

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 12. 011

SHP-1 和 JAKs 基因在成人急性髓系白血病患者中的异常表达及其相关性

杨 琳, 罗建民, 温树鹏, 刘晓军*, 杜行严, 张敬宇, 姚 丽, 董作仁

Expressions of SHP-1 and JAKs Genes in AML Patients and Their Correlation

YANG Lin, LUO Jian-min, WEN Shu-peng, LIU Xiao-jun*, DU Xing-yan, ZHANG Jing-yu, YAO Li, DONG Zuo-ren

Department of Hematology, Province Key Laboratory of Experimental Hematology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China (* Present: Herman B Wells Center, Indiana University)

Corresponding Author: LUO Jian-min, E-mail: Luoym315@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To investigate the expression of SHP-1 and JAKs mRNA in the primary acute myeloid leukemia(AML) patients and their impact on leukemogenesis. **Methods** The expression of SHP-1 and JAKs mRNA in AML patients, CR and 19 healthy adults as normal controls(NC) was measured with FQ-PCR and RT-PCR. The relationship between the expressions of SHP-1 and JAKs was analysed. **Results** The expression of SHP-1 mRNA in de novo AML patients was significantly lower than that in CR ($P=0.032$) and NC group($P=0.000$), and so was the relapsed. CR was achieved and decreased again after the disease relapsed($P<0.05$); the expression of JAK1 mRNA in NC group was lower than that in relapsed AML($P=0.047$) and de novo AML, but the latter has no statistical significance($P=0.051$). The expressions of JAK2, JAK3 and TYK2 in AML were significant higher than CR and NC($P<0.05$). There was a negative correlation between SHP-1 and JAK1, JAK3 mRNA($P<0.05$). **Conclusion** SHP-1 gene is a potential anti-oncogene. There was a negative correlation between SHP-1 and JAKs mRNA, which indicates that SHP-1 downregulates the JAKs signaling pathway in AML cells not only by decreasing the phosphorylation of JAKs, but also by negatively modulating JAKs mRNA expression.

Key words: Leukemia; Myloid; Acute; SHP-1; JAKs

摘要:目的 研究 SHP-1 基因和 JAK 家族基因在成人急性髓系白血病(AML)患者中的表达及相关性,以探讨两者在 AML 发病机制中的作用。**方法** 急性髓系白血病患者 63 例及健康志愿者 19 名(健康对照)为研究对象,分别应用 FQ-PCR 和 RT-PCR 方法检测骨髓单个核细胞中 SHP-1、JAKs mRNA 表达情况;并分析两者的相关性及其与预后的关系。**结果** SHP-1 在 AML 患者表达水平明显低于缓解组和健康对照组($P<0.01$), JAK2、JAK3 和 TYK2 表达水平明显高于缓解组和健康对照组($P<0.05$), JAK1 在初治 AML 中表达也增高但与 CR 和 NC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$); SHP-1 和 JAK1、JAK3 在 mRNA 水平负相关($P<0.05$)。 **结论** SHP-1 可能是白血病潜在的抑癌基因, AML 细胞中 SHP-1 与 JAKs mRNA 表达呈负相关; SHP-1 对 JAKs 基因的负调控作用并非只是通过去除 JAKs 磷酸化而阻断 JAK/STAT 路径,还可能在转录水平进行调节。

关键词: 白血病; 髓系; 急性; SHP-1; JAK 家族基因

中图分类号: R733. 71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)12-1031-04

0 引言

SHP-1 是一种含 SH2 域(src homology-2 domain)的酪氨酸磷酸酶,是造血细胞信号转导的一种基本负调控因子, SHP-1 表达减少和缺失被认为是淋巴瘤/白血病细胞株和细胞的典型特征^[1-2]。 Janus kinase 家族(JAK)是一组受体相关蛋白酪氨酸激酶,迄今已发现四种: JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2,参与一系列细胞表面受体特别是细胞因子受体超家族成

收稿日期:2008-07-29;修回日期:2009-01-06
基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2005000744)
作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院血液内科,河北省血液病重点实验室(*现单位:美国印第安纳大学肿瘤研究所)
通信作者:罗建民, E-mail: Luoym315@yahoo. com. cn
作者简介:杨琳(1973-),女,博士,副主任医师,主要从事白血病和信号转导的研究

