

重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP对耐伊马替尼的K562/G01细胞增殖的影响

王 林 罗秋平 黄峥兰 李 会 刘张玲 祖白玲 冯文莉* 向 华*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 研究表达融合蛋白SH2-Caspase8的重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP对耐伊马替尼的BCR/ABL阳性的慢性粒细胞白血病(CML)K562/G01细胞增殖的影响。荧光显微镜观察病毒感染效率, Western blot检测融合蛋白的表达情况, MTT和细胞计数检测细胞的生长情况, 流式细胞仪分析细胞增殖周期, 甲基纤维素克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力。结果显示, 荧光显微镜观察病毒感染效率高, Western blot能检测到目的蛋白的表达, MTT和细胞计数检测可见, 与对照组相比AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP能显著抑制细胞的生长; 流式周期检测发现, AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP组G₁期细胞比例增加, S期和G₂期细胞比例减少; 克隆形成实验可见, AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP能显著抑制细胞克隆的形成。综上所述, 重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP表达的SH2-Caspase8融合蛋白能明显抑制耐伊马替尼的K562/G01细胞的增殖。

关键词 细胞增殖; 慢性粒细胞白血病; BCR/ABL; SH2结构域; Caspase8; K562/G01细胞

The Effect of Recombinant Adenovirus AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP on the Proliferation of Imatinib-resistant K562/G01 Cell Line

Wang Lin, Luo Qiuping, Huang Zhenglan, Li Hui, Liu Zhanglin, Zu Bailin, Feng Wenli*, Xiang Hua*

(Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To study the effect of SH2-Caspase8 fusion protein expressed by recombinant adenovirus AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP on the proliferation of K562/G01 cell line, which is a BCR/ABL positive chronic myeloid leukemia cell line and resistant to imatinib. Infection efficiency was observed under fluorescent microscopy. The expression of fusion protein was analyzed by Western blot. Cell growth was detected by MTT test and cell counts. Cell cycles were determined by flow cytometry. The ability of cell colony was assessed by colony-forming assay. As a result, the infection efficiency of AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP on K562/G01 cells was high as confirmed by fluorescent microscopy. SH2-Caspase8 fusion protein was expressed correctly in K562/G01 cells. As compared to control groups, AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP adenovirus significantly inhibited cell growth. The result of FCM showed that cells in G₁ phase increased, while cells in S phase and G₂ phase decreased. AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP adenovirus inhibited the colony-forming ability of K562/G01 cells

收稿日期: 2013-06-14 接受日期: 2013-07-15

国家自然科学基金(批准号: 30871102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485938, E-mail: fengwlcqmu@sina.com; Tel: 023-68485009, E-mail: xianghuacq@163.com

Received: June 14, 2013 Accepted: July 15, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30871102)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68485938, E-mail: fengwlcqmu@sina.com; Tel: +86-23-68485009, E-mail: xianghuacq@163.com

网络出版时间: 2013-08-20 14:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130820.1410.001.html>

obviously. Together all, AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP which expresses SH2-Caspase8 fusion protein can significantly inhibit the proliferation of K562/G01 cells.

Key words cell proliferation; chronic myeloid leukemia; BCR-ABL; SH2 domain; Caspase8; K562/G01 cells

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种起源于造血干细胞的克隆性增殖性恶性血液病,其发生是由于t(9;22)(q34;q11)所致的BCR/ABL融合基因编码产生了具有强烈酪氨酸激酶活性的BCR/ABL融合蛋白^[1],该融合蛋白激活PI-3K(phosphatidylinositol-3 kinase)、Ras(renin-angiotensin system)、STAT5(signal transducer and activator of transcription 5)等信号转导通路,导致细胞恶性转化^[2]。

CML的治疗方法有传统的放、化疗,异基因造血干细胞移植和低分子酪氨酸激酶抑制的靶向治疗。目前,只有伊马替尼为代表的酪氨酸激酶抑制剂在临床上广泛的应用并具有显著的治疗效果,但由BCR/ABL基因突变导致BCR/ABL融合蛋白激酶区的突变引起伊马替尼耐药,导致CML不可抑制的疾病进展成为目前困扰血液学工作者的难题^[3],因此,寻找新的靶点成为CML治疗的迫切要求。

