胰岛素通过调控PI3K和Erk通路促进人白血病细胞株K562增殖和迁移

景　莉[1],王　秦[2],袁凯锋[1],段春燕[3],李晓明[1]

([1]泸州医学院附属医院血液内科,[2]药剂科,四川　泸州　646000;[3]泸州医学院生化教研室,四川　泸州　646000)

[摘　要]　**目的**:观察胰岛素对白血病细胞株K562中PI3K及Erk信号通路的影响及其对K562细胞增殖和迁移的影响。**方法**:分别采用0、25、50、100和200 nmol/L胰岛素处理K562细胞48 h及200 nmol/L胰岛素处理K562细胞0、12、24和48 h。采用Western blot方法检测K562细胞中PI3K及Erk信号通路的活化情况;采用MTT方法检测胰岛素对K562细胞增殖的影响;采用伤口愈合实验检测胰岛素对K562细胞迁移能力的影响;采用PI3K及Erk信号通路抑制剂LY294002及U0126处理K562细胞,观察PI3K及Erk信号通路在胰岛素促K562细胞增殖和迁移中的作用。**结果**:同0 nmol/L胰岛素处理组相比,25、50、100、200 nmol/L的胰岛素均可显著上调K562细胞中PI3K及Erk的磷酸化水平,加强K562细胞的增殖能力($P < 0.01$)。同0 h组相比,200 nmol/L的胰岛素处理K562细胞12、24和48 h,亦可显著上调K562细胞中PI3K及Erk的磷酸化水平,加强K562细胞的增殖能力($P < 0.01$)。同时,同对照组相比,200 nmol/L胰岛素处理48 h后,K562细胞迁移能力均显著增强($P < 0.01$)。采用PI3K及Erk信号通路抑制剂LY294002及U0126预处理K562细胞后,胰岛素促K562细胞增殖和迁移的能力显著降低($P <$ 0.01)。**结论**:胰岛素可通过激活K562细胞中的PI3K及Erk信号通路,进而增强K562细胞的增殖和迁移能力。

[关键词]　胰岛素;白血病;K562;增殖;迁移

[中图分类号]　R733.7　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2015)06-808-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150610

Insulin promotes K562 cells proliferation and migration through PI3K and Erk signaling pathway

Jin Li[1], Wang Qin[2], Yuan Kaifeng[1], Duan Chunyan[3], Li Xiaoming[1]

(*[1]Department of Hematology, [2]Pharmaceutical Preparation Section, the Hospital Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000; [3]Biochemistry Department, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China*)

[Abstract]　**Objective**:To observe the effect of insulin on PI3K and Erk signaling pathway and its regulation of proliferation and migration in K562 cells. **Methods**: K562 cells were treated with insulin with different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 nmol/L) for 48 h, and 200 nmol/L insulin for 0, 12, 24 and 48 h. Then, the phosphorylation levels of PI3K and Erk were detected by Western blot, and the proliferation ability of K562 cells was detected by MTT. Effect of insulin on migration ability of K562 cells was detected by wound healing assay. K562 cells were pretreated with PI3K and Erk signaling pathway inhibitors LY294002 and U0126 to observe the effect of PI3K and Erk signaling pathway on insulin induced proliferation and migration in K562 cells. **Results**: Compared with the 0 nmol/L insulin treated group, 25, 50, 100 and 200 nmol/L insulin treated groups had significantly increased phosphorylation levels of PI3K and Erk and promoted proliferation in K562 cells ($P < 0.01$). Compared with the 0 h insulin treated group, 200 nmol/L insulin treated for 12, 24 and 48 h groups also had significantly increased phosphorylation levels of PI3K and Erk and promoted proliferation in K562 cells($P < 0.01$). After treated with 200 nmol/L insulin by 48 h, the migration ability of K562 cells were significantly increased ($P < 0.01$). After blocked PI3K and Erk signaling pathway by LY294002 and U0126, the ability of insulin in induced proliferation and migration in K562 cells were significantly decreased($P < 0.01$). **Conclusion**: Through actives PI3K and Erk signaling pathway, insulin can promote proliferation and migration of K562 cells.

