

# TRIM28 高表达在非 M3 型急性髓性白血病中的预后意义

龚思琪<sup>1</sup>, 李丛<sup>1</sup>, 范蒙蒙<sup>1</sup>, 王会平<sup>1</sup>, 张婉秋<sup>1</sup>, 梁雪<sup>1</sup>, 陶千山<sup>1</sup>, 洪强<sup>2</sup>, 翟志敏<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学附属第二医院血液科, 合肥 230601; <sup>2</sup> 安徽医科大学基础医学院, 合肥, 230032)

**摘要** 目的 本研究旨在阐明 TRIM28 在非 M3 型急性髓性白血病 (AML) 中的表达及其与临床指标和预后的相关性, 并利用小干扰 RNA 技术进一步探讨 TRIM28 表达水平对 AML 细胞增殖和凋亡的影响。方法 通过 R 语言分析 GSE34577 数据集对比正常人及非 M3 型 AML 患者 TRIM28 表达。并收集非 M3 型 AML 的患者临床样本, 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 TRIM28 在非 M3 型 AML 患者中的表达水平, 并分析其与临床指标的相关性、疗效与预后。利用小干扰技术以干涉人源 AML 细胞 (HL60 细胞系) 的 TRIM28 水平, 并用 CCK-8 和流式细胞术分别检测细胞增殖和凋亡情况。结果 TRIM28 在临床样本和 GSE34577 数据集的非 M3 型 AML 样本中均上调 ( $P < 0.0001$ ), 初诊 (ND) 组和复发难治 (RR) 组的 TRIM28 表达高于缺铁性贫血 (IDA) 组 ( $P < 0.01$ ), 不同法美英分型系统 (FAB) 亚型之间无显著性差异, 遗传学预后分层为中等的不良的非 M3 型 AML 患者 TRIM28 表达高于预后良好组, 且 TRIM28 表达与 NPM1 合并 FLT3-ITD 突变有关; 与年龄、骨髓原始细胞、外周血原始细胞、白细胞计数呈正相关; 与血红蛋白负相关。此外, 干扰 TRIM28 能显著抑制 HL60 细胞增殖, 促进细胞凋亡。结论 TRIM28 在非 M3 型 AML 中高表达并与预后相关, 并在 AML 细胞的增殖和凋亡中起关键作用, 提示 TRIM28 可能成为非 M3 型 AML 新的治疗靶点。

**关键词** 非 M3 型急性髓性白血病; TRIM28; 增殖; 细胞凋亡; 复发; 预后

**中图分类号** R 733.71

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2026)02-0301-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.016

急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种髓系来源的造血干细胞的恶性克隆性疾病, 其特征是骨髓内异常细胞的快速增殖并同时伴感染、贫血和出血等症状<sup>[1]</sup>。全球每年有 8 万多人死于 AML, 由造血功能异常引起的一系列血液变化是其主要死亡原因<sup>[2]</sup>。近年来治疗手段不断进步, M3 型 AML 在临床已有较好治疗方案且早期完全缓解 (complete response, CR) 率可达 90% 以上, 但是非 M3 型患者预后仍不理想, 大多数患者依然面临着复发、难治, 最终病情进展恶化的问题, 新型有效的治疗靶点有待进一步探索。

三基序蛋白 (tripartite motif-containing protein, TRIM) 家族是一类进化上保守的蛋白质<sup>[3]</sup>, 在肿瘤发生的早期阶段, 代谢重编程、肿瘤微环境变化以及活性氧失衡等一系列因素可促进细胞发生恶性

转化<sup>[4]</sup>。TRIM28, 又称 KRAB 相关蛋白 1 (KRAB-associated protein 1, KAP1)<sup>[5]</sup>, 是 TRIM 家族的重要成员。TRIM28 在胚胎干细胞及多种肿瘤中表达升高, 可调节细胞分化及凋亡在内的多种细胞功能<sup>[6]</sup>, 被认为是白血病的有效治疗靶点<sup>[4]</sup>。该研究旨在检测 TRIM28 在非 M3 型 AML 患者中的表达水平, 并探讨其在非 M3 型 AML 中的预后意义。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 纳入 2020 年 4 月至 2025 年 6 月在安徽医科大学第二附属医院诊断为非 M3 型 AML 的患者 75 例, 4 例治疗无缓解 (non-remission, NR) 患者未纳入表 1, 无先天性/获得性免疫缺陷。选取 20 例骨髓检查无异常的缺铁性贫血 (iron deficiency anemia, IDA) 患者作为正常对照骨髓标本。根据 WHO (2016) MICM 分类诊断的患者分为初诊 (new diagnosis, ND)、CR 和复发难治 (relapsed refractory, RR)。这些患者的详细临床资料见表 1。本研究经安徽医科大学第二附属医院医学研究伦理委员会 (IRB) 批准 (SL-YX【YS】2023-SZR 039)。所有参与研究的患者均签署了知情同意书。

**1.2 主要试剂与仪器** 1640 RPMI 培养基 (上海

2025-11-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82370225); 安徽省高校自然科学基金项目 (编号: 2023AH053176); 安徽省转化医学研究院科研基金项目 (编号: 2023zhyy-B08)

作者简介: 龚思琪, 女, 硕士研究生;

翟志敏, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: zzzm889@163.com

表 1 非M3型 AML 患者特征  
Tab. 1 Characteristics of non-M3 AML patients

| State of disease at sample draw | IDA          | ND           | CR           | RR           |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Number of patients ( <i>n</i> ) | 20           | 27           | 15           | 29           |
| Male <i>n</i> (%)               | 8 (40.00)    | 12 (44.44)   | 6 (40.00)    | 14 (48.28)   |
| Female <i>n</i> (%)             | 12 (60.00)   | 15 (55.56)   | 9 (60.00)    | 15 (51.72)   |
| Average age [Mean (Range)]      | 46.2 (35–68) | 59.1 (20–85) | 52.2 (16–72) | 51.2 (16–82) |

