论著

文章编号:1000-5404(2005)21-2118-03

靶向阻断STAT5对白血病K562细胞周期的影响

史 梅[1],冯文莉[1],王小中[1],曾建明[1],陈 敏[1],黄宗干[2] (重庆医科大学:[1]检验系临床血液教研室,[2]临床学院血液科,重庆 400016)

提 要:目的 通过应用诱骗寡核苷酸(Decoy ODNs)抑制信号转导因子和转录激活因子5(signal transducers and activators of transcription 5, STAT5)信号转导途径,观察对白血病K562细胞细胞周期的影响,初步探讨其中的分子机制。**方法** 体外设计合成STAT5 Decoy ODNs,在脂质体的介导下转染K562细胞,FCM检测细胞周期,用RT-PCR和Western blot方法检测STAT5下游基因细胞周期素D1(cyclin D1)和c-myc的表达。**结果** Decoy ODNs作用K562细胞24 h后的细胞周期显示,S期细胞由(48.71±5.42)%减低为(31.94±2.35)%,G_0/G_1期细胞由(40.83±5.20)%增加为(61.39±2.18)%;而错配寡核苷酸(mutant ODNs)对细胞周期没有明显影响。RT-PCR实验和Western blot实验证实Decoy ODNs作用引起STAT5下游基因cyclin D1和c-myc mRNA和蛋白表达下调。**结论** STAT5 Decoy ODNs能抑制细胞G_1/S转换而影响细胞周期进程,其作用机制可能与Decoy ODNs下调STAT5下游cyclin D1和c-myc基因的表达有关。

关键词: 细胞周期;STAT5;转录因子诱骗策略;K562细胞

中图法分类号: R394.3; R730.23; R733.7 **文献标识码:** A

Effect of STAT5 Decoy ODNs on cell cycle of K562 cells

SHI Mei[1], FENG Wen-li[1], WANG Xiao-zhong[1], ZENG Jian-ming[1], CHEN Min[1], HUANG Zong-gan[2] ([1]Department of Clinical Laboratory Medicine, [2]Department of Hematology, Clinical College, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To use transcription factor decoy to inhibit STAT5 signaling pathway of K562 cells and observe the effect of Decoy ODNs on cell cycle and investigate the related molecular mechanisms. **Methods** STAT5 Decoy ODNs, designed and synthesized *in vitro*, was transfected into K562 cells mediated by cationic lipid. The cell cycle in K562 cells was determined by FCM. RT-PCR and Western blotting was used to determine the effects of STAT5 Decoy ODNs on the expression of cyclin D1 and c-myc. **Results** After treated with Decoy ODNs for 24 h, the percentage of S phase cells decreased from (48.71±5.42)% to (31.94±2.35)%, while the percentage of G_0/G_1 phase cells increased from (40.83±5.20)% to (61.39±2.18)%. The mutant ODNs did not affect the cell cycles significantly. STAT5 Decoy ODNs had decreased the mRNA expression of cyclin D1 and c-myc by RT-PCR and the protein expression of cyclin D1 and c-myc by Western blotting. **Conclusion** STAT5 Decoy ODNs could affect the cell cycle progress of K562 cells. The mechanism probably was that STAT5 Decoy ODNs down-regulated the mRNA and protein expression of cyclin D1 and c-myc.

Key words: cell cycle; STAT5; transcription factor decoy; K562 cell

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)发病的分子基础是t(9;22)(q34;q11)形成BCR/ABL融合基因,编码产生具有强烈酪氨酸激酶活性的BCR/ABL融合蛋白,由此异常激活信号转导途径,引起细胞增殖失控、凋亡受抑、粘附异常,导致肿瘤的发生[1]。现在对慢粒发病的分子基础和信号转导研究表明:STAT5信号转导途径在CML发病中居于十分重要的地位。BCR/ABL融合蛋白可直接激活STAT5途径,使细胞发生恶性转化[2,3]。转录因子诱骗策略(transcription factor decoy)将含有某一转录因子的结合序列的双链脱氧寡核苷酸(Decoy ODNs)转染进入细胞,竞争性结合转录因子,而抑制相应的靶基

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270574)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270574)

