

重组人SPARC蛋白对SKM-1细胞生物活性的研究

潘晖 周晓佳 王利*

(重庆医科大学附属第一医院血液科, 重庆 400016)

摘要 富含半胱氨酸的酸性分泌性糖蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)在疾病细胞衰老过程中具有复杂且多效的生物学作用。然而, SPARC在继发性急性髓性白血病(secondary acute myeloid leukemia, sAML)中的作用尚未完全阐明。该研究旨在探讨人重组SPARC(rh-SPARC)对sAML的生物学及免疫调节相关作用。差示扫描量热法、CCK-8法、流式细胞术、蛋白质印迹分析(Western blot)和等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)等评估rh-SPARC的特征和生物活性。结果表明, rh-SPARC蛋白以浓度依赖性方式抑制SKM-1而非K562细胞的增殖于细胞周期G₀/G₁期。rh-SPARC和Ara-C联合使用对SKM-1的增殖抑制更显著。ITC结果显示, rh-SPARC和Ara-C之间没有直接的相互作用。Western blot结果显示, rh-SPARC和Ara-C联合作用显著降低SKM-1中pAkt的相对表达水平。以上结果表明, rh-SPARC对白血病细胞具有选择抑制性, rh-SPARC和Ara-C之间存在协同作用, rh-SPARC通过降低Akt磷酸化, 以增强SKM-1对Ara-C的敏感性。

关键词 继发性髓系白血病; 骨髓增生异常综合征; SPARC; 阿糖胞苷; HEK293F表达体系

Bioactivity of Recombinant Human SPARC Protein Against SKM-1 Cell

Pan Hui, Zhou Xiaojia, Wang Li*

(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) has a complicated and pleiotropic biological role in cellular senescence during disease. However, the role of SPARC in secondary acute myeloid leukemia (sAML) is not yet fully understood. A high-efficiency HEK293F expression system was established to purify recombinant human SPARC (rh-SPARC), and Auto VP-capillary differential scanning calorimetry, CCK-8 kit, flow cytometry, and Western blot analyses were used to assess the characteristics and bioactivity of rh-SPARC. Isothermal titration calorimetry was performed to observe whether there was a direct interaction between rh-SPARC and cytarabine (Ara-C). The cell lines used in this study included SKM-1 and K562. The rh-SPARC protein suppressed the proliferation of SKM-1 cells in a concentration-dependent manner and suppressed the SKM-1 cell cycle in the G₀/G₁ phase, with a more significant observed when rh-SPARC and Ara-C were used in combination. In addition, the combination of rh-SPARC and Ara-C significantly reduced the relative levels of the pAkt protein in SKM-1 cells compared to rh-SPARC or Ara-C alone. The results indicated that rh-SPARC has a selective inhibition activity towards leukemia cells, as it could suppress the sAML cell line SKM-1 in the G₀/G₁ phase in a concentration-dependent manner. In addition, there a synergistic effect between rh-SPARC and

收稿日期: 2019-02-13 接受日期: 2019-03-07

国家自然科学基金(批准号: 30971277)、重庆市自然科学基金计划项目(批准号: cstc2018jcyjA0872)和重庆市教委基金(批准号: KJ1702017)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011532, E-mail: liwangls@yahoo.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30971277), the Natural Science Foundation Project of CQ (Grant No.cstc2018jcyjA0872) and the Chongqing Education Commission Foundation (Grant No.KJ1702017)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011532, E-mail: liwangls@yahoo.com

网络出版时间: 2019-05-10 14:04:00

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1118.016.html>

Ara-C was observed, and rh-SPARC may enhance the sensitivity of SKM-1 cells to Ara-C by decreasing the phosphorylation of Akt.

Keywords secondary acute myeloid leukemia; myelodysplastic syndromes; SPARC; cytosine arabinoside; HEK293F expression system

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是异质性恶性肿瘤,被认为是由位于造血干细胞与祖细胞区室内的少量癌症起始细胞产生的^[1-2]。MDS与血细胞减少症相关并且有很大风险演变为继发性急性髓性白血病(secondary acute myeloid leukemia, sAML)^[3-4]。先前研究已经阐明染色体畸变与MDS的发生发展关系,现已知5号染色体长臂缺失——del(5q)是MDS中最常见的细胞遗传学异常^[5-6]。Del(5q)在MDS患者中以10%~15%的频率发生,并且当它作为孤立的细胞遗传学异常发生时预示着患者具有良好的预后^[5,7-8]。富含半胱氨酸的酸性分泌性糖蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC, 也称为骨黏连蛋白或BM-40)是属于共同缺失区域的基因编码分泌蛋白^[7,9]。

SPARC是一种抗黏附基质细胞蛋白,具有许多与细胞形态发生、重塑、迁移和增殖相关的生物学功能^[10]。SPARC可在不同类型的癌症中表达,但其在肿瘤发生中的作用似乎是复杂且多效的,至今尚未有明确定义^[11]。在实体瘤中,SPARC高表达于乳腺癌和结肠直肠癌^[12-13],但在前列腺癌和肺癌中表达较低^[14-15]。SPARC还在血液系统疾病中发挥着作用。在5q综合征中,SPARC的单倍体不足可能增加HSC与支持基质细胞的黏附性,从而提供克隆优势^[16]。先前研究的结果显示,用质粒SATB1转染K562细胞诱导SPARC过表达,导致细胞增殖减少^[17]。另一项研究观察到,SPARC在TKI抵抗的慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)细胞系中积累,可激活Fyn/ERK激酶信号传导以抑制细胞凋亡,并促进CML细胞对伊马替尼(Imatinib, IM)耐药的发生^[18]。在MDS中,SPARC的高表达可抑制5q综合征中肿瘤细胞的生长,而其低表达则可能导致肿瘤的发展。来那度胺(口服抗肿瘤药和免疫调节剂)是一种已知可提高SPARC表达的药物,已被用于治疗5q综合征患者^[19]。此外,尽管有研究提出SPARC对免疫调节药物的功效很重要,但其在sAML细胞中的生物活性尚未明确定义^[10,20]。

