

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.009

SHIP1 在急性髓细胞白血病患者中的表达及对入白血病细胞凋亡的影响研究*

王小蕊¹ 李文倩¹ 冯建明¹ 沈扩¹ 艾国¹ 韩国雄¹ 孟毅²

(1 青海省人民医院血液风湿科 青海 西宁 810000; 2 河南省中医院脑病科 河南 郑州 450000)

摘要 目的:探讨含 SH2 结构域的肌醇 1(SHIP1)在急性髓细胞白血病患者中的表达及对入白血病细胞凋亡的影响。方法:采用 Western blot 检测收集的急性髓细胞白血病患者骨髓中 SHIP1 的表达。人白血病细胞 U937 转染 SHIP1 过表达载体 (pEGFP-SHIP1 组)及对照空载体(pEGFP 组),同时设置对照组,对照组细胞不转染载体,其他步骤同 pEGFP-SHIP1 组和 pEGFP 组。流式细胞仪检测 48 h 的细胞凋亡情况,Western blot 检测 48 h 细胞中 SHIP1、Bcl-2、Bax、Akt、p-Akt 的表达。结果:急性髓细胞白血病患者骨髓中 SHIP1 表达明显低于正常人($P<0.05$)。pEGFP-SHIP1 组细胞中 SHIP1、Bax 表达和凋亡率均明显高于 pEGFP 组及对照组($P<0.01$),Bcl-2、p-Akt 表达均明显低于对照组($P<0.01$)。结论:SHIP1 在急性髓细胞白血病患者骨髓中表达下调,其可能通过 Akt 信号促进入白血病细胞凋亡。

关键词:急性髓细胞白血病;SHIP1;人白血病细胞;凋亡

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)23-4441-05

Expression of SHIP1 in the Patients with Acute Myeloid Leukemia and Its Influence on the Apoptosis of Human Leukemia Cells*

WANG Xiao-ru¹, LI Wen-qian¹, FENG Jian-ming¹, SHEN Kuo¹, AI Guo¹, HAN Guo-xiong¹, MENG Yi²

(1 Blood Department of rheumatism, Qinghai People's Hospital, Xining, Qinghai, 810000, China;

2 Department of encephalopathy, Henan Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou, Henan, 450000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of SHIP1 in the patients with acute myeloid leukemia and its effect on the apoptosis of human leukemia cells. **Methods:** The expression of SHIP1 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia was detected by Western blot. U937 cells was transfected with SHIP1 expression vector (pEGFP-SHIP1 group) and empty vector control (pEGFP group) respectively, U937 cells without transfection were used as the control group. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of the cells, the expression of SHIP1, Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt were detected by western blot. **Results:** The expression of SHIP1 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia was significantly lower than that of the normal human bone marrow SHIP1 ($P<0.01$). The SHIP1 and Bax expressions as well as the apoptotic rate of pEGFP-SHIP1 group were significantly higher than those of the control group ($P<0.01$), while the Bcl-2 and p-Akt expressions were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). **Conclusions:** SHIP1 expression was down regulated in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. SHIP1 could promote the apoptosis of human leukemia cells via Akt signaling pathway.

Key words: Acute myeloid leukemia; SHIP1; Human leukemia cells; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)23-4441-05

前言

急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)又称为急性非淋巴细胞白血病,属于白血病的一种^[1]。据统计,非老年的急性髓细胞白血病患者中只有 40%,而老年急性髓细胞白血病患者中只有 10%经过常规的化疗能继续生存^[2]。急性髓细胞白血病发病机制复杂,是由于单核细胞、红细胞等髓系细胞过度增生导致的造血系统肿瘤^[3]。

含 SH2 结构域的肌醇 1 (SHIP1) 作为一种磷酸肌醇磷酸

酶,参与恶性血液疾病的发生过程^[4]。SHIP1 对造血细胞生长和增殖发挥负调控的作用。有研究表明敲除小鼠中 SHIP1 基因后,其外周血中的白细胞数目异常增多,临床症状和病理检查结果与人白血病相似^[5]。而 SHIP1 在 CML 患者骨髓的白细胞中表达水平异常降低^[6]。为了明确 SHIP1 对人白血病细胞凋亡的影响,本研究通过细胞转染 SHIP1 过表达载体,探讨 SHIP1 在急性髓细胞白血病发病机制中的作用,以期治疗急性髓细胞白血病提供理论依据。