BCR/ABL融合蛋白N端第177位酪氨酸磷酸化后(Y177-p)与Grb2(growth receptor bound protein 2)的SH2(src homology 2)结构域特异性结合,从而激活RAS-MAPK、PI3K-AKT和STAT5等细胞的增殖信号^[4]。细胞凋亡的细胞膜死亡受体途径中Caspase8是细胞凋亡关键的起始因子,其激活后导致下游凋亡信号分子的活化引起细胞凋亡。本文旨在探讨重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP表达的外源性SH2-Caspase8融合肽,以人源性BCR/ABL阳性耐伊马替尼CML细胞株K562/G01细胞为研究对象,通过SH2结构域靶向竞争性抑制阻断BCR/ABL-Y177-p下游细胞恶性转化信号和过表达Caspase8诱导细胞凋亡的策略,发挥了对CML细胞特异性增殖抑制效应,为CML特别是伊马替尼耐药CML的治疗寻找新途径和手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

缺失E1基因并携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的重组腺病毒AdEGFP空载(简称CMV)、重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP(简称SC,同时,为了便

于后期的检测在融合蛋白加上了HA标签)和SH2蛋白第86位精氨酸突变为赖氨酸(R86K)的核苷酸序列突变体的重组腺病毒AdE-SH2m-Caspase8-HA-GFP(简称SmC),均由本课题组前期通过AdEasy系统重组产生^[5]。K562/G01细胞购于中国医学科学院天津血液病研究所。RPMI 1640培养基购买于GIBCO公司,碘化丙啶(PI)购自美国Sigma公司。鼠抗HA单克隆抗体、HRP耦联的羊抗鼠IgG二抗和鼠抗人actin抗体均购于美国Santa Cruz公司, ECL试剂盒购自美国Milli-pore公司, Polybrene和甲基纤维素购于美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562/G01用含有100 μg/mL链霉素和100 U/mL青霉素, 10% FBS的RPMI 1640培养液常规培养,细胞培养于37 °C 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中,取对数生长期的细胞进行后续实验研究。

1.2.2 荧光倒置显微镜和Western blot检测SC在K562/G01中表达 重组腺病毒SC、SmC和CMV空载与Polybrene混匀后(终浓度为4 μg/mL)按照前期测定最佳的感染指数(MOI) 10⁴感染对数生长期的K562/G01,同时以PBS为阴性对照,48 h后,于倒置荧光显微镜下观察细胞的感染效率。然后,收集细胞PBS洗涤3次,提取蛋白样品,取适量的蛋白进行SDS-PAGE电泳,半干转至PVDF膜上,鼠抗HA一抗1:500稀释4 °C孵育过夜,兔抗鼠IgG-HRP二抗1:1 000稀释,室温孵育1 h, ECL化学发光法检测目的蛋白表达情况。

1.2.3 MTT实验检测重组腺病毒SC对K562/G01细胞增殖能力的影响 取对数生长期的细胞,按1×10⁴/孔,将K562/G01加入96孔培养板中,分别加入重组腺病毒SC、SmC、CMV空载和PBS,同时设置试剂对照组,并且每个处理设置3个平行孔。培养1~7 d后,取出培养板每孔加入50 μL 2 mg/mL MTT溶液,避光培养4 h后,1 500 r/min离心10 min后小心吸掉上清,每孔加入150 μL二甲基亚砜,摇匀溶解后, D₄₉₅ nm测量各孔的吸光值,并按如下公式计算抑制率。

细胞增殖抑制率=[1-(处理组D值-试剂对照D值)/(PBS处理组D值-试剂对照D值)]×100%

1.2.4 细胞计数测定重组腺病毒SC对K562/G01细胞增殖能力的影响 取对数生长期的细胞,按 1.5×10^5 /孔,将K562/G01加入6孔培养板中,分别加入重组腺病毒SC、SmC、CMV空载和PBS,每个处理设置3个平行孔。培养1~5 d后,分别计数每孔中的细胞数。

