网络出版时间:2016-8-10 11:04:48 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.003.html

Shp2 表达沉默对 ATPR 诱导 K562 细胞分化作用的影响

丁 然,王静静,葛金芳,陈飞虎

摘要 **目的** 研究 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(ATPR)在诱导慢性粒细胞白血病 K562 细胞分化过程中蛋白酪氨酸磷酸酶(Shp2)的作用。**方法** ATPR 作用 K562 细胞,CCK-8 法检测细胞生长抑制率;Q-PCR 和 Western blot 法检测 Shp2 表达;合成特异性荧光短链 Shp2 siRNA 链,抑制 Shp2 表达后,观察 ATPR 对 K562 细胞增殖和形态学影响。流式细胞术测定周期动力学和特异性分化指标 CD235a 表达,利用 Western blot 和 Q-PCR 法检测维甲酸受体 RARs 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** ATPR(10^{-5} mol/L)作用于 K562 细胞 72 h 时能最显著地抑制增殖,且 Shp2 的表达明显下降。靶向沉默 K562 细胞中 Shp2 基因的最佳序列为 PTPN-Homo-438,siRNA 与 Lipo 的最佳浓度比例为 1∶0.05。与 ATPR 单独用药组比较,siRNA-Shp2 + ATPR 组的 K562 细胞增殖活性升高,G_0/G_1 期细胞所占比例降低,S 期增多,CD235a 的表达下降,形态学较空白组变化不大。Shp2 转染沉默后用药组维甲酸受体 RARs 表达与单独用药组比较有差异。**结论** Shp2 沉默后,ATPR 诱导 K562 细胞分化作用减弱,提示 ATPR 诱导 K562 细胞分化过程中,Shp2 可能发挥着作用。

关键词 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯;蛋白酪氨酸磷酸酶;K562 细胞;诱导分化;维甲酸受体
中图分类号 R 593.22;R 392.3;R 392.5;R 967;R 979.5
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1403-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.003

全反式维甲酸(all trans retinoic acid,ATRA)作为分化诱导剂的代表已广泛应用于临床上治疗急性早幼粒细胞性白血病[1]。但长期使用 ATRA 会导致多种不良反应,制约了其在临床上广泛应用[2]。课题组前期研究[3]对 ATRA 的碳链末端进行结构改造,经过药效学筛选,显示 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate,ATPR)具有较强的活性,并且可诱导多种肿瘤细胞分化成熟,有望成为一种新型的诱导分化剂。

2016-06-12 接收
基金项目:国家科技部"重大新药创新"科技重大专项(编号:2011ZX09401-021)
作者单位:安徽医科大学药学院,合肥 230032
作者简介:丁 然,男,硕士研究生;
陈飞虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:cfhchina@sohu.com

蛋白酪氨酸磷酸酶(Shp2)是 PTPs 胞内非受体型(non-receptor PTPs,NRPTPs)的一员,由 *ptpn*11 基因编码。Shp2 不仅通过调节包括 RAS 在内的多条信号通路,而且还与细胞存活、迁移、凋亡、分化等密切相关[4]。同时,编码基因 *ptpn*11 的突变在多种疾病如努南综合征、LEOPARD 综合征[5]、部分白血病[6-7]等多种肿瘤中发挥着重要作用。在血液系统中,造血祖细胞对造血生长因子的刺激可以通过 Shp2 突变体而变得敏感[8],并且 Shp2 对造血细胞的发育也十分重要[9]。Shp2 被认为是治疗肿瘤的靶点。该研究以 K562 细胞为研究对象,通过小分子干扰 RNA(siRNA)技术,建立 Shp2 表达沉默模型,探究 ATPR 在诱导 K562 细胞分化过程中 Shp2 所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 ATPR(安徽医科大学药学院);ATRA(美国 Sigma 公司);RPMI-1640 培养液(上海碧云天公司);胎牛血清(杭州四季青公司);瑞氏-吉姆萨染液(生产批号:20150717,南京建成生物科技研究所);CCK-8(批号:BB150091)、细胞周期检测试剂盒(批号:88150071)(上海贝博生物公司);TRIzol(美国 Ambion 公司);Lipofectamine 2000、Shp2 引物及 RARs 引物(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒和 Q-PCR 试剂盒(美国 Vazyme 公司);siRNA(苏州吉玛基因股份有限公司);抗 β-actin、抗 Shp2、抗 RARα、抗 RARβ 抗体(美国 Immunoway 公司);抗 RARγ 抗体(美国 Santa 公司)。

1.2 细胞培养 K562 细胞由安徽医科大学药学院李晓峰馈赠,使用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养液进行培养,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中生长,取对数期生长的细胞进行试验。

1.3 ATPR 对 K562 细胞增殖及 Shp2 表达的影响

1.3.1 CCK-8 法测定 ATPR 对 K562 细胞生长增殖的影响 将 K562 细胞接种至 96 孔培养板中,浓度为 5×10^4/ml,体积为 100 μl。实验分组为:空白组、溶剂对照组(含 0.02% 无水乙醇)、ATRA 组(10^{-5} mol/L)、ATPR 组(10^{-4} ~ 10^{-9} mol/L),每孔的终体

积为 200 μl,分别在 24、48、72 h 时加入 10 μl CCK-8,继续培养 4 h,测定吸光度(absorbance,A)值。

1.3.2 Q-PCR 法检测 K562 细胞中 Shp2 mRNA 表达 将 K562 细胞接种至细胞培养瓶中,浓度为 1×10^5/ml,实验分组为:空白组(RPMI-1640 培养液)、溶剂对照组(0.02% 无水乙醇)、ATRA 组(10^{-5} mol/L)及 ATPR 组(10^{-5} mol/L)。72 h 后,抽提细胞 RNA 并逆转录为 cDNA,根据 abmEVAGreen 2× PCR MasterMix 实验方法,以 β-actin 为内参,上机进行检测。

