

慢病毒载体介导 SHIP 基因抑制 K562 细胞增殖 及对 PI3K/Akt 信号通路的调控

杨琳, 罗建民, 刘小军, 温树鹏, 杜行严, 姚丽

Inhibitory effect of lentiviral vector-mediated SHIP gene transfection on proliferation of leukemia K562 cells and PI3K/Akt pathway regulation

Lin Yang, Jian-Min Luo, Xiao-Jun Liu, Shu-Peng Wen, Xing-Yan Du and Li Yao

河北医科大学第二医院
血液科,
河北 石家庄 050000

Department of Hematology,
The Second Affiliated Hospital,
Hebei Medical University,
Shijiazhuang, Hebei, 050000,
P.R. China

通讯作者: 罗建民

Correspondence to: Jian-Min Luo
Tel.: 86.311.66002841
Fax: 86.311.66002845
Email: luojm315@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金
资助项目 (No. 30240011);
河北省自然科学基金资助项目
(No. 2007000858)

Grants: National Natural Science
Foundation of China (No. 30240011);
Natural Science Foundation of Hebei
Province (No. 2007000858).

收稿日期: 2008-08-07

修回日期: 2008-11-12

[Abstract] **Background and Objective:** The hemopoietic-restricted Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) acts as a negative regulator for the proliferation and survival of hematopoietic cells by hydrolysing the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-generated second messenger, PtdIns(3,4,5)- P_3 (PI-3,4,5- P_3) to PtdIns(3,4)- P_2 (PI-3,4- P_2). This study was to investigate the biological function of SHIP gene in pathogenesis of leukemia cells by lentiviral vector-mediated SHIP transfection. **Methods:** Ectopic SHIP gene was transfected into leukemia K562 cells by the mediation of lentiviral vector. The mRNA level of SHIP was detected by fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (FQ-PCR). The expression of SHIP, Akt, and phosphorylated Akt (p-Akt) was detected by Western blot. The proliferation and morphology of K562 cells before and after SHIP gene transfection were compared. **Results:** The proliferation of K562 cells was inhibited after transfection; the proliferation inhibition rate was increased from (9.9±1.5)% on Day 3 to (40.6±2.3)% on Day 5. K562 cells were SHIP-negative but expressed high level of p-Akt which was down-regulated from 0.533 to 0.245 ($P<0.01$) after SHIP transfection. Apoptotic characteristics were showed in K562 cells after SHIP transfection. The early apoptosis rate was significantly higher in K562-wtSHIP-FIV-G cells than in K562-FIV-G cells and untransfected K562 cells [(38.3±4.3)% vs. (8.2±0.9)% and (7.7±0.8)%], $P<0.05$. **Conclusions:** SHIP gene can inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis via inactivating PI3K/Akt pathway. Loss of SHIP might activate PI3K/Akt pathway and promote the proliferation of K562 cells.

Key words: gene, SHIP, lentiviral vector, cell proliferation, p-Akt, apoptosis

【摘要】 背景与目的: SHIP 基因主要表达于造血细胞, 通过降解 PIP3 抑制 PI3K/Akt 信号通路而在造血细胞增殖和存活中起重要负调控作用。本研究通过慢病毒载体介导 SHIP 基因转染 K562 细胞, 探讨 SHIP 基因改变及功能丢失与白血病发病的关系。方法: 将携带 SHIP 基因的慢病毒感染 K562 细胞, FQ-PCR 法检测 SHIP 转录水平, Western blot 法检测转染后 SHIP 蛋白表达及 Akt 磷酸化水平的变化; 比较 SHIP 基因表达前后细胞增殖、形态的变化。结果: K562 细胞中 SHIP 蛋白阴性。以携带 SHIP 基因的慢病毒载体转染 K562 细胞后, 细胞增殖抑制率升高, K562-wtSHIP-FIV-G 细胞的增殖抑制率由转染第 3 天的 (9.9±1.5)% 升到第 5 天的 (40.6±2.3)%; 伴有 Akt 磷酸化水平明显减弱; 转染后, K562-wtSHIP-FIV-G 组细胞 p-Akt 的表达水平由 0.533 降低到 0.245 ($P<0.01$), 细胞增殖明显被抑制。此外, SHIP 蛋白还能使 K562 细胞出现凋亡特征, Hoechst33342 染色结果转染 wtSHIP 基因组 K562 细胞第 5 天早期凋亡率 [(38.3±4.3)%] 明显高于 K562-FIV-G 组细胞 [(8.2±0.9)%] 和未转染组 K562 细胞 [(7.7±0.8)%]。结论: SHIP 基因具有重要的抑制细胞增殖和促进凋亡的能力, SHIP 基因缺失导

