

# 稳定过表达外源 p62/SQSTM1 基因的 U937 白血病细胞株的建立及初步特性分析

刘玲玲, 范蕊芳, 赖文兴, 林东军\*

(中山大学附属第三医院血液科//血液病研究所, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】构建稳定过表达外源 p62/SQSTM1 基因的人急性单核细胞白血病 U937 细胞株,并初步分析过表达 p62 基因对 U937 细胞的影响。【方法】首先在空载体 MSCV-IRES-GFP (MIG) 基础上构建重组质粒 MSCV-p62-IRES-GFP (MPIG), 分别用 MIG 及 MPIG 载体进行病毒包装, 并感染 U937 细胞, 用流式细胞分选仪分选出绿色荧光细胞, 获得 U937-GFP 和 U937-p62 稳定细胞株, 利用流式细胞仪及 Western blot 分别检测 GFP 细胞的阳性率及 p62 蛋白表达水平, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定 U937-GFP 和 U937-p62 细胞的生长情况, 流式细胞术检测髓系细胞表面分化抗原 CD11b 和 CD14 的表达情况。【结果】荧光显微镜观察结果显示, MIG 和 MPIG 病毒感染后, U937-GFP 和 U937-p62 细胞均表达绿色荧光蛋白; 经流式细胞仪分选后, U937-GFP 和 U937-p62 细胞中 GFP 阳性表达率分别达 98.5% 和 87.3%。Western blot 的结果显示 U937-p62 细胞中 p62 蛋白表达较 U937-GFP 显著升高。MTT 实验结果显示, 与 U937-GFP 细胞相比, U937-p62 细胞的生长速率加快。流式结果显示 U937-GFP 细胞和 U937-p62 细胞表达细胞表面分化抗原 CD11b 及 CD14 无明显差异。【结论】成功构建了 p62 基因过表达的 U937 稳定细胞株, 过表达 p62 可促进 U937 细胞增殖, 并不能促进 U937 细胞的分化。

**关键词:** U937 细胞株; p62; 载体构建

**中图分类号:** R733.7

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2015)05-0670-06

## Establishment and Analysis of p62 Stably-Expressed U937 Cell Line

LIU Ling-ling, FAN Rui-fang, LAI Wen-xing, LIN Dong-jun\*

(Department of Hematology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Sun Yat-sen Institute of Hematology, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: LIN Dong-jun; E-mail: lindongjun0168@163.com

**Abstract:** 【Objective】 To establish U937 cell line stably expressing p62 gene and to investigate the biological characteristics of this cell line. 【Methods】 The recombinant MSCV-p62-IRES-GFP (MPIG) vector was constructed and packaged the virus for infecting U937 cell line. U937 cells successfully infected were subjected to fluorescence activated cell sorter (FACS) for sorting out the GFP positive cells. The expression of p62 was determined by Western blot. MTT was used to show the cell proliferation. CD11b and CD14 expression were detected by flow cytometry. 【Results】 U937 cells that infected with retrovirus expressed GFP and were subjected to FACS. After sorting, the green fluorescent rates of U937-GFP cells and U937-p62 cells were 98.5% and 87.3%, respectively. And the p62 protein expression was increased in U937-p62 cells than that in U937-GFP cells. Comparing with U937-GFP cells, the cell proliferation of U937-p62 cells was faster. Then flow cytometry showed there was no difference of the CD11b and CD14 expression between U937-GFP cells and U937-p62 cells. 【Conclusion】 The recombinant MPIG vector was constructed and p62 gene stably-expressed U937 cell line was established successfully. It was proved that overexpression of p62 promoted the viability but not the differentiation of the U937 cell.

**Key words:** U937 cell line; p62; vector construction

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(5): 670-675]

收稿日期: 2014-12-09

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(2014A030310292); 广东省医学科研基金(B2013134)

