

# 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 介导的粘着斑激酶和细胞外信号调节激酶 信号传导通路对 K562 细胞增殖的影响

牛志云<sup>1</sup>, 成志勇<sup>2</sup>, 刘英杰<sup>3</sup>, 索晓惠<sup>4</sup>, 张学军<sup>1</sup>, 潘 陵<sup>1\*</sup>

(1. 河北医科大学第二医院血液内科, 河北 石家庄 050000; 2. 保定市第一医院血液内科, 河北 保定 071000;  
3. 石家庄市第三医院 内八科, 河北 石家庄 050011; 4. 邯郸市第一医院血液内科, 河北 邯郸 056002)

**摘要:**【目的】分析整合素  $\alpha 5\beta 1$  介导的粘着斑激酶(FAK)和细胞外信号调节激酶(ERK)信号转导通路对 K562 细胞增殖的影响,并初步探讨其作用机制。【方法】应用四甲基偶氮唑蓝染色法(MTT)检测抗整合素  $\alpha 5\beta 1$  单抗(Anti- $\alpha 5\beta 1$ )对 K562 细胞增殖的抑制作用,应用反转录 PCR(RT-PCR)和蛋白印迹(western blot)方法检测 FAK 和 ERK 的 mRNA 和蛋白表达水平的改变。【结果】Anti- $\alpha 5\beta 1$  明显抑制 K562 细胞的增殖,下调细胞内总 FAK 及 ERK 的 mRNA 和蛋白表达,并抑制其磷酸化水平。【结论】整合素  $\alpha 5\beta 1$  介导的 FAK-ras-ERK 信号转导通路可能参与了 K562 细胞的增殖调控,阻断此通路可明显抑制 K562 细胞的增殖。

**关键词:** 整合素; K562 细胞; 粘着斑激酶; 细胞外信号调节激酶

**中图分类号:** R      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)06-0728-05

## Effect of Integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated FAK and ERK Signal Pathway on Proliferation of K562 Cells

NIU Zhi-yun<sup>1</sup>, CHENG Zhi-yong<sup>1</sup>, LIU Ying-jie<sup>2</sup>, SUO Xiao-hui<sup>3</sup>, ZHANG Xue-jun<sup>1</sup>, PAN Ling<sup>1\*</sup>

(1. Department of Hematology, The Second Hospital of Hebei Medical University and The Key Hematology Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Hematology, The First Hospital of Baoding 071000, China;  
3. Department of The 8th Internal Medicine, The Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China;  
4. Department of Hematology, The First Hospital of Handan, Handan 056002, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the function of integrin  $\alpha 5\beta 1$ -mediated focal adhesin kinase (FAK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal transduction pathway on the proliferation of K562 cells and explore its mechanism. 【Methods】 The inhibitory effect of anti- $\alpha 5\beta 1$  on the proliferation of K562 cells was measured by MTT assay, the expression levels of FAK and ERK mRNA by RT-PCR. The protein expression levels of FAK and ERK were detected by western blot analysis. 【Results】 The present study showed that anti- $\alpha 5\beta 1$  antibody could inhibit the proliferation of K562 cells, down-regulate the expression of total FAK and ERK mRNA and the relative proteins. 【Conclusion】 Intergrin  $\alpha 5\beta 1$  mediated FAK-ras-ERK signal transduction pathway might conduct the abnormal proliferation of K562 cells.

**Key words:** integrin; K562; FAK; ERK

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(6): 728-732]

整合素是一类重要的细胞表面受体,它作为一种跨膜信号分子,通过特有的信号转导途径传递相关信号,参与调节细胞的多种生理和病理变化。研究表明,整合素  $\beta 1$  亚家族(主要包括  $\alpha 5\beta 1$

和  $\alpha 4\beta 1$ )大量表达于慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)祖细胞上,但由于其功能存在缺陷而导致细胞异常增殖和黏附功能下降。国内外研究表明<sup>[1-2]</sup>抑制 CML 细胞特异性 P210 蛋

收稿日期: 2009-06-16

基金项目: 河北省自然科学基金(c200500745)

