

RNAi干扰*Shp2*基因对K562细胞增殖的抑制效应

王灿蔚¹ 陶 崑^{1*} 齐杰玉¹ 邓一平²

¹重庆医科大学基础医学院免疫学教研室, 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016;

²重庆医科大学实验中心, 重庆 400016)

摘要 通过RNA干扰技术沉默蛋白酪氨酸磷酸酶*Shp2*基因, 构建重组质粒, 采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)法、Western blot、MTT法、流式细胞术(FCM)分别检测转染后K562细胞中*bcr/abl*融合基因、*bcr/abl*融合蛋白的表达水平、细胞生长增殖变化及细胞凋亡率, 探索该基因的沉默表达对K562细胞的抑制作用。结果表明, 该实验成功构建出能明显下调*Shp2*基因及其蛋白表达的重组质粒, 转染K562细胞后, 其*bcr/abl*融合基因及融合蛋白水平均明显降低、K562细胞增殖活力被抑制($P<0.05$)、细胞凋亡水平上升($P<0.05$)。与对照组相比, 其差异具有统计学意义。提示, 重组质粒可显著降低*bcr/abl*基因及蛋白的表达, 抑制K562细胞的生物学效应, 表明在细胞水平沉默*Shp2*有可能成为治疗慢性粒细胞白血病的靶点。

关键词 慢性粒细胞白血病(CML); *bcr/abl*; *Shp2*; K562细胞

The Inhibitory Effect of RNAi *Shp2* Gene on the Proliferation of Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells

Wang Canwei¹, Tao Kun^{1*}, Qi Jieyu¹, Deng Yiping²

¹Department of Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Chongqing Medical University Experiment Center, Chongqing 400016, China)

Abstract We established low-expressed *Shp2* recombinant plasmids containing siRNA fragment specific for *Shp2* gene. Real-time PCR and Western blot assays were used to detect the mRNA and protein level of *bcr/abl* gene. The proliferation of cells was detected by MTT assay, and the apoptosis was detected by Flow Cytometry (FCM). The results demonstrated that the recombinant plasmids were successfully constructed and significantly inhibited the expression of *Shp2* gene. Compared with the two control groups, the mRNA and protein level of *bcr/abl* were significantly decreased; the proliferation ability was inhibited significantly ($P<0.05$) and the rate of apoptosis cells was increased significantly ($P<0.05$). The biological effect of K562 cells may be significantly inhibited by down-regulation of *Shp2*, indicating that *Shp2* may play a biological role as a tumor suppressor gene.

Key words chronic myeloid leukemia (CML); *bcr/abl*; *Shp2*; K562

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是最常见的骨髓增生性疾病, 占成人白血病诊断病例的15%^[1]。其发病机制是t(9; 22)(q34; q11)易

位形成Ph染色体, 表达*bcr/abl*融合基因并翻译成具有酪氨酸激酶活性的*bcr/abl*融合蛋白, 该蛋白可激活细胞内多种信号传导通路, 导致白细胞在体内恶性增殖。目前, CML的治疗方法主要是采用酪氨酸激酶抑制剂来针对*bcr/abl*进行靶向治疗, 但有部分病人对此类药物可产生耐药^[2]。因此, 探索基于其他机制的治疗方法具有重要的现实意义。近年研究发现, *Shp2*基因已被确认为与人类白血病及其它肿瘤相关的蛋白酪氨酸磷酸酶细胞原癌基因^[3-4]。而作为

收稿日期: 2013-09-02 接受日期: 2013-11-06

重庆市科委(批准号: CSTC: 2010BB5369)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485813, E-mail: taokun68@126.com

Received: September 2, 2013 Accepted: November 6, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.CSTC: 2010BB5369)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485813, E-mail: taokun68@126.com

