

LY294002对CML急变期细胞中Wnt/ β -catenin 信号通路的影响及其效应

刘张玲 胡 晶 黄峥兰 李 会 李亚娟 冯文莉*
(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 β -catenin在慢性粒细胞白血病急变过程中发挥着重要作用, 而其受BCR/ABL及其下游信号通路调控的具体分子机制尚未完全阐明。该研究旨在探讨PI3K-AKT信号通路对慢粒急变期细胞的影响及其对Wnt/ β -catenin信号通路的调控作用。采用PI3K-AKT信号通路的靶向抑制剂LY294002作用于慢粒急变期K562细胞, MTT法检测其对细胞增殖的影响, 甲基纤维素克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力, Western blot检测pAKT(Thr308)的表达变化, RT-PCR和Western blot分别检测 β -catenin及其下游靶基因c-myc、cyclinD1的mRNA和蛋白表达情况。结果显示, 10, 20, 40 μ mol/L的LY294002作用细胞24 h后, 抑制了K562细胞的增殖以及克隆形成能力, 该效应呈浓度依赖的方式。3种浓度的LY294002处理细胞后, PI3K-AKT信号通路明显被抑制, pAKT(Thr308)的蛋白表达明显减少; β -catenin的mRNA表达无明显改变, 但其蛋白水平依次减少; β -catenin的下游靶基因c-myc、cyclinD1的mRNA和蛋白水平均明显降低。综上所述, 抑制PI3K-AKT信号通路可抑制白血病K562细胞的增殖和克隆形成能力, 其机制可能与抑制Wnt/ β -catenin信号通路相关。

关键词 慢性粒细胞白血病; BCR/ABL; 急变期; β -catenin; PI3K-AKT; 信号通路

Effect of LY294002 on Wnt/ β -catenin Pathway in CML Blastic Cells

Liu Zhangling, Hu Jing, Huang Zhenglan, Li Hui, Li Yajuan, Feng Wenli*

(Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract β -catenin plays important roles in the progression of chronic myeloid leukemia blasts, whereas the relationship between β -catenin and the key pathways activated by BCR/ABL have not yet been elucidated. To investigate the impact of PI3K-AKT pathway on Wnt/ β -catenin signal pathway, PI3K-AKT inhibitor LY294002 was used in CML blastic cells K562. Cell growth was detected by MTT test. The ability of cell colony was assessed by colony-forming assay. The protein expression of pAKT (Thr308) was detected by Western blot. The mRNA and protein expressions of β -catenin and its down-stream targets c-myc and cyclinD1 were analyzed by RT-PCR and Western blot, respectively. As a result, LY294002 significantly inhibited K562 cell growth and colony-forming ability in a dose-dependent manner. Meanwhile, the protein levels of pAKT (Thr308) and β -catenin were decreased in a dose-dependent manner after LY294002 treatment for 24 h, while the mRNA of β -catenin was not affected. Compared with the control groups, the mRNA and protein levels of c-myc and cyclinD1 were also decreased obviously after PI3K inhibitor treatment. Our data indicated that blockade of PI3K-AKT signaling inhibited the

收稿日期: 2013-12-23 接受日期: 2014-03-07

重庆市基础与前沿研究计划一般项目(批准号: cstc2012jjA0004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485938, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

Received: December 23, 2013 Accepted: March 7, 2014

This work was supported by the Foundation for Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.cstc2012jjA0004)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485938, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

网络出版时间: 2014-05-26 15:43 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0426.html>

proliferation of CML blastic cells and the mechanism might be related to down-regulated expression of Wnt/ β -catenin pathway.

