

PESV 对 K562 细胞 BCR/ABL 融合基因及凋亡调控因子 Bcl-2、Bad 表达的影响 *

于文俊¹ 杨文华^{2△} 杨向东² 史哲新² 王兴丽² 郝征¹ 张佳¹

(1 天津中医药大学 天津 300193 2 天津中医药大学第一附属医院 天津 300193)

摘要 目的 探讨 PESV 对 K562 细胞 BCR/ABL 融合基因及凋亡调控因子 bcl-2 和 bad 表达的影响。方法 将体外培养 K562 细胞,经 PESV 处理不同时间后,流式细胞术检测细胞凋亡率,荧光定量 RT-PCR 检测 BCR/ABL、Bcl-2、Bad mRNA 水平变化。结果 与对照组相比,PESV 处理后 K562 细胞,凋亡率增加,BCR/ABL 融合基因表达降低,抗凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 表达降低,促凋亡基因 Bad mRNA 表达增加。结论 PESV 能降低降低 K562 细胞 BCR/ABL 融合基因的表达,可能通过调节 Bcl-2 和 Bad 表达,抑制 K562 细胞增殖,促进其凋亡。

关键词 PESV K562 细胞系 凋亡 BCR/ABL Bcl-2 Bad

中图分类号 Q75,Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)21-4015-04

The Effects of PESV on the Expression of BCR / ABL Fusion Gene and Bcl-2, Bad of Apoptosis Regulators on the K562 Cells*

YU Wen-jun¹, YANG Wen-hua^{2△}, YANG Xiang-dong², SHI Zhe-xin², WANG Xing-li², HAO Zheng¹, ZHANG Jia¹

(1 Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 300193 Tianjin, China;

2 The First Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, 300193 Tianjin, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the PESV of K562 cells BCR / ABL fusion gene and apoptosis regulators bcl-2 and bad expression. **Methods:** K562 cells were cultured in vitro, by PESV for different times, the apoptosis rate by flow cytometry, fluorescence quantitative RT-PCR detection of BCR / ABL, Bcl-2, Bad mRNA level changes. **Results:** Compared with the control group, PESV treated K562 cells, apoptosis increased, BCR / ABL fusion gene reduced expression, anti-apoptotic gene Bcl-2 mRNA expression decreased, pro-apoptotic gene Bad mRNA expression. **Conclusion:** PESV reduced in K562 cells can reduce the BCR / ABL fusion gene, may regulate the expression of Bcl-2 and Bad, inhibit proliferation of K562 cells and promote their apoptosis.

Key words: PESV; K562 cell lines; Apoptosis; BCR / ABL; Bcl-2; Bad

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)21-4015-04

慢性粒细胞白血病(chronic Myeloid Leukemia,CML)简称“慢粒”,是起源于多能造血干细胞的恶性增殖性疾病。Ph 染色体自 1960 年在慢性粒细胞白血病(Chronic myeloid leukemia,CML)中被发现后,成为第一个认识的与恶性疾病相关的细胞遗传学改变。90%以上的慢粒患者中可发现有 Ph 染色体,即 t(9;22)(q34;q11),形成 BCR/ABL 融合基因,BCR/ABL 介导的 Ph 染色体畸变被认为是 CML 的始动突变^[1]。目前已知参与慢性粒细胞白血病细胞凋亡的因素较多,最为常见的是 bcl-2 家族的信号分子,包括抑制细胞凋亡的因子(bcl-2、bcl-x)和促进细胞凋亡的因子(Bax、Bad)等。我们前期的研究证实 PESV 在体内体外均能对白血病细胞有明显的促进凋亡的作用^[2,3]。本研究探讨 PESV 对 K562 细胞的凋亡效应,以及对 BCR/ABL 融合基因及凋亡调控因子 bcl-2 和 bad 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 RPMI 1640、FBS 购自美国 Gibco 公司;Annexin V/PI 双染流式法细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒及 SYBR Green 荧光染料 MIX 购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 药物制备 PESV 系将蝎毒粗毒应用分子筛层析技术提纯所得,为分子量 6000~7000 的多肽混合物,纯度为 89.1%,使用前用生理盐水溶解稀释到所需浓度。

1.1.3 细胞系 人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞系由中国医学科学院血液学研究所提供,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液培养,均在 37℃、5% CO₂、饱和湿度环境孵育。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 K562 白血病细胞培养 K562 白血病细胞用 RPMI 1640 完全培养液(含 10%FBS),按常规方法培养。实验时均取对数生长期细胞。

