

## SHP-1 和 JAK1 基因在初治急性白血病患者中的表达

李英华<sup>1</sup>, 罗建民<sup>2</sup>, 张晓燕<sup>1</sup>, 王冬梅<sup>1</sup>

(1. 哈励逊国际和平医院血液科, 河北 衡水 053000; 2. 河北医科大学第二医院血液科, 石家庄 050000)

**[摘要]** 目的:探讨 SHP-1 和 JAK1 基因在初治急性白血病(AL)细胞的转录表达及其与初治 AL 患者化疗效果的关系。方法:采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 60 例初治 AL 患者骨髓单个核细胞及 20 例健康人外周血单个核细胞中 SHP-1 和 JAK1 mRNA 的表达。结果:60 例初治 AL 患者 SHP-1 和 JAK1 的 mRNA 表达阳性率分别为 30%, 100%;初治 AL 患者 SHP-1 mRNA 表达水平明显低于正常对照组( $P < 0.001$ ), JAK1 mRNA 表达水平较正常对照组略增高,但差异无统计学意义( $P = 0.180$ ),初治 AL 患者 SHP-1 mRNA 阳性组的诱导化疗完全缓解(CR)率为 88.9%,阴性患者组 CR 率为 54.8%,差异有统计学意义( $P = 0.005$ )。SHP-1 与 JAK1 mRNA 表达呈负相关( $P = 0.046$ )。结论:SHP-1 可能是白血病潜在的抑制基因,可望作为判断初治急性白血病患者疗效和预后的指标。

**[关键词]** 初治急性白血病; SHP-1; JAK1; RT-PCR; 抑癌基因

**[中图分类号]** R557 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2007)04-0284-04

## Expressions of SHP-1 and JAK1 gene in de novo acute leukemia patients

LI Ying-hua<sup>1</sup>, LUO Jian-min<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-yan<sup>1</sup>, WANG Dong-mei<sup>1</sup>

(1. Department of Hematology, Harrison International Peace Hospital, Hengshui Hebei 053000; 2. Department of Hematology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the relationship between the expressions of SHP-1 or JAK1 mRNA and the effect of chemotherapy in de novo acute leukemia patients. **Methods** The expression of SHP-1 and JAK1 mRNA in de novo acute leukemia patients were measured with semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(semi-Q-RT-PCR), and other 20 healthy adults as normal control (NC). **Results** The positive rates of SHP-1 and JAK1 mRNA in de novo acute leukemia patients were 30%, 100% respectively. The expression of SHP-1 mRNA in de novo acute leukemia patients was significant higher than that in the NC group ( $P < 0.001$ ). The expression of JAK1 mRNA in de novo acute leukemia patients was a little higher than that in the NC group, but in which had no statistical significance ( $P = 0.180$ ). The first complete remission (CR) rate in SHP-1 positive group was 88.9%, and in negative group was 54.8%, there was a statistical significance between them ( $P = 0.005$ ). There was a negative correlation between SHP-1 and JAK1 mRNA ( $P = 0.046$ ). **Conclusion** SHP-1 is potentially a tumor suppressor gene for leukemia and is associated with complete remission rate. It could be used as an index for evaluating therapy efficiency and judging prognosis in de novo acute leukemia.

**[Key words]** de novo acute leukemia; SHP-1; JAK1; RT-PCR; tumor suppressor gene  
[Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(4):0284-04]

①收稿日期:2007-04-05 修回日期:2007-05-11

作者简介:李英华(1971-),女,河北衡水人,硕士,副主任医师,主要从事白血病/淋巴瘤的发病机制、诊断和靶向治疗的研究。

通讯作者:罗建民, E-mail: luojm315@yahoo.com.cn

基金项目:河北省自然科学基金(C200500074);衡水市科技局科学技术研究与发展计划项目(06020Z) This work was supported by Hebei Provincial Natural Scientific Foundation (C200500074); Studying and Developing Program of Hengshui science-technology bureau (06020Z)