Key words chronic myeloid leukemia; BCR/ABL; blast crisis; β -catenin; PI3K-AKT; signaling transduction

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是起源于造血干细胞的恶性增殖性疾病,它以9号和22号染色体发生相互易位形成的BCR/ABL融合基因为发病特征,该基因编码的BCR/ABL融合蛋白具有高酪氨酸激酶活性,能够激活细胞内一系列的信号通路,从而使白血病细胞恶性增殖,凋亡受阻^[1]。其中PI3K-AKT为最重要的信号通路之一,在CML中异常激活,与该病的发生发展密切相关^[2]。CML在临床上分为慢性期、加速期和急变期,绝大部分CML病人最终进入急变期,预后极差。因此,阐明CML急变的分子机制具有重要意义。

β -catenin蛋白是Wnt信号通路的关键调控因子,参与细胞的增殖、分化以及干细胞的自我更新^[3]。研究提示, β -catenin在慢粒急变期病人中随着BCR/ABL的扩增,其表达量也随之增高,药物或基因抑制 β -catenin能够明显抑制慢粒的耐药以及进入急变期^[4-5]。但慢粒中BCR/ABL调控 β -catenin的具体分子机制尚不清楚。本实验拟探讨PI3K-AKT靶向抑制剂LY294002对慢粒急变期K562细胞的作用,以明确PI3K-AKT信号通路对慢粒急变期的影响及其对Wnt/ β -catenin通路的作用。

1 材料与方法

1.2 细胞和试剂

K562细胞由本实验室保存,用含有10%胎牛血清(Gibco公司)的RPMI 1640培养液常规培养,置于37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。LY294002、pAKT(Thr308)、总AKT和 β -catenin抗体购自于美国CST公司,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,c-myc、cyclinD1抗体来自Origene公司, β -actin抗体、辣根

过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG二抗购自Santa Cruz公司。MTT试剂、甲基纤维素、二甲基亚砜购自Sigma公司。

1.2 MTT法检测LY294002对K562细胞增殖能力的影响

取对数生长期细胞,按 5×10^3 /孔,将K562细胞加入96孔培养板中,实验组分别给予10, 20, 40 μ mol/L的LY294002处理,同时设置试剂对照组、空白对照组,每组设5个复孔,分别培养12, 24, 36 h后,再加入50 μ L 2 mg/mL MTT溶液,避光培养4 h, 2 000 r/min离心10 min后弃上清,每孔加入100 μ L二甲基亚砜,摇匀溶解后,在490 nm测量各孔的吸光值(D),并按以下公式计算抑制率:细胞增殖抑制率=[1-(处理组D值-试剂对照D值)/(空白对照组D值-试剂对照D值)]。

1.3 克隆形成实验检测LY294002对K562细胞克隆形成能力的影响

收集对数生长期的K562细胞,分别用不同浓度的LY294002处理24 h,经处理后的K562细胞按每孔300个细胞加入含0.9%甲基纤维素的24孔培养板中培养,每组设3个平行孔,培养10 d后计数克隆数,以50个细胞以上计为1个集落,比较各组克隆形成数的差异。

1.4 RT-PCR检测 β -catenin、c-myc、cyclinD1基因表达

收集对数生长期的K562细胞,分别用不同浓度的LY294002处理24 h后,常规提取总RNA、逆转录成cDNA,以其为模板进行PCR扩增。引物序列见表1,反应条件为:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s,共30个循环;72 °C再延伸5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪成像分析。

表1 扩增基因引物序列

Table 1 The sequence of PCR primers for each gene

基因 Genes	PCR产物长度(bp) Amplified fragments (bp)	上游引物(5'-3') Forward primers (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primers (5'-3')
β -catenin	141 bp	GTG TGG CGA CAT ATG CAG CT	CAA GAT CAG CAG TCT CAT TC
c-myc	164 bp	CAC ATC AGC ACA ACT ACG	TTC GCC TCT TGA CAT TCT
cyclinD1	107 bp	CTC GGT GTC CTA CTT CA	TCC TCG CAC TTC TGT TC
β -actin	225 bp	TGA AGT ACC CCA TCG AGC ACG GCA	GAT AGC ACA GCC TGG ATA GCA ACG

1.5 Western blot检测蛋白水平的表达

LY294002处理细胞后,提取细胞总蛋白测定其浓度,经8% SDS-PAGE胶电泳分离、转膜,分别孵一抗和IgG-HRP二抗,采用ECL化学发光法检测目的蛋白表达情况。Western blot条带通过Quantity One软件进行分析。

