文章编号:1000-5404(2009)15-1467-04

论著

外源性肌醇 5′磷酸酶对 K562 细胞增殖及凋亡的影响

杨 琳,罗建民,杜行严,杨敬慈,刘晓军,温树鹏,成志勇 (河北医科大学第二医院血液科,河北省血液病重点实验室,石家庄 050000)

摘 要:目的 通过慢病毒载体介导外源性 5′肌醇磷酸酶(SH2 domain contaihing inositol 5′-phosphatase, SHIP)基因转染 K562 细胞,探讨 *ship* 基因对 K562 细胞生长增殖的影响。**方法** 以白血病细胞株 K562 为研究对象,将携带 *ship* 基因的慢病毒感染 K562 细胞,FQ-PCR 方法检测 *ship* 转录水平,Western blot 方法检测转染后 SHIP 蛋白表达变化;比较 *ship* 基因表达前后细胞增殖、形态的变化。**结果** FQ-PCR 和 Western blot 结果显示,携带 *ship* 基因的慢病毒载体 pReceiver-Lv31 能高效转染 K562 细胞,阳性率(74.6 ± 5.8)%;细胞生长曲线显示 SHIP 可显著抑制 K562 细胞生长,抑制率(35.0 ± 3.1)%;集落形成实验显示 SHIP 能显著抑制 K562 细胞集落形成能力[K562/SHIP 组集落形成率(36.7 ± 7.1)%,K562/FIV 组为(77.7 ± 6.3)%,($P<0.05$)];细胞形态观察发现凋亡增加,TUNEL 法证实 SHIP 蛋白促进细胞凋亡。**结论** 外源性 *ship* 基因表达抑制白血病细胞系 K562 的增殖活性,并促进其凋亡。

关键词: 基因,肌醇 5′磷酸酶;慢病毒载体;细胞增殖;细胞凋亡
中图法分类号: R394.2; R730.231; R733.71 **文献标识码:** A

Effects of exogenous SHIP expression on cell growth and apoptosis of K562 cells

YANG Lin, LUO Jian-min, DU Xing-yan, YANG Jing-ci, LIU Xiao-jun, WEN Shu-peng, CHENG Zhi-yong (Provincial Key Institute of Hematology, Department of Hematology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To investigate the biological function of SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase (*ship*) gene in cell growth and proliferation. K562 cells by lentiviral vector mediated *ship*. **Methods** Exogenous *ship* gene was delivered into K562 cells by lentiviral vector-based viral infection. SHIP expression was determined by Western blot. Transcription of *ship* was examined by FQ-PCR. Changes in cell morphology, cell growth, cell apoptosis after SHIP expression were observed. **Results** FQ-PCR and Western blot demonstrated successful SHIP expression in K562 cells. SHIP protein inhibited the growth of K562 cells [inhibition rate = (35.0 ± 3.1)%] and their colony forming capacity [K562/SHIP group (36.7 ± 7.1)% *vs* K562/FIV group (77.7 ± 6.3)%, $P<0.05$]. Morphological observation showed enhanced cell apoptosis. TUNEL confirmed the enhanced cell apoptosis by SHIP protein. **Conclusion** *ship* gene has the potential ability to inhibit leukemic cell proliferation but enhance cell apoptosis.

Key words: gene, SHIP; lentiviral vector; cell proliferation; apoptosis

人类 *ship*(SH2 domain containing inositol 5′-phosphatase)基因是继 PTEN 之后发现的又一肌醇 5′磷酸酶,仅限于造血细胞表达[1]。近年来国内外研究表明,SHIP 是造血细胞增殖和生存的重要负调控因子[2]。但有关 *ship* 基因与白血病发病的关系尚不清楚。我们利用慢病毒载体将 *ship* 基因导入 K562 细胞,使其稳定表达 *ship* 基因,进一步探讨 *ship* 基因对白血病细胞凋亡及增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 采用三质粒慢病毒载体系统,载体质粒 pReceiver-Lv31 含巨细胞病毒(CMV)启动子及绿色荧光蛋白(GFP);包装质粒 FIV 和 VSG 由广州复能生物公司合成并鉴定。人胚肾细胞系 293T 包装细胞系购自中国医学科学院血液研究所,用于慢病毒扩增,用含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基培养。人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 细胞系为本室长期保存,用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基,加入青霉素