细胞信号转导通路的异常激活是白血病重要的发病机制。JAK/STAT 是造血生长因子广泛应用的信号通路, JAK1 与 IL-11 等多种造血生长因子的信号转导有关<sup>[1]</sup>。造血细胞磷酸酶 (SH<sub>2</sub> domain-containing protein tyrosine phosphatase1, SHP-1) 是主要表达于造血细胞的胞浆酪氨酸磷酸酶, 通过对与造血生长因子受体偶联的 JAKs 激酶的脱磷酸化负调控 JAK/STAT 信号通路, 抑制造血细胞的有丝分裂、增殖、分化和生物活性。SHP-1 蛋白无功能突变的血细胞 SHP-1 与 JAKs 偶联障碍, 对造血生长因子刺激呈超敏反性<sup>[2]</sup>。某些人 T 淋巴细胞白血病病毒 (HTLV) 转化的 T 细胞系中, SHP-1 表达缺失与 JAK/STAT 的激活及细胞转化相关, 而转染 SHP-1 基因的肿瘤细胞的增殖活性明显受到抑制<sup>[3]</sup>。为了探讨 SHP-1 和 JAK1 基因在初治急性白血病 (AL) 发生及预后中的作用, 我们以半定量 RT-PCR 的方法检测了 60 例初治 AL 患者骨髓和 20 名健康人外周血单个核细胞 (MNCs) 中 SHP-1 和 JAK1 mRNA 的表达情况。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 60 例初治 AL 患者均为我院 2003 年 6 月至 2005 年 5 月住院治疗患者。其中男 36 例, 女 24 例, 18 ~ 68 (中位年龄 38) 岁, 急性髓细胞白血病 (AML) 44 例, FAB 分型: M1, 2 例; M2, 20 例; M3, 14 例; M4, 4 例; M5, 4 例。急性淋巴细胞白血病 (ALL) 16 例, FAB 分型: L1, 1 例; L2, 14 例; L3, 1 例。诊断标准参照张之南的《血液病诊断及疗效标准》<sup>[4]</sup>。正常对照 (NC) 20 例为健康志愿者, 男 12 例, 女 8 例, 23 ~ 35 (中位年龄 30) 岁。

### 1.2 方法

1.2.1 单个核细胞的提取 MNCs 取自 60 例 AL 患者骨髓和 20 名健康志愿者的外周血, 标本用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离提取, 冻存备用。

1.2.2 细胞总 RNA 的提取和鉴定 按产品说明用 TRIZOL (美国 Promega 公司) 提取细胞总 RNA, 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, 用紫外分光光度仪进行 RNA 定量和纯度鉴定。

1.2.3 cDNA 合成 随机六聚引物 (Promega 公司) 合成第 1 条链 cDNA。逆转录反应体系 20  $\mu$ L, 细胞总 RNA 2  $\mu$ g, 50 U/ $\mu$ L Rnasin 0.5  $\mu$ L, 500 mg/L 随机引物 1  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 5  $\times$  逆转录反应缓冲液 4  $\mu$ L, 200 U/ $\mu$ L AMV 逆转录酶 200 U, 余

用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水补足。在 37  $^{\circ}$ C 中反应 60 min, 95  $^{\circ}$ C 反应 5 min 后终止反应。cDNA 在 -80  $^{\circ}$ C 保存或进行 PCR 扩增。

1.2.4 引物设计 目的基因 SHP-1 和管家基因磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 引物序列参照文献<sup>[5]</sup>, SHP-1 上游引物: 5'-GGGCAGGCAGAGACGCT-3'; 下游引物: 5'-CTTCTTGAAATGCTCCACCA-3'。GAPDH 上游引物: 5'-CGGGAAGCTTGTCATCAATGG-3'; 下游引物: 5'-GGCACTGATGGCATGGACTG-3'。登陆 Genebank 数据库, JAK1 序列号为 NM002227, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 JAK1 引物, JAK1 上游引物: 5'-TGGAGGTAACCACATAGC-3'; 下游引物: 5'-CCGAGAACCCAAATAGTC-3'。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。SHP-1, JAK1, GAPDH 的 RT-PCR 产物长度分别为 237 bp, 250 bp, 358 bp。