1.6 统计分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LY294002对K562细胞增殖能力的影响

MTT检测结果显示,10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ LY294002

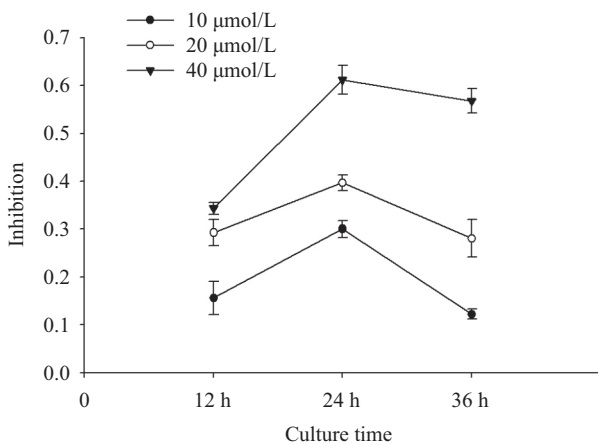


图1 MTT检测不同浓度的LY294002处理K562细胞12, 24, 36 h后细胞的生长情况

Fig.1 K562 cells growth was determined by MTT assay after treated with diferent concentrations of LY294002 for 12, 24, 36 h

对K562细胞均有生长抑制作用,处理12 h后出现明显的抑制作用,24 h抑制效率最强,36 h抑制率反而下降,说明PI3K抑制剂处理K562细胞24 h时抑制作用最佳,并且呈浓度依赖性(图1)。

2.2 LY294002对K562细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验的结果显示,10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002处理K562细胞后,处理组的克隆数明显减少。K562空白对照组的克隆数为 196 ± 13 ,各处理组克隆数分别为: 165 ± 10 、 65 ± 12 、 46 ± 12 ,与对照组相比,差异均具有统计学意义($P<0.05$)(图2)。

2.3 LY294002对PI3K-AKT信号通路的抑制作用

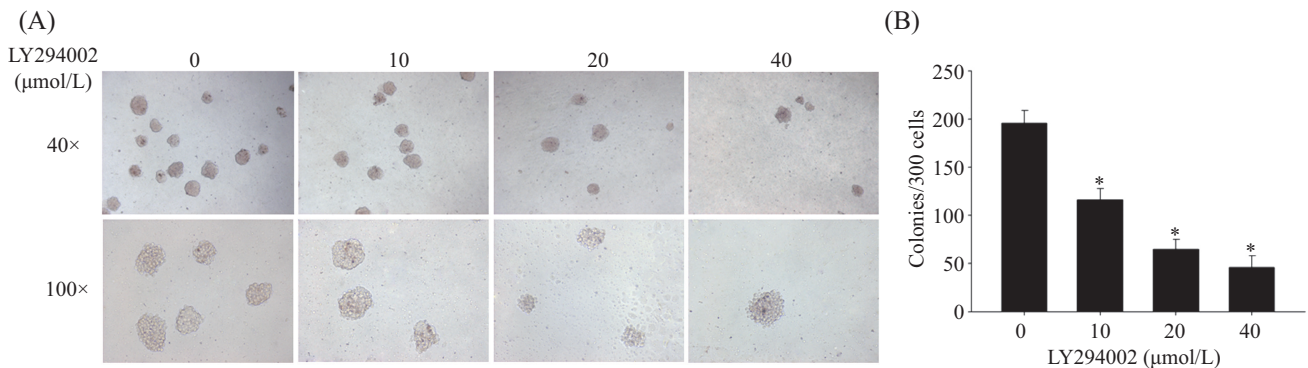
Western blot结果显示,用10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002处理K562细胞24 h后,PI3K-AKT信号通路被抑制,pAKT(Thr308)的蛋白表达水平明显减少,呈浓度依赖性(图3)。