员的信号传递。JAK-STAT (janus kinase-signal transducer and activator of transcription)路径的异常激活与白血病细胞增殖分化密切相关^[3]。JAKs 和 STATs 上的 Tyr 残基的去磷酸化是 JAK-STAT 信号下调的重要机制^[4]。近年研究发现 SHP-1 能粘合 JAK 并调节 JAK 发生去磷酸化,从而阻断 JAK/STAT 级联反应^[5]。然而,JAKs 转录水平的研究目前还很少,本研究通过实时定量 PCR 和 RT-PCR 法,从 mRNA 水平研究了各期急性髓系白血病(AML)患者 SHP-1 基因、JAK 家族基因表达差别,同时分析了 SHP-1 和 JAKs 的 mRNA 水平及其相关性,为进一步探讨 SHP-1 基因和 JAK 家族基因在白血病发病中的作用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

标本源自我院血液科。2005 年 1 月~2006 年 6 月共收集 63 例 AML 患者骨髓标本,其中 50 例初治患者,13 例复发患者,19 例健康志愿者作为健康对照。全部患者均根据临床特征、形态学、免疫学表型,血象和骨髓象及细胞化学染色确诊^[7]。其中 M₀ 1 例、M₁ 2 例(复发 1 例)、M₂ 15 例(复发 4 例)、M₃ 15 例(复 2 例)、M₄ 12 例(复发 3 例)、M₅ 17 例(复发 3 例)、M₆ 1 例,M₇ 0 例。男 34 例,女 29 例,中位年龄 31.5 岁(16~79 岁)。随访完全缓解(CR)患者 26 例,19 例健康志愿者中男 11 人,女 8 人,中位年龄 38 岁(18~52 岁)。将研究对象分为初治 AML 组(即初诊未治疗者)、复发 AML 组(按难治、复发 AML 的诊断标准确诊后尚未进行治疗者)、完全缓解组(CR)、健康对照组。观察各组中 SHP-1 与 JAKs 的表达情况,分析其相关性。

1.2 材料

Ficoll 淋巴细胞分离液、M-MLV、Taq DNA 聚合酶、dNTP、随机六聚体引物均购自 Promega 公司。Realmastermix 定量扩增试剂盒购自 Tiangen 公司。Trizol 试剂购自 Solarbio 公司,实时定量 PCR 荧光探针由中山大学达安基因股份有限公司合成。逆转录 PCR 引物由上海 Generay 生物公司

合成。SHP-1 正义引物:5'-GCG GCA GCC GTA CTA TGC-3',反义引物:5'-CAG TTC CAA CAC TCG GTT CTC A-3',探针序列:5'-FAM-ACG AGG GTG AAT GCG GCT GAC-TAMRA-3'。PCR 扩增仪为美国 PE 公司 GeneAmp5700 型。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 SHP-1 基因表达 抽取 AML 患者和健康对照骨髓 5 ml,2%EDTA-Na₂ 抗凝,Ficoll 分离液分离骨髓单个核细胞(MNC)。Trizol 一步法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计定量。逆转录体系为:5×逆转录缓冲液 4 μl,上游引物 0.4 μg,dNTPs 0.2 μg,逆转录酶 1.0 μg,DEPC 水 9 μl,RNA 1.0 μg。总体积 20 μl。反应条件为 37℃ 1 h,95℃ 3 min。阳性模板和检测样品的 PCR 体系为 5×定量 PCR 缓冲液 10 μl,上游引物 1.0 μg,下游引物 1.0 μg,dNTP 0.5 μg,荧光探针 1 μl,Taq 酶 1.5 u,cDNA 模板 5 μl,双蒸水 30 μl,总体积 50 μl。反应条件:93℃ 2 min,93℃ 变性 45 s,55℃ 45 s,共 40 个循环。GENE5700 软件分析结果。结果公式:拷贝数/μg 总 RNA = 拷贝数/μl cDNA ÷ 样本 RNA 的 OD₂₆₀ 值 × 1.05。

1.3.2 半定量逆转录 PCR(RT-PCR)检测 JAK 家族基因表达 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计定量。逆转录反应体系为:随机六聚核苷酸引物 0.5 μg,M-MLV 200 u,5×逆转录 buffer 4 μl,dNTPs (2 mmol/L) 2 μl,Rnasin 25 u,RNA 2 μg,用 DEPC 水补至 20 μl;37℃ 60 min,94℃ 5 min,1℃ 2 min。PCR 反应体系为:10×buffer 5 μl,MgCl₂ 3 μl,dNTPs 5 μl,上下游引物各 3 μl,Taq 酶 2u,cDNA 2 μl,双蒸水补至 50 μl;反应条件为 94℃ 5 min,94℃ 60 s,58℃ 退火 60 s,72℃ 90 s,25 个循环后,72℃ 再延伸 10 min。取产物 10 μl,2%琼脂糖凝胶电泳,紫外投射仪下观察照相,胶片在凝胶成像系统中分析,以见到 JAKs 基因相应的扩增带为阳性表达,以其与内对照 β-actin 曲线下面积比值作为 mRNA 表达水平,RT-PCR 引物序列见表 1。

