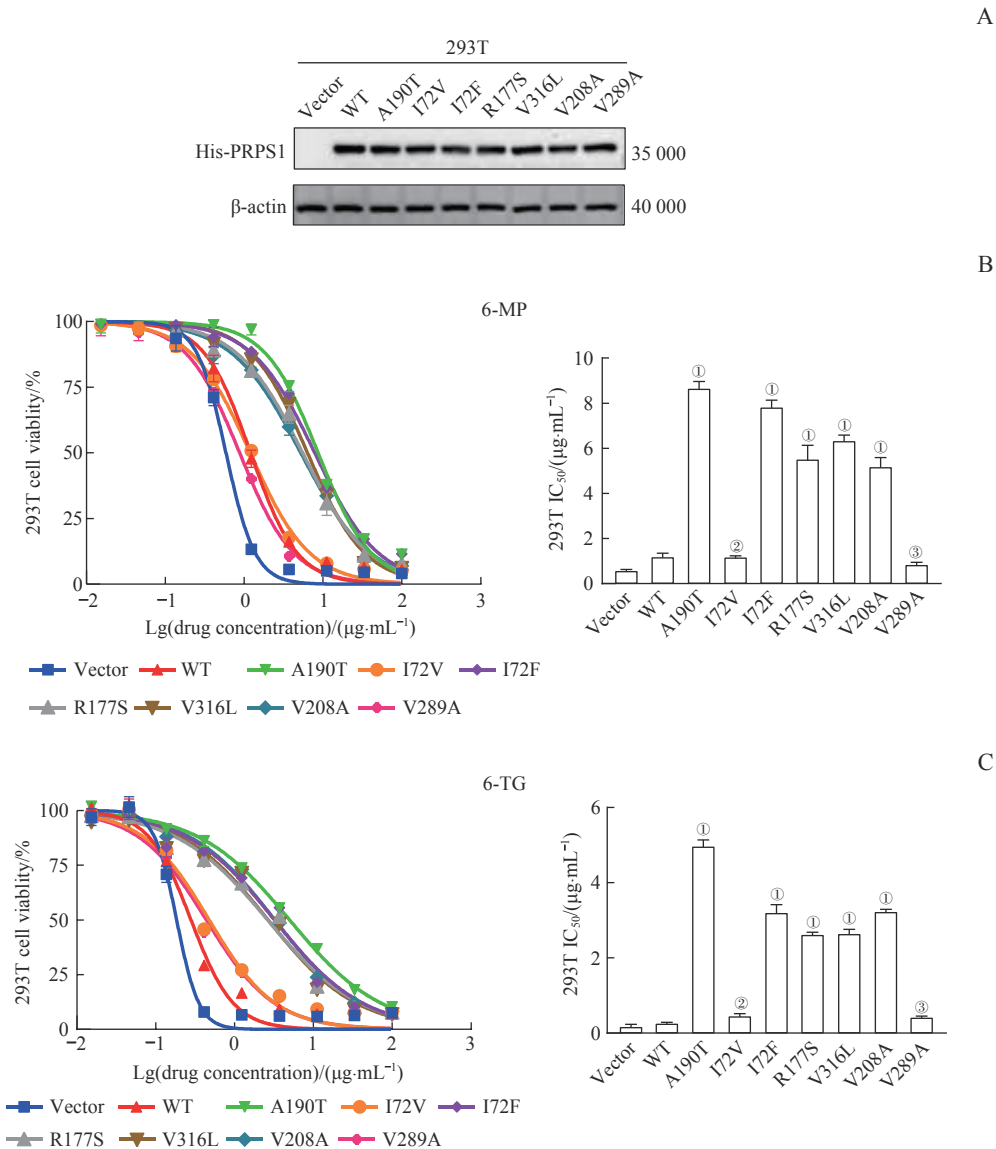
2.1 PRPS1 位点突变对 293T 细胞硫嘌呤类药物敏感性的影响

采用 Western blotting 检测 PRPS1 各突变体在 293T 细胞中的蛋白表达情况, 结果 (图 1A) 显示, 与转染 pGV303 空载体相比, 转染 pGV303 PRPS1 WT、A190T、I72V、I72F、R177S、V316L、V208A、V289A 重组质粒的 293T 细胞均可高表达各外源性 PRPS1, 且各细胞间的表达量相似; 继而表明, 各外源性 PRPS1 在 293T 细胞中均有良好且相一致的蛋白表达。

