

· 基础实验研究论著 ·

# 腺病毒介导的 SD-HA 融合蛋白表达对慢性粒细胞白血病细胞增殖和凋亡的影响

彭 智<sup>1</sup>, 桂 敏<sup>1</sup>, 冯文莉<sup>2</sup>, 杜 莉<sup>1△</sup>

(1. 重庆医科大学附属第二医院《中华肝脏病杂志》编辑部, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

**摘要:**目的 探讨腺病毒介导的 SD-HA 融合蛋白表达对慢性粒细胞白血病(CML)细胞增殖和凋亡的影响。方法 外源性融合蛋白表达的检测采用 Western blot; 细胞经免疫荧光染色后用激光共聚焦显微镜观察 SD-HA 融合蛋白在细胞中的定位; 采用 MTT 法检测细胞增殖的情况; 采用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡。结果 SD-HA、SmD-HA 融合蛋白能在 CML 细胞株中有效表达, 且定位于胞浆。重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染 CML 细胞后能特异性阻滞 CML 细胞周期由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S 期推进, 具有抑制细胞的增殖效应, 且对照组比较早期凋亡细胞明显增多 ( $P < 0.05$ )。结论 腺病毒介导的 SD-HA 基因转染对 CML 细胞有抑制增殖和诱导凋亡的双重效应。

**关键词:** 白血病, 髓系, 慢性, BCR-ABL 阳性; 含 SH2 域蛋白质酪氨酸磷酸酶类; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)15-1922-03

## The impact of fusion protein SD-HA expression on cell proliferation and apoptosis in chronic myelocytic leukemia cell mediated by adenovirus

Peng Zhi<sup>1</sup>, Gui Min<sup>1</sup>, Feng Wenli<sup>2</sup>, Du Li<sup>1△</sup>

(1. the Editorial Board of Chinese Journal of Hepatology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To explore the impact of SD-HA fusion peptide expression on cells proliferation and apoptosis in chronic myeloid leukemia(CML) cells mediated by adenovirus. **Methods** Exogenous fusion protein expression was detected by Western blot. The localization of fusion protein SD-HA was observed through laser scanning confocal microscope after cell immunofluorescence staining. Cell proliferation was determined by MTT test. Flow cytometry was employed in cell cycle and apoptosis detection. **Results** Adenoviral vector encoding SD-HA and SmD-HA were successfully constructed and validated by immunocytochemical staining and confocal microscopy. It was verified that recombinant adenovirus Ad5F35-SD-HA have some inhibiting effects on cell proliferation after infection, such as blocking cell cycle from G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase to S period. Flow cytometry tests showed that compared with control groups its early apoptotic cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Fusion protein SD-HA expressed in chronic myeloid leukemia cells mediated by adenovirus exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects.

**Key words:** leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive; SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatases; cell proliferation; apoptosis

慢性粒细胞白血病(CML)以持续表达具有强酪氨酸激酶活性的 BCR-ABL 癌蛋白为重要特征<sup>[1]</sup>。针对 BCR-ABL 癌蛋白酪氨酸激酶的特异性抑制剂如伊马替尼、尼罗替尼和达沙替尼等对 CML 慢性期及急变期患者显示出良好的治疗效果, 但不能解决耐药、免疫抑制、骨髓抑制、复发等问题<sup>[2-3]</sup>。因此, 研究人员需要寻找新的治疗靶点和治疗方法。外源性的 SH2-DED(SD)融合肽在 CML 细胞中表达时, 一方面含 SH2 结构域的多肽可以竞争性的抑制 BCR-ABL 融合蛋白的第 177 位酪氨酸磷酸化位点与生长因子受体连接蛋白 2(Grb2)的结合; 同时, DED 可以激活 caspase8 诱导细胞凋亡, 是 CML 基因治疗研究中新的切入点<sup>[4-6]</sup>。本研究使用了基于 AdEasy 系统构建的新型 Ad5F35 腺病毒表达系统<sup>[7-8]</sup>, 将重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA、Ad5F35-SmD-HA、Ad5F35-GFP 分别感染人源性 CML 及其他细胞株, 采用免疫荧光染色, 并使用激光共聚焦显微镜观察表达的外源性蛋白在 CML 细胞中的定位, 采用 MTT 法检测细胞增殖情况, 流式细胞术检测细胞增殖和凋亡, 旨在探讨融合蛋白 SD-HA 对 CML 细胞恶性表型的影响, 为深入研究其发挥治疗效应的机制奠定基础。

