

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.004

· 基础研究 ·

SHIP1 基因过表达非小细胞肺癌细胞系的建立及其对细胞增殖能力的影响

陶星宇^{1,2}, 付桥粉², 王莹², 宋鑫^{1,2} (1. 南方医科大学 基础医学院 肿瘤研究所, 广东 广州 510515; 2. 昆明医科大学 第三附属医院暨云南省肿瘤医院 肿瘤生物治疗中心, 云南 昆明 650118)

[摘要] **目的:** 观察 *SHIP1* 对 NSCLC 细胞增殖的影响。**方法:** 由 NCBI Gene 数据库查询获得人 *SHIP1* 基因 CDS 区, 插至载体 pTSB-CMV-MCS-SBP-3Flag-EGFP, 构建 *SHIP1* 真核过表达质粒; 进一步利用其构建 *SHIP1* 过表达慢病毒。用该慢病毒感染 A549、SPCA-1 和 PC-9 细胞株, 获得 *SHIP1* 稳定过表达 NSCLC 细胞系。Western blotting 和 qRT-PCR 分别从蛋白水平和 mRNA 水平检测 *SHIP1* 的表达变化。采用 MTT 法和克隆形成实验检测过表达 *SHIP1* 的 PC-9 细胞增殖活力和克隆形成能力。Western blotting 检测 AP-1 蛋白复合体各组分的表达。**结果:** *SHIP1* 真核过表达质粒经测序证实构建成功。稳定过表达 *SHIP1* 的 A549、SPCA-1 和 PC-9 细胞, 在荧光显微镜下可见均一表达绿色荧光。与阴性对照组比较, 细胞中 *SHIP1* 在 mRNA ($P < 0.01$) 及蛋白水平均明显升高。在 PC-9 细胞中, 过表达 *SHIP1* 使细胞增殖、克隆形成能力降低 (均 $P < 0.01$), p-c-Jun、FosB 等表达降低。**结论:** 成功构建了稳定过表达 *SHIP1* 的 A549、SPCA-1 和 PC-9 细胞模型; 过表达 *SHIP1* 可通过抑制 AP-1 家族蛋白抑制 NSCLC 细胞增殖能力。

[关键词] 多磷酸肌醇-5-磷酸酶; 非小细胞肺癌; 基因重组; 稳定过表达; 细胞增殖
[中图分类号] R734.2; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)07-0680-07

Construction of *SHIP1* overexpressed NSCLC cell line and the effect of *SHIP1* on NSCLC cell proliferation

TAO Xingyu^{1,2}, FU Qiaofen², WANG Ying², SONG Xin^{1,2} (1. Cancer Research Institute, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 2. Department of Cancer Biotherapy Center, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University and Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of *SHIP1* on NSCLC cell proliferation. **Methods:** The CDS region of human *SHIP1* gene was obtained by inquiring NCBI Gene database and was inserted into the vector pTSB-CMV-MCS-SBP-3Flag-EGFP to construct *SHIP1* over-expression plasmid, which was further used to construct *SHIP1* overexpression lentivirus. *SHIP1* over-expressed lentiviruses were used to transfect A549, SPCA-1 and PC-9 cell lines to construct *SHIP1* overexpressed NSCLC cell line. Western blotting and qRT-PCR were used to determine the protein and mRNA expression of *SHIP1*. The MTT assay and Clone formation assay were used to examine the cell proliferation ability and clone formation ability of PC-9 cells overexpressed *SHIP1*; Western blotting was performed to examine the level of AP-1 proteins. **Results:** The sequencing result suggested that the *SHIP1* eukaryotic over-expression plasmid was successfully constructed. A519, SPCA-1 and PC-9 cells with *SHIP1* over-expression were observed to display uniform green fluorescence under fluorescent microscopy. Compared with negative control group, the mRNA and protein levels of *SHIP1* were significantly increased in *SHIP1* overexpressed cells (all $P < 0.01$). The over-expression of *SHIP1* suppressed the abilities of proliferation and clone formation in PC-9 cells (all $P < 0.01$), and down-regulated the expression of p-c-Jun and FosB etc. **Conclusion:** The *SHIP1* overexpressed NSCLC cell lines were successfully established, and the over-expression of *SHIP1* suppressed the cell proliferation ability by inhibiting AP-1 proteins in NSCLC cell lines.