致 K562 细胞 PI3K/Akt 信号途径失调,促进 K562 细胞增殖。

关键词:基因,肌醇 5'磷酸酶;慢病毒载体;细胞增殖;磷酸化蛋白激酶 B;细胞凋亡

中图分类号:R733.7;R730.23 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2009)04-0366-07

人类 SHIP (SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase) 基因是肌醇 5'磷酸酶家族的一个成员,主要表达在造血细胞。该基因定位于染色体 2q36-q37.1,其编码的 145 ku 的蛋白含有 SH2 区域,能选择性地去除肌醇-1,3,4,5-四磷酸和肌醇-3,4,5-三磷酸的 5'-磷酸,在免疫受体活化或生长因子刺激下发生磷酸化^[1,2]。研究显示,SHIP 是造血细胞增殖和存活的重要负调控因子。SHIP^{-/-}的小鼠会出现外周血白细胞异常增高、脾脏增大及肺部中性粒细胞浸润,与人类慢性粒细胞性白血病相似^[3],已发现急性白血病细胞中存在 SHIP 基因突变^[4,5]。我们前期研究表明,在 K562 细胞中 bcr/abl 抑制 SHIP 基因表达,应用甲磺酸伊马替尼或针对 bcr/abl 基因 siRNA 技术封闭 BCR/ABL 的作用后,SHIP 基因表达水平升高,同时 p-Akt 水平下降^[6,7];这些都提示 SHIP 基因可能与白血病发病有关。本研究中我们利用慢病毒载体将 SHIP 基因转入 K562 细胞,建立可稳定表达 SHIP 基因的细胞模型,进一步探讨 SHIP 基因改变及功能的丢失在白血病发病中的作用。

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 和包膜蛋白 VSG 由广州复能生物公司合成并鉴定。人胚肾细胞系 293T 包装细胞由中国医学科学院微生物所馈赠,用于慢病毒扩增,用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM 培养基培养。人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 为本室长期保存,用含 10% FBS RPMI-1640 培养基,加入 100 u/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的培养体系,在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度环境下培养。

1.1.2 主要试剂和材料 少量质粒提取试剂盒购自天根生物公司;细胞培养基 DMEM、RPMI-1640 购自 Gibco 公司;FBS 购自 Hyclone 公司;胰蛋白酶购自上海生物工程技术有限公司;绝对荧光定

量 PCR 试剂盒 (针对 SHIP) 由达安基因公司设计合成 (基因序列来自基因库,获取号 M77273)。p-Akt 抗体、Akt 抗体、SHIP 抗体、β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。Lipofectamine2000 购自美国 Introvigen 公司。全自动酶标仪为美国的 Bio-Rad Model 550。四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 为美国 Sigma 公司产品。

1.2 慢病毒包装和病毒滴度测定

1.2.1 慢病毒包装 采用脂质体 Lipofectamine2000 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 后荧光显微镜下观察 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,250×g 离心取上清,过滤并保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2.2 病毒滴度测定 冻存的病毒上清用无血清 DMEM 作 1×10⁻¹~1×10⁻⁶ 倍稀释,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 (2×10⁶/孔) 混合,37℃、5%CO₂ 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,并计数比例在 10 左右的荧光细胞数和病毒稀释比例。病毒滴度 (IU/mL) = 每毫升细胞悬液中表达 GFP 的细胞个数 × 相应的稀释倍数。

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%CO₂ 培养 72 h。取密度为 6×10⁶/mL 的对数生长期的 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 RPMI-1640 培养液继续培养。实验分 3 组,转染携带野生型 SHIP 基因慢病毒载体的细胞 (K562-wtSHIP-FIV-G) 为实验组,转染空载体的细胞 (K562-FIV-G) 和未转染组 (NC) 作为对照。48 h 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,上流式细胞仪检测表达 GFP 的细胞比例,计算转染效率。