网络出版时间: 2013-12-23 14:32

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0281.html>

原癌基因, 其表达量在CML细胞中显著升高^[5]。同时研究也证实, 慢性粒细胞白血病致癌基因*bcr/abl*转化造血细胞需要*Shp2*介导^[6]。因此, 本实验拟通过RNA干扰技术沉默*Shp2*基因, 探索该基因的沉默表达对慢性髓细胞白血病K562细胞株的抑制效应, 旨在为寻找治疗CML的有效靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒及菌株

K562细胞由重庆医科大学组织与胚胎学研究室实验室赠送; pSilencer4.1-CMV neo质粒、DH5 α 由重庆医科大学基础医学院免疫学教研室保存。

1.2 主要试剂

*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、T4 DNA连接酶、RNAlplus Trizol、DNA Maker、miScript逆转录试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa); SYBR real-time PCR premixture试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA凝胶纯化回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; x-fect转染试剂和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Invitrogen公司; 预染蛋白Maker购自Thermo公司; 兔抗人*Shp2*单克隆抗体购自Epitomics公司; 兔抗人*c-abl* pAb购自Cell Signal公司; 兔抗人 β -actin pAb、HRP标记的羊抗兔IgG均购自北京四正柏公司; RPMI 1640培养液、胎牛血清均购自Hyclone公司; 引物由宝生物公司合成; 无效序列及RNA干扰序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 *Shp2* siRNA序列设计

根据NCBI数据库中*Shp2*基因(NM_002834.3) cDNA, 设计3条针对*Shp2*基因的cDNA 560~578、1 435~1 453、1 783~1 801位置碱基序列19 nt的RNA片段, 经Blast Search检索确认与*Shp2*以外的人类已知基因序列无同源性。序列分别如下: 正义5'-TGA TTA CTA TGA CCT GTA T-3'; 正义5'-TGA TTG TCA TGA CAA CGA A-3'; 正义5'-CGT TCA TTG TGA TTG ATA T-3', 分别命名为*Shp2*/560、*Shp2*/1435和*Shp2*/1783。

1.4 *Shp2* shRNA载体的构建

根据设计的siRNA序列, 设计模板DNA链6条, 其模式为: *Bam*H I-Sense-loop(TTC AAG ACG)-Antisense-终止信号-*Eco*R I-*Hind* III。序列信息如下: *Shp2*/560 Sense: 5'-GAT CCG TGA TTA CTA TGA

CCT GTA TTT CAA GAG AAT ACA GGT CAT AGT AAT CAC TTT TTT GAA TTC-A-3', Antisense: 5'-AGC TTG AAT TCA AAA AAG TGA TTA CTA TGA CCT GTA TTC TCT TGA AAT ACA GGT CAT AGT AAT CAC G-3'; *Shp2*/1435 Sense: 5'-GAT CCG TGA TTG TCA TGA CAA CGA ATT CAA GAG ATT CGT TGT CAT GAC AAT CAC TTT TTT GAA TTC A-3', Antisense: 5'-AGC TTG AAT TCA AAA AAG TGA TTG TCA TGA CAA CGA ATC TCT TGA ATT CGT TGT CAT GAC AAT CAC G-3'; *Shp2*/1783 Sense: 5'-GAT CCG CGT TCA TTG TGA TTG ATA TTT CAA GAG AAT ATC AAT CAC AAT GAA CGC TTT TTT GAA TTC A-3', Antisense: 5'-AGC TTG AAT TCA AAA AAG CGT TCA TTG TGA TTG ATA TTC TCT TGA AAT ATC AAT CAC AAT GAA CGC G-3'。

各组2条模板经95 °C退火形成小发夹结构的shRNA, pSilencer4.1/NC组质粒经*Bam*H I和*Hind* III酶切后回收大片段。利用T4 DNA连接酶把退火的shRNA模板DNA定向克隆至pSilencer4.1-CMV neo构建重组质粒。将重组体转化大肠杆菌DH5 α , 50 mg/L氨苄霉素的LB培养基筛选培养, 挑选单菌落培养, 提取质粒, 分别命名为pSilencer4.1*Shp2*/560、pSilencer4.1*Shp2*/1435、pSilencer4.1*Shp2*/1783, 插入无效序列的空载体命名为pSilencer4.1/NC, 作为本实验的阴性对照。*Eco*R I单酶切后根据琼脂糖凝胶电泳, 初步筛选出重组质粒。重组质粒序列测定由上海英俊公司完成。

