

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00653

• 研究快报 •

## SHP1 基因诱导慢性粒细胞白血病 K562 细胞凋亡及红系分化

杨 军, 刘晓力, 杜庆锋\*, 李 宁, 周淑芸

南方医科大学南方医院血液科, 广州 510515

**[摘要]** **目的** 探讨 SHP1 基因在诱导 K562 细胞凋亡及红系分化中的作用。**方法** 应用 RT-PCR 法克隆 SHP1 基因全长 cDNA 序列并克隆于真核表达载体 pcDNA3.0, 脂质体转染使其基因在 K562 细胞中过表达。Hoechst33258 染色和 FACS(Annexin V-PI 双标)分析检测转基因后 K562 细胞凋亡;联苯胺蓝染色和血型糖蛋白 A(GPA)表达检测分析细胞分化情况。**结果** pcDNA3-SHP1 转染 K562 细胞, RT-PCR、蛋白免疫印迹分析证实 SHP1 在 K562 细胞中表达。转染 48 h 后, K562 细胞出现凋亡, Annexin V-PI 双标 FACS 分析细胞凋亡率为 16.84%, 与转染空载体 pcDNA3.0(6.23%)相比差异有统计学意义( $P=0.000$ )。联苯胺蓝染色细胞阳性率 14.67%, GPA 表达率 19.38%, 与转染空载体组比较差异也有统计学意义( $P=0.005$ )。**结论** SHP1 能有效地诱导 K562 细胞凋亡与红系分化。

**[关键词]** SHP1 基因; K562 细胞; 细胞凋亡; 红系分化

**[中图分类号]** R 733.722 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0653-04

### SHP1 gene induces apoptosis and erythroid differentiation in human erythromyeloblastoid leukemia cell line K562

YANG Jun, LIU Xiao-li, DU Qing-feng\*, LI Ning, ZHOU Shu-yun

Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of SHP1 gene in inducing apoptosis and erythroid differentiation in human erythromyeloblastoid leukemia cell line K562. **Methods** The full length cDNA of SHP1 gene was cloned by RT-PCR and was subcloned into mammalian expression vector pcDNA3.0. The cDNA sequence of the cloned gene was validated by enzyme digestion and DNA sequencing. Then the recombinant plasmid was used to transfect K562 cells *via* lipofectin. The apoptosis of K562 cells was examined by Hoechst 33258 staining assay and Annexin V/PI double-labeled assay; the differentiation of K562 cells was observed by benzidine staining and expression of glycophorin A (GPA). **Results** RT-PCR and Western blotting analysis showed expression of SHP1 in K562 cells after transfection with pcDNA3-SHP1 plasmid. Apoptotic cells were detected in the K562 cells 48 h after treatment with pcDNA3-SHP1, with the apoptosis rate being 16.84%, which was significantly higher than that in cells transfected with pcDNA3.0 (6.23%,  $P=0.000$ ). The positive rate of benzidine staining was 14.67% and the positive rate of GPA expression was 19.38% in cells treated with pcDNA3-SHP1, both were significantly different from those in the cells transfected with pcDNA3.0 ( $P=0.005$ ). **Conclusion** Over-expression of SHP1 can effectively induce apoptosis and erythroid differentiation in K562 cells.

**[Key words]** SHP1 gene; K562 cells; apoptosis; erythroid differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6):653-656]

慢性髓系白血病(chronic myeloid leukaemia, CML)是一种源自造血干细胞的恶性克隆性疾病,其标志性的 BCR/ABL 融合蛋白具有持续异常激活的酪氨酸激酶活性,能催化多种原癌蛋白底物发生酪氨酸磷酸化而异常活化,进而转导一系列细胞信号通路使细胞增殖失控,凋亡受阻,分化停滞,成为疾病发展的根本动力。近年来 CML 中关于 BCR/ABL 及

相关原癌蛋白的异常酪氨酸磷酸化激活机制已有广泛报道,但关于去磷酸化即负调控机制的报道相对较少<sup>[1]</sup>。SHP1 是蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)家族的重要成员,能使磷酸化的酪氨酸残基去磷酸化而抑制激酶活性<sup>[2]</sup>。我们的前期工作已证实 CML 急变期患者 SHP1 表达水平明显下降并构建了 SHP1 真核表达载体<sup>[3]</sup>。本研究通过转染慢性粒细胞白血病 K562 细胞

**[收稿日期]** 2010-04-16 **[接受日期]** 2010-06-09

**[基金项目]** 广州市科技攻关重点引导项目(2006Z3-E0401)。Supported by the Project for Tackling Key Problems of Science and Technology of Guangzhou Municipality(2006Z3-E0401)。

