

蛋白酶体抑制剂 MG-132 诱导 K562 细胞凋亡的实验研究

王西阁,郝庆飞,汤有才

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 观察蛋白酶体抑制剂 MG-132 对人红白血病细胞株 K562 的致凋亡作用及其对凋亡相关基因 NF- κ B 与 caspase-3 表达的影响。方法 将蛋白酶体通路特异性阻断剂 MG-132 加入 K562 细胞,用 AO/EB 细胞形态和 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡,流式细胞仪检测凋亡率,逆转录-PCR 检测 NF- κ B 的转录水平,免疫组化法检测 NF- κ B 与 caspase-3 的表达,比色法检测 caspase-3 活性。结果 流式细胞仪检测 15 μ mol/L MG-132 作用 24 h 后,凋亡率为(26.5 $\pm$ 0.6)% ,与对照组(1.2 $\pm$ 0.1)% 相比明显增多,差异有显著性($P<0.01$) ,MG-132 诱导 K562 细胞凋亡具有量-效关系; RT-PCR 检测发现 NF- κ B mRNA 表达下调;免疫组化法检测发现 MG-132 可降低 NF- κ B 的表达,增加 caspase-3 蛋白的表达,且表达量与 MG-132 的作用呈剂量相关。结论 MG-132 能诱导 K562 细胞凋亡,其机制可能与 MG-132 抑制 NF- κ B 信号转导通路,下调 NF- κ B 表达继而上调 caspase-3 表达有关。

[中国当代儿科杂志,2009,11(4):255-258]

[关键词] 蛋白酶体抑制剂 MG-132; 凋亡; Caspase-3; K562 细胞株

[中图分类号] R733.73 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)04-0255-04

Induction of apoptosis by proteasome inhibitor MG-132 in human erythroleukemia cell line K562

WANG Xi-Ge, HAO Qing-Fei, TANG You-Cai. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Hao Q-F, Email: haoqingfei@hotmail.com)

Abstract: Objective To investigate whether proteasome inhibitor MG-132 induces apoptosis of human erythroleukemia cell line K562 and possible mechanisms. **Methods** K562 cells were incubated with RPMI 1640 and exposed to 0, 1, 5, 10, 15 μ mol/L of MG-132 for 24 hrs, respectively. The apoptosis of cells were detected by fluorescence microscope, DNA fragments and flow cytometry. The NF- κ B mRNA expression was quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression of NF- κ B and caspase-3 was semiquantitatively analyzed with SABC techniques. Caspase-3 activities were measured with a colorimetric method. **Results** The growth of K562 cells was inhibited and the apoptosis of the cells increased after MG-132 treatment in a dose-dependent manner. After 24 hrs of 15 μ mol/L MG-132 treatment, the percentage of apoptotic cells (26.5 $\pm$ 0.6%) increased significantly when compared with the untreated controls (1.2 $\pm$ 0.1%) ($P<0.01$). MG-132 treatment decreased the mRNA and protein expression of NF- κ B, and increased the protein expression of caspase-3. **Conclusions** MG-132 can induce apoptosis of human erythroleukemia cell line K562 through the down-regulation of NF- κ B expression and up-regulation of caspase-3 expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (4):255-258]

Key words: Proteasome inhibitor MG-132; Apoptosis; Caspase-3; K562 cell line

泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin proteasome pathway, UPP)具有精确降解细胞内各种目的靶蛋白,进而参与基因转录和细胞周期调节,如核因子抑制蛋白 I- κ B, p53, Bax, C-Jun 氨基端激酶等许多负责细胞增殖和凋亡信号传导的蛋白^[1]。实验证实,蛋白酶体抑制剂 MG-132 可抑制多种肿瘤细胞生长并诱导其凋亡^[2]。本实验通过人白血病细胞株 K562,探讨蛋白酶体抑制剂 MG-132 诱导白血病细胞凋亡

过程中 NF- κ B 与 caspase-3 表达水平的关系,阻断 NF- κ B 介导的凋亡,为临床应用于白血病的治疗寻找新的方法提供有价值的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人红白血病细胞 K562 由中国医学科学院惠赠;

[收稿日期]2008-09-28;[修回日期]2008-11-12
[作者简介]王西阁,女,教授,主任医师。主攻方向:小儿血液肿瘤。

MG-132 购自 Calbiochem 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自美国 Becton Dickinson Biosciences 公司; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; SABC 免疫酶标试剂盒购自北京中山金桥生物公司; Caspase-3 分光光度试剂盒购自南京凯基生物科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 K562 细胞置于 37 ℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 48 ~ 72 h 传代一次, 长至对数生长期。

