

· 论 著 ·

## 游离的白血病抑制因子受体 $\alpha$ 亚基胞内功能片段对 HL-60 细胞的生长调节

王 静, 杨 玲, 刘厚奇\*

(第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨白血病抑制因子(LIF)受体  $\alpha$  亚基胞内区在细胞内游离存在时,对 HL-60 细胞增殖分化的调节及相关信号转导机制。**方法:**鉴定已构建的重组质粒 pCDNA3.0-190CT2+3 和 pCDNA3.0-190CT3;用脂质体将质粒转染 HL-60 细胞,细胞培养基中加入 G-418 来筛选阳性克隆。用免疫细胞化学和免疫印迹法检测转染组细胞中目的蛋白的表达。绘制细胞生长曲线。免疫印迹法检测各组细胞增殖细胞核抗原(PCNA)的表达和信号分子 STAT3 的磷酸化水平。**结果:**免疫印迹法检测及目的蛋白条带,获得稳定表达目的蛋白的细胞株。与野生组细胞相比,190CT2+3 和 190CT3 组的细胞体积增大,分叶核细胞占总细胞数的比例增加,细胞增殖减慢,PCNA 的表达减少,STAT3 的磷酸化水平升高。**结论:**LIF 受体  $\alpha$  亚基胞内区游离片段促进了 HL-60 细胞的分化,抑制了增殖,激活了信号分子 STAT3。

**[关键词]** 白血病抑制因子;受体;增殖细胞核抗原;信号转导;STAT3

**[中图分类号]** R 733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1277-04

### Regulatory effect of dissociative intracytoplasmic domain of leukemia inhibitory factor receptor $\alpha$ subunit on growth of HL-60 cells

WANG Jing, YANG Ling, LIU Hou-qi\* (Department of Embryology and Histology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the regulatory effect of dissociative intracytoplasmic domain of leukemia inhibitory factor receptor  $\alpha$  (LIFR $\alpha$ ) subunit on the growth of HL-60 cells and the related signal transduction mechanism. **Methods:** The constructed recombinant plasmids pCDNA3.0-190CT2+3 and cDNA3.0-190CT3 were identified and transfected into HL-60 cells with liposome FuGene-6. Then the cells were cultured in a medium containing G-418 and the positive clones were selected. Immunohistochemical method and Western blotting were used to detect the expression of the target protein in HL-60 cells and the growth curve of the cells was plotted. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the phosphorylation levels of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) were assayed by Western blotting. **Results:** Western blotting detected the band of target protein and the cell line stably expressing the target protein was obtained. Compared with that of the wild type group, the cell sizes in 190CT2+3 and 190CT3 group were enlarged. The ratio of leaf cell number to the total cell number increased and the cell proliferation was slowed down. We also found that the expression of PCNA was decreased and the phosphorylation level of STAT3 was increased. **Conclusion:** The dissociative intracytoplasmic domain of LIFR $\alpha$  subunit can accelerate the differentiation of HL-60 cells, inhibit the proliferation of HL-60 cells, and activate signal molecule STAT3.

**[KEY WORDS]** leukemia inhibitory factor; receptor; proliferating cell nuclear antigen; signal transduction; STAT3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1277-1280]

白血病抑制因子(LIF)是一种作用广泛的因子,因人们最早发现它有促进小鼠单核白血病 M1 细胞分化并抑制其增殖的作用,所以把它命名为白血病抑制因子<sup>[1]</sup>。随着研究的不断深入,人们了解到 LIF 在不同的环境中发挥着不同的生物学效应,LIF 的生物效应是通过结合靶细胞膜上的 LIF 受体  $\alpha$  亚基(gp190),并使之与另一亚基 gp130(亦为 IL-6 信号转导子)形成异源性二聚化,从而启动细胞内信号分子的活性以完成 LIF 的信息从细胞膜至核的传递,使细胞产生一系列生理或病理的变化<sup>[2]</sup>。gp190 和 gp130 胞内区都含有相似的重要功能域 BOX1、BOX2 和 BOX3<sup>[3]</sup>;研究表明,它们各自在细胞增殖

分化过程中的作用不同<sup>[4]</sup>。通过我们前期研究发现 gp190 胞内区的多个功能域成为游离多肽存在于细胞内时,对细胞分化有不同的影响<sup>[5]</sup>。190CT2+3(BOX2+3)激活 Ras-MAPK 途径,而不含 BOX2 的 C-端多肽 190CT3(BOX3),可使白血病细胞 HL-60 中 STAT3 激活,膜表面 CD15 表达增加。