作者简介: 牛志云,医学博士,主治医师,从事白血病信号传导研究, E-mail: zhiyunniu@126.com; \* 通信作者,潘陵,教授,博士生导师  
E-mail: lingpan20002000@yahoo.com.cn

白表达可恢复整合素  $\beta 1$  介导的 CML 造血祖细胞的黏附和增殖抑制作用, CML 和人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞中 P210 蛋白的酪氨酸激酶活性异常增高可能是由于表达 P210 蛋白的细胞中整合素  $\beta 1$  活化障碍所引起。研究证实, 应用整合素介导的信号转导通路中某些关键分子如粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、细胞外信号调节激酶(signal-regulated kinase, ERK)的抑制剂或抑制性抗对抑制肿瘤细胞的增殖有一定作用<sup>[3-4]</sup>。因此本文以 K562 细胞为研究对象, 观察整合素  $\alpha 5\beta 1$  单克隆抗体对 K562 细胞增殖及 FAK、ERK 表达的影响, 并与 CML 的常用药物 IFN $\alpha$ -2b 的作用进行比较, 探讨整合素介导的 FAK-ras-ERK 信号通路在 CML 细胞异常增殖中作用以期作为 CML 的治疗提供新的靶向治疗。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

K562 细胞、10 例健康志愿者骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNC)和 10 例 CML 急变期患者的 BMMNC 在含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养。收集对数生长期 K562 细胞, 调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  细胞/mL, 以每孔 1.0 mL 接种于 24 孔板, 参照文献<sup>[5]</sup>以终浓度为 10 000 U/mL 的 IFN $\alpha$ -2b 和 4  $\mu$ g/mL 整合素  $\alpha 5\beta 1$  单抗(Anti- $\alpha 5\beta 1$ )预处理各组细胞 48 h。

### 1.2 药品和试剂

阻断型小鼠抗人整合素  $\alpha 5$  单克隆抗体(Anti- $\alpha 5$ , 小鼠 IgG1)为 BD pharmingen 公司产品, 阻断型小鼠抗人整合素  $\beta 1$  单克隆抗体(Anti- $\beta 1$ , 小鼠 IgG1), 购自苏州库尔特公司。IFN $\alpha$ -2b 购于诺华公司。小鼠抗 FAK 单克隆抗体、兔抗 p-FAK(Tyr<sup>397</sup>)多克隆抗体、兔抗 ERK<sub>1</sub> 多克隆抗体和小鼠抗 p-ERK 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。Trizol RNA 提取试剂盒购自 Gibco 公司, 随机引物、M-MLV 逆转录酶及 TaqDNA 聚合酶、dNTP 等 PCR 反应体系购自 Promega 公司。FAK 和 ERK 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

### 1.3 流式细胞仪检测整合素 $\alpha 5\beta 1$ 表达水平

分别收集培养液中加入抗整合素  $\alpha 5$ (CD49e) 单抗或抗整合素  $\beta 1$ (CD29) 单抗或对照抗体(小鼠

IgG 同型对照抗体)后培养的 K562 细胞、健康志愿者 BMMNC 和 CML 急变期患者的 BMMNC, 并调整细胞密度为  $5 \times 10^6$ /mL, 取细胞悬液 100  $\mu$ L, 分别加入羊抗鼠 FITC 二抗 10  $\mu$ L, 4 °C 避光放置 30 min; 冷 PBS 洗涤后, 用 FCM 检测 K562 细胞、健康志愿者 BMMNC 以及 CML 患者的 BMMNC 表面整合素  $\alpha 5$ 、 $\beta 1$  的表达情况。

### 1.4 MTT 检测 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 对 K562 细胞增殖的影响

收集对数生长期的 K562 细胞并调整密度为  $5 \times 10^6$ /mL, 将细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 200  $\mu$ L, 实验组分为 IFN $\alpha$ -2b 组、Anti- $\alpha 5\beta 1$  组和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组; 对照组加入同型对照抗体(小鼠 IgG)孵育。实验组 IFN $\alpha$ -2b 终浓度为 10 000 U/mL, Anti- $\alpha 5\beta 1$  浓度分别为 3  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL 和 8  $\mu$ g/mL, 每组接种 3 个复孔连续培养 1 ~ 6 d。培养结束前 4 h 每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL), 离心弃上清, 加入 200  $\mu$ L 二甲亚砜(DMSO)充分溶解结晶物, 采用酶标仪检测 490 nm 处吸光度 *A* 值, 绘制细胞存活曲线并计算增殖抑制率。