**[作者简介]** 杨 军, 博士生, 副教授。E-mail: yangjun@fimmu.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 020-62787876, E-mail: dqf@vip.163.com

使其过表达 SHP1,来探讨 SHP1 基因在诱导 K562 细胞凋亡及红系分化中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 细胞培养基、凋亡检测试剂盒、蛋白提取与定量试剂盒、总 RNA 提取与分析试剂盒、Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;抗 SHP1 多克隆抗体购自 BD Transduction Laboratories 公司;Protein Detector Western Blot Kid BCIP/NBT 试剂盒购自 Kirkegaard & Perry 公司;抗 CD71-PE、抗 GPA-FITC、小鼠同型对照 IgG1-PE 和 IgG1-FITC 等均购自武汉博士德公司。

1.2 细胞培养与质粒预处理 K562 细胞(购自上海生物研究所)用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 中培养传代,每 24~48 h 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。pcDNA3-SHP1(本实验室前期构建<sup>[1]</sup>)、对照空载体 pcDNA3(为本实验室前期保存)、绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-C1(Clontech 公司)各 15 μg,溶于 100 μl ddH<sub>2</sub>O;加等体积平衡酚混匀,室温离心;5 000 g×5 min;上清加等体积氯仿;异戊醇(24:1),混匀,室温离心;5 000 g×5 min;上清加 1/10 体积 3 mol NaAc,再加 2 倍体积冰冷的无水乙醇;置冰上 20 min;4℃,10 000 g×10 min 离心回收 DNA;弃乙醇,留取沉淀,加 1 ml 70%乙醇,轻洗去除残余的盐,4℃,离心 2 min;吹干备用。

1.3 脂质体转基因 参照 Lipofectamine™ 2000 产品说明书上的方法及文献将 pcDNA3-SHP1 和 pcDNA3.0 导入 K562 靶细胞中。操作方法如下:调整细胞终密度为 5×10<sup>5</sup>/ml,2 ml/皿接种于 35 mm 培养皿中;用无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养液稀释 4 μg 质粒 DNA,终体积为 250 μl;用无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养液稀释 10 μl Lipofectamine™ 2000,终体积为 250 μl,室温静置 5 min;将 DNA 稀释液与 Lipofectamine™ 2000 稀释液混匀,室温静置 5 min;于对应的各 35 mm 培养皿中加入 500 μl 的 DNA-Lipofectamine™ 2000 复合物,轻摇混匀;37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 h 后,换含 20%FBS 的 RPMI 1640 再培养 48 h;收集细胞,PBS 洗 2 次,离心并调整密度以进行下述检测。

### 1.4 转基因鉴定

1.4.1 转染效果鉴定 Lipofectamine™ 2000 脂质体法将 pEGFP-C1 质粒转入 K562 细胞,步骤同 1.3 项下,设 3 个平行皿;36 h 后收集细胞;调整细胞密度为 1×10<sup>7</sup>/ml;取细胞悬液滴片,加盖玻片于荧光显微镜下观察;每皿随机计数 100 个细胞并计算荧光阳性细胞率。

1.4.2 RT-PCR 按 TRIzol 试剂盒说明进行总 RNA 的抽提,行 SH1 基因 RT-PCR 检测<sup>[1]</sup>。

1.4.3 Western 印迹与胞质蛋白活性分析 胞质蛋白与全细胞蛋白抽提按 Nuclear Extract Kit(Active Motif)操作说明进行;Bradford 蛋白定量法行蛋白定量,蛋白免疫印迹分析按 Western Blot Kit BCIP/NBT System 操作说明进行<sup>[1]</sup>,在 Adobe Photoshop 软件支持下进行图像扫描存储。

1.5 凋亡检测 根据 Annexin V-PI 法检测凋亡,将 Annexin V-PI 法 FACS 检测的细胞分为 4 群,Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> 为早期凋亡细胞,Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> 为晚期凋亡细胞,Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> 为死亡细胞,Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> 为活细胞。细胞总凋亡率=(早期凋亡细胞+晚期凋亡细胞)/总细胞数。两组间细胞总凋亡率的比较采用四格表资料的  $\chi^2$  检验。

### 1.6 红系分化检测

1.6.1 联苯胺蓝染色 细胞用预冷 PBS 洗涤后,调整密度为 1×10<sup>6</sup>/ml,取 100 μl 细胞悬液,离心去上清后再用 50 μl 预冷 PBS 重悬;0.5 mol/L 冰乙酸配制的质量体积分数为 0.2% 的联苯胺蓝液 0.5 ml 加 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液 20 μl;取 10 μl 联苯胺蓝-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液加入到细胞中,室温避光放置 10 min;5 min 内显微镜下计数 200 个细胞,计算阳性细胞率,并拍摄图片。