1.3.3 Western blot 法检测 K562 细胞中 Shp2 蛋白表达 实验按 1.3.2 分组处理 72 h 后,提取总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度,根据蛋白浓度决定上样量,依次进行电泳、转膜、封闭,Shp2 小鼠抗兔单克隆抗体(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,辣根酶标记的山羊抗兔二抗(1∶5 000)室温下孵育 2 h。洗涤、显影,根据蛋白条带测定光密度值,表示 Shp2 蛋白的表达强度。

1.4 制备并筛选沉默 K562 细胞内 Shp2 的 siRNA 最佳序列

1.4.1 siRNA 序列设计与制备 在 NCBI 数据库中查找 Shp2 mRNA 全序列,从 Shp2 编码区中寻找符合设计原则的靶序列,从而合成 Shp2-siRNA 序列。Shp2-siRNA 3 条序列为:PTPN-Homo-438 上游引物:5′-GUUGACAAGAGGAGUUGUTT-3′,下游引物:5′-AUCAACUCCUCUUGUCAACTT-3′;PTPN-Homo-948 上游引物:5′-GACAGAUCUUGUGGAACAUTT-3′,下游引物:5′-AUGUUCCACAAGAUCUGUCTT-3′;PTPN-Homo-1493 上游引物:5′-CUGAUGAGUAUGCUCUAAATT-3′,下游引物:5′-UUUAGAGCAUACUCAUCAGTT-3′。

1.4.2 siRNA 转染及分组 转染前,收集细胞,每孔接种 5×10^5 个细胞于 6 孔板中。实验分为:空白组、每条 siRNA 与 Lipo 按照 1∶0.08、1∶0.06、1∶0.05、1∶0.04 各分 4 组,配制不同比例 siRNA-Lipo 混合物。将 siRNA-Lipo 混合液加到培养瓶中,再加 4 ml Opti-MEM 培养基,摇匀,继续培养。

1.4.3 荧光强度观察转染效率 转染后,培养 6 h 后,利用激发波长为 480 nm、发射波长为 520 nm 的蓝激发光,采用荧光倒置显微镜观察 K562 细胞质中绿色荧光强度。

1.4.4 Western blot 法检测沉默后 Shp2 的蛋白表达 提取转染后各组 K562 细胞的总蛋白,根据蛋白浓度决定上样量,依次进行电泳、转膜、封闭,孵育 Shp2 一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜后,其后操作同 1.3.3。

1.5 Shp2 转染沉默后 ATPR 对 K562 细胞诱导分化的影响

1.5.1 CCK-8 法检测转染后细胞增殖状况 实验分组:空白组(RPMI-1640 培养液)、ATRA 组(10^{-5} mol/L)、ATPR 组(10^{-5} mol/L)、Shp2 沉默不加药组(siRNA-Lipo)、siRNA-Lipo + ATRA 组以及 siRNA-Lipo + ATPR 组。实验方法同 1.3.1。

1.5.2 细胞形态学观察 将 K562 细胞接种于 6 孔板中,细胞浓度为 1×10^5/ml,实验分组同 1.5.1。药物处理 72 h 后,收集细胞,PBS 洗涤 2 ~ 3 次,用 PBS 重悬、混匀,滴加在载玻片上,自然风干,依次滴加瑞氏 - 吉姆萨染液 A 液和 B 液,流水冲洗、干燥,观察并拍摄(×400)油镜下的细胞。

1.5.3 细胞周期和 DNA 倍体分析 将 K562 细胞接种于 6 孔板中,细胞浓度为 1×10^5/ml,实验分组同 1.5.1。药物处理 72 h 后,收集细胞,洗涤,加入 75% 冰乙醇 2 ml,-20 ℃固定 1 h 或 4 ℃过夜(起固定作用)。用 200 ~ 500 μl 冷 PBS 重悬细胞,加入 Rnase A 溶液 20 μl,37 ℃水浴 30 min,然后加入 400 μl PI 染液,轻轻混匀后避光 4 ℃孵育 30 min ~ 1 h,使用 BD FACSVerse™ 流式细胞仪检测结果。

1.5.4 细胞表面分化抗原检测 将 K562 细胞接种于 6 孔板中,细胞浓度为 1×10^5/ml,实验分组同 1.5.1。72 h 后收集细胞,用 PBS 调整各组细胞密度为 1×10^6 个/ml,加入 CD235a-PE 单克隆抗体,充分涡旋后,避光 4 ℃孵育 20 min,使用流式细胞仪检测结果。

1.5.5 Q-PCR 法检测 K562 细胞中 RARs mRNA 表达 将 K562 细胞接种于细胞培养瓶中,细胞浓度为 4×10^5/ml,实验分组同 1.5.1,72 h 后,按 TRIzol 说明书提取 K562 细胞的 RNA,逆转录获得 cDNA,根据 Q-PCR 试剂盒说明书按比例进行上样,以 β-actin 为内参,上机进行检测。引物序列见表 1。

1.5.6 Western blot 法检测 RARα、RARγ 蛋白的表达 将 K562 细胞接种于细胞培养瓶中,细胞浓度为 4×10^5/ml,实验分组同 1.5.1,提取各处理组 K562 细胞的总蛋白,并进行定量。根据蛋白浓度决定上样量,依次进行电泳、转膜、封闭,并孵育相应一抗,4 ℃过夜。随后操作同 1.3.3。

1.6 统计学处理 采取 SPSS 17.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析。

表1 Q-PCR 引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
RARα	F: AAGTCCTCAGGCTACCACTATG
	R: CTTCTTGTTTCGGTCGTTTC
RARβ	F: GGAATGACAGGAACAAGAAA
	R: GGCAGAGTGAAGGGAAAG
RARγ	F: CTCCTCGGGTCTACAAGCC
	R: TTCCGGTCATTTCGCACA
Shp2	F: TGGGAAAGAAGCAGAGAAA
	R: CGCACAGAAAGAACAAAATC
	F: GACATCCGCCAAAGACCTG
	R: GACATCCGCAAAGACCTG