作者简介: 史 梅(1976-),女,四川省西昌市人,硕士研究生,检验师,主要从事白血病分子机制和基因治疗方面的研究,现在常州市第一人民医院血液科。E-mail:shimeim2002@sina.com.cn

通讯作者: 冯文莉,电话:(023)66827978,E-mail: fengwlcqmu@sina.com

收稿日期: 2004-07-06;**修回日期:** 2004-11-12

因的表达，是一种研究基因转录调控和进行基因治疗的新的手段[4]。本研究运用体外设计合成的 Decoy ODNs 抑制 STAT5 信号转导途径，观察对白血病 K562 细胞周期的影响，并初步探讨其分子机制。

1　材料与方法

1.1　材料

lipofectin 脂质体：Invitrogen 公司产品。cyclin D1 抗体：Santa Cruz Biotechnology 产品。c-myc 抗体：Santa Cruz Biotechnology 产品。actin 抗体：Santa Cruz Biotechnology 产品。

1.2　STAT5 Decoy ODNs 的设计和合成

分别设计合成 STAT5 Decoy ODNs 的两条链，正义链：5′-AGATTTCTAG GAATTCAAATC-3′；反义链：5′-GATTTGAATTC-CTAGAAATCT-3′，下划线部分为 STAT5 所识别的一致性序列。Mutant ODNs 序列：正义链：5′-AGATACTAGTGTATTCAAATC-3′；反义链：5′-GATTTGAA TACACTAGTATCT-3′，下划线部分为错配碱基。以上序列全硫代修饰，由上海博亚公司合成并纯化。溶于无菌 TE 溶液，分别退火形成双链，置于 4 ℃保存。

1.3　细胞培养

K562 细胞为本室冻存。细胞用含 10% 灭活小牛血清的 PRMI 1640 培养液培养于含 5% CO_2 的 37 ℃恒温孵箱中，常规换液传代，实验前 24 h 换液，取生长期细胞做实验。

1.4　Decoy ODNs 转染

参照 lipofectin 说明书中悬浮细胞瞬时转染操作步骤，略有改动。寡核苷酸和脂质体按照 1∶4 比例在两管中以无血清 PRMI1640 中稀释，静置 30 min 后将二者轻轻混匀，静置 15 min。加入以无血清 PRMI1640 洗涤并调整好细胞数的 K562 细胞悬液，轻轻混匀置 37 ℃孵育 4～6 h，加入含 10% FCS 的 1640 培养液继续培养。

1.5　细胞周期测定

以 15 μmol Decoy ODNs 处理 1×10^6 个 K562 细胞，24 h 后收集细胞，PBS 洗两次后，70% 乙醇中固定过夜，上机前洗去乙醇，加入 PCB 溶液低渗处理室温 30 min，离心去上清，加入 50 μg/ml RNAse A 消化 30 min，再加入终浓度为 50 μg/ml 的 PI 染液室温避光孵育 25 min，用 FCM 检测。

1.6　RT-PCR 检测 STAT5 下游基因的表达

引物序列及 PCR 扩增产物长度见表 1，引物由上海生物工程公司合成并纯化。

表 1　PCR 引物

Tab 1　PCR primer

Gene	Primer sequences	Product size (bp)
cyclin D1	5′-CTGGCCATGAACTACCTGGA-3′	483
	5′-GTCACACTTGATCACTCTGG-3′	
c-myc	5′-CCAGCAGCGACTCTAAGG-3′	344
	5′-CCAAGACGTTGTGTGTTC-3′	
GAPDH	5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′	195
	5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3′	

收集转染 15 μmol/L Decoy ODNs 处理组和 Mutant ODNs 处理组 24 h 后 K562 细胞，用 Trizol 核酸提取试剂盒抽提各组细胞中的总 RNA，紫外分光光度计测定 RNA 纯度，并计算其含量。取 2 μg 总 RNA，加入 OligodT 在 MMLV 逆转录酶作用下进行逆转录，反应体系为 25 μl，反应条件为 42 ℃ 60 min，产物 -20 ℃保存备用。PCR 反应取 2 μl 逆转录产物作为模板，分别加入 10 × PCR 缓冲液，0.25 μmol/L dNTPs，0.5 μmol/L 引物，*Taq* 酶 1U，加去 RNase 水至反应总体系为 30 μl。扩增条件分别为 c-myc：94 ℃ 5 min，94 ℃ 45 s，58 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环后，72 ℃延伸 10 min；cyclin D1：94 ℃ 5 min，94 ℃ 45 s，67 ℃ 1 min，30 个循环，72 ℃ 10 min；GAPDH：94 ℃ 5 min，95 ℃ 45 s，58 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，27 个循环后，72 ℃延伸 10 min。PCR 结束后，分别取以上 PCR 产物各 5 μl 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察并保存结果，分析密度。