阿糖胞苷(cytosine arabinoside, Ara-C)因其可

观的安全性和有效性,被认为是治疗高风险MDS患者最理想的策略之一。高风险MDS和MDS转化的AML(即sAML)患者对以Ara-C为基础的化疗方案可达到50%的完全缓解率(complete response, CR)^[21],但仅限于少数患者。此外,CR持续时间短,患者复发率高。Ara-C是一种嘧啶抗代谢物,转化为Ara-CTP后可取代DNA合成过程中的dCTP,此过程可终止DNA复制并不可逆地干扰细胞中的DNA合成^[22]。

在本研究中,为了评估SPARC对sAML疾病发生发展中的功能与作用,我们用HEK293F细胞表达和纯化人重组SPARC(rh-SPARC),监测rh-SPARC对sAML的作用,并观察其与Ara-C联合使用时对sAML的生物活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

人SPARC cDNA是由厦门大学韩家淮实验室慷慨馈赠的。大肠杆菌DH5 α 细胞、HEK293F细胞、pTT5质粒由BSD实验室提供。sAML细胞系SKM-1由华中科技大学同济医学院周建峰教授馈赠。用于分子克隆的所有试剂,包括Prima STAR[®] MaxDNA聚合酶、DNA连接试剂盒Ver.2.1和限制性内切酶(TaKaRa公司)。DNA凝胶提取试剂盒和质粒Miniprep试剂盒购自Omega Bio-Tek公司。Complete[™] His-Tag纯化树脂购自Sigma-Aldrich公司。HRP缀合的兔抗小鼠IgG抗体购自Thermo公司。ToxinEraser[™]内毒素去除试剂盒购自GenScript公司。注射器过滤器(0.22 μ m/28 mm, PES, 无菌,赛多利斯)购自Beyotime公司。在整个实验过程中均遵循制造商的推荐方案。

1.2 rh-SPARC的克隆和表达

为了获得分泌性rh-SPARC,我们将人SPARC基因连接到C末端带有His标签的pTT5载体上,并对阳性质粒进行筛选。在转染前1天制备了240 mL细胞浓度为 1×10^6 个/mL的HEK293F细胞悬浮液。将细胞在37 $^{\circ}$ C、125 rpm和含5% CO₂的条件下培养过夜。第2天,用5 mL无血清培养基稀释240 μ g的rh-SPARC表达质粒与870 μ L的FectoPRO[®] DNA转染试剂混合,

并在混匀后于25 °C孵育10 min。随后将FectoPRO® DNA转染混合物加入HEK293F细胞中。在第5、6、7天收集30 μ L细胞培养溶液, 以评估rh-SPARC的表达水平并确定最佳表达条件。之后将细胞培养溶液分离成细胞培养基、细胞裂解上清液和细胞裂解沉淀物以分析rh-SPARC的定位。进行蛋白印迹和SDS-PAGE分析, 以评估rh-SPARC表达。

1.3 rh-SPARC的纯化

将分离后的240 mL上清液分装入50 mL离心管, 纯化。用0.22 μ L一次性针头过滤器过滤后, 用AKTA蛋白质纯化系统(GE Healthcare)进行rh-SPARC纯化。上样缓冲液由50 mmol/L Tris、200 mmol/L NaCl和2 mmol/L CaCl_2 (pH7.4)组成。用30 mL上样缓冲液以1 mL/min的流速洗涤5 mL HisSeq Ni-NTA 6FF色谱柱。当色谱柱达到离子平衡时, 通过输入管A将上清液注入色谱柱中。收集并标记流出液体, 待上清液上样完毕, 再次使用上样缓冲液作为平衡溶液。接下来, 将含有50 mmol/L Tris、300 mmol/L NaCl、2 mmol/L CaCl_2 和200 mmol/L咪唑(pH7.4)的洗脱缓冲液从管B中注入柱子。以下列比例进行梯度洗脱: 管道A/管道B=5%、10%、25%、50%和100%(分别为10、20、50、100和200 mmol/L咪唑)。收集每个梯度流穿液, 用于SDS-PAGE检测。使用透析法去除洗脱缓冲液(pH7.4)中的咪唑, 并使用Nanodrop 2000测定在波长280 nm处纯化蛋白质的浓度。

1.4 差示扫描量热法(DSC)分析rh-SPARC热稳定性

将rh-SPARC用上样缓冲液稀释至1 mg/mL, 并通过Auto VP-毛细管DSC(GE Healthcare)分析蛋白质的 T_m 值。热容量检测的设定温度为30~100 °C, 用熔解曲线分析计算 T_m 值。

1.5 CCK-8分析rh-SPARC生物活性

用加有10%胎牛血清(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)的RPMI-1640培养基孵育SKM-1、K562细胞, 孵箱条件为5% CO_2 、37 °C。将SKM-1、K562细胞以 5×10^3 个细胞/孔接种到96孔板中并培养过夜, 然后加入不同浓度的rh-SPARC或Ara-C。于24、48、72 h后, 使用CCK-8试剂盒评估细胞增殖活性。报道结果为至少3次独立实验的平均值。

1.6 通过等温滴定量热法(ITC)评估rh-SPARC和Ara-C/Ara-CTP之间的相互作用

使用Microcal ITC200仪器(Malvern)在25 °C下

对30 μ mol/L rh-SPARC(300 μ L, 约3 mg)和10倍浓度的Ara-C/Ara-CTP溶液(300 μ L, 300 nmol/L)进行ITC实验。将Ara-C和Ara-CTP直接滴定到含有30 μ mol/L rh-SPARC的小室中。使用NITPIC对数据进行基线校正和整合, 具有ITC的单点结合模型拟合非线性最小二乘法, 用GUSSI绘图^[23]。

1.7 蛋白质印迹分析

在SDS-PAGE还原缓冲液中制备纯化的rh-SPARC蛋白, 并在10% SDS-PAGE凝胶中进行电泳实验。将rh-SPARC(200 mg/mL)和Ara-C(3 μ mol/L)加入SKM-1细胞8 h后收集各组细胞, 加入含有1 μ mol/L苯基甲磺酰氟(PMSF)的RIPA裂解物提取总蛋白。使用BCA法测定蛋白质浓度。在蛋白质浓度标准化后, 将50 μ g蛋白质加载到SDS-PAGE凝胶上。凝胶电泳后, 将样品转移到PVDF膜上, 然后在室温下用5% BSA中封闭1 h。后用抗His一抗4 °C孵育过夜, 用HRP缀合的二抗37 °C孵育2 h。使用Bio-Rad Western ECL溶液曝光蛋白质条带。最后使用ImageJ软件分析条带的灰度值。

