

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.07.009

• 基础研究 •

三氧化二砷联合5-杂氮-2'-脱氧胞苷对U937细胞SHP-1、JAK3、TYK2基因表达的影响

张小坤¹, 罗建民², 孙杰¹

Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine Combined with Arsenic Trioxide on SHP-1, JAK3, TYK2 Expression in U937 Cells

ZHANG Xiaokun¹, Luo Jianmin², Sun Jie¹

1. Department of Hematology, Xingtai People's Hospital of Hebei Medical University, Xingtai 054000, China; 2. Department of Hematology, The Second Hospital, Hebei Medical University Provincial Key Laboratory of Experimental Hematology

Abstract: Objective To investigate the influence of methylation inhibitor of arsenic trioxide (As_2O_3) combined with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) on the expression of JAK3, TYK2 and hematopoietic cell phosphatase SHP-1 in chronic myeloid leukemia cell line U937, and to explore the effects of the combination in leukemia pathogenesis. **Methods** 5-aza-CdR, As_2O_3 and the combined treatment were applied on U937 cells. As_2O_3 1 $\mu\text{mol/L}$ and 5-aza-CdR 0.5 $\mu\text{mol/L}$ group, As_2O_3 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and 5-aza-CdR 1 $\mu\text{mol/L}$ group, As_2O_3 5 $\mu\text{mol/L}$ and 5-aza-CdR 2 $\mu\text{mol/L}$ group and no chemical substances group were treated for 24, 48, 72 h, respectively. Then total cellular RNA was extracted. Real-time Quantitative PCR was used to detect the expression of JAK3, TYK2 and SHP-1. **Results** With the application of As_2O_3 , 5-aza-CdR and the combination, SHP-1 mRNA expression in U937 cells was increased gradually, while JAK3 and TYK2 mRNA expression were decreased, in a dose- and time-dependent manner. SHP-1 was negatively correlated with JAK3 or TYK2. JAK3 was affected more obviously than TYK2. **Conclusion** (1) With the application of methylation inhibitor of As_2O_3 and 5-aza-CdR, the expression of SHP-1 was increased, while the expressions of JAK3 and TYK2 were decreased in a dose- and time-dependent manner. (2) The reexpression of SHP-1 gene is related to its methylation and has a negative regulation role of JAK/STAT pathway.

Key words: Methylation inhibitor; 5-Aza-2'-deoxycytidine; SHP-1; JAK3; TYK2

摘要: 目的 探讨甲基化抑制剂5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR)联合三氧化二砷(As_2O_3)对白血病细胞株U937中JAK3、TYK2和造血细胞磷酸酶SHP-1表达水平的影响,并探讨它们在白血病发病中的作用。**方法** 5-aza-CdR、 As_2O_3 单用及联合处理U937细胞,5-aza-CdR浓度为0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$, As_2O_3 的浓度为1、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$, As_2O_3 1 $\mu\text{mol/L}$ + 5-aza-CdR 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、 As_2O_3 2.5 $\mu\text{mol/L}$ + 5-aza-CdR 1 $\mu\text{mol/L}$ 、 As_2O_3 5 $\mu\text{mol/L}$ + 5-aza-CdR 2 $\mu\text{mol/L}$ 及不加药物组,分别处理24、48、72 h后提取细胞总RNA,荧光实时定量PCR(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RQ-PCR)检测JAK3、TYK2及SHP-1的表达。**结果** As_2O_3 和5-aza-CdR单独作用及两药合用时,SHP-1 mRNA在U937细胞中的表达呈剂量及时间依赖性,其表达逐渐升高;JAK3 mRNA的表达呈剂量及时间依赖性,其表达逐渐降低;TYK2 mRNA的表达呈剂量及时间依赖性,其表达逐渐降低;SHP-1与JAK3、TYK2负相关,JAK3所受影响较TYK2更为显著。**结论** (1)甲基化抑制剂5-aza-CdR和 As_2O_3 可使SHP-1表达升高,JAK3、TYK2表达降低,与浓度及作用时间有关。(2)SHP-1基因的重新表达与其发生去甲基化有关,对JAK/STAT通路有负调控作用。