源培生物科技股份有限公司,货号:L210KJ),细胞总 RNA 快提试剂盒(广州信天翁生物科技有限公司,货号:400-100),ToloScript All-in-one RT Easy-Mix for qPCR、2 × Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) (上海吐露港生物科技有限公司,货号:22107、22204),BCA 蛋白定量试剂盒、CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0010S、C0041),ECL 化学发光剂(美国 Thermofisher 公司,货号:34577),AnnexinV-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,货号:BB-41033)。TRIM28 和 GAPDH 的 PCR 引物(南京擎科生物科技有限公司),GAPDH Rabbit pAb、TRIM28 Rabbit pAb(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:AC001、A2245),山羊抗兔 IgG HRP(合肥麦客生物科技有限公司,货号:BL101A)。实时荧光定量 PCR(上海罗氏诊断产品有限公司,型号:Light Cycler480),凝胶成像仪(广州博鹭腾生物科技有限公司,型号:GelView 6000 Pro II),流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号:Cyto Flex)

**1.3 骨髓单个核细胞提取** 用肝素抗凝管采集血液样本,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上层血浆。将剩余沉淀与等体积无菌 PBS 混匀,转入 15 mL 离心管。将稀释后的血样小心加入至淋巴分离液上层,2 000 r/min 离心 30 min(升降速均设为 1),离心后分为 4 层。取第 2 层淋巴细胞白环层至含生理盐水的离心管中,1 500 r/min 离心 10 min,获得单核细胞沉淀。

**1.4 实时定量 PCR** 收集上述单个核细胞,用细胞总 RNA 快提试剂盒提取总 RNA,用分光光度计测定浓度,用 DEPC 水校准。将该 RNA 作为反转录模板,得到的 cDNA 进行 qPCR 扩增,以 GAPDH 作为内参检测 TRIM28 mRNA 的相对表达水平。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算 TRIM28 相对表达量,基因引物序列如表 2 所示。

**1.5 蛋白质免疫印迹法** 取生长状态好的细胞收集沉淀,加入适量细胞裂解液(RIPA:PMSF=100:1)提取蛋白,并进行 BCA 蛋白定量分析,提取的蛋白

进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后进行转膜,用脱脂牛奶封闭 2 h;封闭结束,洗膜后进行抗体孵育。一抗如表 3 所示。暴露于 ECL 后,使用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

表 2 用于 qPCR 引物的引物  
Tab. 2 Primers used for qPCR

| Name           | Sequences (5'-3')     |
|----------------|-----------------------|
| GAPDH-Forward  | AGCAAGAGCACAAAGAGGAAG |
| GAPDH-Reverse  | GGTTGAGCACAGGCTACTTT  |
| TRIM28-Forward | GCGGAAATGTGACGCTGTA   |
| TRIM28-Reverse | CCTGGGCAAACCTCTGT     |

表 3 Western blot 所用一抗  
Tab. 3 Primary antibodies used for Western blot

| Antibody               | Company  | Catalog number |
|------------------------|----------|----------------|
| GAPDH Rabbit pAb       | ABclonal | AC001          |
| KAP1/TRIM28 Rabbit pAb | ABclonal | A2245          |

**1.6 细胞复苏和培养** 将冻存的 HL-60 细胞在 37 °C 水浴锅中解冻然后在室温下用 PBS 缓冲细胞,在 800 r/min 下离心 5 min 以去除冻存液,然后在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中重悬,转移到 T25 培养瓶中,培养温度为 37 °C,CO<sub>2</sub> 浓度为 5%。

**1.7 si-RNA 转染** 取生长状态良好的细胞,以每孔 2×10<sup>5</sup> 个细胞/400 μL 的密度接种于 24 孔板中。用培养基稀释 4 种不同序列的病毒和转染剂 lip3000。将稀释后的病毒加入稀释后的 lip3000 中,得到最终的转染液,室温孵育 20 min。每孔加入转染液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在 24~48 h 通过 qPCR 验证转染效率,在 48~72 h 通过蛋白水平验证转染效率。

**1.8 CCK-8 实验** 每组细胞在 1 500 r/min 下离心 5 min,获得细胞沉淀,将含 10% FBS 的完全培养基重悬细胞。按照每孔 6 000 个/100 μL 的体系接种于 96 孔板中。每组细胞重复 5 个复孔,分别于 0、24、48、72 h 加入 10 μL CCK-8 溶液,然后在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1~2 h。在 450 nm 波长处测量每组每孔细胞的吸光度值 A,记录数据并计数。

**1.9 凋亡检测** 采集细胞并计数。每组取  $10^4$  个细胞置于流式管中,  $1\ 500\ \text{r/min}$  离心  $5\ \text{min}$ , 丢弃上清液, 在 PBS 中洗涤  $1\sim 2$  次。将细胞重悬于  $100\ \mu\text{L}$  Annexin V 结合液中, 然后加入  $1\ \mu\text{L}$  Annexin V-APC 染料溶液, 轻轻混合,  $4\ ^\circ\text{C}$  孵育  $15\ \text{min}$ , 加入  $1\ \mu\text{L}$  PI 染料溶液, 轻轻混合,  $4\ ^\circ\text{C}$  孵育  $5\ \text{min}$ 。最后, 用流式细胞仪测定。