药物敏感性实验的结果 (图 1B、C) 显示, 转染 pGV303 PRPS1 I72F、R177S、V316L 和 V208A 重组质粒的 293T 细胞对 6-MP 或 6-TG 的 IC_{50} 远高于各药物的阴性对照 (即转染 Vector、pGV303 PRPS1 WT、

I72V 重组质粒的 293T 细胞) (均 $P=0.000$), 而转染 pGV303 *PRPS1* V289A 重组质粒的 293T 细胞对 6-MP

或 6-TG 的 IC_{50} 与各药物的阴性对照之间的差异均无统计学意义。



Note: A. Protein expression of PRPS1 mutants in 293T cells by Western blotting. His-PRPS1 represents the PRPS1 fusion protein with His label, that is, the exogenous PRPS1 protein. B. Detection of the drug sensitivities of *PRPS1* mutations to 6-MP in 293T cells by drug sensitivity experiment. ^① $P=0.000$, ^② $P=1.000$, ^③ $P=0.632$, compared with 293T cells transfected with pGV303 *PRPS1* WT plasmid. C. Detection of the drug sensitivities of *PRPS1* mutations to 6-TG in 293T cells by drug sensitivity experiment. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.135$, ^③ $P=0.291$, compared with 293T cells transfected with pGV303 *PRPS1* WT plasmid.

图1 *PRPS1* 位点突变对 293T 细胞巯嘌呤类药物敏感性的影响

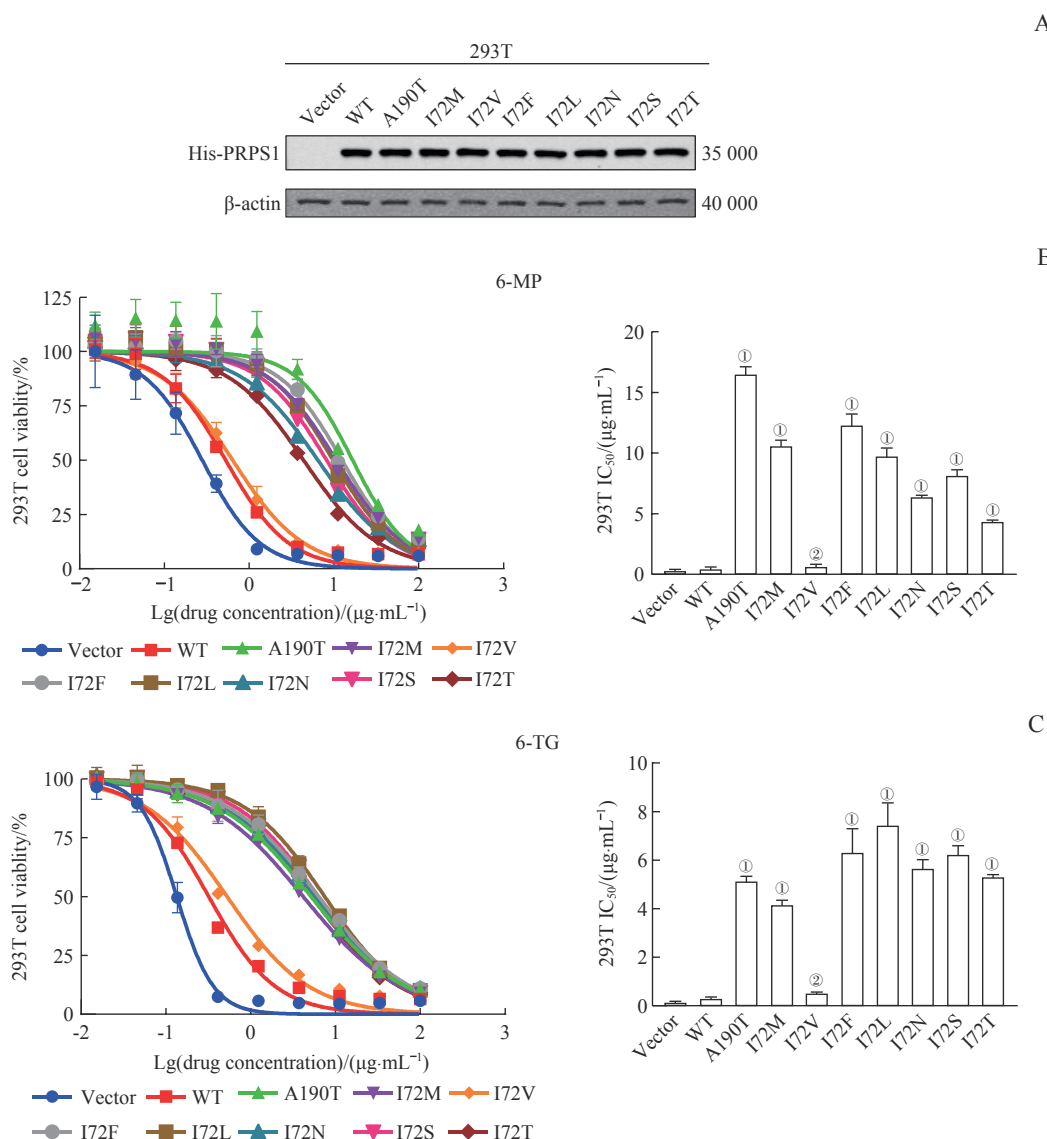
Fig 1 Effect of mutations at *PRPS1* locus on the sensitivity of thiopurine chemotherapy drugs in 293T cells