1.4 实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测 SHIP 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 260 光密度值 (OD 值)。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'-CGA CAA GAA GCT GAG TCC CTT T-3',下游引物:5'-GGT AGT TAA GAT CCC CAA ACC AGA A-3',探针:5'-FAM-ACA TCA CTC ACC GCT TCA CGC ACC-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 \div 样本 RNA 的 OD₂₆₀ 值 $\times 1.05$ 。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 法检测转染后 K562 细胞内 SHIP 蛋白和 Akt 磷酸化水平

取 5×10^6 个细胞,加入 200 μL 预冷的蛋白裂解液 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h,冰浴下超声裂解 15 min。1000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 50 μg 样品蛋白质按 Western blot 试剂盒说明书步骤操作。蛋白质条带用扫描仪扫描后,ImageQuant5.1 软件对蛋白质条带灰度进行相对定量分析,并以 β -actin 条带作为参照。取目的蛋白条带对相应的 β -actin 相对灰度比值进行动态比较。

1.6 MTT 法检测转染后细胞的增殖情况

取各组细胞调整密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,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,实验重复 3 次。以未转染组作为对照,每日取出一板,加入 MTT 液 10 μL (10 mg/mL),孵育 4 h 后用平板离心机 250 $\times g$ 离心 10 min,弃上清,再加入 200 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 终止反应,应用全自动酶标仪测 490 nm 处吸光度值 (A 值),计算增殖抑制率,根据时间及增殖抑制率值绘制生长曲线。增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.7 细胞形态学观察

收集转染 5 天的 K562-wtSHIP-FIV-G、K562-FIV-G 细胞和未转染组细胞,离心,PBS 洗 2 次,涂片 Wright's 染色,光镜下观察细胞形态变化。同时用透射电镜观察细胞超微结构变化:4% 戊二醛固定过夜,1% 锇酸固定 1 h,PBS 充分清洗。梯度乙醇脱水,丙酮浸透,包埋,超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬双染,HITACHI 1200ES 型透射电镜观察并拍照。

1.8 荧光染色检测细胞凋亡改变

将 1×10^6 个细胞接种于 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,Hoechst33342 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 Hoechst 着色,正常细胞核 Hoechst 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 个细胞核,计算凋亡细胞百分率。PI 检测中晚期凋亡:PI 染色呈黄色,棕色或红色为中晚期凋亡或坏死细胞。

1.9 统计学处理

SAS8.0 统计软件分析处理,组间比较采用二因素二水平析因设计方差分析 (Factorial ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒包装、感染及鉴定

荧光显微镜下可观察到转染 48 h 的 293T 细胞和感染慢病毒 48 h 的 K562 细胞中有较强的绿色荧光。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,测定病毒滴度为 4×10^7 IU/mL。荧光显微镜下计数感染阳性细胞达 $(74.6 \pm 5.8)\%$ 。感染细胞经 FQ-PCR 扩增出 SHIP mRNA 表达明显增强,Western blot 法检测 K562 细胞中 SHIP 蛋白也呈阳性表达,而在未转染组 K562 细胞和转染空载体的 K562-FIV-G 细胞中,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,图 2)。

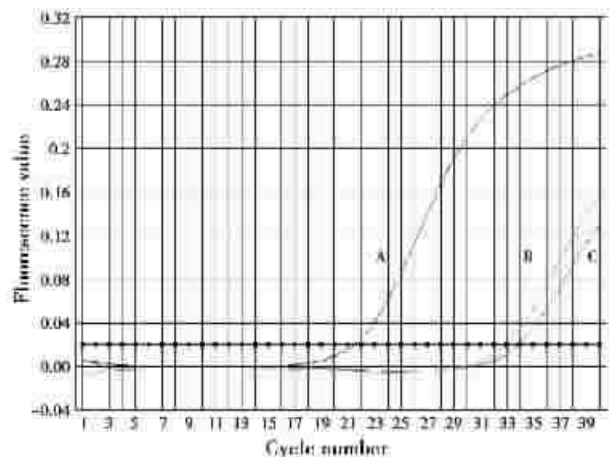


图 1 不同转染组 SHIP 基因表达情况

Figure 1 Expression of SHIP mRNA in K562 cells after transfection

A: K562 cells transfected with wtSHIP (K562-wtSHIP-FIV-G);
B: K562 cells transfected with empty vector (K562-FIV-G);
C: untransfected K562 cells.