1.8 细胞周期分析

用预冷的PBS洗涤细胞2次, 预冷的75%乙醇, 于4 °C固定过夜。将固定的细胞以1 500 r/min离心4 min, 弃去上清液, 并用PBS洗涤1次。随后, 加入400 μ L碘化丙啶(PI, 50 μ g/mL)和100 μ L RNase (100 μ g/mL), 将细胞在室温下避光孵育30 min。最后通过流式细胞术检测细胞周期分布。

1.9 统计分析

用SPSS 19.0和GraphPad Prism 6.0对实验结果进行分析, 结果以平均值和标准差(mean $\pm$ SD)表示。每个实验重复至少3次。用单因素方差分析进行组间分析比较, $P < 0.05$ 表示结果具有统计学意义。当差异具有统计学意义时, 使用Tukey Post-Hoc检验进行各组相互比较。

2 结果

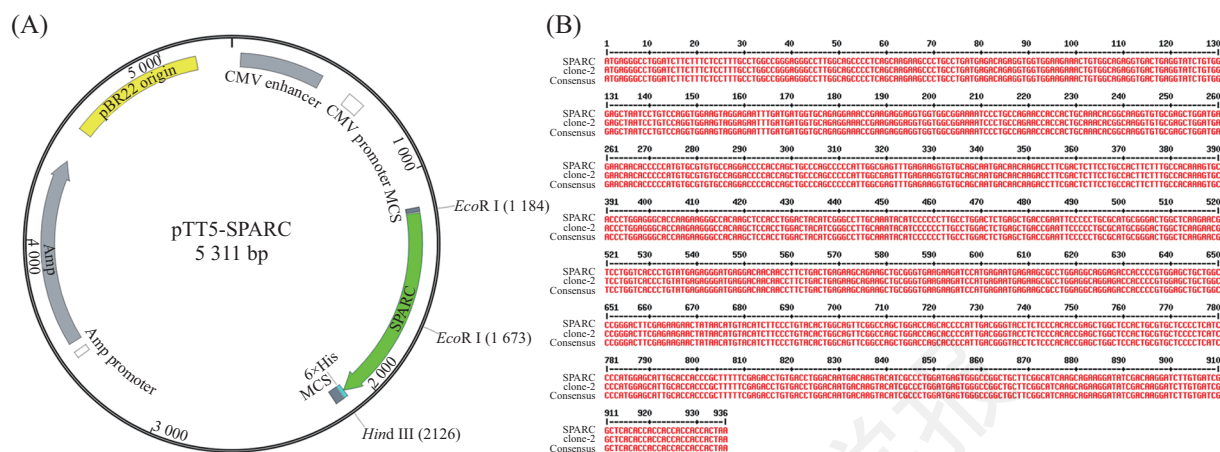
2.1 rh-SPARC的表达和纯化

将人SPARC基因克隆到质粒pTT5中以产生表达质粒pTT5-SPARC-6 $\times$ His(图1)。在预表达体系中, 用质粒转染60 mL HEK293F细胞, 在细胞活力不低于50%时可保证目标蛋白降解率较低的前提下, 为达到产量最大化在第7天收集蛋白。C末端含有6 $\times$ His rh-SPARC总共有311个氨基酸, 预测其分

子量为35 kDa^[24]。SDS-PAGE和蛋白质印迹检测rh-SPARC的分子量接近40 kDa(图2A)。

因预表达检测出有rh-SPARC蛋白的表达, 所以

扩大细胞培养体积至240 mL。在第7天收集细胞培养基, 使用HisSeq Ni-NTA 6FF色谱柱纯化rh-SPARC蛋白(图2B)。浓缩rh-SPARC蛋白, 并用Tris缓冲液