### 1.5 PT-PCR 检测 FAK 和 ERK mRNA 水平

分别收集对照组、Anti- $\alpha 5\beta 1$  和 IFN $\alpha$ -2b 处理 48 h 的 K562 细胞以及 CML 急变期患者和健康志愿者的 BMMNC, 以 TrizolRNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。引物序列及扩增片段如下:  $\beta$ -actin 上游引物 5'-TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG-3', 下游引物 5'-CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT-3'; 扩增片段长度 155 bp。FAK 上游引物 5'-TTG CCG AGA ATA TGG CTG ACC TAA-3', 下游引物, 5'-TGG TAT TGA TGG CAA AGC CCG TTC-3'; 扩增片段长度 116 bp。ERK1 上游引物 5'-ACC TGC TCA TCA ACA CCA CC-3', 下游引物, 5'-CGT AGC CAC ATA CTC CGT CA-3'; 扩增片段长度 110 bp。反应条件: 94 °C 预变性 2 min 进入循环, 94 °C 变性 40 s, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 经 35 个循环扩增后 72 °C 延伸 10 min。

### 1.6 Western blot 检测 FAK 和 ERK 的蛋白水平

蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 并测定样本蛋白, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳、转膜和免疫显色。以封闭液分别稀释小鼠抗 FAK 单克隆抗体(1:500)、兔抗 p-FAK(Tyr<sup>397</sup>)多克隆抗体(1:200)、兔抗 ERK1 多克隆抗体(1:

500)或小鼠抗 p-ERK 单克隆抗体(1:200),按每  $\text{cm}^2$  膜加入 0.1 mL 一抗,封入袋内室温轻摇,充分反应 6 h。再次取出硝酸纤维素膜,TTBS 振摇洗膜 3 次,每次 10 min,以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:3 000)或山羊抗兔 IgG(1:5 000)。按每  $\text{cm}^2$  膜加入 0.1 mL 二抗,封入袋内室温摇动孵育 2 h。

### 1.7 统计学处理

数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。多组间均数差异性比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 K562 细胞和 CML 急变期患者 BMMNC 表面整合素 $\alpha 5\beta 1$ 高表达

经 FCM 检测,健康志愿者 BMMNC 表面整合素  $\alpha 5$ (CD49e)和  $\beta 1$ (CD29)表达阳性率分别为

(64.0  $\pm$  2.4)%和 (72.4  $\pm$  3.6)%。K562 细胞和 CML 急变期患者的 BMMNC 表面整合素  $\alpha 5\beta 1$  表达阳性率分别(97.6  $\pm$  1.0)%、(99.2  $\pm$  0.5)%和 (91.2  $\pm$  2.5)%、(93.4  $\pm$  1.7)%。与健康志愿者 BMMNC 相比较,K562 细胞和 CML 患者的 BMMNC 均存在整合素  $\alpha 5\beta 1$  高表达,差异有显著性( $P < 0.05$ )。用 IFN $\alpha$ -2b 预处理 48 h 后 K562 细胞整合素  $\alpha 5$ 、 $\beta 1$  表达阳性率未出现改变。

### 2.2 抗整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抗体明显抑制 K562 细胞的增殖

MTT 检测结果显示,Anti- $\alpha 5\beta 1$  和 IFN $\alpha$ -2b 均可抑制 K562 细胞的增殖。与 IFN $\alpha$ -2b 组相比,第 1、2 天 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  各浓度组和单用 Anti- $\alpha 5\beta 1$  各浓度组的 K562 细胞增殖抑制率明显升高并出现统计学差异 ( $P < 0.01$ )。提示 Anti- $\alpha 5\beta 1$  单独作用或与 IFN $\alpha$ -2b 联合作用较 IFN $\alpha$ -2b 单独作用时,对 K562 细胞的增殖抑制作用明显增强。第 1、2 天各组比较的 F 值分别为 14.748、8.549,P 值分别为 0.000、0.007(表 1)。