1.6.2 FACS 检测细胞红系分化标记物 收集细胞用预冷 PBS(pH 7.4)洗涤 2 次;每管分别取 10<sup>6</sup> 个细胞进行细胞表面抗原标记;其中包括早期红系表面标志抗原 CD71 和中晚期红系标志血型糖蛋白 A (glycophorin A, GPA),小鼠 IgG1-PE 和 IgG1-FITC 作为同型阴性对照;避光标记 20 min 后, PBS 洗涤,488 nm 激光激发下进行 FACS 分析。

1.7 统计学处理 两个样本率的比较采用四格表资料的  $\chi^2$  检验,利用 SPSS 10.0 软件包进行,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 转基因结果鉴定

2.1.1 荧光显微镜检测 pcDNA3.0+pEGFP-C1 组表达荧光阳性细胞率为(83.0±4.6)% (图 1A),pcDNA3-SHP1+pEGFP-C1 组表达荧光阳性细胞率为(81.3±6.1)% (图 1B)。

2.1.2 RT-PCR 检测 K562 和空载体 pcDNA3/K562 SHP1 结果阴性,转基因组 pcDNA3-SHP1/K562 可见到长 414 bp 的阳性条带(图 2)。

2.1.3 蛋白免疫印迹分析 脂质体转基因后 60 h,pcDNA3-SHP1/K562 细胞蛋白免疫印迹可以检测

到相对分子质量为 68 000 的阳性条带, K562 与 pcDNA3/K562 细胞未检测到 SHP1 蛋白表达。

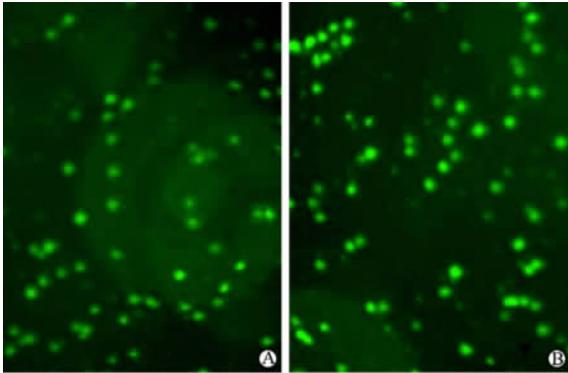


图 1 荧光显微镜观察 pcDNA3.0+pEGFP-C1(A) 和 pcDNA3-SHP1+pEGFP-C1(B) 共转染 K562 细胞

Fig 1 K562 cells were co-transfected with pcDNA3.0+pEGFP-C1(A) or pcDNA3-SHP1+pEGFP-C1(B)

Original magnification:  $\times 10$

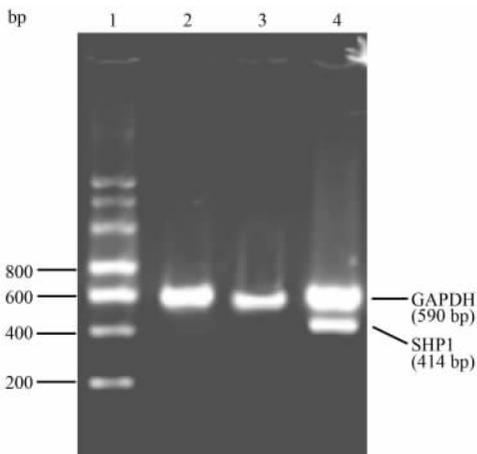


图 2 RT-PCR 检测结果

Fig 2 RT-PCR analysis of SHP1 mRNA expression in K562 cells 48 h after pcDNA3-SHP1 transfection

1: DNA marker; 2: K562 cells; 3: K562 cells transfected with vector pcDNA3.0; 4: K562 cells transfected with pcDNA3-SHP1

2.2 SHP1 转基因诱导 K562 细胞凋亡 未转染组及转染空载体组细胞凋亡率分别为 4.82% 和 6.23%, 转染 pcDNA3-SHP1 组的 K562 细胞凋亡率为 16.84%, 显著高于未转染及转染空载体细胞组 ( $P$  值均为 0.000)。

2.3 SHP1 转基因诱导 K562 细胞红系分化

2.3.1 联苯胺蓝染色 如图 3 所示, 转染 pcDNA-SHP1 组 K562 细胞经 G418 筛选 48 h 后, 联苯胺蓝染色阳性率为  $(14.67 \pm 1.25)\%$ , 转染空载体组为  $(3.34 \pm 1.25)\%$ , 两组比较差异有统计学意义 ( $\chi^2$  值为 8.791,  $P=0.005$ )。