基金项目: 国家自然科学基金(30240011);河北省自然科学基金(2007000858) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30240011) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (2007000858)
作者简介: 杨 琳,女,河北省石家庄市人,博士,副教授,主要从事信号转导与白血病发病机制方面的研究,发表论文 20 篇。电话:(0311)66002841,E-mail: ylhbsjz@163.com
通信作者: 罗建民,E-mail: Luojm315@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-09-17;**修回日期:** 2008-11-05

(100 U/ml)和链霉素(100 μg/ml)的培养体系,均在37℃,5% CO_2,饱和湿度环境孵育。

1.1.2 主要试剂和材料 小量质粒提取试剂盒购自天根生物公司;细胞培养基DMEM、RPMI1640购自Gibico公司;胎牛血清(FBS)购自HYCLONE公司;胰蛋白酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司;绝对荧光定量PCR试剂盒(针对SHIP)由达安基因公司设计合成(GenBank登陆号U57650)。SHIP抗体、β-actin抗体购自Santa Cruz公司。Lipofectmine 2000购自美国Introvigen公司。全自动酶标仪为美国的Bio-Rad Model 550。四唑氮蓝(MTT)为美国Sigma公司产品。

1.2 慢病毒包装

采用脂质体Lipofectamine 2000将3种质粒共转染293T包装细胞,其中载体质粒pReceiver-Lv31-SHIP 10 μg、FIV 10 μg、VSG 10 μg,36 h后荧光显微镜观察GFP表达情况,48~72 h离心取细胞加入1×PBS在液氮中反复冻融3~4次离心取上清,用无血清DMEM将病毒上清液进行10^{-1}~10^{-6}梯度稀释,当293T包装细胞融合度达80%~90%时,分别吸取1 ml稀释病毒液与293T细胞(2×10^6/孔)混合,37℃、5% CO_2培养3 h,加2~3 ml DMEM继续培养48 h,荧光显微镜观察各浓度孔GFP表达并计数。

病毒滴度=(表达GFP的细胞个数×稀释倍数)/ml

1.3 慢病毒感染K562细胞系

常规将细胞悬浮于含2 μg/ml PHA、20% FBS的RPMI 1640培养基中,37℃、5% CO_2培养72 h,将6×10^6/ml的处于对数生长期的K562细胞与病毒液按感染指数(MOI)1∶3共同培养4 h,加入含20% FBS的RPMI1640培养液继续培养。实验设3组,转染携带野生型*ship*基因慢病毒载体的细胞为实验组,转染空载体的细胞和未转染组为对照组。48 h后荧光显微镜下观察GFP表达情况。直接用流式细胞仪上机检测表达绿色荧光蛋白的细胞比例计算转染效率。

1.4 *ship* mRNA在K562细胞表达

收集转染的K562细胞,提取细胞总RNA分光光度计测量波长260 nm处光密度值[*D*(260)]。取4 μl加入试剂盒逆转录,取5 μl进行定量扩增。*ship*上游引物:5′-CGACAAGAA-GCTGAGTCCCTTT-3′下游引物:5′-GGTAGTTAAGATCCCCAAA-CCAGAA-3′探针:5′-FAM-ACATCACTCACCGCTTCACGCACC-TAMRA-3′。参数为93℃预变性2 min 1个循环。93℃变性45 s,55℃退火45 s,共40个循环。GENE5700软件分析结果。结果计算按公式:拷贝数/μg总RNA=拷贝数/μl cDNA÷样本RNA的*D*(260)×1.05。实验重复3次。

