

抑制 PI_3K 通路增强 CAHB 对 Jurkat 细胞的凋亡作用

张 佳 洪 叶 罗文达 朱 敏 陈葆国

摘 要 **目的** 探讨 CAHB 单独使用及与 LY294002 联合应用对 Jurkat 细胞体外作用的影响。**方法** 分别用不同剂量的 CAHB(0、5、10、20、40mmol/L)诱导 Jurkat 细胞,用 MTS 法检测 Jurkat 细胞的增殖抑制效应,流式细胞术分析 Jurkat 细胞凋亡情况;取 40mmol/L 浓度的 CAHB 加入 PI_3K 抑制剂 LY294002,流式细胞术分析 Jurkat 细胞凋亡情况。**结果** CAHB 对 Jurkat 细胞生长有显著的抑制作用,并能显著诱导 Jurkat 细胞发生凋亡,其作用呈明显剂量、时间依赖性。 PI_3K 抑制剂 LY294002 能显著增强 CAHB 对 Jurkat 细胞的凋亡作用。**结论** CAHB 能抑制 Jurkat 细胞增殖,并诱导其凋亡。抑制 PI_3K 通路能增强 CAHB 对 Jurkat 细胞的凋亡作用。

关键词 CAHB PI_3K 抑制剂 Jurkat 细胞 细胞凋亡

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.034

Inhibited PI_3K Synergism with CAHB to Induce Apoptosis in Jurkat cells. Zhang Jia, Hong Ye, Luo Wenda, et al. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To study CAHB alone or in combined with LY294002 on culture Jurkat cell lines and the possible mechanism. **Methods** Jurkat cells were treated with different concentrations of CAHB in culture. MTS assay was used to observe the proliferation inhibition rate of Jurkat, and the flow cytometry was applied to analyze rate of Annexin V⁺/PI⁻, and to observe the change in the rate of Annexin V⁺/PI⁻ in presence or absence of PI_3K inhibitor LY294002 after Jurkat cells were induced with CAHB. **Results** CAHB obviously inhibited the growth of Jurkat cells in a time- and dose- dependent manners. CAHB also induced apoptosis of Jurkat cells in a dose- dependent manner. The PI_3K inhibitor LY294002 markedly increased the rate of Annexin V⁺/PI⁻ of Jurkat cells which was induced with CAHB. **Conclusion** CAHB can inhibit the proliferation and induce apoptosis of Jurkat. Inhibition of PI_3K signal enhances sensitivity of Jurkat cells to CAHB.

Key words CAHB; PI_3K inhibitor; Jurkat cell; Cell apoptosis

恶性肿瘤细胞的诱导分化和凋亡治疗是近些年肿瘤防治研究的热点之一。二乙酰己二胺(CAHB)是由中国科学院兰州化物所研制的一种癌细胞诱导分化剂,目前已经完成了骨髓增生异常综合征为适应证的 I 期(批件号:1999XL0059)和 II A 期临床试验(批件号:2005L02959),且毒性不良反应相对较低^[1,2]。国内研究发现 CAHB 对骨髓增生异常综合征 MUTZ-1 细胞株、人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株等有诱导凋亡的作用^[3]。目前认为 PI_3K/AKT 信号通路的过度活化和异常表达导致细胞凋亡受抑,参与肿瘤的发生,国外有研究者发现 T-ALL 患者中存在 PI_3K/Akt 通路的过度表达^[4]。本研究以急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 细胞为研究对象,观察

CAHB 对 Jurkat 细胞的抑制作用,并探讨 PI_3K 通路调节 CAHB 对 Jurkat 细胞体外作用的影响。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞系:急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株。(2)药物和主要试剂:二乙酰己二胺原药由无锡山禾制药有限公司提供,LY294002 购自美国 Sigma 公司;MTS 试剂盒为普洛麦格生物技术有限公司产品,FACS caliber 流式细胞仪为美国 BD 公司产品,RT-6000 酶标分析仪为德国 Rayto 公司产品。