### 1 材料与与方法

**1.1 细胞株及重组腺病毒来源** K562、KU812 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 人早幼粒白血病

细胞株 HL-60、人脐静脉内皮细胞株 ECV304 由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室提供。在前期的研究中, 本课题组成功构建并制备了高滴度的 Ad5F35 重组腺病毒, 其对 CML 细胞株的感染效率明显优于 Ad5 腺病毒, 达 85% 以上, 有的甚至可以达到 90%<sup>[9-10]</sup>。为了便于后续实验进行免疫学检测, 本课题组在构建的重组病毒载体时, 加入了表达 GFP<sup>[11]</sup>、HA 标记蛋白的基因序列。

**1.2 仪器与试剂** 德国 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜、日本 Nikon Te2000-U 倒置荧光显微镜、美国 Bio-Rad 凝胶成像系统 Gel Doc 1000; RPMI 1640、DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司; 鼠抗 HA 单克隆抗体购自美国 Cell signal 公司, HRP 耦联及 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养及实验分组** 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。根据不同的处理方式将两种 CML 细胞分为: 不加入病毒仅加入 PBS 缓冲液的 PBS 组(作为空白对照), 经重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染的 Ad5F35-SD-HA 组, 经 Ad5F35-SmD-HA 感染的 Ad5F35-SmD-HA 组(作为突变对照), 经 Ad5F35-GFP 感染的 Ad5F35-GFP 组(作为空载对照)。

**1.3.2 细胞免疫荧光染色** 在经重组腺病毒转染 48 h 后,细胞经胰酶消化后,将其浓度调整至  $2 \times 10^5$  个/毫升,接种于 6 孔板,培养 24 h 后,经 4% 多聚甲醛固定,0.5% Triton-100 透膜,5% 牛血清清蛋白封闭,然后分别用鼠抗人 HA 抗体(1:100 稀释)4 °C 孵育过夜。第 2 天,用 Cy3 标记山羊抗小鼠抗体(1:1 000 稀释)作为二抗为孵育,经 DAPI 染色,加抗荧光淬灭封闭液封片后用激光共聚焦显微镜观察拍照,分析 CML 细胞中外源性表达的目的蛋白的定位情况。

**1.2.3 外源性蛋白表达的验证** 腺病毒转染 CML 细胞 48 h 后收集细胞,提取蛋白,按常规方法采用 Western blot 检测目的蛋白的表达。

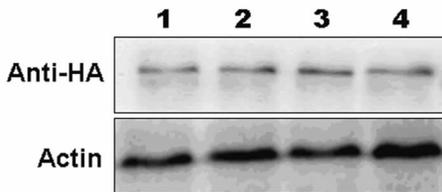
**1.2.4 MTT 法检测细胞增殖抑制率** 病毒感染细胞后 12 h,离心收集各组细胞作活细胞计数,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/毫升,每孔 100  $\mu$ L,加入 96 孔板中,每个浓度均做 3 个复孔,于饱和湿度、5%CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中培养 10 d。于培养 1、3、4、5、6、7、8、10 d 各个时间点取细胞进行试验。每孔中加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu$ L,并以无血清 1640 培养基作为试剂空白对照,37 °C 保温 4 h 后每孔中加入 100  $\mu$ L 二甲亚砜裂解细胞,酶标仪读数(波长 540 nm)后取平均值,与对照组比较,按照以下公式计算抑制率:抑制率 = [1 - (处理 OD 值 - 试剂对照 OD 值 / 非处理细胞 OD 值 - 试剂对照 OD 值)]  $\times 100\%$ 。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞增殖周期及凋亡** 细胞周期的检测:病毒感染细胞后 96 h,离心收集细胞,PBS 洗 3 次后,70% 乙醇中固定过夜,上机前用 PBS 洗去乙醇,离心去上清,加入终浓度为 50  $\mu$ g/mL PI 染液(含 50  $\mu$ g/mL RNase)室温避光孵育 30 min,然后使用流式细胞仪进行检测。凋亡的检测:病毒感染细胞后 96 h,离心收集细胞,4 °C 预冷的 PBS 洗 3 次后按 Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒说明,用流式细胞仪检测各实验组细胞中的早期凋亡细胞。

**1.3 统计学处理** 实验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 SD-HA 和 SmD-HA 融合蛋白在细胞中的表达** 重组腺病毒感染两种人源性 CML 细胞株(K562 和 KU812 细胞)48 h 后,Western blot 检测表明两种融合蛋白在 K562 和 KU812 细胞中均能有效表达,见图 1。