关键词: 甲基化抑制剂; 5-杂氮-2'-脱氧胞苷; SHP-1; JAK3; TYK2

中图分类号: R733.71 文献标识码: A

收稿日期: 2013-06-28; 修回日期: 2013-10-23

作者单位: 1. 054000河北邢台,河北医科大学附属医院邢台市人民医院血液科; 2. 河北医科大学第二医院血液科 血液病河北省重点实验室

作者简介: 张小坤(1982-),女,硕士,主治医师,主要从事细胞内信号转导与恶性血液病的诊断与治疗

0 引言

急性白血病(acute leukemia, AL)是常见的恶性肿瘤,JAK/STAT(Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway)途径的激活与白血病细胞增殖分化有关,SHP-1是JAK/STAT信号转导通路的负调控机制之一。SHP-1基

因的表达缺失可归因于SHP-1的突变、启动区的甲基化或SHP-1蛋白合成转录后调节。研究证实,淋巴瘤和白血病细胞系中存在SHP-1基因表达缺失及其启动子甲基化^[1], 5-aza-CdR能诱导这些细胞系SHP-1基因表达, 并抑制肿瘤细胞增殖^[2]。As₂O₃具有杀伤白血病细胞、促进白血病细胞凋亡和诱导细胞分化三重作用, 并发挥去甲基化的作用^[3]。本实验以白血病细胞株U937为研究对象, 通过实时定量PCR法, 从mRNA水平研究了应用去甲基化药物5-aza-CdR和As₂O₃后, SHP-1、JAK3、TYK2基因的表达情况, 分析了SHP-1基因的表达缺失的原因及对JAK/STAT通路的影响, 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 材料和方法

1.1 材料

白血病细胞株U937, 为河北医科大学第二医院血液病研究所实验室保留株。RPMI 1640培养液和新生胎牛血均购自Hyclone公司。5-aza-CdR购自美国Sigma公司, 用10% RPMI 1640培养液配成4 mol/L储备液, -20℃保存, 稀释终浓度为200 μmol/L。As₂O₃ (三氧化二砷, ATO) 购自哈尔滨伊达药业有限公司, 应用浓度为500 μmol/L。TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司。SYBR Green I 购自上海基康生物技术公司。SHP-1上游引物: 5'-GCC TGG ACT GTG ACA TTG AC-3', 下游引物: 5'-ATG TTC CCG TAC TCC GAC TC-3'。JAK3上游引物: 5'-CCA CGG TCT GGG AAG TGT TTA G-3', 下游引物: 5'-ACG AAT GAC GGC TCG GAA G-3'。TYK2上游引物: 5'-TCA CTG AGT TGC TGG AAC GAG G-3', 下游引物: 5'-CGA AGG TTG GGC GAA AGG AC-3'。β-actin上游引物: 5'-TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG-3', 下游引物: 5'-CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT-3'。引物由上海生工基因技术有限公司合成, SHP-1的扩增片断长度187 bp, JAK3的扩增片断长度188 bp, TYK2的扩增片断长度117 bp, β-actin的扩增片断长度155 bp。

1.2 细胞培养

U937细胞悬浮培养于含10%热灭活(56℃, 30 min)的新生胎牛血清、青霉素100 u/ml、链霉素100 μg/ml的RPMI 1640培养液中。培养条件为37℃、5%CO₂饱和湿度, 隔天换液传代一次。取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 药物处理

将对数生长期的细胞转入细胞培养板, 每孔1×10⁶ cells/ml。5-aza-CdR浓度为0.5、1、2 μmol/L, As₂O₃的浓度为1、2.5、5 μmol/L, As₂O₃ 1 μmol/L+5-aza-CdR 0.5 μmol/L (低浓度组)、As₂O₃ 2.5 μmol/L+5-aza-CdR 1 μmol/L (中浓度组)、As₂O₃ 5 μmol/L+5-aza-CdR 2 μmol/L (高浓度组)^[2]及空白对照组。细胞和药物在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下孵育24、48、72 h后收获并洗涤。

1.4 荧光实时定量PCR (RQ-PCR) 检测SHP-1、JAK3、TYK2的基因表达

Trizol提取细胞总RNA, 在紫外透射仪上显示有28S、18S (部分可见到5S) 两条rRNA条带, 说明提取的RNA完整。紫外分光光度计定量。反转录反应体系20 μl, 包括细胞总RNA 2 μg, 50 u/μl Rnasin 1 μl, 500 μg/ml随机引物1 μl, 10 mM dNTP 2 μl, 5×反转录反应缓冲液4 μl, M-MLV反转录酶200 u, 余用DEPC水补足至20 μl。反应条件为37℃中反应60 min, 95℃反应5 min后终止反应。cDNA在-80℃保存或进行PCR扩增。