[Key words]　insulin; leukemia; K562; proliferation; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 808-811, 826]

白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病,据报道,我国各地区白血病的发病率在各种肿瘤中居第 6 位。文献报道,多种肿瘤细胞,包括白血病细胞株 K562 在内,其表面均存在胰岛素受体(insulin receptor,IR)、胰岛素样生长因子-1 受体(insulin-like growth factor-1 receptor,IGF-1R)和(或)IGF-2R 的表达[1-3]。已知胰岛素可通过结合 IR 及 IGF-1R 向下游传递活化信号,进而促进细胞的有丝分裂。关于胰岛素在肿瘤发生发展中的作用受到越来越多的关注[4-5],而关于胰岛素在白血病发生发展中的作用及相关机制目前还少有文献报道。据此,本研究希望通过在体外观察胰岛素对人白血病细胞株 K562 增殖和迁移能力的影响,并对相关机制进行初步探讨,以阐明胰岛素在白血病发生发展中的作用。

1　材料和方法

1.1　材料

白血病细胞株 K562(中国医学科学院基础医学研究所),细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。鼠抗人 p-Akt 抗体及 p-Erk 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG(Snata Cruz 公司,美国),PI3K 及 Erk 信号通路抑制剂(Sigma 公司,美国),CytoBuster 蛋白提取试剂(Novagen 公司,美国),蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo 公司,美国)。

1.2　方法

1.2.1　细胞处理

采用 0、25、50、100 和 200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 48 h 及 200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 0、12、24 和 48 h。

1.2.2　细胞总蛋白提取

上述细胞采用冰 PBS 洗涤 2 次,400 r/min 离心 5 min;弃去细胞上清,于沉淀中加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂和 CytoBuster 蛋白提取试剂,吹打混匀,室温放置 15 min;4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;所得上清部分即细胞总蛋白,留部分细胞总蛋白检测蛋白浓度,其余每管 15 μL 分装,-80°C 冻存。

1.2.3　Western blot

等量提取上述蛋白经 8%~10% SDS-PAGE 分离胶和 5%浓缩胶分离后,半干转印至硝酸纤维素膜上,采用含 5% BSA 的 TBST 室温孵育封闭 2 h,加入鼠抗人 p-Akt 和 p-Erk 抗体,4℃ 孵育过夜。次日以 0.1% TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入相应种属的 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜后,采用 Supersignal West Femto/Pico HRP 敏感化学发光底物对条带进行显色。Actin 作为内参对照。所有实验至少重复 3 次。

1.2.4　MTT 法检测细胞增殖能力

上述胰岛素处理的细胞培养至对数生长期,接种于 96 孔培养板中,采用不同浓度和不同时间的胰岛素处理 K562 细胞后,每孔中加入 20 μL MTT 溶液,作用 4 h 后吸出上清,加入 150 μL DMSO 溶液,低速震荡 10 min 后,波长 490 nm 处测定吸光度值。

1.2.5　K562 细胞迁移能力检测

采用伤口愈合实验方法检测细胞迁移能力,具体操作方法参见文献[6]。

1.2.6　PI3K 和 Erk 信号通路阻断试验

培养基中加入 PI3K 和 Erk 信号通路阻断剂,分别为 1 μmol/L 的 LY294002 和 10 μmol/L 的 U0126。

1.3　统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析。数据间比较采用 Anova 分析方法,两两比较采用 LSD-*t* 检验,$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　胰岛素对白血病细胞株 K562 增殖的作用