1.2.2 凋亡细胞检测 收集对数生长期细胞,离心计数,调整细胞浓度为 1.0×10⁶/ml,接种于 24 孔培养板,每孔体积 800μl。

* 基金项目 教育部博士点基金(20091210110004)

作者简介 于文俊(1980-),男,博士研究生,研究方向 血液病的临床和实验研究,E-mail ywj1@yahoo.cn

△通讯作者 杨文华(1951-),女,教授,博士生导师,研究方向 中西医结合血液病的治疗与实验研究,E-mail fcmymwh@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-11-28 接受日期 2011-12-30)

实验组加入 PESV 20 $\mu\text{g/ml}$, 阳性对照 CTX 组加入 CTX 作用 K562, 空白对照生理盐水组加入生理盐水 200 μL 。取 24h、48h、72h 三个时间点, 各自取细胞离心 5 min, PBS 洗 2 次, 调节细胞浓度为 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$, 加入 -20°C 预冷 70%乙醇 2ml 固定, RNase 消化, 4°C 放置 24h, PBS 洗 2 次。每管加入 PI, AN-NEXIN-V 双染色, 计数 1×10^4 个细胞, 检测细胞凋亡率, 用 FACSCan 流式细胞仪检测和分析凋亡细胞, 同时以不加 AN-NEXIN-V 及 PI 的一管作为阴性对照。

1.2.3 实时荧光定量 RT-PCR (1)收集上述不同组三个时间点 K562 细胞, TRIzol 提取细胞总 RNA, 电泳鉴定 RNA 并定量, 逆转录合成 cDNA。(2)实时荧光定量 PCR 反应: SYBR 反应体系共 20 μl 。反应条件为 95°C 5min, 95°C 30s, 55°C 30s, 40 循环, 72°C 20s, 设空白对照。各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据 $\Delta C(t) = C(t)$ 目的基因 $-C(t)\beta\text{-actin}$, $\Delta\Delta C(t) = 2^{-\Delta C(t)}$ 计算目的基因与 $\beta\text{-actin}$ 相对表达量。

表 1 PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequence of PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	片段长度 Fragment length
BCR/ABL F	ACTCCTCTTCTTCTCTG	116 bp
BCR/ABL R	TTATCGTACCCTGTTCTC	116 bp
BAD F	CTCCACATCCCGAACTCC	126 bp
BAD R	TCAGCCCTCCCTCCAAAG	126 bp
BCL2 F	ACTCCTCTTCTTCTCTG	140 bp
BCL2 R	ATGTACTTCATCACTATCTC	140 bp
Actin F	ACCTTCTACAATGAGCTGCG	148 bp
Actin R	CCTGGATAGCAACGTACATGG	148 bp

1.2.4 统计学方法 各组均数比较采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。所有数据用 SPSS13.0 统计软件分析处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PESV 对 K562 细胞凋亡的影响

K562 细胞出现时间依赖的凋亡现象。白血病细胞经药物处理 24h 时, 即可见到凋亡细胞上升, 凋亡细胞百分比由 3.63% 上升到 7.21%, 并随时间延长而继续升高, 至 72h 时达到 34.26% ($P < 0.05$)。FCM 定量显示, PESV 作用后随时间的延长, 凋亡细胞增多, PESV 实验组 72h 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 2。与 24 h 处理组比较, 都有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 2 PESV 对 K562 细胞凋亡的影响
Table 2 The effect of PESV on apoptosis of K562 cells

组别 Groups	凋亡率 (%) Apoptosis rate		
	24h	48h	72h
PESV group	$3.63 \pm 0.82^{\Delta\Box}$	$7.21 \pm 1.69^{\Delta\Box}$	$34.26 \pm 12.14^{\Delta\Box}$
CTX group	2.26 ± 0.48	5.85 ± 1.43	22.17 ± 9.34
Blank group	0.48 ± 0.25	1.36 ± 0.64	4.46 ± 1.62

注: Δ 与空白组各对应时间点比较皆有显著性差异 ($P < 0.01$); $\Box$ 与 CTX 阳性对照组各对应时间点比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: Δ Compared with the blank group, there is significant difference at each time point ($P < 0.01$); $\Box$ Compared with CTX positive control group had significant differences at each time point ($P < 0.05$).