1.2.2 AO/EB 染色细胞形态观察 取对数生长期细胞, 将终浓度分别为 1, 5, 10, 15 μmol/L 的 MG-132 加入培养体系培养 24 h 后, 取细胞悬液 100 μL, 加入 AO/EB 染料 4 μL 混匀, 置 1 滴于载玻片, 上覆盖玻片, 荧光显微镜下观察结果。

1.2.3 DNA 断裂琼脂糖电泳分析 培养 24 h 后, 收集各组细胞, 采用常规的酚/氯仿法抽提 DNA, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 实验组加入 MG-132, 其终浓度分别为 1, 5, 10, 15 μmol/L, 每个浓度均行 3 个复孔, 同时设阴性对照组, 相同条件下培养 24 h。收集各组细胞, 4℃ 预冷的 PBS 洗细胞两次, 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙锭溶液, 混匀后室温避光后上流式细胞仪检测。

1.2.5 逆转录-PCR 检测 NF-κB mRNA 的水平

收集上述处理的 K562 细胞 (同 1.2.2)。Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 溶于无 RNase 的水中, 紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8 ~ 2.0 之间。根据其 cDNA 序列设计引物, β-actin 引物: 上游引物 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3', 下游引物 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3', 564 bp; NF-κB 引物: 上游引物 5'-AGC ACA GAT ACC ACC AAG ACC-3', 下游引物 5'-GGG CAC GAT TGT CAA AGA T-3', 415 bp。首次循环: 42℃ 20 min, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min。PCR 扩增: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 总延伸 6 min。5 μL 扩增产物加于含 0.01% Goldview 染料的 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 用 Quantiscan 分析软件分析条带。

1.2.6 免疫组化 K562 细胞接种于放有盖玻片的 6 孔培养板, 培养过夜, 待细胞长至八成满。对照组不加 MG-132, 实验组 MG-132 (终浓度分别为

1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L, 15 μmol/L) 处理细胞 24 h 后, 取出附有 K562 细胞的盖玻片, 磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍, 多聚甲醛固定, 按 SABC 免疫酶标试剂盒方法进行。细胞中呈现棕褐色颗粒者为阳性细胞, 并采用 Biosens Digital Imaging System 医学图像分析系统进行阳性区平均光密度测量。

1.2.7 Caspase-3 活性测定 收集对数生长期细胞 (同 1.2.2), 按试剂盒说明酶标仪测定 A405 值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 所有原始数据均进行正态分布、方差齐性检验。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数比较用单因素方差分析, 相关分析用直线回归, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学变化

吖啶橙 (AO) 能透过胞膜完整的细胞, 嵌入细胞核 DNA, 使之发出明亮的绿色荧光。溴乙锭 (EB) 仅能透过胞膜受损的细胞, 嵌入核 DNA, 发橘黄色荧光。本试验对照组 K562 细胞绝大多数被染成均匀较弱绿色荧光, 细胞大小形态较一致。10 μmol/L MG-132 作用 K562 细胞 24 h 后, 部分细胞体积变小, 染色质致密固缩聚集于细胞核, 可见境界分明的块状或新月形小体, 部分染成均匀染成亮绿色荧光, 部分呈黄绿色颗粒荧光, 部分表现为橘黄色荧光, 还有少数橘红色死亡细胞 (图 1)。

2.2 DNA 断裂琼脂糖电泳分析

5 μmol/L MG-132 作用 K562 细胞 24 h 后, DNA 电泳出现细胞凋亡特有的间隔 180 ~ 200 bp 梯状条带 (DNA ladder), 但条带较弱; 当 MG-132 浓度增至 10 μmol/L 时电泳条带更加明显 (图 2)。

2.3 MG-132 对 K562 细胞凋亡率的影响

流式细胞检测结果显示: MG-132 作用后, 凋亡率随浓度的增高而明显增加。1, 5, 10, 15 μmol/L MG-132 作用 24 h 后的凋亡率分别为 $(2.4 \pm 0.2)\%$, $(10.9 \pm 0.8)\%$, $(18.0 \pm 0.7)\%$, $(26.5 \pm 0.6)\%$, 与对照组 $(1.2 \pm 0.1)\%$ 相比, 除 1 μmol/L 组差异无显著性外, 各组差异均有显著性意义 ($P < 0.01$)。表明 MG-132 诱导的 K562 细胞凋亡具有量效关系。

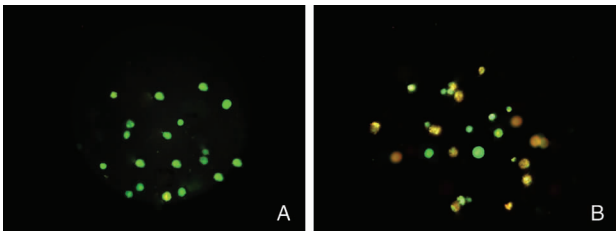


图 1 荧光显微镜下观察 K562 细胞凋亡 (AO/EB 染色) A:对照组,细胞大小均匀,发绿色荧光,未见凋亡细胞; B:10 μmol/L 组,可见发黄绿色荧光的凋亡细胞及橘红色的死亡细胞。