1.7　Western blot 检测

收集 15 μmol/L Decoy ODNs 处理 48 h 后的 K562 细胞和对照 K562 细胞，用细胞裂解液提取细胞总蛋白，Bradford 法定量细胞蛋白总量。100 ℃变性 5 min，等量蛋白上样。10% SDS-PAGE 电泳后，转膜。5% 脱脂奶室温封闭 2 h，分别加一定浓度稀释的一抗孵育过夜。PBS 洗涤 3 次。再与辣根酶标记二抗孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次，加 DAB 显色，在 Bio-Rad 凝胶成像系统上分析密度。实验独立重复 3 次，结果以平均值实验独立重复 3 次。

1.8　统计学分析

以 SPSS 10.0 软件分析，多组数据间用单因素方差分析，两两比较用 t 检验。

2　结果

2.1　Decoy ODNs 对 K562 细胞周期的影响

Decoy ODNs 处理细胞 24 h 后，G_0/G_1 期细胞比例增高，S 期细胞比例下降，结果如表 2 所示；Decoy ODNs 处理后阻滞了细胞周期由 G_0/G_1 期向 S 期推进。Mutant ODNs 未明显影响细胞周期进程。

表 2　Decoy ODNs 对 K562 细胞周期的影响 [$(\bar{x}\pm s)$%]

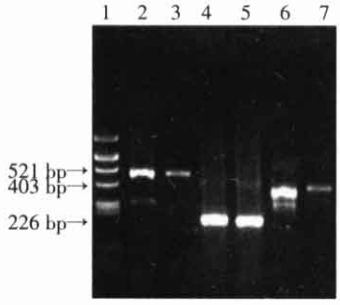
Tab 2　Effect of Decoy ODNs on K562 cell cycle [$(\bar{x}\pm s)$%]

Groups	Cell cycle		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	40.83 ± 5.20	48.71 ± 5.42	10.48 ± 1.42
Mutant ODNs	45.52 ± 3.61	45.02 ± 3.65	9.68 ± 0.56
Decoy ODNs	61.39 ± 2.18 *△	31.94 ± 2.35 *△	6.66 ± 1.08 *△

*：$P<0.05$，*vs* control；△：$P<0.05$，*vs* mutant ODNs

2.2　RT-PCR 检测 STAT5 下游基因 cyclin D1 和 c-myc mRNA 表达

Decoy ODNs 转染 K562 细胞 24 h，收集细胞做 RT-PCR，如图 1 所示：cyclin D1 和 c-myc mRNA 在 Decoy ODNs 处理后表达下调，经密度分析后，以各目的条带和内参 GAPDH 的密度相比。cyclin D1 下降了 48.97%，c-myc 下降了 58.70%。



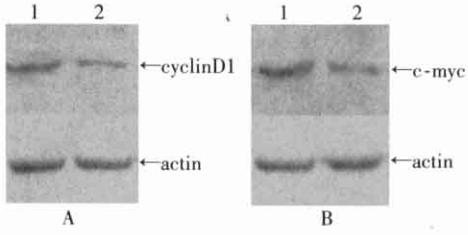
1: Marker; 2: cyclin D1 gene in control K562 cells; 3: cyclin D1 gene in Decoy ODNs treated K562 cells; 4: GAPDH gene in control K562 cells; 5: GAPDH gene in Decoy ODNs treated K562 cells; 6: c-myc gene in control K562 cells; 7: c-myc gene in Decoy ODNs treated K562 cells

图1 RT-PCR 检测 K562 细胞 cyclin D1 和 c-myc mRNA 表达

Fig 1 The expression of cyclin D1 and c-myc mRNA in K562 cells by RT-PCR

2.3 Western blot 检测 STAT5 下游基因 cyclin D1 和 c-myc 的蛋白表达

Decoy ODNs 处理 48 h 后，cyclin D1 和 c-myc 蛋白表达水平都不同程度下调，见图2。将各目的条带与内参 actin 的密度相比，Decoy ODNs 作用 48 h 后，cyclin D1 下降了 40.84%，c-myc 下降了 52.02%。