表 1 MTT 法检测的  $\alpha 5\beta 1$  抗体对 K562 细胞生长的抑制率

Table 1 The inhibition rate of  $\alpha 5\beta 1$  antibodies on growth inhibition of K562 cells analyzed by MTT test (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
IFN $\alpha$ -2b	7.8 $\pm$ 3.4	24.3 $\pm$ 2.6	19.3 $\pm$ 4.2	14.9 $\pm$ 4.4	12.5 $\pm$ 4.9	11.2 $\pm$ 1.3
Anti- $\alpha 5\beta 1$ (2)	28.4 $\pm$ 1.9 <sup>1)2)</sup>	46.5 $\pm$ 6.1 <sup>1)2)</sup>	26.3 $\pm$ 5.4	18.9 $\pm$ 4.6	11.0 $\pm$ 4.4	10.8 $\pm$ 4.2
Anti- $\alpha 5\beta 1$ (4)	29.2 $\pm$ 1.5 <sup>1)2)</sup>	50.9 $\pm$ 2.9 <sup>1)2)</sup>	23.8 $\pm$ 3.2	15.9 $\pm$ 2.3	11.9 $\pm$ 1.6	11.0 $\pm$ 1.4
Anti- $\alpha 5\beta 1$ (8)	30.1 $\pm$ 4.4 <sup>1)2)</sup>	53.2 $\pm$ 1.9 <sup>1)2)</sup>	27.0 $\pm$ 2.5	17.0 $\pm$ 1.9	11.6 $\pm$ 3.5	11.3 $\pm$ 2.0
Anti- $\alpha 5\beta 1$ (2) + IFN	28.8 $\pm$ 1.6 <sup>1)2)</sup>	47.5 $\pm$ 7.2 <sup>1)2)</sup>	19.4 $\pm$ 4.9	17.6 $\pm$ 2.9	11.8 $\pm$ 4.2	10.4 $\pm$ 4.8
Anti- $\alpha 5\beta 1$ (4) + IFN	29.1 $\pm$ 1.8 <sup>1)2)</sup>	51.0 $\pm$ 3.7 <sup>1)2)</sup>	22.9 $\pm$ 1.5	18.1 $\pm$ 2.6	12.9 $\pm$ 2.3	11.9 $\pm$ 1.3
Anti- $\alpha 5\beta 1$ (8) + IFN	29.7 $\pm$ 2.5 <sup>1)2)</sup>	53.3 $\pm$ 2.7 <sup>1)2)</sup>	26.9 $\pm$ 1.9	16.9 $\pm$ 2.4	12.5 $\pm$ 2.3	11.6 $\pm$ 1.4

1)  $P < 0.05$  compared with control group; 2)  $P < 0.05$  compared with IFN $\alpha$ -2b group

### 2.3 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 下调 FAK mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR 和 Western blot 结果显示,FAK mRNA 及蛋白在健康志愿者 BMMNC 表达水平分别为(2.26  $\pm$  0.42;2.54  $\pm$  0.36),K562 细胞(1.04  $\pm$  0.12;1.31  $\pm$  0.15)和 CML 急变期患者 BMMNC (0.99  $\pm$  0.09;1.10  $\pm$  0.13),后两组细胞内 FAK mRNA 和蛋白的表达水平均显著低于健康志愿者 BMMNC 表达水平 ( $P < 0.01$ )。用 IFN $\alpha$ -2b 处理 K562 细胞 48 h 后,FAK mRNA 和蛋白表达水平(2.19  $\pm$  0.12;1.93  $\pm$  0.15)较未处理组 K562 细胞表达水平(1.04  $\pm$  0.12;1.31  $\pm$  0.15)明显上调( $P <$

0.01),分别较未处理组增加 111.3%和 46.9%。与 IFN $\alpha$ -2b 组(2.19  $\pm$  0.12;1.93  $\pm$  0.15)比较,Anti- $\alpha 5\beta 1$  组(0.91  $\pm$  0.12;1.34  $\pm$  0.12)和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组(0.10  $\pm$  0.14;1.26  $\pm$  0.16)的 FAK mRNA 和蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.01$ );IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组和 Anti- $\beta 1\alpha 5$  组与对照组(K562 细胞组)比较无显著性差异( $P > 0.05$ ,图 1)。FAK mRNA 和蛋白各组比较的 F 值分别为 7.831、8.041,P 值分别为 0.007、0.006。