2.2 *PRPS1* I72 位点突变对 293T 细胞巯嘌呤类药物敏感性的影响

采用 Western blotting 检测外源性 *PRPS1* I72 位点不同突变体在 293T 细胞中的蛋白表达情况, 结果 (图 2A) 显示, 与转染 pGV303 空载体相比, 转染 pGV303 *PRPS1* WT、A190T、I72M、I72V、I72F、I72L、I72N、I72S、I72T 重组质粒的 293T 细胞均高表达 PRPS1 不同突变体, 且各细胞间的表达量相似;

继而证明, 外源性 *PRPS1* I72 位点不同突变体在 293T 细胞中均有良好且相一致的蛋白表达。

药物敏感性实验的结果 (图 2B、C) 显示, 6-MP 或 6-TG 对转染 pGV303 *PRPS1* A190T、I72M、I72F、I72L、I72N、I72S、I72T 重组质粒的 293T 细胞的 IC_{50} 远高于各药物的阴性对照 (即转染 Vector、pGV303 *PRPS1* WT、I72V 重组质粒的 293T 细胞) (均 $P=0.000$)。



Note: A. Protein expression of PRPS1 mutants in 293T cells by Western blotting. His-PRPS1 represents the PRPS1 fusion protein with His label, that is, the exogenous PRPS1 protein. B. Detection of the drug sensitivities of PRPS1 I72 mutations to 6-MP in 293T cells by drug sensitivity experiment. ^①*P*=0.000, ^②*P*=1.000, compared with 293T cells transfected with pGV303 PRPS1 WT plasmid. C. Detection of the drug sensitivities of PRPS1 I72 mutations to 6-TG in 293T cells by drug sensitivity experiment. ^①*P*=0.000, ^②*P*=0.995, compared with 293T cells transfected with pGV303 PRPS1 WT plasmid.

