

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.018

· 短篇论著 ·

整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的 PI3K-AKT 信号分子在 CML 发病机制中的作用 Role of integrin $\alpha 5 \beta 1$ -mediated PI3K-AKT signal pathway in pathogenesis of chronic myeloid leukemia

牛志云¹, 刘英杰³, 成志勇², 张学军¹, 潘 峻¹(1. 河北医科大学第二医院 血液内科, 河北 石家庄 050000; 2. 石家庄市第三医院 内八科, 河北 石家庄 050011; 3. 邯郸市第一医院 血液内科, 河北 邯郸 056002)

[摘要] 目的: 研究整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的 PI3K-AKT 信号转导通路在慢性髓细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)发病机制中的作用。方法: 流式细胞术检测不同剂量抗整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 单抗(Anti- $\alpha 5 \beta 1$)作用后白血病 K562 细胞的凋亡率, Western blotting 检测健康志愿者、CML 急变期患者、K562 细胞和 Anti- $\alpha 5 \beta 1$ 处理的 K562 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白的表达水平。结果: Anti- $\alpha 5 \beta 1$ 可诱导 K562 细胞凋亡, 并呈剂量依赖性。与健康志愿者比较, CML 急变期患者骨髓单个核细胞和 K562 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白的表达水平明显增高($P < 0.05$); Anti- $\alpha 5 \beta 1$ 处理后, K562 细胞内 PI3K、AKT 蛋白表达水平明显降低, 其磷酸化水平也下降($P < 0.05$)。结论: 整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 可能通过影响 PI3K-AKT 信号转导通路中关键分子 PI3K 和 AKT 的表达水平诱导 CML 祖细胞凋亡耐受, 参与了 CML 的发生、发展过程。

[关键词] 整合素; 慢性髓细胞白血病; PI3K; AKT

[文献标志码] A **[文章编号]** 1007-385X(2010)02-0210-03

慢性髓细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病, 其发病与患者体内的 P210 融合蛋白的活性密切相关。已证实^[1], P210 蛋白具有很强的酪氨酸激酶活性, 可磷酸化激活细胞内多种信号分子, 启动一系列异常信号转导通路, 使 CML 祖细胞增殖失控、凋亡耐受和分化受阻。研究^[2-3]表明, 广泛存在于肿瘤细胞表面的整合素受体及其引发的异常信号转导机制在肿瘤的转移、浸润及细胞的增殖和凋亡中起着重要作用。本研究通过比较健康志愿者骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNC)、CML 急变期患者 BMMNC 及 CML 急变细胞株 K562 细胞内 PI3K 和 AKT 蛋白的表达水平, 探讨整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的 PI3K-AKT 信号通路在 CML 发病机制中的作用, 以期对白血病的靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞株

小鼠抗人整合素 $\alpha 5$ 单克隆抗体(Anti- $\alpha 5$, 小鼠 IgG1)为 BD 公司产品, 小鼠抗人整合素 $\beta 1$ 单克隆抗体(Anti- $\beta 1$, 小鼠 IgG1)、兔抗 PI3Kp85(Z-8)多克隆抗体、小鼠抗 AKT 单克隆抗体、兔抗 p-AKT(Ser473)多克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG 单克隆抗体均由美国 Santa Cruz 公司提供。K562 细胞株由河北医科大学细胞生物教研室馈赠。

采集骨髓单个核细胞的健康志愿者和 CML 急变期患者的临床资料: 本院血液科门诊的健康志愿

者 15 人, 8 位男性、7 位女性, 年龄在 21 ~ 65 岁, 中位年龄为 40 岁。本科病房 CML 急变期患者 15 例, 7 例男性、8 例女性, 年龄范围 19 ~ 68 岁, 中位年龄 38 岁; 6 例为急粒变, 3 例为急淋变, 3 例为急单变, 3 例为急红变患者。病例诊断均符合 FAB 诊断标准。所有参与试验人员均签署知情同意书, 并获院伦理委员会审查批准。

1.2 细胞培养

将健康志愿者和 CML 急变期患者的骨髓单个核细胞以及 K562 细胞置于含 10% 灭活胎牛血清(FBS)、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺、100 μ g/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。实验使用对数生长期细胞, 锥虫蓝染色法检测拒染率均在 95% 以上。调整 K562 细胞密度至 5 $\times 10^6$ 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l。实验组分为 2、4、8 μ g/ml Anti- $\alpha 5 \beta 1$ 3 个亚组, 对照组加入同型对照抗体(小鼠 IgG)孵育。每组 3 个复孔, 均孵育 48 h。

1.3 FCM 检测 Anti- $\alpha 5 \beta 1$ 单抗诱导 K562 细胞凋亡

分别收集各组细胞 1 $\times 10^6$ 个, 离心弃上清, 冷 PBS 洗 2 遍, 加入 5 μ l PI、10 μ l FITC 及 100 μ l 缓冲

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(No. c200500745)。Project supported by the Natural Science of Foundation of Hebei Province (No. c200500745)