1.3.3 统计学方法 结果用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。阳性率之间的差异用 χ² 检验,表达水平

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Primer Sequences of RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR products(bp)
JAK1	TGGAGGTAACCATAGC	CCGAGAACCCAAATAGTC	250
JAK2	CAACCTCAGTGGGACAAAGA	TTCTCGTCTCCACAGACGCA	480
JAK3	CTCCTTCCGAGCCGTCAT	CTCCCGCTGAAAGTCCCT	310
TYK2	GTGGCTTGCTTGAGTGA	CACTGTGTTGGCGTACAGGT	367
β-actin	TCATCACCATTGGCAATGAG	AGCATCAGGCTTGCATCT	155

表 2 JAKs mRNA 在各期 AML 患者和正常人中的表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression levels of JAKs mRNA in AML patients and normal control($\bar{x} \pm s$)

Group	n	JAK1	JAK2	JAK3	TYK2
Newly diagnosed	50	0. 575 $\pm$ 0. 372 $\star\triangle$	1. 667 $\pm$ 0. 984 $\star\blacktriangle$	0. 790 $\pm$ 0. 419 $\star\blacktriangle$	0. 374 $\pm$ 0. 093 $\star\blacktriangle$
Relapsed	13	0. 599 $\pm$ 0. 335 $\star\blacktriangle$	1. 466 $\pm$ 1. 012 $\star\blacktriangle$	0. 945 $\pm$ 0. 541 $\star\blacktriangle$	0. 416 $\pm$ 0. 143 $\star\blacktriangle$
CR	26	0. 403 $\pm$ 0. 233	0. 978 $\pm$ 0. 490	0. 537 $\pm$ 0. 245	0. 292 $\pm$ 0. 075
NC	19	0. 376 $\pm$ 0. 194	1. 033 $\pm$ 0. 836	0. 483 $\pm$ 0. 217	0. 079 $\pm$ 0. 023

Note: $\star P > 0. 05$, compared with CR group; $\triangle P > 0. 05$, compared with NC group; $\star P < 0. 05$, compared with CR group; $\blacktriangle P < 0. 05$, compared with NC group

表 3 JAKs mRNA 在各期 AML 患者和正常人中的表达率

Table 3 The positive rate of JAKs mRNA in AML patients and normal control

Group	n	JAK1(%)	JAK2(%)	JAK3(%)	TYK2(%)
Newly diagnosed	50	84. 0(42/50) $\triangle\star$	86. 0(43/50) $\triangle\star$	68. 0(34/50) $\triangle\star$	82. 0(41/50) $\diamond\blacktriangle$
Relapsed	13	69. 2(9/13) $\triangle\star$	84. 6(11/13) $\triangle\star$	69. 2(9/13) $\triangle\star$	76. 9(10/13) $\diamond\blacktriangle$
CR	26	76. 9(20/26)	65. 4(17/26)	57. 6(15/26)	60. 0(13/26)
NC	19	69. 0(13/19)	86. 1(16/19)	57. 8(11/19)	36. 8(7/19)

Note: $\star P > 0. 05$, compared with CR group; $\triangle P > 0. 05$, compared with NC group; $\star P < 0. 05$, compared with CR group; $\blacktriangle P < 0. 05$, compared with NC group

之间的差异用 *t* 检验或方差分析, 相关性用 Spearman 相关分析方法等。以 $P < 0. 05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 纯度和质量分析

所提取总 RNA 经紫外分光光度计检测, 比值在 1. 8~2. 0 之间, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 28 s、18 s 条带清晰可见, 无明显降解。

2.2 AML 患者 JAKs mRNA 表达与 FAB 分型的关系

3 例 M_0 和 M_1 患者 4 种 JAKs 均表达; 因 M_0 、 M_1 、 M_6 、 M_7 病例数少或缺如, 在方差分析时去除。本研究分析了 M_2 、 M_3 、 M_4 、 M_5 4 种类型患者中 JAKs 的表达, 应用方差分析, $P > 0. 05$, 由此认为 4 种类型患者 JAKs 表达差异无统计学意义。

