文章编号:1000-5404(2008)05-0393-03

论著

ERK 阻滞剂 U0126 对白血病细胞 K562 细胞周期的作用及机制

郭 晓,潘 峻 (河北医科大学第二临床医院血液科,石家庄 050000)

摘 要:目的 研究细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)阻滞剂 U0126 对 K562 细胞周期的作用及机制。方法 以逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western blot 检测 U0126 处理 K562 细胞后 ERK、Cyclin D2、Cyclin E、P27 mRNA 和蛋白的表达;以流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞周期的变化。结果 处理后 K562 细胞 ERK、Cyclin D2、Cyclin E mRNA 和蛋白表达降低;P27 mRNA 和蛋白表达增高。G_0/G_1 期细胞增多,S 期细胞减少,与用药前相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 U0126 可能通过 ERK 途径,影响细胞周期调控蛋白,最终抑制了 K562 细胞的增殖。

关键词:白血病;细胞周期;ERK;K562 细胞;U0126
中图法分类号:R329.28;R73-361;R733.7 文献标识码:A

Effect of ERK pathway inhibitor U0126 on cell cycle of leukemia K562 cell lines

GUO Xiao, PAN Ling (Department of Hematology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway inhibitor U0126 on cell cycle of K562 cell lines. Methods The mRNA and protein expressions of ERK, Cyclin D2, Cyclin E in and P27 K562 cell lines after 10 μmol/L U0126 treatment for 12, 24 and 72 h were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. The cell cycle was determined by flow cytometry. Results The mRNA and protein expressions of ERK, Cyclin D2 and Cyclin E in K562 cell lines after U0126 treatment were decreased, while those of P27 were increased. The percentage of cells in G_0/G_1 phase was increased and that in S phase was decreased. All data mentioned above showed significant difference between the K562 cell lines before and after U0126 treatment ($P<0.05$). Conclusion U0126 possibly affects cell cycle regulating proteins by ERK pathway and eventually inhibits the proliferation of K562 cells.

Key words: leukemia; cell cycle; extracellular signal-regulated kinase; K562 cells; U0126

近年来,丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路的研究引人注目。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是 MAPK 家族重要成员,围绕肿瘤、血液等领域的研究表明,ERK 信号通路是多数生长因子和细胞因子调控细胞增殖的重要途径[1-3]。本研究旨在观察 ERK 阻滞剂 U0126 处理 K562 细胞后,细胞周期的变化及 ERK、细胞周期调控因子(Cyclin D2、Cyclin E、P27)mRNA 和蛋白表达的变化,探讨 ERK 阻滞剂 U0126 对 K562 细胞周期的调控作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

K562 细胞株由本院中心实验室提供,置于含有 15% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 37 ℃、含 5% CO_2、饱和湿度的恒温孵育箱中培养,采用对数生长期细胞进行实验。

1.2 实验分组

实验分为两组。①实验组:取对数生长期的 K562 细胞,培养基中加入 10 μmol/L ERK 阻滞剂 U0126,培养 12、24、72 h 后,收获细胞备用。②对照组:不加 U0126,仅加入同体积的 RPMI1640 培养液。

1.3 RT-PCR 检测各组细胞中相关基因的表达水平

分别取各组 K562 细胞 5×10^6 个,检测方法参照文献[4]。

1.4 Western blot 检测各组细胞中相关蛋白的表达水平

分别取各组 K562 细胞 5×10^6 个,检测方法参照文献[4]。

作者简介:郭 晓,女,河北省辛集市人,博士研究生,副主任医师,主要从事白血病的基础和临床方面的研究,发表论文 10 余篇。现在解放军白求恩国际和平医院血液科。电话:(0311)87978322
通信作者:潘 峻,电话:(0311)87222942,E-mail:Lingpan2000@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-07-05;修回日期:2007-09-22