图2 PRPS1 I72 位点突变对 293T 细胞巯嘌呤类药物敏感性的影响

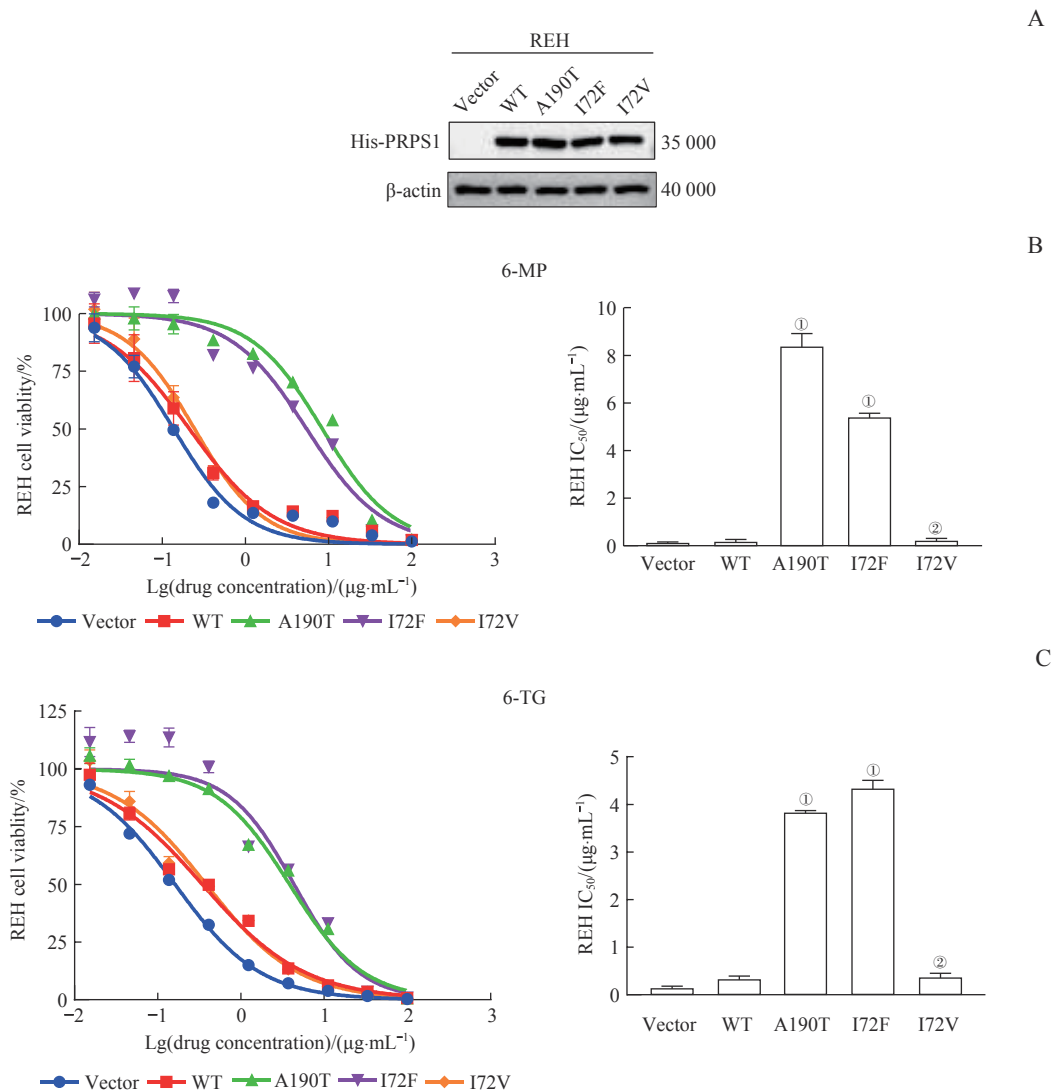
Fig 2 Effect of mutations at PRPS1 I72 locus on the sensitivity of thiopurine chemotherapy drugs in 293T cells

2.3 PRPS1 I72 位点突变对 REH 细胞巯嘌呤类药物敏感性的影响

采用 Western blotting 检测各 REH 稳定细胞系中 PRPS1 不同突变体的蛋白表达情况, 结果 (图 3A) 显示, 与转染 pGV303 空载体相比, 稳定转染 pGV303 PRPS1 WT、A190T、I72F、I72V 重组质粒的 REH 细胞均高表达 PRPS1, 且各细胞间的表达量相似; 继而证明, REH 稳定细胞系构建成功。

药物敏感性实验的结果 (图 3B、C) 显示, 6-MP 或 6-TG 对稳定转染 pGV303 PRPS1 A190T、I72F 重组质粒的 REH 细胞的 IC₅₀ 远高于各药物的阴性对照 (即稳定转染 Vector、pGV303 PRPS1 WT、I72V 重组质粒的 REH 细胞) (均 *P*=0.000)。