1.5 转染后K562细胞内SHIP蛋白检测

采用Western blot法。取5×10^6细胞,加入200 μl预冷的蛋白裂解液4℃裂解1 h,冰浴下超声裂解15 min。12 000 r/min 4℃离心20 min,取上清用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度,分装后置-20℃保存。取50 μg样品蛋白质加入等体积上样缓冲液,经5%浓缩胶和10% SDS-PAGE凝胶电泳后,用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。经5% BSA 37℃封闭1 h,加入小鼠抗人SHIP抗体,4℃孵育过夜。TBS漂洗5 min×3次,加入山羊抗小鼠HRP标记二抗,37℃孵育1 h,TBS漂洗5 min×3次。化学发光法检测后分析结果。

1.6 *ship*基因对K562细胞增殖能力影响

1.6.1 MTT 取各组细胞调整密度均为5×10^4/ml,接种于96孔无菌培养板中,每孔200 μl。每个时段下设3个复孔。以未转染组和转染空载体组K562/FIV细胞做为对照。终止培养前4 h,每孔加入四唑氮蓝(MTT)10 μl(10 mg/ml),终止培养时,每孔加入150 μl二甲基亚砜(DMSO),溶解后用酶标仪测490 nm处光密度值[*D*(490)],计算细胞生长抑制率。

抑制率=[1-实验组*D*(490)/对照组*D*(490)]×100%

1.6.2 集落形成实验 取上述各组细胞1×10^3个分别接种于含琼脂(0.03 g/L)及10% FCS的RPMI1640的6孔板内,每组设3个复孔,培养10 d后在显微镜下计数集落数。>50个细胞的细胞团定为1个集落。

1.7 细胞周期及细胞凋亡率分析

取1×10^6细胞用70%冷乙醇(4℃)固定30 min,RNase A和碘化丙啶染色60 min(37℃)后,进行流式细胞分析。

1.8 Hoechest33342荧光染色检测细胞早期凋亡

1×10^6细胞接种于6孔细胞培养板中,按前述分组进行转染,48 h后常规细胞涂片,固定,Hoechest33342染色后封固,荧光显微镜下观察结果。正常细胞和中早期凋亡细胞均可被Hoechest着色,正常细胞核Hoechest的着色呈淡蓝色弥散均匀荧光,内有较深的蓝色颗粒;而凋亡的细胞核则表现为浓染致密的亮蓝色颗粒块状荧光。观察后进行数码照相并通过Image Pro-Plus(Media Cybernetics公司产品)图像分析软件自动计数500各细胞核,计算凋亡细胞百分比。

1.9 TUNEL法鉴定细胞凋亡

按博士德TUNEL试剂盒操作步骤检测,细胞转染5 d后涂片后做TUNEL检测,每张切片计数10个视野共计500个细胞。细胞中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。

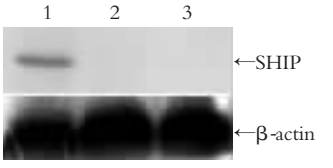
1.10 统计学处理

SAS 10.0统计软件分析处理,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 慢病毒包装、感染及鉴定

转染48 h的293T细胞和感染慢病毒48 h的K562细胞,荧光显微镜下均可观察到较强的GFP绿色荧光。将转染48~72 h后的包装细胞反复冻融3~4次离心取上清后再感染293T靶细胞48 h后,测定病毒滴度为4×10^7 U/ml。荧光显微镜下计数感染阳性细胞达(74.6±5.8)%。感染细胞经FQ-PCR和Western blot方法检测K562细胞中SHIP mRNA和蛋白均呈阳性表达,而在K562细胞和转染空载体细胞K562/FIV中,SHIP表达始终很低;上述结果证明慢病毒成功感染K562细胞(图1)。