基于以上研究,我们将已构建好的重组 BOX2+3、BOX3 的真核表达质粒,即 pCDNA3.0-

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30170468)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30170468)。

**[作者简介]** 王 静,硕士。E-mail: wangjing80128@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: houqiliu@hotmail.com

190CT2+3、pcDNA3.0-190CT3 转染人白血病 HL-60 细胞,得到稳定表达目的基因的 HL-60 细胞株。观察转染 gp190 胞内区不同功能域后,游离的目的片段对 HL-60 细胞生长特性的影响,细胞的形态变化,并检测与细胞增殖及分化相关的抗原和信号分子,以探讨游离功能域 BOX2+3 和 BOX3 对 HL-60 细胞增殖分化的调节及其分子机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料的来源 HL-60 细胞株购自中国科学院上海细胞研究所;1640 培养基(Gibco);限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I (Promega 公司);脂质体 Fu-Gene6 Transfection Reagent(Roache);兔多克隆抗体 LIF 受体  $\alpha$  亚基(Santa Cruz Biotechnology);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(华美生物工程有限公司);增殖细胞核抗原(PCNA)多克隆抗体(北京中山生物技术);STAT3 Tyr705 磷酸化多克隆抗体(Pharmagene);槽式转膜仪(TE52X, Pharmacia Biotech);PVDF 膜(Whatman);Western blotting luminol reagent(Santa Cruz)。

1.2 细胞培养 HL-60 细胞株用含 10% 小牛血清的 1640 培养基 37℃,5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。

1.3 重组质粒 pcDNA3.0-190CT2+3、pcDNA3.0-190CT3 的鉴定 以 *Bam*HI、*Xba*I 双酶切并测序。

1.4 重组质粒的 HL-60 细胞转染 将重组质粒 pcDNA3.0-190CT2+3、pcDNA3.0-190CT3 用脂质体转染法分别转染于 HL-60 细胞,设转染 pcDNA3.0 空质粒载体和野生型 HL-60 细胞为对照实验细胞。

1.5 免疫组化法检测转染细胞 190CT2+3、190CT3 的表达 转染的细胞在培养瓶中生长至  $1 \times 10^7$ /ml 时,收集细胞。4% 多聚甲醛室温固定 10 min,均匀涂布于覆有铬矾明胶的载玻片上,37℃ 过夜。检测前以 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭 20 min,一抗兔多克隆抗体 LIFR $\alpha$  4℃ 过夜,二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG 4℃ 过夜。随后 DAB 显色。显微镜观察 3~10 min,显色适当后自来水冲洗,烘干,树胶封片。

1.6 免疫印迹法检测转染细胞 190CT2+3、190CT3 的表达 细胞生长至  $1 \times 10^7$ /ml 后,收集细胞,每  $1 \times 10^7$  细胞加入 100  $\mu$ l 细胞裂解液,冰浴 30 min,4℃  $10\ 000 \sim 12\ 000 \times g$  离心 20 min,取上清加等体积 2 $\times$ SDS 混合,沸水煮 5 min, $1\ 000 \times g$  离心 5 min,取上清进行 15% SDS 凝胶电泳,用槽式转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜,兔多抗 LIFR $\alpha$  与膜蛋白结合,HRP 结合的羊抗兔 IgG 与一抗结合,等体积混合 Western blotting luminol reagent 中 A 液和 B 液

适量(0.5~1 ml each),滴加在膜上,使均匀覆盖,静置 1 min;除去多余液体,将膜封在两层塑料薄膜之间,暗室 X 线胶片曝光、显影、定影。

1.7 免疫印迹法分析转染细胞 PCNA 表达和 STAT3 磷酸化水平 方法同上。

### 2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切。紫外灯下观察,酶切 190CT2+3 组可见 500~750 bp 间的 1 条特异性电泳条带;酶切 190CT3 组可见 250~500 bp 间的 1 条电泳条带,均与目的片段大小相符(图 1)。生工测序重组质粒 190CT2+3、190CT3;与 GenBank 核酸序列数据库中 LIFR 序列比对,序列一致(GenBank X61615)。

