

· 论 著 ·

TGF- $\beta_1$  对白血病 KG-1 细胞株 Gli1 表达的影响

李 哲, 潘 静

(辽宁医学院附属第一医院血液科, 辽宁锦州 121000)

**摘要:**目的 证明在白血病 KG-1 细胞株中存在 TGF- $\beta$  信号通路对 Gli 的调控作用。方法 (1) 用 0.1、1、10 ng/mL TGF- $\beta_1$  分别作用于 KG-1 细胞, 时间分别为 6、12、24 h。处理结束后收集细胞, 提取 mRNA, 检测 Gli1 的表达。(2) 5 ng/mL TGF- $\beta_1$ 、5 ng/mL TGF- $\beta_1$  联合 5  $\mu$ mol SIS3 分别作用于 KG-1 细胞 24 h。处理结束后收集细胞, 提取 mRNA, 检测 Gli1 的表达。结果 (1) 1~10 ng/mL TGF- $\beta_1$  分别作用于 KG-1 细胞 6、12、24 h, 从 12 h 起并至少持续至 24 h, 其 Gli1 的 mRNA 表达较对照组明显减少; (2) 5 ng/mL TGF- $\beta_1$ 、5 ng/mL TGF- $\beta_1$  联合 5  $\mu$ mol SIS3 分别作用于 KG-1 细胞 24 h, 其 Gli1 的 mRNA 表达与对照组比较: 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  组较对照组降低, 而 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  联合 5  $\mu$ mol SIS3 组较对照组明显增高。结论 应用 TGF- $\beta_1$  可以降低 KG-1 细胞 Gli1 的表达, TGF- $\beta_1$  降低 KG-1 细胞 Gli1 的表达是通过 TGF- $\beta$ /Smad3 途径介导的, 可被 SIS3 所抑制, 不依赖于 Ptch/Smoo 途径。

**关键词:** KG-1 细胞; TGF- $\beta_1$ ; SIS3; Gli1

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.20.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)20-2018-03

Effect of TGF- $\beta_1$  on Gli1 expression in KG-1 cell line

Li Zhe, Pan Jing

(Department of Hematology, the First Hospital, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

**Abstract:** **Objective** To prove that there was cross talk between Hh signaling pathway and TGF- $\beta$  signaling pathway in KG-1 cells line. **Methods** (1) KG-1 cells were treated with 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, and 10 ng/mL TGF- $\beta_1$  for 6 h, 12 h, and 24 h respectively. Cells were collected after stimulation. Total mRNA was extracted. Gli1 expression was detected by real-time PCR. (2) KG-1 cells were treated with 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  and 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  + 5  $\mu$ mol SIS3 respectively for 24h. Cells were collected after stimulation. Total mRNA was extracted. Gli1 expression was detected. **Results** (1) When 1-10 ng/mL TGF- $\beta_1$  acted on the KG-1 cells respectively for 6 h, 12 h and 24 h, significant reduction of Gli1 mRNA in response to TGF- $\beta_1$  was observed in KG-1 cells, emerging at 12 h and lasting at least 24 h, lower than that of the control group. (2) When 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  and 5 ng/mL TGF- $\beta_1$  + 5  $\mu$ mol SIS3 acted on the KG-1 cells respectively for 24 h respectively, Gli1 expression of mRNA of control group was higher than that of TGF- $\beta_1$  group, while much lower than that of TGF- $\beta_1$  + SIS3 group. **Conclusion** TGF- $\beta_1$  significantly decreased Gli1 expression in KG-1 cells. Gli1 induction in KG-1 cells by TGF- $\beta_1$  was a Smad3-dependent manner. This effect was independent from the Ptch/Smoo axis.

**Key words:** KG-1 cell; TGF- $\beta_1$ ; SIS3; Gli1

Hedgehog(HH)信号通路在组织的损伤与修复中可以促使正常干细胞自我更新, 因其过度激活可诱使正常干细胞向肿瘤干细胞转化, 并最终导致肿瘤的发生<sup>[1]</sup>, 近年来备受关注。最近的研究认为, HH 信号通路是白血病干细胞所需的功能性通路, 这一通路的失活将阻碍白血病的进展<sup>[2]</sup>。

Gli 是 HH 信号通路的最后效应阶段, 一直以来 Gli 都作为 HH 通路的下游基因参与肿瘤发生。最近关于 Gli 非经典激活机制的研究表明, Gli 分子可能是几种信号通路所共同整合交织的平台, 多种机制可以调控 Gli 的活性<sup>[3]</sup>。最近研究表明, 在正常成纤维细胞和角质形成细胞以及多种肿瘤细胞系, Gli 不仅受 HH/Smoo 信号的调控, 也受其他途径的调控, 比如 TGF- $\beta$  信号转导通路, 这种调控是独立于 Ptch/Smoo 途径的<sup>[4]</sup>。TGF- $\beta$  作为非常重要的肿瘤抑制因子, 对多种恶性肿瘤细胞的增生有明显的抑制作用。James 等<sup>[5]</sup>研究证实, TGF- $\beta$  对白血病细胞的增生具有抑制作用, 可以诱导白血病细胞分化成熟, 而在急性白血病患者中 TGF- $\beta$  水平降低, 促使肿瘤细胞过度增生, 对急性白血病的发生起促进作用。

