

## • 基础检验研究论著 •

C/EBP $\alpha$ -Per2 信号通路对 K562 细胞相关基因的调控机制\*

孙成铭, 栾材富, 邵会媛, 高玉洁, 李少君, 马新衡, 刘日明, 李 杰, 张守信, 刘 鹏

(青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院检验科中心, 山东烟台 264000)

**摘要:**目的 探索 Per2 在 CCAAT 增强子结合蛋白  $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ ) 参与调控的慢性粒细胞白血病(CML)发生、发展中的作用。方法 通过脂质体介导将真核表达载体 pGenesil-3-SiPer2 和空载体 pGenesil-3-HK 转染到 pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 细胞, 利用新霉素筛选稳定干扰 Per2 的 pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 单克隆细胞株。利用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测转染组、空载体组、对照组细胞 p53、c-myc、cyclinB1 的 mRNA 及蛋白表达水平的改变。结果 成功构建稳定干扰 Per2 表达的 pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 细胞株。与对照组和空载体组细胞相比, 转染组 pGenesil-3-SiPer2-K562 细胞的 p53 mRNA 及蛋白表达水平明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而 cyclinB1 和 c-myc 基因的 mRNA 及蛋白表达水平则显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 Per2 基因在 C/EBP $\alpha$  参与调控的 CML 发生发展中起重要作用, 该通路的发现对于研究 CML 的发生及调控机制具有重要意义。

**关键词:** 小干扰 RNA; CCAAT 增强子结合蛋白  $\alpha$ ; 慢性粒细胞白血病

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.001

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)07-0801-03

The mechanism research of C/EBP $\alpha$ -Per2 in K562 leukemia cells gene regulation\*

Sun Chengming, Luan Cai fu, Shao Huiyuan, Gao Yujie, Li Shaojun,

Ma Xinheng, Liu Riming, Li Jie, Zhang Shouxin, Liu Peng

(Department of Laboratory Center, Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao

University Medical College, Yantai, Shandong 264000, China)

**Abstract: Objective** To explore the role of Per2 in chronic myeloid leukemia(CML) with CCAAT/enhancer binding protein alpha(C/EBP $\alpha$ ). **Methods** The pGenesil-3-SiPer2 and pGenesil-3-HK plasmid vector were transfected into pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 cells, respectively. After screening culture by neomycin, cells stably reducing the expression of Per2 protein were established. RT-PCR and Western blot were used to detect the transcription and protein expression of p53, c-myc and cyclinB1 in the transfection group, the empty vector group and the control group. **Results** The pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 cells with lower expression of Per2 were successfully established. Compared with cells in the empty vector group and the control group, the expressions of p53 mRNA and protein in the transfection group were significantly decreased( $P < 0.01$ ), and the expressions of cyclinB1 and c-myc mRNA and protein were significantly increased ( $P < 0.01$ ), respectively. **Conclusion** This findings indicate that Per2 gene may play an important role in the development of CML with C/EBP $\alpha$ , which may have new value in investigating both the occurrence and regulatory mechanism of CML.

**Key words:** small interfering RNA; CCAAT enhancer binding protein alpha; chronic myeloid leukemia

CCAAT 增强子结合蛋白  $\alpha$ (CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ ) 是一种转录因子, 在慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML) 的发生和分化增殖中具有重要调控作用<sup>[1-3]</sup>。作者前期研究表明转染外源性 C/EBP $\alpha$  能够增加节律基因——Per2 基因的表达, 并降低 cyclinB1、c-myc 的表达水平, 从而抑制白血病细胞恶性增殖, 促进细胞分化, 进而逆转 K562 细胞的恶性表型<sup>[4-5]</sup>。为进一步探讨是否存在 C/EBP $\alpha$  经由 Per2 基因进行相关基因调控的信号通路。本课题在成功转染 C/EBP $\alpha$  的 K562 细胞中转入 Per2 基因 RNA 干扰质粒, 通过干扰 K562 细胞中 Per2 基因的表达, 观察 C/EBP $\alpha$  下游靶基因的表达水平, 进而分析 Per2 基因在 C/EBP $\alpha$  参与调控的 CML 发生发展中的重要作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 胎牛血清购于美国 Gibco 公司, 质粒提取试剂盒购于 Omega 公司, 总 RNA 提取试剂、反转录酶(M-MLV) 及限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, 脂质体(Lipofectamine2000) 购