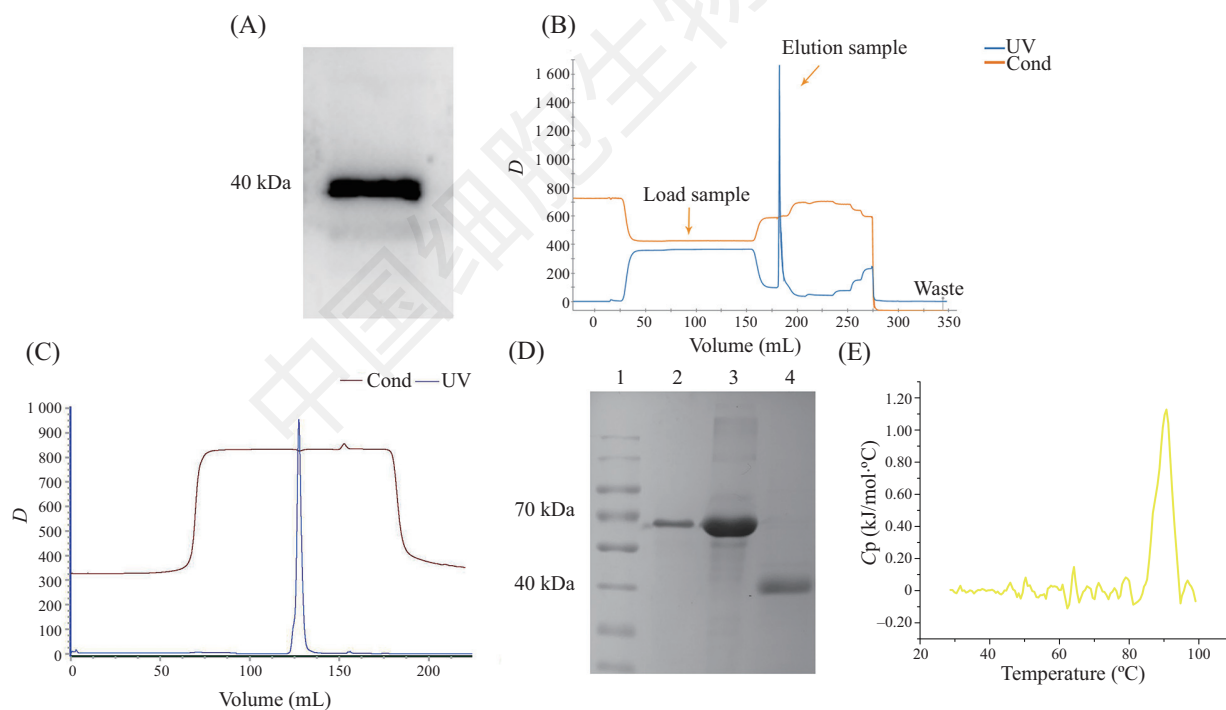


A: pTT5-SPARC质粒图谱; B: rh-SPARC表达质粒DNA测序。

A: Map of the pTT5 plasmid; B: DNA sequencing confirmation of the successful construction of the rh-SPARC expression plasmid.

图1 pTT5-SPARC质粒图谱和rh-SPARC表达质粒DNA测序

Fig.1 Map of the pTT5 plasmid and DNA sequencing confirmation of the successful construction of the rh-SPARC expression plasmid



A: rh-SPARC的蛋白质印迹分析。B: AKTA蛋白质纯化系统纯化rh-SPARC, 蓝色紫外(UV)峰表示目的蛋白。C: 分子筛进一步纯化rh-SPARC, 蓝色紫外(UV)峰表示目的蛋白。D: BSA作为对照组评估rh-SPARC的蛋白浓度; 1代表蛋白标准(protein marker); 2代表2 μL BSA(2.0 mg/mL); 3代表5 μL BSA(2.0 mg/mL); 4代表2 μL变性rh-SPARC。E: Auto VP-毛细管DSC分析rh-SPARC的 T_m 值。

A: Western blot analysis of rh-SPARC. B: purification of rh-SPARC using an AKTA protein purification system. The blue ultraviolet (UV) peak indicates the target protein. C: further purification of rh-SPARC using molecular sieves. The blue ultraviolet (UV) peak indicates the target protein. D: BSA as a control to assess the concentration of rh-SPARC; 1 represents protein marker; 2 represents 2 μL BSA (2.0 mg/mL); 3 represents 5 μL BSA (2.0 mg/mL); 4 represents 2 μL denatured rh-SPARC. E: T_m value analysis of rh-SPARC via Auto VP-capillary DSC.

图2 rh-SPARC的纯化和特征

Fig.2 Purification and characterization of rh-SPARC

(50 mmol/L Tris、300 mmol/L NaCl、2 mmol/L CaCl_2) 置换含有咪唑的洗脱液。SDS-PAGE显示洗脱样品含有非靶蛋白, 我们使用分子筛进一步纯化洗脱蛋白质(图2C)。后用BSA作为对照评估rh-SPARC的浓度(图2D)。最后, 在240 mL培养体系中总共得到7.85 mg rh-SPARC, 终浓度为1.57 mg/mL, rh-SPARC的产率为80.04%(表1)。

为了确定纯化的rh-SPARC是否足够稳定以用于后续实验, 我们进行了Auto VP-毛细管DSC测试。我们将rh-SPARC稀释至1 mg/mL。在30~100 °C的温度区间下检测其热容量变化, 结果表明, rh-SPARC的 T_m 值为90.68 °C, 表明其热稳定性好(图2E)。

2.2 rh-SPARC的生物活性分析

在进行生物活性测试之前, 我们对rh-SPARC进行了去内毒素和除菌处理。之后用不同浓度的rh-

SPARC(0、10、100、200 $\mu\text{g/mL}$)孵育SKM-1和K562细胞, 并用CCK-8试剂盒在3个不同时间点(24、48、72 h)检测它们的增殖率。

与对照组相比, 光密度(D)值显示, 10、100、200 $\mu\text{g/mL}$ rh-SPARC组在24、48、72 h显著抑制SKM-1细胞的增殖($P<0.05$)(图3A)。此外, 200 $\mu\text{g/mL}$ rh-SPARC组的 D 值在48、72 h显著低于10、100 $\mu\text{g/mL}$ rh-SPARC处理组($P<0.05$)(图3A)。但是, K562细胞的rh-SPARC处理组和对照组 D 值之间没有显著差异($P>0.05$)(图3B)。

我们还进行了一些实验来评估rh-SPARC是否在SKM-1细胞中具有与免疫调节药物相关的作用。我们用临床上高剂量的Ara-C(3 $\mu\text{mol/L}$)单独处理或与不同浓度的rh-SPARC蛋白联合处理SKM-1细胞并评估细胞增殖率。 D 值显示: 与未处理组相比,

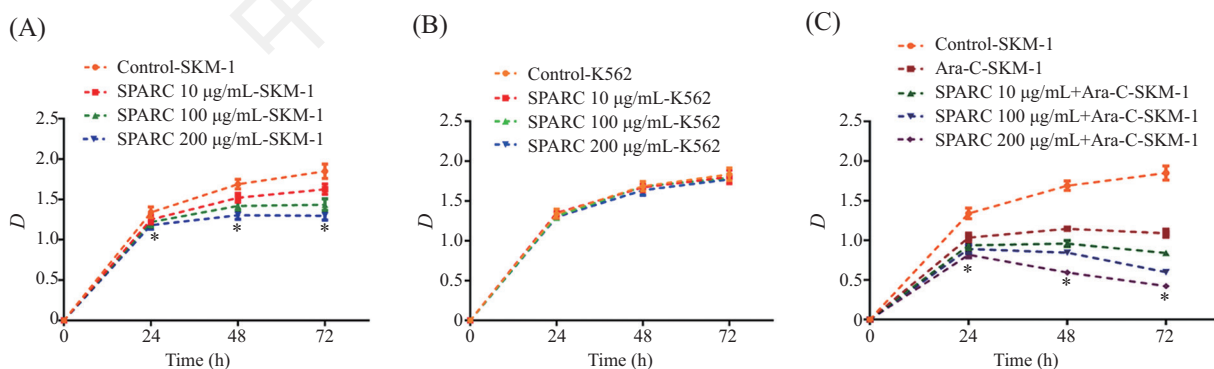
表1 HEK293F细胞表达纯化rh-SPARC产率

Table 1 The yield of expression and purification of rh-SPARC in HEK293F cells

样品 Sample	体积(mL) Volume (mL)	蛋白含量(mg/mL) Protein concentration (mg/mL)	总含量(mg) Total amount (mg)	产率(%) Yield (%)
Culture medium	240.0	0.11	26.400	/
Mixture of all elution SPARC samples	9.0	1.24	11.160	42.27 ¹
SPARC after concentration and dialysis	0.7	14.01	9.807	87.88 ²
Molecular sieve chromatography	5.0	1.57	7.850	80.04 ³