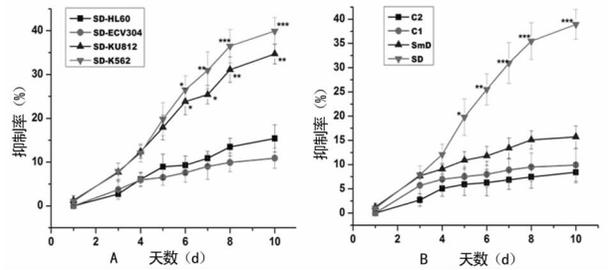
1:K562 细胞 Ad5F35-SD-HA 组;2:K562 细胞 Ad5F35-SmD-HA 组;3:KU812 细胞 Ad5F35-SD-HA 组;4:KU812 细胞 Ad5F35-SmD-HA 组。

图 1 Western blot 鉴定 SD-HA、SmD-HA 融合蛋白在 CML 细胞的表达

**2.2 SD-HA 和 SmD-HA 融合蛋白在 K562 细胞内的定位** 融合蛋白在细胞中主要定位于细胞胞浆中;观察到目的蛋白表达在视野内绝大部分细胞内,而对照组细胞胞浆内仅观察到微弱的荧光背景,见图 2(结果图见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

**2.3 重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染对 CML 细胞的增殖能力的影响** 随着感染时间的延长,人源性表达 BCR-ABL 蛋白的 CML 细胞株(K562、KU812)增殖抑制效应逐渐增强,在感

染病毒后 10 d,K562 细胞抑制率为  $(39.2 \pm 2.38)\%$ ,KU812 细胞抑制率为  $(35.9 \pm 5.47)\%$ ;对不表达 BCR-ABL 蛋白的细胞株(HL60、ECV304)无明显的抑制效应( $P < 0.05$ )。同时,以 K562 细胞为实验模型,在第 10 天抑制率达到峰值,增殖抑制率分别为  $(38.91 \pm 3.1)\%$ ,  $(15.7 \pm 2.3)\%$ ,  $(9.9 \pm 3.3)\%$ ,  $(8.4 \pm 2.1)\%$  ( $P < 0.001$ ),见图 3。



A:K562 细胞 Ad5F35-GFP 组;B:K562 细胞 Ad5F35-SD-HA 组;C:K562 细胞 Ad5F35-SmD-HA 组。\*:  $P < 0.05$ ,分别与 HL60、ECV304 细胞比较;\*\* :  $P < 0.01$ ,分别与 HL60、ECV304 细胞比较;\*\*\* :  $P < 0.001$ ,分别与 Ad5F35-SmD-HA 组、Ad5F35-GFP 组、PBS 组比较。

图 3 MTT 法检测不同感染时间的细胞增殖抑制率

**2.4 重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染对 CML 细胞周期的影响** 腺病毒 Ad5F35-SD-HA 分别处理人源性 CML 细胞(K562、KU812 细胞)72 h 后,细胞各周期时相改变见表 1。与 PBS 组比较,两种 CML 细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增高,S 期细胞比例下降( $P < 0.05$ ),而 K562 细胞 Ad5F35-SmD-HA 组及 Ad5F35-GFP 组细胞周期无明显改变( $P > 0.05$ )。

表 1 腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染对 K562 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 细胞类型  | 组别              | 细胞周期                           |                   |                   |
|-------|-----------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|       |                 | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | S                 | G <sub>2</sub> /M |
| K562  | PBS 组           | 35.74 $\pm$ 6.9                | 52.30 $\pm$ 5.77  | 8.85 $\pm$ 2.03   |
|       | Ad5F35-GFP 组    | 38.13 $\pm$ 4.25               | 48.15 $\pm$ 5.62  | 8.05 $\pm$ 1.56   |
|       | Ad5F35-SmD-HA 组 | 40.41 $\pm$ 4.80               | 45.48 $\pm$ 4.35  | 6.05 $\pm$ 1.15   |
|       | Ad5F35-SD-HA 组  | 71.19 $\pm$ 2.14*              | 23.62 $\pm$ 1.95* | 3.76 $\pm$ 1.21*  |
| KU812 | PBS 组           | 36.74 $\pm$ 4.5                | 50.68 $\pm$ 4.92  | 8.45 $\pm$ 1.23   |
|       | Ad5F35-GFP 组    | 40.54 $\pm$ 4.67               | 47.15 $\pm$ 5.21  | 7.34 $\pm$ 1.66   |
|       | Ad5F35-SmD-HA 组 | 44.22 $\pm$ 5.32               | 42.97 $\pm$ 4.26  | 6.22 $\pm$ 1.47   |
|       | Ad5F35-SD-HA 组  | 69.39 $\pm$ 3.24*              | 25.19 $\pm$ 1.56* | 2.80 $\pm$ 1.45*  |