2. 方法:(1)细胞培养:Jurkat 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中进行培养。每隔 2~3 天传代 1 次,所有实验均取对数生长期细胞进行。(2)MTS 法检测细胞生长抑制率:将细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数为 5×10^4 个,加入 CAHB 形成浓度梯度,最后配制成的终浓度为 40、20、10、5、0mmol/L,37℃、5% CO₂ 温箱中培养,分别于 12、24、48、72h 测定吸光度,于孵育

作者单位:317000 浙江省台州医院血液肿瘤内科(张佳、洪叶、罗文达、陈葆国),公共卫生平台(朱敏)

通讯作者:罗文达,电子信箱:luowd@enzemed.com

10h 时取出 96 孔板,在 1~3 列各孔加入 20 μ l CellTiter 96RAqueous One Solution Reagent,细胞培养箱继续孵育 2h,490nm 处读取吸光度,余 3 个时点重复上述步骤,计算抑制率:抑制率=(对照-本底)-(给药-本底)/(对照-本底) $\times$ 100%;用 IC₅₀ 计算软件求得 CAHB 作用后的半数抑制浓度(IC₅₀);根据 IC₅₀ 值选取处理 24h 时点作为试验作用时间;(3)流式细胞术检测 Annexin V 阳性细胞表达:细胞接种于 6 孔板,每孔细胞数为 5 $\times$ 10⁵个细胞,加入 CAHB 使终浓度为 0、5、10、20、40mmol/L,作用 24h 后,收集细胞,PBS 10000r/min $\times$ 5min 漂洗 2 遍,按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明操作,检测 Annexin V⁺PI⁻细胞百分含量。(4)PI₃K 抑制剂对细胞凋亡的影响:取 2.5 $\times$ 10⁵/ml 的 Jurkat 细胞,分为 3 组,分别加入终浓度为 0、25、

50 μ mol/L 的 PI₃K 抑制剂 LY294002,同时均以 40mmol/L CAHB 诱导 24h,流式细胞术检测 Annexin V⁺/PI⁻细胞率。

3. 统计学方法:使用统计软件 SPSS 17.0 软件包对实验结果进行统计学处理。所有实验至少重复 3 次,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组样本均数比较采用方差分析,多组间两两比较用 SNK-q 法检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CAHB 对 Jurkat 细胞增殖的影响:不同浓度的 CAHB 处理后的 Jurkat 细胞生长受到抑制,且抑制作用随着药物浓度和时间的增加逐渐增强。但 CAHB 处理 Jurkat 细胞 12h 时,浓度 5、10mmol/L 对 Jurkat 细胞的抑制作用不明显(表 1、图 1)。

表 1 不同浓度 CAHB 诱导 Jurkat 细胞的增殖抑制率(% , $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

浓度 (mmol/L)	时间			
	12	24	48	72
5	-5.91 $\pm$ 0.6 ^a	4.02 $\pm$ 0.7 ^c	5.92 $\pm$ 0.6 ^d	15.71 $\pm$ 2.0 ^e
10	-5.63 $\pm$ 0.8 ^b	13.99 $\pm$ 0.6 ^f	27.6 $\pm$ 2.1 ^e	36.56 $\pm$ 1.9
20	9.80 $\pm$ 0.5	27.05 $\pm$ 2.3 ^h	71.54 $\pm$ 2.7	82.11 $\pm$ 0.6
40	43.65 $\pm$ 0.9	56.65 $\pm$ 2.2	74.50 $\pm$ 1.4	88.50 $\pm$ 1.8

a vs b, c vs d, e vs f, g vs h, $P>0.05$;其余各组间两两比较, $P<0.05$

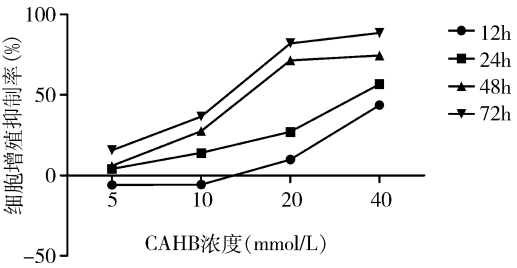


图 1 不同浓度 CAHB 诱导 Jurkat 细胞的增殖抑制率

2. CAHB 诱导后 Annexin V⁺/PI⁻细胞百分率的变化:经不同浓度 CAHB 诱导 Jurkat 细胞 24h 后, Annexin V⁺/PI⁻细胞百分率随药物浓度升高而增加,各组间比较差异有统计学意义($F=242.957$ 、 199.52 , $P<0.01$),除 5mmol/L 组外,其余各试验组与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$,图 2、图 3)。