自美国 Invitrogen 公司, 鼠抗人 c-myc、cyclinB1、p53、Per2 单抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 羊抗鼠二抗购自武汉博士德公司。

**1.2 质粒和细胞系** 空载体(pGenesil-3-HK)、Per2 干扰质粒(pGenesil-3-SiPer2) 由武汉晶赛公司构建, pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 细胞由本室构建保存, 按常规方法培养。

## 1.3 方法

**1.3.1 筛选稳定干扰 Per2 的细胞株** pGenesil-3-HK、pGenesil-3-SiPer2 质粒分别经 Sal I 酶切鉴定, 同时作 DNA 序列分析。采用 Lipofectamine2000 将 pGenesil-3-HK、pGenesil-3-SiPer2 分别转染 pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 细胞, 设立 pGenesil-3-SiPer2 转染组(转染组)、pGenesil-3-HK 转染组(空载体组)、pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 未处理组(对照组), 每组设 5 个复孔。转染 48 h, 荧光显微镜下观察细胞转染效果, 并以新霉素筛选阳性克隆, 采用有限稀释法筛选获得稳定转染的单克隆细胞, 确定靶细胞中 Per2 的表达明显降低之后扩大培养用于后续实

\* 基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011YY064); 烟台市科技发展计划项目(2011203)。 作者简介: 孙成铭, 男, 副主任检验师, 主要从事白血病的发病机制研究。

验。RT-PCR 检测 Per2 mRNA 水平:提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 检测。Per2 及  $\beta$ -actin 引物序列见表 1, 扩增片段分别为 444 bp 和 247 bp。PCR 扩增条件为 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。实验重复 3 次以确保结果准确性。Western blot 检测 Per2 蛋白水平:取 20  $\mu$ L 细胞裂解液用 10% 的分离胶分离蛋白质, 湿转转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 先后与鼠抗人 Per2 单克隆抗体(1 : 100 稀释)和羊抗鼠抗体(1 : 2 000 稀释)孵育 2 h, 洗涤后用化学发光进行显色。实验重复 3 次以确保结果准确性。

**1.3.2 RT-PCR 检测 p53、cyclinB1 和 c-myc 基因的表达** 同时提取转染组、空载组、对照组细胞总 RNA, 逆转录合成 cD-

NA, 进行 PCR 检测, 实验重复 3 次以确保结果准确性。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ L 上样于 1.6% 的琼脂糖凝胶中, 80 V 电压, 电泳 1 h。用 Bio-Rad 凝胶成像系统自带 Quantity One 软件分析结果。以目的条带和内参条带的密度之比表示。

**1.3.3 Western blot 检测 p53、cyclinB1 和 c-myc 蛋白表达** 同时收集转染组、空载组、对照组细胞提取细胞总蛋白, 并测定蛋白含量。取 80  $\mu$ g 蛋白进行电泳、电转膜、封闭后, 加一抗鼠抗人单克隆抗体孵育过夜, 抗体稀释度为 1 : 100, 漂洗后加二抗羊抗鼠(1 : 2 000)抗体, 室温下孵育 2 h, TBST 洗 3 次后化学发光显示试剂盒显色并成像分析,  $\beta$ -actin 作为内参。实验重复 3 次以确保结果准确性。

表 1 检测引物序列及预期产物长度

基因名称	引物序列	产物长度(bp)
$\beta$ -actin(BC001301)	5'-CTG ACT GAC TAC CTC ATG AAG ATC-3'	
	3'-GGA AGG AAG GCT GGA AGA GTG-5'	247
p53(NM_000546.3)	5'-AGA ATC TCC GCA AGA AAG G-3'	
	5'-GCA AGC AAG GGT TCA AAG AC-3'	417
c-myc(NM_002467)	5'-CAA CCC TTG CCG CAT CCA C-3'	
	5'-CCT CCT CGT CGC AGT AGA A-3'	318
cyclinB1(NM_031966.2)	5'-TTT CTG CTG GGT GTA GGT C-3'	
	5'-AGG TTC TGG CTC AGG TTC T-3'	407
Per2(NM_022817)	5'-TGT ATT TTT AGT AGA GAC AGG GT-3'	
	5'-CAT AAC AGC AGA GTA AGA TTT TG-3'	444