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(122102310502)

作者简介:王小蕊(1981-),女,硕士研究生,主要研究方向:血液风湿,E-mail:wang13145362398@163.com

(收稿日期:2017-02-25 接受日期:2017-03-20)

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 组织及细胞 选取 2012 年 7 月~2015 年 10 月青海省人民医院确诊的急性髓细胞白血病患者骨髓共 62 例,男性 32 例,女性 30 例,平均年龄(42.35± 14.31)岁。同期选择 20 例健康志愿者骨髓作为对照组。本研究已经过医院伦理委员会的批准,所有患者及家属已签署知情同意书。人白血病细胞 U937 购自于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要仪器及试剂 RPMI1640 培养基购自于美国 Sigma;SHIP1 单克隆抗体、Bcl-2 单克隆抗体、Bax 单克隆抗体、Akt 单克隆抗体、p-Akt 单克隆抗体、GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物标记的二抗均购自于美国 CTS;CO₂ 培养箱购自于美国 Thermo; 流式细胞仪购自于美国 BD;PVDF 膜购自于北京鼎国;胎牛血清购自于杭州四季青;

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 取出保存在液氮罐中的 U937 细胞,放在 37℃ 的水浴锅中融化细胞,在细胞中加入含有 10% FBS 的 RPMI1640 细胞培养液,800 rpm 离心 10 min,吸除上清液,在细胞沉淀中加入细胞培养液悬浮细胞,接种到细胞培养瓶中,放在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。观察细胞融合度达到 80%时,将细胞转移到离心管中,1000 rpm 离心 10 min,弃上清液,加入新鲜的培养液,按照实验要求接种到培养瓶中培养。

1.2.2 细胞转染 取培养至对数生长期的 U937 细胞,转移至离心管中,1000 rpm 离心 10 min,加入细胞培养液悬浮细胞,调整细胞浓度为每毫升含有 1× 10⁵ 个细胞,接种到 12 孔细胞培养板中培养 24 h。根据 Lipofectamine2000 脂质体转染说明书将 SHIP1 过表达载体(pEGFP-SHIP1)及对照空载体(pEGFP)转染至 U937 细胞中,同时设置对照组,对照组不转染载体,其他步骤同 pEGFP-SHIP1 组和 pEGFP 组。放置在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。转染后 48 h,Western blot 检测 SHIP1 水平。

1.2.3 Western blot 检测 取出保存在 -80℃ 的组织或细胞,放置于冰上,加入 RIPA 裂解液,反复吹打混匀。冰上裂解 30 min 后,14000 rpm,4℃ 离心 20 min,吸取蛋白上清液至 EP 管中。按照 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测提取的蛋白浓度。取蛋白样品与 Loading buffer 混合后,100℃ 煮沸 5 min 使蛋白变性。取变性蛋白样品加入到 SDS 凝胶(10%分离胶,5%浓缩胶)上样孔中,每孔加入 50 μL。电泳的初始电压为 6 V/cm,观察溴酚蓝进入分离胶后,把电压调整到 10 V/cm,待溴酚蓝进入分离胶的底部,电泳结束。取出蛋白凝胶,将蛋白转印至 PVDF 膜上,转膜电流为 1 mA/cm²,4℃ 转膜 2 h。取出 PVDF 膜经 5%脱脂奶粉封闭(室温封闭 1 h)后,依次与一抗(600 倍稀释,4℃ 孵育过夜)、二抗(1000 倍稀释,室温孵育 1h)反应后,显色,以 GAPDH 为内参,分析蛋白表达。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取转染 48h 后的 U937 细胞,离心后,收集细胞,调整细胞浓度为 1× 10⁶ 个/mL。取 1 mL 细胞,1000 rpm 离心 10 min 后,弃上清液,加入冰预冷的 PBS 洗涤细胞两次,弃 PBS,在细胞中加入 Annexin-V 缓冲液充分混合后,加入各 5 μL 的 PI 和 Annexin-V-FITC,避光反应 25 min,加 400 μL 的结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