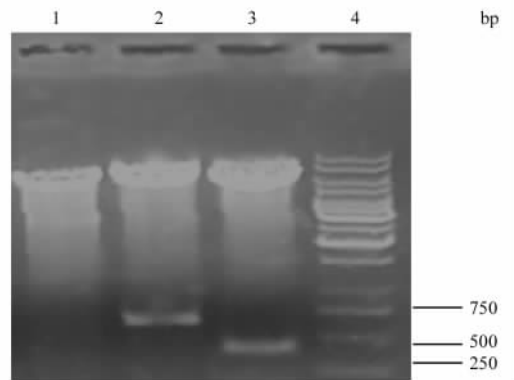


图 1 酶切质粒图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pcDNA3.0-190CT2+3 and pcDNA3.0-190CT3

1:pcDNA3.0;2:pcDNA3.0-190CT2+3;3:pcDNA3.0-190CT3;M:Marker

2.2 转染细胞目的基因的表达 免疫细胞化学检测 LIFR 表达,结果显示实验组(pcDNA3.0-190CT2+3、190CT3)较对照组(pcDNA 3.0、野生型)黄褐色阳性加强;实验组杆状核、分叶核增多(图 2)。分别计数 190CT2+3 和 190CT3 组 10 个视野下分叶核细胞和总细胞数,190CT3 组分叶核细胞/总细胞数为 34.88%,190CT2+3 组为 27.52%,两组间差别有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明 190CT3 组分叶核的比例大于 190CT2+3 组,转染 190CT3 的细胞更趋向于成熟分化;免疫印迹法检测 LIFR,转染组分别于 15 000 处见 190CT3 片段、20 000 处见 190CT2+3 片段,均于 190 000 处见全长的跨膜受体 gp190(图 3)。

2.3 生长曲线的绘制 4 组细胞每天计数 3 孔,可见转染目的基因 190CT2+3 和 190CT3 后,细胞增殖明显减慢,峰值下降,证明目的基因对 HL-60 细胞的增殖具有抑制作用,生长曲线见图 4。

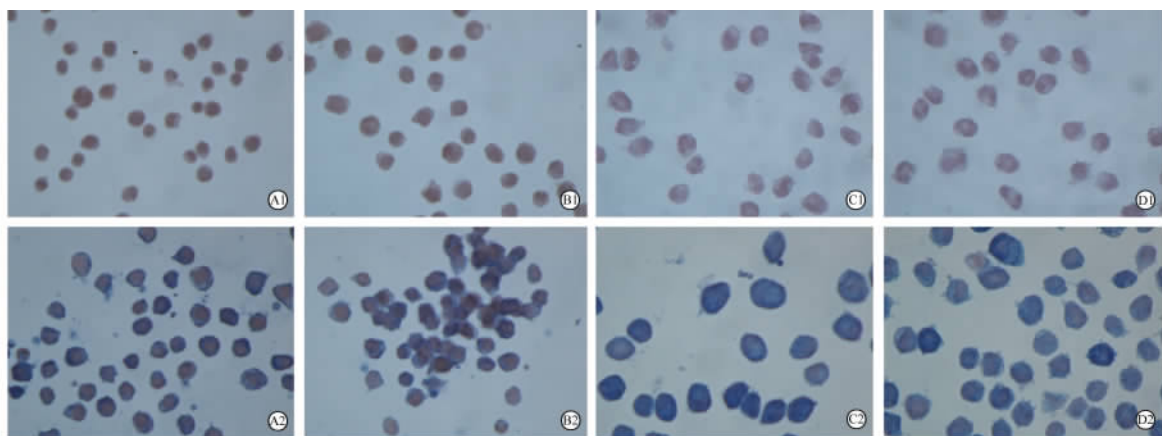


图 2 LIFR 免疫组化(H-E 染色)

Fig 2 Immunocytochemical analysis of LIFR C-terminal expression (A1-D1:  $\times 200$ ; A2-D2:  $\times 400$ )

A1, A2: HL-60 wide-type; B1, B2: pcDNA3.0; C1, C2: pcDNA-190CT2+3-HL60; D1, D2: pcDNA-190CT3-HL60

