

TGF- $\beta$  对 KG-1 细胞株 Gli 2 表达影响

李哲 李斌

**摘要:**目的 探讨在白血病 KG-1 细胞株中转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 信号通路对 Gli 的调控作用。方法 用 0.1、1、10 ng/mL TGF- $\beta$  1 分别作用于 KG-1 细胞 6、12 和 24 h, 收集细胞, 提取 mRNA 检测 Gli 2 表达; 5 ng/mL TGF- $\beta$  1、5 ng/mL TGF- $\beta$  1 + 5  $\mu$ mol/L SIS 3 (specific inhibitor of Smad3) 分别作用于 KG-1 细胞 24 h, 收集细胞, 提取蛋白, 检测 Gli 2 表达。结果 1、10 ng/mL TGF- $\beta$  1 分别作用于 KG-1 细胞 6、12、24 h, 其 Gli 2 的 mRNA 表达分别为 0.78、0.51、0.16 和 0.73、0.59、0.15, 与对照组比较, 明显减少 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 5 ng/mL TGF- $\beta$  1 组 Gli 2 蛋白表达明显降低, 而 5 ng/mL TGF- $\beta$  1 + 5  $\mu$ mol/L SIS 3 组 Gli 2 蛋白表达明显升高。结论 TGF- $\beta$  降低 KG-1 细胞 Gli 2 表达是通过 TGF- $\beta$ /Smad3 途径介导的, 不依赖于 Ptch/Smoo 途径。

**关键词:** KG-1 细胞; 转化全长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); SIS3; Gli 2

中图分类号: R 733.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)06-0793-02

**Effect of TGF- $\beta$  on Gli2 expression in KG-1 cell line** LI Zhe, LI Bin. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College (Jinzhou 121000, China)

**Abstract: Objective** To explore the role of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) signaling pathway in regulation of Gli in leukemia KG-1 cell line. **Methods** KG-1 cells were treated with 0.1 ng/ml, 1 ng/ml and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 for 6 hr, 12 hr and 24 hr, respectively. The cells were collected after stimulation. Total mRNA was extracted. Gli 2 expression was detected. KG-1 cells were treated with 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 and 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 5 mol/L specific inhibitor of Smad 3 (SIS3), respectively for 24 hr. The cells were collected after stimulation and total proteins were extracted. Gli 2 expression was detected. **Results** After the treatments of 1, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 to the KG-1 cells for 6 hr, 12 hr, and 24 hr, Gli 2 mRNA expression decreased significantly (0.78, 0.51, 0.16 and 0.73, 0.59, 0.15, respectively) compared with those of the control group ( $P < 0.05$  for all). The Gli 2 expression (protein level) of control group was higher than that of the TGF- $\beta$  treatment group, while much lower than that of TGF- $\beta$  + SIS3 treatment group. **Conclusion** The expression of Gli 2 in KG-1 cells induced by TGF- $\beta$  is mediated through Smad 3 and the effect is independent of the Ptch/Smoo axis.

**Key words:** KG-1 cell; TGF- $\beta$ ; SIS3; Gli2

Hedgehog (HH) 信号通路在组织修复与损伤中可以促使正常干细胞进行自我更新, 最近研究认为, HH 信号通路是白血病干细胞所必需的功能性通路, 如这一通路失活, 将可阻碍白血病进展<sup>[1]</sup>。Gli 是 HH 信号通路的最后效应阶段, 研究表明 Gli 不仅受 HH/Smoo 信号调控, 也受转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 信号转导通路调控, 这种调控是独立于 Ptch/Smoo 途径的<sup>[2]</sup>。本研究通过观察 TGF- $\beta$  对 KG-1 细胞 Gli 2 表达影响, 探讨白血病中 TGF- $\beta$  信号通路对 Gli 的调控, 寻找白血病治疗新靶点。

## 1 材料与方

1.1 细胞与培养 KG-1 细胞 (中国医学科学院血液研究所)。细胞采用含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 环境培养。

1.2 主要试剂与仪器 重组人细胞因子 TGF- $\beta$  1 (美国 Pep-ro Tech 公司); SIS 3 (specific inhibitor of Smad 3) (德国 Merck 公司); 兔抗人 Gli 2 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); Real time RT-PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Rotor-Gene 6000 实时定量 PCR 仪 (德国 QIAGEN 公司); 凝胶成像系统 (美国 Syngene 公司)。