作者简介: 刘玲玲, 博士, 住院医师, 研究方向: 血液肿瘤的分子靶向治疗, E-mail: liu600813@163.com; \* 通信作者: 林东军, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 血液肿瘤的基础与临床, E-mail: lindongjun0168@163.com

p62/SQSTM1 作为一个衔接蛋白,具有多个与其他蛋白相互结合的结构区域,能将细胞内蛋白携带至蛋白酶体或溶酶体内进行降解<sup>[1]</sup>。p62 与 TRAF6 相结合能促进 TRAF6 下游 NF- $\kappa$ B 的活化,从而促进细胞增殖,促进肿瘤的发生发展<sup>[2]</sup>。另外,p62 能结合并活化 caspase 8,促进细胞内一系列凋亡反应的发生,抑制肿瘤的生长<sup>[3]</sup>。在急性早幼粒白血病中,对全反式维甲酸促进 PML-RAR $\alpha$  融合蛋白降解的机制研究中发现,全反式维甲酸不仅能诱导急性早幼粒白血病细胞产生自噬,并且该研究表明,细胞内一定水平的 p62 蛋白能结合并促进 PML-RAR $\alpha$  融合蛋白进入自噬泡内被降解,从而促进白血病细胞的分化<sup>[4]</sup>。本研究首先建立稳定过表达 p62 蛋白的人急性单核细胞白血病 U937 细胞株,其次初步探讨过表达 p62 蛋白对 U937 细胞的增殖及分化的影响,为进一步研究 p62 对急性非 M3 型白血病细胞的作用打好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

提取 RNA 的试剂购买自 Invitrogen,反转录试剂盒、高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bgl* II 及 *Sal* I、T4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 产品。胎牛血清购买自 Hyclone,RPMI-1640 培养基购买自 Gibco。细胞转染试剂为 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000。抗体 p62 与 GAPDH 购买自 Santa Cruz 公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)购买自 Sigma 公司。CD11b 及 CD14 抗体购买自 BD 公司。

### 1.2 重组质粒 MSCV-p62-IRES-GFP 载体的构建

1.2.1 目的基因 p62 的获得 从白血病细胞株 NB4 中提取 RNA 并反转录为 cDNA,以此为模板扩增目的基因。PCR 扩增目的基因的引物序列为:上游引物为 5'-TTAGATCTATGGCGTCGCTCACC GTGAAGG-3',下划线处为 *Bgl* II 酶切位点,下游引物为 5'-GTGTCGACTGGGCAAAAAGTGGTCAACG-3',下划线处为 *Sal* I 酶切位点,扩增目的基因片段长度 1323 bp。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果并将目的条带

进行纯化回收。

1.2.2 重组质粒 MSCV-p62-IRES-GFP(MPIG)载体的连接和酶切鉴定 将 1.2.1 中 PCR 回收产物与 MSCV-IRES-GFP(MIG)空载体分别用 *Bgl* II 和 *Sal* I 进行双酶切,纯化回收酶切产物,将目的基因片段与空载体用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在铺有氨苄青霉素琼脂糖平板上进行单个菌落挑取,于 37 °C 摇菌 16 h,提取重组质粒 DNA,用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切鉴定,观察 p62 基因片段是否成功克隆至空载体中。阳性质粒由深圳华大基因研究院进行 DNA 测序分析。

### 1.3 细胞培养

293FT 细胞及 U937 细胞为中山大学血液病研究所提供。U937 细胞株培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,293FT 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔 2~3 d 进行传代,取对数生长期细胞进行细胞实验。

### 1.4 包装逆转录病毒并感染 U937 细胞株

1.4.1 逆转录病毒的包装 在 60 mm 培养皿中种  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  的 293FT 细胞,24 h 后生长密度达到 70%~80% 进行转染。重组逆转录病毒载体与病毒包装载体在 Lipofectamine 2000 作用下共转染 293FT 细胞。转染后 48 h、72 h 分别收集含有病毒的培养液,2500 r/min( $r = 12$  cm)离心 5 min 去除细胞沉淀。

1.4.2 逆转录病毒感染 U937 细胞 在六孔板中接种  $1 \times 10^6$  的 U937 细胞,加入病毒液及终浓度为 8  $\mu$ g/mL 聚凝胺(polybrene)。感染 24 h 后更换新鲜培养基,感染 2 d 后于倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

### 1.5 U937-GFP 和 U937-p62 细胞的流式分选

将稳定表达 GFP 的细胞株于 MoFlo XDP 细胞分选流式仪(美国 Beckman 公司)进行分选。MIG 病毒感染分选后的 U937 稳定细胞株命名为 U937-GFP,而 MPIG 病毒感染分选后的 U937 稳定细胞株命名为 U937-p62。

### 1.6 Western blot 检测 p62 蛋白表达

收集细胞,PBS 洗一遍后加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。使用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。按 40  $\mu$ g 蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白转移到 NC 膜上,用 5% BSA 室温封闭 1 h,4 °C 一抗孵