1.5 转染并筛选单克隆细胞株

K562细胞株在37 °C, 5% CO₂条件下, 培养于含10%新生胎牛血清的RPMI 1640中, 每周传代2次至3次。取对数生长期的细胞以1 \times 10⁶/孔接种于6孔板, 待6孔板中的细胞生长密度达80%~90%时, 采用X-fect转染试剂盒分别将pSilencer4.1*Shp2*/560、pSilencer4.1*Shp2*/1435、pSilencer4.1*Shp2*/1783和pSilencer4.1/NC重组质粒转染至K562细胞。具体方法参照Clontech公司的Xfect™ Transfection Reagents说明书。

细胞转染48 h后以终浓度500 ng/ μ L的G418进行筛选。两周后, 可见独立荧光细胞团形成。采用极限稀释法原理将细胞转至96孔板, 每孔1个至2个细胞。G418 200 ng/ μ L维持培养。待96孔板内细胞增殖成团后, 传至培养瓶继续增殖, 最终得到重组质粒pSilencer4.1*Shp2*/560、pSilencer4.1*Shp2*/1435、

pSilencer4.1Shp2/1783的单克隆细胞株及阴性对照组pSilencer4.1/NC单克隆细胞株。

1.6 Real-time PCR检测各转染组K562细胞Shp2 mRNA水平的表达

Trizol法分别提取3组单克隆细胞株总RNA(以阴性细胞组和空白细胞组作为对照),按照miScript逆转录试剂盒说明书提取总RNA,取1 μ g总RNA进行cDNA合成反应,取2 μ L反应产物在20 μ L反应体系中进行实时荧光定量PCR检测。Shp2引物上游: 5'-CCT GGA GAT TTT GTT CTT TCT G-3', 下游: 5'-AGG GGC TGC TTG AGT TGT AGT A-3', 内参GAPDH引物上游: 5'-CAG CGA CAC CCA CTC CTC-3', 下游: 5'-TGA GGT CCA CCA CCC TGT-3', 两步法PCR扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 一个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 39个循环。

1.7 Western blot检测各转染组K562细胞Shp2蛋白表达水平

分别收集各组细胞, RIPA蛋白裂解液提取细胞总蛋白, BCA法检测蛋白浓度后与2 \times 上样缓冲液1:1混合煮沸, 每组上样量为50 μ g, 以8%的分离胶和5%的浓缩胶进行SDS-PAGE电泳。电转移至PVDF膜上后, 用5%脱脂奶粉封闭2 h; 分别加入兔抗人Shp2单克隆抗体(1:1 000稀释)、兔抗人 β -actin抗体(1:3 000稀释), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; TBST清洗3次后加入HRP标记的羊抗兔IgG(1:10 000稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 洗膜后经ECL发光显色系统显色。Quantity One软件分析条带灰度值, 采用Shp2/ β -actin代表Shp2蛋白的相对表达量。

1.8 RT-PCR和Real-time PCR检测转染细胞bcr/abl融合基因的表达

培养上述得到最佳干扰效率的pSilencer4.1Shp2/560细胞, pSilencer4.1/NC细胞以及空细胞, cDNA的获取方法同1.6。用于RT-PCR bcr/abl引物上游: 5'-GCA AGC TTA CCA TGG ACA TCC GTG G-3', 下游: 5'-GTC GAC CTT GCC ATC AGA AGC-3', β -actin上游: 5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AG-3', 下游: 5'-CAC AGG ATT CCA TAC CCA AG-3', RT-PCR扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 一个循环, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物经2%琼脂糖凝胶电泳后, Bio-Rad凝胶系统成像。Real-time PCR bcr/abl引物上游: 5'-CTT CTC CCT GGC ATC CGT GGA-3', 下游: 5'-TGCA ACG AAA AGG TTG GGG T-3'; 内参GAPDH引物序列同1.6, Real-

time PCR扩增程序同1.6。

1.9 Western blot检测转染细胞bcr/abl融合蛋白的表达水平

培养上述得到最佳干扰效率pSilencer4.1Shp2/560细胞, pSilencer4.1/NC细胞以及空细胞, 采用Western blot检测转染细胞bcr/abl融合蛋白的表达水平, 具体方法同1.7。Quantity One软件分析条带灰度值, 用bcr/abl/ β -actin代表bcr/abl蛋白的相对表达量。