1:K562/SHIP;2:K562/FIV;3:K562

图1 Western blot鉴定SHIP在K562细胞中的表达

2.2　*ship* 基因抑制 K562 细胞增殖活性

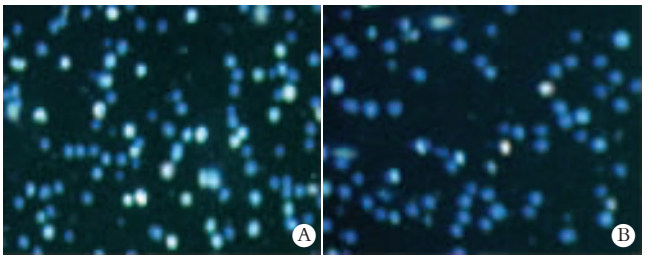
2.2.1　MTT　　对 K562/SHIP 细胞和 K562/FIV 细胞的生长、形态进行比较发现,转染野生型 *ship* 基因明显地抑制 K562 细胞生长:转染 1 d 时 K562/SHIP 细胞增殖抑制率(2.4 ± 0.2)%虽高于 K562/FIV(1.7 ± 0.4)%,但无统计学意义($P > 0.05$),自转染 2 ~ 7 d 出现差异,K562/SHIP 细胞增殖抑制率明显高于 K562/FIV 细胞和亲代 K562 细胞($P < 0.05$)。

2.2.2　集落形成实验　　半固体琼脂糖培养 10 d 后发现,K562/SHIP 组集落形成减少(36.7 ± 7.1)%,所形成的集落包含的细胞数也偏少,有较多单个散在的细胞存在。而 K562/FIV 组所形成的集落多(77.7 ± 6.3)%,每个集落所包含的细胞数也较多,形成团块状。与转染空载体组相比,转染 SHIP 后对细胞集落形成具有明显的抑制作用($P < 0.01$)。

2.3　转染 *ship* 基因促进 K562 细胞凋亡

2.3.1　Hoechst33342 染色检测各转染组 K562 细胞早期凋亡

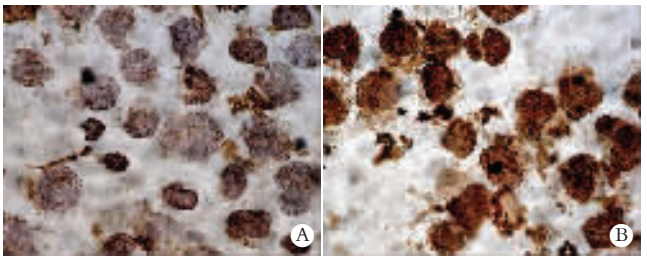
同时转染 5 d 时各组细胞经 Hoechst33342 染色检测早期凋亡,结果发现转染 *ship* 基因组 K562 细胞早期凋亡细胞数量明显高于转染空载体组和位转染组($P < 0.05$),后 2 组之间无统计学差异($P > 0.05$)(图 2)。



A: K562/FIV 组;B: K562/SHIP 组

图 2　转染 *ship* 基因和空载体 K562 细胞早期凋亡情况
(Hoechst33342 × 40)

2.3.2　TUNEL 法检测细胞凋亡　　TUNEL 法检测各组细胞凋亡率结果显示 K562/SHIP 组细胞凋亡率[(78.4 ± 16.6)%]明显高于 K562/FIV 组[(29.2 ± 8.6)%]和 K562 组[(32.5 ± 10.8)%],差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。



A: K562/FIV 组;B: K562/SHIP 组

图 3　转染 *ship* 基因和空载体 K562 细胞中晚期凋亡情况
(TUNEL × 400)

2.4　细胞周期分布

于 0、3、5 d 收集每组细胞 1×10^6 个,流式细胞仪分析结果表明 K562/SHIP 细胞主要表现为 G_0/G_1 期细胞增多、G_2/M 期细胞减少,PI 降低。说明 K562/SHIP 细胞较 K562/FIV 细胞及亲代 K562 细胞增殖能力降低(表 1)。