实验重复 3 次,以提高实验的准确性。

1.3 统计学分析

所得的实验数据均采用 SPSS22.0 统计学软件分析,数据以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较用 t 检验,多组数据以上用单因素方差分析,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 SHIP1 在急性髓细胞白血病患者中的表达

如图 1 所示,急性髓细胞白血病患者骨髓中 SHIP1 表达水平明显低于正常人骨髓,差异具有统计学意义(P<0.01)。

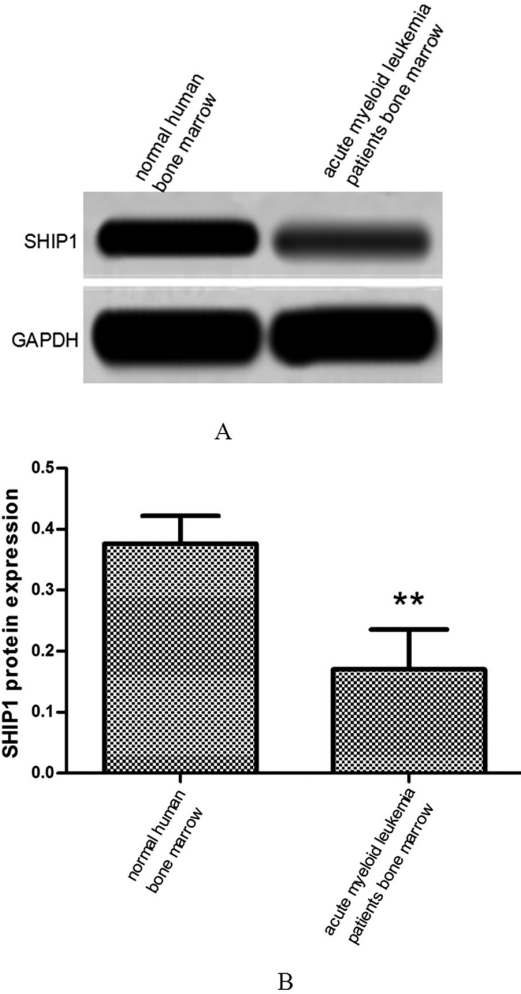


图 1 SHIP1 在急性髓细胞白血病患者中的表达

注:A: Western blot 结果图;B: 蛋白表达率; **P<0.01 vs 正常人骨髓
Fig.1 The expression of SHIP1 in the patients with acute myeloid leukemia
Note: A: Western blot; B: protein expression rate; **P<0.01 vs normal human bone marrow.

2.2 pEGFP-SHIP1 的转染效率

白血病细胞 U937 转染 pEGFP-SHIP1 和 pEGFP 后,Western blot 检测转染 48 h 的细胞中 SHIP1 的表达水平。结果显示:pEGFP-SHIP1 组细胞中 SHIP1 水平明显高于对照组,差异具有统计学意义(P<0.01),而 pEGFP 组细胞中 SHIP1 水平与对照组相比差异无统计学意义(P>0.05),见图 2。