\*  $P < 0.05$ ,分别与 Ad5F35-SmD-HA 组、Ad5F35-GFP 组、PBS 组比较。

**2.5 重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 感染对 CML 细胞凋亡的影响** K562 细胞 PBS 组绝大部分都是活细胞,PBS 组早期凋亡细胞占  $(4.08 \pm 0.76)\%$ ,Ad5F35-GFP 组的凋亡率为  $(4.62 \pm 1.56)\%$ ,Ad5F35-SmD-HA 组的凋亡率为  $(6.19 \pm 2.56)\%$ ,而 Ad5F35-SD-HA 组的凋亡率为  $(32.08 \pm 4.30)\%$ ,与各对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。同样,Ad5F35-SD-HA 感染 KU812 细胞 96 h 后凋亡率为  $(30.10 \pm 4.14)\%$ ,与 KU812 细胞各对照组的凋亡率相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**3 讨 论**

本课题组构建的 Ad5F35-SD-HA、Ad5F35-SmD-HA 重组腺病毒在感染 K562 和 KU812 细胞 48 h 后能有效表达外源性融合蛋白 SD-HA、SmD-HA。作为 SD 融合肽在细胞内作用的靶蛋白,BCR-ABL 是一种胞浆蛋白。而本研究中表达的外源性融合蛋白 SD-HA、SmD-HA 均定位于胞浆,与实验预期相符合。

本研究以 BCR-ABL 阳性的 CML 细胞株:K562 细胞和

KU812 细胞,为研究模型,初步评价 BCR-ABL 融合蛋白的第 177 位酪氨酸磷酸化位点作为慢性粒细胞白血病治疗新靶点的可行性。重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 能明显抑制 CML 细胞的恶性增生程度。流式细胞术对细胞周期的分析表明,重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 可使 CML 细胞的细胞周期进程受到特异性阻滞, $G_0/G_1$  期细胞比例明显增加,S 期相对减少,DNA 的合成减少,增殖受到抑制。流式细胞术检测发现了早期凋亡细胞,表明重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 可使 CML 细胞发生特异性凋亡。

重组腺病毒 Ad5F35-SD-HA 具有特异性的抑制 CML 细胞增殖,诱导 CML 细胞凋亡的双重效应,本研究为后续实验进一步阐明融合蛋白 SD-HA 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基础。

参考文献

[1] O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, et al. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(8): 513-526.  
 [2] Chahardouli B, Zaker F, Mousavi SA, et al. Evaluation of T315I mutation frequency in chronic myeloid leukemia patients after imatinib resistance[J]. Hematology, 2013, 18(3): 158-162.  
 [3] Jain P, Kantarjian H, Cortes J. Chronic myeloid leukemia: overview of new agents and comparative analysis[J]. Curr Treat Options Oncol, 2013, 14(2): 127-143.  
 [4] Thomas LR, Henson A, Reed JC, et al. Direct binding of Fas-associated death domain(FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor Dr5 is regulated by the death effector domain

of FADD[J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32780-32785.  
 [5] Moriwaki K, Shinzaki S, Miyoshi E. GDP-mannose-4, 6-dehydratase (GMDS) deficiency renders colon Cancer cells resistant to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor- and CD95-mediated apoptosis by inhibiting complex II formation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(50): 43123-43133.  
 [6] Laussmann MA, Passante E, Dussmann H, et al. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(10): 1584-1597.  
 [7] Na M, Fan X. Design of Ad5F35 vectors for coordinated dual gene expression in candidate human hematopoietic stem cells[J]. Exp Hematol, 2010, 38(6): 446-452.  
 [8] Yu D, Jin C, Ramachandran M, et al. Adenovirus serotype 5 vectors with Tat-PTD modified hexon and serotype 35 fiber show greatly enhanced transduction capacity of primary cell cultures [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54952.  
 [9] Peng Z, Yuan Y, Li YJ, et al. Targeting BCR tyrosine177 site with novel SH2-DED causes selective leukemia cell death in vitro and in vivo[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(6): 861-868.  
 [10] Peng Z, Luo HW, Yuan Y, et al. Growth of chronic myeloid leukemia cells is inhibited by infection with Ad-SH2-HA adenovirus that disrupts Grb2-Bcr-Abl complexes [J]. Oncol Rep, 2011, 25(5): 1381-1388.  
 [11] 史静, 胡晶, 肖青, 等. 重组腺病毒 Ad5F35-SD-EGFP 的构建及其对 K562 细胞增殖的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(11): 1806-1811.