1.2.5 PCR 反应 PCR 反应体系 25  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (1.5 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, dNTPs (0.2 mmol/L) 2  $\mu$ L, 引物 (10 pmol/L) 1.5  $\mu$ L, Taq 酶 1.5 U, 余用双蒸水补足。扩增条件, SHP-1: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。JAK1: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环。最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。GAPDH 的扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 60 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 22 个循环。最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.6 PCR 产物分析 取 10  $\mu$ L 扩增产物, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 50 min), 溴化乙锭 (EB) 染色, 并在读胶仪 AlphaImager 1200 上扫描分析 SHP-1, JAK1 与 GAPDH 的灰度比值进行半定量分析。RT-PCR 结果 SHP-1, JAK1 和 GAPDH 均有表达者定义为 SHP-1, JAK1 mRNA 阳性表达, 只有 GAPDH 阳性者定义为 SHP-1 或 JAK1 mRNA 阴性表达。

1.2.7 治疗 诱导缓解方案: 初治 AML 选用 DA (柔红霉素、阿糖胞苷) 或 MA 方案 (米托蒽醌、阿糖胞苷), APL 用全反式维甲酸 (ATRA) 或三氧化二砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 如白细胞增高加小剂量 HA (高三尖杉酯碱、阿糖胞苷) 或标准剂量 DA。初治 ALL 选用 VDCP (长春新碱、柔红霉素、环磷酰胺、泼尼松) 或 VDLP (长春新碱、柔红霉素、左旋门冬氨酸酶、泼尼松)。疗效判定根据《血液病诊断及疗效标准》<sup>[4]</sup>。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件处理

实验数据。SHP-1, JAK1 mRNA 在初治 AL 患者与 NC 表达采用两个独立样本非参数秩和 Kolmogorov-smirov Z 检验; SHP-1 mRNA 阳性组和阴性组诱导化疗 CR 率采用  $\chi^2$  检验; 初治 AL 患者 SHP-1 与 JAK1 mRNA 是否具有相关性采用两个独立样本非参数 Wilcoxon 相关检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 初治 AL 患者 SHP-1 和 JAK1 基因的表达

SHP-1 及 JAK1 基因的 RT-PCR 扩增产物电泳图分别见图 1, 2。初治 AL 患者 SHP-1 mRNA 的阳性率为 30.0%, AL 患者 SHP-1 mRNA 水平与 NC 组比较

差异有统计学意义 ( $Z = 2.77, P < 0.001$ )。初治 AL 及 NC 中 JAK1 mRNA 均表达, AL 患者 JAK1 mRNA 相对水平与 NC 组比较, 差异无统计学意义 ( $Z = 1.097, P = 0.18$ ) (表 1)。

2.2 初治 AL 患者 SHP-1 mRNA 表达与化疗疗效的关系 初治 AL 患者中 SHP-1 mRNA 阳性组诱导化疗 CR 率为 88.9% (16/18), 阴性组诱导化疗 CR 率为 54.8% (23/42), 两组比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 8.028, P = 0.005$ )。

### 2.3 初治 AL 患者 SHP-1 与 JAK1 mRNA 的关系

60 例初治 AL 患者 SHP-1 与 JAK1 mRNA 水平的相关性分析显示两种基因 mRNA 水平呈轻度负相关 ( $Z = -1.982, P = 0.046$ )。

表 1 初治 AL 与 NC 组 SHP-1, JAK1 mRNA 的表达

Table 1 Expression of SHP-1, JAK1 mRNA in de novo acute leukemia patients and normal controls

组别	n	SHP-1 mRNA 相对水平		JAK1 mRNA 相对水平
		M(Q <sub>L</sub> -Q <sub>U</sub> )	阳性例数(%)	M(Q <sub>L</sub> -Q <sub>U</sub> )
初治 AL	60	0.000(0.000 ~ 0.043) **	18(30.0)	0.502(0.106 ~ 0.826)
NC	20	1.768(1.132 ~ 2.258)	20(100.0)	0.448(0.195 ~ 0.528)