2 结果

2.1 ATPR 对 K562 细胞增殖及 Shp2 表达的影响

2.1.1 ATPR 对 K562 细胞增殖的影响 溶剂对照组的 A_{490} 值与空白组比较差异无统计学意义，说明无水乙醇(0.02%)作为药物溶剂对细胞活性无影响。显微镜下观察加药后各组细胞显示，ATPR(10^{-4} mol/L)作用于 K562 细胞时细胞形态发生皱缩，细胞出现大面积凋亡；其他各组 ATPR 作用 24 h 时对 K562 细胞增殖无影响，作用 48、72 h 后，细胞发生不同程度的抑制增殖作用。10^{-5} mol/L ATPR 作用 72 h 时 K562 细胞增殖抑制最明显($P<0.01$)。见表 2。

2.1.2 ATPR 作用于 K562 细胞 72 h 后 Shp2 mRNA 表达变化 K562 细胞在 ATPR(10^{-5} mol/L)作用 72 h 后，与溶剂对照组比较，其 Shp2 mRNA 的表达明显下降($F=87.23$，$P<0.01$)。见图 1。

2.1.3 ATPR 作用于 K562 细胞 72 h 后 Shp2 蛋白表达变化 Western blot 结果显示，与溶剂对照组比较，ATPR(10^{-5} mol/L)作用 72 h 后 K562 细胞中 Shp2 蛋白表达降低($F=75.36$，$P<0.01$)。见图 2。

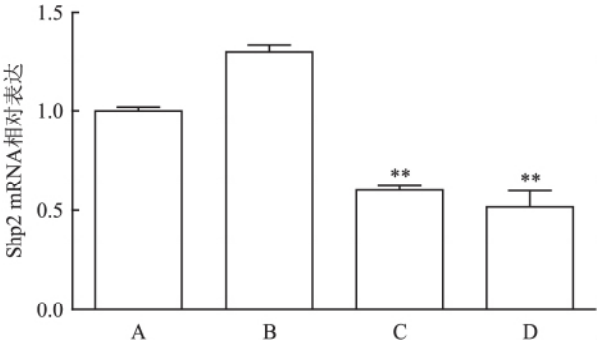


图1 ATPR 对 K562 细胞中 Shp2 mRNA 的表达影响($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

A: 空白组; B: 溶剂对照组; C: ATRA(10^{-5} mol/L)组; D: ATPR(10^{-5} mol/L)组; 与溶剂对照组比较: $^{**}P<0.01$

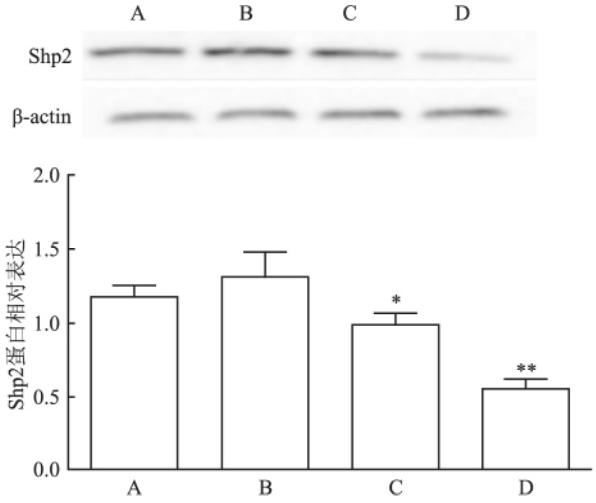


图2 ATPR 对 K562 细胞中 Shp2 蛋白的表达影响($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

A: 空白组; B: 溶剂对照组; C: ATRA(10^{-5} mol/L)组; D: ATPR(10^{-5} mol/L)组; 与溶剂对照组比较: $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

2.2 筛选 Shp2 siRNA 与 Lipofectamine 2000 最佳浓度和比例

2.2.1 荧光法测定各条 Shp2-siRNA 转染效率 本

表2 ATPR 对 K562 细胞增殖的影响($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	浓度(mol/L)	A_{490} 值		
		24 h	48 h	72 h
空白		1.619±0.035	2.192±0.007	2.759±0.010
溶剂对照		1.569±0.046	2.126±0.007	2.743±0.036
ATPR	10^{-4}	0.703±0.032**	0.799±0.086**	1.152±0.052**
	10^{-5}	1.521±0.023	1.608±0.092**	2.143±0.022**
	10^{-6}	1.565±0.021	1.906±0.009**	2.268±0.046**
	10^{-7}	1.608±0.031	2.128±0.012	2.548±0.061**
	10^{-8}	1.641±0.031	2.205±0.091	2.678±0.050
	10^{-9}	1.646±0.057	0.438±0.007	2.799±0.080
ATRA	10^{-5}	1.525±0.030	1.504±0.047*	2.202±0.046**