随着胰岛素浓度的升高和处理时间的延长,K562 细胞增殖能力逐渐升高($P < 0.01$,图 1)。

2.2　胰岛素对白血病细胞株 K562 迁移的作用

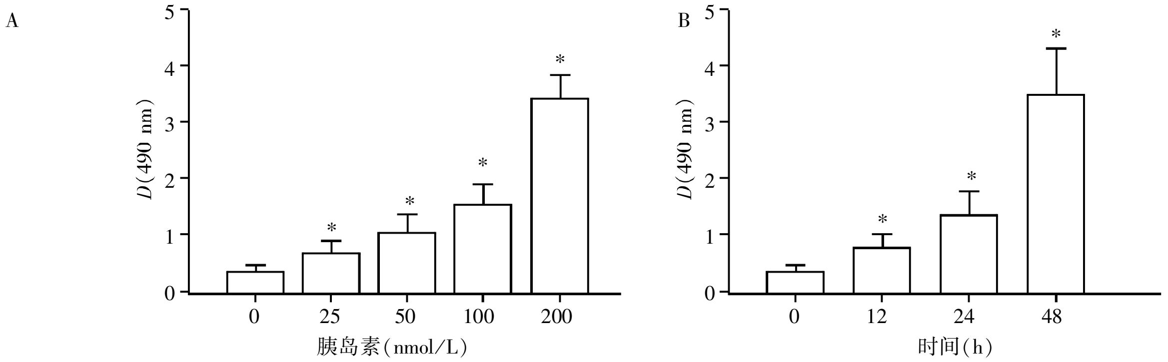
200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 48 h 后,采用伤口愈合实验分析 K562 细胞的迁移能力,结果显示,200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 48 h 后,K562 细胞迁移和侵袭能力显著升高(图 2)。

2.3　胰岛素对 K562 细胞中 PI3K 和 Erk 蛋白磷酸化水平的作用

随着胰岛素浓度的升高和处理时间的延长,K562 细胞中 Akt 和 Erk 蛋白磷酸化水平逐渐升高(图 3)。

2.4　PI3K 和 Erk 信号通路在胰岛素促 K562 细胞增殖和迁移能力中的作用

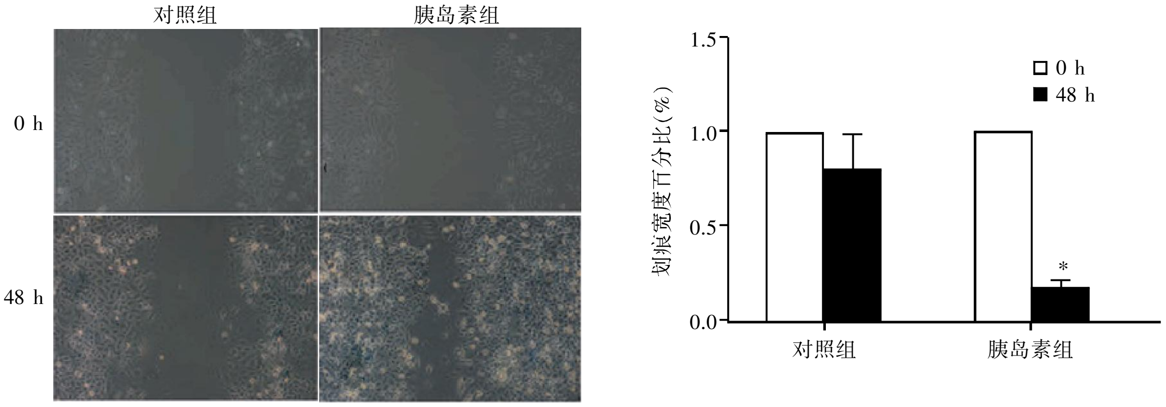
同胰岛素处理组相比,采用 LY294002 阻断 K562 细胞中 PI3K 信号通路后,K562 细胞增殖能力显著降低($P < 0.01$,图 4A),同时,胰岛素诱导的 K562 细胞迁移能力亦显著降低($P < 0.01$,图 4B)。



A:不同浓度胰岛素处理K562细胞后,MTT法检测K562细胞增殖能力,与0 nmol/L组相比,*$P < 0.01$(n=3);B:200 nmol/L的胰岛素处理K562细胞不同时间,MTT法检测K562细胞增殖能力,与0 h组相比,*$P < 0.01$(n=3)。