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

分别取各组 K562 细胞 5×10^6 个，PBS 洗 3 遍，所得细胞用 70% 乙醇固定，不含 DNA 酶的 RNA 酶处理，碘化丙啶（PI）染色后，进行流式细胞仪检测，并对获取数据进行细胞周期分析。

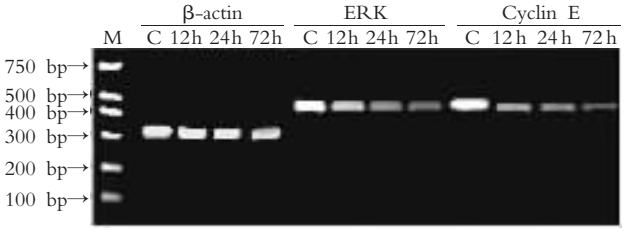
1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。以 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

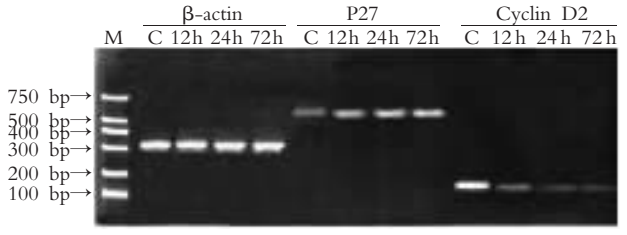
2.1 ERK 阻滞剂 U0126 对上述细胞周期相关基因表达水平的影响

用 U0126 处理 K562 细胞 12 h 后，Cyclin D2、Cyclin E 和 ERK mRNA 在 K562 细胞中表达水平较对照组表达均降低，而 P27 mRNA 表达较对照组增加。72 h 后 Cyclin D2、Cyclin E 和 ERK mRNA 表达显著降低，均在对照组表达水平的 25% 以下（$P<0.01$），P27 mRNA 的表达上升至对照组的 2 倍（$P<0.01$）。见图 1、2 和表 1。



M 标准；C 对照组

图 1 RT-PCR 检测 U0126 处理 K562 细胞 12、24、72 h 后 ERK 和 Cyclin E mRNA 表达



M 标准；C 对照组

图 2 RT-PCR 检测的 U0126 处理 K562 细胞 12、24、72 h 后 P27 和 Cyclin D2 mRNA 表达

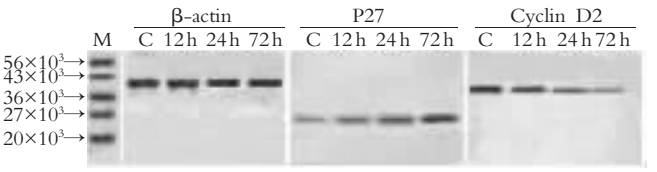
表 1 U0126 处理 K562 细胞 72 h 后细胞周期相关基因的表达

组别	Cyclin D_2	P27	Cyclin E	ERK
实验组	0.12 ± 0.01^a	0.72 ± 0.11^a	0.16 ± 0.12^a	0.11 ± 0.01^a
对照组	0.64 ± 0.06	0.35 ± 0.04	0.89 ± 0.07	0.57 ± 0.05

a：$P<0.01$，与对照组比较

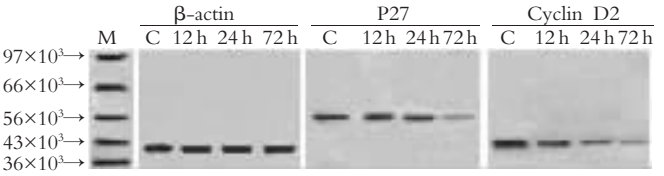
2.2 ERK 阻滞剂 U0126 对上述细胞周期相关蛋白表达的影响

用 U0126 处理 K562 细胞 12 h 后，Cyclin D2、Cyclin E 和 ERK 的蛋白表达水平较对照组表达明显降低，而 P27 蛋白表达较对照组增加。72 h 后 Cyclin D2、Cyclin E、ERK 蛋白表达显著降低，均在对照组表达水平的 20% 以下（$P<0.01$），P27 表达升至对照组的 2.6 倍（$P<0.01$）。见图 3、4 和表 2。