而后, 我们采用 10 μg/mL 6-MP 处理实验组细胞, 48 h 后经 Annexin V/DAPI 双染并通过流式细胞术检测细胞的凋亡情况, 结果 (图 4A、B) 显示, 稳定转染 pGV303 PRPS1 A190T、I72F 重组质粒的 REH



Note: A. Protein expression of PRPS1 mutants in REH cells by Western blotting. His-PRPS1 represents the PRPS1 fusion protein with His label, that is, the exogenous PRPS1 protein. B. Detection of the drug sensitivities of *PRPS1* I72 mutations to 6-MP in REH cells by drug sensitivity experiment. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.998$, compared with REH cells transfected with pGV303 *PRPS1* WT plasmid. C. Detection of the drug sensitivities of *PRPS1* I72 mutations to 6-TG in REH cells by drug sensitivity experiment. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.903$, compared with REH cells transfected with pGV303 *PRPS1* WT plasmid.

图3 *PRPS1* I72位点突变对REH细胞巯嘌呤类药物敏感性的影响

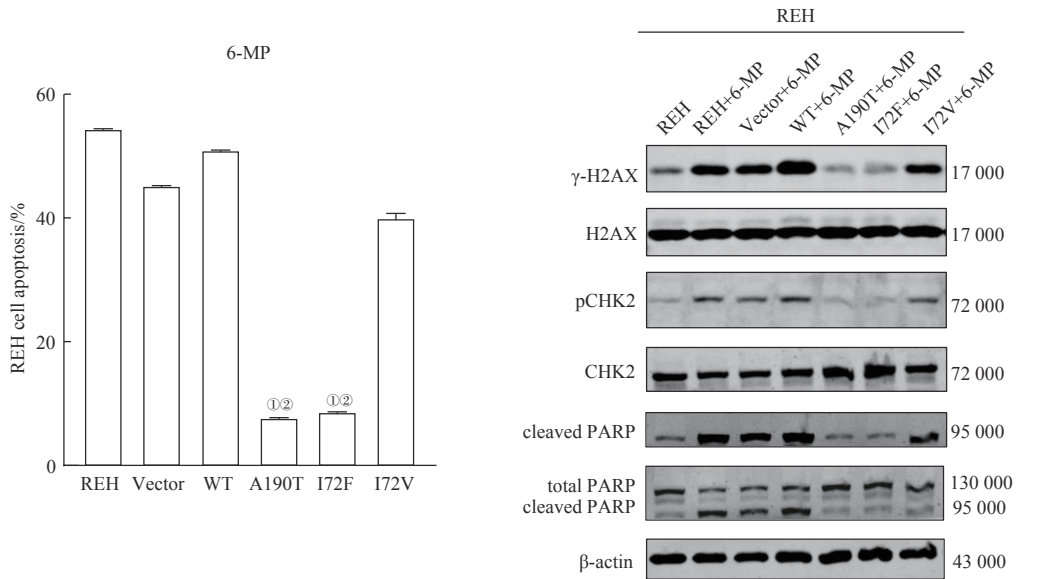
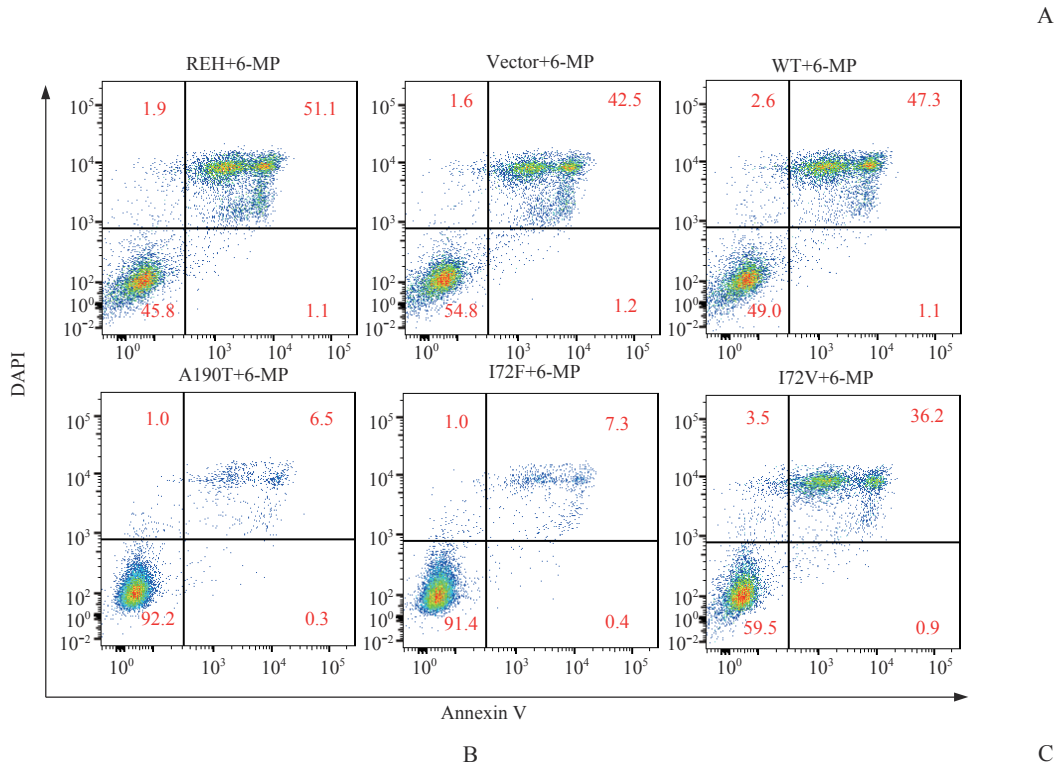
Fig 3 Effect of mutations at *PRPS1* I72 locus on the sensitivity of thiopurine chemotherapy drugs in REH cells