**1.3.4 统计学处理** 采用 SAS8.2 软件进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 RNA 干扰质粒的鉴定** 质粒 pGenesil-3-SiPer2 和 pGenesil-3-HK 经 Sal I 单酶切分别得到 400 bp 左右的目的片段和 4 800 bp 的骨架片段, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。质粒测序结果正确, 见图 2~3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.2 稳定干扰 Per2 的 pEGFP-C/EBP $\alpha$ -K562 细胞株的构建** 转染后 48 h, 倒置荧光显微镜下观察到转染组有明显的荧光信号, 见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。利用新霉素筛选阳性克隆 7 d, 采用有限稀释法获得稳定转染的单克隆细胞, 扩大培养。RT-PCR 检测结果发现, 转染组细胞相对于对照组和空载组, Per2 mRNA 水平表达分别下降 (75.09  $\pm$  3.98)% 和 (78.34  $\pm$  5.07)%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。Western blot 检测结果显示相对于对照组, 转染组细胞 Per2 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 说明 Per2 干扰成功, 见图 6(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.3 RT-PCR 检测 p53、cyclinB1 和 c-myc 基因的表达** RT-PCR 检测结果发现, 以各目的条带和内参  $\beta$ -actin 的光密度相比, 相对于对照组 K562 和空载组 pGenesil-3-HK-K562 细胞, 转染组 pGenesil-3-SiPer2-K562 的 p53 基因的 mRNA 表达水平明显下调, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 cyclinB1 和 c-myc

基因的 mRNA 表达水平则明显升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 7(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.4 Western blot 检测 p53、cyclinB1 和 c-myc 蛋白的表达** 为了进一步分析在 Per2 干扰后, C/EBP $\alpha$  对相关基因的蛋白水平的调控作用。作者做了 Western blot 的检测, 以各目的条带和内参  $\beta$ -actin 的光密度相比, 相对于对照组和空载组, 转染组 p53 蛋白的表达水平明显降低, cyclinB1 和 c-myc 蛋白的表达水平则显著增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 8(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**3 讨 论**

CML 是由 bcr/abl 融合基因及其编码的融合蛋白引起的造血干细胞恶性增殖性血液系统肿瘤<sup>[6]</sup>。随着耐药现象的发生, 寻找新的治疗靶点已成为白血病治疗工作中的新方向。已知, C/EBP $\alpha$  与 Per2 基因在白血病中发挥重要调控作用<sup>[7-9]</sup>。临床资料显示, CML 急变期患者的骨髓细胞中野生型 C/EBP $\alpha$  的 mRNA 表达水平降低, 且无 C/EBP $\alpha$  蛋白的表达<sup>[10]</sup>。研究发现, C/EBP $\alpha$  主要在转录水平调控粒系和单核系的分化, C/EBP $\alpha$  的突变可以阻滞 CML 来源的 K562 细胞的粒系分化<sup>[11]</sup>。以上资料均提示, C/EBP $\alpha$  可能作为一种抑癌基因参与调控 CML 的发生发展, 然而 C/EBP $\alpha$  调控 CML 的具体机制尚不明确。为此, 作者在前期研究发现 C/EBP $\alpha$  明显上调 Per2 表达水平的基础上<sup>[4]</sup>, 进一步探讨 Per2 在 C/EBP $\alpha$  参与调控 CML 过程中的作用。

实验中, 作者在成功转染 C/EBP $\alpha$  的 K562 细胞中转入 Per2 基因的 RNA 干扰质粒, 通过干扰细胞中(下转第 807 页)

哌拉西林/他唑巴坦和头孢吡肟的耐药率虽然低,但有逐年上升趋势,应引起注意。

鲍曼不动杆菌已成为医院感染的重要致病菌,对多种常用抗菌药物耐药,极易引起临床传播,虽然近年来国内外报道临床分离率及耐药率越来越高<sup>[10]</sup>,但本院分离率及耐药率均有下降的趋势,与文献<sup>[11-12]</sup>报道不一致。提示这一变迁趋势可能与本院院感科等相关部门重视对 ICU 的监控、指导,以及在加强医院感染的控制与预防有关。

综上所述,掌握细菌分布及变迁的药敏情况,对及时发现个别菌种耐药性的变化、合理应用抗菌药物及控制感染性疾病有重要的指导作用。

### 参考文献

[1] Balode A, Punda-Polic V, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative and Gram-positive bacteria collected from countries in Eastern Europe; results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T. E. S. T.) 2004–2010 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41(6): 527-535.

[2] Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens [J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(6): 371-379.

[3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 452-470.

[4] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(5): 321-329.

[5] 彭晓燕, 姚冰, 李晓波, 等. 2009~2011 年医院革兰阴性菌分布及耐药性分析 [J]. *西北药学杂志*, 2013, 28(2): 201-203.