表 1　不同转染组 K562 细胞周期分布及细胞增殖指数($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	G_0/G_1(%)	S(%)	G_2/M(%)	PI
K562/SHIP 组	51.09 ± 87.90	19.07 ± 2.05	28.84 ± 3.69	0.31 ± 0.03[ab]
K562/FIV 组	35.92 ± 4.52	24.41 ± 4.65	39.67 ± 5.51	0.54 ± 0.05[b]
K562 组	34.42 ± 5.20	25.47 ± 5.46	40.11 ± 5.63	0.56 ± 0.04

a: $P < 0.05$,与 K562/FIV 组比较;b: $P < 0.05$,与 K562 组比较

3　讨论

SHIP 是继 PTEN 之后发现的又一个磷酸肌醇酯磷酸酶。该基因仅限于造血细胞表达,其主要作用是特异性降解三磷酸肌醇(PIP3)的 5′磷酸基团使 PIP3 降解为 3,4-二磷酸肌醇[PI(3,4)P2],从而负性调控磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路[1-3]。Kisseleva 等[4]对过表达 SHIP 的 293T 细胞增殖能力研究提示 SHIP 蛋白表达能抑制肿瘤细胞的增殖通路;Helgason 等[5]对敲除 *ship* 基因小鼠生长特性的研究发现 $ship^{-/-}$ 的小鼠周血白细胞异常增高、脾脏增大及肺部中性粒细胞侵润,与人类慢性粒细胞性白血病相似;罗建民等[6,7]首次报道白血病患者存在 *ship* 基因的功能结构域遗传学突变;并且有些突变在疾病完全缓解后消失;张苏江等[8]也在急性髓系白血病患者中发现了两种 *ship* 基因突变(A > T, Q1154L Q1153L)。我们前期研究表明 K562 细胞中 BCR/ABI 融合蛋白 p210 能抑制 *ship* 基因表达,应用甲磺酸伊马替尼或 siRNA 技术封闭 BCR/ABL 作用后,*ship* 基因表达水平升高,p-Akt 水平下降,细胞增殖率下降,凋亡率增加[9-11];这些都提示 *ship* 基因可能与白血病发病有关。

目前,有关基因功能的研究最直接有效的方法就是建立转基因和(或)基因敲除的动物模型。而在细胞水平上,采用的策略通常是通过转染目的基因使其在细胞株中过表达或利用干扰 RNA 技术使目的基因沉默。近来的研究表明,以人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)为基础构建的慢病毒(Lentivirus)载体因具有可感染非分裂细胞、实现目的基因稳定表达、转移基因片段容量较大,转染所需的病毒滴度可达 $10^7 \sim 10^8$ U/ml、不易诱发宿主免疫反应等优点而弥补了逆转录病毒载体和腺病毒载体的缺陷。本实验成功构建了携带野生型 *ship* 基因的慢病毒载体质粒,并将其转入人白血病细胞系 K562,经 FQ-PCR 和 Western blot 鉴定均证明质粒 DNA 稳定整合入 K562 基因组中。通过使 K562 细胞过表达 *ship* 基因,可以更直接地研究 SHIP 对 K562 细胞生物学行为的影响。

本研究通过 MTT 实验和肿瘤集落形成实验观察

到转染SHIP的K562细胞能够有效地抑制K562细胞的生长,表明外源性 *ship* 基因转染表达出的SHIP蛋白是有功能的,能够抑制K562细胞增殖。其作用机制可能是 *ship* 基因抑制了蛋白激酶B的磷酸化水平,从而减少了 bcl-X_L、cyclin D1 和 $NF\kappa B$ 等重要的肿瘤基因的转录。本研究应用膜联蛋白Ⅴ/碘化丙啶染色及TUNEL检查的结果显示:SHIP对K562细胞的影响主要是抑制细胞周期进展和促进细胞凋亡。由此推测 *ship* 基因缺失在白血病发病机制中可能具有重要作用,对其后继事件,如影响哪些下游信号转导通路等等,有待我们进一步研究。

参考文献:

[1] Geier S J, Algate P A, Carlberg K, *et al*. The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood [J]. Blood, 1997,89(6):1876-1885.

[2] Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, *et al*. SHIP is negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival[J]. Genes Dev, 1999,13(7):786-791.