育过夜, TBST 洗三遍后 HRP 标记的抗鼠 IgG 的二抗孵育 1 h, 化学发光液曝光显影。

### 1.7 MTT 法检测稳定细胞株增殖情况

在 96 孔板中种 500 个细胞, 分别培养 1、2、3、4、5、6 d, 每孔加 20  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 孵育 4h, 吸去上清, 每孔加 200  $\mu$ L DMSO 溶解结晶, 于 490 nm 波长测定 OD 值, 细胞存活率=实验组吸光度/对照组吸光度 $\times$ 100%。

### 1.8 流式细胞术检测 CD11b 及 CD14 的表达

收集  $5 \times 10^5$  个细胞, PBS 洗一遍后加 100  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 并加入 1  $\mu$ L CD11b 或 CD14 抗体室温避光孵育 1 h, PBS 洗两遍后, 用 500  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 进行流式细胞仪检测。

### 1.9 统计学处理

数据用 SPSS 13.0 统计软件分析, 数据均采用均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 比较分析用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 MPIG (MSCV-p62-IRES-GFP) 载体的构建及鉴定

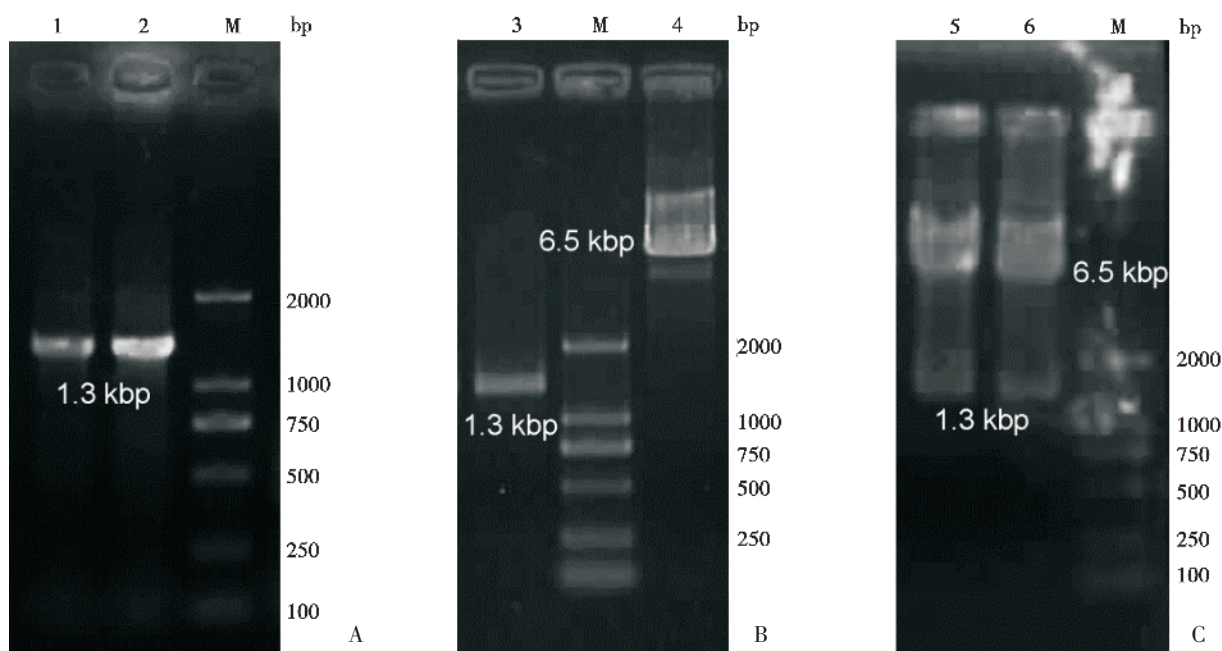
PCR 反应扩增的 p62 基因片段长度为 1 323

bp。PCR 产物电泳如图 1A 所示, 在 1 000 bp 与 2 000 bp 之间可见清楚条带, 与预期大小一致。纯化的目的基因 PCR 产物与 MIG 空载体经 *Bgl* II 及 *Sal* I 双酶切后, 得到线性的目的基因(图 1B 泳道 3)及 MIG 空载体(图 1B 泳道 4), 且片段大小与预期相符。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5, 挑取克隆, 对菌液 PCR 阳性的克隆进行质粒提取并双酶切鉴定, 图 1C 的 5, 6 两个泳道均可见与目的基因及空载体片段大小相符合的条带。将这两个质粒进行 DNA 测序, 结果正确。