2.2 SHIP 蛋白对细胞增殖的影响

转染野生型 SHIP 基因使 K562 细胞增殖明显减慢,与转染空载体组和未转染组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$),后两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。转染第 3 天细胞增殖开始出现明显区别,K562-wtSHIP-FIV-G 细胞的增殖抑制率由第 3 天的 $(9.9 \pm 1.5)\%$ 升到第 5 天的 $(40.6 \pm 2.3)\%$,见图 3。

转染前细胞透明,折光性好,边缘光滑完整,细

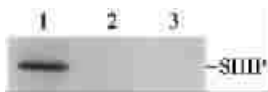


图 2 不同转染组 SHIP 蛋白表达情况

Figure 2 Expression of SHIP protein in K562 cells after transfection

Lane 1: K562-wtSHIP-FIV-G cells; lane 2: K562-FIV-G cells; lane 3: untransfected K562 cells.

胞大小均一,胞核完整均匀,荧光显微镜下细胞无荧光标记,透射电镜下染色质细致均匀,核仁清晰,细胞器完整,细胞微绒毛清晰可见,无凋亡的形态学改变。转染后的 K562-wtSHIP-FIV-G 细胞出现凋亡形态:包括细胞皱缩、出芽及胞核固缩、碎裂、少量凋亡小体形成等;透射电镜还可观察到细胞核染色质聚集、浓缩,细胞器结构不完整,核边集、核破

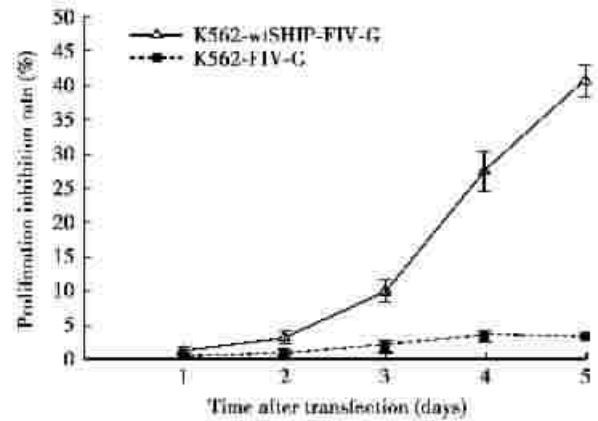


图 3 不同时间各组细胞的增殖情况

Figure 3 Proliferation of K562 cells after SHIP transfection

碎、胞膜出泡等。K562-FIV-G 组和空白组细胞未见明显凋亡形态。见图 4,图 5。

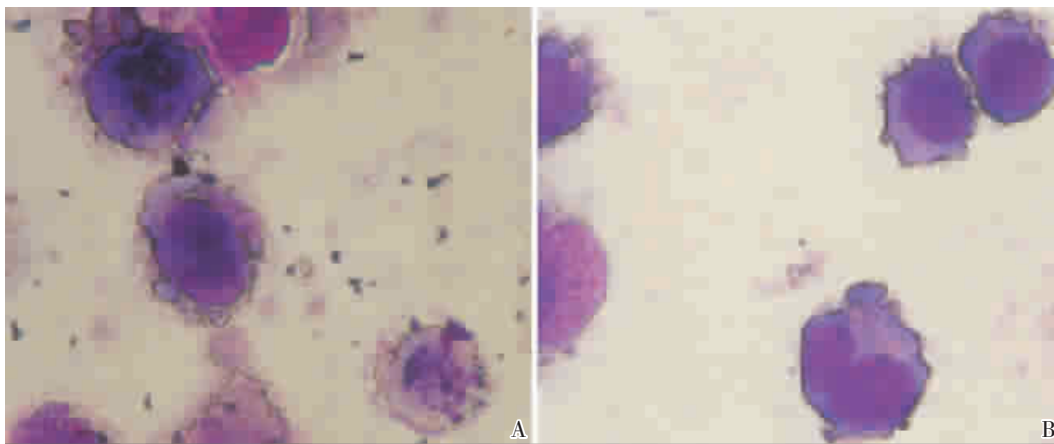


图 4 转染 SHIP 基因和空载体的 K562 细胞形态的变化 (Wright's $\times 1000$)

Figure 4 Morphology of K562 cells after SHIP transfection (Wright's $\times 1000$)

A: The nuclear chromatin is condensed and apoptosis bodies can be seen in K562 cells when transfected with wtSHIP for 5 days.

