

LIF 受体胞内功能域调节白血病细胞增殖分化

姚云,王静,刘厚奇*

(第二军医大学基础部组织胚胎学教研室,发育生物学研究中心,上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨白血病抑制因子受体(LIFR) α 亚基胞内游离功能域 gp190CT3 对启动靶细胞内信号转导通路(JAK/STAT3),使白血病细胞 HL-60 向粒细胞方向分化的作用。**方法:**采用免疫细胞化学、RT-PCR 以及流式细胞术等技术和方法,观测 pcDNA3.0-gp190CT3 重组质粒稳定转染 CHO 细胞中靶基因的表达;以及稳定转染的 CHO 细胞与 HL-60 细胞共培养后,HL-60 细胞的形态学、STAT3 磷酸化水平、细胞表面抗原 CD15 表达的变化。**结果:**(1)重组质粒转染的 CHO 细胞表达目的基因 gp190CT3,并获得稳定表达目的基因的细胞株;(2)重组质粒转染的 CHO 细胞与野生型 HL-60 细胞共培养可使 HL-60 细胞体积变大,形态不规则,STAT3 磷酸化水平和细胞表面抗原 CD15 表达升高。**结论:**LIF 受体 α 亚基胞内游离片段表达的功能蛋白 gp190CT3 能够启动靶细胞内 JAK/STAT3 信号转导通路,从而发挥其调节白血病细胞增殖分化的效能。

[关键词] 白血病;白血病抑制因子受体;细胞分化;信号转导

[中图分类号] R 733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1165-04

Cytoplasmic domain of leukemia inhibitory factor receptor regulates proliferation and differentiation of leukemia cells

YAO Yun, WANG Jing, LIU Hou-qi* (Department of Embryology and Histology, College of Basic Medical Sciences, Research Center of Developmental Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of the cytoplasmic domain of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor α submit, gp190CT3, on activation of the JAK/STAT3 signal transduction pathway and on promotion of leukemia cell HL-60 differentiation into granulocytes. **Methods:** pcDNA3.0-gp190CT3 was used to transfect CHO cells. Using immunofluorescent cytochemistry, RT-PCR and flow cytometry techniques, we detected the expression of gp190CT3 gene and protein in the stably-transfected CHO cells. Then the stably-transfected CHO cells were co-cultured with HL-60 cells and the morphological changes of the HL-60 cells were observed, the levels of STAT3 phosphorylation and the expression of the cell surface antigen CD15 were also determined. **Results:** Expression of gp190CT3 gene was found in pcDNA3.0-gp190CT3 transfected CHO cells and gp190CT3-stably-transfect CHO cells were obtained. Compared with the untreated HL-60 cells, the size of the co-cultured HL-60 cells was increased, the morphology was irregular and the level STAT3 phosphorylation and the expression of CD15 were increased. **Conclusion:** The LIF receptor α submit gp190CT3 participates in the activation of JAK/STAT3 signal transduction pathway and regulates HL-60 cell differentiation and proliferation.

[KEY WORDS] leukemia inhibitory factor receptor; cell differentiation; signal transduction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1165-1168]

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一种功能多样,作用广泛的细胞因子^[1]。LIF的生物学效应是通过结合靶细胞膜上的LIF受体(LIF-receptor, LIFR)完成的。在LIF的诱导下,LIFR形成gp190、gp130异源性二聚体启动细胞内信号转导通路^[2]。Tomida等^[3]研究发现,LIFR gp190亚基胞内区具有转导信号的作用。

我们以前的实验研究也表明,LIFR α 亚基胞内区功能域BOX3(gp190CT3)在HL-60细胞内表达时具有明显的抑制白血病细胞增殖并促进其分化的生物学效应^[4-5]。那么gp190CT3表达的功能多肽是否能够启动靶细胞内JAK/STAT3信号转导通路,从而发挥其调节白血病细胞增殖分化的效应呢?为此,

本实验采用细胞共培养的方法,进一步探讨gp190CT3功能多肽对白血病细胞增殖分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3.0-gp190CT3重组质粒由本室构建与保存。HL-60细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。限制性内切酶BamH I和Xba I(Promega公司),小牛血清(杭州四季青生物公