[作者简介] 牛志云(1974 -), 女, 河北省石家庄市人, 博士, 主治医师, 主要从事白血病信号转导方面的研究

[通信作者] 潘峻(PAN Ling, corresponding author), E-mail: lingpan20002000@yahoo.com.cn

液,上机检测凋亡细胞。

1.4 Western blotting 检测 BMMNC 和 K562 细胞的 PI3K 和 AKT 蛋白水平

制备细胞总蛋白,SDS-PAGE 后转膜,按 0.1 ml/cm^2 加入一抗溶液,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗,孵育 2 h,染色观察。

1.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件,组间差异比较采用单因素方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 单抗诱导 K562 细胞的凋亡

FCM 结果显示,作用 24 h 时与对照组相比,2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ Anti- $\alpha 5\beta 1$ 三组的凋亡细胞率分别增加了 1.8 倍、2.4 倍和 3.1 倍,有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);作用 48 h 时 2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ Anti- $\alpha 5\beta 1$ 三组的凋亡细胞率分别增加了 2.3 倍、3.6 倍和 4.2 倍 ($P < 0.05$)。两个时间点的相同剂量组相比分别增加了 39.43%、78.51%、108.96% 和 88.56% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Anti- $\alpha 5\beta 1$ 诱导 K562 细胞凋亡的作用存在时间依赖性和剂量依赖性(表 1)。

表 1 比较不同质量浓度整合素 $\alpha 5\beta 1$ 单抗作用 24 h 和 48 h 诱导 K562 细胞的凋亡 (%)

Anti- $\alpha 5\beta 1$ ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	24 h	48 h
0	2.46 ± 0.42	$3.43 \pm 0.28^\Delta$
2	$4.42 \pm 0.40^*$	$7.89 \pm 0.50^{*\Delta}$
4	$5.91 \pm 0.27^{**}$	$12.35 \pm 0.97^{***\Delta\Delta}$
8	$7.63 \pm 0.61^{**}$	$14.41 \pm 0.51^{***\Delta}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较; $^\Delta P < 0.05$,
 $^\Delta\Delta P < 0.01$ 与 24 h 同质量浓度组比较

2.2 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 单抗下调 K562 细胞 PI3K 的表达

Western blotting 检测显示,与健康志愿者 BMMNC 相比,K562 细胞和 CML 急变期患者 BMMNC 中 PI3K 蛋白的表达水平增高了 86.65% 和 67.26% ($P < 0.01$)。K562 细胞经 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 处理 48 h 后,PI3K 蛋白的表达水平下降了 42.95% ($P < 0.05$,图 1)

2.3 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 单抗下调 K562 细胞 AKT 的表达

与健康志愿者 BMMNC 中 AKT 蛋白表达水平相比,K562 细胞和 CML 急变期患者 AKT 表达水平升高了 74.68% 和 72.59% ($P < 0.01$)。K562 细胞

AKT 蛋白表达水平经 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 单抗作用后下降了 37.08% ($P < 0.05$,图 1)。

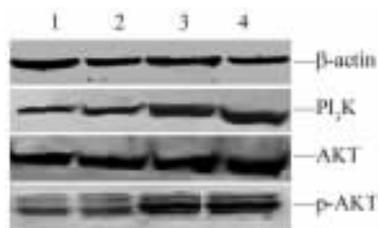


图 1 各组 PI3K、AKT 和 p-AKT 蛋白的表达

1: 健康志愿者; 2: Anti- $\alpha 5\beta 1$ 处理的 K562 细胞;
3: K562 细胞; 4: CML 急变期患者

2.4 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 单抗下调 K562 细胞 AKT 蛋白的磷酸化水平

Western blotting 分析显示,与健康志愿者 BMMNC 的 p-AKT 蛋白表达水平相比,K562 细胞和 CML 急变期患者中 p-AKT 表达水平分别增加了 79.16% 和 83.17% ($P < 0.01$)。K562 细胞经 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 作用 48 h 后,p-AKT 蛋白表达水平下降了 32.51% ($P < 0.05$,图 1)。

3 讨论

整合素作为细胞基质(ECM)的受体,参与了细胞的生长、增殖及凋亡的调节。研究^[2-3]显示,整合素与 ECM 结合后导致细胞内原癌基因的持续激活,抑制细胞的凋亡活动,该过程与 PI3K-AKT 信号通路密切相关^[4]。PI3K 是磷酸酰肌醇-3 激酶家族,AKT 是 PI3K 下游的靶蛋白,它们与细胞增殖、抗凋亡和细胞恶性转化等有关,与 CML 祖细胞的增殖、抗凋亡和黏附缺陷密切相关^[5-6]。

研究^[7-8]证实,整合素 $\beta 1$ 亚家族表达于大多数骨髓 CD34⁺ 细胞上,并在 CML 祖细胞(ph⁺ 细胞)上高表达。这种高表达状态可能与 CML 的发病息息相关,通过 FAK-MAPK 或 PI3K-AKT 信号途径上调核内某些基因的表达,促使细胞发生白血病转化、异常增殖和凋亡受抑^[9-11]。因此,阻断这些信号通路的源头——整合素的功能,其介导的凋亡耐受必然受到影响。