M 标准；C 对照组

图 3 Western blot 检测 U0126 处理 K562 细胞 12、24、72 h 后 P27 和 Cyclin D2 蛋白的表达



M 标准；C 对照组

图 4 Western blot 检测的 U0126 处理 K562 细胞 12、24、72 h 后 Cyclin E 和 ERK 蛋白表达

表 2 U0126 处理 K562 细胞 72 h 后细胞周期相关蛋白的表达

组别	Cyclin D_2	P27	Cyclin E	ERK
实验组	0.19 ± 0.03^a	0.84 ± 0.23^a	0.15 ± 0.02^a	0.13 ± 0.01^a
对照组	0.98 ± 0.18	0.39 ± 0.14	0.77 ± 0.18	0.57 ± 0.14

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.3 ERK 阻滞剂 U0126 对细胞周期的影响

用 U0126 处理 K562 细胞 12 h 后，K562 细胞株的细胞周期被阻滞于 G_0/G_1 期，S 期细胞减少，与对照组比较有显著性差异（$P<0.05$）。72 h 后细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期的比例达到对照组的 1.2 倍（$P<0.01$）。见表 3。

表 3 U0126 处理 K562 细胞 12、72 h 后细胞周期的分布（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
实验组（12 h）	70.3 ± 6.5^a	28.6 ± 3.4^a	9.6 ± 3.1^a
实验组（72 h）	90.2 ± 12.3^b	12.3 ± 2.4^b	7.7 ± 2.4^b
对照组	31.5 ± 4.8	65.2 ± 4.9	12.4 ± 2.6

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

3 讨论

90% 以上慢性粒细胞白血病（chronic myelocytic leukemia，CML）患者骨髓细胞 Ph 染色体阳性，即有 t(9；22) 染色体易位，产生 BCR/ABL 融合基因和 BCR/ABL 融合蛋白，BCR/ABL 融合蛋白具有异常增高的酪氨酸激酶活性，与白血病细胞恶性生长和增殖有密切关系[5]。

MAPK 途径的组成成分 ERK 是决定细胞命运的关键分子之一，它决定着细胞的分裂增殖、终末分化或进入凋亡程序。ERK 的活化是将分子信号从表面受体转导至细胞核内的关键步骤，此过程包括癌基因 Ras、Raf-1，丝/苏氨酸激酶，MAPK 激酶（MAPK kinase MAPKK or MEK）等[6,7]。当受到生长因子或原癌基因

的蛋白产物刺激后，ERK 通过一系列酶反应被激活，促进细胞增殖。若其持续活化则最终可使细胞发生恶性转化。ERK mRNA 及蛋白表达下调则可抑制细胞生长和增殖，同时抑制相关基因的转录过程。

近期有研究证实 ERK 阻滞剂可以阻断 ERK 的活化和细胞增殖[8]。ERK 阻滞剂通过 ERK 通路抑制 MEK 激酶（MEK kinase MEKK）活性，从而抑制 MAPKs 级联反应参与细胞周期调控，尤其是 G_1/S 期调节[9-11]。U0126 为蛋白激酶抑制剂，能选择性抑制 MEKK1 激活，抑制 MAPKs 级联反应，逆转因 Ras 活化而造成的细胞分化和增殖。