B: K562 cells transfected with empty vector demonstrate no indication of apoptosis.

Hoechst33342 及 Hoechst33342/PI 双标检测转染慢病毒载体 5 d 后细胞凋亡情况(图 6),结果发现 K562-wtSHIP-FIV-G 组早期和中晚期凋亡细胞数量明显高于未转染组和 K562-FIV-G 组 ($F=43.79, P<0.05$),后两组之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 SHIP 蛋白对 K562 细胞中磷酸化 Akt 的影响

转染 3 d 后, K562-wtSHIP-FIV-G 细胞中 Akt-308 和 Akt-473 的磷酸化水平均出现明显下降(图 7),在表达 SHIP 的 K562-wtSHIP-FIV-G 细胞中磷酸化 Akt-308 水平(0.126)显著低于不表达 SHIP 的 K562-FIV-G 细胞(0.302)和未转染组(0.323),差异有统计学意义($F=56.18, P<0.01$);后两组间磷酸化

Akt 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。比较转染第 0、1、3、5 天的 SHIP 蛋白、p-Akt308、p-Akt473 及 Akt 表达水平,发现随着 SHIP 蛋白重新表达,p-Akt308 和 p-Akt473 水平均呈下降趋势,而 Akt 水平无明显变化(图 8)。

3 讨论

已证实 PI3K/Akt 信号路径异常在造血细胞的恶性转化中发挥重要作用。PI3K 接收生长信号被激活,催化磷脂酰肌醇的肌醇环上 3 位羟基发生磷酸化反应生成 PIP3。后者作为多种生长因子在细胞中重要的第二信使,导致丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 募集到胞浆膜上进一步被磷酸化而主要调

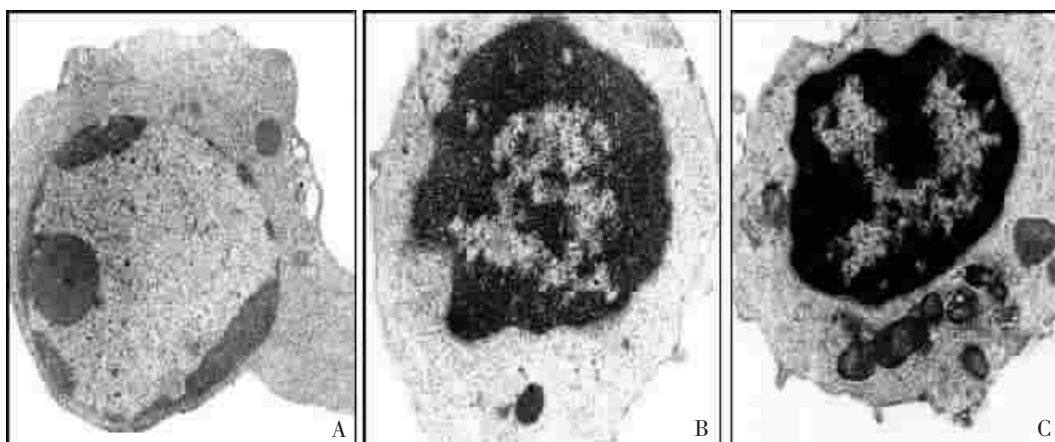


图 5 转染 SHIP 基因 5 天后 K562 细胞的超微结构改变 ($\times 5000$)

Figure 5 The ultrastructure changes of K562 cells after SHIP gene transfection ($\times 5000$)

A: K562 cells have integrity nuclear membrane.

B: The nuclear chromatin is condensed, aggregated to the margin.

C: Apoptotic bodies can be seen in some cells.