2.4 LY294002对 β -catenin mRNA和蛋白表达的影响

RT-PCR和Western blot实验结果显示,用10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002处理K562细胞24 h后, β -catenin的mRNA水平并没有明显的变化(图4A),而 β -catenin的蛋白表达水平明显降低(图4B),处理组与对照组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 LY294002减少 β -catenin下游靶基因c-myc和cyclinD1的mRNA和蛋白表达

K562细胞经10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002处理24 h后,c-myc和cyclinD1的mRNA和蛋白表达明显下降(图5)。通过灰度值比较可见,随着药物浓度增加,c-myc和cyclinD1的蛋白表达逐渐减少($P<0.05$)。

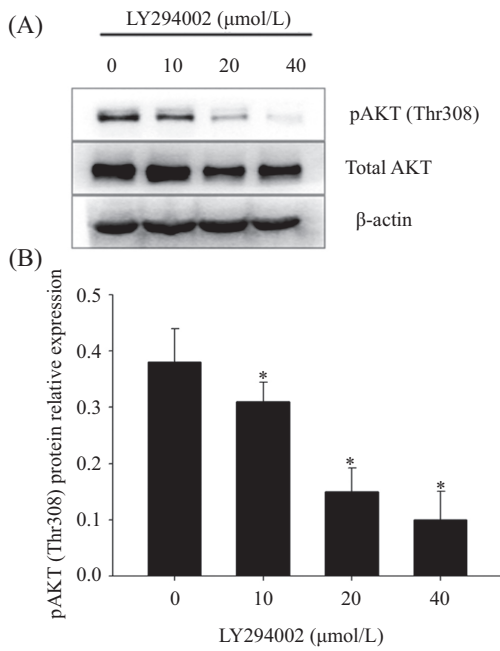


A: 经LY294002处理的K562细胞培养10 d后,显微镜下克隆形态; B: 克隆形成数统计图, * $P<0.05$, 与对照组比较。

A: K562 cells were treated with LY294002 and cultured for 10 days, the image of colony forming was shown in inverted microscope; B: histogram and statistics showed the number of colonies per 300 plated cells, * $P<0.05$ vs control group.

图2 LY294002对K562细胞克隆形成能力的影响

Fig.2 The effect of LY294002 on the colony forming ability of K562 cells

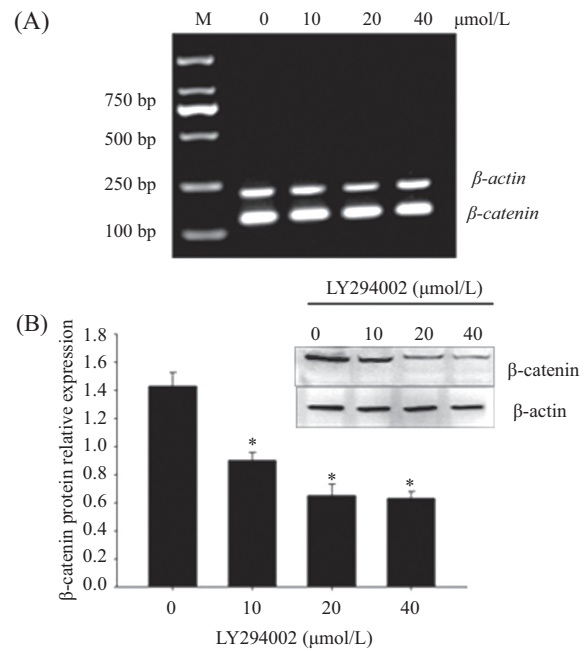


A: Western blot检测pAKT(Thr308)的蛋白表达情况; B: pAKT(Thr308)的相对表达; β -actin为内参, * P <0.05, 与对照组比较。

A: the expression of pAKT (Thr308) protein was detected by Western blot; B: the relative expression of pAKT (Thr308) to β -actin. * P <0.05 vs control group.