(收稿日期: 2013-03-15)

(上接第 1921 页)

响 见图 1, 与对照组相比, 在 5 mW/cm<sup>2</sup>、10 mW/cm<sup>2</sup>、20 mW/cm<sup>2</sup> 三个辐照组中, 辐照 3 d 以后新西兰兔血尿素氮水平明显增加 ( $P < 0.05$ ), 且增加的程度与辐照时间呈现正相关。分别经 5、10、20 mW/cm<sup>2</sup> 强度的电磁辐射后, 新西兰兔肌酐水平明显增加 ( $P < 0.05$ )。同样的, 辐照 3 d 以后新西兰兔体尿酸水平明显增加 ( $P < 0.05$ ), 且增加的程度与辐照时间呈现正相关。

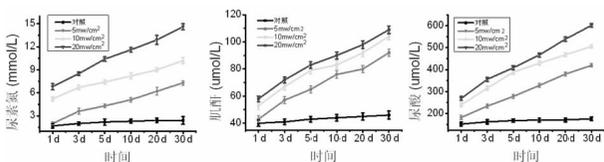


图 1 电磁辐射照射后各生化指标随时间变化情况

3 讨论

本实验采用了随机、平行、独立的动物实验,系统地研究了 5、10、20 mW/cm<sup>2</sup> 三种强度的电磁辐射对新西兰兔肾脏功能的影响。在以往的研究中,电磁辐射对肾脏功能的影响虽有报道,但其辐射强度的设置均为低强度,且辐射的时间较短,无法体现长时间辐射对肾脏功能的影响<sup>[5]</sup>。笔者采用心脏采血法采集新西兰兔血液标本,然后进行检测,排除了感染、疾病、焦虑等因素对血象和肾功能指标的影响<sup>[6]</sup>。本实验为排除热效应的干扰,采用了间歇暴露法,即每辐射 30 min,间歇 10 min,每天辐射 2 次,即 1 h。新西兰兔肛温在辐射前后基本没有变化,证实该方法可以排除热效应的干扰。

本研究表明,新西兰兔经电磁辐射 1、3、5、10、20、30 d 后尿素氮、肌酐、尿酸这三项指标均发生了明显变化,提示新西兰兔肾功能有不同程度的损伤,在一定强度范围内,电磁辐射对肾脏损伤的效应与强度呈正相关,即电磁波以量子能量方式向

外辐射,强度越大、时间越长,该辐射的量子能量越大,其生物学作用也越强。本研究的结果提示,电磁辐射的强度与其对人体的伤害呈正相关。该结果与国内外的研究结果相似,长期处于电磁辐射环境下,还可能造成儿童白血病,诱发癌症并加速人体的癌细胞增殖<sup>[7]</sup>,影响人的生殖系统,导致儿童智力残缺,对心血管系统和视觉系统造成损害<sup>[8]</sup>。本研究表明该实验条件下三种平均强度的电磁辐射均能对新西兰兔的肾脏功能产生不良影响,且平均强度越大损伤的作用越强。

参考文献

[1] 高艳,张成岗. 生物电磁剂量学研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2010(11): 1286-1289.  
 [2] 郭静,魏巍,王晓文,等. 中频磁场对小鼠血液及重要脏器的影响 [J]. 中国微创外科杂志, 2009, 6(6): 498-501.  
 [3] 王伟,王德文. 电磁辐射对免疫损伤的研究进展 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(12): 966-968.  
 [4] 陈冀. 电磁脉冲开放大鼠血脑屏障及其生物效应的实验研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2009.  
 [5] 赵洪雯,张广斌,王源,等. 电磁辐射对大鼠内皮祖细胞和肾脏组织学的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(2): 262-266.  
 [6] Salama N, Kishimoto T, Kanayama HO, et al. Retraction effects of exposure to a Mobile phone on sexual behavior in adult male rabbit: an observational study [J]. Int J Impot Res, 2009, 24(4): 170.  
 [7] 李玉红,路国兵,史长华,等. 2 000  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> 电磁辐射对大鼠海马 NR2A 蛋白及其 mRNA 表达的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 15-18.  
 [8] Sarookhani MR, Asiabanha RM, Safari A. The influence of 950 MHz magnetic field (Mobile phone radiation) on sex organ and adrenal functions of male rabbits [J]. Afr J Biochem Res, 2011, 5(2): 65-68.

(收稿日期: 2013-03-20)