RQ-PCR反应总反应体系25 μl, 包括cDNA 1.5 μl, 10 pmol/μl 上、下游引物各1 μl, dNTP 5 mM 0.8 μl, 10×buffer 2.5 μl, MgCl₂ 25 mM 1.5 μl, Taq酶3 u/μl 0.5 μl, 20×SYBR Green I 1 μl, 余用DEPC水补足25 μl。SHP-1的扩增条件: 94℃变性45 s, 60℃退火45 s, 72℃延伸60 s, 35个循环。最后72℃延伸10 min。JAK3的扩增条件: 94℃变性45 s, 60℃退火45s, 72℃延伸60s, 35个循环。最后72℃延伸10min。TYK2的扩增条件: 94℃变性45s, 60℃退火45 s, 72℃延伸60 s, 35个循环。最后72℃延伸10 min。β-actin的扩增条件: 94℃变性45s, 58℃退火45s, 72℃延伸60 s, 35个循环。最后72℃延伸10 min。

1.5 PCR产物的相对定量分析

通过标准曲线对检测样品的目的基因(SHP-1、JAK3、TYK2)及管家基因(β-actin)进行定量, 然后用下列公式计算, 求得相对值即为相对表达量。

相对值=2^{-ΔΔCt}, ΔCt=Ct₁-Ct₂, Ct₁: 处理样品待测基因的临界循环数, Ct₂: 处理样品管家基因的临界循环数。

1.6 统计学方法

组间比较采用多样本均数比较的方差分析。采用配对t检验分析单用药与合用药对基因表达的影响。采用直线回归分析, 探讨SHP-1对JAK3、

TYK2的影响。所有数据用SPSS.V13.0统计软件分析处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

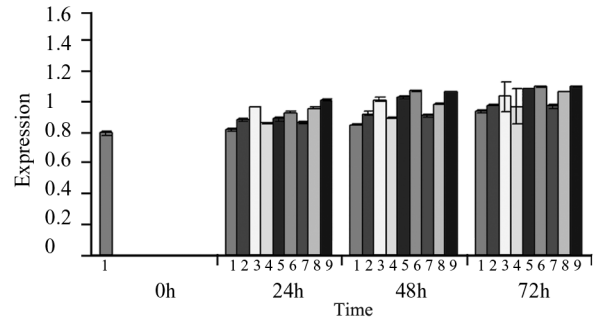
2.1 SHP-1基因在U937细胞中的表达

单独应用As₂O₃和5-aza-CdR以及两药合用时,随着药物浓度的增加和作用时间的延长, SHP-1的表达水平升高,与未用药的对照组以及各组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。合用药均比单独用药时的表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图1,表1、2。

2.2 JAK3基因在U937细胞中的表达

2.2.1 单独应用As₂O₃时JAK3基因的表达变化

随着药物浓度的增加和作用时间的延长, JAK3的表达水平下降,与未用药的对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。除中浓度 (2.5 μmol/L) 时, 48与72 h差异无统计学意义 ($P = 0.111$) 外, 其余各浓度在各时段的表达变化经两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在三个时段 (24、48、72 h) 内低、中、高浓度间的表达变化经两两比较, 差异均有统计学意义



1:As₂O₃ low;2:As₂O₃ mid;3:As₂O₃ high;4:5-aza-CdR low;5:5-aza-CdR mid;6:5-aza-CdR high;7:As₂O₃ + 5-aza-CdR low;8:As₂O₃ + 5-aza-CdR mid;9:As₂O₃ + 5-aza-CdR high

图1 SHP-1基因在U937细胞中的表达

Figure1 SHP-1 mRNA expression in U937 cells

($P < 0.05$), 见图2、表3。

2.2.2 单独应用5-aza-CdR时JAK3基因的表达变化

随着药物浓度的增加和作用时间的延长, JAK3的表达水平下降,与未用药的对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。除低浓度 (0.5 μmol/L) 时, 空白组和24 h差异无统计学意义 ($P = 0.052$), 48和72 h差异无统计学意义 ($P = 0.235$); 中浓度 (1 μmol/L), 48和72 h差