2.3.2 红系抗原 CD71 及 GPA 分析 应用 FACS

对各组细胞的红系抗原 CD71 及 GPA 进行分析, 结果可见未转染组 K562 细胞表面 CD71 与 GPA 阳性率分别为 80.0% 和 2.98%, 转染空载体组 CD71 与 GPA 阳性率分别为 85.63% 和 2.73%, 转染 pcDNA3-SHP1 组则分别为 91.84% 和 19.38%。统计学分析显示, 转染 pcDNA3-SHP1 组 CD71 和 GPA 阳性率均明显高于转染空载体组 CD71 和 GPA 阳性表达率 ( $P$  值均为 0.000)。

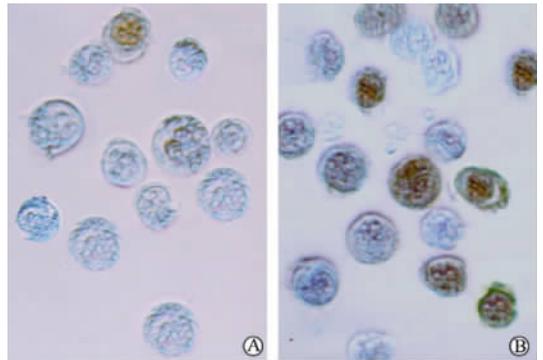


图 3 联苯胺蓝染色分析 pcDNA3.0 空载体(A) 和 pcDNA3-SHP1 载体(B) 转染的 K562 细胞红系分化

Fig 3 Benzidine analysis of erythroid differentiation of K562 cells transfected with pcDNA3.0 (A) and pcDNA3-SHP1 (B)

Original magnification:  $\times 40$

### 3 讨论

CML 是起源于造血干/祖细胞的恶性克隆性疾病, 其临床病程具有典型的三阶段性, 即慢性期 (CP), 加速期 (AP), 急变期 (BP)。在慢性期, 受累的 CML 造血干/祖细胞能进一步分化为相对成熟的血细胞, 但此类细胞在数量上远超出正常血细胞, 而使得正常造血受抑制。急变期细胞分化显著受阻同时抗凋亡能力进一步增强, 使得原始幼稚细胞大量增多。目前多数研究认为: P210BCR-ABL 融合基因的形成不仅是导致 CML 发生的原因, 还是推动肿瘤克隆演进的根动力; 而 BCR/ABL 融合蛋白具有的持续酪氨酸激酶活性, 及其介导的一系列酪氨酸激酶的异常活化, 是 CML 发生发展的重要机制<sup>[4-6]</sup>。

SHP1 是 20 世纪 90 年代初从造血细胞中克隆出来的 PTP 家族重要成员, 其在肿瘤的发生发展过程中可能发挥“抑癌作用”。Amara 等<sup>[7]</sup>发现 SHP1 基因高甲基化后表达缺失与弥漫大 B 细胞淋巴瘤侵袭性增强有关, 是预后不良的标志之一。Ksiao 等<sup>[8]</sup>发现 SHP1 的高甲基化可能与胶质细胞瘤的发生发展及不良预后有关。Gauffin 等<sup>[2]</sup>也在儿童急性淋巴细胞白血病细胞中发现 SHP 呈低水平表达, 进一步提示 SHP 在肿瘤发生发展中的负调控作用。

