

文章编号: 1673-3851 (2012) 04-0589-05

Hsp90 抑制剂 BIIB021 对人急性 T 细胞白血病 Molt-4 细胞周期和凋亡的影响

李 敏¹, 曹 慧¹, 钱文斌^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学院 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

2. 浙江大学医学院附属第一医院 血液病研究所, 杭州 310003)

摘 要: 为了研究 Hsp90 抑制剂 BIIB021 对人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Molt-4 增殖和凋亡的影响, 采用 MTT 法检测了 BIIB021 对 Molt-4 细胞增殖的影响, Hoechst33258 荧光染色法检测细胞凋亡形态学变化, 流式细胞术检测药物作用前后细胞周期和凋亡的改变, Western blotting 检测 BIIB021 对细胞周期和凋亡相关蛋白的影响。结果显示: BIIB021 以时间和剂量依赖性方式抑制 Molt-4 细胞增殖, 48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 384.6 nmol/L 和 301.8 nmol/L; Hoechst33258 染色可观察到细胞内出现凋亡小体, 且随着药物浓度增大, 凋亡小体的数目也逐渐增多; 流式结果同样显示, 随着药物浓度升高, 细胞凋亡率逐渐上升, 400 nmol/L BIIB021 可诱导细胞凋亡率达 34.4%; 另外, BIIB021 可显著阻滞细胞于 G₀/G₁ 期; Western blotting 显示 BIIB021 激活 Caspase-8、-9、-3 和 PARP, 下调 CDK4/6, 上调 p21 和 p18, 并能明显抑制 Akt 和 p65。由此表明, BIIB021 能激活死亡受体途径和线粒体途径诱导 Molt-4 细胞凋亡, 并通过影响 CDK4/6 和 p21、p18 使得 Molt-4 细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期, 抑制细胞增殖; BIIB021 对 Molt-4 的 Akt 和 NF- κ B 也有抑制作用。

关键词: Hsp90 抑制剂; BIIB021; 急性 T 淋巴细胞白血病; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: Q733.7 **文献标识码:** A

0 引 言

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是由于原始及幼稚淋巴细胞在造血组织异常增殖并浸润全身各组织脏器的一种造血系统恶性克隆性疾病。ALL 可分为急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)和急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)。化疗是 T-ALL 的主要治疗手段, 但复发率高、预后差^[1], 因此, 亟待寻找新的抗肿瘤药物和治疗方案。

Hsp90 是一种高度保守并且广泛存在于原核及真核生物中的热休克蛋白。Hsp90 通常与热休克蛋白家族其他成员如 Hsp70、Hsp40、p60/Hop 和 p23 等形成复合体, 在 ATP 的参与下, 促进伴侣蛋白的正确折叠并维持其构象稳定。有研究表明,

Hsp90 的伴侣蛋白有 200 多种, 涵盖了几乎所有的细胞过程。许多已知的伴侣蛋白都属于蛋白激酶或转录因子, 如 Bcr-Abl、EGFR、c-Met、IGF1-R、c-Src、Akt、ERK、CDK4、Raf-1、类固醇激素受体、p53、Stat3、Mdm2 和端粒酶等^[2-4], 这些蛋白激酶和转录因子涉及与细胞增殖相关的多条信号转导途径。抑制 Hsp90 的活性, 能够同时引发多条信号转导途径中关键蛋白降解, 达到 Klein 等^[5]提出的“肿瘤多点攻击”的目的。目前, 以 Hsp90 作为抗肿瘤的分子靶点已经受到广泛关注。

BIIB021/CNF2024 是一种人工合成的嘌呤骨架类 Hsp90 抑制剂, 它能竞争性地结合于 Hsp90 的 N 末端 ATP/ADP 结合域, 破坏细胞增殖、分化过程中关键蛋白的稳定性, 从而诱导细胞凋亡。研

收稿日期: 2011-10-25

基金项目: 浙江省自然科学基金杰出青年团队项目(R2090392); 浙江理工大学科研启动基金项目(1016834-1)

作者简介: 李 敏(1987-), 女, 河南中牟人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的分子靶向治疗研究。