最终储存缓冲液: 50 mmol/L三羟甲基氨基甲烷、200 mmol/L 氯化钠、2 mmol/L 氯化钙, pH7.4。用Nanodrop 2000测定该蛋白在280 nm处的浓度。¹洗脱后产率为11.160/26.400=42.27%; ²浓缩透析后产率为9.807/11.160=87.88%; ³分子筛后产率为7.850/9.807=80.04%。

Final storage buffer: 50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl_2 , pH7.4. The concentration of the protein was determined at 280 nm by Nanodrop 2000. ¹The yield of SPARC in elution is 11.160/26.400 = 42.27%; ²The yield of SPARC after concentration and dialysis is 9.807/11.160 = 87.88%; ³The yield of SPARC after molecular sieve is 7.850/9.807 = 80.04%.



A: CCK-8检测不同浓度rh-SPARC对SKM-1细胞增值的影响; B: CCK-8检测不同浓度的rh-SPARC对K562细胞增值的影响; C: CCK-8不同浓度的rh-SPARC联合Ara-C对SKM-1细胞增值的影响; * $P<0.05$, 与对照组比较。

A: SKM-1 cells were treated with different concentrations of rh-SPARC. B: K562 cells were treated with different concentrations of rh-SPARC. C: SKM-1 cells were treated with different concentrations of rh-SPARC. * $P<0.05$ compared with control group.

图3 CCK-8检测rh-SPARC单独或联合Ara-C使用对SKM-1和K562细胞增殖的影响

Fig.3 CCK-8 analysis of the effects of rh-SPARC on SKM-1 and K562 cells alone or in combination with Ara-C on SKM-1 cells with respect to time and concentration

SKM-1细胞增殖在Ara-C单独处理或联合10、100、200 $\mu\text{g/mL}$ rh-SPARC孵育时受到显著抑制($P<0.05$) (图3C)。结果显示, 当Ara-C和rh-SPARC同时孵育SKM-1细胞时, 细胞增殖受抑更明显; 随着时间和rh-SPARC浓度增高, 抑制效果越明显。

2.3 细胞周期分布

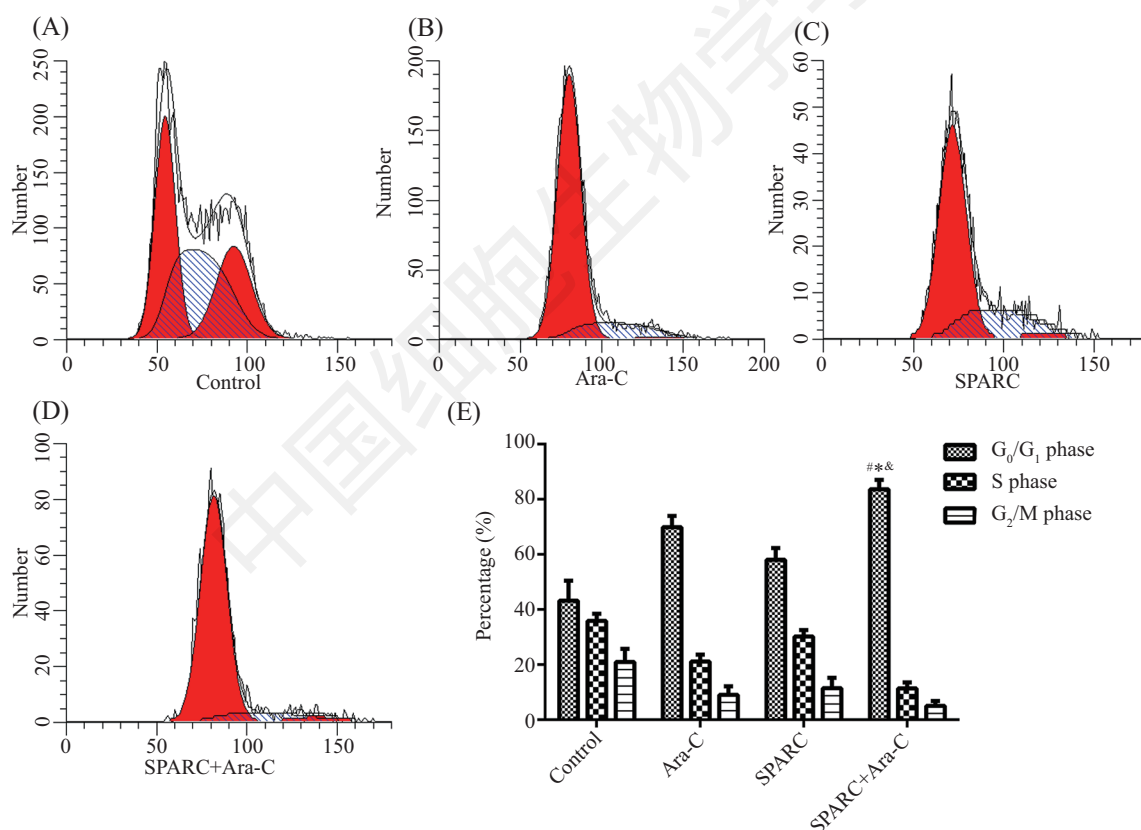
为了评估rh-SPARC是否影响细胞周期进展, 我们将SKM-1细胞与200 mg/mL rh-SPARC一起孵育, 并在72 h后用流式细胞术分析检测。结果显示, 当将rh-SPARC和/或Ara-C与SKM-1细胞同时孵育时, G_0/G_1 期细胞百分比显著增加, 而S期和 G_2 期细胞比例下降(图4A~图4E), 提示SKM-1细胞增殖的减少是由于 G_0/G_1 期细胞数量的增加所致。这些结果表明, rh-SPARC可抑制SKM-1细胞于 G_0/G_1 期, 并可通过联合Ara-C的使用而增强抑制效果。