细胞的凋亡率明显低于阴性对照（稳定转染 Vector、pGV303 *PRPS1* WT、I72V 重组质粒的 REH 细胞）（均 $P=0.000$ ）。

采用 Western blotting 检测实验组细胞中 DNA 损伤、细胞凋亡相关蛋白的表达情况，结果（图 4C）显示与转染 Vector、pGV303 *PRPS1* WT、I72V 重组质粒的 REH 细胞相比，经 6-MP 处理的稳定转染 pGV303 *PRPS1* A190T、I72F 重组质粒的 REH 细胞中的 γ -H2AX、pCHK2、cleaved PARP 的表达水平有明显下调。继而提示，*PRPS1* I72F 突变可以更加有效地减少由 6-MP 诱导的细胞凋亡和 DNA 损伤反应。

2.4 *PRPS1* I72位点突变对蛋白质结构的影响

通过对蛋白质结构进行分析，我们发现 *PRPS1* 第 72 位氨基酸 I 位于 *PRPS1* 内部的 α -螺旋上（图 5A）。当 I 突变成 V 时，该突变对结构（即氨基酸的性质和侧链大小）均无明显影响（图 5B）；当 I 突变成 F 后，由于 F 的侧链是一个较大的苯环，其与邻近的 β -折叠上的第 42 位氨基酸 V 距离较近，可能会产生一定的空间位阻，从而使得 β -折叠的相对位置发生改变，进而导致 *PRPS1* 结构发生一定的形变（图 5C）。



Note: A/B. Flow scatter plots (A) and statistical analysis (B) of the detection of apoptosis rates for each REH cell line by Annexin V/DAPI double staining. ^① $P=0.000$, compared with REH cells transfected with pGV303 PRPS1 WT plasmid; ^② $P=0.000$, compared with REH cells transfected with pGV303 PRPS1 I72V plasmid. C. Detection of the protein expression of DNA damage biomarkers and apoptosis-related proteins by Western blotting.