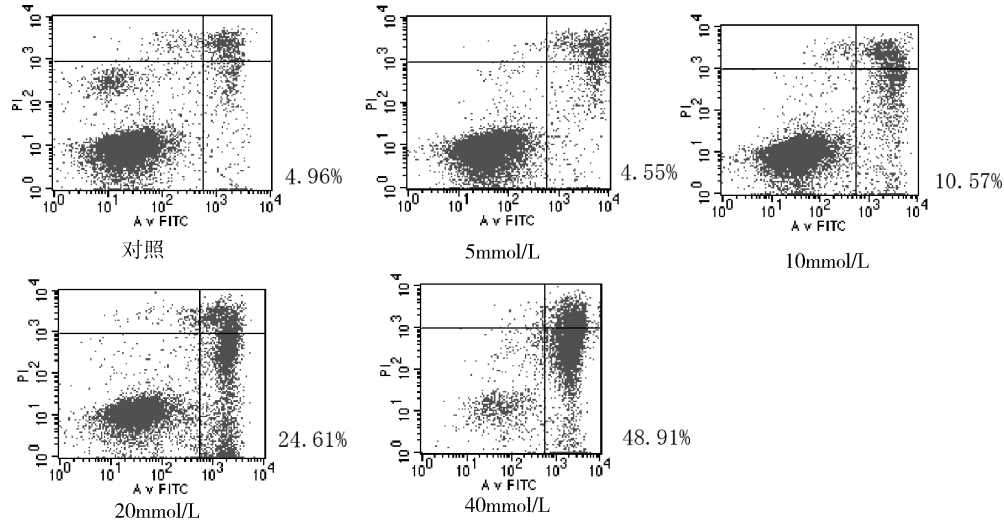


图 2 不同浓度 CAHB 诱导 Jurkat 细胞后 Annexin V⁺/PI⁻细胞百分率的变化

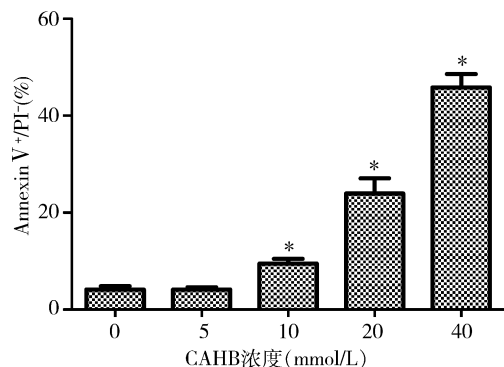


图 3 不同浓度的 CAHB 诱导 Jurkat 细胞后 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞百分率的变化

与对照组比较, * $P < 0.05$

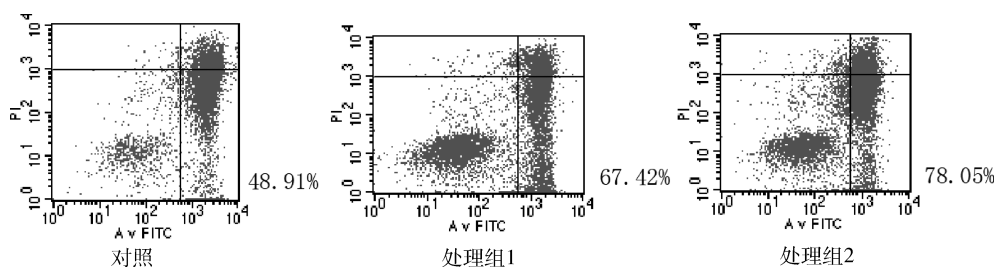


图 4 加入不同浓度 PI₃K 抑制剂后 Jurkat 细胞凋亡率的变化

对照组为 40mmol/L CAHB; 处理组 1 为 40mmol/L CAHB + 25 μmol/L LY294002; 处理组 2 为 40mmol/L CAHB + 50 μmol/L LY294002