[基金项目] 上海市科学委员会登山计划(064119612)。Supported by Mountaineering Program Foundation of Science and Technology Committee of Shanghai(064119612)。

[作者简介] 姚云,硕士生。E-mail:yaoying2000@tom.com

* Corresponding author. E-mail:houqiliu@126.com

司),RPMI 1640 培养基(Gibco 公司),脂质体(Sigma 公司), G418 (博光生物科技公司), STAT3Tyr705 磷酸化多克隆抗体(Pharmagene)。

1.2 细胞培养 HL-60 细胞株用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养基,37℃、5%CO₂ 条件下培养。CHO 细胞用含 10%小牛血清的 RPMI 1640/DMEM (1:1)混合培养基,37℃、5%CO₂ 条件下培养。

1.3 重组质粒 pcDNA3.0-gp190CT3 和质粒 pcDNA3.0 的转染 将重组质粒 pcDNA3.0-gp190CT3 和质粒 pcDNA3.0 用脂质体转染法分别转染入 CHO 细胞中。48 h 后换成含 2 000 mg/L G418 的培养基筛选,筛选 2 周。挑出单克隆继续加压扩大培养,进行 RT-PCR 及免疫荧光检测。

1.4 稳定转染的 CHO 细胞与 HL-60 细胞共培养 将稳定转染的 CHO 细胞接种于 6 孔板内,待生长至 60%时,分别与 1×10⁴、1×10⁵、1×10⁶/ml 密度的 HL-60 细胞共培养。每 3 d 换液、传代 1 次,将 HL-60 细胞轻轻吹打使之悬浮,移入离心管 800 r/min 3 min,弃上清,调整细胞密度分别为 1×10⁴、1×10⁵、1×10⁶/ml 与前 1 d 提前准备好的稳定转染的 CHO 细胞继续共培养,倒置显微镜下观察其形态学改变。

1.5 免疫组织化学法检测共培养 HL-60 细胞磷酸化 STAT3 的表达 稳定转染的 CHO 细胞与 HL-60 细胞共培养 24 h 后收集共培养 HL-60 细胞。4%多聚甲醛室温固定。均匀涂布于覆有铬钒明胶的载玻片上,37℃烤片过夜。片子从烤箱中取出后,用 0.3% H₂O₂ 封闭内源性的过氧化物酶活性,室温 30 min。一抗(兔抗人 STAT3-p 多克隆抗体,1:100 抗体稀释液)4℃,过夜,二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG,1:100 抗体稀释液)37℃,30 min。DAB 显色试剂盒避光显色(镜下观察控制显色时间)。终止

显色。烘干,封片保存。

1.6 流式细胞仪检测共培养 HL-60 细胞 CD15 的表达 收集不同密度共培养的 HL-60 细胞,一抗(小鼠抗人 CD15,1:200 抗体稀释液),室温孵育 60 min;阴性对照以 PBS 孵育。二抗(FITC 标记的羊抗鼠 IgG,1:200 抗体稀释液),室温避光 40 min。加入 300 μl PBS 悬浮细胞,流式细胞仪检测各组细胞 CD15 的阳性率。

2 结果

2.1 获得稳定高表达 gp190CT3 的 CHO 细胞株 重组质粒转染 CHO 细胞后 48 h 加入 G418 进行筛选,在 G418 终浓度为 2 000 mg/L 时,加压筛选,显微镜下可见形成单克隆细胞,克隆化培养后进行 RT-PCR 在基因转录水平上的鉴定,可检测到 gp190CT3 mRNA 的表达(图 1)。挑取高表达的细胞株继续扩大培养。细胞免疫荧光化学检测显示胞质内明显阳性信号,而转染 pcDNA3.0 空载体的 CHO 细胞没有检测到阳性信号(图 2)。