1.3 细胞总 RNA 提取 细胞总 RNA 提取按照 Trizol Reagent 说明书进行, 应用 20% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度仪对 RNA 质量进行鉴定。

## 1.4 KG-1 细胞 Gli 2 mRNA 表达检测

1.4.1 cDNA 合成 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。反应体系如下: 5  $\times$  RT buffer 2  $\mu$ L, dNTP mixture (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, random Hexamer primer 0.5  $\mu$ L, RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, AMV reverse transcriptase 0.5  $\mu$ L, 实验样品 RNA 1  $\mu$ L, RNase Free H<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L, 于 25 °C 静置 10 min, 45 °C 45 min, 95 °C 5 min, 4 °C 5 min。

1.4.2 Real Time PCR 反应体系及反应参数: 采用 SYBR Premix Ex Taq™ Kit 进行定量 PCR, SYBR Primx Ex Taq 12.5  $\mu$ L, PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, PCR reverse primer (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, 总体积 25  $\mu$ L。反应条件如下: 95 °C 1 min 预变性 1 次, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 循环反应 40 次。待测样品每管重复 3 次。PCR 仪 (德国 QIAGEN 公司) 上进行。PCR 引物序列, Gli 2 (sense 5'-TGGCCGCTTCAGATGACAGATGTTG-3', anti sense 5'-CGTTAGCCGAATGTCAGCCGTGAAG-3'), ABL (sense 5'-CGAGAGCCTGGCCTACAACAA-3', anti sense 5'-CTAG-CAGCTCATAACCTGGGACA-3')。采用 comparative Delta-delta Ct 法计算 Gli 2 表达。

1.5 KG-1 细胞 Gli 2 蛋白表达检测 采用免疫蛋白印迹 (western blot) 法, 培养结束后, 细胞 1 000 r/min 4 °C 离心, 用冰预冷磷酸盐缓冲液洗 2 次, 加裂解液, 于冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 30 min, 将离心所得上清转入另一新 EP 管中, -80 °C 保存备用。样本蛋白测定浓度后, 加入上样缓冲液混匀, 100 °C 变性 5 min。用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙

作者单位: 辽宁医学院附属第一医院血液科, 辽宁 锦州 12100

作者简介: 李哲 (1973-) 男, 辽宁锦州人, 主治医师, 博士, 主要从事血液病临床诊治工作。

烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白(100 μg/道),然后转移到聚偏氟乙烯膜上,转膜完毕后,于三羟甲基氨基缓冲液(TTBS)中浸泡 5 min,用 5% 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 2 h。加入兔抗人 Gli 2 单克隆抗体(1:1 000 稀释)或 β-actin(1:500 稀释)4 °C 过夜。洗膜后加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释),37 °C 孵育 2 h。将增强化学发光试剂盒中 A 液和 B 液等量混合,滴加于膜上,反应 1 min 后,在发光仪上发光。待测样品重复 3 次。

1.6 统计分析 统计数据以 SPSS 13.0 软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析,多个样本均数比较采用最小显著差法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TGF-β 对 KG-1 细胞 Gli 2 表达影响(表 1) 与对照组比较,0.1 ng/mL TGF-β 1 作用于 KG-1 细胞 6、12、24 h 后,Gli 2 表达无明显变化;而 1、10 ng/mL TGF-β 1 分别作用于 KG-1 细胞 6、12 和 24 h 后,Gli 2 表达明显低于对照组,时间效应关系明显;1 与 10 ng/mL TGF-β 1 组间无明显差异。

表 1 TGF-β1 对 KG-1 细胞 Gli 2 的 mRNA 表达影响

组别(ng/mL)	时间(h)		
	6	12	24
对照组	1.00	1.00	1.00
TGF-β1			
0.1	1.06	0.96	0.87
1	0.78 <sup>a</sup>	0.51 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>
10	0.73 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

2.2 TGF-β、SIS 3 对 KG-1 细胞 Gli 2 表达影响(图 1) Western blot 结果显示,5 ng/mL TGF-β 1 作用于 KG-1 细胞 24 h 后,Gli 2 蛋白表达较对照组明显降低;5 ng/mL TGF-β 1 + 5 μmol/L SIS 3 作用于 KG-1 细胞 24 h 后,其 Gli 2 蛋白表达较对照组明显增高。