**1.10 GEO 数据库和 GEPIA2 数据库** 通过 R 语言 4.4.1 GEO query 包获取 GSE34577 数据集, 并对原始数据进行背景校正和归一化, 从标准化后的表达矩阵中提取 *TRIM28* 基因的表达数据, 筛选出 *TRIM28* 基因在正常人样本和非 M3 型 AML 患者中的表达数据并导出数据, 将此数据导入 Graphpad Prism9.5 软件中进行统计分析。利用在线网站 GEPIA2 数据库, 选择生存分析, 输入 *TRIM28* 基因名并选择 AML, 进行在线分析。

**1.11 统计学处理** 使用 Graphpad Prism9.5 和 Origin 2018 对得到的实验数据进行统计分析和制图。在统计分析之前, 对每组数据先进行正态性分析。对于符合正态性分布的两组数据之间的比较, 使用 *t* 检验; 对于不符合正态分布的, 则使用非参数秩和检验。多组间数据比较, 如果满足正态分布条件, 则采用 One-way ANOVA 进行分析, 并在发现统计学差异时采用 Tamhane's T2 test 法进行两两组间的比较; 若不符合正态分布, 则使用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 并在有统计学差异时进一步采用 Mann-Whitney *U* 检验进行两两组间的比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。使用线性回归分析统计 *TRIM28* 水平与临床指标的相关性, 当  $P<0.05$  时, 表示变量间的线性关系具有统计学意义。Pearson 相关系数(*r*)的绝对值越大, 说明相关性越强, 方向由其正负号决定。

## 2 结果

**2.1 *TRIM28* 在非 M3 型 AML 患者中上调** 为了探讨 *TRIM28* 在非 M3 型 AML 中的作用, 本研究利用 GEO 数据库 GSE34577 数据集分析 *TRIM28* 的表达, 结果显示 *TRIM28* 在非 M3 型 AML 患者中的表达水平明显高于对照组 ( $P<0.000\ 1$ ) (图 1A)。采用 qPCR 检测 *TRIM28* 在临床非 M3 型 AML 患者骨髓细胞中的表达。由于健康对照的骨髓标本难以获得, 本研究选取 IDA 患者的骨髓标本作为对照。结果显示, *TRIM28* 在非 M3 型 AML 患者中的表达高于 IDA

组, 且有统计学差异 ( $P<0.000\ 1$ ) (图 1B)。此外, *TRIM28* 在 ND 组和 RR 组中的表达高于 IDA 组 ( $q=3.791/3.971, P<0.05$ ) (图 1C), 但 *TRIM28* 的表达高低与 AML 类型之间的差异无统计学差异 (图 1D)。以 2025 年 NCCN 治疗指南为参考依据, 按照染色体核型与基因突变结果进行预后分层, 对患者的 *TRIM28* 表达与预后分层进行相关性分析, 结果表明 *TRIM28* 在遗传学风险预后分层为中等和不良组的患者中的表达高于预后良好组的患者 ( $t=2.790/2.318, P<0.05$ ) (图 1E)。对患者的基因突变进行进一步分析, 结果如表 4 所示, *TRIM28* 的表达在 *NPM1* 突变患者中升高, 组间差异有统计学意义 ( $Z=-2.003, P=0.044\ 9$ ), 但是根据指南表示, *NPM1* 单突变是预后良好因素, *NPM1* 突变合并 *FLT3-ITD* 突变患者预后较差, 因此将 *NPM1* 突变组的患者分为 *NPM1* 单突变组和 *NPM1* 合并 *FLT3-ITD* 突变组, 统计学分析结果表明 *TRIM28* 的表达在 *NPM1* 合并 *FLT3-ITD* 突变患者中升高, 但 *TRIM28* 的表达高低与 *NPM1* 单突变无明显相关性 (表 5)。

**2.2 非 M3 型 AML 患者 *TRIM28* 水平与临床指标的相关性分析** 在验证 *TRIM28* 在非 M3 型 AML 患者中的表达后, 分析 *TRIM28* 表达水平与各项临床指标包括初诊患者年龄、骨髓原始细胞 (bone marrow blast, BM-blast) 百分比、外周血原始细胞 (peripheral blood blast, PB-blast) 百分比、白细胞计数 (white blood cell count, WBC count)、血红蛋白计数 (hemoglobin count, HB count)、血小板计数 (platelet count, PLT count)、白蛋白 (albumin, ALB)、铁蛋白 (ferritin, FE) 以及乳酸脱氢酶水平 (lactate dehydrogenase, LDH) 之间的相关性。结果显示, *TRIM28* 表达水平与年龄 (图 2A,  $r=0.504\ 7, P=0.023\ 2$ )、骨髓原始细胞比例 (图 2B,  $r=0.548\ 2, P=0.012\ 3$ )、外周血原始细胞比例 (图 2C,  $r=0.637\ 2, P=0.001\ 4$ )、白细胞计数 (图 2D,  $r=0.536\ 4, P=0.026\ 5$ ) 呈正相关; 与血红蛋白 (图 2E,  $r=-0.462\ 8, P=0.030\ 1$ ) 呈负相关, 与血小板 (图 2F)、乳酸脱氢酶 (图 2G)、铁蛋白 (图 2H)、白蛋白 (图 2I) 无相关性 (均  $P>0.05$ )。

**2.3 *TRIM28* 水平与非 M3 型 AML 患者的治疗反应率和预后相关** 此外, 收集首次诱导化疗 CR 患者和治疗无反应 (non-response, NR) 的患者的临床数据, 并分析首次诱导化疗的治疗效果与 *TRIM28* 的相关性。结果显示, 无反应组患者的 *TRIM28* 表