2.4 ITC分析

ITC是一种测量化学反应过程中释放或吸收热量的技术, 用于表征任何涉及反应过程中自发发生的热变化的化学过程。上述实验结果显示, 当rh-SPARC和Ara-C的联合作用于SKM-1细胞时可观察到二者的协同作用。为进一步阐明这种协同作用的机制, 我们首先用ITC来评估rh-SPARC和Ara-C或其代谢物Ara-CTP之间是否存在直接相互作用。然而, ITC结果显示rh-SPARC和Ara-C/Ara-CTP之间没有直接相互作用关系(图5A)。

2.5 检测Akt和pAkt蛋白的表达

因为没有观察到rh-SPARC和Ara-C/Ara-CTP之间存在直接相互作用, 我们猜想rh-SPARC和Ara-C之间的协同作用是否由于下游信号传导途径的变化所致。有研究报道, PI3K/Akt信号通路在细胞对化

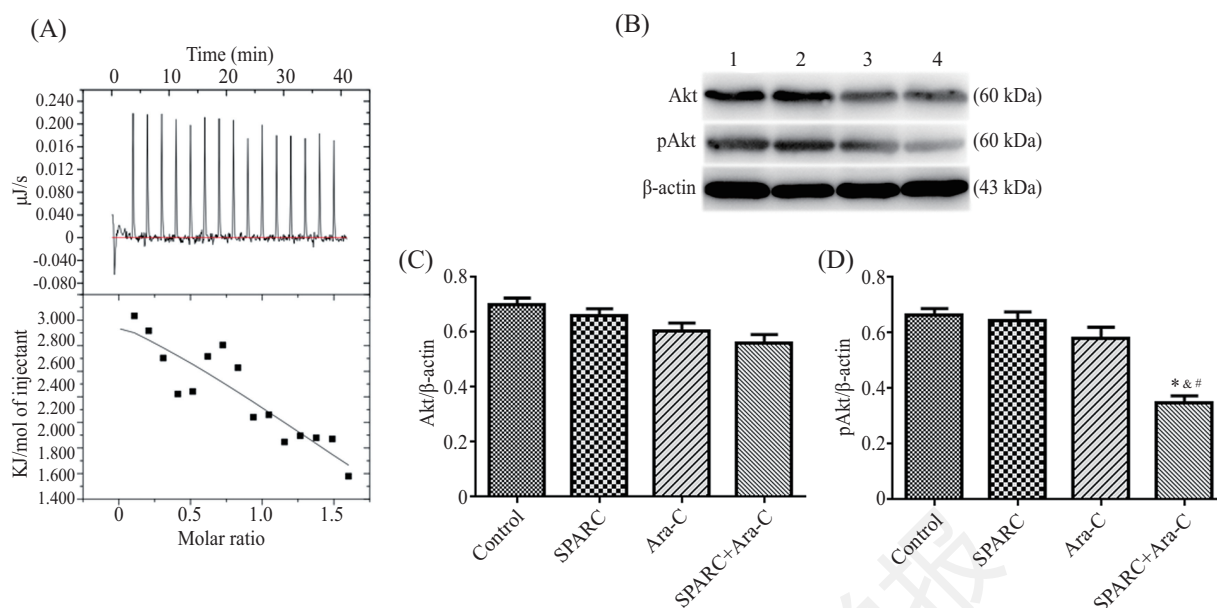


A: 流式细胞术分析72 h SKM-1细胞周期分布; B: 流式细胞术分析Ara-C(3 $\mu\text{mol/L}$)孵育SKM-1细胞72 h 细胞周期分布; C: 流式细胞术分析rh-SPARC(200 mg/mL)孵育72 h后SKM-1细胞周期分布; D: Ara-C(3 $\mu\text{mol/L}$)和rh-SPARC(200 mg/mL)联合孵育SKM-1细胞72 h后的细胞周期分布; E: GraphPad Prism 6绘制细胞周期分布直方图。* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与Ara-C组相比; * $P<0.05$, 与SPARC组相比。

A: flow cytometry analysis of the SKM-1 cell cycle after 72 h; B: flow cytometry analysis of the SKM-1 cell cycle after treatment with Ara-C (3 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h; C: flow cytometry analysis of the SKM-1 cell cycle after treatment with rh-SPARC (200 mg/mL) for 72 h; D: flow cytometry analysis of the SKM-1 cell cycle after combined treatment of Ara-C (3 $\mu\text{mol/L}$) and rh-SPARC (200 mg/mL) for 72 h; E: histogram summary of the cell cycle distribution by GraphPad Prism 6. * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs Ara-C group; * $P<0.05$ vs SPARC group.

图4 流式细胞术分析各组细胞周期分布

Fig.4 Flow cytometry analysis of cell cycle distribution



A: ITC结果显示, rh-SPARC和Ara-C/Ara-CTP之间没有直接相互作用关系。B: 每组SKM-1细胞中Akt和pAkt的水平; 1代表对照组; 2代表rh-SPARC处理的SKM-1细胞; 3代表Ara-C处理的SKM-1细胞; 4代表rh-SPARC和Ara-C联合作用于SKM-1细胞。C、D: ImageJ分析WB条带灰度值的直方图。* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与Ara-C组相比; * $P < 0.05$, 与SPARC组相比。

A: the ITC results showed that there was no interaction between rh-SPARC and Ara-C/Ara-CTP. B: the levels of Akt and pAkt in each group of SKM-1 cells. C, D: the grey value of the bands was analyzed using ImageJ. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs Ara-C group; * $P < 0.05$ vs SPARC group.