与溶剂对照组比较: $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

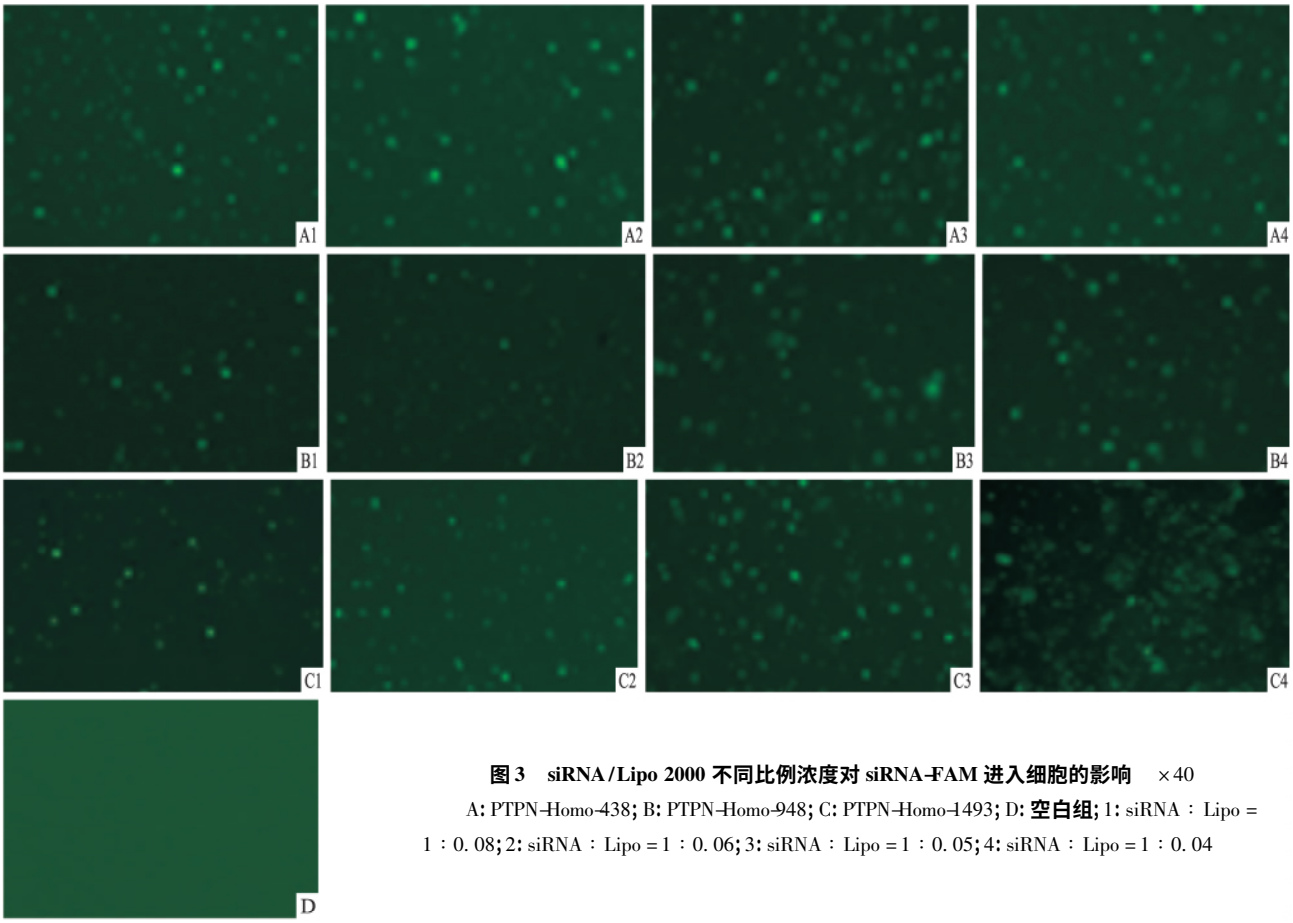


图3 siRNA/Lipo 2000 不同比例浓度对 siRNA-FAM 进入细胞的影响 ×40

A: PTPN-Homo-438; B: PTPN-Homo-948; C: PTPN-Homo-1493; D: **空白组**; 1: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.08; 2: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.06; 3: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.05; 4: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.04

研究中设计合成的 siRNA **其** 3′**端为** FAM **荧光标记。空白组(** siRNA/Lipo 2000 **比例为** 0 μl ∶ 0 μl**) 几乎无荧光表达,当** siRNA/Lipo 2000 **为其他比例时荧光倒置显微镜下均能观察到不同程度荧光。通过比较各组荧光程度显示** PTPN-Homo-438 **组和** PTPN-Homo-1493 **组荧光表达较多。见图** 3。

2.2.2 各条 siRNA **序列转染对** K562 **细胞中** Shp2 **蛋白表达的影响 结果显示:** K562 **细胞经转染后,与空白组比较,**Shp2 **的蛋白质表达下降,与其他各组比较,**PTPN-Homo-438 **组下降明显,**PTPN-Homo-438/Lipo 2000 **比值为** 1 ∶ 0.05 **时,**Shp2 **蛋白表达低于其他各组,差异有统计学意义(** $P<0.01$**),见图** 4。

2.3 Shp2 基因转染沉默后 ATPR 对 K562 细胞分化的影响

2.3.1 转染沉默 Shp2 **基因后** ATPR **对** K562 **细胞增殖的影响 转染** 24 h **后,各组细胞生长无明显变化,**48 h **时** ATPR **组与空白组比较细胞增殖降低(** $P<0.01$**),**siRNA-Shp2 + ATPR **组细胞生长较** ATPR **组增加,**72 h **后** ATPR **组与空白组比较细胞增殖明显降低(** $P<0.01$**),**siRNA-Shp2 + ATPR **组细胞生长比** ATPR **组显著增多(** $P<0.01$**),而**siRNA-Shp2 +

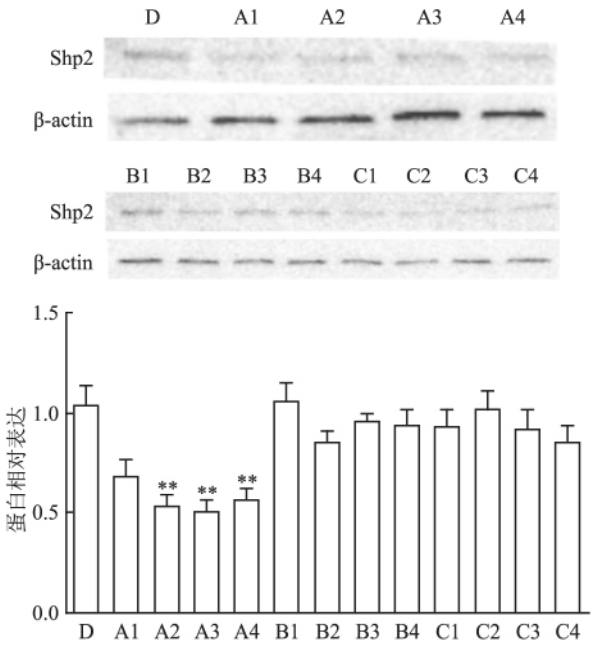


图4 不同 siRNA 序列转染对 siRNA-Shp2 蛋白表达的影响($n=3, \bar{x}\pm s$**)**

A: PTPN-Homo-438; B: PTPN-Homo-948; C: PTPN-Homo-1493; D: **空白组**; 1: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.08; 2: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.06; 3: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.05; 4: siRNA ∶ Lipo = 1 ∶ 0.04; **与空白组比较:** $^{**}P<0.01$