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 法检测 PESV 对 K562 细胞 BCR/ABL 融合基因的影响

PESV 组应用荧光定量 RT-PCR 检测 BCR/ABL 融合基因, 其变异系数(CV) 介于 2.08%~7.42% 之间, 分布良好。CT 值为 22.16~24.69 (中位 23.26), 24h、48h、72h 相对含量 RQ 值平均值分别为 5.738、2.305、1.697。BCR/ABL 融合基因表达降低, 并呈时间依赖性。PESV 组各时间点与阳性对照和空白对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。如图 2。

2.3 实时荧光定量 RT-PCR 法检测 PESV 对 K562 细胞凋亡调

节因子 Bcl-2 与 Bad mRNA 的表达量的影响

PESV 组应用荧光定量 RT-PCR 检测 K562 细胞 Bcl-2 mRNA, 其变异系数(CV) 介于 1.21%~8.65% 之间, 分布良好。CT 值为 28.51~31.193 (中位 30.07), 24h、48h、72h 相对含量 RQ 值平均值分别为 1.205、0.769、0.740。各时间点与阳性对照和空白对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。如图 3。

PESV 组应用荧光定量 RT-PCR 检测 K562 细胞 Bad mRNA, 其变异系数(CV) 介于 0.77%~7.24% 之间, 分布良好。CT 值为 24.712~28.92 (中位 26.35), 24h、48h、72h 相对含量 RQ 值

平均值分别为 2.015、3.443、6.934。各时间点与阳性对照和空白对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。如图 4。

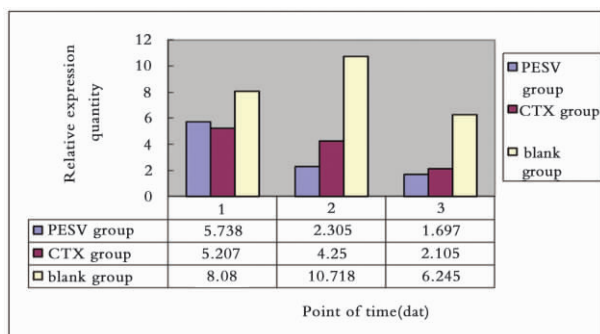


图 2 各组 K562 细胞 BCR/ABL 融合基因表达情况

Fig.2 Expression of each group of K562 cells in BCR / ABL fusion gene

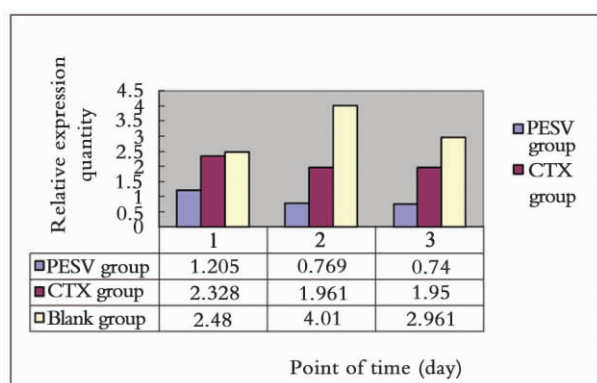


图 3 各组 K562 细胞 Bcl-2 mRNA 表达情况

Fig.3 Expression of each group of Bcl-2 mRNA in K562 cells

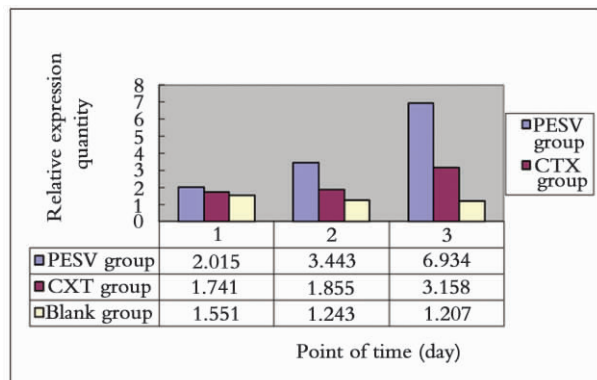


图 4 各组 K562 细胞 Bad mRNA 表达情况

Fig.4 Expression of each group of Bad mRNA in K562 cells

3 讨论

中医无慢性粒细胞白血病之病名,根据其临床表现,将其归属于“积聚”、“瘰癧”等范畴。其病机为风湿毒邪循经流注,风湿互结,闭阻脉络,毒损络脉之证,治以祛风除湿、解毒通络。全蝎性味咸辛平、有毒,具有熄风祛湿、解毒通络之功,为以毒治毒之要药。全蝎的有效成分蝎毒多肽 (PESV), PESV 为含 50~60 氨基酸的多肽混合物,纯度 89.1%,分子量 6000~7000,大多数有 3-4 对二硫键交联而成。研究发现,蝎毒多肽可