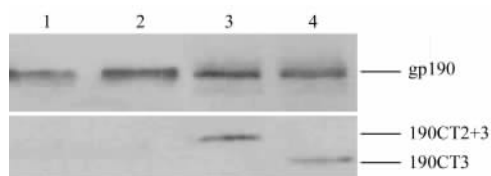


图 3 Western blotting 检测 LIFR

Fig 3 Western blotting analysis of expressed LIFR

1: WT-HL60; 2: pcDNA3.0; 3: 190CT2+3; 4: 190CT3

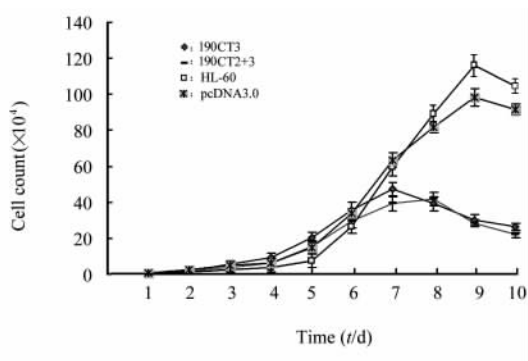


图 4 4 组细胞生长曲线

Fig 4 Growth curve of cells in 4 groups

$n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 免疫印迹法检测 PCNA 和 STAT3 磷酸化水平 实验组(190CT2+3 和 190CT3 转染组)PCNA 的表达量较对照组(空质粒和野生型)明显减少,证明目的基因抑制了 HL-60 细胞的增殖(图 5A)。

运用 Scion Image 软件分析条带的积分光密度值,计算各组 PCNA 与  $\beta$ -actin 密度值的比值。结果如下: WT-HL60 组为 58.17%, pcDNA3.0-HL60 组为 54.33%, 190CT2+3-HL60 组为 20.83%, 190CT3-HL60 组为 17.83%。方差分析及 SNK 检验表明,190CT2+3 和 190CT3 转染组 PCNA 与对

照组比较表达下降( $P < 0.05$ )。

转染目的基因组(pcDNA3.0-190CT2+3、pcDNA3.0-190CT3)的 STAT3 磷酸化水平较空质粒转染组和野生型细胞的表达升高,pcDNA3.0-190CT3 组明显升高。说明转染目的基因 190CT2+3、190CT3 后,HL-60 细胞内信号分子 STAT3 激活(图 5B)。

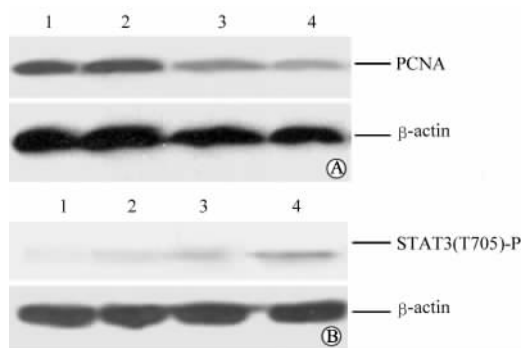


图 5 Western blotting 检测 PCNA(A)和 STAT3(B)

Fig 5 Western blotting analysis of expressed PCNA(A) and STAT3(B)

1: WT-HL60; 2: pcDNA3.0-HL60; 3: 190CT2+3-HL60; 4: 190CT3-HL60

计算各组 STAT3-P 与  $\beta$ -actin 密度值的比值,结果如下: WT-HL60 组为 6.50%, pcDNA3.0-HL60 组为 10.67%, 190CT2+3-HL60 组为 14.17%, 190CT3-HL60 组为 26.83%。方差分析及 SNK 检验表明,pcDNA3.0-190CT3 组与其余 3 组比较表达增加( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