与 NC 比较, \*\*  $P < 0.001$

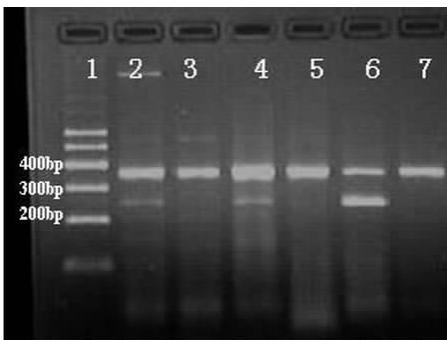


图 1 初治 AL 及 NC 组 SHP-1 mRNA 的表达 1:DNA 分子量标准; 2-5, 7:初治 AL; 6:NC

Fig. 1 Expression of SHP-1 mRNA in de novo acute leukemia patients and normal controls Lane 1:DNA Marker; Lane 2-5, 7:De novo AL; Lane 6:NC

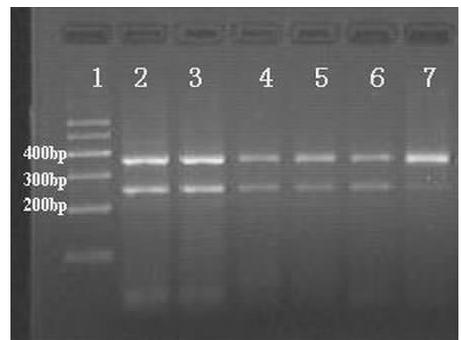


图 2 初治 AL 及 NC 组 JAK1 mRNA 的表达 1:DNA 分子量标准; 2-6:初治 AL; 7:NC

Fig. 2 Expression of JAK1 mRNA in de novo acute leukemia patients and normal controls Lane 1:DNA Marker; Lane 2-5, 7:De novo AL; Lane 6:NC

## 3 讨 论

SHP-1 蛋白为一种经典非受体磷酸酶, 负调控造血细胞发生、发展、增殖和分化<sup>[6]</sup>。对 SHP-1 失活突变  $me/me$  和  $me^v/me^v$  小鼠的研究发现<sup>[7]</sup>, SHP-1 功能缺失引起髓/单核细胞系的过度增殖, 其骨髓细

胞对造血生长因子高度敏感。SHP-1 活性缺失或降低是淋巴瘤/白血病细胞系的特征, 转染 SHP-1 可明显抑制白血病细胞系的增殖<sup>[6]</sup>, 提示 SHP-1 可能为白血病的抑制基因。笔者应用半定量 RT-PCR 方法检测 60 例初治 AL 患者 SHP-1 mRNA 的表达, 发现在初治 AL 中 SHP-1 表达阳性率及表达水平明显低

于正常对照组,说明原代初治急性白血病细胞中 SHP-1 表达降低或缺如。研究显示 SHP-1 启动子的甲基化,可能是白血病细胞系及原代白血病细胞中 SHP-1 基因沉默的重要机制<sup>[8]</sup>。国内有研究发现<sup>[5]</sup>白血病中 SHP-1 的基因突变罕见,SH-1 的失活突变可能与白血病发病无关或仅在小部分白血病中起作用。本研究结果也说明白血病形成中 SHP-1 活性降低主要与其表达缺如或降低有关。