[Key words] *SHIP1*; non-small cell lung cancer; gene recombination; stable overexpression; cell proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 680-686. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.004]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (U1502222, No.81702295); 云南省卫生科技计划资助项目 (No.2017NS177, No.2016NS113); 云南省科技计划资助项目 (No.2014FB064); 中国博士后科学基金资助项目 (No.2017M613008)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (U1502222, No.81702295), the Project of Health Science and Technology of Yunnan Province (No.2017NS177, No.2016NS113), the Project of Science and Technology of Yunnan Province (No.2014FB064), and the China Postdoctoral Science Foundation (No.2017M613008)

[作者简介] 陶星宇 (1991-), 男, 硕士生, 住院医师, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: 15198924758@126.com

[通信作者] 宋鑫 (SONG Xin, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: songxin68@126.com

肺癌是一种起源于肺支气管上皮的恶性肿瘤。在我国肺癌一直高居恶性肿瘤发病率和病死率的榜首^[1],其中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是其主要病理类型^[2],其起病隐匿,确诊时大多已属晚期,治疗手段有限,预后极差^[3-5]。因此,研究NSCLC的发病机制和寻找可能的治疗靶点对其治疗意义重大。

SHIP1(INPP5D)基因位于2号染色体上,编码区长3 570 bp,其编码蛋白SHIP1是多磷酸肌醇-5-磷酸酶家族一员,约145 kD,主要表达于造血细胞,可通过水解3,4,5三磷酸肌醇和1,3,4,5四磷酸肌醇的5'端磷酸负向调节PI3K/AKT信号通路,从而影响细胞生长、增殖、分化、代谢和转移等过程^[6-8]。近年来大量的研究表明,*SHIP1*的异常表达与活性异常与多种疾病的发生有关^[9],尤其是造血系统的肿瘤。*SHIP1*在急慢性髓系白血病中可能发挥抑癌基因作用^[10-14],而且*SHIP1*活性降低可能是其增殖失控的先决条件^[15-16]。然而,在多发骨髓瘤中,*SHIP1*则是作为癌基因发挥促进增殖和抑制凋亡作用^[17]。其次,在弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中,恢复*SHIP1*活性后细胞增殖受到显著抑制,并且*SHIP1*低表达与DLBCL不良预后密切相关^[18]。在部分实体肿瘤(如下咽鳞癌)中,*SHIP1*呈低表达状态,其异常表达导致了肿瘤的增殖与去分化,这一功能可能与其启动子区高甲基化有关^[19]。目前有关*SHIP1*在肿瘤中的研究主要集中于血液系统,其在实体肿瘤中的研究罕见,特别是其在NSCLC中的研究尚未见报道。

基因克隆重组技术是近年来发展起来的一种特异性抑制/过表达基因的方法。通过将目的基因的编码区(CDS区)序列插入载体质粒,转染至靶细胞可导致目的基因表达增加,是目前用于研究抑癌基因功能及机制的主要方法。过表达质粒构建难易程度部分取决于目的基因CDS区长度。*SHIP1*基因CDS区长3 570 bp,构建其真核重组过表达质粒存在难度,这在一定程度上制约着*SHIP1*基因功能及机制的研究。

本研究利用基因克隆重组技术成功构建了人*SHIP1*基因真核过表达质粒,并将该质粒成功包装为慢病毒,用其感染人NSCLC细胞,成功构建了稳定过表达*SHIP1*基因的NSCLC细胞系,并发现*SHIP1*可通过抑制AP-1家族蛋白抑制NSCLC细胞增殖,提示*SHIP1*可能作为NSCLC治疗候选靶基因。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

NSCLC细胞株A549和PC-9购于ATCC细胞库,

SPCA-1购于中国科学院上海细胞库。RMPI 1640培养基及含0.25%EDTA的胰酶购于Gibco公司,胎牛血清购自BIOSUN公司,高效RIPA细胞裂解液购于Solarbio公司;Anti-*SHIP1*、 β -actin、 α -Tubulin与HRP标记的羊抗兔IgG及羊抗鼠IgG均购于Proteintech公司,p-JunB、c-Jun、p-c-Jun、JunD、p-JunD、FosB抗体均购于Abcam公司,真核细胞转染试剂Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司,pTSB-CMV-MCS-SBP-3Flag-EGFP质粒购自上海权阳生物科技有限公司,Xba I、BamH I限制性核酸内切酶及PrimeScript™逆转录试剂盒和SYBR®Premix Ex Taq™II实时荧光定量PCR检测试剂盒均购于TaKaRa公司,快速质粒小提试剂盒购自TIANGEN公司,T4 DNA连接酶购于BioLabs公司,测序由Invitrogen公司完成。