图3 LY294002作用K562细胞后pAKT(Thr308)和总AKT的蛋白表达变化

Fig.3 The protein levels of pAKT (Thr308) and total AKT in LY294002 treated K562 cells

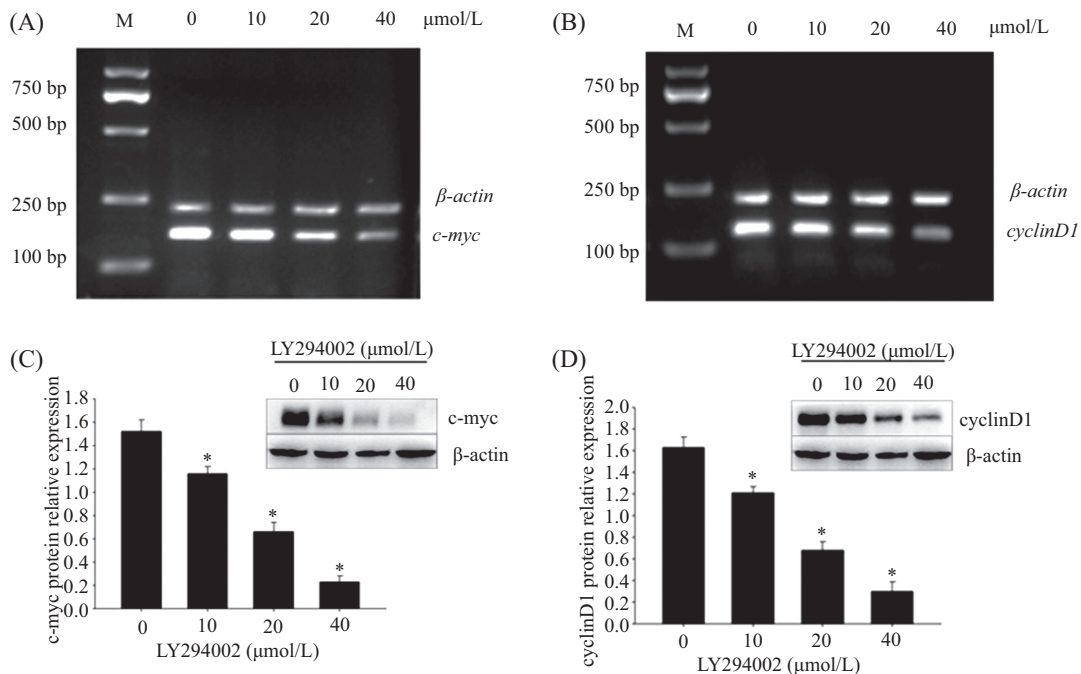


A: RT-PCR检测LY294002处理K562细胞24 h后 β -catenin的mRNA表达变化, M: DNA marker DL2000; B: Western blot检测 β -catenin的蛋白表达情况; β -actin为内参, * P <0.05, 与对照组比较。

A: the expression of β -catenin mRNA was detected by RT-PCR; M: DNA marker DL2000; B: the expression of β -catenin protein was detected by Western blot. β -actin served as the loading control. * P <0.05 vs control group.

图4 LY294002处理对K562细胞中 β -catenin基因和蛋白表达的影响

Fig.4 Influence of LY294002 on the mRNA and protein expressions of β -catenin in K562 cells



A: *c-myc*的mRNA表达变化; B: *cyclinD1*的mRNA表达变化; C: *c-myc*的蛋白表达情况; D: *cyclinD1*的蛋白表达情况。 β -actin为内参, * P <0.05, 与对照组比较。
A: the mRNA level of *c-myc*; B: the mRNA level of *cyclinD1*; C: the protein expression of *c-myc*; D: the protein expression of *cyclinD1*. β -actin served as the loading control. * P <0.05 vs control group.