ATPR 组与 siRNA-Lipo 组之间差异无统计学意义。见图 5。

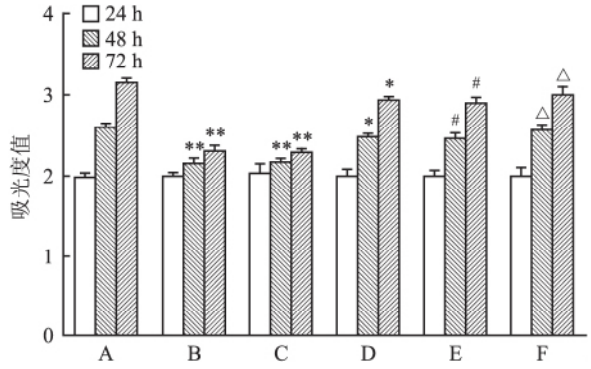


图 5 转染沉默 Shp2 基因后加 ATPR 对细胞增殖的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

A: 空白组; B: ATRA(10^{-5} mol/L) 组; C: ATPR(10^{-5} mol/L) 组; D: siRNA-Lipo 组; E: siRNA-Lipo + ATRA 组; F: siRNA-Lipo + ATPR 组; 与空白组比较: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与 ATRA 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与 ATPR 组比较: $^{\triangle}P<0.05$

2.3.2 Shp2 基因转染沉默后 ATPR 对细胞形态学影响 ATPR(10^{-5} mol/L) 对 K562 细胞作用 72 h 后形态学变化见图 6。结果显示: 空白组出现细胞呈圆形、体积较大、核/质比例大、核圆形等特点。用药组的细胞出现细胞和细胞核体积缩小、核质比例缩小、核偏于一侧等细胞分化程度成熟的形态学状态。然而 siRNA-Shp2 + ATPR 组染色后倒置显微镜所呈现的细胞状态跟空白组较为相似,并没有出现明显的细胞开始分化所表现出的现象。

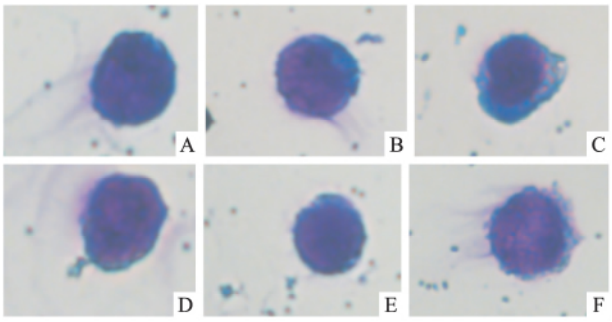


图 6 ATPR 作用 72 h 后 K562 细胞的形态学变化 ×400

A: 空白组; B: ATRA(10^{-5} mol/L) 组; C: ATPR(10^{-5} mol/L) 组; D: siRNA-Lipo 组; E: siRNA-Lipo + ATRA 组; F: siRNA-Lipo + ATPR 组

2.3.3 Shp2 基因转染沉默后 K562 细胞周期及 DNA 倍体分析 细胞周期分析结果显示,ATRA(10^{-5} mol/L) 和 ATPR(10^{-5} mol/L) 组作用于 K562 细胞 72 h 后,与空白组比较,S 期细胞所占百分比明显下降,G_0/G_1 期细胞百分比上升。当 Shp2 基因转染沉默后,siRNA-Shp2 + ATPR 组与 siRNA-Lipo 组比较差异无统计学意义($F=183.559$, $P>0.05$),siRNA-Shp2 + ATPR 组与 ATPR 组比较差异有统计学意义($F=42.397$, $P<0.05$)。见图 7。

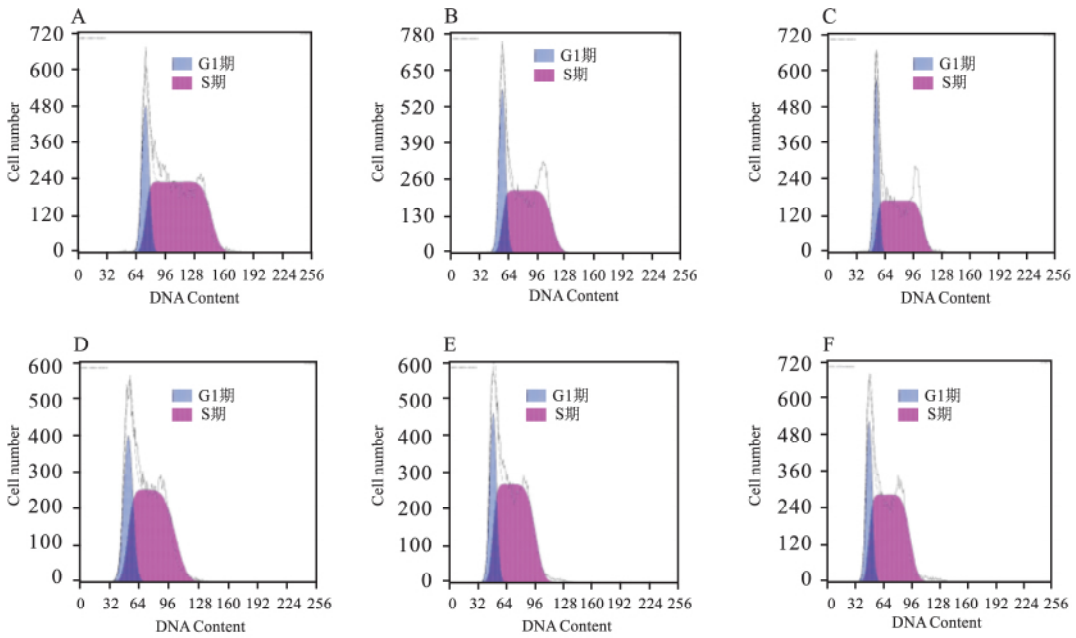
2.3.4 Shp2 基因转染沉默后细胞表面分化抗原 CD235a 表达改变 CD235a 抗原为血型糖蛋白 A (glycophorin A) 抗原,是红系特异抗原。ATPR 处理 K562 细胞 72 h 后,与空白组比较,结果显示 CD235a 表达上升($P<0.01$)。当 Shp2 基因转染沉默后,siRNA-Lipo + ATPR 组与 ATPR 组比较,CD235a 表达变化明显,差异有统计学意义($F=342.071$, $P<0.01$)。见图 8。