2.3 JAKs 基因在正常人及 AML 各期的表达差别

JAKs 在正常人及 AML 各期均有较强程度的表达, 提示该基因在正常骨髓细胞中就有表达, 参与细胞的生理功能。正常人及各期 AML 患者的 JAK1、JAK2 和 JAK3 mRNA 阳性表达率差异均无统计学意义(P 均 $> 0. 05$); 而 TYK2 在初治和复发组表达率明显高于 CR 和 NC 组, 差异有统计学意义($P < 0. 05$)。JAK2、JAK3、TYK2 mRNA 在初治和复发 AML 组平均表达水平明显高于 NC 和 CR 组(P 均 $< 0. 05$), 初治 AML 和复发 AML 之间、CR 和 NC 组之间差异均无统计学意义(P 均 $> 0. 05$)。JAK1 在初治 AML 组平均表达水平略高于 CR 和 NC 组, 差异无统计学意义($P > 0. 05$); 在复发 AML 组 mRNA 水平较 CR 和 NC 组高($P < 0. 05$), 见表 2、3。

表 4 SHP-1mRNA 在 AML、CR 患者和正常对照组的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The expression levels of SHP-1 mRNA in AML, CR patients and normal control($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Positive(%)	mRNA
Newly diagnosed	50	44(22/50) $\diamond\blacktriangle$	0 - 1. 92 $\times 10^5$ $\diamond\blacktriangle$
CR	26	60(19/26) $\blacktriangle$	0 - 6. 23 $\times 10^7$ $\blacktriangle$
Relapsed	13	26. 7(4/13) $\diamond\blacktriangle$	0 - 1. 79 $\times 10^5$ $\diamond\blacktriangle$
NC	19	100(19/19)	3. 21 $\times 10^6$ - 6. 88 $\times 10^7$

Note: $\diamond P < 0. 05$, compared with CR group; $\blacktriangle P < 0. 05$, compared with NC group

2.4 SHP-1 在正常人及 AML 各期的表达差别

初治和复发 AML 组 SHP-1 表达率和表达水平明显低于 CR 组和 NC 组(P 均 $< 0. 01$)。CR 组亦低于 NC 组, 差异有统计学意义($P < 0. 05$)。持续追踪 6 例急性白血病患者其初治、缓解一月、缓解三月和缓解半年的自身 SHP-1 mRNA 表达水平, 发现初治组与缓解一月组、缓解三月组和缓解半年组相比 SHP-1 mRNA 表达水平差异有统计学意义(成组设计多个样本比较的秩和检验 $P = 0. 0327$), 初治组与其他三组有差别, 三个缓解组之间没有差别, 见表 4。

2.5 SHP-1 和 JAKs mRNA 表达的相关性

对同时进行 JAKs 和 SHP-1 检测的 50 例初治 AML 患者的分析表明, SHP-1 与 JAK1($r = 0. 501$, $P = 0. 048$) 和 JAK3($r = -0. 307$, $P = 0. 038$) 在 mRNA 水平呈负相关, 与 JAK2 和 TYK2 表达无相关性($P > 0. 05$)。

3 讨论

JAKs 为非受体型酪氨酸激酶, 包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 四个成员, 研究报道 AML

患者存在多种 JAKs 表达^[3], JAKs 与细胞因子受体结合, 识别细胞因子受体近膜区域基序, 在受体及其配体的刺激下发生一系列磷酸化, 并选择性激活其下游底物 STAT 使之转位到核, 与核内特异性 DNA 调控元件结合而指导转录。JAKs/STATs 信号转导途径异常激活与血液系统肿瘤发生密切相关^[3-4]。JAKs 和 STATs 上的 Tyr 残基的去磷酸化是 JAK-STAT 信号下调的重要机制^[5]。但有资料表明白血病/淋巴瘤细胞系细胞系 Ramos、H9、Jurkat 和乳癌细胞系 HTB26 系中蛋白酶体对 JAK1 和 TYK1 的降解减弱而致 JAK1 和 TYK1 蛋白水平增高, 蛋白酶体抑制剂 MG132 能阻断这种作用^[6]。Han Y 等^[6]也发现 NPM-ALK 阳性的间变大细胞淋巴瘤细胞系中 JAK3 激酶蛋白的增加。提示白血病发生病理机制中不仅与 JAKs 信号通路的组成性激活有关, 同时可能还存在 JAKs 基因表达的异常增高, 但他并没有研究 JAKs mRNA 表达水平的变化。