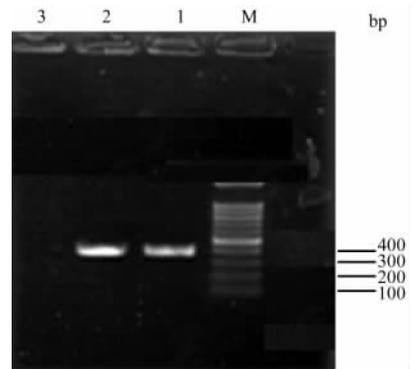


图 1 RT-PCR 结果

Fig 1 Result of RT-PCR

M: Marker; 1,2: Positive cell clone; 3: Negative control

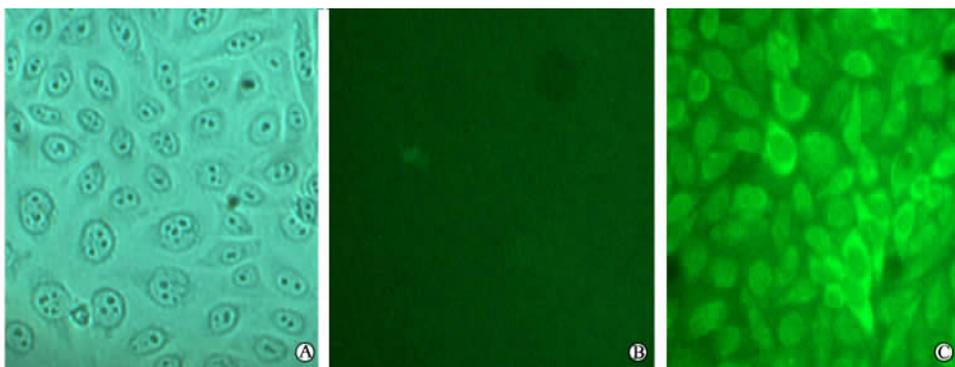


图 2 免疫荧光检测 gp190CT3 表达

Fig 2 Immunofluorescent analysis of gp190CT3 expression(×400)

A: CHO-pcDNA3.0 cells under light microscope; B: CHO-pcDNA3.0 cells under immunofluorescent microscope(control); C: CHO-gp190CT3 cells

2.2 共培养后 HL-60 细胞的形态学改变 稳定高表达 gp190CT3 的 CHO 细胞株与 HL-60 细胞共培养 1 周后, 共培养 HL-60 细胞与单独培养的 HL-60

细胞相比细胞体积变大, 形状变得不规则。而与转染空质粒的 CHO 细胞共培养 1 周的 HL-60 细胞的形状规则, 变化不明显(图 3)。

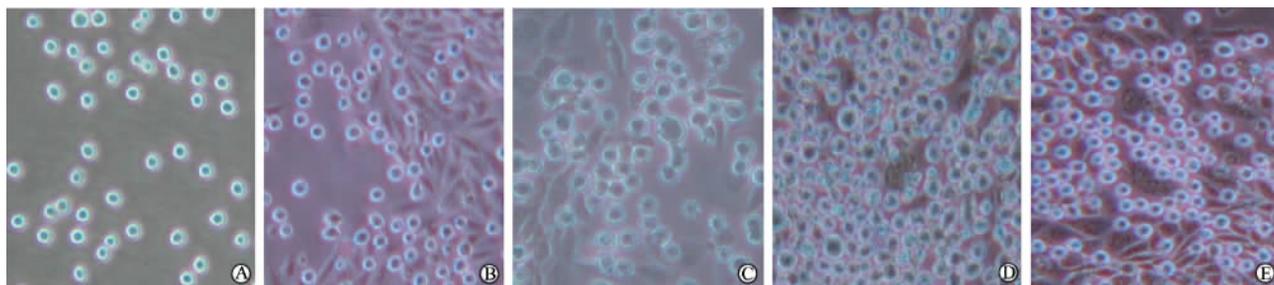


图 3 共培养后 HL-60 细胞形态学改变

Fig 3 Morphology change of co-cultured HL-60 cells($\times 200$)

A: Wild-type HL-60 cells; B: HL-60 cells co-cultured with CHO-gp190CT3 cells(1 d); C: HL-60 cells co-cultured with CHO-gp190CT3 cells(5 d); D: HL-60 cells co-cultured with CHO-gp190CT3 cells(7 d); E: HL-60 cells co-cultured with CHO-pcDNA3.0 cells(7 d)