### 2.2 包装病毒及建立稳定过表达 p62 的 U937 细胞株

三质粒系统共转染 293FT 细胞包装病毒, 将得到的病毒液感染 U937 细胞。荧光显微镜下可见绿色荧光, 流式细胞术检测 U937-GFP 及 U937-p62 中的 GFP 阳性细胞比例分别为 40.0% 及 34.4%(图 2A, B)。

感染成功的 U937 细胞经流式细胞仪分选得到稳定细胞株 U937-GFP 和 U937-p62 (图 3A, B), U937-GFP 及 U937-p62 中的 GFP 阳性细胞比例分别达到 98.5% 及 87.3%(图 3C), Western blot 结果显示, 分选后的 U937-p62 细胞中 p62 蛋白的表达较 U937-GFP 细胞更高(图 3D)。实验证明成



M: DL 2000 DNA marker; Lane 1-2: PCR target gene p62 from cDNA; Lane 3: PCR product was digested by *Bgl* II and *Sal* I; Lane 4: MIG vector was digested by *Bgl* II and *Sal* I; Lane 5-6: Recombinants were digested by *Bgl* II and *Sal* I.

图 1 构建 MSCV-p62-IRES-GFP 载体

Fig.1 Construction of MSCV-p62-IRES-GFP recombinant vector

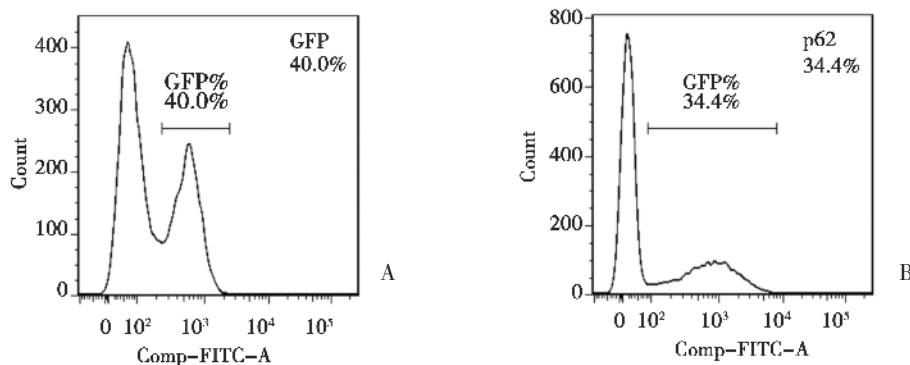
功建立了稳定过表达 p62 的 U937 细胞株。

### 2.3 过表达 p62 对 U937 细胞增殖的影响

将 500 个 U937-GFP 或 U937-p62 细胞接种于 96 孔板中, 培养 1 ~ 6 d, 观察细胞生长情况。MTT 结果显示, U937-p62 细胞较 U937-GFP 细胞生长加快, 具有明显统计学差异(图 4,  $P < 0.001$ )。