1.2.5 克隆形成实验检测K562/G01细胞感染重组腺病毒SC后的克隆形成能力 实验分组,细胞分为重组腺病毒SC处理组、重组腺病毒SmC处理组、重组腺病毒CMV空载处理组和PBS对照组4组。经处理后的K562/G01细胞组按每孔500细胞加入含0.9%甲基纤维素的24孔培养板中培养,每孔设3个平行孔,培养2周后计数克隆数,以50个细胞以上计为1个集落,以经PBS处理的K562/G01细胞的克隆形成数理论上为100%计算克隆形成率。

1.2.6 流式细胞术检测重组腺病毒SC感染 K562/

G01细胞后的细胞周期 收集重组腺病毒SC、SmC、CMV空载和PBS处理72 h的K562/G01细胞,PBS洗3次后,70%乙醇固定4 h,离心弃去上清液,加入50 g/mL RNaseA消化30 min后,加入50 mL的PI染色25 min,上机检测细胞增殖周期。

1.3 统计分析

采用SPSS 19.0统计软件进行独立样本的*t*检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒感染K562/G01细胞后介导的外源基因表达鉴定

通过荧光倒置显微镜观察重组腺病毒SC、SmC和CMV空载感染K562/G01 48 h后,可见绝大多数细胞带有明显的绿色荧光,PBS对照组没有荧光蛋白的表达(图1)。Western blot检测K562/G01细胞感染重组腺病毒SC和SmC后融合蛋白SH2-

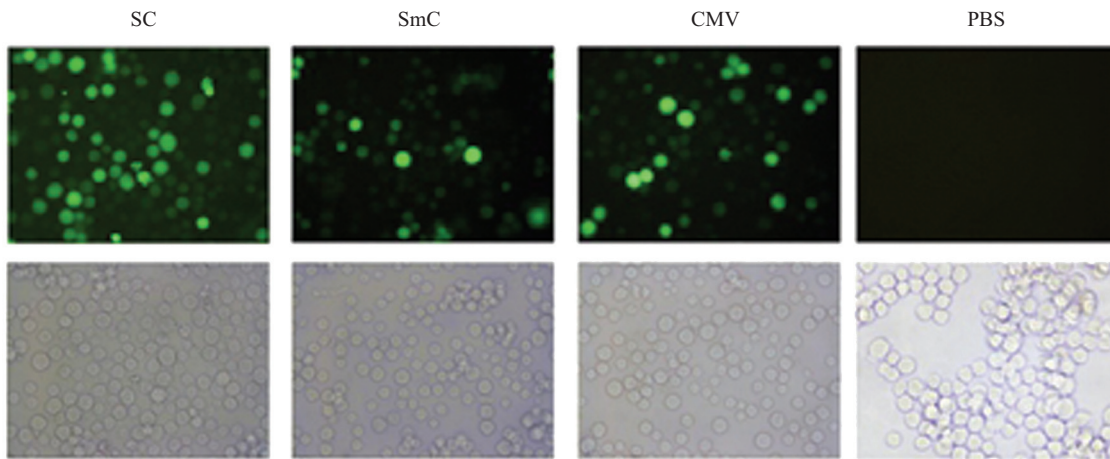


图1 重组腺病毒SC感染K562/G01后绿色荧光蛋白的表达情况(200×)

Fig.1 Expression of the GFP protein in K562/G01 cell infected with recombinant adenovirus (200×)

Caspase8-HA和SH2m-Caspase8-HA的表达,CMV空载组未见HA的表达(图2)。通过上述结果可见重组腺病毒在K562/G01细胞感染效率高,融合蛋白SH2-Caspase8-HA、SH2m-Caspase8-HA能够在K562/G01中表达。

2.2 重组腺病毒SC对K562/G01细胞增殖能力的影响

MTT实验结果可见,腺病毒SC感染K562/G01细胞后,随着时间延长,增殖抑制效应逐渐增强,K562/G01感染SC后5 d,其抑制率为 $44\% \pm 7\%$,与SmC组比较,其增殖能力明显减弱($P < 0.05$),SmC组与CMV组比较增殖能力无明显差异(图3A)。