1.2 *SHIP1* 基因重组过表达质粒的构建

登录NCBI Gene数据库,查询获得人*SHIP1*基因CDS区序列(NM_001017915.2),利用Primer-BLAST设计引物。为满足后续基因克隆要求,根据载体质粒和*SHIP1*基因CDS区序列,在上游引物末端加入XbaI限制性内切酶序列(下划线所示),在下游引物末端去除终止密码子并加入BamH I内切酶序列(下划线所示)。*SHIP1* CDS区上游引物为5'-CTC-TAGAGCCACCATGGTCCCCTGCT-3',下游为5'-CGGATCCCTGCATGGCAGTCCTGCCTA-3'。

引物经化学合成后,以细胞cDNA为模板,用PrimeSTAR HS DNA Polymerase体系进行PCR反应扩增目的产物,PCR反应条件:预变性98℃、2 min,变性98℃、10 s,退火64℃、20 s,延伸72℃、3.5 min,共35个循环,72℃再延伸10 min。扩增产物经胶回收纯化后进行XbaI、BamHI双酶切。利用T4连接酶将双酶切后的PCR产物与含有黏性末端的载体质粒pTSB-CMV-MCS-SBP-3Flag-EGFP进行连接。连接产物转化DH5 α 大肠杆菌,过夜后挑选抗氨苄青霉素克隆进行菌液PCR,菌液PCR含目标片段的单克隆菌落送Invitrogen公司测序鉴定。

1.3 过表达*SHIP1* 基因慢病毒包装及滴度检测

将目的质粒/载体质粒20 μ g、PMD2.G载体10 μ g、psPAX2载体5 μ g与500 μ l Opti-MEM培养基混匀,室温孵育5 min后,再与Lipofectamine™2000混匀并稀释至1 ml,室温孵育20 min后,将混合液加入293T细胞培养液中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养,8 h后换新鲜培养基。48 h后收集293T细胞培养上清,4℃4 000 \times g离心10 min,收集上清并再次于4000 \times g离心15 min,收集病毒混悬液于-80℃保存。用慢病毒感染293T细胞,48 h后于荧光显微镜下观察,根据绿色荧光标记细胞数估算病毒滴度。

1.4 慢病毒转染 NSCLC 细胞

将对数生长期生长状态良好 NSCLC 细胞经胰酶消化后制成单细胞悬液, 取 1×10^4 个细胞接种于 24 孔板内, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养至细胞贴壁后, A549 细胞以复感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 值为 40、SPCA-1 细胞以 MOI 值为 100、PC-9 细胞以 MOI 值为 50, 每孔加入感染培养基 (基础培养基 + 5 mg/L polybrene) 和病毒共 500 μl , 感染 8 h 后换新鲜培养基, 72 h 后荧光镜观察 GFP 基因表达情况。扩大培养至 6 cm 皿后分别提取 RNA 和蛋白进行 SHIP1 过表达情况鉴定。

1.5 qRT-PCR 检测 SHIP1 mRNA 的表达

收集对照组和实验组细胞, TRIzol 提取细胞总 RNA, 利用 PrimeScriptTM 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 以此 cDNA 作为模板进行 qRT-PCR 检测。根据 SHIP1 CDS 区序列, 利用 Primer-BLAST 分别设计 SHIP1 及内参 ARF 基因的引物。SHIP1 mRNA 上游引物为 5' - TTTACGTGATCGGCACCCAA - 3', 下游为 5' - GTGGCTGTTGACGAACCCTA - 3', ARF 上游引物为 5' - ATCTGTTTCACAGTCTGGGACG - 3', 下游为 5' - CCTGCTTGTGGCAAATACC - 3'。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 20 s, 72°C 延伸 3.5 min, 共 40 个循环; 72°C 延伸 10 min。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值计算相对表达量。

1.6 Western blotting 检测 SHIP1 蛋白及相关蛋白的表达

将对照组和实验组细胞收集于 1.5 ml EP 管中, 每管加入适量 RIPA 细胞裂解液冰上裂解 15 min, BCA 法测定蛋白浓度, 于沸水中使蛋白变性 10 min, 上样量 50 $\mu\text{g}/\text{lane}$, 10% SDS-PAGE 凝胶跑胶, 360 mA 2 h 将蛋白转移至 0.22 μm PVDF (Immobilon[®]-pSQ) 膜上, 5% BSA 封闭 2~3 h, TBST 洗膜 3 次, 每次