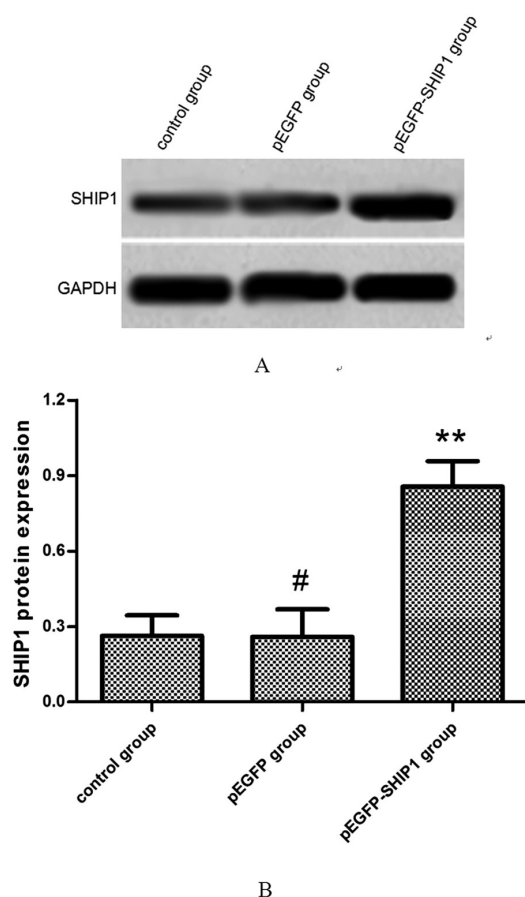


图2 转染后细胞中 SHIP1 表达检测

注:A: Western blot 结果图; B: 蛋白表达率; # $P>0.05$ vs 对照组; ** $P<0.01$ vs 对照组

Fig. 2 The expression of SHIP1 in the transfected cells

Note: A: Western blot; B protein expression rate; # $P>0.05$ vs control group; ** $P<0.01$ vs control group

2.3 过表达 SHIP1 对 U937 细胞凋亡的影响

细胞转染 pEGFP-SHIP1 和 pEGFP 后, pEGFP-SHIP1 组细胞凋亡率明显高于对照组 ($P<0.01$), SHIP1 组细胞凋亡率与对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。pEGFP-SHIP1 组细胞中 Bax 表达明显高于对照组 ($P<0.01$), pEGFP-SHIP1 组细胞中 Bcl-2 水平明显低于对照组 ($P<0.01$), 而 SHIP1 组细胞中 Bcl-2、Bax 水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 3。

2.4 过表达 SHIP1 对 U937 中 Akt、p-Akt 表达的影响

白血病细胞 U937 转染 pEGFP-SHIP1 和 pEGFP 后, pEGFP-SHIP1 组细胞中 p-Akt 水平明显低于对照组 ($P<0.01$), pEGFP-SHIP1 组、SHIP1 组、对照组细胞中 Akt 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), SHIP1 组细胞中 p-Akt 水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 4。

3 讨论

急性髓细胞白血病是一种常见的血液系统疾病, 成年人的发病率较高, 以皮肤黏膜异常出血、贫血、发热、脾脏肿大为典型的临床症状^[7]。目前, 化疗是治疗急性髓细胞白血病的主要方法^[8]。虽然化疗取得了一些成效, 但患者 5 年内的生存率仅 30% 左右^[9]。

人类 SHIP 基因定位于 q36.1-37, 是受酪氨酸磷酸化调控的肌醇磷酸酶家族成员之一^[10]。SHIP 有两种同源物, 分别为 SHIP1 和 SHIP2, 二者的基因 N 端是 SH2 结构域, C 端是脯氨酸聚集的区域, 中间部分是磷脂酰肌醇催化的场所^[11,12]。SHIP2 广泛存在于哺乳动物体内, 而 SHIP1 只在哺乳动物造血系统中表达。近年来的研究表明 SHIP1 与血液系统疾病密切相关, SHIP1 可以抑制造血细胞的增殖和存活^[13-16]。急性髓细胞白血病患者的外周血和骨髓中 SHIP1 mRNA 表达下调, 病参与白血细胞的凋亡^[17,18]。本研究分别选取急性髓细胞白血患者的骨髓和正常人的骨髓, 通过 Western blot 检测其 SHIP1 的表达, 结果显示急性髓细胞白血病患者骨髓中 SHIP1 的表达下调, 这与既往的研究结果一致。

正常情况下, 细胞凋亡与细胞生长是一个动态平衡的过程, 在某些病理条件下, 细胞恶性增殖、癌变会形成肿瘤^[19-22]。白血细胞凋亡在白血病发生和发展过程中至关重要。细胞凋亡过程中受多种信号因子的共同调控, 是一个极为复杂的过程^[23]。Bcl-2 蛋白家族是目前研究较多的与凋亡相关的蛋白, Bax 作为 Bcl-2 蛋白家族中的成员在细胞凋亡过程中发挥促进作用, 而 Bcl-2 发挥抑制凋亡的作用^[24-27]。本研究结果显示过表达 SHIP1 能够促进白血细胞凋亡, 增加促凋亡蛋白 Bax 的表达, 抑制抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 提示 SHIP1 主要发挥抑癌基因的作用。