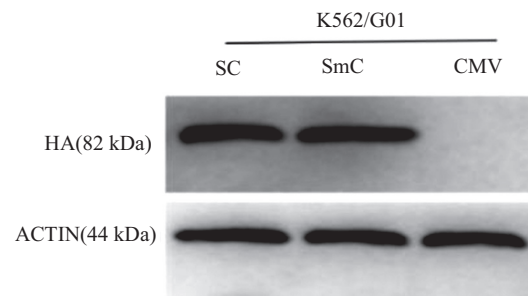
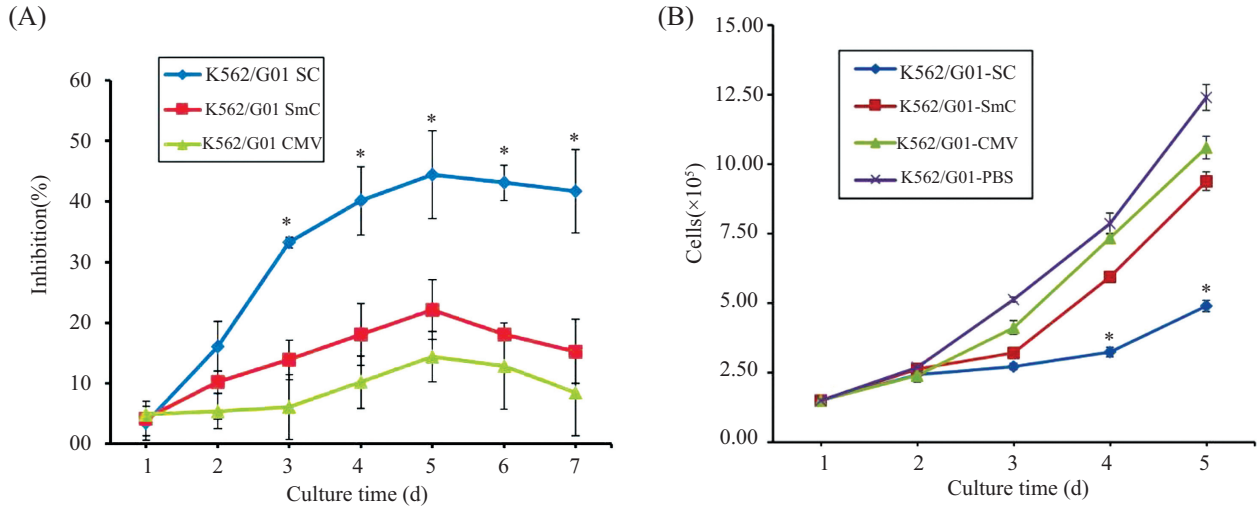


图2 Western blot鉴定融合蛋白SC-HA、SmC-HA在K562/G01细胞中的表达情况

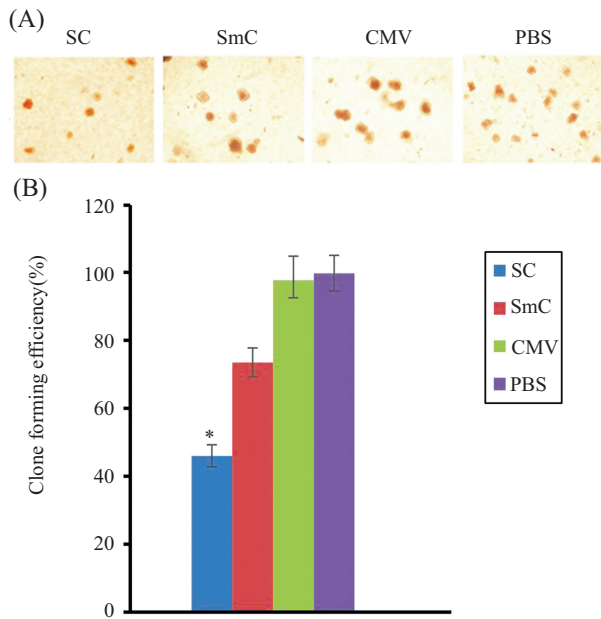
Fig.2 Expression of the SH2-Caspase8-HA/SH2m-Caspase8-HA fusion protein in K562/G01 cell as identified by Western blot



A: K562/G01 cells were treated with SC, SmC, CMV and PBS for 1~7 d, and cell growth was determined by MTT assay. Data are representative of 3 independent measurements and the standard errors of the means are shown (* $P < 0.05$ vs SmC control groups); B: K562/G01 cells were treated with SC, SmC, CMV and PBS for 1~5 d, and cell growth was determined by cell counts. Data are representative of 3 independent measurements and the standard errors of the means are shown (* $P < 0.05$ vs SmC control groups).