5 min, 剪膜, 加入 TBST 稀释的一抗 (SHIP1 为 1:500; 其余抗体为 1:1 000), 4°C 摇床过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 室温摇床孵育 HRP 标记的 IgG 2 h 后, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。用 ECL 化学发光法检测蛋白表达情况。

1.7 MTT 法检测过表达 SHIP1 对 PC-9 细胞增殖的影响

将过表达 SHIP1 细胞和对照组细胞, 铺 96 孔板 (1 500 个细胞/孔), 每组设置 5 个复孔。8~10 h 细胞贴壁后, 按培养基: MTT=5:1 比例加入 MTT, 37°C 、5% CO_2 恒温孵育箱继续培养 2 h 后, 全波长扫描仪检测细胞活力, 并以 490 nm 处的光密度值 (D) 代表细胞增殖活力。

1.8 平板克隆形成实验检测过表达 SHIP1 对 PC-9 细胞克隆形成能力的影响

将过表达 SHIP1 细胞和对照组细胞用胰酶消化, 铺 6 孔板 (300 个细胞/孔), 轻轻晃匀, 每隔 2 d 观察 1 次细胞, 培养细胞 7~9 d, 待细胞团长至足够大但又未融合时, 弃培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 甲醇固定 15~30 min, 自然风干, Giemsa 染色 30 min, 自来水冲洗 3 遍, 自然风干。拍照计数克隆团。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 均值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SHIP1 mRNA 相对表达量、克隆形成数据采用独立样本 *t* 检验; MTT 结果数据采用析因设计的方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 SHIP1 基因 CDS 区序列的 PCR 扩增

以人 NSCLC 细胞株 SPCA-1 细胞 cDNA 为模板, PCR 扩增 SHIP1 基因 CDS 区序列, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示, 扩增产物长度大小与预期大小 3 570 bp 大小一致 (图 1)。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 Sequence of qPCR primers

Gene fragment		Sequence
SHIP1 CDS	Sense	5'-CTCTAGAGCCACCATGGTCCCCTGCT-3'
	Anti-sense	5'-CGGATCCCTGCATGGCAGTCCTGCCTA-3'
SHIP1 mRNA	Sense	5'-TTTACGTGATCGGCACCCAA-3'
	Anti-sense	5'-GTGGCTGTTGACGAACCCTA-3'
ARF	Sense	5'-ATCTGTTTCACAGTCTGGGACG-3'
	Anti-sense	5'-CCTGCTTGTGGCAAATACC-3'

2.2 人 SHIP1 重组质粒鉴定

将双酶切后的 SHIP1 CDS 区与含有黏性末端的载体质粒 pTSB-CMV-MCS-SBP-3Flag-EGFP 连接构

建 SHIP1 重组质粒。转化 DH5 α 大肠杆菌后挑选抗氨苄青霉素克隆进行菌液 PCR, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示, 1 号克隆产物大小与目标片段大小一

致(图2A),提示1号克隆含目的片段。提取1号克隆质粒测序鉴定(图2B),结果与NCBI Gene数据库人 *SHIP1* 基因CDS区序列(NM_001017915.2)比对完全一致,证明 *SHIP1* 重组质粒构建成功。

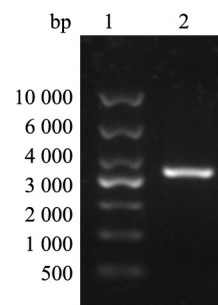
2.3 稳定转染 NSCLC 细胞系的建立

慢病毒转染 NSCLC 细胞 72 h 后,于倒置荧光显微镜下观察,结果发现转染 *SHIP1* 重组慢病毒和阴性对照慢病毒的 NSCLC 细胞均可见绿色荧光表达(图3),表明稳定转染 NSCLC 细胞系构建成功。

2.4 感染慢病毒的 NSCLC 细胞中 *SHIP1* mRNA 的表达

提取感染慢病毒后 NSCLC 细胞的 RNA, qRT-PCR 检测 *SHIP1* mRNA 的表达,结果(图4)显示,与阴性对照组比较,感染 *SHIP1* 重组慢病毒的 A549、