图 4 PRPS1 I72 位点突变对经 6-MP 诱导的 REH 细胞的 DNA 损伤和细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of mutations at PRPS1 I72 locus on the apoptosis and DNA damage in REH cells induced by 6-MP

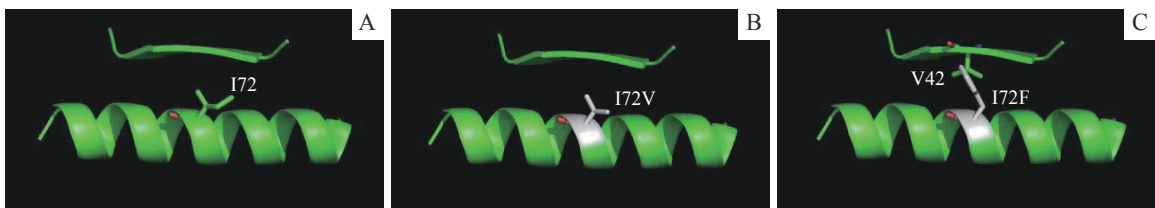


图 5 PRPS1 I72 位点 (A)、PRPS1 I72V (B) 和 PRPS1 I72F (C) 的蛋白质结构示意图

Fig 5 Schematic diagrams of protein structures of PRPS1 I72 locus (A), PRPS1 I72V (B) and PRPS1 I72F (C)

3 讨论

有研究显示,联合化疗是临床上治疗儿童ALL的主要方式^[15-16],而巯嘌呤类化疗药物(6-MP、6-TG)是其联合化疗的主要药物之一^[17-20]。目前,耐药、复发是儿童ALL治疗失败的主要原因。随着二代测序技术的广泛运用,ALL的分子分型及与ALL耐药、复发相关的基因突变图谱得到了进一步的补充^[21],从而为寻找该类基因变异奠定了重要基础。

PRPS1作为核苷酸合成途径中的限速酶,在ALL耐药、复发中发挥着重要作用。本研究首先在293T细胞中过表达ALL临床样本及2个ALL细胞系中已发现的多个未知功能的PRPS1突变体,并行巯嘌呤类药物敏感性检测,结果发现表达PRPS1 I72F、R177S、V316L、V208A的突变可使293T细胞对6-MP或6-TG产生耐药,而突变体I72V则不会影响细胞的药物敏感性。因此我们推测,PRPS1 I72位点突变成不同氨基酸后,其对巯嘌呤类药物敏感性的影响可能不尽相同。为此,我们构建了PRPS1 I72的不同突变体(包括I72M、I72L、I72N、I72S、I72T),在293T细胞中就I72不同突变体对巯嘌呤类药物敏感性的影响进行检测,结果发现表达PRPS1 I72M、I72F、I72L、I72N、I72S、I72T的突变可使293T细胞对6-MP或6-TG产生耐药。后续,通过构建REH稳定表达PRPS1各突变体的细胞系行巯嘌呤类药物敏感性检测,并通过Annexin V/DAPI双染实验及细胞凋亡、DNA损伤蛋白检测明确了PRPS1 I72位点的不同突变对该类药物敏感性的影响亦不同,与293T细胞获得的结果一致。同时,我们尝试从蛋白质结构变化的角度就I72位点不同突变对巯嘌呤敏感性影响不同的现象做出解释。

本研究通过在293T细胞中瞬时表达和REH细胞稳定表达PRPS1各突变体进行巯嘌呤类药物敏感性检测,发现PRPS1 I72F、R177S、V316L、V208A属于耐药突变,而I72V、V289A对巯嘌呤类药物敏感性无明显影响,继而证明PRPS1 I72位点不同突变对功能影响存在差别。从PRPS1 I72位点的三维蛋白质结构解析图上来看,PRPS1 I72位点

的I突变成F可能对PRPS1蛋白结构有潜在影响,而突变成M时并没有明确影响(该结果在正文中未显示)。且PRPS1 I72位点既不在PRPS1底物结合的口袋和变构位点附近,也不在二聚体界面上;而在理论上,涉及酶活性位点、变构调节位点的突变才能够改变酶的活性。另外,本文所使用的通过PDB数据库预测产生的蛋白质三维结构模型可能与真正结构存在一定出入,因此要想进一步明确PRPS1 I72位点突变产生的耐药机制,尚需要突变体的蛋白结构才能确定。