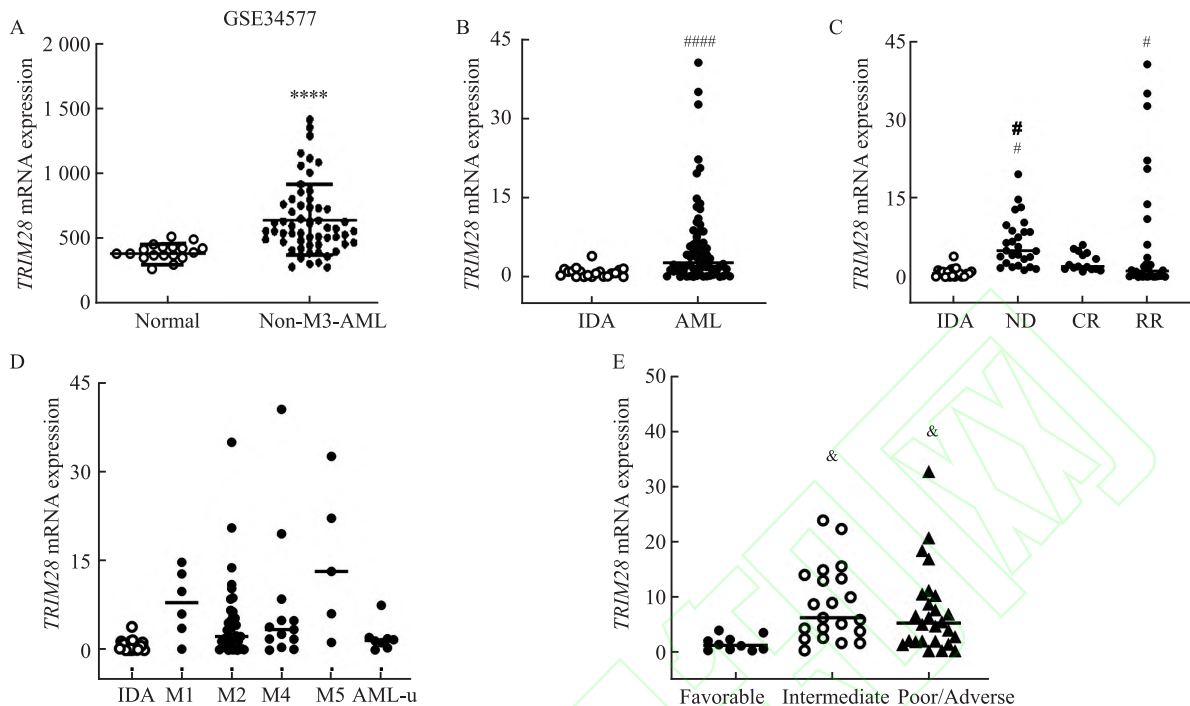


图1 *TRIM28*在AML患者中的表达水平

Fig. 1 The expression levels of *TRIM28* in AML patients

A: The expression level of *TRIM28* between non-M3-AML samples and normal samples in GEO database; B: Comparison of *TRIM28* expression levels in IDA and AML patients in clinical samples; C: Comparison of *TRIM28* expression levels between IDA and different group AML patients; D: Comparison of *TRIM28* expression levels between IDA and AML patients with different FAB subtypes; E: Comparison of *TRIM28* expression levels in AML patients with different genetic risk prognostic strata; \*\*\*\* $P<0.0001$  vs Normal group; \* $P<0.05$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  vs IDA group; & $P<0.05$  vs Favorable group.

达高于治疗有反应组(图3A,  $P<0.01$ )。随后,利用GEPIA2数据库验证了高 *TRIM28* 表达的非M3型AML患者的长期生存率较差(图3B,  $HR=2.9$ ,  $P=0.045$ )。

**2.4 干扰 *TRIM28* 抑制 AML 细胞增殖,促进细胞凋亡** 为了探讨 *TRIM28* 水平对 AML 细胞功能的影响,使用了小干扰 RNA 技术(siRNA)干扰 HL60 细胞 *TRIM28*。如图 4A-4C 所示,不同序列转染后, *TRIM28* 的 mRNA 表达水平( $t=6.68$ 、 $12.02$ 、 $10.76$ 、 $4.17$ ,均  $P<0.05$ )和蛋白表达水平均有不同程度的下降( $t=16.25$ 、 $33.44$ 、 $37.05$ 、 $7.470$ ,均  $P<0.05$ )。根据转染效率,选择 S2、S3 序列下降程度最高,因此用于后续实验。CCK-8 结果显示,转染后 HL60 细胞的增殖能力下降(图 4D,  $q=2.92$ 、 $3.37$ ,均  $P<0.05$ )。此外,通过流式细胞术检测 *TRIM28* 水平对凋亡比例的影响,发现干扰 *TRIM28* 后细胞凋亡比例增加(图 4E,  $q=4.76$ 、 $4.68$ ,均  $P<0.01$ )。上述结果表明,干扰 *TRIM28* 的表达可抑制 HL60 细胞的增殖,促进细胞凋亡。

### 3 讨论

AML 是一种危害人类健康的血液系统恶性疾病,其发病率和病死率在白血病中居首位<sup>[2]</sup>,但大多数 AML 病例病因尚不明确。尽管在治疗 AML 方面取得了一些有希望的进展,但 AML 患者的预后仍然不令人满意,其中一半以上的患者最终死于疾病。因此,探索新的治疗靶点是非常必要的。