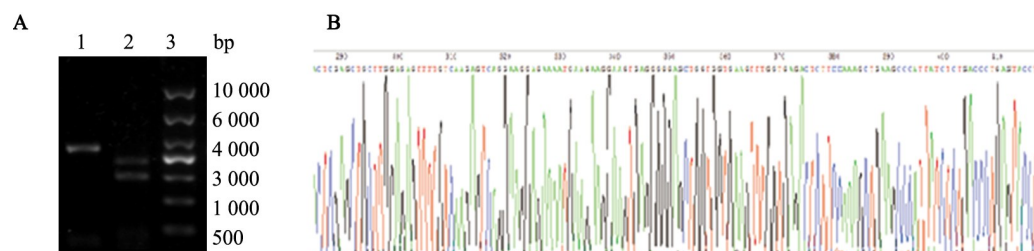
SPCA-1 和 PC-9 细胞中 *SHIP1* mRNA 水平均明显升高,提示构建的 *SHIP1* 重组质粒和慢病毒能稳定过表达 NSCLC 细胞中 *SHIP1*。



1:DNA marker; 2:SHIP1

图1 人 *SHIP1* 基因CDS区的PCR扩增

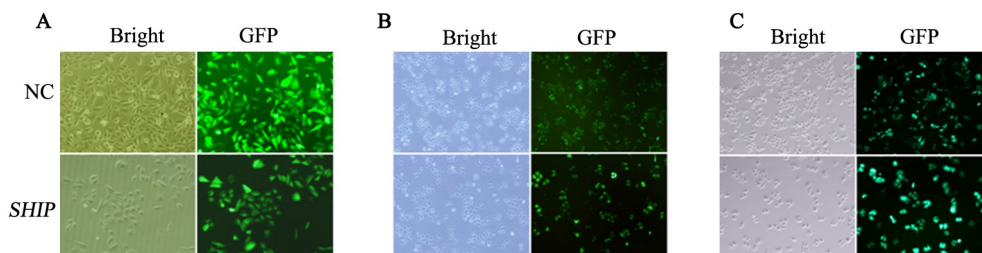
Fig.1 PCR amplification of CDS region of human *SHIP1* gene



1,2: Bacterial culture PCR result; 3:DNA marker

图2 菌液PCR扩增 *SHIP1* CDS区结果(A)及测序峰图(B)

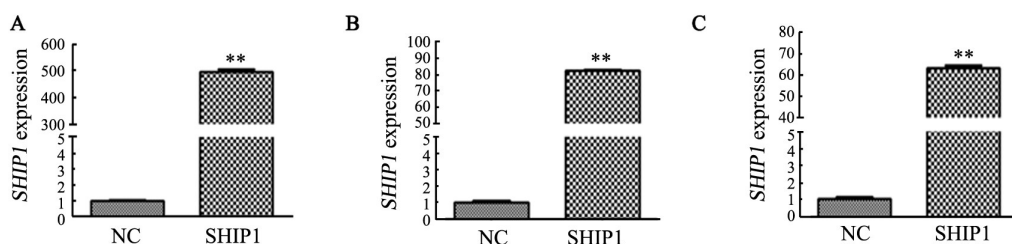
Fig.2 CDS of *SHIP1* amplification result by bacterial PCR (A) and sequencing peak map (B)



A: A549; B: SPCA-1; C: PC-9

图3 成功构建 *SHIP1* 稳转 NSCLC 细胞系($\times 50$)

Fig.3 The NSCLC cell lines stably over-expressing *SHIP1* were successfully constructed($\times 50$)



* $P < 0.01$ vs NC group

图4 荧光定量PCR分别检测 NSCLC 细胞中 *SHIP1* 基因 mRNA 的表达

Fig.4 The mRNA levels of *SHIP1* in NSCLC cells infected with *SHIP1* recombinant lentivirus were detected by qRT-PCR

2.5 感染慢病毒的 NSCLC 细胞中 SHIP1 蛋白的表达

提取感染慢病毒后 NSCLC 细胞的总蛋白, Western blotting 检测 SHIP1 蛋白表达, 与阴性对照组比较, 感染 SHIP1 重组慢病毒的 A549、SPCA-1 和 PC-9 细胞中 SHIP1 蛋白水平均升高(图 5), 提示构建的 SHIP1 重组质粒和慢病毒能使 NSCLC 细胞中 SHIP1