2.3 共培养后 HL-60 细胞磷酸化 STAT3 的表达 免疫细胞化学检测结果显示, 单独培养的 HL-60 细胞与 CHO 和 CHO-pcDNA3.0 共培养组的 HL-

60 细胞 STAT3 磷酸化水平明显低于与 CHO-gp190CT3 共培养组的 HL-60 细胞(图 4)。

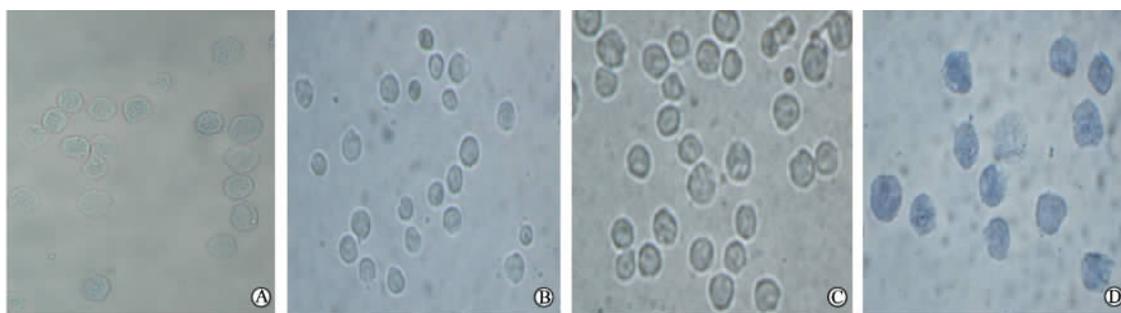


图 4 STAT3 磷酸化免疫细胞化学检测

Fig 4 Immunohistochemical analysis of STAT3-p expression($\times 400$)

A: Wild-type HL-60 cells; B: HL-60 cells co-cultured with CHO cells; C: HL-60 cells co-cultured with CHO-pcDNA 3.0 cells; D: HL-60 cells co-cultured with CHO-gp190CT3 cells

2.4 共培养后 HL-60 细胞 CD15 表达 野生型 HL-60 细胞表达 CD15 的阳性率为 21.93%, 与 CHO 细胞共培养组的 HL-60 细胞表达 CD15 的阳性率为 33.96%, 而与转染 gp190CT3 的 CHO 细胞共培养组 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 HL-60 细胞 CD15 表达的阳性率分别为 54.52%、53.95%、43.24%, 高于野生组。这提示 gp190CT3 能够促进 HL-60 细胞向粒细胞方向分化。

3 讨论

白血病是起源于造血干细胞的恶性疾病, 俗称血癌。白血病细胞具有肿瘤细胞的生长特点: 增殖

失控、分化障碍、凋亡受阻, 白血病细胞大量增生累积, 而使得正常造血功能受到抑制。目前, 科学家提出人体所有疾病都可以从信号转导异常的角度重新认识, 而细胞信号转导机制和各种疾病发生机制的阐明, 使很多信号分子可以作为治疗这些疾病的药物筛选靶位, 由此产生了信号转导药物。

LIF 的生物学作用是通过与 LIF 受体相结合完成的, LIF 受体包括 2 个亚基 gp190 和 gp130, LIF 首先与 LIF 受体的 gp190 亚基结合并使之与 gp130 形成异源性二聚体, 启动下游信号转导通路, 使细胞发生形态和功能改变。gp190 和 gp130 胞内区均含有与细胞增殖分化相关的 3 个结构域 BOX1、