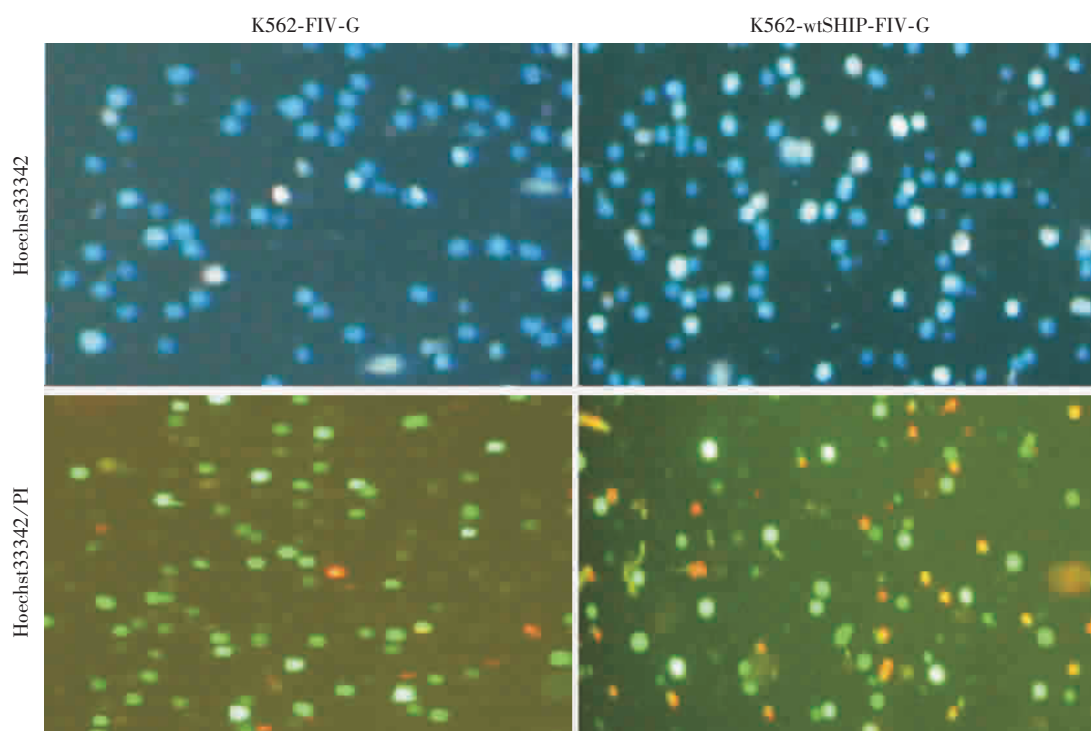


图 6 转染慢病毒 5 天后不同组细胞的凋亡情况 ($\times 100$)

Figure 6 Early apoptosis of K562 cells after SHIP gene transfection ($\times 100$)

控细胞存活信号通路,促进白血病细胞的生长、极度增殖和永生,并抵抗各种因素引起的细胞凋亡^[9]。

细胞中对 PIP3 的调节有两方面:一是生成 PIP3 的 PI3K,另一方面就是降解它的磷酸肌醇脂磷酸酶(PIPase)SHIP1 和 PTEN^[10]。PTEN 是第一个被证实的具有抑癌基因作用的磷酸肌醇脂磷酸酶,它对磷酸酪氨酸和磷酸酯底物具有双重磷酸酶作

用。在造血系统恶性肿瘤中,PTEN 基因主要表现为不同程度的低表达和表达缺失,而基因突变、重排少见^[10,11],且研究表明 PTEN 只能负性调节细胞的基础 Akt 活性,而不能调节造血生长因子刺激后引起的 Akt 的活化^[8]。最近研究显示,含 SH2 结构域的肌醇 5' 磷酸酶-SHIP 的作用逐渐受到重视,SHIP 作为另一个 PIPase,在生长因子调节细胞存

表 1 各组细胞不同时间的早期凋亡率比较

Table 1 Comparison of early apoptosis rate of K562 cells after gene transfection

Group	Early apoptosis rate (%)					
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
K562	1.8±0.6	2.4±0.2	3.7±0.6	3.9±0.4	5.7±0.3	7.7±0.8
K562-FIV-G	1.8±0.5	2.7±0.1	3.7±0.6	4.1±0.6	6.1±0.7	8.2±0.9
K562-SHIP-FIV-G	1.8±0.6	3.7±0.1	4.3±0.4	7.2±0.6 ^{a,b}	23.3±2.3 ^{a,b}	38.3±4.3 ^{a,b}

All values are presented as mean ± SD of three experiments. ^aP<0.05, vs. control K562 cells; ^bP<0.05, vs. K562-FIV-G cells.