### 2.4 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 降低 FAK 蛋白的磷酸化水平

与健康志愿者 BMMNC 的 p-FAK 蛋白表达水

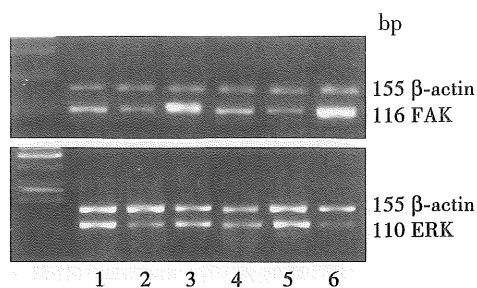


图1 RT-PCR 检测 K562 细胞 FAK 和 ERK 的 mRNA

Fig.1 RT-PCR analysis of mRNA encoding FAK and ERK in of K562 cells

1: K562 cells; 2: Anti- $\alpha 5\beta 1$  treated K562 cells; 3: IFN $\alpha$ -2b treated K562 cells; 4: Anti- $\alpha 5\beta$  + IFN $\alpha$ -2b treated K562 cells; 5: CML-BC; 6: Health volunteers

平( $1.00 \pm 0.13$ )相比, K562 细胞( $1.80 \pm 0.11$ )和 CML 急变期患者 ( $1.70 \pm 0.11$ )BMMNC 的 p-FAK 蛋白表达水平明显升高,有统计学意义( $P < 0.01$ )。K562 细胞经 IFN $\alpha$ -2b 和或 Anti- $\alpha 5\beta 1$  孵育 48 h 后, p-FAK 的蛋白水平较对照组均下降,但 Anti- $\alpha 5\beta 1$  作用更显著 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, IFN $\alpha$ -2b 组 ( $1.54 \pm 0.13$ )、Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 ( $1.32 \pm 0.13$ )和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 ( $1.24 \pm 0.11$ )的 p-FAK 蛋白水平分别降低了 13.9%、26.4% 和 30.8%。与 IFN $\alpha$ -2b 组相比较, Anti- $\alpha 5\beta 1$  组和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 p-FAK 的蛋白水平降低更明显 ( $P < 0.05$ ), 分别下降了 17.96% 和 19.58%;  $F = 11.682$ ,  $P = 0.000$  与 Anti- $\beta 1\alpha 5$  组的 p-FAK 蛋白水平相比较, IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组的 p-FAK 蛋白水平也有所下降 (2.2%), 但差异无显著性 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

### 2.5 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 可下调 K562 细胞 ERK mRNA 和蛋白表达

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, K562 细胞和 CML 急变期患者 BMMNC 的 ERK mRNA 和蛋白表达水平分别为 ( $2.56 \pm 0.05$  和  $1.55 \pm 0.13$ ) 及 ( $2.57 \pm 0.07$  和  $1.54 \pm 0.10$ ), 明显高于健康志愿者 BMMNC ( $1.46 \pm 0.07$  和  $1.05 \pm 0.10$ ,  $P < 0.01$ )。IFN $\alpha$ -2b 和/或 Anti- $\alpha 5\beta 1$  处理 48 h 后, K562 细胞内 ERK 的 mRNA 和蛋白表达水平明显下降。与对照组比较, IFN $\alpha$ -2b 组 ( $2.41 \pm 0.06$  和  $1.32 \pm 0.11$ )、Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 ( $1.97 \pm 0.13$  和  $1.14 \pm 0.12$ ) 和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 ( $1.89 \pm 0.10$  和  $1.12 \pm 0.10$ ) ERK 的 mRNA 和蛋白表达水平分别降低了