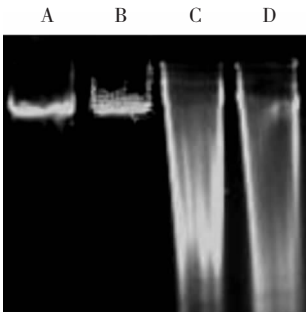


图 2 DNA 断裂琼脂糖电泳分析 A:对照组 (DNA 条带完整); B:1 μmol/L 组 (未见 DNA ladder); C:5 μmol/L 组 (DNA ladder 较弱); D:10 μmol/L 组 (DNA ladder 较为明显)

2.4 RT-PCR 分析 NF-κB 基因转录水平

与对照组比较, MG-132 作用 24 h 后 NF-κB 的 mRNA 表达随着 MG-132 浓度加大而减少 (图 3)。与对照组 mRNA 表达相比, 除 1 μmol/L 组 (0.8 ± 0.2) 差异无显著性外, 其余各组差异均有显著性 (P < 0.01)。

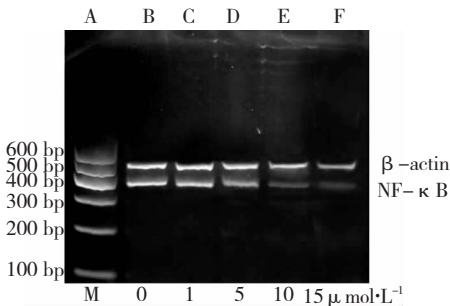


图 3 不同浓度 MG-132 对 NF-κB 的 mRNA 表达影响 A: Marker; B: 对照组; C: 1 μmol/L 组; D: 5 μmol/L 组; E: 10 μmol/L 组; F: 15 μmol/L 组。

2.5 MG-132 对 K562 细胞 NF-κB 与 caspase-3 蛋白表达的影响

免疫组化结果 (表 1) 显示, 1, 5, 10, 15 μmol/L 的 MG-132 作用 24 h 后, NF-κB 蛋白水平随浓度升

高而降低, 而 caspase-3 蛋白水平逐渐升高, 且 NF-κB 的表达与 caspase-3 的表达量也呈负相关, 其相关系数为 -0.832。

表 1 MG-132 处理 24 h 后 NF-κB 与 caspase-3 表达水平 (平均光密度值) 的变化 (x ± s)

组别	NF-κB	Caspase-3
对照组	188.5 ± 2.4	110.2 ± 5.7
1 μmol/L 组	185.9 ± 4.7	116.9 ± 5.2
5 μmol/L 组	151.7 ± 9.2 ^a	132.6 ± 4.5 ^a
10 μmol/L 组	139.1 ± 7.8 ^a	149.5 ± 5.3 ^a
15 μmol/L 组	126.9 ± 4.0 ^a	166.9 ± 6.3 ^a

a: 与对照组相比, P < 0.05

2.6 MG-132 活化 caspase-3

K562 细胞在不同浓度 MG-132 作用 24 h 后, caspase-3 活性逐渐升高。1, 5, 10, 15 μmol/L MG-132 作用 24 h 后的 caspase-3 活性值分别为 (0.07 ± 0.04)%, (0.14 ± 0.04)%, (0.19 ± 0.07)%, (0.22 ± 0.06)%, 与对照组 (0.07 ± 0.05)% 相比, 除 1 μmol/L 组差异无显著性外, 各组差异均有显著性 (P < 0.01)。MG-132 作用 24 h 后 caspase-3 活性随 MG-132 浓度上升而逐渐增强, 表明 MG-132 可激活 caspase-3。

3 讨论

白血病是一类异质性的造血干细胞的恶性克隆性疾病。在我国, 小儿的恶性肿瘤中以白血病发病率最高。虽然随着新化疗药物不断出现, 化疗方案不断优化, 小儿白血病的化疗效果不断提高, 但有部分患儿不能达到完全缓解或缓解后复发, 而这与 NF-κB 密切相关。研究证实, 白血病表达高活性的 NF-κB, NF-κB 的不适当激活和表达与促进细胞生长、抗凋亡耐药密切相关^[3]。相反, 抑制 NF-κB 活性, 则能诱导细胞凋亡、抑制肿瘤的生长。因此, 寻求抑制 NF-κB 活性的方法, 在临床上具有重要意义。