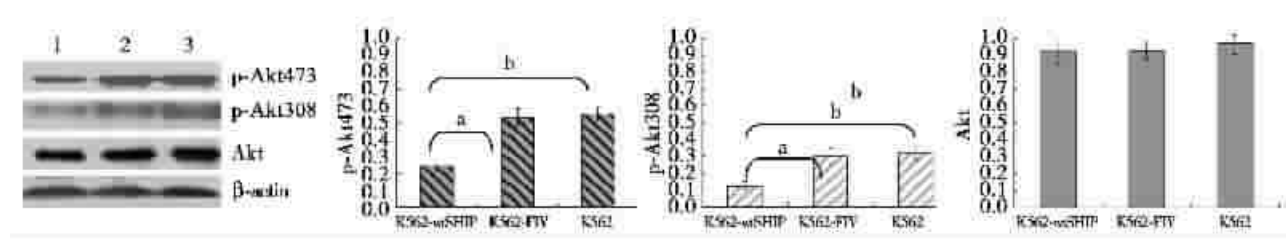


图 7 转染 3 天时各组 K562 细胞 p-Akt 的表达变化

Figure 7 Comparison of Akt phosphorylation status in K562 cells after transfection

Lane 1: K562-wtSHIP-FIV-G cells; lane 2: K562-FIV-G cells; lane 3: untransfected K562 cells.

^aP<0.05, vs. K562-FIV-G cells; ^bP<0.05, vs. K562 cells.

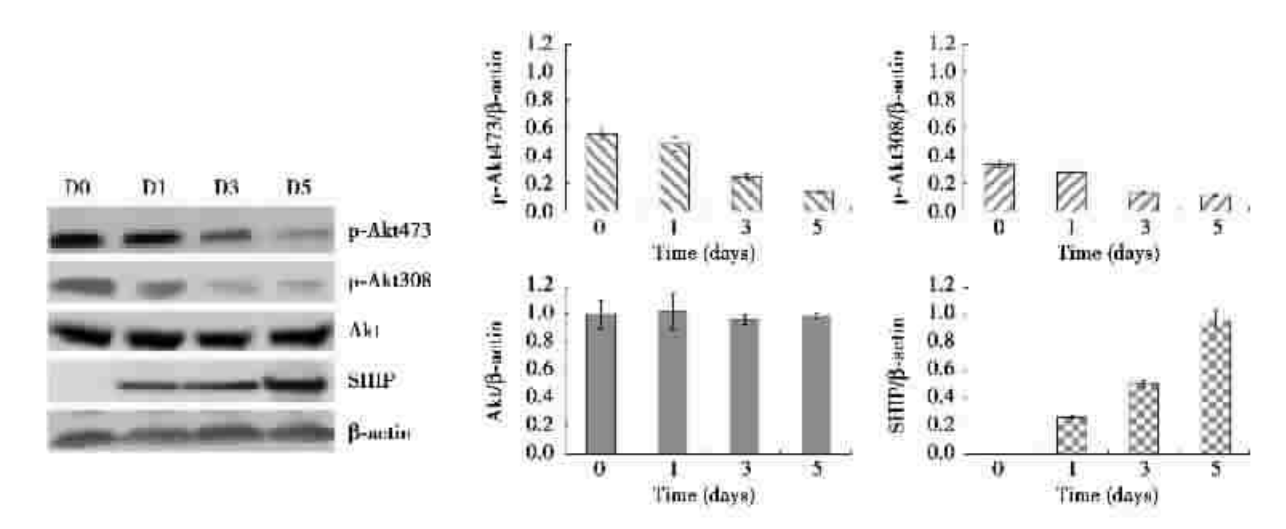


图 8 转染 SHIP 基因不同时间细胞 SHIP 和 p-Akt 的表达变化

Figure 8 Akt phosphorylation in K562 cells when transfected with SHIP for different time

活的 Akt 活化中是一个关键负性调节蛋白。SHIP 仅限于造血细胞特异性表达,人类 SHIP1 基因位于染色体 2q37,在造血细胞增殖和生存的信号转导途径中起着关键的负性调控作用,其主要功能是特异性降解 PIP3 的 5'磷酸基而使 PIP3 降解为 PI(3,4)P2,从而确保 PIP3 介导的信号通路的下调,尤其是抑制 Akt 的活化。罗建民等^[4,5]报道了白血病患者存在 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^[12]也在急性髓系白血病患者中发现了两种 SHIP 突变(A>T,Q1154L Q1153L)。SHIP 基因在白血病发病中的