[3] Xu Q, Simpson S E, Scialla T J, *et al*. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation[J]. Blood, 2003,102(3):972-980.

[4] Kisseleva M V, Cao L, Majerus P W. Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase Ⅳ inhibits Akt/protein kinase B phosphorylation and leads to apoptotic cell death[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8):6266-6272.

[5] Helgason C D, Antonchuk J, Bodner C, *et al*. Homeostasis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in SHIP-deficient mice[J]. Blood, 2003,102(10):3541-3547.

[6] Luo J M, Yoshida H, Komura S, *et al*. Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2003,17(1):1-8.

[7] 罗建民,刘泽林,郝洪岭,等.急性白血病细胞 *ship* 基因的突变分析[J].中华血液学杂志,2004,25(7):385-388.

[8] 张苏江,李建勇,施静艺,等.急性髓系白血病患者PDGFRβ和 *ship* 基因突变及其单核苷酸多态性研究[J].中华血液学杂志,2006,27(6):383-385.

[9] 刘小军,罗建民,杨 琳,等.慢性粒细胞性白血病中SHIP1基因的表达变化及机制探讨[J].解放军医学杂志,2008,33(6):701-703.

[10] 任金海,罗建民,杨敬慈,等.白血病细胞内 *ship* 基因表达及其对AKT磷酸化的影响[J].中华血液学杂志,2007,28(12):844-845.

[11] 任金海,罗建民,杜行严,等.伊马替尼对K562细胞内SHIP基因表达的影响及促凋亡作用[J].肿瘤,2007,27(11):853-856.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)15-1470-01

吲哚美辛联合对氨基苯甲酸治疗15例早期阴茎硬结症临床观察

张水文,臧 桐,孙凤岭,张国晖,张 勇,郭岩杰,郑清友 (北京军区总医院泌尿外科,北京 100700)

2001年3月至2007年12月,选择本科病程<1年的阴茎硬结症患者15例,采用吲哚美辛联合对氨基苯甲酸治疗,报告如下。

1 资料与方法

本组15例患者,年龄32~64岁,平均48岁,病程<1年。临床表现均有阴茎局部触痛、硬结、勃起时疼痛,影响性交快感,6例为阴茎勃起弯曲。体格检查:阴茎斑块最大为0.6 cm×0.5 cm×2.7 cm,最小者0.3 cm×0.3 cm×0.6 cm。斑块位于阴茎前段5例,中段7例,阴茎末段及根部3例。阴茎结节单发11例,多发3例,条索状1例。B超检查提示阴茎海绵体纤维化,X线均未见钙化及骨化阴影。

15例患者均给予吲哚美辛肠溶片(25 mg,3/d)联合对氨基苯甲酸(6 g,2/d)治疗,连续服用6个月,随访1~6年。

作者简介:张水文,男,湖北省黄石市人,博士,副主任医师,主要从事前列腺、阴茎等男性学方面的研究。E-mail: zhang180308@163.com

收稿日期:2008-10-22;修回日期:2009-02-24

2 结果

15例患者均觉疼痛不同程度减轻,其中11例硬结明显软化缩小,4例硬结也有不同程度软化;13例患者阴茎勃起后无明显不适,随访1~6年,3例复发。6例阴茎勃起弯曲者经治疗后5例弯曲角度纠正满意,1例仍影响性交,选择手术治疗。

3 讨论

阴茎硬结症是阴茎白膜结缔组织纤维化成为纤维瘢痕、斑块或有钙化,常局限于阴茎筋膜与白膜之间,其间纤维细胞增殖及慢性炎症细胞浸润,是一种良性的慢性病变[1]。其病因目前尚不清楚,阴茎外伤和侵入性检查以及免疫异常、维生素E缺乏、糖尿病、痛风、高血压、动脉粥样硬化等全身性疾病[2]等均可能诱发本病。

本病多见于中年人,有发展缓慢的阴茎体部硬结,早期常

(下转1474页)