SHP1的负调控作用机制,主要是通过与蛋白酪氨酸激酶(PTK)成员结合或使其底物的酪氨酸残基去磷酸化,从而拮抗PTK在多个生长、分化、凋亡等信号通路中的酶活性<sup>[9]</sup>。P210<sup>BCR-ABL</sup>是导致人类恶性血液系统肿瘤CML发病的重要PTK成员之一,但SHP1在P210<sup>BCR-ABL</sup>所介导的各种增殖、抗凋亡中起何种作用,目前相关资料十分有限。Ito等<sup>[10]</sup>发现SHP1能与P210<sup>BCR-ABL</sup>结合并负性调节P210<sup>BCR-ABL</sup>/SAPK通路的信号强度,作者还进一步证实了SHP1在成纤维细胞中过表达可以抑制P210<sup>BCR-ABL</sup>的致瘤作用。最近有研究发现SHP1甲基化水平在AML(急性髓系白血病)中要显著高于CML,而CML急变时生物学表现与AML基本一致,因此提示SHP1或许与CML疾病进展有关<sup>[11]</sup>。并且我们的前期研究应用RT-PCR对11例CML原代细胞中SHP1的mRNA转录本水平进行了半定量检测,结果7例慢性期患者SHP1转录本水平与正常对照无差异,但急变期患者SHP1转录本水平明显下降<sup>[3]</sup>。而急变期白血病细胞凋亡及分化较慢性期明显受抑是CML急变的基本特征,因而我们的前期工作提示SHP1可能在CML急变细胞中的表达水平降低或缺失与细胞的抗凋亡和分化受抑存在某种相关性。为了进一步验证这种相关性,我们在建立SHP1基因真核表达载体pcDNA3-SHP1后,应用脂质体转基因技术使得K562细胞过表达SHP1,结果发现过表达SHP1确实可以诱导K562细胞一定程度的凋亡。而事实上本研究未能成功在K562细胞中建立SHP1稳定表达的细胞系,也说明SHP1在K562细胞的增殖、抗凋亡等信号通路中充当重要负性调节子的可能性。此外,我们的前期研究还提示SHP1参与了正常造血细胞与肿瘤细胞的分化,因此本研究对SHP1转基因后的K562细胞的红系分化情况也进行了检测,结果显示细胞联苯胺染色阳性率上升,提示血红蛋白合成增加;同时细胞表面中晚期红系抗原标志(CD71、GPA)也表达上升,以上结果表明SHP1的过表达可以诱导K562细胞朝成熟红系分化。

需要提出的是,SHP1的过表达虽然既诱导K562细胞凋亡又诱导分化,但两者间并不矛盾。细胞在各种生存环境中总在不断动态地调整外界与自身的各种正、负生长信号,启动细胞进入细胞周期,在经过各个周期检测点时,按照各种信号的最终总和将不可避免地面临3种主要结局:分裂、分化和死亡(凋亡)。当以正性生长信号为主时,细胞继续分裂增殖;当以负性生长信号为主时,按照负性信号的强弱而启动分化或凋亡通路。例如高浓度的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对早幼粒细胞白

血病的作用为诱导凋亡,但低浓度却是诱导分化<sup>[12]</sup>;即使是细胞毒性药物Ara-C、三尖杉酯碱在低浓度时也诱导肿瘤细胞分化为主。由于细胞个体间存在异质性或SHP1基因在不同细胞中表达程度的差异,部分细胞以正性生长信号为主而继续生长,部分细胞负性信号稍占上峰出现分化,另外部分细胞因负性信号过强而启动凋亡途径,细胞最终死亡。

## [参考文献]

- [1] Amin H M, Hoshino K, Yang H, Lin Q, Lai R, Garcia-Manero G. Decreased expression level of SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1 (Shp1) is associated with progression of chronic myeloid leukaemia[J]. *J Pathol*, 2007, 212: 402-410.
- [2] Gauffin F, Diffren E, Gustafsson B, Nordgren A, Wingren A G, Sander B. Expression of PTEN and SHP1, investigated from tissue microarrays in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 26: 48-56.
- [3] 李宁, 杜庆锋, 张嵩, 刘晓力, 周淑云. SHP1表达与慢性粒细胞白血病进展的初步研究[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29: 1490-1493.
- [4] Kumar C, Purandare A V, Lee F Y, Lorenzi M V. Kinase drug discovery approaches in chronic myeloproliferative disorders [J]. *Oncogene*, 2009, 28: 2305-2313.
- [5] Druker B J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML[J]. *Blood*, 2008, 112: 4808-4817.
- [6] Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2009, 113: 1619-1630.
- [7] Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19: 1774-1786.
- [8] Ksiaa F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 404: 128-133.
- [9] Liedtke M, Pandey P, Kumar S, Kharbanda S, Kufe D. Regulation of Bcr-Abl-induced SAP kinase activity and transformation by the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase [J]. *Oncogene*, 1998, 17: 1889-1892.
- [10] Ito Y, Pandey P, Sathyanarayana P, Ling P, Rana A, Weichselbaum R, et al. Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 and c-Abl tyrosine kinase in response to genotoxic stress [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18130-18138.
- [11] Uhm K O, Lee E S, Lee Y M, Park J S, Kim S J, Kim B S, et al. Differential methylation pattern of ID4, SFRP1, and SHP1 between acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia [J]. *J Korean Med Sci*, 2009, 24: 493-497.
- [12] Kinjo K, Kizaki M, Muto A, Fukuchi Y, Umezawa A, Yamato K, et al. Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-induced apoptosis and differentiation in retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in hGM-CSF-producing transgenic SCID mice [J]. *Leukemia*, 2000, 14: 431-438.