为了寻找白血病治疗的新的靶点, 笔者假设在白血病中同样存在有 TGF- $\beta$  信号通路对 Gli 的调控, 进行了 TGF- $\beta_1$  对 KG-1 细胞 Gli1 表达影响的研究, 现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** KG-1 细胞由中国医学科学院血液研究所惠赠。细胞培养应用 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 培养环境为 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 恒温培养箱中培养。

**1.2 仪器与试剂** 重组人细胞因子 TGF- $\beta_1$  (Pepro Tech); SIS3 (Merck Company); PCR 引物合成 (大连宝生物公司); RT-PCR 试剂盒 (杭州博日科技有限公司); Real Time RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa Japan); 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 方法

**1.3.1 Real Time PCR 检测 KG-1 细胞 Gli1 mRNA 的表达** cDNA 合成: 所培养的 KG-1 细胞总 RNA 的提取按照 Trizol Reagent 说明书进行操作, 按逆转录试剂盒 (Promega 公司) 说明书进行逆转录合成 cDNA。反应体系如下: 5 × RT 缓冲液 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。

Real Time PCR 反应体系及反应参数: 采用 SYBR Prem ix

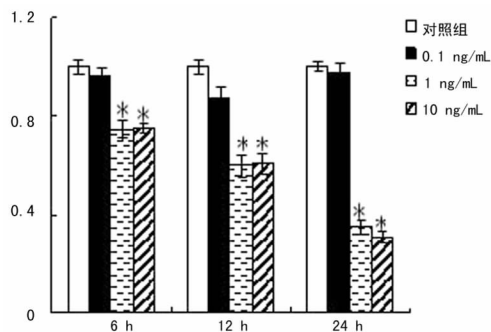
Ex Taq™ Kit(TaKaRa 公司)进行定量 PCR,反应体系如下: SYBR Primx Ex Taq12.5 μL,PCR Forward Primer(10 μmol) 0.5 μL,PCR Reverse Primer(10 μmol)0.5 μL,cDNA 2 μL, dH<sub>2</sub>O 9.5 μL,总体积 25 μL。反应条件如下:95 °C 1 min 预变性 1 次,95 °C 10 s,60 °C 30 s,循环反应 40 次。待测样品每管重复 3 次。在 Rotor-Gene 6000 实时定量 PCR 仪(德国 QIA-GEN 公司)上进行。PCR 引物的序列,Gli1 (sense 5'-CCC AAT CAC AAG TCA GGT TCC T-3',antisense 5'-CCT ATG TGA AGC CCT ATT TGC C-3'),ABL(sense 5'-CGA GAG CCT GGC CTA CAA CAA-3',antisense 5'-CTA GCA GCT CAT ACA CCT GGG ACA-3')。采用 Comparative Delta-delta Ct 法计算 Gli1 的表达。

**1.3.2 PCR 反应判定 KG-1 细胞是否表达 Ptch 和 Smo** 提取 KG-1 细胞的 mRNA 进行反转录,并应用 Ptch 和 Smo 的引物进行扩增,PCR 引物的序列,Ptch(sense 5'-CTG TTG GCA TAG GAG TGG AGT TCA CC-3',antisense 5'-CTG CTG GGC CTC GTA GTG CCG AAG C-3'),Smo(sense 5'-CAG AAC ATC AAG TTC AAC AGT TCA GGC-3',antisense 5'-ATA GGT GAG GAC CAC AAA CCA AAC CAC ACC-3'),反应体系如下:10×PCR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL,dNTP Mixture(10 mmol)0.5 μL,上游特异性引物(5 μmol)0.5 μL,下游特异性引物(5 μmol)0.5 μL,Taq mix DNA polymerase 0.5 μL,RT 产物 2.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 18 μL,总体积 25 μL。PCR 反应条件:94 °C 3 min;94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 60 s,35 循环;72 °C 5 min。反应结束后,取 10 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳。电泳条件:电流 160 mA,电泳 25 min 后,并通过凝胶图像分析仪观察是否有相应的 PCR 产物。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行分析,组间比较用单因素方差分析,多个样本的均数比较用 LSD 方法。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