*TRIM28* 作为一种转录调节因子,在肿瘤生物学中具有多种作用,如在肺癌中, *TRIM28* 可与泛素连接酶 RLIM 相互作用,促进其泛素化,维持 p53 的低表达水平,最终促进肿瘤细胞的增殖和生存<sup>[8]</sup>。有研究<sup>[9]</sup>报道,在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中,细胞核中的 *TRIM28* 与泛素偶联酶 E2 家族的成员 UBE2S 相互作用,增强 p27 的泛素化并促进其降解,从而调节 HCC 细胞的细胞周期进程。它能促进卵巢癌的迁移、侵袭和上皮间质转化过程<sup>[5, 10]</sup>。此外, *TRIM28* 还参与了肿瘤细胞的凋亡<sup>[11]</sup>和自噬<sup>[12]</sup>过程。然而,其在 AML 中的表达和分子作用研究较少。

表4 *TRIM28* mRNA 表达与非M3型AML患者基因突变的关系  
Tab. 4 Association of *TRIM28* mRNA expression with gene mutations in non-M3 AML patients

| Genetic mutation                | <i>n</i> (Total=63) | <i>TRIM28</i> [ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> )] | Z value | <i>P</i> value |
|---------------------------------|---------------------|---|---------|----------------|
| <i>FLT3-ITD</i> mutation status |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 14                  | 4.312 (1.721, 12.970)   | −0.678  | 0.507 3        |
| Non-mutant                      | 49                  | 3.805 (0.699, 8.593)  |         |                |
| <i>NPM1</i> mutation status     |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 9                   | 9.894 (3.746, 14.370)   | −2.003  | 0.044 9        |
| Non-mutant                      | 54                  | 2.553 (0.471, 7.810)  |         |                |
| <i>ASXL1</i> mutation status    |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 2                   | 2.752 (0.122, 5.381)  | −0.666  | 0.541 7        |
| Non-mutant                      | 61                  | 3.805 (1.259, 9.353)  |         |                |
| <i>RUNX1</i> mutation status    |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 6                   | 4.772 (1.368, 12.210)   | −0.398  | 0.706 2        |
| Non-mutant                      | 57                  | 3.805 (1.128, 8.707)  |         |                |
| <i>CEBPα</i> mutation status    |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 7                   | 1.295 (0.186, 20.620)   | −0.525  | 0.614 6        |
| Non-mutant                      | 56                  | 4.027 (1.345, 8.760)  |         |                |
| <i>TET2</i> mutation status     |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 4                   | 0.838 (0.116, 17.070)   | −0.902  | 0.389 1        |
| Non-mutant                      | 59                  | 3.884 (1.278, 8.813)  |         |                |
| <i>TP53</i> mutation status     |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 3                   | 1.886 (0.114, 5.381)  | −0.871  | 0.410 7        |
| Non-mutant                      | 60                  | 3.844 (1.250, 9.624)  |         |                |
| <i>DNMT3A</i> mutation status   |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 7                   | 2.679 (1.295, 7.552)  | −0.306  | 0.772 6        |
| Non-mutant                      | 56                  | 4.027 (1.071, 9.624)  |         |                |
| <i>ETO</i> mutation status      |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 5                   | 4.595 (2.189, 13.570)   | −0.712  | 0.495 8        |
| Non-mutant                      | 58                  | 3.543 (1.185, 8.924)  |         |                |
| <i>KIT</i> mutation status      |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 7                   | 4.595 (1.919, 8.813)  | −0.722  | 0.485 4        |
| Non-mutant                      | 56                  | 3.543 (1.071, 9.571)  |         |                |
| <i>IDH2</i> mutation status     |                     |   |         |                |
| Mutant                          | 8                   | 1.773 (1.084, 6.898)  | −0.764  | 0.458 4        |
| Non-mutant                      | 55                  | 3.884 (1.241, 9.894)  |         |                |

表5 *NPM1*单突变与*NPM1*合并*FLT3-ITD*突变患者*TRIM28*表达水平的比较  
Tab. 5 Comparison of *TRIM28* expression between patients with *NPM1* mutation alone and those with *NPM1* plus *FLT3-ITD* mutation

| Group                                     | <i>n</i> | <i>TRIM28</i> [ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> )] | Compare the <i>P</i> value with | Compare the <i>P</i> value with |
|---|----------|---|---------------------------------|---------------------------------|
|   |          |   | Non-mutant                      | <i>NPM1</i> mutation            |
| <i>NPM1</i> mutation                      | 2        | 2.409 (1.014, 3.805)  | 0.804                           |                                 |
| <i>NPM1</i> with <i>FLT3-ITD</i> mutation | 7        | 12.870 (4.938, 15.450)  | 0.047                           | 0.184                           |
| Non-mutant                                | 54       | 2.553 (0.471, 7.810)  |                                 | 0.804                           |

本研究在 GEO 数据库 GSE34577 中验证了非 M3 型 AML 样本中 *TRIM28* 的表达水平,结果显示其在 AML 中显著高于对照组。进一步检测 *TRIM28* 在临床非 M3 型 AML 骨髓样本中的表达,以 IDA 患者的骨髓样本为对照组。qPCR 结果与数据库结果一致,显示非 M3 型 AML 组 *TRIM28* 表达水平高于 IDA

组,而不同 FAB 亚型 AML 患者之间无统计学差异,根据 2025 年 NCCN 治疗指南进行遗传学风险分层,结果发现 *TRIM28* 在中等和不良预后组患者中的表达高于良好预后组。基因突变分析显示,*TRIM28* 在 *NPM1* 突变患者中表达升高,但进一步分组发现,这种高表达主要出现在 *NPM1* 合并 *FLT3-ITD* 突变患