图5 rh-SPARC与Ara-C的协同效应与Akt磷酸化降低相关

Fig.5 The synergistic effect associated with the decrease in Akt phosphorylation

疗药物敏感性中起着关键作用^[25-26]。我们进行蛋白质印迹法以评估单独使用rh-SPARC或与Ara-C组合作用后SKM-1细胞的蛋白质磷酸化。将SKM-1细胞与rh-SPARC和Ara-C单独或联合孵育8 h后, 提取细胞裂解物, 用蛋白质印迹法检测。结果表明, 与单独的rh-SPARC或Ara-C相比, rh-SPARC和Ara-C的组合孵育显著降低了SKA-1细胞中pAkt蛋白的相对表达量(图5B~图5D)。

3 讨论

MDS是一组起源于造血干/祖细胞的克隆性疾病, 其临床特征主要为造血功能低下、外周血一系或多系减少, 以及高风险转化为急性髓系白血病^[3-4]。SPARC因其细胞特异性, 在血液和其他恶性肿瘤中的作用是复杂且多效的^[12,14]。在过去的十年中, 临床试验结果表明, del(5q) MDS患者对来那度胺的反应非常好, 并且此效果是通过升高SPARC表达实现的^[27-29]。尽管有研究提出, SPARC对免疫调节药物的功效很重要, 但其在sAML细胞中的生物活性尚未明确定义。故对其在sAML中的发生发展机制以及与化疗药物的相互作用进行深入探索尤其重要。在

本研究中, 我们描述了从HEK293F细胞中表达和纯化rh-SPARC的实验策略, 观察了rh-SPARC对sAML细胞系的生物活性, 并分析了其与sAML化疗药物Ara-C的关系。

首先, 我们构建了表达载体pTT5-SPARC-6×His, 并从240 mL HEK293F细胞培养基中纯化了7.85 mg rh-SPARC蛋白(图1)。所得rh-SPARC的总产率为80.04%(表1), 其产率是相对较高的。ITC检测显示HEK293表达系统产生的rh-SPARC表现高热稳定性, T_m 值为90.68 °C(图2E)。之前的文献报道有用大肠杆菌、酵母和昆虫细胞表达纯化重组SPARC蛋白^[30-32]。虽然可以使用大肠杆菌表达系统产生许多His融合蛋白, 但当存在二硫键和复杂的糖基化修饰时, 会影响胶原结合特性, 所以细菌表达系统就不作为生产用于细胞外基质组分检测的最优选择。酵母分泌表达系统可用于在表达过程中避免内源蛋白质的作用, 同时可使蛋白质糖基化, 但其产生的糖链仅是甘露糖残基。而哺乳动物细胞中发生的糖基化修饰非常复杂, 可包括乳糖、唾液酸和N-乙酰基-D-半乳糖胺修饰, 所以酵母表达系统也不作为表达rh-SPARC的最优选择。虽然rh-SPARC可以通过

昆虫细胞中的杆状病毒表达和纯化,但其表达周期是HEK293F表达系统周期的2到3倍多^[30],并且昆虫细胞纯化SPARC产量为4~7 mg SPARC/400 mL,而我们纯化的产量比他们的高了近1倍(7.85 mg SPARC/240 mL)。故从经济、蛋白活性和产率等多方面综合考虑,最后选择HEK293F表达系统表达rh-SPARC。

阿糖胞苷是一种嘧啶抗代谢物,在体内转化为Ara-CTP后取代dCTP与DNA结合,终止DNA复制,不可逆地干扰DNA合成,从而抑制白血病细胞的增殖^[33]。据报道,在临床上高剂量的阿糖胞苷具有良好的抗肿瘤作用,并且细胞周期分析的结果表明高剂量的阿糖胞苷作用于G₀/G₁期,而中剂量和小剂量的阿糖胞苷作用于S期^[34]。在本研究中,我们使用了人sAML细胞系SKM-1细胞,其具有复杂的异常核型,包括del(9q)、i(17q)和t(17p),此细胞系来源于患有MDS后转化为AML的男性患者^[35-36]。我们还使用了对照细胞系人类红白血病细胞系K562,其源自一名53岁的女性慢性粒细胞白血病患急变患者。

我们评估了rh-SPARC对这些细胞系的生物活性。我们的研究结果显示, rh-SPARC以浓度依赖性方式抑制SKM-1细胞增殖,但对K562细胞没有显著影响,表明rh-SPARC在不同细胞类型中作用不同,具有选择性。此外, rh-SPARC还可将SKM-1抑制于细胞周期G₀/G₁期,并可通过rh-SPARC和Ara-C联合作用增强抑制效果。

rh-SPARC和Ara-C联合作用于SKM-1细胞时对细胞增殖的抑制作用大于单一疗法的总和,表明rh-SPARC和Ara-C具有协同效应。为阐明这种协同作用的机制,我们首先进行了ITC实验以确定rh-SPARC和Ara-C及其代谢物Ara-CTP之间是否存在直接相互作用关系。然而,ITC分析的结果显示, rh-SPARC和Ara-C/Ara-CTP之间没有观察到存在相互作用关系,表明协同效应不是由于蛋白与小分子之间的直接相互作用所致。许多研究表明,PI3K/Akt通路在化疗药物的敏感性中起着至关重要的作用^[25-26,37]。查德等^[38]观察到当抑制AKT1/2时可提高肿瘤细胞的存活率,而抑制pAkt可有效抑制肿瘤细胞的生长,提高化疗药物的敏感性和有效性。在我们的研究中,我们观察到与单独的rh-SPARC或Ara-C相比, rh-SPARC和Ara-C的组合显著降低了SKM-1细胞中pAkt的相对表达水平,表明rh-SPARC可通过pAkt信号途径增强SKM-1细胞对Ara-C的敏感性。

综上所述, rh-SPARC对白血病细胞具有选择性抑制作用,它以浓度依赖性方式抑制G₀/G₁期的sAML细胞系的SKM-1细胞。此外,当rh-SPARC和Ara-C同时作用于SKM-1细胞时二者存在协同作用,此效应是由于降低了细胞的Akt磷酸化水平,增强SKM-1细胞对Ara-C的敏感性所致。然而,我们仍需进一步研究和探索以明确SPARC在MDS转化为AML的生物学功能。

参考文献 (References)