图5 LY294002作用K562细胞24 h后*c-myc*和*cyclinD1*基因和蛋白表达变化

Fig.5 The mRNA and protein levels of *c-myc* and *cyclinD1* in K562 cells after pre-treated with LY294002 for 24 h

3 讨论

Wnt/ β -catenin通路是一条在生物进化中极为保守的信号通路,在决定细胞的黏附、增殖、凋亡、分化和自我更新等功能中发挥着重要作用^[6]。其中 β -catenin为最重要的效应分子,它在蛋白水平上受Wnt通路的调控。通常情况下,它的合成增加以及降解减少都可以使胞浆中的 β -catenin大量积累从而转位入核,与转录因子LEF/TCF-4结合,激活c-myc、cyclinD1等下游效应分子的转录,使细胞恶性转化^[7-8]。既往对 β -catenin的研究主要集中于BCR/ABL本身与 β -catenin的直接或者间接作用,并未从信号转导的角度深入到BCR/ABL下游信号通路对 β -catenin的作用研究。鉴于BCR/ABL在CML发生发展中的作用,探明BCR/ABL下游信号通路中的关键分子对 β -catenin的调节作用,对于理解CML急变的具体分子机制至关重要。

PI3K-AKT信号通路是BCR/ABL下游最重要的信号通路之一,它的异常激活与CML急变密切相关。该通路的重要成分AKT的激活可以使GSK-3 β 失活,而GSK-3 β 的失活在慢粒急变期中已被证明可以促进 β -catenin的激活^[9]。此外,Brian等^[10]发现,在前列腺癌细胞中Osteopontin通过激活AKT上调了 β -catenin的表达,使前列腺癌细胞凋亡受阻。Andrew等^[11]也报道,HCV病毒的NS5A蛋白通过激活PI3K-AKT通路而致GSK-3 β 失活,从而激活 β -catenin导致肝癌的发生。因此,我们推测,在CML中PI3K-AKT信号通路可能通过Wnt/ β -catenin通路影响细胞的增殖与存活。

本研究采用PI3K-AKT信号通路的特异性抑制剂LY294002作用于慢粒急变期细胞株K562细胞,通过抑制BCR/ABL下游的关键信号通路之一,从而探讨其对慢粒细胞生长增殖以及克隆形成能力的影响,同时检测其对 β -catenin及其下游靶基因表达量的影响。结果发现,LY294002以浓度依赖性方式抑制K562细胞的增殖以及克隆形成,其原因与显著降低 β -catenin的蛋白表达相关,然而对 β -catenin的mRNA水平并没有明显影响,说明PI3K-AKT通路抑制剂可能从翻译水平而非转录水平影响 β -catenin的生物学活性。此外,随着LY294002浓度的增加,

Wnt/ β -catenin通路的下游靶分子c-myc和cyclinD1的mRNA和蛋白表达量也依次减少,进一步说明了PI3K-AKT信号通路对Wnt/ β -catenin通路的抑制作用。

综上所述,本研究从信号转导通路角度首次在慢粒急变期细胞中证明,PI3K-AKT信号通路的特异性抑制剂LY294002能够通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路的活性,从而抑制细胞的增殖和克隆形成,实验结果为进一步研究CML急变的具体分子机制提供了新思路。

参考文献 (References)

- 1 Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113(8): 1619-30.
- 2 Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK//STAT, Raf//MEK//ERK, PI3K//Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2000; 18(2): 189-218.
- 3 de Sousa EMF, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17(4): 647-53.
- 4 Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, *et al.* Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *New Engl J Med* 2004; 351(7): 657-67.
- 5 Heidel Florian H, Bullinger L, Feng Z, Wang Z, Neff Tobias A, Stein L, *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of β -catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 412-24.
- 6 Staal FJT, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: A WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(1): 21-30.
- 7 He T-C, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281(5382): 1509-12.
- 8 Tetsu O, McCormick F. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398(6726): 422-6.
- 9 Coluccia AML, Vacca A, Duñach M, Mologni L, Redaelli S, Bustos VH, *et al.* Bcr-Abl stabilizes β -catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 2007; 26(5): 1456-66.
- 10 Robertson BW, Chellaiah MA. Osteopontin induces β -catenin signaling through activation of Akt in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 2010; 316(1): 1-11.
- 11 Street A, Macdonald A, McCormick C, Harris M. Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular β -catenin and stimulation of β -catenin-responsive transcription. *J Virol* 2005; 79(8): 5006-16.