1.10 MTT法检测转染细胞增殖能力

pSilencer4.1Shp2/560组、pSilencer4.1/NC和空K562组细胞均以 1×10^4 /孔接种于96孔板中, 设3个时间点(第1, 2, 3 d), 每个时间点每组细胞设5个复孔, 同时设只加培养液不加细胞的空白孔作为对照。各组细胞置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱内分别培养至各时间点后, 每孔加入20 μ L MTT(5 mg/mL)后继续培养4 h, 平板离心机离心弃上清后加入二甲基亚砷150 μ L终止培养, 酶标仪检测各孔490 nm处的吸光度D值, 计算各组平均值。试验重复3次以上, 结果基本一致, 以其中1次试验值为准, 绘制曲线。细胞抑制增殖率=(1-pSilencer4.1Shp2/560组D₄₉₀值/K562组D₄₉₀值) \times 100%。

1.11 流式细胞术(FCM)检测转染细胞凋亡率

pSilencer4.1Shp2/560组、pSilencer4.1/NC组和空K562组细胞均以 1×10^6 /孔接种于6孔板中培养, 取对数生长期的各组细胞于离心管中, 1 000 r/min, 离心5 min, 弃上清, 细胞经PBS洗涤2次, 再用1 mL PBS重悬于EP管中, 采用Annexin V-PI细胞凋亡检测试剂盒、通过流式细胞术检测细胞凋亡水平, 实验独立重复3次。

1.12 统计学分析

所有实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不同实验组之间的比较采用F检验, 使用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及鉴定

pSilencer4.1Shp2/560、pSilencer4.1Shp2/1435、pSilencer4.1Shp2/1783组重组质粒分别经EcoR I单酶切、琼脂糖凝胶电泳后, 在668 bp和4 289 bp左右分别出现一条目的条带, 与预期结果相符(图1)。测序结果表明与GenBank中提供的序列一致, 证实三组重组质粒构建成功。

2.2 重组质粒干扰效果检测

Real-time PCR结果分析: pSilencer4.1Shp2/560、

pSilencer4.1Shp2/1435、pSilencer4.1Shp2/1783组mRNA的抑制率分别为(64.52±0.51)%、(48.55±3.24)%、(20.20±10.41)%,与两对照组相比,pSilencer4.1Shp2/560、pSilencer4.1Shp2/1435组Shp2 mRNA抑制明显,差异有统计学意义($P<0.01$),而pSilencer4.1Shp2/1783转染组Shp2 mRNA抑制不明显,差异无统计学意义(图2A)。Western blot结果显示,各重组质粒组均可降低Shp2蛋白的表达水平(图2B),Quantity One软件分析,蛋白表达水平的抑制率分别为(42.35±1.08)%、(32.96±2.34)%、(21.09±1.11)%,与pSilencer4.1/NC组和K562组相比,pSilencer4.1Shp2/560、pSilencer4.1Shp2/1435差异具有统计学意义($P<0.01$)。选择干扰效率较高的pSilencer4.1Shp2/560进行后续实验。