2.3.5 Shp2 基因转染沉默后 K562 细胞中 RARs mRNA 的表达变化 当 K562 细胞经过 ATPR(10^{-5} mol/L) 作用 72 h 后,与空白组比较,RARα 的 mRNA 表达下降,而 RARγ 的 mRNA 表达上升。当 Shp2 基因转染沉默后,siRNA-Lipo + ATPR 组细胞的 RARα 和 RARγ mRNA 表达与 siRNA-Lipo 之间差异无统计学意义($F_{RAR\alpha}=2.908$、$F_{RAR\gamma}=0.727$, $P>0.05$),而 siRNA-Lipo + ATPR 组与 ATPR 组比较,其 RARα 和 RARγ 组的 mRNA 表达差异有统计学意义($F_{RAR\alpha}=17.355$、$F_{RAR\gamma}=44.145$, $P<0.01$)。见图 9。

2.3.6 Shp2 基因转染沉默后 K562 细胞中 RARα、RARγ 蛋白的表达变化 与空白组比较,ATPR(10^{-5} mol/L) 组 RARα 的蛋白表达下降($F=83.183$, $P<0.05$),RARγ 的蛋白表达上升($F=124.307$, $P<0.01$)。然而当 Shp2 基因转染沉默后,siRNA-Lipo + ATPR 组细胞 RARα 和 RARγ 蛋白表达与 siRNA-Lipo 之间差异无统计学意义($F_{RAR\alpha}=3.012$、$F_{RAR\gamma}=4.165$, $P>0.05$),而 siRNA-Lipo + ATPR 组与 ATPR 组比较,其 RARα 和 RARγ 组的蛋白表达差异有统计学意义($F_{RAR\alpha}=29.580$、$F_{RAR\gamma}=40.790$, $P<0.01$)。见图 10。

3 讨论

慢性粒细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML) 是一类影响血液及骨髓的恶性肿瘤,其特点是产生不成熟的白细胞,这些白细胞聚集于骨髓,致使骨髓的造血被抑制;并且能够通过血液在全身扩散。90% 以上 CML 患者有费城染色体(Ph),(t9;22)(q34;q11) 染色体易位并形成 BCR/ABL 融合基因,从而致使疾病产生[10]。研究[11]显示,Shp2



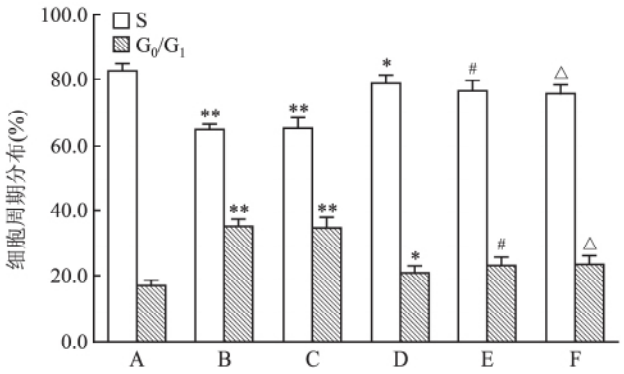


图7 ATPR 作用 72 h 后 K562 细胞周期的变化($n=3, \bar{x} \pm s$)

A: 空白组; B: ATRA(10^{-5} mol/L) 组; C: ATPR(10^{-5} mol/L) 组; D: siRNA-Lipo 组; E: siRNA-Lipo + ATRA 组; F: siRNA-Lipo + ATPR 组; 与空白组比较: $^{**}P<0.01$; 与 ATRA 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与 ATPR 组比较: $^{\triangle}P<0.05$

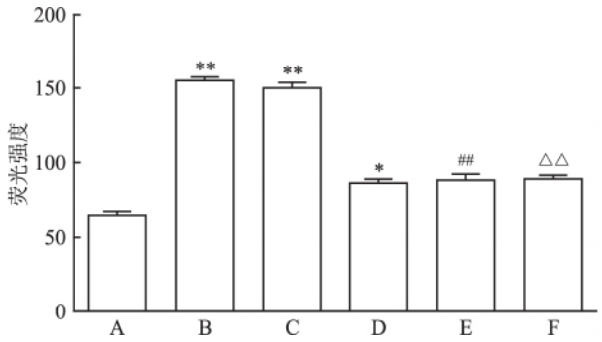


图8 ATPR 对 K562 细胞表面分化抗原 CD235a 表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

A: 空白组; B: ATRA(10^{-5} mol/L) 组; C: ATPR(10^{-5} mol/L) 组; D: siRNA-Lipo 组; E: siRNA-Lipo + ATRA 组; F: siRNA-Lipo + ATPR 组; 与空白组比较: $^{**}P<0.01$; 与 ATRA 组比较: $^{\#\#}P<0.01$; 与 ATPR 组比较: $^{\triangle\triangle}P<0.01$