### 2.4 过表达 p62 对 U937 细胞分化的影响

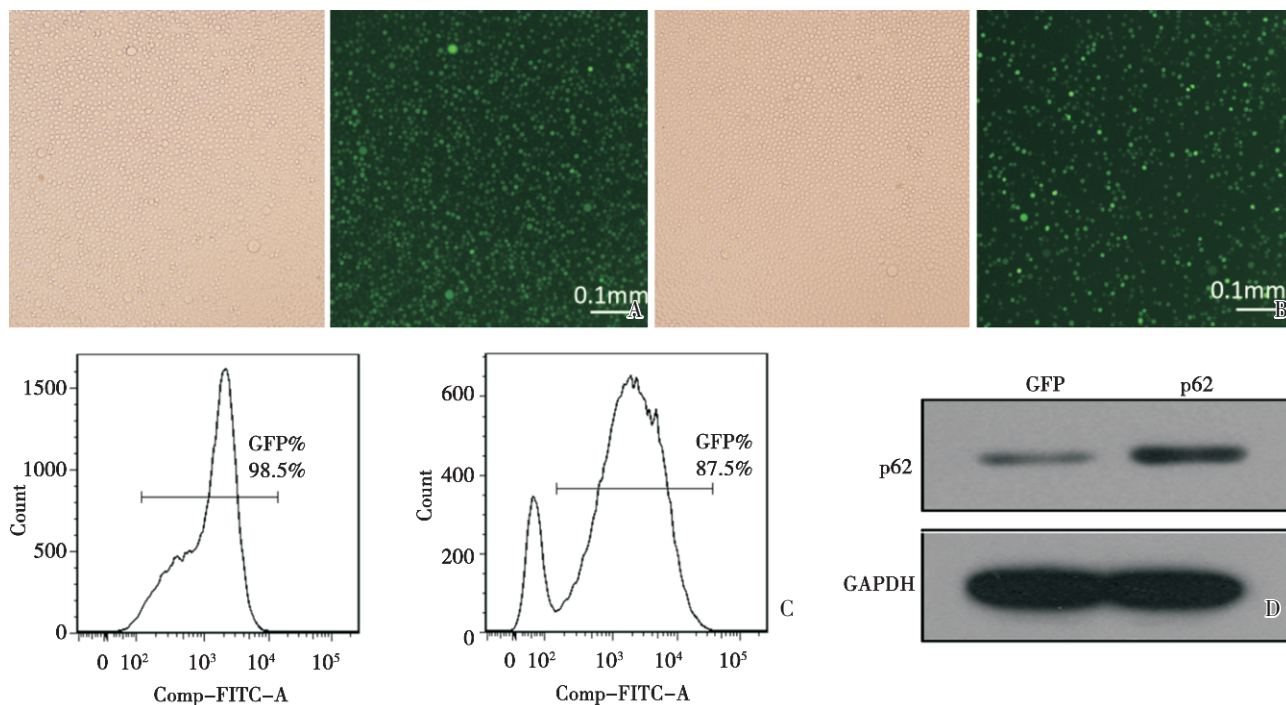
收集对数期生长的 U937-GFP 细胞及 U937-p62 细胞, CD11b 及 CD14 抗体孵育, 流式细胞术检测 CD11b 及 CD14 的表达。如图 5 可见, U937-GFP 细胞表达 0.082% CD11b 及 0.322% CD14, 而 U937-p62 细胞表达 0.106% CD11b 及 0.462%



A-B: Green fluorescence rates of U937-GFP cells and U937-p62 cells were determined by flow cytometry.

图 2 MIG 或 MPIG 病毒感染后 U937 细胞 GFP 阳性率

Fig.2 The GFP rate of U937 cells infected by MIG or MPIG virus



A-B: Images of GFP expression in U937-GFP cells and U937-p62 cells were showed by microscopy (left: light microscope; right: fluorescence microscope) (magnification×100); C: Green fluorescence rates of U937-GFP cells and U937-p62 cells were determined by flow cytometry; D: Protein p62 expression was detected by Western blot.  $n = 3$

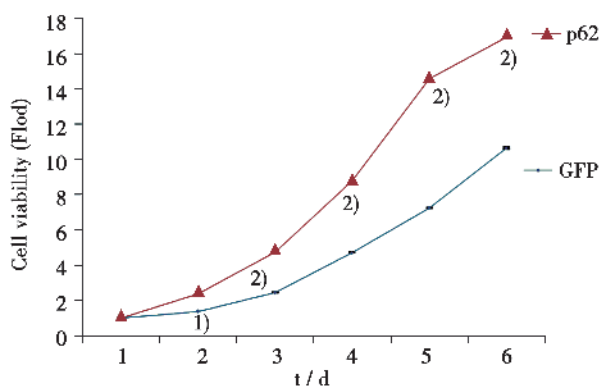
图 3 分选后 U937-GFP 及 U937-p62 细胞株的分析

Fig.3 Characteristics of U937-GFP and U937-p62 cells after fluorescence-activated cell sorting

CD14, 均无统计学差异。

### 3 讨论

急性髓系白血病的发生原理最为广泛接受的是“多次打击”学说, 该学说指出白血病的发生是一个复杂而多步骤的过程, 包括癌基因活化、抑癌基因失活、DNA 修复机制异常、细胞周期的变化、凋亡通路异常等等, 而其中某些因素如癌基因活化等起决定性作用<sup>[5]</sup>。因此, 对急性髓系白血病(AML)癌基因的研究越来越显得重要。白血病细胞为悬浮生长的一类细胞, 利用质粒转染白血病细胞法效率较低, 而逆转录病毒载体具有转染效率高、表达稳定等优点而被广泛应用于基因表达的实验研究<sup>[6]</sup>。MSCV(murine stem cell virus)是目前广泛应用的逆转录病毒载体。MSCV 是在 MoMLV(Moloney murine leukemia virus)载体的长末端重复序列(LTR)部分进行了改良, 从而提高了转录活性, 促进目的基因在细胞中过表达<sup>[7]</sup>。因



