

· 论 著 ·

氟尿嘧啶对结直肠癌 RKO 细胞 SHP2 基因表达的影响

王 洁¹, 黄 岩¹, 张 川², 马兴元², 常文军³, 陆一鸣¹ (1. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433; 2. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237; 3. 第二军医大学热带医学与公共卫生学系环境卫生教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探究氟尿嘧啶(5-FU)对结直肠癌 RKO 细胞 SHP2 基因表达的影响。**方法** 培养对数生长期的人结直肠癌细胞 RKO, 5-FU 处理 48 h 后, 采用免疫荧光和 Western 免疫印迹观察 SHP2 的蛋白表达水平; 将能够特异性抑制 SHP2 表达的 siRNA (siSHP2) 转染 RKO 细胞, 5-FU 处理 48 h, CCK8 测定细胞吸光度(A)值, 流式检测细胞凋亡, 观察 RKO 对 5-FU 的敏感性变化及 5-FU 诱导细胞凋亡的影响。**结果** 结直肠癌细胞 RKO 在 5-FU 处理 48 h 后, 其细胞核中 SHP2 的蛋白表达水平明显增高; siSHP2 转染后, RKO 细胞对 5-FU 的敏感性降低, 且降低了 5-FU 诱导的细胞凋亡率。**结论** 5-FU 可能通过影响 SHP2 的表达, 促进 RKO 细胞的凋亡, 发挥抑癌作用。

[关键词] 氟尿嘧啶; 蛋白酪氨酸磷酸酶; 结直肠癌; 免疫荧光

[中图分类号] R735.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)06-0512-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.008

Effect of 5-FU on the expression of SHP2 gene in colorectal cancer cells RKO

WANG Jie¹, HUANG Yan¹, ZHANG Chuan², MA Xingyuan², CHANG Wenjun³, LU Yiming¹ (1. Department of Biochemistry Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. College of Biological Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Department of Environmental Hygiene, School of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of 5-FU on the expression of SHP2 gene in colorectal cancer cells RKO. **Methods** The human colorectal cancer cell line RKO of logarithmic growth phase was cultured 48 h with 5-FU. The expression of SHP2 was observed by immunofluorescence and Western blotting; siSHP2 which specifically inhibits the expression of SHP2 was transfected into RKO cells and cultured 48 h with 5-FU. The cell absorbance (A) values were measured with CCK8 and apoptosis was determined by flow cytometry. The sensitivity of RKO to 5-FU and the effect of 5-FU on apoptosis of RKO cells were observed. **Results** The expression of nuclear protein of SHP2 was improved remarkably after colorectal cancer cell RKO was cultured 48 h with 5-FU. The sensitivity of RKO cells to 5-FU and the cell apoptosis rate induced by 5-FU were decreased after siSHP2 transfection. **Conclusion** 5-FU exerts anti-cancer activity possibly due to its promoting the apoptosis of RKO cells by influencing the expression of SHP2.

[Key words] 5-FU; SHP2; colorectal cancer cells; immunofluorescence

氟尿嘧啶(5-FU)是目前临床上应用最广的抗嘧啶类药物,对消化道癌及其他实体瘤有良好疗效,其在抑制 DNA 合成的同时会调控某些蛋白的表达从而发挥抑癌作用。蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP2, SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2)是一种由 PTPN11 基因编码的酪氨酸磷酸酶,包含 2 个 SH2 结构域(N-SH2 和 C-SH2)、1 个酪氨酸磷酸酶结构域和 2 个 C 端酪氨酸残基(Y542 和 Y580)^[1]。SHP2 能够参与不同的信号通路,调节细胞的生长、存活、迁移和分化^[2],其功能异常与多种恶性肿瘤的发生发展相关。已有研究^[3]表明 SHP2 高表达的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者其复发和转移显著减少,与预后良好有关,而 SHP2 低表达与 CRC 的晚期疾病、复发转移及术后死亡等临床特征相关,提示 SHP2 在 CRC 恶性表型的形成中可能发挥着肿瘤抑制基因的功能。且已有研究^[3]表明在 CRC 样本中,SH2 阳性样本中 80% 以上的 SHP2 都定位于细胞核,明显不同于 SHP2