参与 BCR / ABL 信号通路,与费城染色体阳性白血病的发生密切相关。本研究以 K562 细胞为研究对象,通过 Q-PCR 和 Western blot 法检测证实,当 ATPR 作用于 K562 细胞时,其 Shp2 的表达明显降低,说明 K562 细胞被 ATPR 作用过程中,Shp2 可能发挥着作用。为了进一步证实 Shp2 在 ATPR 诱导 K562 细胞分化过程中的作用,本研究通过小分子干扰 RNA(siRNA)技术建立 Shp2 表达沉默模型来进行研究。荧光法和 Western blot 法结果表明: PTPN-Homo-438 与 Lipo 比例为 1∶0.05 时 Shp2 蛋白表达最低,故选用此条件进行转染。

课题组前期研究[12]证实 ATPR 对 K562 细胞具有诱导分化作用,然而当 Shp2 被转染沉默后,CCK-8 检测结果表明: 靶向沉默 Shp2 基因 6 h 后加入 ATPR,用药 72 h 后,siRNA-Shp2 + ATPR 组与 ATPR 组相比细胞生长显著增多,表明 ATPR 作用后,siRNA-Shp2 + ATPR 组细胞增殖明显高于 ATPR 组。形态学变化可作为细胞分化程度的重要指标[13],并且能够反映出诱导分化剂的诱导分化能力。瑞氏染色后结果显示 K562 细胞被 ATPR 作用 72 h 后,细胞形态学趋向于分化成熟方向,然而 siRNA-Shp2 + ATRA 组和 siRNA-Shp2 + ATPR 组形态学变化没有 ATPR 组明显,当 Shp2 被转染沉默后,ATPR 诱导

K562 细胞分化的形态学变化减弱。

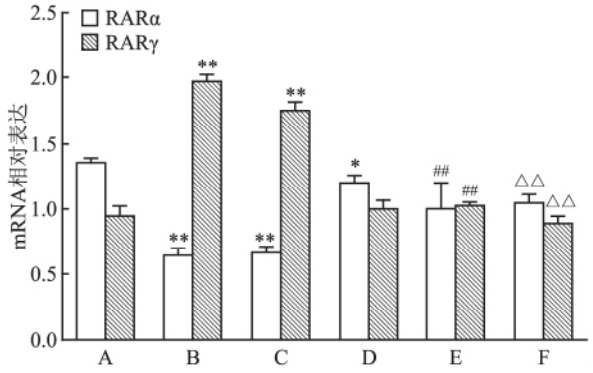


图 9 ATPR 作用 72 h 后 K562 细胞 RARs mRNA 表达量的变化($n=3, \bar{x} \pm s$)

A: 空白组; B: ATRA(10^{-5} mol/L) 组; C: ATPR(10^{-5} mol/L) 组; D: siRNA-Lipo 组; E: siRNA-Lipo + ATRA 组; F: siRNA-Lipo + ATPR 组; 与空白组比较: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与 ATRA 组比较: $^{\#\#}P<0.01$; 与 ATPR 组比较: $^{\triangle\triangle}P<0.01$

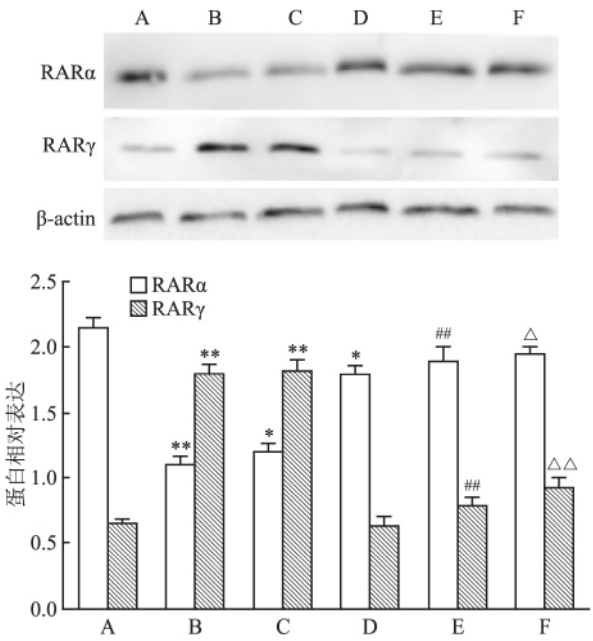


图 10 ATPR 作用 72 h 后 K562 细胞 RARs 蛋白表达量的变化($n=3, \bar{x} \pm s$)

A: 空白组; B: ATRA(10^{-5} mol/L) 组; C: ATPR(10^{-5} mol/L) 组; D: siRNA-Lipo 组; E: siRNA-Lipo + ATRA 组; F: siRNA-Lipo + ATPR 组; 与空白组比较: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与 ATRA 组比较: $^{\#\#}P<0.01$; 与 ATPR 组比较: $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$

细胞 S 期比例高是恶性肿瘤细胞的周期分布特点之一,分化后细胞 G0/G1 期比例升高[14]。根据细胞周期结果显示: ATPR 作用 72 h 后,K562 细胞中 G_0/G_1 期比例升高,S 期细胞比例降低。当 Shp2 基因被沉默后,siRNA-Shp2 + ATPR 组细胞周期变化与 ATPR 组比较有明显差异,说明 Shp2 对 ATPR 作用 K562 细胞有影响。CD235a 抗原为血型糖蛋白 A 抗原,是红系特异抗原,可作为 ATPR 诱导 K562 细胞分化的重要标志[15],流式结果显示,ATPR 处理 K562 细胞 72 h 后,与空白组比较,CD235a 表达上升,证实 K562 细胞可被 ATPR 诱导向红系分化。当 Shp2 基因转染沉默后,siRNA-Shp2 + ATPR 组的 CD235a 表达变化相较于 ATPR 组明显降低,说明当 Shp2 被转染沉默后,ATPR 诱导 K562 细胞分化作用降低。