图1 胰岛素对K562细胞增殖能力的影响

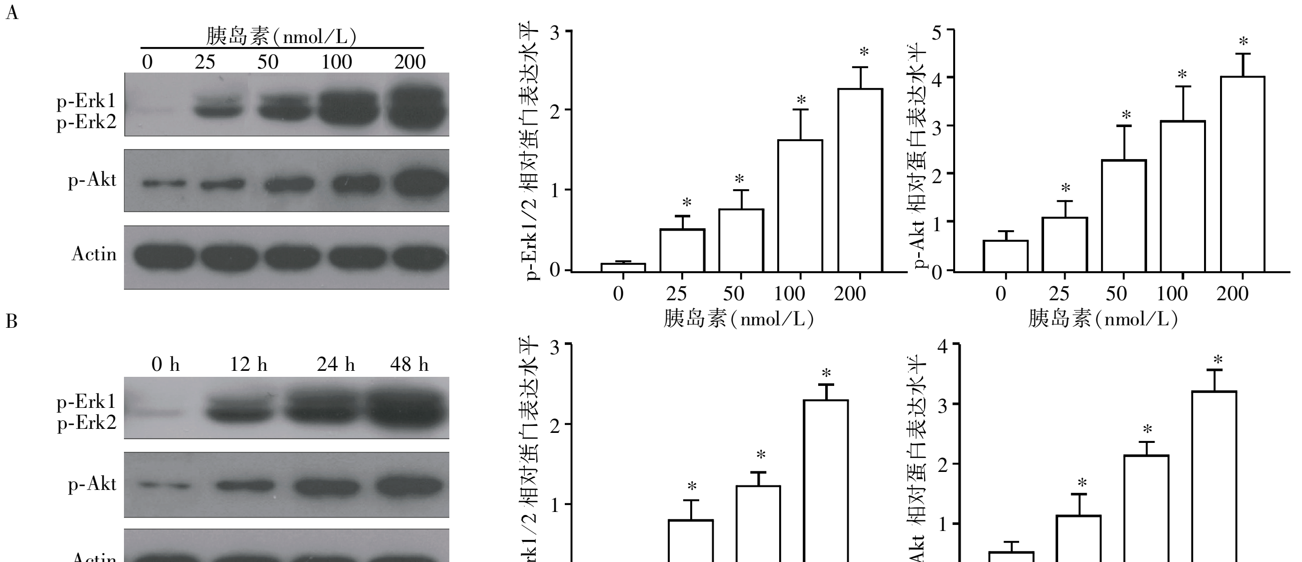
Figure 1 Effect of insulin on proliferation ability of K56



与对照组相比,*$P < 0.01$(n=3)。

图2 胰岛素对K562细胞迁移能力的影响

Figure 2 Effect of insulin on migration ability of K562

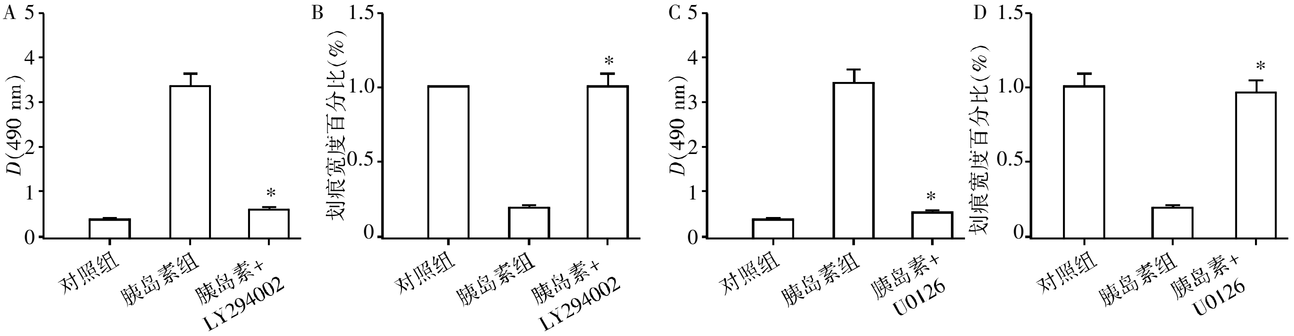


A:不同浓度胰岛素处理K562细胞后,Western blot检测K562细胞中Akt和Erk蛋白磷酸化水平,与0 nmol/L组相比,*$P < 0.01$(n=4);B:200 nmol/L的胰岛素处理K562细胞不同时间,Western blot检测K562细胞中Akt和Erk蛋白磷酸化水平,与0 h组相比,*$P < 0.01$(n=4)。

图3 胰岛素对K562细胞中PI3K和Erk蛋白磷酸化水平的影响

Figure 3 Effect of insulin on PI3K and Erk phosphoralation of K562

同胰岛素处理组相比，采用 U0126 阻断 K562 细胞中 Erk 信号通路后,K562 细胞增殖能力显著降低($P < 0.01$,图 4C),同时,胰岛素诱导的 K562 细胞迁移能力亦显著降低($P < 0.01$,图 4D)。