作用尚不明了。我们前期研究表明,K562 细胞中 bcr/abl 的表达对 SHIP 基因的功能有抑制作用,应用甲磺酸伊马替尼及 RNAi 技术封闭 bcr/abl 后,细胞 SHIP 蛋白水平上调,同时 Akt 磷酸化水平下降,细胞增殖率下降,凋亡率增加^[6,7],这些研究都表明 SHIP 基因在抑制白血病细胞生长的信号转导途径中可能起着重要的作用。

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 RNA 干扰技术使目

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 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ IU/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。我们前期研究结果表明,K562细胞中SHIP蛋白阴性,因此本研究选用K562细胞为研究对象,构建了慢病毒转染质粒,与包装质粒和包膜质粒一起构成三质粒慢病毒载体系统,通过稳定转染K562细胞进一步探讨SHIP在白血病发病中的作用。结果发现,野生型SHIP基因具有明显的增殖抑制作用,转染野生型SHIP基因能明显抑制K562细胞增殖,光镜和透射电镜进一步观察到转染SHIP后K562细胞出现凋亡的特征性改变,可见大量的凋亡细胞和凋亡小体形成,通过Hoechst33342/PI双染检测凋亡发现,转染SHIP组细胞凋亡率明显增加。因此SHIP蛋白具有明显的抗增殖和促凋亡作用。

蛋白激酶B(PKB,Akt)处于PI3K/Akt信号转导通路的核心部位,在PI3K的作用下发生2个位点磷酸化,一个是催化结构域Thr308位点,另一个是调节结构域Ser473位点^[13];以上位点磷酸化后Akt被激活,从而参与白血病发生、发展^[14]。本研究对Thr308和Ser473位点的Akt磷酸化水平检测结果显示,K562细胞中存在p-Akt308和p-Akt473的表达,转染野生型SHIP基因可以使细胞的p-Akt308和p-Akt473水平显著降低;K562细胞的SHIP和p-Akt表达呈负相关;因此我们认为,K562细胞中SHIP基因表达缺失是其p-Akt高表达的关键因素之一,而且这种作用与SHIP的磷酸酶活性密切相关。SHIP基因可能通过降解PIP₃,下调Akt磷酸化水平而使细胞周期阻滞、生长受抑。

我们的研究证实,SHIP基因具有重要的增殖抑制和促进凋亡的功能,并由此推测SHIP基因缺失在白血病发病机制中可能具有重要作用,由于SHIP基因突变或表达缺失,不能负调控PI3K/Akt信号转导通路,从而Akt激酶磷酸化水平上调;为研究SHIP基因在白血病中抑癌作用的分子机制奠定了基础。对其影响哪些下游信号转导通路等等仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Geier SJ, Algate PA, 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] Helgason CD, 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(4):1541-1547.
- [3] Kisseleva MV, Cao L, Majerus PW, et al. 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.
- [4] Luo JM, 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.
- [5] 罗建民,刘泽林,郝红领,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.
- [6] 刘小军,罗建民,杨琳,等.慢性粒细胞白血病中SHIP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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Hirsch E, Costa C, Ciralo E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling [J]. *J Endocrinol*, 2007,194(2):243-256.
- [10] Aggerholm A, Gronbaek K, Guldberg P, et al. Mutational analysis of the tumor suppressor gene MMAC1/PTEN in malignant myeloid disorders [J]. *Eur J Haematol*, 2000,65(2):109-113.
- [11] Yang J, Liu J, Zheng J, et al. A reappraisal by quantitative flow cytometry analysis of PTEN expression in acute leukemia [J]. *Leukemia*, 2007,21(9):2072-2074.
- [12] 张苏江,李建勇,施静艺,等.急性髓系白血病患者PDGFB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.
- [13] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343 [J]. *J Biol Chem*, 2001,276(29):27462-27469.
- [14] Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, et al. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation [J]. *Blood*, 2003,102(3):972-980.

[编辑及校对:张菊]