蛋白过表达。

2.6 过表达 SHIP1 抑制 PC-9 细胞的增殖活力

MTT 法检测过表达 SHIP1 的 PC-9 细胞的增殖活力, 结果(图 6)显示从第 4 d 开始, 增殖能力相较于对照组明显降低($P < 0.05$)。

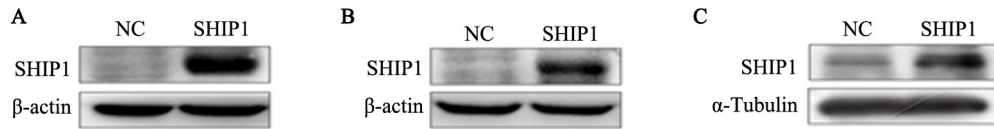


图 5 Western blotting 分别检测 NSCLC 细胞中的 SHIP1 蛋白表达水平

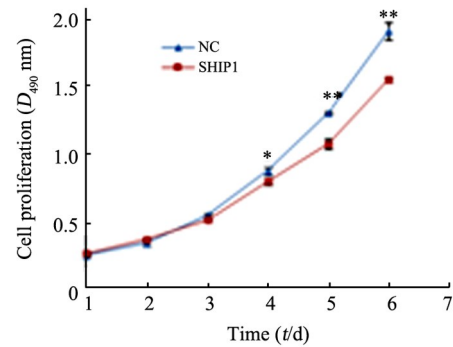
Fig.5 The protein levels of SHIP1 in NSCLC cells infected with SHIP1 recombinant lentivirus were detected respectively by Western blotting

2.7 过表达 SHIP1 抑制 PC-9 细胞克隆形成能力

克隆形成实验结果(图 7)显示, 与对照组相比, 过表达 SHIP1 的 PC-9 细胞克隆团形成数量明显减少 ($P < 0.01$)。

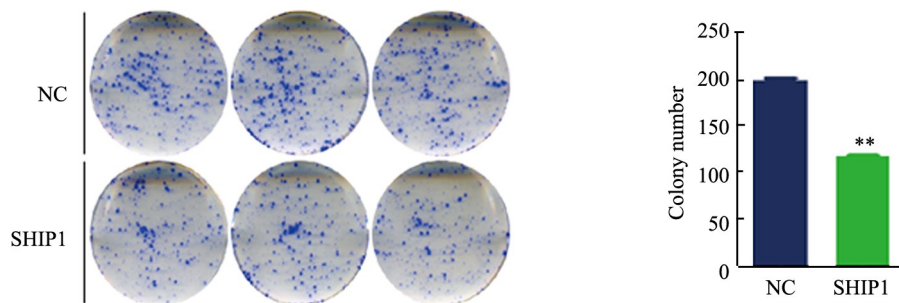
2.8 过表达 SHIP1 对 PC-9 细胞中 AP-1 蛋白复合体各组分的影响

Western blotting 检测过表达 SHIP1 细胞及对照组细胞中 AP-1 蛋白复合体各组分的变化。结果(图 8)显示, 过表达 SHIP1 组与对照组细胞相比, AP-1 家族蛋白中的转录因子 c-Jun、p-c-Jun(ser73)、JunD、p-JunD(ser255)、p-JunB(ser259)、FosB 表达均显著下调。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group

图 6 过表达 SHIP1 对 PC-9 细胞活力的影响
Fig.6 Effect of SHIP1 overexpression on the viability of PC-9 cells



** $P < 0.01$ vs NC group

图 7 过表达 SHIP1 对 PC-9 细胞克隆形成能力的影响

Fig.7 Effect of SHIP1 overexpression on colony forming ability of PC-9 cells

3 讨论

众所周知, 在肿瘤发生发展过程中, 活化的 PI3K/AKT 信号通路起着至关重要的作用。三磷酸肌醇(PIP3)是 PI3K 信号通路发挥作用的关键第二信使分子, 通过招募含有 pleckstrin 同源结构域的蛋白,

激活其下游效应激酶(包括丝氨酸/苏氨酸激酶, AKT、酪氨酸激酶、Btk、S6K、Rac 等), 发挥相应生物学效应^[7]。目前发现的 PIP3 降解酶主要有 SHIP1/2 和 PTEN, 并且发现他们与 PIP3 的亲合力有区别, 这可能导致了不同肿瘤发病机制的差异^[20-21]。