表1 单用As₂O₃及联合用药处理后SHP-1基因在U937细胞中表达比较

Table1 Comparison of SHP-1 gene expression in U937 cells treated with As₂O₃ and the combination

Time	As ₂ O ₃				As ₂ O ₃ +5-aza-CdR			
	1 μmol/L	2.5 μmol/L	5 μmol/L	P	Low	Middle	High	P
0h	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	-	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	-
24h	0.8105±0.0079	0.8636±0.0091	0.8636±0.0091	<0.05	0.8636±0.0091*	0.8850±0.0146**	0.9280±0.0031 [☆]	<0.05
48h	0.8448±0.0071	0.9063±0.0072	0.9063±0.0072	<0.05	0.9063±0.0072*	1.0240±0.0074**	1.0681±0.0042 [☆]	<0.05
72h	0.9352±0.0072	0.9688±0.0139	0.9688±0.0139	<0.05	0.9688±0.0139*	1.0797±0.0025**	1.0939±0.0042 [☆]	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	

Notes: *: $P < 0.05$, compared with 1 μmol/L; **: $P < 0.05$, compared with 2.5 μmol/L; [☆]: $P < 0.05$, compared with 5 μmol/L; -: do not need to compare

表2 单用5-aza-CdR及联合用药处理后SHP-1基因在U937细胞中的表达比较

Table2 Comparison of SHP-1 gene expression in U937 cells treated with 5-aza-CdR and the combination

Time	5-aza-CdR				As ₂ O ₃ +5-aza-CdR			
	0.5 μmol/L	1 μmol/L	2 μmol/L	P	Low	Middle	High	P
0h	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	-	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	0.7923±0.0134	-
24h	0.8573±0.0051	0.8636±0.0091	0.8636±0.0091	<0.05	0.8636±0.0091*	0.8850±0.0146**	0.9280±0.0031 [☆]	<0.05
48h	0.8898±0.0026	0.9063±0.0072	0.9063±0.0072	<0.05	0.9063±0.0072*	1.0240±0.0074**	1.0681±0.0042 [☆]	<0.05
72h	0.9618±0.1137	0.9688±0.0139	0.9688±0.0139	<0.05	0.9688±0.0139*	1.0797±0.0025**	1.0939±0.0042 [☆]	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	

Notes: *: $P < 0.05$, compared with 0.5 μmol/L; **: $P < 0.05$, compared with 1 μmol/L; [☆]: $P < 0.05$, compared with 2 μmol/L; -: do not need to compare

表3 单用As₂O₃及联合用药处理后JAK3基因在U937细胞中的表达比较

Table3 Comparison of JAK3 gene expression in U937 cells treated with As₂O₃ and the combination

Time	As ₂ O ₃				As ₂ O ₃ +5-aza-CdR			
	1 μmol/L	2.5 μmol/L	5 μmol/L	P	Low	Middle	High	P
0h	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	-	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	-
24h	0.8680±0.0029	0.7815±0.0110	0.6956±0.0085	<0.05	0.7224±0.0064*	0.6988±0.0030**	0.6446±0.0080 [☆]	<0.05
48h	0.8077±0.0078	0.6838±0.0241	0.6591±0.0032	<0.05	0.7028±0.0052*	0.6799±0.0029**	0.5694±0.0061 [☆]	<0.05
72h	0.7012±0.0045	0.6629±0.0098 [#]	0.6158±0.0083	<0.05	0.6816±0.0088*	0.6561±0.0115**	0.5525±0.0089 [☆]	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	

Notes: *: $P < 0.05$, compared with 1 μmol/L; **: $P < 0.05$, compared with 2.5 μmol/L; [☆]: $P < 0.05$, compared with 5 μmol/L; [#]: $P < 0.05$, compared with 48 h; -: do not need to compare

异无统计学意义 ($P=0.120$) 外, 其余各浓度在各时段的表达变化经两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。在三个时段 (24、48、72 h) 内, 低、中、高浓度间的表达变化经两两比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见图2、表4。

2.2.3 联合应用5-aza-CdR和As₂O₃时JAK3基因的表达变化

随着药物浓度的增加和作用时间的延长, JAK3的表达水平下降, 与未用药的对照组以及各组之间两两比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 合用药均比单用药时的表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