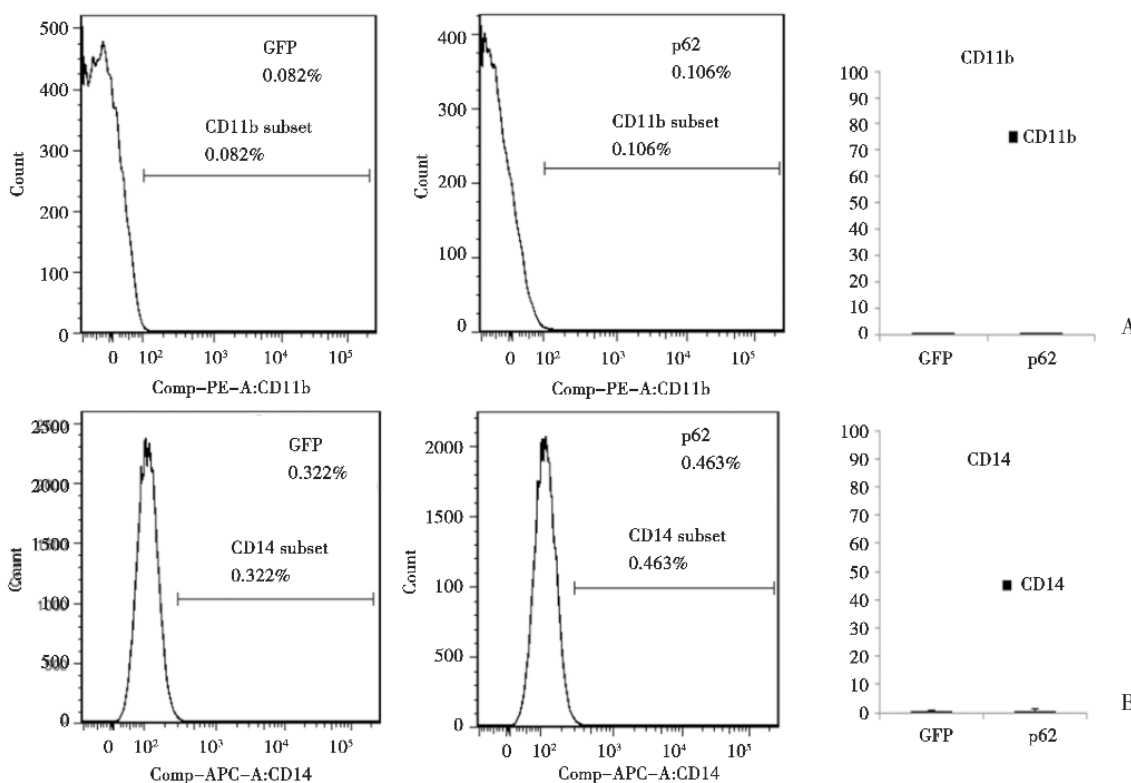
Red: The growth of U937 cells overexpressed with p62. Blue: The growth of control cells. Data were mean ± SD (n = 3). 1) P < 0.05, 2) P < 0.001

图 4 过表达 p62 对 U937 细胞增殖的影响

Fig.4 Overexpression of p62 promotes the proliferation of U937 cell line

此, MSCV 逆转录病毒载体被应用于干细胞和其他哺乳动物细胞, 特别是血液肿瘤细胞的研究中。

本文构建了人急性单核细胞白血病 U937 细



A: The rate of CD11b was determined by flow cytometry; B: The rate of CD14 was determined by flow cytometry. Data were mean ± SD (n = 3).