Akt 信号通路广泛存在于哺乳动物体内, 参与调控细胞的增殖和凋亡。心肌细胞、海马神经元细胞、癌细胞等多种细胞的生长都与 Akt 信号通路有关。有研究表明过表达 SHIP1 后的人白血细胞后细胞内 Akt 的磷酸化水平降低, 从而促进细胞凋亡增多^[28-30]。本研究结果显示过表达 SHIP1 的人白血细胞中 p-Akt 水平下降, 提示 SHIP1 可能通过抑制 Akt 信号通路调控人白血细胞的凋亡。

综上所述, SHIP1 在急性髓细胞白血病患者骨髓中表达下调。SHIP1 能够促进人白血细胞的凋亡, 作用机制可能与 Akt 信号通路有关。本研究结果与之前的研究报道均说明了 SHIP1 在急性髓细胞白血病患者骨髓中表达下调, 提高 SHIP1 表达后能够促进人白血细胞的凋亡, 但研究方法不同, 薛华^[31]等通过检测急性髓细胞白血病患者骨髓中 SHIP1 的 mRNA 水平发现 SHIP1 的低表达, 而本研究中运用 Western blot 的方法检测了蛋白的表达水平, 并且本研究中进一步说明了 SHIP1 对人白血细胞凋亡的作用机制, 这为进一步研究 SHIP1 在急性髓细胞白血病发病机制中的作用奠定了基础, 为治疗急性髓细胞白血病提供了新方向。

参考文献 (References)

- [1] Debarri H, Lebon D, Roumier C, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 42345
- [2] Kleo J M, Miller C A, Griffith M, et al. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia[J]. *Jama*, 2015, 314(8): 811-822
- [3] Shih A H, Jiang Y, Meydan C, et al. Mutational cooperativity linked to combinatorial epigenetic gain of function in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 502-515