图3 重组腺病毒SC感染K562/G01细胞后对细胞生长的影响

Fig.3 Influences of the growth of K562/G01 cells by infection recombinant adenovirus SC



A: K562/G01 cells treated with SC, SmC, CMV and PBS for 2 weeks, the figure of colony forming was shown in inverted microscope (100 \times); B: the colony forming efficiency of K562/G01 cells infected with SC, SmC, CMV or simply treated with an equal volume of PBS for 2 weeks (* $P < 0.05$ vs SmC control groups, $n = 3$).

A: K562/G01 cells were treated with SC, SmC, CMV and PBS for 2 weeks, the figure of colony forming was shown in inverted microscope (100 \times); B: the colony forming efficiency of K562/G01 cells infected with SC, SmC, CMV or simply treated with an equal volume of PBS for 2 weeks (* $P < 0.05$ vs SmC control groups, $n = 3$).

图4 重组腺病毒SC感染K562/G01对其细胞克隆形成能力的影响

Fig.4 The colony forming inhibition of K562/G01 cells treated by recombinant adenovirus SC

细胞计数结果显示, 腺病毒SC感染K562/G01细胞后, 随着时间延长, 生长抑制效应逐渐增强, K562/G01感染SC 5 d后, 其细胞计数为 $(4.95 \pm 0.21) \times 10^5$, 与SmC组比较, 其细胞增殖能力明显减弱($P < 0.05$), SmC组与CMV组、PBS组比较增殖能力无明显差异(图3B)。

2.3 重组腺病毒SC对K562/G01细胞克隆形成能力的影响

克隆形成2周后成像的结果显示, 相对于SmC、CMV和PBS对照组K562/G01细胞的克隆数量SC处理组克隆明显减少(图4A)。以经PBS处理的CML细胞的克隆形成数理论上为100%计算。K562/G01细胞SC处理组克隆形成率为 $46\% \pm 3\%$, 与SmC组比较克隆形成率显著降低($P < 0.05$), SmC组与CMV、PBS组比较克隆形成率无显著差异(图4B)。

2.4 重组腺病毒SC对K562/G01细胞周期的影响

流式细胞仪检测细胞增殖周期可见, K562/G01细胞SC、SmC、CMV、PBS组, G_1 期细胞比例分别为50.07%、29.41%、24.65%和24.23%, SC组的 G_1 比例明显高于对照组, 对照组间 G_1 比例没有明显差别(图5和表1)。由此可见腺病毒SC感染K562/G01后细胞明显阻滞在 G_1 期。