抑制肿瘤细胞的生长,诱导肿瘤细胞的凋亡。

慢粒起源于 22 号染色体长臂异常 (22q) 的原始细胞,90% 以上的慢粒患者中可发现有 Ph 染色体,即 t(9;22)(q34;q11),9 号染色体 q34 带上原癌基因 c-abl 的片段易位至 22 号染色体 q11 带上的断裂点簇集区 bcr (break point cluster region),形成 BCR/ABL 融合基因^[4,5],BCR/ABL 介导的 Ph 染色体畸变被认为是 CML 的始动突变。

BCR/ABL 融合基因中,主要由 ABL 段携带细胞恶变的主要信息,而 BCR 段的断裂位点主要影响疾病表型^[6],不同的 BCR/ABL 融合基因类型与疾病表型相关。ABL 基因断裂位点通常位于内含子 1,包括了全部外显子 2 及以后的 ABL 基因序列。BCR 基因常见的断裂点有三个,包括 b2a2 和 b3a2 及 μ 型,相应翻译成 P190、P210 及 P230 融合蛋白,分别主要见于 CML 及 ALL^[7]。其中 P210 断裂在 M-BCR 区,位于外显子 b1 ~ b5 之间 5.8 kb 的区域,转录成 b2a2 或 b3a2 型 mRNA,编码 210 KD 的 BCR/ABL 融合蛋白 (p210),见于 90% 以上的 CML 患者^[8,9]。BCR/ABL 融合基因表达的融合蛋白具有高度酪氨酸激酶活性,在 CML 的发病中起重要作用,通过作用于多种不同的信号途径促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。

Akt 是相对分子质量约为 57KD 的丝/苏氨酸蛋白激酶。PI3K 激活的 Akt 可以通过磷酸化作用,进一步激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、caspase9、NF- κ B 等,而介导胰岛素、多种生长因子等诱发的细胞生长,经多种途径促进细胞存活,是重要的抗凋亡调节因子^[10,11]。凋亡前体蛋白 Bad 是第一个被发现的由 Akt 靶向作用,并与凋亡有关的蛋白,是 AKT 的下游因子。Bad 是 Bcl-2 家族成员之一,分布于线粒体外膜在细胞凋亡的调控上发挥重要作用^[12]。当 Akt 未活化时, Bad 可与 Bcl-2 形成复合体而表现促凋亡活性^[13]。活化的 Akt 磷酸化 Bcl-2 家族中的 Bad Ser136 位点,引起 Bad 与伴侣蛋白 (Chaperone) 14-3-3 结合,从而阻断 Bad 与 Bcl-2 形成二聚体,使 Bad 不能发挥促细胞凋亡作用,而游离的抗凋亡因子 Bcl-2 发挥抗凋亡作用^[14]。我们的实验证实, PESV 在通过抑制 BCR/ABL 酪氨酸激酶活性进而诱导 K562 细胞凋亡过程中对抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达有下调作用,且呈时间依赖性,同时伴有促凋亡蛋白 Bax 的表达升高,导致抗凋亡和促凋亡因素的比例下降,使细胞走向凋亡。

慢性粒细胞白血病的发病机制提示我们通过研制新的酪氨酸激酶抑制因子,抑制蛋白酶体或通过作用于 BCR/ABL 下游的靶向信号途径^[15],对慢性粒细胞白血病的治疗可能是一个新的有效的途径。慢性粒细胞白血病 BCR/ABL 基因越来越引起学术界重视,大量研究证实,慢粒中 BCR/ABL 融合基因及其表达产物是该病发生、发展、转归中的关键。阻抑 BCR/ABL 基因表达,寻找基因靶向治疗药物是慢粒能否治愈的关键。本研究在一定程度阐明中药全蝎提取物 PESV 促进慢性粒细胞白血病细胞的凋亡,抑制 BCR/ABL 基因,干预相关凋亡调节因子 Bcl-2 与 Bad 的表达,起到促进慢性粒细胞白血病细胞 K562 细胞凋亡的作用。

参考文献 (References)

- [1] 张之南.血液病学[M].北京:人民卫生出版社,2005,12
Zhang Zhi-nan. Hematology[M]. Beijing: People's medical publishing house, 2005,12