研究[16]显示,维甲酸类药物是通过与细胞内的维甲酸受体结合,调节体内生理过程。RARs 在不同的细胞中的分布有差异,因此 ATPR 在各种细胞中刺激的 RARs 亚型也不一样。前期实验[12]结果显示,当 ATPR 诱导 K562 细胞分化过程中,RARα 表达下降,RARγ 表达上升,RARβ 表达没有明确变化。根据 Western blot 和 Q-PCR 结果显示: 当转染沉默 Shp2 后,siRNA-Shp2 + ATPR 组的 RARα 和 RARγ 的表达变化与 siRNA-SHP2 组比较差异无统计学意义,而 siRNA-Shp2 + ATPR 组与 ATPR 组比较,RARα 和 RARγ 的表达变化明显,提示 K562 细胞在被 ATPR 通过 RARs 作用的过程中,Shp2 可能参与着作用。

综上所述,PTPN-Homo-438 可有效沉默 Shp2 基因的表达; ATPR 可显著抑制 K562 细胞增殖并致使其分化程度上升; 然而当 Shp2 被转染沉默后,ATPR 对 K562 细胞抗增殖和诱导分化作用明显降低甚至消失,提示 Shp2 可能是介导抗白血病作用的主要环节。

参考文献

[1] Brown G, Hughes P. Retinoid differentiation therapy for common types of acute myeloid leukemia [J]. Leuk Res Treatment, 2012, 2012: 939021.

[2] Sanz M A, Montesinos P. How we prevent and treat differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia [J]. Blood, 2014, 123(18): 2777-82.

[3] 沈 娟, 陈飞虎, 石静波, 等. 维甲酸衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(11): 86-9.

[4] Qiu W, Wang X, Romanov V, et al. Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2(PTPN11) [J]. BMC Structural Biology, 2014, 14: 10.

[5] Digilio M C, Conti E, Sarkozy A, et al. Grouping of multiple lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene [J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(2): 389-94.

[6] Nabinger S C,Chan R J. Shp2 function in hematopoietic stem cell biology and leukemogenesis [J]. Curr Opin Hematol,2012,19(4):273 - 9.

[7] Chen L,Chen W,Mysliwski M,et al. Mutated Ptpn11 alters leukemic stem cell frequency and reduces the sensitivity of acute myeloid leukemia cells to Mcl1 inhibition [J]. Leukemia,2015,29(6):1290 - 300.

[8] Loh M L, Vattikuti S, Schubbert S,et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP2 phosphatase in leukemogenesis [J]. Blood, 2004,103(6):2325 - 31.

[9] Broxmeyer H E,Etienne-Jnlan M,Gotoh A,et al. Hematopoietic colony formation from human growth factor-dependent TF1 cells and human cord blood myeloid progenitor cells depends on SHP2 phosphatase function [J]. Stem Cells Dev,2013,22(6):998 - 1006.

[10] Sun W T,Xiang W,Ng B L,et al. Inhibition of isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase augments BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibition induced apoptosis in chronic myeloid leukaemia [J]. Exp Hematol,2016 ,44(3):189 - 93. e2.

[11] Chen J,Yu W M. Daino H,et al. SHP2 phosphatase is required for hematopoietic cell transformation by Bcr-Abl [J]. Blood,2007,109(2):778 - 85.

[12] 阮晶晶，陈飞虎，徐 佼，等. 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯对 K562 细胞分化和细胞周期的影响 [J]. 中国药理学通报，2009，25(9)：1238 - 43.

[13] 吴 菲，陈飞虎，洪凡青，等. ATPR 对 ECA-109、PANC-1、Hela 细胞增殖及分化的影响 [J]. 中国癌症杂志，2012，22(4)：257 - 63.

[14] Bastie J N, Balitrand N,Guillemot I, et al. Cooperative action of 1a,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid in NB4 acute promyelocytic leukemia cell differentiation is transcriptionally controlled [J]. Exp Cell Res, 2005, 310(2): 319 - 30.

[15] 陈 晶，李 欢，安 娜，等. TBLR1-RARα 融合基因对 K562 细胞向红系分化的影响 [J]. 中国实验血液学杂志，2015，23(6)：1702 - 8.

[16] Dawson H D,Collins G,Pyle R, et al. The Retinoic Acid Receptor-alpha mediates human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production [J]. BMC Immunol, 2008,9:16.

Effect of Shp2 gene silencing on the 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate inducing differentiation of K562 cells

Ding Ran,Wang Jingjing,Ge Jinfang,et al

(*School of Pharmacy,Anhui Medical University,Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To investigate the effect of protein tyrosine phosphatase Shp2 on 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate (ATPR) induced differentiation of K562 cells. ***Methods*** K562 cells were cultured and treated with ATPR at different concentrations. The proliferation of K562 cells was evaluated using CCK-8. The mRNA and protein expressions of Shp2 were detected by Q-PCR and Western blot . Lipofectamine 2000 transfection reagent was used to transfect the small interfering RNA (siRNA) in K562 cells. Using CCK-8 assay to detect the proliferation of K562 cells. Morphologic changes were observed *via* Wright-Giemsa staining. Using FCS to observe the expression of an exclusive cell surface antigen CD235a and the distribution of cell cycle on K562 cells. The mRNA and protein expressions of retinoic acid receptors (RARα and RARγ) were detected by Q-PCR and Western blot, respectively. ***Results*** The best inhibitory effect reached the peak at 72 h. The expressions of Shp2 remarkably decreased. Detected through fluorescence microscope and Western blot, the PTPN-Homo-438 and the concentration ratio of the siRNA and Lipo was 1∶0.05. The gene silencing efficacy was the best. Compared with the ATPR group, the proliferation of K562 cells were not inhibited by treatment with ATPR (10^{-5} mol/L) . The percentage of cells in G0/G1 phase was decreased while S-phase cells were increased, and the expression level of the maturation specific cell surface marker CD235a decreased in K562 cells. Q-PCR and Western blot results showed that RARα mRNA and protein expressions of siRNA + ATPR group were significantly increased than ATPR group. RARγ mRNA and protein expressions of siRNA + ATPR group were decreased than ATPR group. ***Conclusion*** The effect of ATPR induced differentiation of K562 cells might be involved with the Shp2 gene.

Key words 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate; Shp2; K562 cells; inducing differentiation; retinoic acid receptor