图 5 过表达 p62 对 U937 细胞分化的影响

Fig.5 Overexpression of p62 has no effect on the expression of CD14 and CD11b of U937 cells

胞系逆转录病毒 MSCV 重组体,经包装细胞 293FT 包装后,产生完整的重组逆转录病毒,以该病毒直接感染 U937 细胞,通过检测报告基因 GFP 的表达,证明 MSCV 能有效介导外源基因 p62 进入细胞并进行表达,说明 MSCV-p62-IRES-GFP 构建成功。流式检测 GFP 表达率,空载体组 MIG 及 MPIG 过表达 p62 组病毒感染细胞的效率分别为 40.0%及 34.3%,说明该病毒载体感染率较高。为了进一步验证过表达 p62 在 U937 细胞中的作用,我们利用流式细胞仪分选出转染的细胞,分选后的 GFP 表达率高达 90%,并且利用 Western blot 在蛋白水平验证了 U937 细胞中 p62 的高表达。

多项研究表明,p62 蛋白与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[8]</sup>。Mathew 等<sup>[9]</sup>研究显示,当自噬形成缺陷时 p62 蛋白聚集增多,能通过增高内质网分子伴侣蛋白的表达,损伤线粒体,促进活性氧(ROS)等机制促进肿瘤的发生。这一结果与 Duran 等<sup>[10]</sup>的研究结果一致,p62 在 Ras 诱导的肿瘤形成中起着关键的作用,这可能与 p62 激活 TRAF6-NF- $\kappa$ B 途径有关。本实验中测定细胞生长曲线的结果表明,过表达 p62 蛋白的 U937 细胞生长加快,这说明 p62 蛋白能促进白血病细胞增殖,与研究报道一致。

细胞内自噬形成时,p62 与 LC3 结合并被转运至自噬溶酶体内进行降解,同时 p62 可作为衔接蛋白将结合的错误折叠的蛋白或者失去功能的细胞器转运至自噬溶酶体内降解<sup>[11]</sup>。研究报道,全反式维甲酸促进急性早幼粒白血病细胞分化是通过促进自噬发生,利用细胞内 p62 蛋白将 PML-RAR 融合蛋白携带至自噬泡内被降解而实现的。鉴于 p62 的这一作用,我们检测了过表达 p62 对 U937 细胞分化的影响。CD14 是一种单核巨噬细胞系特异性分化抗原,在成熟单核巨噬细胞上有高度表达。CD11b 作为一种髓系特异性标志,可分布于骨髓单核细胞表面,随着细胞进一步分化,其表达逐渐减低<sup>[12]</sup>。本实验结果表明对照组与过表达组 CD14 及 CD11b 均无明显改变。说明过表达 p62 对急性单核细胞白血病的分化无影响,与 p62 在全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病中的作用并不相同,具体机制有待进一步研究探讨。

#### 参考文献

[1] Yu HB, Kielczewska A, Rozek A, et al. Sequestosome-

1/p62 is the key intracellular target of innate defense regulator peptide [J]. *J Biol Chem*, 2009,284 (52): 36007-36011.

[2] Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, et al. The atypical PKC  $\delta$ -interacting protein p62 channels NF- $\kappa$ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway [J]. *EMBO J*, 2000,19(7):1576-1586.

[3] Jin Z, Li Y, Pitti R, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling [J]. *Cell*, 2009,137(4):721-735.

[4] Wang Z, Cao L, Kang R, et al. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RAR $\alpha$  oncoprotein [J]. *Autophagy*, 2011,7(4):401-411.

[5] 王月英,陈赛娟. 白血病发病原理研究:“多次打击”学说 [J]. *自然杂志*, 2008,30(3):128-136.

Wang YY, Chen SJ. Study on the pathogenesis of leukemia: theory of multistep pathogenesis of leukemia [J]. *Chinese Journal of Nature*, 2008,30(3):128-136.

[6] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference [J]. *Oncogene*, 2002,21(39):6041-6048.

[7] Choi JK, Hoang N, Vilardi AM, et al. Hybrid HIV/MSCV LTR enhances transgene expression of lentiviral vectors in human CD34(+) hematopoietic cells [J]. *Stem Cells*, 2001,19(3):236-246.

[8] Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, et al. Cell signaling and function organized by PBI domain interactions [J]. *Mol Cell*, 2006,23(5):631-640.

[9] Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [J]. *Cell*, 2009,137(6):1062-1075.

[10] Duran A, Linares JF, Galvez AS, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF- $\kappa$ B mediator in tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2008,13(4):343-354.

[11] Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. *Cell*, 2007,131(6):1149-1163.

[12] Park H, Shelley CS, Arnaout MA. The zinc finger transcription factor ZBP-89 is a repressor of the human beta 2-integrin CD11b gene [J]. *Blood*, 2003,101(3): 894-902.

(编辑 孙慧兰)