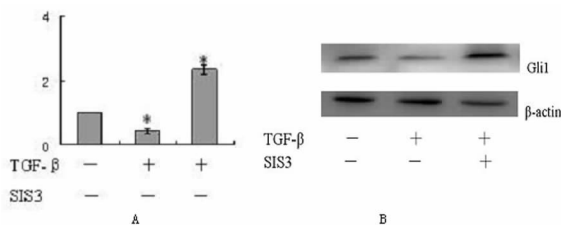
**2.1 TGF-β<sub>1</sub> 对 KG-1 细胞 Gli1 表达的影响** 0.1 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 作用于 KG-1 细胞 6、12、24 h 后,Real Time-PCR 结果显示 KG-1 细胞的 Gli1 表达与对照组相比没有明显变化;而 1 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 和 10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 分别作用于 KG-1 细胞 6、12、24 h 后,Real Time-PCR 结果显示,KG-1 细胞的 Gli1 表达与对照组相比,明显低于对照组;而且随作用时间的延长,作用更加明显;1 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 和 10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 对 KG-1 细胞 Gli1 表达的影响没有明显差异,因此,后续实验应用两组间近似平均浓度 5 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 作用于 KG-1 细胞,见图 1。



\*:与对照组相比,P<0.05。

图 1 不同浓度 TGF-β<sub>1</sub> 作用于 KG-1 细胞后不同时间 Gli1 的 mRNA 表达变化

**2.2 TGF-β<sub>1</sub>、SIS3 对 KG-1 细胞 Gli1 表达影响** 因 1~10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 作用于 KG-1 细胞后可引起 Gli1 的表达减少,且 1 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 组和 10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 组之间没有明显差异,故应用其近似平均值 5 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 作用于 KG-1 细胞,Real Time-PCR 结果显示,5 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 作用于 KG-1 细胞 24 h,Gli1 的 mRNA 及蛋白表达较对照组明显降低;Western blotting 结果显示,5 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 联合 5 μmol SIS3 作用于 KG-1 细胞 24 h 后,其 Gli1 的 mRNA 及蛋白表达较对照组明显增高,见图 2。



A:TGF-β<sub>1</sub> 组 Gli1 mRNA 表达较对照组降低;TGF-β<sub>1</sub> 联合 SIS3 组 Gli1 mRNA 表达较对照组明显增高。\*:P<0.05,与空白对照组相比。B:TGF-β<sub>1</sub> 组 Gli1 蛋白表达较对照组降低;TGF-β<sub>1</sub> 联合 SIS3 组 Gli1 的蛋白表达较对照组增高。

图 2 TGF-β<sub>1</sub>、SIS3 对 KG-1 细胞 Gli1 mRNA 和蛋白表达的影响

**2.3 PCR 反应判定 KG-1 细胞是否表达 Ptch 和 Smo** 见图 3。

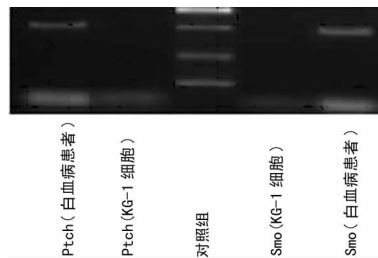


图 3 KG-1 细胞与对照组的白血病患者相比较,均没有 Ptch 和 Smo 基因的表达

**3 讨 论**

HH 基因的作用涉及细胞的增生分化和组织发育。众多研究表明该通路与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的新靶点。HH 信号分子首先作用于受体蛋白 Ptch 家族,并激活 Smo,进而促使 Gli 转变成催化剂形式,进入细胞核启动下游基因转录。Gli 包括 3 个同源基因,Gli1、Gli2、Gli3,其中 Gli1 起激活作用<sup>[6]</sup>。Gli 分子本身与肿瘤细胞的发生、发展并没有直接关系,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 的家庭成员在体外和体内的干(祖)细胞扩增中起重要的调节作用。在一些白血病细胞系中对 HH 信号的成分进行检测,如 Ptch 和 Smo 可在 Jurkat 细胞中表达<sup>[7]</sup>,Gli1 可在 HL-60 细胞和 KG-1 细胞中表达,Gli2 在 KG-1 细胞和 HL-60 细胞中表达<sup>[8]</sup>。类似于 HH 信号通路,TGF-β 在炎症、组织修复、血管生成和调节细胞生长和分化等复杂过程中发挥了重要作用,其中 TGF-β<sub>1</sub> 生物活性最为强,在造血调控方面起重要作用<sup>[9]</sup>。

虽然有许多研究表明,HH 通路的异常活化在许多恶性肿瘤里存在,但在结肠癌细胞系的研究却发现很多 HH 通路

的关键分子并没有检测到表达,表明在结肠癌细胞系中没有 HH 通路普遍激活<sup>[10]</sup>。这表明 HH 通路所激活的一些靶基因可能同样被其他通路所调控。最近的研究表明,TGF- $\beta$  通路可以调控 Gli 的功能<sup>[11]</sup>,也就是说存在由 TGF- $\beta$  通路调控的 HH 信号传导通路的非经典调控途径。为了证明在白血病中同样存在由 TGF- $\beta$  通路介导的 HH 通路的调控,笔者进行了目前的研究。