tase-2)是一种由 PTPN11 基因编码的酪氨酸磷酸酶,包含 2 个 SH2 结构域(N-SH2 和 C-SH2)、1 个酪氨酸磷酸酶结构域和 2 个 C 端酪氨酸残基(Y542 和 Y580)^[1]。SHP2 能够参与不同的信号通路,调节细胞的生长、存活、迁移和分化^[2],其功能异常与多种恶性肿瘤的发生发展相关。已有研究^[3]表明 SHP2 高表达的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者其复发和转移显著减少,与预后良好有关,而 SHP2 低表达与 CRC 的晚期疾病、复发转移及术后死亡等临床特征相关,提示 SHP2 在 CRC 恶性表型的形成中可能发挥着肿瘤抑制基因的功能。且已有研究^[3]表明在 CRC 样本中,SH2 阳性样本中 80% 以上的 SHP2 都定位于细胞核,明显不同于 SHP2

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30500093, 81274162); 国家科技部“重大新药创制”专项(2009ZX09103-690); 上海市科委生物医药领域科技支撑项目(16431904400); 上海市教委科研创新项目(14ZZ077)

[作者简介] 王 洁, 硕士研究生, Email: wj890801@126.com

[通讯作者] 陆一鸣, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 肽类药物, Email: bluesluyi@sina.com

在肝癌组织中的细胞定位,因此,提示其肿瘤抑制机制存在组织、器官特异性差异。本研究通过观察发现 5-FU 在发挥抗癌作用的同时,能够调控 SHP2 基因的表达,即 5-FU 可能通过影响 SHP2 的表达发挥抑癌作用,为进一步探讨 SHP2 在结直肠癌中的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 结直肠癌细胞 RKO (美国模式培养物集存库, American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 主要试剂与仪器 5-FU (批号:MBI273,大连美仑生物技术有限公司),质量标准 $>98\%$,用 DMSO 配置成 100 mmol/L 储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放,实验时加培养基稀释到所需浓度;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素和胰蛋白酶(HYCLONE 公司);4% 多聚甲醛、曲拉通 X-100(Triton-X-100)、荧光封片剂(mounting solution)、荧光染料 4,6-联脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(Sigma 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、5 \times 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术有限公司);SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒;蛋白 Marker 及兔抗人 GAPDH、TBP 单克隆抗体(批号:sc-25778)、兔抗人 SHP2 单克隆抗体(批号:sc-482),均购自 Santa Cruz 公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);Dye800 标记羊抗兔二抗和 Odyssey 红外激光成像系统(美国 LICOR 公司)。

1.2 方法

1.2.1 5-FU 处理后用免疫荧光观察 SHP2 的表达情况 结直肠癌细胞 RKO 接种于含有玻片的 6 孔板中培养,加入 5-FU 干预处理 48 h。4% 的多聚甲醛固定 30 min,0.3% Triton-X-100 处理 5 min,PBS 清洗,5% 的马血清封闭 2 h,加入 SHP2 一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h。DAPI 染色,封片,显微镜下观察 SHP2 的表达情况。

1.2.2 5-FU 处理后用 Western 印迹法检测 SHP2 蛋白表达情况 结直肠癌细胞 RKO 接种于细胞培养皿中,分为阴性对照组(negative control, NC)和 5-FU 处理组,5-FU 处理 48 h 后,吸弃细胞中的培养基,PBS 洗 2 次,胰酶消化,培养基终止消化,离心,收集细胞。运用核质分离试剂盒提取核蛋白和质蛋白。利用蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,之后向样品中加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,沸水浴 10 min,每孔加入等量蛋白,在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行

电泳,转膜,5% 的脱脂奶粉封闭,SHP2 一抗(1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。Odyssey 红外激光成像系统成像显影。以 TBP、GAPDH 为内参,观察 SHP2 的核质表达情况。