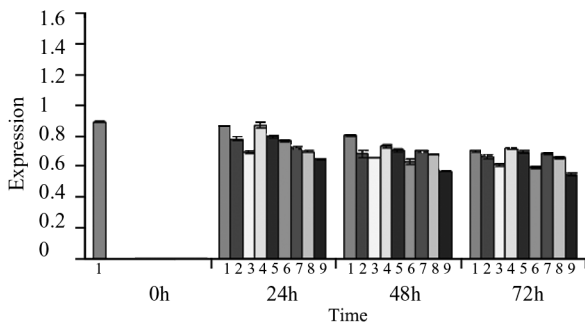
2.3 TYK2基因在U937细胞中的表达

单独应用As₂O₃和5-aza-CdR时以及两药合用时, 随着药物浓度的增加和作用时间的延长, TYK2的表达水平降低, 与未用药的对照

组, 以及各组间两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。合用药均比单独用药时的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图3, 表5、6。

2.4 SHP-1、JAK3、TYK2三者之间相关性

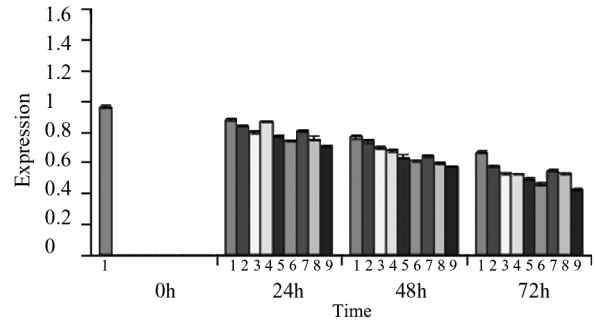
通过对As₂O₃和5-aza-CdR作用于U937细胞株后基因表达做直线回归分析后, 可以看出, 直线回归方程均有意义 ($P=0$), JAK3和TYK2的基因表达量同药物作用时间及浓度呈线性相关, 呈负相关, 随着作用时间的延长和药物浓度的增加, JAK3和TYK2的基因表达量下降(回归系数 $b<0$)。在三种浓度分别作用下, JAK3的下降程度均大于TYK2的下降程度 ($|b_{JAK3}| > |b_{TYK2}|$), 但在三个药物作用时间段中, 仅48 h时TYK2的下降程度大于JAK3的下降程度 ($|b_{TYK2}| > |b_{JAK3}|$), 见表7、8。



1:As₂O₃ low;2:As₂O₃ mid;3:3:As₂O₃ high;4:5-aza-CdR low;5:5-aza-CdR mid;6:5-aza-CdR high;7:As₂O₃ + 5-aza-CdR low;8:As₂O₃ + 5-aza-CdR mid;9:As₂O₃ + 5-aza-CdR high

图2 JAK3基因在U937细胞中的表达

Figure2 JAK3 mRNA expression in U937 cells



1:As₂O₃ low;2:As₂O₃ mid;3:3:As₂O₃ high;4:5-aza-CdR low;5:5-aza-CdR mid;6:5-aza-CdR high;7:As₂O₃ + 5-aza-CdR low;8:As₂O₃ + 5-aza-CdR mid;9:As₂O₃ + 5-aza-CdR high

图3 TYK2基因在U937细胞中的表达

Figure3 TYK2 mRNA expression in U937 cells

表4 单用5-aza-CdR及联合用药处理后JAK3基因在U937细胞中的表达

Table4 Comparison of JAK3 gene expression in U937 cells treated with 5-aza-CdR and the combination

Time	5-aza-CdR				As ₂ O ₃ +5-aza-CdR			
	0.5μmol/L	1μmol/L	2μmol/L	P	Low	Middle	High	P
0h	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	-	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	-
24h	0.8715±0.0173 [#]	0.7941±0.0084	0.7660±0.0083	<0.05	0.7224±0.0064 [*]	0.6988±0.0030 ^{**}	0.6446±0.0080 [☆]	<0.05
48h	0.7346±0.0091	0.7040±0.0051	0.6312±0.0151	<0.05	0.7028±0.0052 [*]	0.6799±0.0029 ^{**}	0.5694±0.0061 [☆]	<0.05
72h	0.7235±0.0066 [°]	0.6934±0.0103 ^{&}	0.5949±0.0068	<0.05	0.6816±0.0088 [*]	0.6561±0.0115 ^{**}	0.5525±0.0089 [☆]	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	