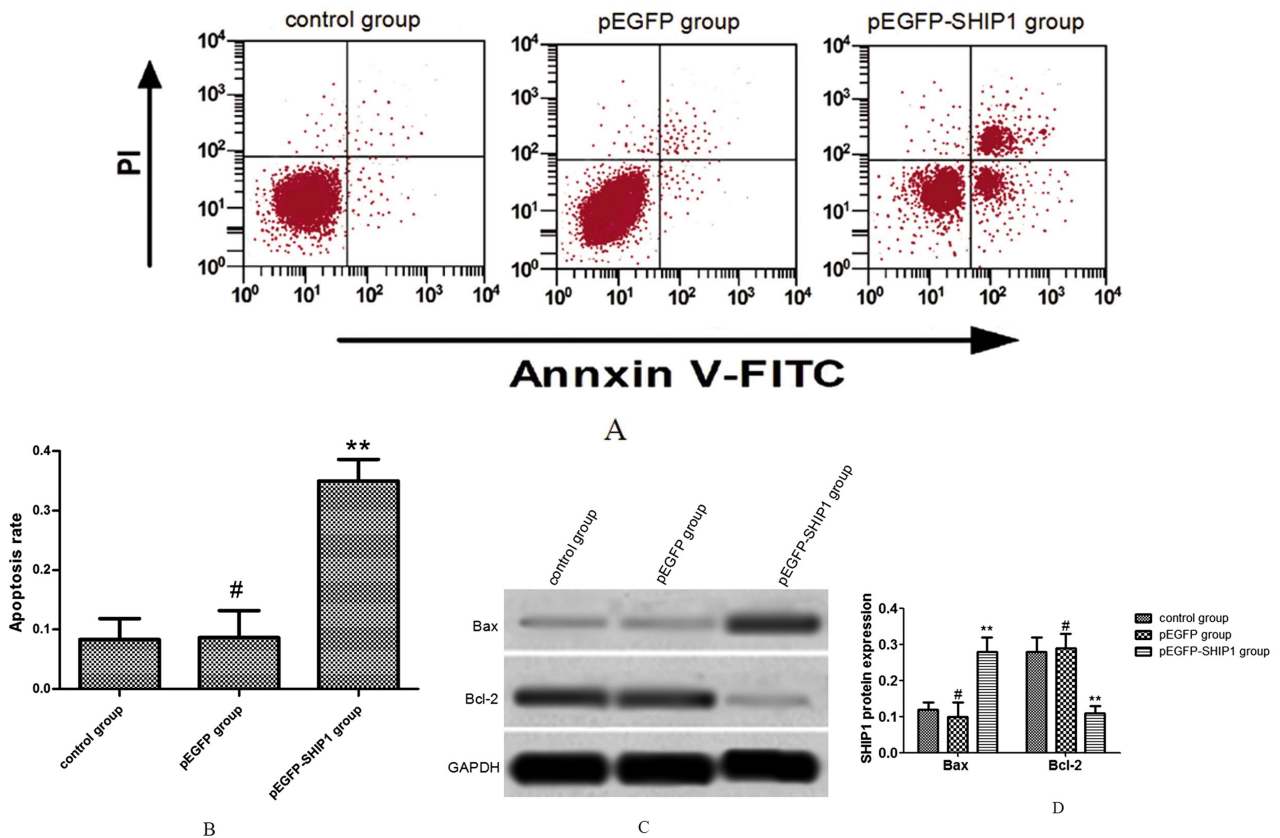


图3 过表达 SHIP1 对 U937 细胞凋亡的影响

注: A:流式细胞仪结果图;B:细胞凋亡率;C: Western blot 结果图;D:蛋白表达率;#P>0.05 vs 对照组; **P<0.01 vs 对照组

Fig.3 Effect of SHIP1 overexpression on the apoptosis of U937 cells

Note: A: flow cytometry results; B: the apoptosis rate; C: Western; blot; D: the expression rate; #P>0.05; vs control group; **P<0.01 vs control group.

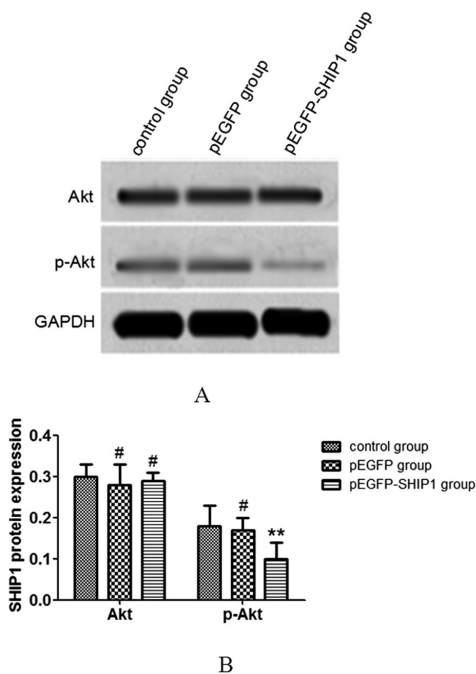


图4 过表达 SHIP1 对 U937 细胞中 Akt、p-Akt 表达影响

注:A: Western blot 结果图;B:蛋白表达率;#P>0.05 vs 对照组; **P<0.01 vs 对照组。

Fig.4 Effect of SHIP1 overexpression on the expressions of Akt, p-Akt in the U937 cells

Note: A: Western; blot; B: the expression rate; #P>0.05; vs control group; **P<0.01 vs control group.

- [4] Song C, Gowda C, Pan X, et al. Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia[J]. Blood, 2015, 126(15): 1813-1822
- [5] Chen Z, Shojae S, Buchner M, et al. Signalling thresholds and negative B-cell selection in acute lymphoblastic leukaemia [J]. Nature, 2015, 521(7552): 357-361
- [6] Xue H, Hua L M, Guo M, et al. SHIP1 is targeted by miR-155 in acute myeloid leukemia[J]. Oncology reports, 2014, 32(5): 2253-2259
- [7] Petersdorf S H, Kopecky K J, Slovak M, et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2013, 121(24): 4854-4860
- [8] Hills R K, Castaigne S, Appelbaum F R, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials [J]. The Lancet Oncology, 2014, 15(9): 986-996
- [9] Shlush L I, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia [J]. Nature, 2014, 506(7488): 328-333
- [10] Anderson C K, Salter A I, Toussaint L E, et al. Role of SHIP1 in Invariant NKT Cell Development and Functions [J]. The Journal of Immunology, 2015, 195(5): 2149-2156
- [11] Gumbleton M, Vivier E, Kerr W G. SHIP1 intrinsically regulates NK cell signaling and education, resulting in tolerance of an MHC class