1.2.3 siSHP2 后观察 RKO 对 5-FU 的敏感性变化 按照 siRNA 干扰试剂盒说明书的要求进行转染。在转染前,RKO 细胞接种于 12 孔板,培养 24 h,将含有 siSHP2 的转染试剂与细胞共孵育 24 h,细胞消化、计数、分入 96 孔板,培养 24 h。细胞贴壁后各组加入不同浓度的 5-FU,即 0、12.5、25、50、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$,每个浓度设置 4 个副孔,培养 48 h 后,CCK8 测定吸光度(A)值,计算半数抑制浓度 IC_{50} ,实验重复 3 次。

1.2.4 siSHP2 后用流式细胞仪检测 5-FU 对细胞凋亡的影响 用 siSHP2 提前处理 RKO 24 h,5-FU 处理 48 h,细胞消化,离心后弃去培养基并用预冷的 PBS 洗 2 次,向细胞中加入预混包含 AnnexinV-FITC 的缓冲液,室温孵育 10 min,加入荧光染料碘化丙啶(propidium iodide, PI),流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 统计学分析 计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 17.0 统计软件,采用 one-way ANOVA 统计学方法,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 5-FU 能够影响 RKO 细胞 SHP2 的表达 如图 1A 所示,5-FU 处理细胞 48 h 后,免疫荧光观察 SHP2 表达情况,结果表明:SHP2 的核内表达明显增加;Western 结果表明:5-FU 处理 RKO 细胞后,细胞质 SHP2 表达减少,细胞核 SHP2 表达增加(图 1B、图 1C),即 5-FU 能够影响 SHP2 基因的表达。

2.2 siSHP2 处理后会影响 RKO 细胞对 5-FU 的敏感性 siSHP2 后,不同浓度的 5-FU 处理 RKO 细胞,测定其 IC_{50} 值的变化情况。如图 2A 所示,siSHP2 后,能够促进细胞增殖,且 5-FU 处理后,NC 组 IC_{50} 为 $(42.76\pm 5.82)\mu\text{mol/L}$,siSHP2 组 IC_{50} 为 $(56.64\pm 7.96)\mu\text{mol/L}$,与 NC 组相比,siSHP2 组的 RKO 细胞 IC_{50} 显著提高($P<0.05$,图 2B),即 siSHP2 后,能够显著降低 RKO 细胞对化疗药物 5-FU 的敏感性。

2.3 siSHP2 处理后 5-FU 影响 RKO 细胞凋亡 用 siSHP2 处理 RKO 细胞后,5-FU 处理细胞 48 h,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,如图 3 所示,与 NC 组相比,siSHP2 后,5-FU 对细胞的凋亡率降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

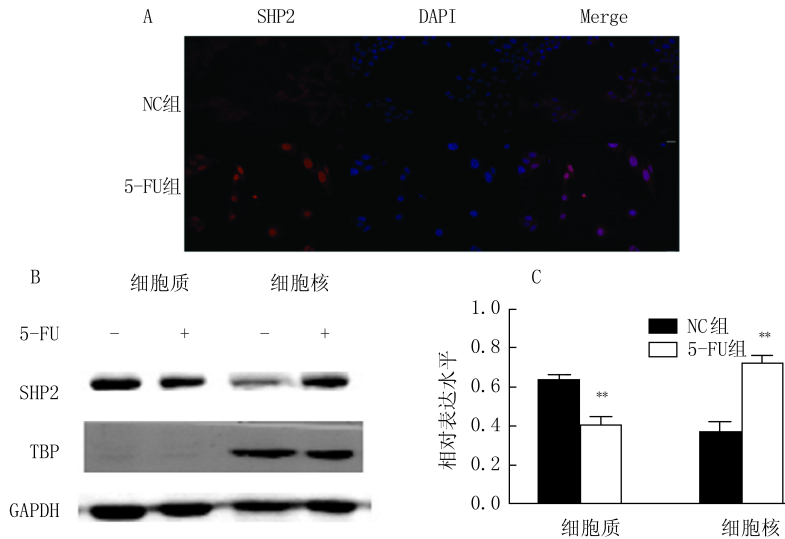


图1 5-FU对RKO细胞SHP2表达的影响

A.免疫荧光观察5-FU对RKO细胞SHP2表达的影响;B.Western观察5-FU对RKO细胞SHP2表达的影响;C.统计学分析结果; ** $P < 0.01$,与阴性对照(NC)组比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