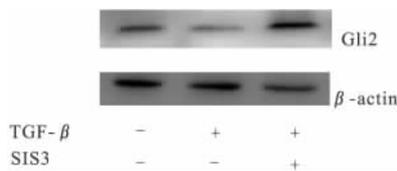


图 1 TGF-β、SIS3 对 KG-1 细胞 Gli 2 蛋白表达影响

## 3 讨论

研究表明 HH 通路包括白血病在内的多种肿瘤性疾病相关,因此抑制该通路有可能成为肿瘤预防和治疗新靶点<sup>(1)</sup>。Gli 是 HH 信号通路的最后效应阶段,包括 3 个同源基因:Gli 1、Gli 2 和 Gli 3。Gli 2 在不同细胞,不同时期可能分别起激活或抑制作用<sup>(3)</sup>。Gli 分子与肿瘤细胞发生和发展无直接关系,但直接调控肿瘤细胞增殖、分化、转移的分子基因

转录水平则受到 HH 信号通路调控,可能是该通路导致肿瘤的关键因素。在造血系统中,HH 家庭成员在体外和体内干/祖细胞扩增中起重要调节作用。类似于 HH 信号通路,TGF-β 在血管生成、炎症、组织修复和调节细胞生长和分化等过程中发挥着重要作用<sup>(4)</sup>。其中 TGF-β 1 生物活性最强,在造血调控方面起重要作用<sup>(5)</sup>。最近研究表明 TGF-β 通路可以调控 Gli 功能<sup>(6)</sup>。

研究表明在白血病细胞上存在 HH 信号转导通路中 Ptch 和 Smo 分子缺失,而 Gli 则有表达<sup>(7)</sup>,因此阻断 Gli 表达可能成为治疗急性白血病方法之一。本研究结果显示,1、10 ng/mL TGF-β 1 作用于 KG-1 细胞 24 h 内,Gli 2 表达较对照组明显减少,且存在时间效应。TGF-β 下游信号是 Smad 2 和 Smad 3,对于成人,Smad 3 是 TGF-β 最主要依赖下游信号,而 Smad 2 则在胚胎发育形成时起关键作用<sup>(8)</sup>。因此,本研究应用 SIS 3<sup>(9)</sup>(特异性 Smad 3 阻断剂),阻断 TGF-β 作用,结果表明 SIS 3 可以有效阻断 TGF-β 引起的 Gli 2 表达降低。因为 KG-1 细胞不表达 Ptch 和 Smo<sup>(7)</sup>,所以 TGF-β 降低 KG-1 细胞 Gli 2 表达,是不依赖于 Ptch/Smo 这一途径的,而依赖于 Smad 3 途径。提示可以应用 TGF-β,并通过 Smad 3 途径调控 Gli 2 基因,作用于下游与细胞增殖分化有关基因,进而对白血病起到治疗作用。

## 参考文献

- Long B, Zhu H, Zhu C, et al. Activation of the hedgehog pathway in chronic myelogenous leukemia patients [J]. J Exp Clin Cancer Res 2011; 30: 8-12.
- Dennler S, André J, Alexaki I, et al. Induction of Sonic Hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad 3-dependent activation of Gli 2 and Gli 1 expression *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Res 2007; 67: 6981-6986.
- Stamatakis D, Ulloa F, Tsoni SV, et al. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube [J]. Genes Dev 2005; 19: 626-641.
- Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor-β [J]. Adv Cancer Res 1988; 51: 107-145.
- Wu KF, Zhu YM, Rao Q, et al. Expression of transforming growth factor-beta, tumor necrosis factor-alpha, and leukemia inhibitory factor mRNAs in rodent and human hematopoietic cells [J]. Ann N Y Acad Sci 1991; 628: 151-152.
- Fernández-Zapico ME. Primers on molecular pathways: GLI: more than just Hedgehog? [J]. Pancreatol 2008; 8: 227-229.
- Kobune M, Takimoto R, Murase K, et al. Drug resistance is dramatically restored by Hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells [J]. Cancer Sci 2009; 100: 948-955.
- Massagué JJ, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. Genes Dev 2005; 19: 2783-2810.
- Jinnin M, Itoh H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad 3, and its effect on transforming growth factor-beta 1-induced extracellular matrix expression [J]. Mol Pharmacol 2006; 69: 597-607.

收稿日期: 2012-01-17

(解学魁编辑 范会清校对)