泛素在真核生物中普遍存在, 是一种高度保守的含 76 个氨基酸残基的蛋白, 属于热休克蛋白基因家族。UPP 通路尽管较早已被提及, 但直到最近才被深入的研究, UPP 主要由泛素、泛素连接酶和 26S 蛋白酶体复合物三部分组成, 参与和调控信号转导、细胞周期的调控、转录活性的调节及抗原提呈和凋亡等众多细胞生理事件。蛋白酶体抑制剂 PS-341 (bortezomib) 通过靶向作用蛋白酶体稳定一些与细胞凋亡有关的蛋白如 IκB, 抑制 NF-κB 的活性, 启动凋亡程序, 抑制转录活性, 降低肿瘤负荷, 从而改善

临床症状^[4]。目前,蛋白酶体抑制剂 PS-341 已被 FDA 批准进入临床用药,被认为是最具有临床运用前景的药物之一^[5]。

近年的研究表明,醛基肽一类蛋白酶体抑制剂,如 MG-132 能有效抑制黑色素瘤、肝细胞癌、肾细胞癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌和胰腺癌、白血病细胞的生长,并能诱导细胞凋亡^[6]。本研究结果表明, MG-132 可有效诱导 K562 细胞凋亡,具有一定的量效性,流式细胞检测结果证明了这一点。免疫组化的结果进一步证实了蛋白酶体抑制剂 MG-132 可诱导白血病细胞发生凋亡,其机制可能与 MG-132 从转录和蛋白水平降低 NF- κ B 的表达从而阻断 NF- κ B 介导的凋亡抑制途径有关。

研究发现细胞凋亡障碍在肿瘤的分子发病机制中有重要意义^[7,8]。近年来,细胞凋亡机制的研究进展很快,目前认为细胞外的凋亡诱导因素可通过多种途径启动细胞凋亡^[9]。其中, caspase 是参与和调控细胞凋亡的主要成分,按功能分为启动酶(caspase-2、caspase-8 和 caspase-9) 和效应酶。 caspase-3 是重要的效应酶,被称为“刽子手” caspase,一旦被激活,激活后直接水解与细胞凋亡相关的蛋白质,引起细胞形态学和生物化学的改变,细胞发生不可逆的凋亡。研究发现蛋白酶体活性抑制后 JNK 活化,激活 caspase-8 和 caspase-3 导致细胞凋亡^[10]。在本实验通过测定 MG-132 对 caspase-3 表达的影响,发现随 MG-132 浓度的升高, caspase-3 活性升高, caspase-3 蛋白表达量逐渐升高,且表达量与 MG-132 的作用呈剂量正相关,提示 MG-132 有可能是通过影响 caspase-3 的表达而诱导白血病细胞发生凋亡,这也是 MG-132 可能抗肿瘤机制之一。

虽然,蛋白酶体抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的精确机制尚不十分清楚,但蛋白酶体抑制剂可诱导人白血病细胞凋亡,而不诱导正常白细胞凋亡^[11],这与常用的抗癌药物对细胞无选择性的杀伤有明显的

不同,因此认为,蛋白酶体作为一种新的靶标,为开发新的抗肿瘤药物提供了新思路,其抑制剂的应用也为肿瘤治疗提供了新方向。

[参 考 文 献]

[1] Marx J. Cell biology. Ubiquitin lives up to its name [J]. Science, 2002, 297(5588):1792-1794.

[2] Cervello M, Giannitrapani L, La Rosa M, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, et al. Induction of apoptosis by the proteasome inhibitor MG132 in human HCC cells: Possible correlation with specific caspase-dependent cleavage of beta-catenin and inhibition of beta-catenin-mediated transactivation [J]. Int J Mol Med, 2004, 13(5):7412748.

[3] Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4):301-310.

[4] Bladé J, Cibeira MT, Rosiñol L. Bortezomib: a valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma[J]. Acta Oncol, 2005, 44(5):440-448.

[5] Smith GG. Proteasome inhibition in cancer therapy[J]. J Infus Nurs, 2005, 28(4):258-264.

[6] Hochwald SN, Lind DS, Malaty J, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, MacKay SL. Antineoplastic therapy in colorectal cancer through proteasome inhibition[J]. Am Surg, 2003, 69(1):15-23.

[7] 佟海侠,张继红,马力,陆春伟,张锦华. Caspase-8 和 DR₅ 在 TRAIL 诱导神经母细胞瘤凋亡中的作用[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(4):327-330.

[8] 叶启东,顾龙君,赵金彩,陈文高,张蓓,蒋乐敏,等. 四硫化四砷 ST1571 和除莠霉素诱导 K562 细胞凋亡的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2004,6(1):15-18.

[9] Kim DS, Kim SY, Jeong YM, Jeon SE, Kim MK, Kwon SB, et al. Light-activated indole-3-acetic acid induces apoptosis in g361 human melanoma cells[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(12):2404-2409.

[10] Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(3):630-639.

[11] Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells [J]. Blood, 2001, 98(8):2301-2307.

(本文编辑:吉耕中)