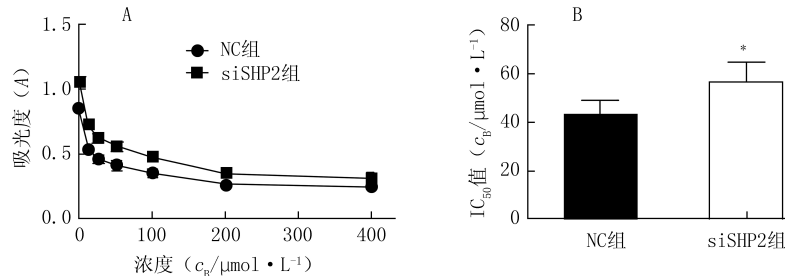


图2 siSHP2处理后,RKO细胞对5-FU敏感性的影响

A. siSHP2处理后,5-FU对RKO细胞A值的影响;B. siSHP2处理后,5-FU对RKO细胞IC₅₀值的影响; * $P < 0.05$,与阴性对照(NC)组比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

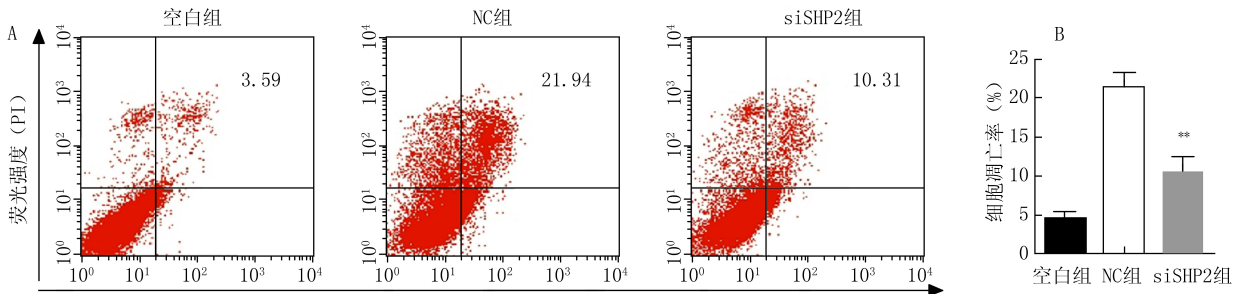


图3 siSHP2处理后,5-FU对RKO细胞凋亡的影响

A. siSHP2处理后,流式细胞仪检测5-FU对细胞凋亡的影响;B. siSHP2处理后,流式细胞仪检测5-FU对细胞凋亡的统计学分析结果; ** $P < 0.01$,与阴性对照(NC)组比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

SHP2是一种非受体型蛋白酪氨酸酶,其介导的信号通路与多种疾病及恶性肿瘤的发生发展有关。对SHP2的探究有助于对其作用机制的阐明及潜在药物靶点的发现^[4]。Tartaglia等^[5]发现在努南综合征患者中,有50%伴有PTPN11基因突变,

导致SHP2蛋白表达异常,过度激活RAS/ERK通路。近几年研究发现:PTPN11/SHP2与胃癌、乳腺癌、肺癌、甲状腺癌、黑色素瘤^[6-10]等多种癌症的发生发展均密切相关。其中,结直肠癌作为人类主要的恶性肿瘤之一,具有极高的发病率和病死率^[11],因此越来越受到研究者的重视。Chang等^[3]研究发现,SHP2在结直肠癌中的低表达与不良预后及高

病死率相关,提示 SHP2 在结直肠癌中发挥抑癌功能。同时已有多个研究表明,在结直肠癌中具有抗癌活性的化合物如非甾体抗炎药 5-氨基水杨酸、吲哚美辛以及 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)抑制剂葱贝素等能够通过提高 SHP2 磷酸酶的活性发挥抑癌功能^[12-14]。这些结果均表明 SHP2 在抑制结直肠癌中发挥重要作用。SHP2 可以表达于肿瘤上皮细胞的线粒体、胞核和胞浆等部位。胞浆 SHP2 的主要功能是激活 ERK/RAS 信号通路,调节 PI3K、JAK/STAT 等信号通路的传导^[15,16]。而胞核 SHP2 主要与 TRET 胞外转运^[17]、Src 激酶的激活^[18] 及 DNA 损伤后的细胞凋亡有关^[19]。