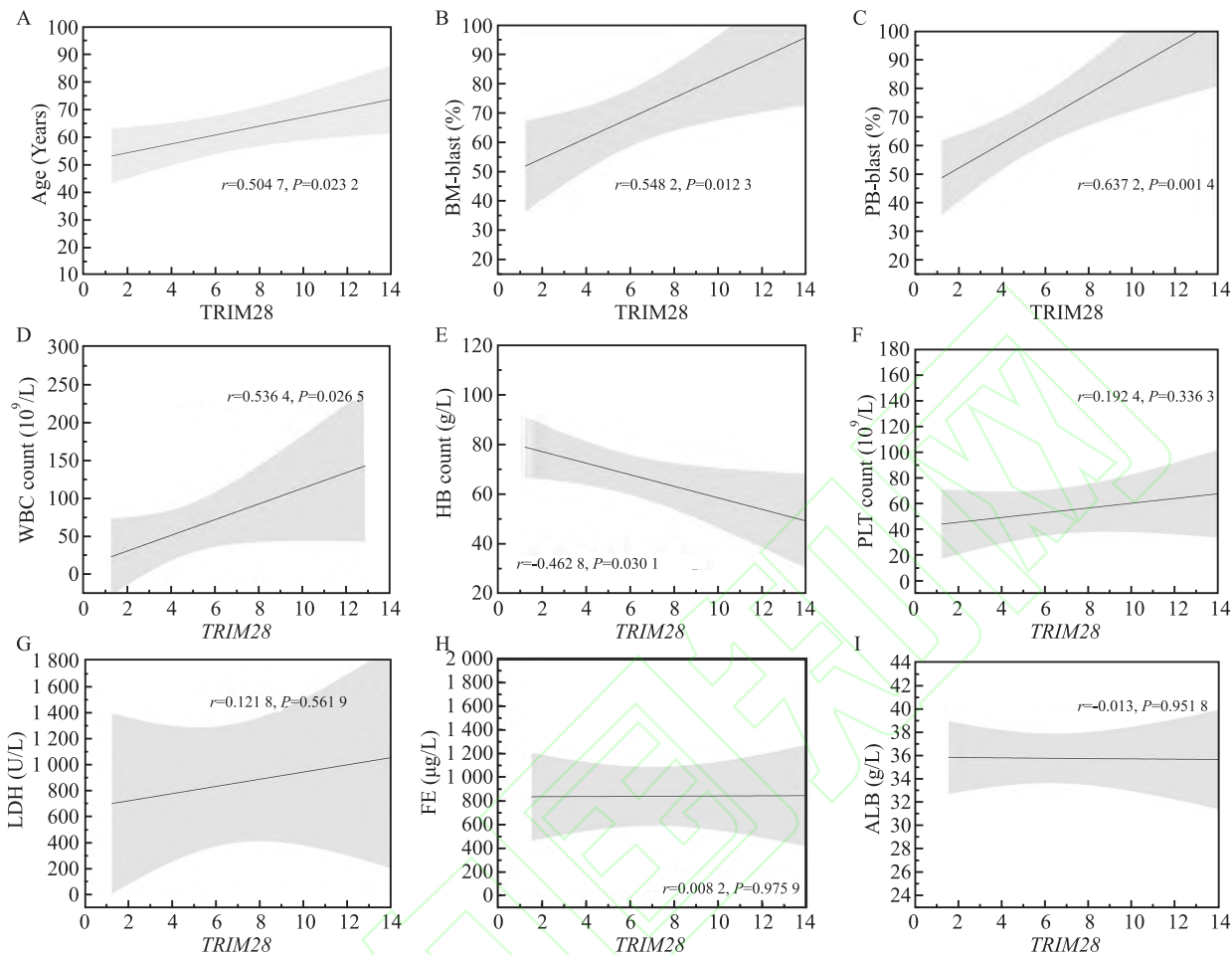


图2 非M3型AML患者TRIM28表达水平与临床的相关性分析指标

Fig. 2 Correlation analysis between TRIM28 expression level of non-M3 AML patients and clinical indicators

A-I: Correlation analysis between TRIM28 expression level with Age, BM-blast, PB-blast, WBC count, HB count, PLT count, LDH, FE and ALB level of non-M3 AML patients in ND group.

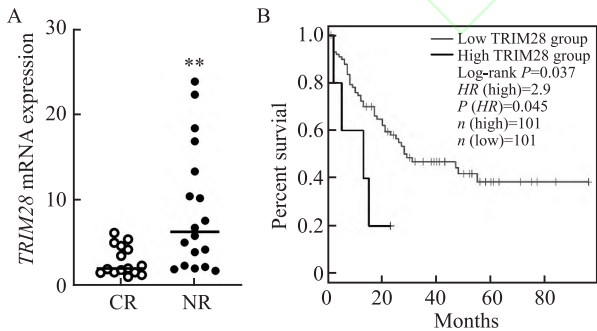


图3 非M3型AML患者TRIM28水平与治疗有效率及预后的关系

Fig. 3 Relationship of TRIM28 level and treatment response rate and prognosis in non-M3 AML patients

A: Relationship between TRIM28 levels and treatment response rates of patients with non-M3 AML; B: Kaplan-Meier curves of TRIM28 on survival in GEPIA2 database; CR: complete response; NR: non-response; \*\* $P<0.01$  vs CR group.