BOX2、BOX3,含有 YXXQ(Y 为酪氨酸, Q 为苯丙氨酸, X 为任意氨基酸)官能体, YXXQ 是下游分子酪氨酸磷酸化的必需结构。LIF 激活信号通路 JAK/STAT3, YXXQ 基团可与信号分子 STAT3 的 SH2 位点相识别^[7-8],从而激活 STAT3 信号分子使其发生磷酸化。信号分子是通过磷酸化和脱磷酸化来调控细胞内 DNA 的合成和细胞的增殖分化,磷酸化的 STAT3 信号分子通过核孔复合体进入细胞核,从而激活与细胞增殖分化相关蛋白的转录^[9]。同时,研究^[10]证明了相关受体细胞内区功能域与 STAT3 的作用是白血病细胞分化和功能成熟的关键。但是,受体细胞内区的多个功能域同时作用起不到抑制白血病细胞增殖的效果,其促进白血病细胞分化的作用也十分有限^[5]。科学家发现^[11],真核细胞存在着一些非常规蛋白分泌现象,因其是不依赖于内质网/高尔基体的蛋白分泌,也被称为非常规蛋白外运(non conventional protein export),利用这些外运途径的有血管生成因子、与炎症有关的细胞因子、调控细胞分化增殖和凋亡的细胞外基质组分、病毒蛋白、参与感染宿主的寄生虫表面蛋白等,但其分子机制至今不清。本实验把其中单一功能域(gp190CT3)分离出来,转染哺乳动物细胞 CHO,通过细胞共培养的方法,以考察其是否能够以非常规蛋白分泌方式出胞,并被白血病细胞吞噬而启动细胞内 JAK/STAT3 信号转导通路,发挥其调节细胞功能的效应。实验结果显示信号转导分子 STAT3 的磷酸化水平有所增高;流式细胞术也检测到细胞表面抗原 CD15 表达的升高,而 CD15 是成熟粒细胞的主要标志物。证明 gp190CT3 在一定程度上可以激活 JAK/STAT 3 信号转导通路,使 HL-60 细胞向正常粒细胞方向分化。由此推测 gp190CT3 蛋白可以部分出胞其功能的获得与其进入白血病细胞有关。

信号转导干扰药物是否可以用于疾病的治疗同时仅引起较少的不良反应,主要取决于两点:一是它所干扰的信号转导途径在体内是否广泛存在,如果该途径广泛存在于各种细胞,其不良反应很难得以控制;二是药物自身的选择性,对信号转导分子的选择性越高,不良反应就越小^[12]。根据 LIFR(亚基细胞内区第三个功能域(BOX3)设计的小分子——gp190CT3(含 BOX3),具有以下特点:利用自身受体成分制备功能多肽无免疫原性和无毒性;

gp190CT3 多肽主要在白血病等病态细胞中发挥作用,对成熟细胞无影响;gp190CT3 多肽作用位点明确,功能专一,需要的剂量小。本实验为信号转导分子机制研究转向临床应用研究的一次尝试,以期为临床白血病的治疗提供一条新的途径。

[参考文献]

- [1] Metcalf D. The leukemia inhibitory factor(LIF)[J]. *Int J Cell Cloning*, 1991, 9: 95-108.
- [2] Starr R, Novak U, Wilson T A, et al. Distinct roles for leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain and gp130 in cell type-specific signal transduction [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 19982-19986.
- [3] Tomida M I, Heike T, Yokota T. Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells [J]. *Blood*, 1999, 93: 1934-1941.
- [4] 杨玲,刘善荣,汤淑萍,等.白血病抑制因子受体 α 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.
- [5] 王静,杨玲,刘厚奇.游离的白血病抑制因子受体 α 亚基胞内功能片段对 HL-60 细胞的生长调节[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 1277-1280.
- [6] Tomida M. Structural and functional studies on the leukemia inhibitory factor receptor (LIF-R): gene and soluble form of LIF-R and cytoplasmic domain of LIF-R required for differentiation and growth arrest of myeloid leukemic cells [J]. *Leukem Lymphoma*, 2000, 37: 517-525.
- [7] Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, et al. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF beta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4524-4529.
- [8] Shao H, Xu X J, Mastrangelo M A, et al. Structural requirements for signal transducer and activator of transcription 3 binding to phosphotyrosine ligands containing the YXXQ motif [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18967-18973.
- [9] Reich R C, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 602-612.
- [10] Shao H, Xu X, Jing N, et al. Unique structural determinants for Stat3 recruitment and activation by the granulocyte colony-stimulating factor receptor at phosphotyrosine ligands 704 and 744 [J]. *J Immunol*, 2006, 176: 2933-2941.
- [11] Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 2109-2119.
- [12] 查锡良. 医学分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 44-47.

[收稿日期] 2007-07-03

[修回日期] 2007-09-25

[本文编辑] 尹茶