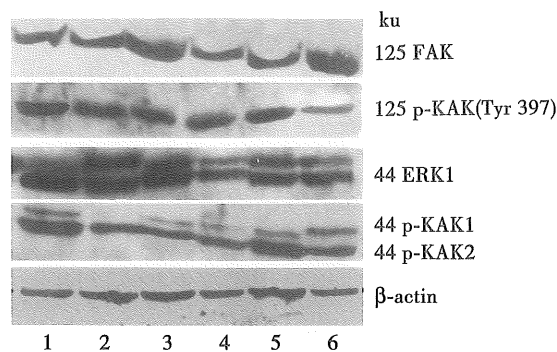


图2 K562 细胞及 CML 急变期患者和正常志愿者的 BMMNC 中 FAK, p-FAK, ERK 和 p-ERK 的蛋白表达  
Fig.2 FAK, p-FAK, ERK and p-ERK protein expression in K562 cells and BMMNC from CML patients in blast crisis and from health volunteers

1: K562 cells; 2: Anti- $\alpha 5\beta 1$  treated K562 cells; 3: IFN $\alpha$ -2b treated K562 cells; 4: Anti- $\alpha 5\beta$  + IFN $\alpha$ -2b treated K562 cells; 5: CML-BC; 6: health volunteers

5.9% 和 14.8%、23.0% 和 26.1%、26.2 和 27.8% ( $P < 0.05$ )。ERK mRNA 和蛋白各组比较的 F 值分别为 14.641、10.489, P 值分别为 0.000、0.002。与 IFN $\alpha$ -2b 组比较, Anti- $\alpha 5\beta 1$  组和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组的 ERK mRNA 和蛋白表达水平均显著下降 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

### 2.6 Anti- $\alpha 5\beta 1$ 可下调 ERK 蛋白的磷酸化水平

Western blot 分析结果显示, K562 细胞和 CML 急变期患者 BMMNC 的 p-ERK 蛋白表达水平分别为 ( $1.62 \pm 0.09$ ) 和 ( $1.57 \pm 0.10$ ), 明显高于健康志愿者 BMMNC ( $1.03 \pm 0.11$ ,  $P < 0.01$ )。K562 细胞经 IFN $\alpha$ -2b 和或 Anti- $\alpha 5\beta 1$  孵育 48 h 后, p-ERK 的蛋白水平较对照组均明显下降 ( $P < 0.05$ ), 其中 IFN $\alpha$ -2b 组 ( $1.32 \pm 0.11$ )、Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 ( $1.20 \pm 0.12$ ) 和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组 ( $1.06 \pm 0.11$ ) 分别降低了 18.2%、25.6% 和 34.7%。与 IFN $\alpha$ -2b 组比较, Anti- $\alpha 5\beta 1$  组和 IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组的 p-ERK 蛋白水平降低更明显 ( $P < 0.05$ ), 分别下降 9.2% 和 20.2% ( $F = 9.177$ ,  $P = 0.004$ )。较与 Anti- $\beta 1\alpha 5$  组相比, IFN $\alpha$ -2b + Anti- $\alpha 5\beta 1$  组的 p-ERK 蛋白水平下降, 但两者之间未出现显著性差异 (图 2)。

## 3 讨论

研究表明, 整合素  $\alpha 4\beta 1$  和  $\alpha 5\beta 1$  在 CML 祖细

胞上高表达<sup>[1]</sup>,但由于整合素  $\beta 1$  功能缺陷,不能发挥其介导细胞与基质间的粘附和抑制细胞增殖的功能,并通过激活细胞内异常信号传导通路促进细胞增殖。抗整合素  $\alpha 5\beta 1$  单抗可能通过阻断整合素  $\alpha 5\beta 1$  介导下游信号转导通路抑制细胞异常增殖的。