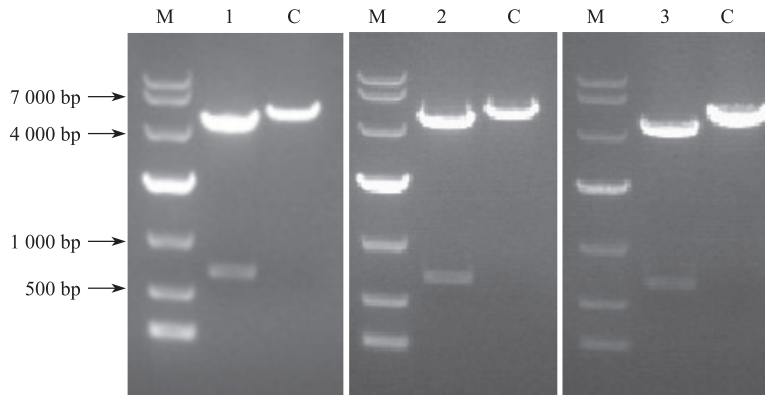
2.3 *bcr/abl*融合基因的表达水平

RT-PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,可见654 bp大小的*bcr/abl*融合基因及336 bp的内参 β -actin基因;pSilencer4.1Shp2/560转染组*bcr/abl* mRNA表达水平为(0.44±0.01),与pSilencer4.1/NC组(0.71±0.01)和K562空白细胞组(0.69±0.01)比较,具有显著性差异($P<0.05$)。说明干扰Shp2表达可明显抑制K562细胞中*bcr/abl*基因的转录水平(图3A)。

Real-time PCR结果显示,与阴性对照组和空白细胞组相比,pSilencer4.1Shp2/560转染组*bcr/abl* mRNA水平明显降低(图3B)。

2.4 Western blot检测pSilencer4.1 Shp2/560转染细胞组*bcr/abl*融合蛋白的表达水平

Western blot结果显示,pSilencer4.1Shp2/560转

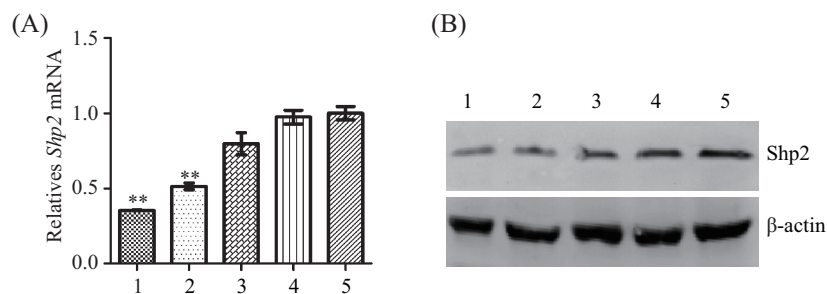


M: DL10000分子量标记; 1: *EcoR* I单酶切pSilencer4.1Shp2/560; 2: *EcoR* I单酶切pSilencer4.1Shp2/1435; 3: *EcoR* I单酶切pSilencer4.1Shp2/1783; C: *EcoR* I单酶切pSilencer4.1-CMV neo。

M: DL10000 DNA marker; 1: pSilencer4.1Shp2/560 digested with *EcoR* I; 2: pSilencer4.1Shp2/1435 digested with *EcoR* I; 3: pSilencer4.1Shp2/1783 digested with *EcoR* I; C: pSilencer4.1-CMV neo digested with *EcoR* I。

图1 shRNA酶切鉴定

Fig.1 The identification of the 3 groups of shRNA digested with *EcoR* I



A: Real-time PCR检测各组Shp2 mRNA表达水平; B: Western blot检测各组Shp2蛋白表达水平; 1: pSilencer4.1Shp2/560组; 2: pSilencer4.1Shp2/1435组; 3: pSilencer4.1Shp2/1783组; 4: pSilencer4.1/NC组; 5: K562组。 ** $P<0.01$,与pSilencer4.1/NC组和K562组比较。

A: expression of Shp2 mRNA detected by Real-time PCR; B: expression of Shp2 protein detected by Western blot; 1: pSilencer4.1Shp2/560 group; 2: pSilencer4.1Shp2/1435 group; 3: pSilencer4.1Shp2/1783 group; 4: pSilencer4.1/NC group; 5: K562 group. ** $P<0.01$ compared with pSilencer4.1/NC group and K562 group.