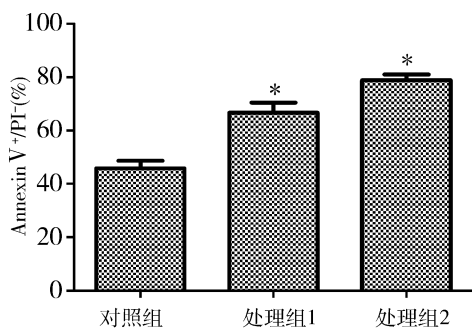


图 5 加入不同浓度 PI₃K 抑制剂后 Jurkat 细胞凋亡率的变化

对照组为 40mmol/L CAHB; 处理组 1 为 40mmol/L CAHB + 25 μmol/L LY294002; 处理组 2 为 40mmol/L CAHB + 50 μmol/L LY294002; 与对照组比较, * $P < 0.01$

3. PI₃K 抑制剂 LY294002 对细胞凋亡的影响: Jurkat 细胞经特异性 PI₃K 抑制剂 LY294002 (0、25、50 μmol/L) 与 CAHB (40mmol/L) 共同孵育后, 抑制剂共孵育组的 Annexin V⁺/PI⁻ 凋亡细胞比率明显增高, 与无抑制剂组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4、图 5)。

讨 论

急性淋巴细胞白血病是造血系统的恶性肿瘤, 约占急性白血病的 30% ~ 40%, 其中急性 T-淋巴细胞白血病约占成人急性淋巴细胞白血病的 20% ~ 25%。有研究表明, 相对于 B-ALL、T-ALL 患者更容易复发, 总体疗效及预后均更差^[5]。目前 T-ALL

二乙酰己二胺 (CAHB) 是由中国科学院兰州化物所研制的一种癌细胞诱导分化剂, 为国内首创品种, 由无锡山禾制药有限公司生产。其为 HMBA 的类似物, 而 HMBA 已被发现能诱导 HL-60、U937、CEM-CCRF 等细胞凋亡, 并且在国外已临床应用于 AML 和 MDS 患者^[7,8]。在我国 CAHB 已完成以骨髓增生异常综合征 (MDS) 为主要适应证的国家一类新药的 I 期和 II A 期临床试验, 取得了一定的疗效, 且不良反应轻微安全, 并建议扩大病种, 用于难治和复发的白血病、肺癌等^[1,2]。

本研究观察到 CAHB 对急性淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞有强烈的增殖抑制及诱导凋亡作用, 并呈现出明显的浓度-时间依赖性。凋亡早期的细胞能够结合 Annexin V 而用流式细胞术体现出来 (Annexin V⁺/PI⁻ 细胞), 并且凋亡细胞的比率随着 CAHB 浓度的增高而增加, 提示 CAHB 有可能应用于临床急性 T 淋巴细胞白血病的治疗。

大量研究证明细胞凋亡是多种基因相互作用、综合调节的结果, 而在诸多细胞凋亡调控基因中, Bcl-2 家族在调节细胞凋亡的过程中发挥重要的作用, 该家族包括抗凋亡 (Bcl-2、Bcl-xL 等) 和促凋亡

的主要治疗手段仍然是化疗, 随着化疗方案的改善及靶向药物的进展, T-ALL 患者的生存率得到了明显提高。有研究报道超过 90% 的患者能获得 CR, 但相当一部分患者 2 年内复发, 且复发患者由于耐药性的出现等, 长期生存率更低, 预后更差^[6]。因此, 寻找新的高效的化疗药物或化疗方案是我国血液病工作者的目标之一。

(Bax、Bad、Bid 等)两大亚家族。Bcl-2 表达可抑制细胞凋亡,从而使细胞增殖和凋亡不平衡,对肿瘤的发生、发展与转移有一定的促进作用。

已有研究发现,经 CAHB 处理后,骨髓增生异常综合征细胞株 MUTZ-1 细胞、人小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 细胞的 Bcl-2 水平下调,细胞发生凋亡,表明 CAHB 可能通过下调 Bcl-2 水平来诱导细胞凋亡^[3]。目前认为 Bcl-2 是 AKT 底物之一,Bcl-2 水平的调节与 PI₃K/Akt 信号通路有关。而 PI₃K/Akt 信号通路在肿瘤的发生、发展中起重要作用,该通路在多种肿瘤中异常活化,参与肿瘤的侵袭和转移,与肿瘤的耐药性密切相关^[9]。有研究发现,PI₃K 是 PI₃K/Akt 信号转导通路的始动因子,参与白血病的形成,其活性异常不仅能导致细胞恶性转化,而且与肿瘤细胞的迁移、黏附等相关^[10]。