白血病形成中普遍存在 JAK/STAT 通路的异常,尤其是 JAK/STAT 信号通路的持续激活<sup>[9-10]</sup>,SH-1 通过对 JAKs 及下游蛋白分子的脱磷酸化负调控 JAK/STAT 通路。我们检测初治 AL 患者中 SHP-1 mRNA 降低或缺如,提示原代白血病细胞中 JAK/STAT 异常激活可能与 SHP-1 的表达降低或缺如有关;还发现原代白血病细胞中 JAK1 mRNA 表达较正常人外周血单个核细胞略增高,并且 60 例初治 AL 患者中 SHP-1, JAK1 mRNA 水平呈低度负相关,提示 SHP-1 表达的降低可能激活了 JAK1 基因的表达,也可能是激活的 JAK1 信号通路抑制了 SHP-1 基因的表达。恶性 T 淋巴细胞中信号转导子及转录激活子 3 (STAT3) 与 DNA 甲基化转移酶 1 基因 (DNMT1) 与组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1) 形成复合物,并与 SHP-1 的启动子结合,引起 SHP-1 基因启动子甲基化,抑制 SHP-1 基因的转录<sup>[11]</sup>,但 SHP-1 与 JAKs 表达的关系及详细机制还有待进一步研究,扩大样本并选择正常人骨髓 MNCs 做对照或许更能准确反应两者之间的关系。Han 等<sup>[12]</sup>发现 SHP-1 表达缺失减少蛋白酶体对 JAK3, NPM-ALK 的降解致间变淋巴瘤激酶 (ALK) 阳性的间变大细胞淋巴瘤形成,提示恶性血细胞中 SHP-1 基因蛋白表达降低削弱了蛋白酶体对 JAKs 蛋白的降解而致 JAKs 蛋白表达增高。SHP-1 mRNA 阳性 AL 患者初次诱导化疗 CR 率较阴性者高,与韩颖等<sup>[13]</sup>报道相似,说明 SHP-1 表达降低在 AL 发病中起重要作用,并与诱导治疗疗效相关,检测 SHP-1 mRNA 的表达,对指导 AL 治疗转归及预后的判断有一定意义。但两项指标在急性白血病发病中的作用及临床实用价值尚有待进一步探讨。

#### 参 考 文 献

[1] Yamaok K, Saharinen P, Pesu M, et al. The Janus kinases (Jaks) [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(12): 253.

- [2] Wormald S, Hilton D J. Inhibitors of Cytokine Signal Transduction [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 821-824.
- [3] Leon F, Cespon C, Franco A, et al. SHP-1 expression in peripheral T cells from patients with Sezary syndrome and in the T cell line HUT-78; implications in JAK3-mediated signaling leukemia [J]. *Leukemia*, 2002, 16(8): 1470-1477.
- [4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998; 168-194, 219-227.
- ZHANG Zhi-nan. The diagnostic and response criteria of hematological disease [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1998; 168-194, 219-227.
- [5] LUO Jian-min, LIU Ze-lin, HAO Hong-ling, et al. Mutation analysis of the HCP gene in acute leukemia [J]. *J Exp Hematol*, 2004, 12(4): 420-426.
- [6] 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.
- [7] Hsu H C, Shultz L D, Su X, et al. Mutation of the hematopoietic cell phosphatase (Hcph) gene is associated with resistance to  $\gamma$ -irradiation induced apoptosis in Src homology protein tyrosine phosphatase (SHP)-1-deficient "Motheaten" mutant mice [J]. *J Immunol*, 2001, 166(2): 772-780.
- [8] Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng G S. Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice [J]. *J Exp Med*, 1993, 178(6): 2157-2163.
- [9] Benekli M, Baer M R, Baumann H, et al. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias [J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2940-2954.
- [10] Zhang Q, Wang H Y, Woetmann A, et al. STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes [J]. *Blood*, 2006, 108(3): 1058-1064.
- [11] 李英华, 罗建民. 白血病形成中 JAK/STAT 信号通路的持续激活 [J]. *国际病理科学与临床*, 2006, 25(5): 398-402.
- LI Ying-hua, LUO Jian-min. Constitutive activation of JAK/STAT signaling pathway in leukemogenesis [J]. *Int J Path Clin Med*, 2006, 25(5): 398-402.
- [12] Han Y, Amin H, 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.
- [13] 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): 363-365.
- HAN Yin, LUO Jian-ming, JIA Xiao-hui, et al. The expression and clinical significance of hematopoietic cell phosphatase and cysteinyl aspartate-specific proteinase in leukemia [J]. *Chin J Intern Med*, 2006, 45(5): 363-365.