Notes: ^{*}: $P<0.05$, compared with 0.5 μmol/L; ^{**}: $P<0.05$, compared with 1 μmol/L; [☆]: $P<0.05$, compared with 2 μmol/L; [#]: $P<0.05$, compared with 0 h; [°]: $P<0.05$, compared with 48 h; [&]: $P<0.05$ compared with 48 h; - :do not need to compare

表5 单用As₂O₃及联合用药处理后TYK2基因在U937细胞中的表达

Table5 Comparison of TYK2 gene expressions in U937 cells after As₂O₃ alone and the combined treatment

Time	As ₂ O ₃				As ₂ O ₃ +5-aza-CdR			
	1μmol/L	2.5μmol/L	5μmol/L	P	Low	Middle	High	P
0h	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	-	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	0.8910±0.0043	-
24h	0.8778±0.0084	0.8348±0.0060	0.7937±0.0113	<0.05	0.8037±0.0070 [*]	0.7542±0.0113 ^{**}	0.7031±0.0096 [☆]	<0.05
48h	0.7639±0.0111	0.7379±0.0112	0.6936±0.0069	<0.05	0.6398±0.0056 [*]	0.5946±0.0063 ^{**}	0.5736±0.0059 [☆]	<0.05
72h	0.6661±0.0095	0.5772±0.0114	0.5264±0.0065	<0.05	0.5525±0.0090 [*]	0.5266±0.0042 ^{**}	0.4174±0.0078 [☆]	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	

Notes: ^{*}: $P<0.05$, compared with 1 μmol/L; ^{**}: $P<0.05$, compared with 2.5 μmol/L; [☆]: $P<0.05$, compared with 5 μmol/L; - :do not need to compare

表6 单用5-aza-CdR及联合用药处理后TYK2基因在U937细胞中的表达的比较

Table6 Comparison of TYK2 gene expressions in U937 cells treated with 5-aza-CdR alone and the combination

Time	5-aza-CdR				As ₂ O ₃ +5-aza-CdR			
	0.5μmol/L	1μmol/L	2μmol/L	P	Low	Middle	High	P
0h	0.9617±0.0094	0.9617±0.0094	0.9617±0.0094	-	0.9617±0.0094	0.9617±0.0094	0.9617±0.0094	-
24h	0.8643±0.0086	0.7675±0.0108	0.7377±0.0086	<0.05	0.8037±0.0070*	0.7542±0.0113*	0.7031±0.0096*	<0.05
48h	0.6742±0.0112	0.6325±0.0124	0.6124±0.0105	<0.05	0.6398±0.0056*	0.5946±0.0063*	0.5736±0.0059*	<0.05
72h	0.5319±0.0107	0.4943±0.0096	0.4573±0.0103	<0.05	0.5525±0.0090*	0.5266±0.0042*	0.4174±0.0078*	<0.05
P	<0.05	<0.05	<0.05	-	<0.05	<0.05	<0.05	-

Notes: *:*P*<0.05 compared with 0.5 μmol/L; *: *P*<0.05 compared with 1μmol/L; *: *P*<0.05 compared with 2 μmol/L

表7 相同浓度下TYK2, JAK3基因在U937细胞中的表达变化的回归系数比较

Table7 Comparison of regression coefficients of TYK2, JAK3 expression changes in U937 cells under the same concentration of drugs

Drugs	Concentration	JAK3		TYK2	
		b _{JAK3}	P	b _{TYK2}	P
As ₂ O ₃	1μmol/L	-279.503	0	-224.448	0
	2.5μmol/L	-333.025	0	-181.549	0
	5μmol/L	-581.273	0	-175.213	0
5-aza-CdR	0.5μmol/L	-256.072	0	-142.898	0
	1μmol/L	-386.160	0	-174.518	0
	2μmol/L	-249.087	0	-169.688	0
Combination	Low	-1053.198	0	-184.799	0
	Middle	-1010.949	0	-199.145	0
	High	-488.539	0	-167.026	0

Notes:b: regression coefficients;*P*<0.05 linear regression equation was established