A、B:阻断 PI3K 信号通路后,MTT 法和伤口愈合实验检测 K562 细胞增殖(A)和迁移能力(B),与胰岛素单独处理组相比,*$P < 0.01$(n=3);C、D:阻断 Erk 信号通路后,MTT 法和伤口愈合实验检测 K562 细胞增殖(C)和迁移能力(D),与胰岛素单独处理组相比,*$P < 0.01$(n=3)。

图 4　PI3K 和 Erk 信号通路在胰岛素促 K562 细胞增殖和迁移能力中的作用

Figure 4　Effect of PI3K and Erk pathways on proliferation and migration ability of K562

3 讨　论

胰岛素除可调节人体代谢外,还具有促进细胞生长的作用[6-9]。文献报道,胰岛素可通过促进肿瘤细胞的增殖而在肿瘤发生和发展中发挥重要作用[4-5]。目前关于胰岛素在白血病发生发展中的作用还少有文献报道。本研究通过体外实验,采用不同浓度的胰岛素及相同浓度的胰岛素处理 K562 细胞不同时间，发现同 0 nmol/L 胰岛素处理组相比,25、50、100、200 nmol/L 的胰岛素均可显著加强 K562 细胞的增殖能力($P < 0.01$)。同 0 h 组相比,200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 12、24 和 48 h,亦可显著加强 K562 细胞的增殖能力($P < 0.01$)。此结果与文献报道的胰岛素可通过促进细胞有丝分裂进而促进细胞生长的结果相一致。此外,本研究还发现,采用 200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 48 h 后,与对照组相比,K562 细胞的迁移能力也显著升高($P < 0.01$)。

随后本研究对胰岛素促进 K562 细胞增殖和迁移的机制进行了初步探讨。目前文献报道,胰岛素可通过激活 PI3K/Akt 信号通路而调控肝星状细胞的增殖能力[10]。提示,PI3K 信号通路在胰岛素促进 K562 细胞增殖和迁移中可能具有一定作用。此外,Erk1/2 是 MAPK 家族成员之一。细胞在接受外源的神经递质和生长因子等信号刺激后，可激活细胞内的 Erk1/2 信号通路,活化的 Erk1/2 随即进入细胞核,激活转录因子的表达,参与细胞增殖和分化[11]。据此,本研究观察了 PI3K 和 Erk 信号通路在胰岛素促进 K562 细胞增殖和迁移中的作用。发现同 0 nmol/L 胰岛素处理组相比,25、50、100 和 200 nmol/L 的胰岛素均可显著上调 K562 细胞中 PI3K 及 Erk 的磷酸化水平($P < 0.01$)。同 0 h 组相比,200 nmol/L 的胰岛素处理 K562 细胞 12、24 和 48 h,亦可显著上调 K562 细胞中 PI3K 及 Erk 的磷酸化水平，提示 PI3K 和 Erk 信号通路在胰岛素促 K562 细胞增殖和迁移中具有重要作用。进一步采用 PI3K 和 Erk 信号通路抑制剂 LY294002 和 U0126 处理 K562 细胞,发现阻断 PI3K 和 Erk 信号通路后胰岛素诱导的 K562 细胞增殖和迁移能力显著降低($P < 0.01$),提示胰岛素通过激活 PI3K 和 Erk 信号通路,促进白血病细胞的增殖和迁移。

综上所述,本研究结果提示,胰岛素可通过激活 K562 细胞中的 PI3K 和 Erk 信号通路，促进 K562 细胞的增殖和迁移能力,从而参与了白血病的发生和发展。

[参考文献]

[1] Wahner HAE, Haluska P, Schneider PA, et al. Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-1 receptor in human acute myelogenous leukemia: effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 in vitro [J]. Cancer Res, 2009, 69(19): 7635-7643

[2] Navenot JM, Fujii N, Peiper SC. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis [J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(5): 1074-1083

[3] Mirshahi P, Rafii A, Vincent L, et al. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells [J]. Leukemia, 2009, 23(6): 1039-1048

(下转第 826 页)