- I-mismatched bone marrow graft in mice[J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(6): 2847-2854
- [12] Guo H, Cruz-Munoz M E, Wu N, et al. Immune cell inhibition by SLAMF7 is mediated by a mechanism requiring src kinases, CD45, and SHIP-1 that is defective in multiple myeloma cells [J]. *Molecular and cellular biology*, 2015, 35(1): 41-51
- [13] Maxwell M J, Srivastava N, Park M Y, et al. SHIP-1 deficiency in the myeloid compartment is insufficient to induce myeloid expansion or chronic inflammation[J]. *Genes and immunity*, 2014, 15(4): 233-240
- [14] Fernandes S, Iyer S, Kerr W G. Role of SHIP1 in cancer and mucosal inflammation [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1280(1): 6-10
- [15] Cui B, Chen L, Zhang S, et al. MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood*, 2014, 124(4): 546-554
- [16] Chen Z, Shojaee S, Geng H, et al. Harnessing Negative B Cell Selection to Overcome Drug-Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Blood*, 2014, 124(21): 792
- [17] Packham G, Krysov S, Allen A, et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy[J]. *Haematologica*, 2014, 99(7): 1138-1148
- [18] Lee J W, Chen Z, Geng H, et al. CD25 (IL2RA) Orchestrates Negative Feedback Control and Stabilizes Oncogenic Signaling Strength in Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. *Blood*, 2015, 126(23): 1434-1434
- [19] Rahmani M, Aust M M, Attkisson E, et al. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3-and Bim-dependent mechanism[J]. *Cancer research*, 2013, 73(4): 1340-1351
- [20] Lagadinou E D, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells[J]. *Cell stem cell*, 2013, 12(3): 329-341
- [21] Hoshyar R, Bathaie S Z, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells[J]. *DNA and cell biology*, 2013, 32(2): 50-57
- [22] Witzens-Harig M, Giaisi M, Köhler R, et al. HTLV-1-associated adult T cell leukemia is highly susceptible to Navitoclax due to enhanced Bax expression [J]. *International journal of cancer*, 2016, 138 (2): 507-514
- [23] Ghasemian M, Mahdavi M, Zare P, et al. Spiroquinazolinone-induced cytotoxicity and apoptosis in K562 human leukemia cells: alteration in expression levels of Bcl-2 and Bax[J]. *The Journal of toxicological sciences*, 2015, 40(1): 115-126
- [24] Takeda T, Tsubaki M, Kino T, et al. Mangiferin enhances the sensitivity of human multiple myeloma cells to anticancer drugs through suppression of the nuclear factor κ B pathway [J]. *International journal of oncology*, 2016, 48(6): 2704-2712
- [25] Luna-Vargas M P A, Chipuk J E. Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond [J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26(12): 906-917
- [26] Hu T, Li C, Zhang Y, et al. Phosphoinositide-dependent kinase 1 regulates leukemia stem cell maintenance in MLL-AF9-induced murine acute myeloid leukemia [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015, 459(4): 692-698
- [27] Giri J, Srivastav S, Basu M, et al. Leishmania donovani Exploits Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL-1) Protein to Prevent Mitochondria-dependent Host Cell Apoptosis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(7): 3496-3507
- [28] Khalife J, Radoska H S, Santhanam R, et al. Pharmacological targeting of miR-155 via the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 (Pevonedistat) in FLT3-ITD acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29(10): 1981-1992
- [29] Eramo M J, Mitchell C A. Regulation of PtdIns (3, 4, 5) P3/Akt signalling by inositol polyphosphate 5-phosphatases[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(1): 240-252
- [30] Liu T M, Ling Y, Woyach J A, et al. OSU-T315: a novel targeted therapeutic that antagonizes AKT membrane localization and activation of chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Blood*, 2015, 125(2): 284-295
- [31] 薛华, 梁璐, 郭慧梅, 等. 抑制 miR-155 表达对白血病细胞系 THP-1 的增殖和凋亡影响及作用机制 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(6): 1550-1554
- Xue Hua, Liang Lu, Guo Hui-mei, et al. Inhibition of miR-155 expression on proliferation and apoptosis of leukemia cell line THP-1 and its mechanism [J]. *Journal of experimental hematology*, 2014, 22 (6): 1550-1554