表8 相同处理时间后TYK2, JAK3基因在U937细胞中的表达变化的回归系数比较

Table8 Comparison of regression coefficients of TYK2, JAK3 expression changes in U937 cells with the same treatment time

Drugs	Time	JAK3		TYK2	
		b _{JAK3}	P	b _{TYK2}	P
As ₂ O ₃	24h	-11.497	0	-22.769	0
	48h	-11.335	0	-25.803	0
	72h	-22.560	0	-13.729	0
5-aza-CdR	24h	-16.858	0	-14.174	0
	48h	-17.627	0	-27.509	0
	72h	-14.009	0	-24.934	0
Combination	24h	-23.891	0	-19.205	0
	48h	-13.044	0	-28.075	0
	72h	-13.525	0	-13.008	0

Notes:b:regression coefficients;*P*<0.05:linear regression equation was established

3 讨论

基因启动子区域CpG岛的高度甲基化是白血病 (leukemia) 等血液系统恶性肿瘤的一种发病机制, 大概有90%的血液系统恶性肿瘤都会至少有一个基因高度甲基化。DNA高度甲基化成为髓系白血病的重要致病机制^[4]。SHP-1主要表达于造血细胞, 被称为造血细胞磷酸酶 (hematopoietic cell phosphatase, HCP), 在信号转导中主要起负调控作用, 抑制细胞增殖^[5]与肿瘤的形成及生长呈负相关。韩颖等^[6]研究发现, SHP-1的低表达或不表达与AL的发病密切相关。JAK^[7]是一种蛋白酪氨酸激酶 (PTK), 迄今为止共发现4种家族成员: JAK1、JAK2、JAK3和TYK2。除了JAK3外, 其余3种成员广泛分布于多种组织细胞中。而JAK3却仅局限于白细胞中, 在活化的T细胞、B细胞和单核细胞中有高水平的表达^[8]。SHP-1主要通过去除JAKs蛋白磷酸化对JAKs进行调解, 也可加速JAKs蛋白的降解而下调JAK/STAT途径^[9]。

5-aza-CdR是一种甲基化抑制剂, 苏庸春等^[10]研究发现5-aza-CdR作用于肿瘤细胞的主要机制是通过其去甲基化作用, 重新激活了那些由于DNA过度甲基化而受到抑制的抑癌基因或多种细胞调控

基因, 从而使细胞向终末分化、凋亡或衰老, 并促进细胞凋亡、抑制细胞增殖。As₂O₃主要用于急性早幼粒细胞白血病 (APL)、骨髓增生异常综合征等恶性血液病的诱导分化治疗, 取得较好疗效。沈松菲等^[11]研究发现As₂O₃可诱导Jurkat细胞中异常甲基化的hdpr1基因去甲基化并使其恢复表达。

本实验采用实时定量PCR技术, 检测到白血病细胞株U937中SHP-1基因低表达, JAK3、TYK2高表达。在应用了甲基化抑制剂5-aza-CdR与As₂O₃后, U937细胞的增殖受到不同程度的抑制, 有剂量和时间依赖性。单独应用这两种药物后, 都可以使原来低表达的SHP-1表达升高, 并且随着药物浓度的增高和作用时间的延长其表达量也增加, 而JAK3、TYK2基因表达也随之下降, 说明基因的表达水平与药物的作用时间和浓度有关。联合应用这两种药物, 发现SHP-1基因表达水平的升高和JAK3、TYK2基因表达水平的下降幅度, 比单独应用时更为显著。杨琳等^[12]通过对63例成人急性髓系白血病患者的SHP-1及JAKs基因表达研究发现, 在mRNA水平, SHP-1表达与JAK1、JAK3呈负相关。故推测, SHP-1基因的重新表达与它发生去甲基化有关系, 对JAK/STAT通路发挥

了的负调控作用,使JAK3、TYK2基因的表达水平下降。较长的作用时间,较高的药物浓度以及两种药物联合后均可以加强其去甲基化的作用。在JAK/STAT通路中,可能适合的浓度更能加强SHP-1对JAK3的负调控作用。