[6] 李德保, 任冬梅, 田春梅, 等. 2008~2010 年某院临床主要病原菌分布及耐药性变迁 [J]. *中国感染控制杂志*, 2013, 12(1): 54-58.

[7] Ko WC, Hsueh PR. Increasing extended-spectrum beta-lactamase production and quinolone resistance among gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections in the Asia/Pacific region data from the smart study 2002–2006 [J]. *J Infect*, 2009, 59(2): 95-103.

[8] 郑港森, 宋秀宇. 2005—2006 年医院常见革兰阴性杆菌的分布与耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(9): 1320-1322.

[9] 张玮博, 倪语星, 孙景勇, 等. 2010 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(3): 161-166.

[10] 刘德新, 卢俊英, 田加坤, 等. 综合性 ICU 鲍曼不动杆菌肺部感染调查及耐药性分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(1): 127-129.

[11] 夏晓影, 贾蓓, 王群, 等. 常见革兰阴性杆菌 3 年耐药性监测 [J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(10): 783-788.

[12] 朱任媛, 张小江, 赵颖, 等. CHINET 2011 年北京协和医院细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(6): 428-434.

(收稿日期: 2013-11-14)

(上接第 802 页)

Per2 的表达, 分析 Per2 在 C/EBP $\alpha$  的下游所扮演的重要角色。由于转入 K562 细胞中的 C/EBP $\alpha$  是带绿色荧光标记, 为了鉴别, 作者特意合成了带有红色荧光标记的 siRNA Per2 进行实验。在本研究中采用的 pGenesi-3 质粒含有红色荧光蛋白表达基因及新霉素选择性抗性标记基因, 适用于阳性克隆细胞株的筛选。通过干扰 Per2 的表达, 作者发现细胞周期中的重要调控基因 c-myc 和 cyclinB1 明显恢复表达, 而 p53 的表达出现下调, 说明 Per2 在 C/EBP $\alpha$  的下游对基因的调控具有重要的作用, 存在 C/EBP $\alpha$  调控 Per2 基因进而影响细胞周期进程的信号通路。

C/EBP $\alpha$  在 K562 细胞中的促分化和诱导凋亡功能提示其将在 CML 的治疗中发挥较强的作用, 对其表达水平的检测有可能成为肿瘤监测和预后评估的新指标。但 C/EBP $\alpha$ -Per2 信号通路在 CML 中的具体调控机制仍需深入研究。

### 参考文献

[1] Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development [J]. *Oncogene*, 2007, 26(47): 6816-6828.

[2] Shimokawa T, Nunomura S, Fujisawa D, et al. Identification of the C/EBP $\alpha$  C-terminal tail residues involved in the protein interaction with GABP and their potency in myeloid differentiation of K562 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1829(11): 1207-1217.

[3] Fragiasso V, Chiodo Y, Ferrari-Amorotti G, et al. Phosphorylation of serine 21 modulates the proliferation inhibitory more than the differentiation inducing effects of C/EBP $\alpha$  in K562 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(5): 1704-1713.

[4] 孙成铭, 黄世峰, 罗红伟, 等. CCAAT/增强子结合蛋白  $\alpha$  对 K562 细胞分化和凋亡的影响及机制 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(3): 220-225.

[5] Gery S, Gombart AF. Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2005, 106(8): 2827-2836.

[6] Gold JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(15): 1451-1464.

[7] Gery S, Koeffler HP. Per2 is a C/EBP target gene implicated in myeloid leukemia [J]. *Integr Cancer Ther*, 2009, 8(4): 317-320.

[8] Thoennissen NH, Thoennissen GB, Abbassi S, et al. Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and critical circadian clock downstream target gene PER2 are highly deregulated in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(8): 1577-1585.

[9] Yang MY, Yang WC, Lin PM, et al. Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia [J]. *J Biol Rhythms*, 2011, 26(2): 136-148.

[10] Wagner K, Zhang P, Rosenbauer F, et al. Absence of the transcription factor CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$  results in loss of myeloid identity in bcr/abl-induced malignancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(16): 6338-6343.

[11] Ferrari-Amorotti G, Mariani SA, Novi C, et al. The biological effects of C/EBP $\alpha$  in K562 cells depend on the potency of the N-terminal regulatory region, not on specificity of the DNA binding domain [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40): 30837-30850.

(收稿日期: 2013-10-23)