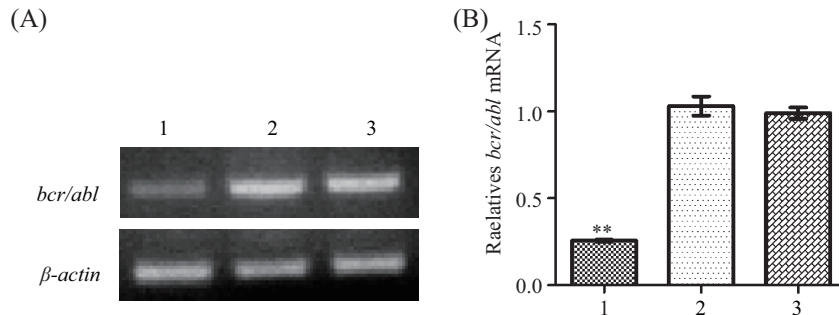
图2 各组细胞中Shp2 mRNA和蛋白表达水平的检测

Fig.2 Expression of Shp2 mRNA and protein levels in each group

染细胞组**bcr/abl**融合蛋白的表达水平明显降低,与其他两组相比,具有显著性差异($P < 0.05$)。pSilencer4.1/NC组和K562组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明干扰**Shp2**表达可有效下调K562细胞中**bcr/abl**融合蛋白表达水平(图4)。

2.5 MTT法检测转染细胞增殖率

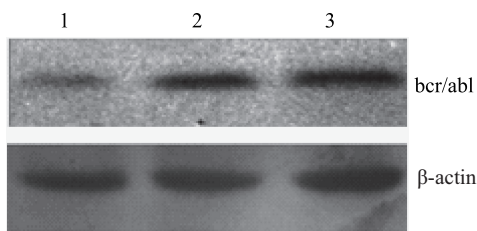
MTT检测结果显示,从第2天起,pSilencer4.1 Shp2/560转染组细胞的抑制增殖率分别为39.42%、58.21%,明显低于其他两组细胞($P < 0.05$),其他两组细胞间 D_{490} 均值基本相近,无统计学差异($P > 0.05$,图5)。结果



A: RT-PCR检测pSilencer4.1Shp2/560转染K562细胞后**bcr/abl** mRNA水平; B: Real-time PCR检测pSilencer4.1Shp2/560转染K562细胞后**bcr/abl** mRNA水平; 1: pSilencer4.1Shp2/560组; 2: pSilencer4.1/NC组; 3: K562组。 ** $P < 0.01$,与pSilencer4.1/NC组和K562组比较。
A: expression of *bcr/abl* mRNA were determined by RT-PCR in K562 cells after transfecting with pSilencer4.1Shp2/560; B: expression of *bcr/abl* mRNA were determined by Real-time PCR in K562 cells after transfecting with pSilencer4.1Shp2/560; 1: pSilencer4.1Shp2/560 group; 2: pSilencer4.1/NC group; 3: K562 group. ** $P < 0.01$ compared with pSilencer4.1/NC group and K562 group.

图3 RT-PCR和Real-time PCR检测**bcr/abl** mRNA的转录水平

Fig.3 Expression of *bcr/abl* mRNA in K562 cells detected by RT-PCR and Real-time PCR



1: pSilencer 4.1Shp2/560组; 2: pSilencer4.1/NC组; 3: K562组。
1: pSilencer 4.1Shp2/560 group; 2: pSilencer4.1/NC group; 3: K562 group.