者,而在NPM1单突变患者中无显著差异。提示TRIM28高表达可能与NPM1合并FLT3-ITD所代表

的不良预后特征相关。

此外,新诊断组的TRIM28表达水平高于缓解组和复发组;这在一定程度上表明TRIM28在AML发病阶段起着关键作用。相关性分析结果显示,TRIM28表达水平与患者年龄、初诊时外周血和骨髓原始细胞比例、白细胞计数呈正相关。结合2022年欧洲白血病联盟建议,预测AML初诊断时TRIM28的高表达可能与不良预后相关。此外,在随访结果统计中,发现首次诱导化疗失败的NR患者中TRIM28的表达高于首次诱导化疗成功的患者。结合生存分析结果显示TRIM28高表达组患者的长期生存较差,最终得出TRIM28高表达与不良预后密切相关。

为了进一步阐明TRIM28水平对AML细胞功能的影响,采用小干扰技术干扰TRIM28的表达水平。实验结果表明,TRIM28敲低后,AML细胞增殖能力

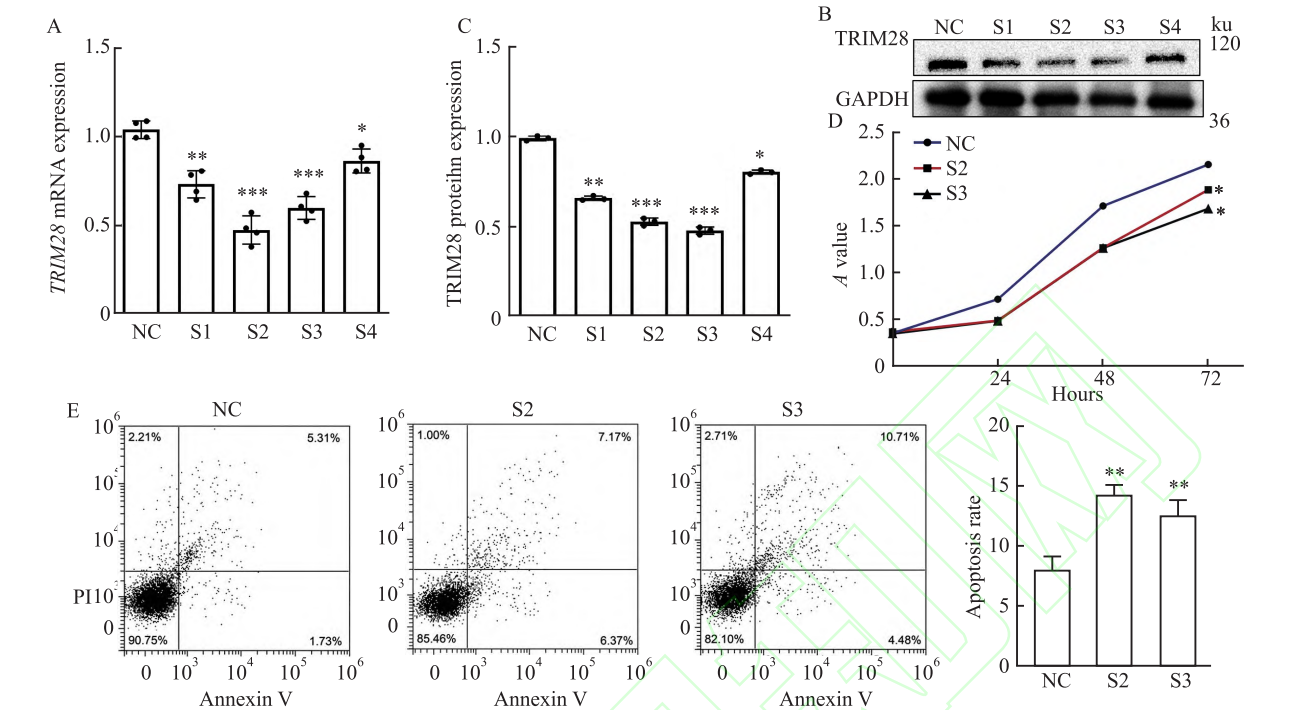


图4 干扰*TRIM28*效率验证及对AML细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 4 Verification of interference efficiency

A-C: The expression of *TRIM28* mRNA and protein in HL60 cells treated with different interfering sequences; D: The effects of interfering with *TRIM28* on the proliferation of HL60 cells; E: The effects of interfering with *TRIM28* on the apoptosis of HL60 cells; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  vs NC group.

降低,凋亡比例增加。出现这一现象可能是因为 *TRIM28* 可以维持癌细胞的干性,并作为 E3 泛素连接酶发挥作用,促进细胞增殖或抗增殖活性<sup>[13]</sup>。一项在胃癌中的研究<sup>[14]</sup>提示, *TRIM28* 通过调控泛素化过程,增加程序性死亡受体-配体 1 (PD-L1) 表达,并抑制 T 细胞活化以促进肿瘤生长。Tan et al<sup>[15]</sup> 研究结果显示, *TRIM28* 可通过上调 miR-125b-5p,抑制 *CREB1* 表达,从而诱导顺铂耐药。这些虽源自其他肿瘤,但与本研究观察到的 AML 细胞中 *TRIM28* 的表达影响肿瘤细胞生存的现象高度一致。

参考文献

[1] Shimony S, Stahl M, Stone R M. Acute myeloid leukemia; 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2023, 98(3): 502-26. doi: 10.1002/ajh.26822.

[2] DiNardo C D, Erba H P, Freeman S D, et al. Acute myeloid leukaemia [J]. Lancet, 2023, 401 (10393): 2073-86. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00108-3.

[3] Niu J, Peng D, Liu L. Drug resistance mechanisms of acute myeloid leukemia stem cells [J]. Front Oncol, 2022, 12: 896426. doi: 10.3389/fonc.2022.896426.