我们分析了 JAKs mRNA 在 AML 各期的表达情况发现, 初治和复发 AML 患者 JAK2、JAK3、TYK2 表达水平明显高于 CR 和 NC 组, JAK1 在初治 AML 组表达水平较 NC 组也有所升高但差异无统计学意义, 分析原因可能有: (1) 样本量较少; (2) JAK1 表达水平在不同患者之间差异较大而造成了统计学误差。CR 后 JAKs 表达水平有所下降, 较 NC 组差异无统计学意义; 这证实 AML 患者中存在 JAKs 基因转录水平上调, 至少可能是其蛋白水平增高的部分原因。

SHP-1 是一种含 SH2 域 (src homology-2 domain) 的胞质酪氨酸磷酸酶, 主要表达于造血细胞, 是 JAK/STAT 信号通路的负调控因子, 在白血病形成中, SHP-1 表达或功能异常很可能是导致 JAK/STAT 通路持续激活的机制之一^[5]。许多白血病/淋巴瘤细胞系中 SHP-1 mRNA 和蛋白水平都明显下降, 在疾病的发生和对预后的判断中具有重要的意义^[5-6]。我们也曾报道初治 AML 患者的 SHP-1 mRNA 表达水平显著降低, CR 后水平上升, 复发时再次下降^[8-10]; 且高表达 SHP-1 的初治 AML 患者预后良好。本研究应用敏感性、特异性和重复性更好且定量准确的 FQ-PCR 方法进一步对各期 AML 患者骨髓单个核细胞中 SHP-1 的表达进行定量, 结果与前期报道相一致; 同时我们动态追踪观察了 6 例 AML 患者在初治时期及不同缓解时期 SHP-1 mRNA 表达变化, 发现同一 AML 患者经治疗达 CR 后 SHP-1 表达水平有不同程度升高, 但与缓解时间长短无关。进一步说明 SHP-1 低表

达或不表达可能是导致 AML 患者发病的原因之一, 证实 SHP-1 在白血病发病机制中起关键负调控作用, 并对 AML 患者的预后判定具有重要意义。

SHP-1 主要通过去除 JAKs 蛋白磷酸化对 JAKs 进行调节, 也可加速 JAKs 蛋白的降解而下调 JAK/STAT 途径^[5-6]。我们对 JAKs 和 SHP-1 的表达量进行了相关分析发现, 在 mRNA 水平, SHP-1 表达与 JAK1、JAK3 呈负相关, 而与其他两种 JAK 基因无相关性; 提示 SHP-1 对 JAKs 基因的负调控作用并非只是通过去除 JAKs 磷酸化而阻断 JAK/STAT 路径, 还可能在转录水平进行调节, 但需要更多的病例资料进一步证实。SHP-1 对 JAKs 家族的负调控作用有待于进一步探讨, 以明确 AML 患者中 SHP-1 表达异常如何通过下游信号通路影响细胞转化、细胞增殖凋亡和分化。

参考文献:

- [1] Wu C, Sun M, Liu L, et al. The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer[J]. *Gene*, 2003, 306(13): 1-12.
- [2] Oka T, Yoshino T, Hayashi K, et al. Reduction of Hematopoietic Cell-Specific Tyrosine Phosphatase SHP-1 Gene Expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas /leukemia[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4): 1495-1505.
- [3] Biethahn S, Alves F, Wilde S, et al. Expression of granulocyte colony-stimulating factor- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia[J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(5): 885-894.
- [4] Jiao H, Berrada K, Yang W, et al. Direct association with and dephosphorylation of JAK2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(12): 6985-6992.
- [5] Wu C, Guan Q, Wang Y, et al. SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinase[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(5): 1026-1037.
- [6] Han Y, Amin H M, Franko B, et al. Loss of SHP1 enhances JAK3/STAT3 signaling and decreases proteasome degradation of JAK3 and NPM-ALK in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2006, 108(8): 2796-2803.
- [7] 张之南, 沈悦. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 171-173.
- [8] 韩颖, 罗建民, 贾晓辉, 等. 白血病患者造血细胞磷酸酶与半胱氨酸蛋白酶基因表达及其临床意义[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(5): 263-265.
- [9] Luo Jianmin, Liu Zelin, Hao Hongling, et al. Mutation analysis of the HCP gene in acute leukemia[J]. *J Experimental Hematology*, 2004, 12(2): 128-132.
- [10] 韩颖, 郝淑香, 田丛哲, 等. 白血病患者蛋白质酪氨酸磷酸酶的检测及临床意义[J]. *临床荟萃*, 2007, 22(9): 440-442.

[编辑: 安 凤; 校对: 周永红]