图4 Western blot检测**bcr/abl**蛋白表达水平

Fig.4 The level of *Shp2* protein was detected by Western blot

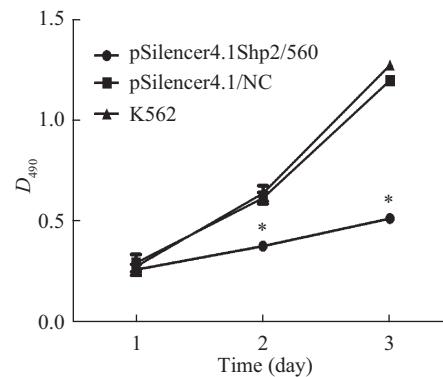
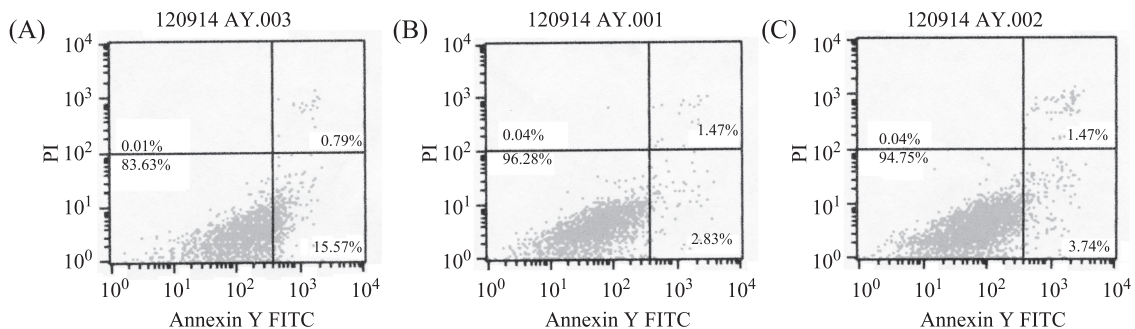


图5 MTT法检测K562细胞生长增殖曲线

Fig.5 The proliferation of K562 cells was detected by MTT assay



A: pSilencer4.1 Shp2/560转染组; B: pSilencer4.1/NC转染组; C: K562细胞组。
A: pSilencer4.1 Shp2/560 transfect group; B: pSilencer4.1/NC transfect group; C: K562 cells group.

图6 流式细胞术检测K562细胞凋亡率

Fig.6 The apoptosis rate of K562 cells was detected by Flow Cytometry

显示,干扰*Shp2*的表达可有效抑制K562细胞增殖。

2.6 流式细胞术检测转染前后细胞凋亡率

采用流式细胞术检测3组转染细胞凋亡水平,结果显示,pSilencer4.1*Shp2*/560转染组细胞的凋亡率为(15.30±0.30)%,高于pSilencer 4.1/NC组(2.81±0.14)%及空白K562细胞组(3.61±0.44)%,差异具有统计学意义($P<0.05$),而pSilencer4.1/NC组和K562空细胞组凋亡率无显著差异(图6)。说明干扰*Shp2*表达可促进K562细胞凋亡。

3 讨论

慢性粒细胞白血病造血细胞的恶性增殖与凋亡抵抗是其主要病理特征之一,因此明确白血病细胞恶性增殖与凋亡抵抗的分子机制对于阐明白血病发病机制及制定更有效的治疗策略具有十分重要的意义。*Shp2*属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员之一,作为细胞因子、生长因子及其他胞外刺激因素的下游信号分子,其表达于机体的各种组织和细胞中,与许多重要的细胞生命活动如细胞增殖分化、迁移、凋亡的调控密切相关^[7-8]。近来研究证实,*Shp2*基因在成人白血病细胞包括CML细胞中均存在过度表达现象^[5]。同时,CML的致癌基因*bcr/abl*转化造血细胞需要*Shp2*介导^[6],*Shp2*可通过与p210 *bcr/abl*致癌蛋白的分子伴侣热休克蛋白90(HSP90)作用,促进p210 *bcr/abl*致癌蛋白降解^[6]。以上研究均提示,*Shp2*可能成为一种新型的抗白血病药物靶分子,具有潜在的治疗学意义。鉴于此,本研究拟通过RNA干扰技术沉默*Shp2*基因,使该原癌基因在K562细胞中呈现低表达,从而在细胞水平探讨其抗白血病效应。