- [2] 杨文华,王慧娟,杨向东,等.蝎毒多肽对白血病细胞黏附及侵袭特性的影响[J].中华血液学杂志, 2009,30(6):424-425
Yang Wen-hua, Wang Hui-juan, Yang Xiang-dong, et al. Experimental study of effect of peptide extract from scorpion venom in interference in leukemic cell extramedullary infiltration [J]. Chinese Journal of Hematology, 2009,30(6):424-425
- [3] 杨文华,杨向东,史哲新,等.蝎毒多肽提取物对白血病小鼠 Bcl-2、SDF-1 α 与 TGF- β 1 表达的影响[J].中国肿瘤临床,2010,8:429-432
Yang Wen-hua, Yang Xiang-dong, Shi Zhe-xin, et al. Effect of Polypeptide Extract from Scorpion Venom on Bcl-2, SDF-1 α and TGF- β 1 Expression in Leukemia-NOD/SCID Mice[J]. Chinese Cancer Clinical, 2010, 8:429-432
- [4] Melo JV, Gordon DE, Cross NC, et al. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia [J]. Blood, 1993, 81 (1): 158-165
- [5] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, et al. Philadelphia chromosome-positive leukemias:from basic mechanisms to molecular Therapeutics[J]. Ann Intern Med, 2003,138:819-830
- [6] Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, et al. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome positive chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon α [J]. Blood, 2004, 104 (7) :1979
- [7] Hirano I, Nakamura S, Yokota D. Depletion of pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 and 2 by Bcr/abl promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation through continuous phosphorylation of Akt isoforms [J]. J Biol Chem, 2009,284(33):22155-22165
- [8] Schwartz J, Pinilla-Barz J, Yuan RR, et al. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia [J]. Semin Hematol, 2003,40:87-96
- [9] Ritchie, E, Nichols, G. Mechanisms of resistance to imatinib in CML patients: a paradigm for the advantages and pitfalls of molecularly targeted therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6:645-657
- [10] Sale EM, Hodgkinson CP, Jones NP, et al. A new strategy for studying protein kinase B and its three isoforms Role of protein kinase-B in phosphorylating glycogen synthase kinase-3, tuberlin, WNK1, and ATP citrate lyase[J]. Biochemistry, 2006, 45(1):213-223
- [11] Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, et al. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR[J]. J Clin Invest, 2007,117 :730-738
- [12] Mayo L D, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of mdm2 from the cytoplasm to the nucleus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (20): 11598-11603
- [13] Sawa H, Kobayashi T, Mukai K, et al. Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATO III gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis[J]. Int J Oncol, 2000,16:745-749
- [14] Peltier J, O'Neill A, Schaffer DV. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation [J]. Developmental Neurobiology, 2007, 67 (10) :1348-1361
- [15] Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, et al. Low-level expression of proapoptotic Bcl-2-interacting mediator in leukemic cells in patients with chronic myeloid leukemia; role of BCR/ABL, characterization of underlying signaling pathways, and expression by novel pharmacologic compounds[J]. Cancer Res, 2005,65:9436-9444

(上接第 4010 页)

- [4] Lehto M, Tienari J, Lehtonen S, et al. Subfamily III of mammalian oxysterol-binding protein (OSBP) homologues: the expression and intracellular localization of ORP3, ORP6, and ORP7 [J]. Cell Tissue Res, 2004, 315(1):39-57
- [5] Terhi Vihervaara, Maurice Jansen, Riikka-Liisa Uronen, et al. Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters [J]. Chem Phys Lipids, 2011, 164(6):443-450
- [6] Jessica P, Ryan J, Neale D. Characterization of the sterol-binding domain of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 reveals a novel role in vimentin organization [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(7): 1426-1437
- [7] Marcia V. Fournier, Fernanda C. Guimaraes, Marcos E. M. Paschoal, et al. Identification of a gene encoding a human oxysterol-binding protein-homologue: a potential general molecular marker for blood dissemination of solid tumors [J]. Cancer Res, 1999, 59 (15): 3748-3753
- [8] Henriques Silva N, Vasconcellos Fournier M, Pimenta G, et al. HLM/OSBP2 is expressed in chronic myeloid leukemia [J]. Int J Mol Med, 2003, 12(4): 663-666
- [9] Zhou T, Li S, Zhong W, et al. OSBP-related protein 8 (ORP8) impacts lipid homeostasis in vitro and in vivo by modulating the quantity of nuclear SREBPs [J]. PLoS One, 2011, 6(6):e21078
- [10] Ngo MH, Colbourne TR, Ridgway ND. Functional implications of sterol transport by the oxysterol-binding protein gene family [J]. Biochem. J, 2010, 429(1):13-24
- [11] Burgett Anthony W. G, Poulsen Thomas B, Wangkanont Kittikhun, et al. Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(9): 639-647
- [12] Zafar S, von Ahsen N, Oellerich M, et al. Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells [J]. J Proteome Res, 2011, 10(7):3123-3135
- [13] Yan D, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins [J]. Int Rev Cytol, 2008, 265:253-285