[4] Mohammadi A, Pour Abbasi M S, Khorrami S, et al. The TRIM proteins in cancer: from expression to emerging regulatory

mechanisms[J]. Clin Transl Oncol, 2022, 24(3): 460-70. doi: 10.1007/s12094-021-02715-5.

[5] Yang Y, Tan S, Han Y, et al. The role of tripartite motif-containing 28 in cancer progression and its therapeutic potentials [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1100134. doi: 10.3389/fonc.2023.1100134.

[6] Huang N, Sun X, Li P, et al. TRIM family contribute to tumorigenesis, cancer development, and drug resistance[J]. Exp Hematol Oncol, 2022, 11(1): 75. doi: 10.1186/s40164-022-00322-w.

[7] Czerwińska P, Mazurek S, Wiznerowicz M. The complexity of *TRIM28* contribution to cancer[J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 63. doi: 10.1186/s12929-017-0374-4.

[8] Jin J O, Lee G D, Nam S H, et al. Sequential ubiquitination of p53 by *TRIM28*, RLIM, and MDM2 in lung tumorigenesis[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(6): 1790-803. doi: 10.1038/s41418-020-00701-y.

[9] Zhang R Y, Liu Z K, Wei D, et al. UBE2S interacting with *TRIM28* in the nucleus accelerates cell cycle by ubiquitination of p27 to promote hepatocellular carcinoma development[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 64. doi: 10.1038/s41392-020-00432-z.

[10] 范蒙蒙, 李 丛, 梁 雪, 等. 转录因子 SOX4 对卵巢颗粒细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1646-51. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.006.

- [10] Fan M M, Li C, Liang X, et al. Effect of the transcription factor SOX4 on the proliferation, migration and apoptosis of ovarian granulosa cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(10): 1646-51. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.006.
- [11] Chen Z, Song J, Xie L, et al. N6-methyladenosine hypomethylation of circGPATCH2L regulates DNA damage and apoptosis through *TRIM28* in intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1957-72. doi: 10.1038/s41418-023-01190-5.
- [12] Song T, Lv S, Ma X, et al. *TRIM28* represses renal cell carcinoma cell proliferation by inhibiting TFE3/KDM6A-regulated autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(5): 104621. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104621.
- [13] Han W Y, Wang J, Zhao J, et al. WDR4/*TRIM28* is a novel molecular target linked to lenvatinib resistance that helps retain the stem characteristics in hepatocellular carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2023, 568: 216259. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216259.
- [14] Ma X, Jia S, Wang G, et al. *TRIM28* promotes the escape of gastric cancer cells from immune surveillance by increasing PD-L1 abundance[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 246. doi: 10.1038/s41392-023-01450-3.
- [15] Tan Q, Ma J, Zhang H, et al. miR-125b-5p upregulation by *TRIM28* induces cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through CREB1 inhibition[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 469. doi: 10.1186/s12890-022-02272-9.

Prognostic significance of *TRIM28* elevation in non-M3 acute myeloid leukemia

Gong Siqi<sup>1</sup>, Li Cong<sup>1</sup>, Fan Mengmeng<sup>1</sup>, Wang Huiping<sup>1</sup>, Zhang Wanqiu<sup>1</sup>, Liang Xue<sup>1</sup>,  
Tao Qianshan<sup>1</sup>, Hong Qiang<sup>2</sup>, Zhai Zhimin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup> School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To clarify the expression of *TRIM28* in non-M3 acute myeloid leukemia (AML) and its correlation with clinical indicators and prognosis, and to further explore the effect of *TRIM28* expression levels on the proliferation and apoptosis of AML cells using small interfering RNA. **Methods** The GSE34577 dataset was analyzed using R software to compare *TRIM28* expression between healthy controls and non-M3 acute myeloid leukemia (AML) patients. Clinical samples from non-M3 AML patients were collected, with *TRIM28* expression levels measured using real-time quantitative PCR (qPCR). The analysis focused on correlations between *TRIM28* expression and various clinical indicators, treatment efficacy, and patient prognosis. Furthermore, small interfering RNA (siRNA) technology was employed to downregulate *TRIM28* expression in human primary AML cells (HL60 cell line). The effects on cell proliferation and apoptosis were then assessed through CCK-8 assays and flow cytometry, respectively. **Results** The results showed that *TRIM28* was up-regulated in non-M3 AML of both online database GSE34577 and clinical samples ( $P<0.0001$ ), *TRIM28* expression of new diagnosis (ND) group and relapsed refractory (RR) group was higher than iron deficiency anemia (IDA) group ( $P<0.01$ ), and there was no significance between different French-American-British classification systems (FAB) subtype. *TRIM28* expression was higher in non-M3 AML patients with a poor genetic prognosis stratified as moderate than in the good prognosis group, and *TRIM28* expression was associated with *NPM1* combined with the *FLT3-ITD* mutation, positively correlated with age, bone marrow blast, peripheral blood blast and white blood cell, negatively correlated with hemoglobin. In addition, interference *TRIM28* greatly inhibited cell proliferation and promoted cell apoptosis. **Conclusion** This study reveals that *TRIM28* is highly expressed in non-M3 AML and associated with prognosis, and plays a key role in the proliferation and apoptosis of AML cells, suggesting that *TRIM28* may serve as a novel therapeutic target for non-M3 AML.

**Key words** acute myeloid leukemia; *TRIM28*; proliferation; apoptosis; recurrence; prognosis

**Fund program** Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82370225); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053176); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2023zhyx-B08).

**Corresponding author** Zhai Zhimin, E-mail: zzzm889@163.com