LY294002 是 PI₃K 抑制剂,可以竞争地、不可逆地抑制 PI₃K 的 ATP 结合位点,抑制 Akt 磷酸化及其活性并诱导凋亡,其对 Akt 磷酸化的抑制作用也呈剂量和时间依赖性^[11]。Sunayama 等^[12]发现使用 LY294002 抑制 PI₃K 通路后,原代胶质母细胞瘤增加了对化疗的敏感度。国内也有研究发现,LY294002 能通过负调节 PI₃K/Akt 通路,与三氧化二砷联合后通过产生协同作用,大幅度的增加三氧化二砷对胶质瘤细胞的凋亡作用^[13]。本研究发现将 CAHB 与 LY294002 联合作用于 Jurkat 细胞与 CAHB 单独使用相比,Jurkat 细胞凋亡率明显提高,实验结果类似于上述的研究,提示 CAHB 诱导 Jurkat 细胞凋亡可能与 PI₃K/Akt 信号转导通路有关。

综上所述,CAHB 在体外通过诱导凋亡发挥抗淋巴细胞白血病的作用,且抑制 PI₃K/Akt 通路能显著的增加 CAHB 对 Jurkat 细胞的凋亡作用,具体机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 陈勤奋,范维琥,李佩,等. 二乙酰己二胺(CAHB)治疗骨髓增生异常综合征(MDS)的心脏安全性临床评价[J]. 中国新药杂志,

2008,17(6):512-515

- 2 陈勤奋,李佩,范学良,等. 二乙酰己二胺治疗骨髓增生异常综合征患者的 I 期临床研究[J]. 中华内科杂志,2004,43(7):534-535
- 3 郭群依,周晖,朱敏,等. 二乙酰己二胺诱导骨髓增生异常综合征 MUTZ-1 细胞凋亡及其机制研究[J]. 浙江医学,2008,5:466-469
- 4 Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, *et al.* High frequency of PTEN, PI₃K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood,2009,114(3):647-650
- 5 Vitale A, Guarini A, Ariola C, *et al.* Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biologic profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol[J]. Blood,2006,107(2):473-479
- 6 李萍,梁爱斌. 成人急性淋巴细胞白血病的诊疗进展[J]. 中国癌症杂志,2014,10:738-744
- 7 Ruefli A A, Smyth M J, Johnstone R W. HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. Blood,2000,95(7):2378-2385
- 8 王钦红,谢毅,范华骅,等. 六亚甲基二乙酰胺对急性白血病细胞株 HL-60 和 U937 分化、凋亡的影响及其机制[J]. 中华血液学杂志,2004,3:29-32
- 9 Evangelisti C, Evangelisti C, Chiarini F, *et al.* Therapeutic potential of targeting mTOR in T-cell acute lymphoblastic leukemia (review) [J]. Int J Oncol,2014,45(3):909-918
- 10 Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI₃K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting[J]. Nat Rev Cancer,2015,15(1):7-24
- 11 Iturri P, Joseph V, Rodrigo G, *et al.* Inhibition of protein kinases AKT and ERK1/2 reduce the carotid body chemoreceptor response to hypoxia in adult rats[J]. Adv Exp Med Biol,2015,860:269-277
- 12 Sunayama J, Sato A, Matsuda K, *et al.* Dual blocking of mTor and PI₃K elicits a prodifferentiation effect on glioblastoma stem-like cells [J]. Neuro Oncol,2010,12(12):1205-1219
- 13 李洋,杨东波,张俊和,等. LY294002 通过抑制胶质瘤的 PI3K/Akt 通路增强三氧化二砷毒性作用[J]. 哈尔滨医科大学学报,2014,1:13-17

(收稿日期:2015-08-26)

(修回日期:2015-09-04)

欢迎订阅 欢迎赐稿