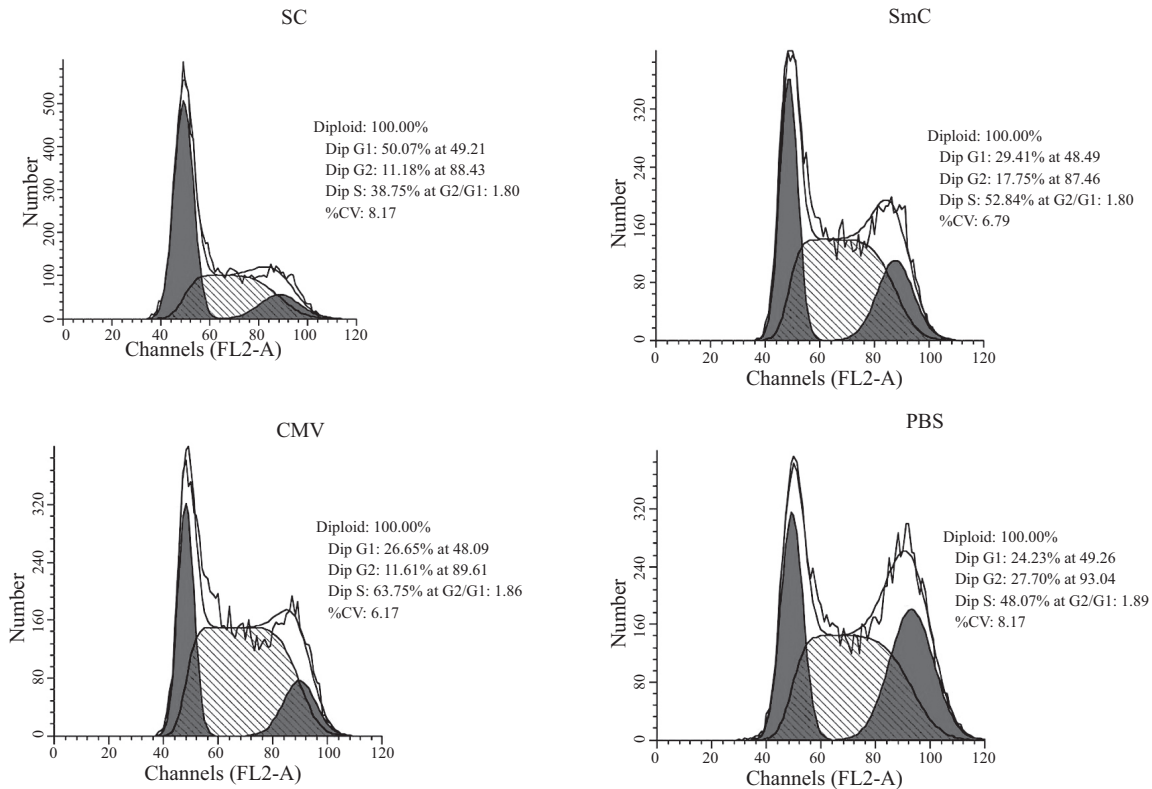


图5 重组腺病毒SC感染对K562/G01和K562细胞周期的影响

Fig.5 Effect of recombinant adenovirus SC infection on cell cycle of K562/G01 and K562 cells

表1 重组腺病毒SC感染对K562/G01细胞增值周期的影响

Table 1 Effect of recombinant adenovirus SC infection on cell cycles of K562/G01 cells

组别 Group	细胞株 Cell line	细胞周期 Cell cycle		
		G ₁	S	G ₂
SC	K562/G01	50.07%	38.75%	11.18%
SmC	K562/G01	29.41%	52.84%	17.75%
CMV	K562/G01	24.65%	63.75%	11.61%
PBS	K562/G01	24.23%	48.07%	27.70%

3 讨论

目前, 针对CML的特异性细胞遗传学标志 BCR/ABL 融合基因及其融合蛋白进行靶向治疗是国内外CML研究的热点。临床上虽然 BCR/ABL 蛋白激酶特异性抑制剂(伊马替尼、尼罗替尼和达沙替尼)对CML慢性期及部分急变期患者显示出良好的治疗效果^[5], 但出现的耐药、抑制正常免疫功能、抑制骨髓正常造血功能和治疗后复发等问题^[6-8], 这为CML的治疗带来了严峻挑战, 也急需寻找CML治疗新的策略。

BCR/ABL 融合蛋白由包括蛋白寡聚、Src同源结构、激酶活性等多个结构域及多个酪氨酸磷酸

化位点构成, 功能复杂。融合蛋白N-端第177位酪氨酸自身磷酸化后(Y177-p), 特异性募集接头蛋白Grb2。Y177-p与Grb2的SH2结构域特异性结合, 再通过Grb2 N端及C端的SH3(src homology 3)结构域分别结合下游的Sos、Gab2分子, 分别激活RAS-MAPK和PI3K-AKT途径的细胞转导信号, 导致细胞恶性转化^[9-10]。并且Imatinib不能抑制Bcr-Abl Y177与Grb2的结合^[11]。因此, 位于 BCR/ABL 激酶区以外的Y177-p能够成为治疗CML的另一个切入点引起了我们的关注, 继而我们开展了基于Y177位点抑制 BCR/ABL 的实验研究。细胞的外源性凋亡途径中Caspase8作为重要的启动因子, 其激活后启动