本研究发现,5-FU 处理 RKO 细胞后,能够提高 SHP2 蛋白在细胞核中的表达,siSHP2 后,能够显著降低 RKO 细胞对 5-FU 的敏感性且抑制 RKO 细胞凋亡,即 siSHP2 能够减弱 5-FU 发挥抑癌作用的能力。5-FU 可能通过影响 SHP2 的表达发挥抑癌作用,为进一步探讨 SHP2 在结直肠癌中的作用提供参考。

【参考文献】

- [1] Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, *et al.* Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2[J]. *Cell*, 1998, 92(4): 441-450.
- [2] Neel B G, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news; SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling[J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(6): 284-293.
- [3] Chang W, Gao X, Han Y, *et al.* Gene expression profiling-derived immunohistochemistry signature with high prognostic value in colorectal carcinoma[J]. *Gut*, 2014, 63(9): 1457-1467.
- [4] 罗 虎,周向东. SHP2 及其在乳腺癌发生发展中的作用[J]. *生命的化学*, 2010,30(6): 833-837.
- [5] Tartaglia M, Mehle E L, Goldberg R, *et al.* Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(4): 465-468.
- [6] Higuchi M, Tsutsumi R, Higashi H, *et al.* Conditional gene silencing utilizing the lac repressor reveals a role of SHP-2 in cagA-positive *Helicobacter pylori* pathogenicity[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(5): 442-447.
- [7] Zhou X, Coad J, Ducatman B, *et al.* SHP2 is up-regulated in breast cancer cells and in infiltrating ductal carcinoma of the breast, implying its involvement in breast oncogenesis [J]. *Histopathology*, 2008, 53(4): 389-402.
- [8] 唐春兰,周向东,杨和平等. SHP2 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(2): 98-101.
- [9] Martinelli S, Carta C, Flex E, *et al.* Activating PTPN11 mutations play a minor role in pediatric and adult solid tumors [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 166(2): 124-129.
- [10] Bentes-Alj M, Paez JG, David FS, *et al.* Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8816-8820.
- [11] Sartore-Bianchi A, Siena S. Plasticity of resistance and sensitivity to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, DOI:10.1007/164_2017_19.
- [12] Monteleone G, Franchi L, Fina D, *et al.* Silencing of SH-PTP2 defines a crucial role in the inactivation of epidermal growth factor receptor by 5-aminosalicylic acid in colon cancer cells[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(2): 202-211.
- [13] Dai Y, Jiao H, Teng G, *et al.* Embelin reduces colitis-associated tumorigenesis through limiting IL-6/STAT3 signaling [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(5): 1206-1216.
- [14] Chu EC, Chai J, Tarnawski AS. NSAIDs activate PTEN and other phosphatases in human colon cancer cells; novel mechanism for chemopreventive action of NSAIDs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3): 875-879.
- [15] Östman A, Hellberg C, Böhmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 307-320.
- [16] Li S, Hsu DD, Wang H, *et al.* Dual faces of SH2-containing protein-tyrosine phosphatase Shp2/PTPN11 in tumorigenesis [J]. *Front Med*, 2012, 6(3): 275-279.
- [17] Jakob S, Schroeder P, Lukosz M, *et al.* Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33155-33161.
- [18] Ran H, Kong S, Zhang S, *et al.* Nuclear Shp2 directs normal embryo implantation via facilitating the ER α tyrosine phosphorylation by the Src kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(18): 4816-4821.
- [19] Yuan L, Yu WM, Yuan Z, *et al.* Role of SHP-2 tyrosine phosphatase in the DNA damage-induced cell death response [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17): 15208-15216.

【收稿日期】 2017-06-19 【修回日期】 2017-07-10

【本文编辑】 李睿旻