本实验 FCM 结果显示,用 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 处理 K562 细胞后可诱导其发生凋亡,并存在时间依赖性和剂量依赖性,提示整合素可能参与了 K562 细胞凋亡过程。实验结果还显示,K562 细胞和 CML 患者的 BMMNC 较健康志愿者的 BMMNC 中 PI3K、AKT 和 p-AKT 表达水平明显升高,Anti- $\alpha 5\beta 1$ 处理后 K562 细胞内上述分子表达水平显著下降。已有研

究^[12-14]表明,PI3K 激活后通过活化 AKT,磷酸化激活下游一系列分子如 Bad、NF- κ B、caspase-9、survivin 等导致 Bcl-2 转录增强,保护细胞不发生凋亡。这充分表明整合素可能是通过其介导的 PI3K-AKT 信号通路诱导 K562 细胞凋亡耐受的,阻断此通路可促使细胞发生凋亡。研究^[15]显示, $\alpha 5\beta 1$ 可诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,应用 $\alpha 5\beta 1$ 抗体可诱导肺腺癌 GLC-82 细胞发生凋亡。梁后杰等^[16]应用 $\beta 1$ 抗体阻断整合素与基质的结合,发现肺腺癌耐药细胞株 A549-ADR 细胞内 Bcl-2/bax 比值和细胞凋亡率明显升高,同时细胞对药物的敏感性也显著增加。上述报道与我们的研究结果一致,均证实 PI3K-AKT 信号转导通路在 CML 的发病机制占有重要地位。本研究认为,CML 发生时,祖细胞表面的整合素受体出现高表达,通过 P210 融合蛋白的高酪氨酸激酶活性大量活化整合素介导的 PI3K-AKT 信号转导通路中的关键酶,使 CML 祖细胞大量存活,耐受凋亡机制,并大量涌向外周血引起 CML 发病,但这仍需要进一步证实。

[参 考 文 献]

[1] Verfaillie CM, Hurley R, Lundell BI, Zhao C, Bhatia R. Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors [J]. *Acta Haematol*, 1997, 97 (1/2): 40-52.

[2] Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling [J]. *Science*, 1999, 285(5430): 1028-1032.

[3] Mc-Cubrey JA, Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell WH, Wong EW, *et al.* Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2007, 47: 64-103.

[4] Arcaro A, Guerreiro AS. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications [J]. *Curr Genomics*, 2007, 8(5): 271-306.

[5] Li Y, Clough N, Sun X, Yu W, Abbott BL, Hogan CJ, *et al.* Bcr-Abl induces abnormal cytoskeleton remodeling, beta1 integrin clustering and increased cell adhesion to fibronectin through the Abl interactor 1 pathway [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 8):

1436-1446.

[6] Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability [J]. *Oncogene*, 2002, 21(56): 8591-8604.

[7] LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations [J]. *Drug Resist Updat*, 2008, 11(1/2): 32-50.

[8] Bhatia R, Verfaillie CM. Inhibition of BCR/ABL expression with antisense oligodeoxynucleotides restores beta1 integrin-mediated adhesion and proliferation inhibition in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors [J]. *Blood*, 1998, 91(9): 3414-3422.

[9] Reagan-Shaw S, Ahmad N. RNA interference-mediated depletion of phosphoinositide 3-kinase activates forkhead box class O transcription factors and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 1062-1069.

[10] Kawakami H, Tomita M, Okudaira T, Ishikawa C, Matsuda T, Tanaka Y, *et al.* Inhibition of heat shock protein-90 modulates multiple functions required for survival of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and adult T-cell leukemia cells [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8): 1811-1820.

[11] Martelli AM, Nyäkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2006, 20(6): 911-928.

[12] Fayard E, Gill J, Paolino M, Hynx D, Holländer GA, Hemmings BA. Deletion of PKB alpha/Akt1 affects thymic development [J]. *PLoS One*, 2007, 2(10): e992.

[13] Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates Bcl-2 transcription [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30): 27757-27763.

[14] 王东海, 王建祥. PI3K/Akt 信号通路异常与白血病 [J]. *国际输血及血液学杂志*, 2006, 29(1): 12-24.

[15] 许德顺, 张蕴利, 王莹, 等. $\alpha 5\beta 1$ 整合素亚基在肺癌细胞凋亡中作用的实验研究 [J]. *锦州医学院学报*, 2003, 24(6): 1-3.

[16] 梁后杰, 李德明, 胡绍毅, 等. A549-ADR 与纤维连接蛋白结合后对其耐药性的影响 [J]. *重庆医学*, 2003, 32(6): 704-705.

[收稿日期] 2009 - 11 - 11 [修回日期] 2010 - 02 - 18
 [本文编辑] 王莹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 封二
 德国美天旆生物技术有限公司 封三
 碧迪医疗器械有限公司 封四
 上海先声药业有限公司 前插页 I
 上海医元生物基因发展有限公司 前插页 II