Caspase级联反应, 激活下游的效应分子, 导致细胞的凋亡^[12]。

我们实验选用能在血液细胞高表达的腺病毒AdEasy系统, 采用基因重组技术制备了表达SH2-Caspase8融合蛋白重组腺病毒SC, 选用人源性BCR/ABL阳性的伊马替尼耐药CML细胞株K562/G01细胞为研究对象(K562/G01为伊马替尼和传统化、放疗药物多重耐药^[13]), 通过靶向竞争性抑制BCR/ABL-Y177磷酸化激活的RAS-MAPK、PI3K-AKT和STAT增殖信号和诱导Caspase8介导的细胞凋亡, 发挥了对CML细胞特异性增殖抑制效应。倒置荧光显微镜和Western blot检测可见(图1和图2), 融合蛋白SH2-Caspase8能够在K562/G01细胞中高表达。MTT实验生长曲线和细胞计数结果显示SC能够明显抑制K562/G01细胞的增殖(图3)。甲基纤维素克隆形式实验显示感染SC的K562/G01细胞其克隆形成能力显著降低(图4)。流式细胞仪检测增殖周期可见SC处理的K562/G01明显停留在G₁期(图5和表1)。

综上所述, 本实验验证了重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8-HA-GFP具有特异性的抑制耐伊马替尼的K562/G01细胞的增殖的治疗效应, 证实了通过BCR/ABL Y177磷酸化信号靶向激活Caspase8的策略作为CML治疗靶点的可行性。为后续实验进一步阐明融合蛋白SH2-Caspase8抗肿瘤作用的机制, 深入研究其发挥生物学活性的功能结构域奠定了实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990; 247(4946): 1079-82.
- 2 Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008; 112(13): 4808-17.
- 3 Charles A, Schiffer. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2007; 357(3): 258-65.
- 4 Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Zonghan, Li Nanxin, *et al.* BCR-ABL induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993; 75(1): 175-85.
- 5 刘双凤, 胡 晶, 曹唯希, 史 静, 彭 智, 王海霞, 等. 携SH2-Caspase8融合基因重组腺病毒的构建及对K562细胞增殖的影响. *第三军医大学学报*(Liu Shuangfeng, Hu Jing, Cao Weixi, Shi Jing, Peng Zhi, Wang Haixia, *et al.* Construction of recombinant adenovirus carrying SH2-Caspase8 fusion gene and its effect on proliferation in K562 cells. *Journal of Third Military Medical University*) 2011; 33(18): 1887-92.
- 6 Krause DS, Van Etten RA. tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353(2): 172-87.
- 7 Weisberg E, Paul WM, Sandra WC, Hochhaus A, DG James. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(5): 345-56.
- 8 Thomas O'Hare, Christopher AE, Michael WN. BCR-ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110(7): 2242-9.
- 9 Ifonso QC, Jorge C. Therapeutic options against BCR-ABL1 T315I-positive chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2008; 14(14): 4392-9.
- 10 Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, *et al.* Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 2002; 1(5): 479-92.
- 11 Brehme M, Hantschel O, Colinge J, Kaupé I, Planyavsky M, Köcher T, *et al.* Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *P Natl Acad Sci USA* 2009; 106(18): 7414-9.
- 12 Patel H, Marley SB, Greener L, Gordon MY. Subcellular distribution of p210BCR-ABL in CML cell lines and primary CD34+ CML cells. *Leukemia* 2007; 22(3): 559-71.
- 13 Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003; 11(2): 529-41.
- 14 齐 静, 彭 晖, 顾振纶, 梁中琴, 杨纯正. 伊马替尼耐药的K562细胞系的建立及其生物学特性研究. *中华血液学杂志*(Qi Jing, Peng Hui, Gu Zhenlun, Liang Zhongqin, Yang Chunzheng. Establishment of an imatinib resistant cell line K562/G01 and its characterization. *Chinese Journal of Hematology*) 2004; 25(6): 337-41.