综上,本研究表明PRPS1的不同位点突变可使细胞对巯嘌呤类化疗药物敏感性产生不同的影响,当我们在临床上发现ALL患儿存在PRPS1 I72F、R177S、V316L、V208A、I72M、I72L、I72N、I72S和I72T突变时,应警惕患儿出现的针对巯嘌呤类化疗药物的耐药性。在此类患儿的治疗中,我们应减少巯嘌呤类化疗药物的使用,而采用其他化疗药物进行个体化治疗,进一步探索针对此类患儿的最佳治疗方案。同时,我们的研究还证实了293T细胞可作为检测PRPS1突变对巯嘌呤类化疗药耐药的快速研究模型,继而提示可通过293T细胞对PRPS1突变是否会引起巯嘌呤类药物耐受进行快速评估,从而为后续临床用药提供指导。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

李慧和沈树红参与了实验设计,崔芷嫣开展了实验操作,崔芷嫣和陈尧参与了数据分析和整理,李慧、崔芷嫣、陈尧、陶悦参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by LI Hui and SHEN Shuhong. The experiments were carried out by CUI Zhiyan. The data was collected and analyzed by CUI Zhiyan and CHEN Yao. The manuscript was drafted and revised by LI Hui, CUI Zhiyan, CHEN Yao and TAO Yue. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-03-05
- Accepted: 2023-05-15
- Published online: 2023-08-28

参·考·文·献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] BROWN P, INABA H, ANNESLEY C, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia, version 2. 2020. NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2020, 18(1): 81-112.
- [3] PUI C H, YANG J J, HUNGER S P, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: progress through collaboration[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 2938-2948.
- [4] HUNGER S P, RAETZ E A. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the pediatric population[J]. *Blood*, 2020, 136(16): 1803-1812.
- [5] MITTAL R, PATEL K, MITTAL J, et al. Association of PRPS1 mutations with disease phenotypes[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 127013.
- [6] TAIRA M, IIZASA T, YAMADA K, et al. Tissue-differential expression of two distinct genes for phosphoribosyl pyrophosphate synthetase and existence of the testis-specific transcript[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1007(2): 203-208.
- [7] LI S, LU Y C, PENG B Z, et al. Crystal structure of human phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 reveals a novel allosteric site[J]. *Biochem J*, 2007, 401(1): 39-47.
- [8] AL-MAAWALI A, DUPUIS L, BLASER S, et al. Prenatal growth restriction, retinal dystrophy, diabetes insipidus and white matter disease: expanding the spectrum of PRPS1-related disorders[J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(3): 310-316.
- [9] DE BROUWER A P, VAN BOKHOVEN H, NABUURS S B, et al. PRPS1 mutations: four distinct syndromes and potential treatment[J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(4): 506-518.
- [10] DE BROUWER A P, WILLIAMS K L, DULEY J A, et al. Arts syndrome is caused by loss-of-function mutations in PRPS1[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(3): 507-518.
- [11] KIM H J, SOHN K M, SHY M E, et al. Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (CMTX5)[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(3): 552-558.
- [12] LI B S, LI H, BAI Y, et al. Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL[J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 563-571.
- [13] PINKEL D, HERNANDEZ K, BORELLA L, et al. Drug dosage and remission duration in childhood lymphocytic leukemia[J]. *Cancer*, 1971, 27(2): 247-256.
- [14] SOMAZU S, TANAKA Y, TAMAI M, et al. NUDT15 polymorphism and NT5C2 and PRPS1 mutations influence thiopurine sensitivity in acute lymphoblastic leukaemia cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(22): 10521-10533.
- [15] PUI C H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Formos Med Assoc*, 2010, 109(11): 777-787.
- [16] BASSAN R, HOELZER D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(5): 532-543.
- [17] RELLING M V, HANCOCK M L, BOYETT J M, et al. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 1999, 93(9): 2817-2823.
- [18] KARRAN P, ATTARD N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(1): 24-36.
- [19] BHATIA S, LANDIER W, SHANGGUAN M, et al. Nonadherence to oral mercaptopurine and risk of relapse in Hispanic and non-Hispanic white children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's oncology group[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(17): 2094-2101.
- [20] INABA H, MULLIGHAN C G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Haematologica*, 2020, 105(11): 2524-2539.
- [21] LI B S, BRADY S W, MA X T, et al. Therapy-induced mutations drive the genomic landscape of relapsed acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2020, 135(1): 41-55.

[本文编辑] 邢宇洋