- 1 Elias HK, Schinke C, Bhattacharyya S, Will B, Verma A, Steidl U. Stem cell origin of myelodysplastic syndromes. *Oncogene* 2014; 33(44): 5139-50.
- 2 Schinke C, Giricz O, Li W, Shastri A, Gordon S, Barreiro L, *et al.* IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. *Blood* 2015; 125(20): 3144-52.
- 3 Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361: 1872-85.
- 4 Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2018; 101(3): 260-71.
- 5 Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E. New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Exp Cell Res* 2010; 316(8): 1390-6.
- 6 Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(4): 309-19.
- 7 Giagounidis AA, Germing U, Wainscoat JS, Boultonwood J, Aul C. The 5q-syndrome. *Hematology* 2004; 9(4): 271-7.
- 8 Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billstrom R, Ahlgren T, Mikoczy Z, *et al.* Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and *de novo* adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia* 2002; 16(12): 2366-78.
- 9 Visconte V, Tiu RV, Rogers HJ. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res* 2014; 49(4): 216-27.
- 10 DiMartino JF, Lacayo NJ, Varadi M, Li L, Saraiya C, Ravindranath Y, *et al.* Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia* 2006; 20(3): 426-32.
- 11 Rotlanti J, Liu D, Yan YL, Postlethwait JH, Westerfield M, Du SJ. Sparc (osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear. *Matrix Biol* 2008; 27(6): 561-72.
- 12 Hsiao YH, Lien HC, Hwa HL, Kuo WH, Chang KJ, Hsieh FJ. SPARC (osteonectin) in breast tumors of different histologic types and its role in the outcome of invasive ductal carcinoma. *Breast J* 2010; 16(3): 305-8.
- 13 Wiese AH, Auer J, Lassmann S, Nahrig J, Rosenberg R, Hofler H, *et al.* Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(4): 282-95.

- 14 Said N, Frierson HF, Jr., Chernauskas D, Conaway M, Motamed K, Theodorescu D. The role of SPARC in the TRAMP model of prostate carcinogenesis and progression. *Oncogene* 2009; 28(39): 3487-98.
- 15 Isler SG, Ludwig CU, Chiquet-Ehrismann R, Schenk S. Evidence for transcriptional repression of SPARC-like 1, a gene downregulated in human lung tumors. *Int J Oncol* 2004; 25(4): 1073-9.
- 16 Boulwood J, Pellagatti A, Cattani H, Lawrie CH, Giagounidis A, Malcovati L, *et al.* Gene expression profiling of CD34⁺ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br J Haematol* 2007; 139(4): 578-89.
- 17 Li K, Cai R, Dai BB, Zhang XQ, Wang HJ, Ge SF, *et al.* SATB1 regulates SPARC expression in K562 cell line through binding to a specific sequence in the third intron. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356(1): 6-12.
- 18 Fenouille N, Puissant A, Dufies M, Robert G, Jacquel A, Ohanna M, *et al.* Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res* 2010; 70(23): 9659-70.
- 19 Lian XY, Zhang ZH, Deng ZQ, He PF, Yao DM, Xu ZJ, *et al.* Efficacy and safety of lenalidomide for treatment of low-/intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with or without 5q deletion: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11(11): e0165948.
- 20 Giagounidis A, Mufti GJ, Fenaux P, Germing U, List A, MacBeth KJ. Lenalidomide as a disease-modifying agent in patients with del(5q) myelodysplastic syndromes: linking mechanism of action to clinical outcomes. *Ann Hematol* 2014; 93(1): 1-11.
- 21 Gardin C, Chaibi P, de Revel T, Rousselot P, Turlure P, Miclea JM, *et al.* Intensive chemotherapy with idarubicin, cytosine arabinoside, and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in patients with secondary and therapy-related acute myelogenous leukemia. *Club de Reflexion en Hematologie. Leukemia* 1997; 11(1): 16-21.
- 22 Koren-Michowitz M, Maayan H, Apel A, Shem-Tov N, Yerushalmi R, Volchek Y, *et al.* Salvage therapy with ARA-C and gemtuzumab ozogamicin in AML patients relapsing after stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2015; 94(3): 375-8.
- 23 Brautigam CA, Zhao H, Vargas C, Keller S, Schuck P. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions. *Protocol* 2016; 11(5): 882-94.
- 24 Sage EH. Purification of SPARC/osteonectin. *Curr Protoc Cell Biol* 2003; Chapter 10: Unit 10.1.
- 25 West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 2002; 5(6): 234-48.
- 26 Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001; 61(10): 3986-97.
- 27 Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, Beyne-Rauzy O, Mufti G, Mittelman M, *et al.* A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood* 2011; 118(14): 3765-76.
- 28 List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, *et al.* Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352(6): 549-57.
- 29 List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, *et al.* Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355(14): 1456-65.
- 30 Workman G, Bradshaw AD. Production and purification of recombinant human SPARC. *Methods Cell Biol* 2018; 143: 335-45.
- 31 Bassuk JA, Baneyx F, Vernon RB, Funk SE, Sage EH. Expression of biologically active human SPARC in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 1996; 325(1): 8-19.
- 32 Nischt R, Pottgiesser J, Krieg T, Mayer U, Aumailley M, Timpl R. Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40. *Eur J Biochem* 1991; 200(2): 529-36.
- 33 Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 2009; 10(10): 1657-74.
- 34 de Vries JF, Falkenburg JH, Willemze R, Barge RM. The mechanisms of Ara-C-induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2006; 91(7): 912-9.
- 35 Nakagawa T, Matozaki S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS. *Leuk Lymphoma* 1995; 17(3/4): 335-9.
- 36 Kimura S, Kuramoto K, Homan J, Naruoka H, Ego T, Nogawa M, *et al.* Antiproliferative and antitumor effects of azacitidine against the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1. *Anticancer Res* 2012; 32(3): 795-8.
- 37 Ghebeh H, Al-Khaldi S, Olabi S, Al-Dhfyhan A, Al-Mohanna F, Barnawi R, *et al.* Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. *Br J Cancer* 2014; 111(8): 1552-61.
- 38 Schultz CR, Golembieski WA, King DA, Brown SL, Brodie C, Rempel SA. Inhibition of HSP27 alone or in combination with pAKT inhibition as therapeutic approaches to target SPARC-induced glioma cell survival. *Mol Cancer* 2012; 11: 20.