本研究选取的 KG-1 细胞株属于急性髓系白血病细胞,有研究表明在这种白血病细胞上存在 HH 信号转导通路中 Ptch 和 Smo 分子的缺失,而 Gli 则有表达<sup>[12]</sup>。对于这类细胞传统的阻断 HH 通路的做法将不起作用,但是因为存在 Gli 的表达,因此,阻断 Gli 的表达将可能成为治疗急性白血病的方法之一。对于阻断 Gli 的表达,特异性的 siRNA 可以起作用,但是对于白血病细胞,siRNA 干扰往往比较困难。本研究应用 TGF- $\beta_1$  成功地减少了 KG-1 细胞 Gli1 的表达。本研究结果显示,1~10 ng/mL TGF- $\beta_1$  作用于 KG-1 细胞后的 24 h 内,Gli1 的表达较对照组明显减少,且较少程度随作用时间的延长而显著,但是 1 ng/mL TGF- $\beta_1$  组和 10 ng/mL TGF- $\beta_1$  组之间没有明显差异。分析 TGF- $\beta_1$  降低 KG-1 细胞的 Gli1 表达的机制,TGF- $\beta_1$  下游的信号是 Smad2 和 Smad3。对于成人,Smad3 是 TGF- $\beta_1$  最主要依赖的下游信号,而 Smad2 则在胚胎发育形成时发挥关键作用<sup>[13]</sup>。因此,本研究应用 SIS3<sup>[14]</sup>,一种特异性的 Smad3 的阻断剂,来阻断 TGF- $\beta_1$  的作用并观察效果,结果表明 SIS3 可以有效阻断 TGF- $\beta_1$  引起的 Gli1 的表达降低。因为 KG-1 细胞不表达 Ptch 和 Smo<sup>[12]</sup>,这一点在本研究中已经验证,所以 TGF- $\beta_1$  降低 KG-1 细胞 Gli1 的表达,是不依赖于 Ptch/Smo 这一途径的,而是依赖于 Smad3 途径的。

综上所述,本研究应用 TGF- $\beta_1$  可以降低 KG-1 细胞的 Gli1 的表达,其作用机制不依赖于 Ptch/Smo 这一途径的,而是依赖于 Smad3 途径的;提示可以应用 TGF- $\beta_1$ ,并通过 Smad3 途径调控 Gli1 基因,作用于其下游与细胞增殖分化有关的基因,进而对白血病起到治疗的作用。

#### 参考文献:

- [1] Liu H, Gu D, Xie J. Clinical implications of hedgehog signaling pathway inhibitors[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(1): 13-26.
- [2] 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.
- [3] Seong KH, Akimaru H, Dai P, et al. Inhibition of the nuclear import of cubitus interruptus by roadkill in the presence of strong hedgehog signal[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15365.
- [4] Dennler S, André J, Alexaki I, et al. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6981-6986.
- [5] Downing JR. TGF-beta signaling: Tumor suppression and acute lymphoblastic leukemia[J]. *N Eng J Med*, 2004, 351(6): 528-530.
- [6] 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(5): 626-641.
- [7] Detmer K, Walker AN, Jenkins TM, et al. Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2000, 26(4): 360-372.
- [8] 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(5): 948-955.
- [9] 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.
- [10] Chatel G, Ganef C, Boussif N, et al. Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(12): 2622-2627.
- [11] Fernández-Zapico ME. Primers on molecular pathways GLI: more than just hedgehog[J]. *Pancreatol*, 2008, 8(3): 227-229.
- [12] 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(5): 948-955.
- [13] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2783-2810.
- [14] Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(2): 597-607.

(收稿日期:2011-11-16 修回日期:2012-03-27)

(上接第 2017 页)

- of Npm1 in proliferation, apoptosis and differentiation of neural stem cell[J]. *J Neurol Sci*, 2008, 266(2): 131-137.
- [8] Hafez M, Ye F, Jackson K, et al. Performance and clinical evaluation of a sensitive multiplex assay for the rapid detection of common NPM1 mutation[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(5): 629-635.
- [9] Bard JD, Gelebart P, Anand M, et al. Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell

lymphoma[J]. *Leukemia*, 2008, 22(8): 1595-1603.

- [10] Greulich C, Diendorf J, Gessmann J, et al. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(9): 3505-3514.
- [11] Chi HT, Vu HA, Iwasaki R, et al. Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(2): 261-262.

(收稿日期:2011-11-09 修回日期:2012-01-18)