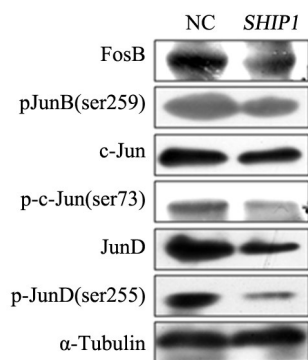


图8 过表达SHIP1对AP-1蛋白复合体各组分表达的影响
Fig.8 Effect of SHIP1 overexpression on the expression of AP-1 heterodimer protein complex component

目前关于SHIP1与肿瘤作用中的研究主要集中于血液系统肿瘤,其在实体瘤中的研究主要限于下咽鳞癌、神经胶质瘤及结肠癌^[19, 22-23]。SHIP1抑制血液系统肿瘤的机制可能有两个方面:(1)通过降解PIP3,抑制PI3K/AKT信号通路^[24]。(2)在促肿瘤和抑制肿瘤发展的免疫细胞中,SHIP1表达水平与活性不同,提示SHIP1可能通过影响免疫反应来调控造血系统肿瘤的发展^[25]。然而,SHIP1在肺癌中的作用尚罕见报道,其作用机制是否与血液系统肿瘤一致,还有待进一步研究证实。

AP-1是由c-Jun蛋白家族(包括c-Jun、JunB、JunD)和c-fos蛋白家族(包括FosB、c-fos等)组成的二聚体复合物,起着基因转录分子开关的作用^[26]。研究^[27]表明,在肿瘤中,PI3K/AKT通路激活后可调节下游转录因子AP-1家族蛋白,作用其靶基因发挥促进肿瘤细胞增殖和侵袭转移的作用。然而,SHIP1是否能调控AP-1蛋白仍不清楚。

研究SHIP1在NSCLC中的功能及其机制的首要条件是建立良好细胞模型,而研究抑癌基因的首要条件是建立能使细胞稳定过表达目的基因的质粒或慢病毒。SHIP1基因CDS区较长(3 570 bp),构建其真核重组过表达质粒难度大,这在一定程度上制约着关于SHIP1基因功能及机制的研究。本研究利用pTSB-CMV-MCS-SBP-3Flag-EGFP质粒为载体,采用基因克隆重组技术,成功将SHIP1基因CDS区插入载体质粒,最终成功构建了携带Flag和GFP标签的SHIP1重组质粒和慢病毒,为针对SHIP1基因的研究打下了坚实基础。

为研究SHIP1在NSCLC中的作用,本研究选择A549、SPCA-1和PC-9细胞作为细胞模型,利用SHIP1重组慢病毒感染细胞,成功建立了稳定过表达SHIP1的NSCLC细胞系,进一步在PC-9细胞中探讨SHIP1在NSCLC增殖中的作用,结果发现过表达SHIP1后,PC-9细胞增殖活力、克隆形成能力显著下

降,c-Jun、p-c-Jun(ser73)、JunD、p-JunD(ser255)、p-JunB(ser259)、FosB表达显著下调。提示过表达SHIP1可通过下调AP-1家族蛋白抑制NSCLC细胞增殖能力。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] CHEN Z, FILLMORE C M, HAMMERMAN P S, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(8): 535-546. DOI:10.1038/nrc3775.
- [3] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. Non-small cell lung cancer, version 5.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(4): 504-535. DOI: 10.6004/jncn.2017.0050.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA: A Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30. DOI:10.3322/caac.21387.
- [5] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI:10.3322/caac.21262.
- [6] ERAMO M J, MITCHELL C A. Regulation of PtdIns(3,4,5)P3/Akt signalling by inositol polyphosphate 5-phosphatases[J]. Biochem Soc T, 2016, 44(1): 240-252. DOI:10.1042/BST20150214.
- [7] HAMILTON M J, HO V W, KURODA E, et al. Role of SHIP in cancer[J]. Exp Hematol, 2011, 39(1): 2-13. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.11.002.
- [8] BACKERS K, BLERO D, PATERNOTTE N, et al. The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-phosphatases[J]. Adv Enzyme Regul, 2003, 43(1): 15-28. DOI:10.1016/S0065-2571(02)00043-2.
- [9] VIERNES D R, CHOI L B, KERR W G, et al. Discovery and development of small molecule SHIP phosphatase modulators[J]. Med Res Rev, 2014, 34(4): 795-824. DOI:10.1002/med.21305.
- [10] EHM P, NALASKOWSKI M M, WUNDENBERG T, et al. The tumor suppressor SHIP1 colocalizes in nucleolar cavities with p53 and components of PML nuclear bodies[J]. Nucleus-Phila, 2015, 6(2): 154-164. DOI:10.1080/19491034.2015.1022701.
- [11] GILBY D C, GOODEVE A C, WINSHIP P R, et al. Gene structure, expression profiling and mutation analysis of the tumour suppressor SHIP1 in Caucasian acute myeloid leukaemia[J]. Leukemia, 2007, 21(11): 2390-2393. DOI:10.1038/sj.leu.2404864.
- [12] METZNER A, PRECHT C, FEHSE B, et al. Reduced proliferation of CD34(+) cells from patients with acute myeloid leukemia after gene transfer of INPP5D[J]. Gene Ther, 2009, 16(4): 570-573. DOI: 10.1038/gt.2008.184.
- [13] SATTLER M, VERMA S, BYRNE C H, et al. BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(11): 7473-7480. DOI:10.1128/MCB.19.11.7473.
- [14] TAGER M, HORN S, LATUSKE E, et al. SHIP1, but not an AML-derived SHIP1 mutant, suppresses myeloid leukemia growth in a xenotransplantation mouse model[J]. Gene Ther, 2017, 24(11): 749-753. DOI:10.1038/gt.2017.88.