LIF 的生物效应是通过结合靶细胞膜上的受体完成。LIF 受体包括 1 个  $\alpha$  亚基(gp190)和 1 个

IL-6、OSM、CNTF 等受体共有的  $\beta$  亚基(gp130)。LIF 首先结合于 LIF 受体  $\alpha$  亚基(gp190),并使之与 gp130 形成异源性二聚体,启动下游信号转导通路,完成 LIF 的信息传递。gp190 和 gp130 均存在与细胞增殖分化相关的 3 个结构功能域 BOX1、BOX2、BOX3,含有酪氨酸的活性中心 YXXQ(Y 为酪氨酸,Q 为苯丙氨酸,X 为任意氨基酸),这种官能体是下游分子酪氨酸磷酸化的必需序列。LIF 激活信号通路 JAK/STAT, YXXQ 基团可与信号分子 STAT3 的 SH2 位点相识别<sup>[6,7]</sup>。通过 JAK 激酶的作用,酪氨酸磷酸化,磷酸化的 STAT3 通过核孔复合物进入细胞核激活细胞增殖分化相关蛋白的转录,信号分子的磷酸化和脱磷酸化调控细胞内 DNA 的合成和细胞的增殖<sup>[8]</sup>。实验证实,LIF 受体与 STAT3 的关系密切,LIF 抑制白血病细胞增殖与 STAT3 激活的关系已被确定<sup>[9]</sup>。LIF 通过激活 STAT3 在不同的细胞发挥不同的生物效应,如在胚胎干细胞中,抑制分化维持其自我复制的能力;在髓样白血病细胞中,促进分化,抑制其增殖<sup>[1]</sup>;在 CD34<sup>+</sup> 的造血干细胞中,促进其向粒细胞和巨噬细胞分化和成熟<sup>[10]</sup>;HL-60 人早幼粒白血病细胞,其表面存在 LIF 受体,在 LIF 的刺激下可抑制细胞的增殖<sup>[11]</sup>。LIF 生物效应的不同可能与其受体有多个功能域有关。近来,Hermanns 等<sup>[12]</sup>证实 gp190 近膜端与 STAT3 结合,远膜端激活 STAT3。进一步研究发现 gp190 远膜端的第 3 个 YXXQ 官能体是 STAT3 磷酸化的必需结构。通过我们以往的研究得知,高表达 gp190 亚基时无需 LIF 的诱导便可以使白血病细胞 STAT3 激活而分化<sup>[5]</sup>。

在本研究中,我们将设计的 2 种小分子——190CT2+3(含 gp190BOX2+3)和 190CT3(含 gp190BOX3)转染 HL-60 细胞,通过免疫印迹法和免疫细胞化学法检测转染后细胞内 LIFR 的表达,结果表明成功获得稳定表达重组子的 HL-60 细胞株。免疫组织化学显色显示转染后细胞体积增大,杆状核与分叶核的出现增多,经统计学分析分叶核占总细胞数的百分数,转染 190CT3 组较转染 190CT2+3 组的分叶核比例高,组间差别有统计学意义。PCNA 的表达水平可以反映细胞的增殖情况,通过对细胞生长曲线和增殖核抗原 PCNA 的分析,转染目的基因的细胞生长减缓,PCNA 的表达减少,以上结果证明,转染基因后,HL-60 细胞的增殖

受到抑制。免疫印迹法检测磷酸化的信号分子 STAT3,转染目的基因组表达增加。因此,我们认为 gp190 细胞内区的不同功能域成为游离多肽在细胞内存在时,对 HL-60 细胞有促进分化抑制增殖的作用,且 190CT3(即 gp190 BOX3)促分化能力较 190CT2+3(即 gp190BOX2+3)更强,BOX3 是 gp190 胞内区的重要功能域;且胞内游离功能域均能激活信号分子 STAT3。

## [参考文献]

- [1] Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells[J]. *J Biol Chem*, 1984, 259:10978-10982.
- [2] Giese B, Roderburg C, Sommerauer M, et al. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118:5129-5140.
- [3] Baumann H, Symes AJ, Comeau MR, et al. Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14:138-146.
- [4] Auernhammer CJ, Melmed S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function[J]. *Endocr Rev*, 2000, 21:313-345.
- [5] 杨玲,刘善荣,汤淑萍,等.白血病抑制因子受体  $\alpha$  亚基胞内区远膜端对 HL-60 细胞增殖分化的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25:679-682.
- [6] Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, et al. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102:4524-4529.
- [7] Shao H, Xu XJ, Mastrangelo MA, et al. Transcription 3 binding to phosphotyrosine ligands containing the YXXQ motif[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:18967-18973.
- [8] Reich RC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6:602-612.
- [9] Minami M, Inoue M, Wei S, et al. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93:3963-3966.
- [10] de Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, et al. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (Kip1) [J]. *Oncogene*, 2000, 19:3290-3298.
- [11] Maekawa T, Metcalf D. Clonal suppression of HL60 and U937 cells by recombinant human leukemia inhibitory factor in combination with GM-CSF or G-CSF[J]. *Leukemia*, 1989, 3:270-276.
- [12] Hermanns HM, Radtke S, Haan C, et al. Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130[J]. *J Immunol*, 1999, 163:6651-6658.

[收稿日期] 2006-05-25

[修回日期] 2006-11-08

[本文编辑] 尹茶