综上所述,异常激活JAK/STAT信号转导通路,可导致白血病的发生。JAK3、TYK2基因的表达上调,可以正性激活JAK/STAT信号转导通路。JAK3、TYK2、SHP-1都参与了白血病的发病。SHP-1在白血病的发病中起着负性调节作用。JAK3、TYK2在白血病的发病中起着正性调节作用,它的高表达促进白血病的发生。As₂O₃和5-aza-CdR对U937细胞株中抑癌基因的去甲基化作用为我们提供了用去甲基化药物治疗肿瘤的一种新思路。同时,SHP-1基因的重新表达、JAK3、TYK2的降低表达,进一步说明了SHP-1在白血病中发挥着重要的负调节功能。

参考文献:

[1] Witkiewicz A, Raghunath P, Wasik A, *et al.* Loss of SHP-1 tyrosine phosphatase expression correlates with the advanced stages of cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Ham Pathol*,2007,38(3):462-7.

[2] Luo JM, Li Y, Yang L, *et al.* Effect of a methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine on SHP-1 gene expression, proliferation and apoptosis in K562 cells[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*,2009,17(2):309-14. [罗建民,李燕,杨琳,等.甲基化抑制剂5-aza-2'-deoxycytidine对K562细胞SHP-1基因表达及细胞增殖与凋亡的影响[J]. *中国实验血液学杂志*,2009,17(2):309-14.]

[3] Ma ZJ, Zhang WJ, Zhao PR, *et al.* Demethylation of estrogen receptor- α in breast cancer cells MDA-MB-231 after treated by arsenic trioxide[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*,2011,38(7):749-51. [马志俊,张伟杰,赵培荣,等.三氧化二砷对乳腺癌细胞MDA-MB-231雌激素受体 α 的去甲基化作用[J]. *肿瘤防治研究*,2011,38(7):749-51.]

[4] Leo E, Mancini M, Aluigi M, *et al.* DNA hypermethylation

promotes the low expression of pro-apoptotic BCL2L1 associated with BCR-ABL1 fusion gene of chronic myeloid leukaemia[J]. *Br J Haematol*,2012,159(3):373-6.

[5] Mauldin IS, Tung KS, Lorenz UM. The tyrosine phosphatase SHP-1 dampens murine Th17 development[J]. *Blood*,2012,119(19):4419-29.

[6] Han Y, Luo JM, Jia XH, *et al.* Expression and clinical value of SHP-1 and c-kit in acute leukemia[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2006,14(5):867-71. [韩颖,罗建民,贾晓辉,等.急性白血病患者SHP-1与c-kit基因表达及临床意义[J]. *中国实验血液学杂志*,2006,14(5):867-71.]

[7] Stark GR, Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway at twenty[J]. *Immunity*,2012,36(4):503-14.

[8] Jaime-Figueroa S, De Vicente J, Hermann J, *et al.* Discovery of a series of novel 5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazine-2-phenyl ethers, as potent JAK3 kinase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2013,23(9):2522-6.

[9] Alicea-Velázquez NL, Jakoncic J, Boggon TJ. Structure-guided studies of the SHP-1/JAK1 interaction provide new insights into phosphatase catalytic domain substrate recognition[J]. *J Struct Biol*,2013,181(3):243-51.

[10] Su YC, Xu HZ, Yu J, *et al.* Effects of 5-azacytidine on methylation state of P16, DAPK and MGMT genes in HL60 cells[J]. *Chongqin Yi Ke Da Xue Xue Bao*,2012,37(10):864-7. [苏庸春,徐红珍,于洁,等.5-氮杂胞苷对HL60细胞P16、DAPK及MGMT基因甲基化状态影响[J]. *重庆医科大学学报*,2012,37(10):864-7.]

[11] Shen SF, Shen JZ, Fu HY, *et al.* Mechanism of As₂O₃ on hdpr1 gene demethylation in Jurkat cell line[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*,2010,18(6):1484-8. [沈松菲,沈建箴,付海英,等. As₂O₃对Jurkat细胞株hdpr1基因去甲基化作用机制的研究[J]. *中国实验血液学杂志*,2010,18(6):1484-8.]

[12] Yang L, Luo JM, Wen SP, *et al.* Expressions of SHP-1 and JAKs genes in AML patients and their correlation[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*,2009,36(12):1031-4. [杨琳,罗建民,温树鹏,等. 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[J]. *肿瘤防治研究*,2009,36(12):1031-4.]

[编辑: 黄园玲; 校对: 刘红武]