在前期工作中，我们用 Western blot 和 RT-PCR 方法检测 K562 细胞和原代 CML 细胞 Cyclin D2、Cyclin E 和 P27 的蛋白和 mRNA 表达水平，结果显示 Cyclin D2 和 Cyclin E 的表达水平明显升高，而 P27 表达明显降低[4,12]。提示 BCR/ABL 可能改变了上游信号转导途径，使 Cyclin D2、P27 等细胞周期调控因子在 CML 中发生了明显改变。实验还表明：与健康人骨髓单个核细胞相比，K562 细胞和原代 CML 细胞在 Cyclin D2、Cyclin E、P27 表达异常的同时，ERK 蛋白和 mRNA 表达明显上升，且 Cyclin D2 蛋白的表达与 ERK 蛋白的表达呈正相关，与 P27 蛋白的表达呈负相关[4]。说明 ERK 途径参与了 CML 细胞周期的调控作用。

在本研究中，我们观察到当使用 ERK 阻滞剂 U0126 处理 K562 细胞后，不仅 ERK 的表达明显下调，而且相关的细胞周期调控因子 Cyclin D2、Cyclin E、P27 的表达都有显著的改变：Cyclin D2、Cyclin E mRNA和蛋白表达下降，P27 mRNA 和蛋白表达上升；流式细胞仪检测 G_0/G_1 期细胞增多，S 期细胞减少，细胞阻滞于 G_0/G_1 期。说明 ERK 阻滞剂 U0126 可能通过 ERK 途径，影响细胞周期蛋白的表达，并最终抑制了 K562 细胞的增殖。进一步证明了 ERK 途径参与了慢性粒细胞白血病的细胞周期调控和 CML 的发病。ERK 阻滞剂在治疗 CML 方面可能有良好的应用前景。

参考文献：

[1] 王树森，管忠震，向燕群，等. 鼻咽癌组织中 EGFR 和 p-ERK 蛋白表达的检测及意义[J]. 中华肿瘤杂志，2006，28(1)：28－31.

[2] 樊　华，杜　宏，张国君，等. VEGF 和 N-Ras 及 pERK1/2 在急性髓系白血病骨髓中的表达及相关性研究[J]. 肿瘤防治杂志，2005，12(12)：903－906.

[3] Vicent S，Lopez-Picazo J M，Toledo G，*et al*. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours[J]. Br J Cancer，2004，90(5)：1047－1052.

[4] 郭　晓，潘　崚，候兰芬，等. ERK 和 P38 信号转导途径对慢性髓系白血病细胞周期的调控作用[J]. 中国实验血液学杂志，2007，15(2)：242－247.

[5] 邓家栋，杨崇礼，杨天楹，等. 邓家栋临床血液学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2001：998－1007.

[6] Vaque J P，Navascues J，Shiio Y，*et al*. Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway[J]. J Biol Chem，2005，280(2)：1112－1122.

[7] Pintus G，Tadolini B，Posadino A M，*et al*. PKC/Raf/MEK/ERK signaling pathway modulates native-LDL-induced E2F-1 gene expression and endothelial cell proliferation[J]. Cardiovasc Res，2003，59(4)：934－944.

[8] Favata M F，Horiuchi K Y，Manos E J，*et al*. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase[J]. J Biol Chem，1998，273(29)：18623－18632.

[9] Hoshino R，Tanimura S，Watanabe K，*et al*. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated：up-regulation of P27(Kip1)[J]. J Biol Chem，2001，276(4)：2686－2692.

[10] Kortylewski M，Heinrich P C，Kauffmann M E，*et al*. Mitogen-activated protein kinases control P27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells[J]. Biochem J，2001，357(Pt 1)：297－303.

[11] 马洪德，蒋明德，曾维政，等. ERK 信号传导通路与细胞周期调控[J]. 西南国防医药，2003，13(5)：556－558.

[12] 郭　晓，徐　铮，侯兰芬，等. 慢性粒细胞性白血病中 Cyclin D_2 与 Cyclin E 及 p27 mRNA 的表达和细胞周期分布[J]. 中华肿瘤防治杂志，2007，14(16)：1235－1237.

（编辑　汪勤俭）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓；“名”可以有 1 个、2 个或 3 个，但“姓”只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部