- [15] JIANG X, STUIBLE M, CHALANDON Y, et al. Evidence for a positive role of SHIP in the BCR-ABL-mediated transformation of primitive murine hematopoietic cells and in human chronic myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2003, 102(8): 2976-2984. DOI:10.1182/blood-2003-05-1550.
- [16] HORN S, ENDL E, FEHSE B, et al. Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3beta signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle[J]. *Leukemia*, 2004, 18(11): 1839-1849. DOI:10.1038/sj.leu.2403529.
- [17] FUHLER G M, BROOKS R, TOMS B, et al. Therapeutic potential of SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1 (SHIP1) and SHIP2 inhibition in cancer[J]. *Mol Med*, 2012, 18: 65-75. DOI:10.2119/molmed.2011.00178.
- [18] PEDERSEN I M, OTERO D, KAO E, et al. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas[J]. *Embo Mol Med*, 2009, 1(5): 288-295. DOI:10.1002/emmm.200900028.
- [19] ZHANG J, AN X, HAN Y, et al. Overexpression of JARID1B promotes differentiation via SHIP1/AKT signaling in human hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(9): e2358-e2358. DOI:10.1038/cddis.2016.262.
- [20] KERR W G. Inhibitor and activator: dual functions for SHIP in immunity and cancer[J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2011, 1217(1): 1-17. DOI:10.1111/j.1749-6632.2010.05869.x.
- [21] PAULS S D, MARSHALL A J. Regulation of immune cell signaling by SHIP1: a phosphatase, scaffold protein, and potential therapeutic target[J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(6): 932-945. DOI: 10.1002/eji.201646795.
- [22] RAMOS A R, ELONG E W, ERNEUX C. Phosphoinositide 5-phosphatase activities control cell motility in glioblastoma: Two phosphoinositides PI(4,5)P2 and PI(3,4)P2 are involved[J]. *Adv Biol Regul*, 2018, 67: 40-48. DOI:10.1016/j.jbior.2017.09.001.
- [23] TU J, XING Y, GUO Y, et al. TanshinoneIIA ameliorates inflammatory microenvironment of colon cancer cells via repression of microRNA-155[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 353-361. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.08.015.
- [24] BRAUER H, STRAUSS J, WEGNER W, et al. Leukemia-associated mutations in SHIP1 inhibit its enzymatic activity, interaction with the GM-CSF receptor and Grb2, and its ability to inactivate PI3K/AKT signaling[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(11): 2095-2101. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.07.017.
- [25] VAILLANCOURT M, LEVASSEUR S, TREMBLAY M L, et al. The Src homology 2-containing inositol 5-phosphatase 1 (SHIP1) is involved in CD32a signaling in human neutrophils[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(11): 2022-2032. DOI:10.1016/j.cellsig.2006.03.012.
- [26] YE N, DING Y, WILD C, et al. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(16): 6930-6948. DOI:10.1021/jm5004733.
- [27] TROP-STEINBERG S, AZAR Y. AP-1 Expression and its clinical relevance in immune disorders and cancer[J]. *Am J Med Sci*, 2017, 353(5): 474-483. DOI:10.1016/j.amjms.2017.01.019.

[收稿日期] 2018-03-04

[修回日期] 2018-05-29

[本文编辑] 韩丹,阮芳铭