A: The expression of cyclin D1 protein and actin protein; B: The expression of c-myc protein and actin protein; 1: Control K562 cells; 2: Decoy ODNs treated K562 cells

图2 Western blot 检测 K562 细胞 cyclin D1 和 c-myc 蛋白的改变

Fig 2 The expression of cyclin D1 and c-myc protein in K562 cells by Western blotting

3 讨论

细胞周期是细胞生命活动的基本过程，典型的一个细胞周期包括 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ 4 个期，并受到信号转导途径和反馈环路的精密调控。细胞是否进入分裂周期以及分裂周期能否成功完成主要取决于其能否顺利通过若干个关卡(checkpoints)，其中重要的就是 G_1/S 转换和 G_2/M 转换。尤其是 G_1/S 转换最重要，被称为限制点(restriction point)。细胞在该点对复杂的细胞内外信号进行整合与传递，决定细胞进入新一轮增殖、分化、死亡或者退出细胞周期进入静止的 G_0 期。近年的研究结果认为，肿瘤的发生与细胞周期的紊乱及监控细胞周期正常分裂的调控因子的丧失有直接关系，与 G_1/S 调控成分的异常有密切关系[5]。本实验用 Decoy ODNs 处理 K562 细胞后 24 h，S 期细胞百分比显著减少，G_1 期细胞增多，说明 Decoy ODNs 作用阻滞了 K562 细胞由 G_1 期向 S 期的进程，引起了 G_1/S 阻滞。

cyclinD1 是 cyclinD 家族中一员，具有促进细胞通过 G_1/S 期转换的功能。研究表明，阻断 cyclinD1 的表达和功能使处于 G_1 中期的细胞停止进入 S 期，其过表达则使 G_1 期缩短。c-myc 为细胞增殖调控的早期反应基因，其产物是一种转录因子。在细胞周期调节过程中，c-myc 被认为对促进细胞进入 S 期完成 DNA 合成具有关键意义：在其他立早基因未被诱导表达的情况下，c-myc 激活可使细胞提早进入 S 期。现在的研究证实 cyclinD1[6] 和 c-myc[7] 基因的启动子上有 STAT5 特异性结合序列，都可能被 STAT5 反式激活而异常表达。RT-PCR 和 Western blot 的结果也分别从 mRNA 和蛋白水平证实了抑制 STAT5 途径下调了 cyclin D1 和 c-myc 的表达。

本实验中 Decoy ODNs 作用引起 K562 细胞 G_1/S 期转换阻滞，cyclinD1 和 c-myc 的表达下调。而 cyclinD1 和 c-myc 均有促进细胞周期 G_1/S 期转换的作用，因此本研究认为 Decoy ODNs 可能通过抑制 STAT5 途径下调 cyclinD1 和 c-myc 表达来阻滞细胞进入 S 期，影响了细胞周期进程，进而影响到细胞的增殖、凋亡过程。

参考文献：

[1] Deininger M W, Goldman J M, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 96(10): 3343 - 3356.

[2] Sillaber C, Gesbert F, Frank D A, *et al*. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells [J]. Blood, 2000, 95(6): 2118 - 2125.

[3] De Groot R P, Raajijmakers J A, Lammers J W, *et al*. STAT5 activation by Bcr-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells [J]. Blood, 1999, 94(3): 1108 - 1112.

[4] Mann M J, Dzau V J. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides [J]. J Clin Invest, 2000, 106(9): 1071 - 1075.

[5] 张玉霞. 细胞周期调控研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2001, 24(5): 262 - 265.

[6] De Groot R P, Raajijmakers J A, Lammers J W, *et al*. STAT5-dependent CyclinD1 and Bcl-xl expression in BCR/ABL transformed cells [J]. Mol Cell Biol Res Commun, 2000, 3(5): 299 - 305.

[7] Lord J D, McIntosh B C, Greenberg P D, *et al*. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5 [J]. J Immunol, 2000, 164(5): 2533 - 2541.

(编辑 汪勤俭)