实验研究表明,构建的pSilencer4.1 *Shp2*/560重组质粒经有效转染可明显抑制K562细胞中*Shp2*基因及蛋白的表达水平;下调的*Shp2*能抑制细胞增殖并促进细胞凋亡,与Chen等^[6]研究结果相符。同时,我们还发现下调的*Shp2*可显著降低CML细胞中致癌基因*bcr/abl*及其蛋白表达水平。究其原因,可能与*Shp2*/*Gab2*的相互作用有关。*Gab2*(生长因子受体结合蛋白2)作为*bcr/abl*的信号转导蛋白,在CML细胞中呈现高表达。它通过对*Gab2* Y452区域的持续性磷酸化作用,增强对酪氨酸激酶抑制剂的抵抗^[9]。所有*Gab2*家族蛋白都能与带有SH3的Grb2蛋白偶联,靠近C端的多个酪氨酸残基在*Gab2*蛋白激活后能迅速磷酸化并与富含SH2的游离信号转运分子结

合,如*Shp2*的p85亚单位、PLC γ 及Crk等^[10]。而作为支架蛋白,*Gab2*可被酪氨酸激酶磷酸化激活,活化下游*Shp2*/*Ras*/*ERK*和*PI3K*/*AKT*等一系列信号传导途径,在细胞增殖分化、凋亡及迁移等生理过程中发挥重要作用^[11-13]。我们推测,下调*Shp2*表达,可能抑制了*Shp2*与*Gab2*的相互作用,使*Gab2*磷酸化水平降低而发挥抗白血病效应。本研究已从细胞水平证实沉默*Shp2*具有明显的抗白血病作用,后续我们将进一步探索*Shp2*/*Gab2*的相互作用机制及进行体内白血病动物模型检测。

参考文献 (References)

- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 2012; 87(11): 1037-45.
- Bisen A, Claxton DF. Tyrosine kinase targeted treatment of chronic myelogenous leukemia and other myeloproliferative neoplasms. *Adv Exp Med Biol* 2013; 779: 179-96.
- Mohi MG, Neel BG. The role of *Shp2* (PTPN11) in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17(1): 23-30.
- Li S, Hsu DD, Wang H, Feng GS. Dual faces of SH2-containing protein-tyrosine phosphatase *Shp2*/PTPN11 in tumorigenesis. *Front Med* 2012; 6(3): 275-9.
- Xu R, Yu Y, Zheng S, Zhao X, Dong Q, He Z, *et al*. Overexpression of *Shp2* tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia. *Blood* 2005; 106(9): 3142-9.
- Chen J, Yu WM, Daino H, Broxmeyer HE, Druker BJ, Qu CK. *Shp2* phosphatase is required for hematopoietic cell transformation by Bcr-Ab1. *Blood* 2007; 109(2): 778-85.
- Qu CK. The *Shp2* tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions. *Cell Res* 2000; 10(4): 279-88.
- Grossmann KS, Rosário M, Birchmeier C, Birchmeier W. The tyrosine phosphatase *Shp2* in development and cancer. *Adv Cancer Res* 2010; 106: 53-89.
- Wohrle FU, Halbach S, Aumann K, Schwemmers S, Braun S, Auberger P, *et al*. *Gab2* signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors. *Leukemia* 2013; 27(1): 118-29.
- Zhang TT, Li H, Cheung SM, Costantini JL, Hou S, Al-Alwan M, *et al*. Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation. *Immunol Rev* 2009; 232(1): 255-72.
- 张珊珊, 柯越海. 支架蛋白*Gab2*信号调控与乳腺癌. *生物化学与分子生物学报*(Zhang Shanshan, Ke Yuehai. *Gab2* signaling in breast cancer. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2011; 27(4): 300-4.
- Maus M, Medgyesi D, Kövesdi D, Csuka D, Koncz G, Sármay G. Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival. *Cell Signal* 2009; 21(2): 220-7.
- Tan WH, Popel AS, Mac Gabhann F. Computational model of *Gab1/2*-dependent VEGFR2 pathway to Akt activation. *PLoS One* 2013; 8(6): e67438.