FAK 和 ERK 是细胞内整合素信号通路中与细胞增殖有关的关键酶,在整合素介导的信息传递中处于核心地位<sup>[2,5,6]</sup>。FAK 是细胞内多条信号转导通路的交汇点,是一种非受体型胞浆酪氨酸激酶,FAK 自身磷酸化可使其激活,p-FAK (Try397) 是 FAK 分子 N-末端的磷酸化活化位点<sup>[3]</sup>。FAK 活化后,可通过 ras-MAPK(ERK)途径引起级联反应,最终影响细胞内相关的基因表达,促进细胞增殖,对细胞的生物学行为具有重要影响<sup>[7]</sup>。本研究结果证实,Anti- $\alpha 5\beta 1$  和 IFN $\alpha$ -2b 处理后,K562 细胞内 p-FAK 和 p-ERK 的蛋白水平较对照组显著下降,且前者作用更明显。有研究表明 CML 患者的骨髓单个核细胞中总 FAK 蛋白水平经 IFN $\alpha$ -2b 孵育 48 h 后较对照组明显升高,而 p-FAK 比例则显著降低,与我们的结论相似,因此我们推测,IFN $\alpha$ -2b 可能主要通过增加非磷酸化 FAK 蛋白表达水平,抑制 FAK 和 ERK 蛋白的磷酸化水平而正常传递整合素  $\beta 1$  介导的细胞增殖抑制信号;在悬浮生长的细胞中,使用抗整合素抗体可使细胞表面整合素聚集成簇,提高 FAK 活性,抑制细胞增殖<sup>[8]</sup>。因此,抗整合素  $\alpha 5\beta 1$  单抗可能主要通过阻断整合素  $\alpha 5\beta 1$  介导的 FAK-ras-MAPK(ERK) 异常增殖信号通路,降低 FAK 和 ERK 的磷酸化蛋白水平,恢复正常的增殖抑制信号的传递,而发挥抑制 K562 细胞增殖的作用。

信号转导的瀑布样级联效应最终要通过诱导或抑制核转录因子、调控基因转录,而影响细胞的生物学行为。研究表明,活化的 ERK 可通过直接影响转录因子 c-fos 和 c-jun 的基因表达,改变细胞行为,促进细胞增殖,并抑制其凋亡。ERK 的激活可使 c-Jun 磷酸化、并形成 c-Jun 同源二聚体或 c-Jun/c-Fos 异源二聚体,组成转录激活因子 AP-1<sup>[9,10]</sup>,而影响细胞内某些基因的表达。事实上,影响 K562 细胞异常增殖的因素很复杂,可能涉及多种信号分子,抗整合素  $\alpha 5\beta 1$  单抗是否在影

响细胞的黏附和迁移中发挥作用, $\alpha 5\beta 1$  单抗引发的生长抑制是单独的 FAK、ERK 通路起作用,还是与影响细胞粘附和迁移相关,它们之间是否存在“串话”(cross talk)需要进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 白任奎,陈珊珊,刘艳荣,等. 低浓度 STI571 提高  $\beta 1$  整合素介导的 Ph(+)慢性髓性白血病髓系祖细胞增殖抑制 [J]. 中国实验血液学杂志, 2001, 9(3): 207-211.
- [2] Liu-Bryan R, Pay S, Schraufstatter IU, et al. The CXCR1 tail mediates beta1 integrin-dependent cell migration via MAP kinase signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(1): 117-125.
- [3] Cai WJ, Li MB, Wu X, et al. Activation of the integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis [J]. Mol Cell Biochem, 2009, 322(1-2): 161-169.
- [4] Chen Q, Meng LH, Zhu CH, et al. ADAM15 suppresses cell motility by driving integrin alpha5beta1 cell surface expression via Erk inactivation [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(10): 2164-2173.
- [5] Milliano MT, Luxon BA. Initial signaling of the fibronectin receptor (alpha5beta1 integrin) in hepatic stellate cells is independent of tyrosine phosphorylation [J]. J Hepatol, 2003, 39(1): 32-37.
- [6] Ly DP, Corbett SA. The integrin alpha5beta1 regulates alphavbeta3-mediated extracellular signal-regulated kinase activation [J]. J Surg Res, 2005, 123(2): 200-205.
- [7] Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years [J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 8): 1409-1416.
- [8] 常 铉,刘晓力,杜庆锋,等. 慢性髓系白血病粘附相关分子整合素  $\beta 1$  及局部粘附激酶的研究 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(10): 1047-1049.
- [9] Peng T, Zhang T, Lu X, et al. JNK1/c-fos inhibits cardiomyocyte TNF- $\alpha$  expression via a negative crosstalk with ERK and p38 MAPK in endotoxemia [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(4): 733-741.
- [10] Ding SZ, Olekhovich IN, Cover TL, et al. Helicobacter pylori and mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1 (AP-1) subcomponent protein expression and DNA-binding activity in gastric epithelial cells [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 53(3): 385-394.