通讯作者: 钱文斌, 电子邮箱: qianwenb@yahoo.com.cn

究显示,其在纳摩尔级水平就能抑制多种肿瘤细胞如乳腺癌、结肠癌、肺癌、头颈部鳞状细胞癌及霍奇金淋巴瘤细胞的增殖^[6-8],但其对 T-ALL 细胞的作用尚无报道。本课题以 T-ALL 细胞株 Molt-4 细胞为研究对象,探讨 BIIB021 对 T-ALL 细胞增殖的影响,并从细胞周期、凋亡调控两个方面研究 BIIB021 抑制 Molt-4 细胞增殖的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

a)细胞株及细胞培养: T-ALL 细胞株 Molt-4 购自上海中科院。细胞培养条件为含体积分数 10%胎牛血清的 RPMI160 完全培养基,在 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。

b)试剂: BIIB021 为 Selleck Chemicals 公司产品,用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解成 1mg/mL 贮存于 -20℃ 保存,实验时无血清培养基稀释至实验浓度; RPMI 1640 购于 GIBCO 公司, 4℃ 保存;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 购于 Hyclone 公司; MTT、DMSO、Hoechst33258 染料、RNaseA 酶购自 Sigma-Aldrich 公司; Western blotting 一抗抗体: Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3、PARP、Akt、p-Akt (Ser473)、CDK4、CDK6、cyclinD3、p21、p18 均购于 Cell-signaling 公司, -20℃ 保存; actin 购于 Sigma-Aldrich 公司, 4℃ 保存; 二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 购于杭州达文生物有限公司, -20℃ 保存。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法检测 BIIB021 对 Molt-4 细胞增殖的影响

将对数生长期的 Molt-4 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L, BIIB021 处理浓度分别为 50、100、200、400、800 nmol/L, 每个浓度设 4 个复孔,并设只加细胞不加药组做对照组,不加细胞组为空白对照组。药物作用 24、48、72 h 后,每孔加入 20 μ L 5mg/mL 的 MTT 工作液, 37℃ 培养箱中继续孵育 4 h,离心(3 000 r/min, 15 min)弃上清,每孔加入 200 μ L DMSO 溶液,震荡混匀后,于酶标仪 570 nm 读取各孔吸光值(A)。

细胞增殖抑制率计算方法如下: 细胞增殖抑制率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 Hoechst33258 染色

细胞经药物处理 24 h 后,离心(1 000 r/min, 5 min)收集细胞, 4% 多聚甲醛冰上固定 30 min,

PBS 洗涤 2 次,涂至玻片,晾干, Triton-100 透化 20 min, PBS 洗涤 2 次,加入 Hoechst33258 染液(工作液浓度 10 μ g/mL)避光反应 15 min, PBS 洗涤 2 次后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 流式细胞术(FACS)检测细胞凋亡

参照流式检测细胞凋亡试剂盒(购自杭州达文生物有限公司)操作说明,药物处理 24h 后,收集 1×10^5 个细胞, PBS 洗涤 2 次,取 500 μ L Annexin V Binding Buffer 重悬细胞,依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 溶液使终浓度均为 1 μ g/mL,混匀,室温避光反应 10min 后上机检测,采用 CellQuest 1.2 软件分析结果。

1.2.4 流式细胞术(FACS)检测细胞周期

细胞经 100、200 nmol/L BIIB021 处理 24 h 后,收集 1×10^6 个细胞,以 4℃ 预冷的 70%乙醇固定过夜(4℃), PBS 洗涤 2 次后加入 RNase A 酶和 PI 染色液,使终浓度均为 50 μ g/mL,室温避光反应 20 min 后上机检测。

1.2.5 Western blotting 检测细胞凋亡和细胞周期相关蛋白的变化

细胞经药物处理 24 h 后, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,加入裂解液冰上放置 30 min,超声波细胞粉碎机处理后(160 W,持续 5 s,间隔 5 s,工作 5 次), 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min,取上清, BCA 法测定蛋白浓度。取 45 μ g 蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,开始电压为 60 V,待蛋白样品进入分离胶后,将电压增至 120 V。电泳结束后, 400 mA 恒流湿转 100 min 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 4℃ 摇床过夜,用 $1 \times$ TBST 洗去非特异性结合的蛋白,加入二抗,室温温育 2 h,再用 $1 \times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,用 ECL 化学发光底物显色, X 片曝光后显影定影。

1.3 统计学处理

实验数据用 SPSS16.0 软件分析,所有实验均重复 2 次或 3 次,各组数据以“均值士标准差”表示。

2 结 果

2.1 BIIB021 对 Molt-4 细胞增殖的抑制作用

MTT 结果显示, BIIB021 对 Molt-4 细胞有明显的生长抑制作用,随着药物剂量增大及药物作用时间延长,抑制作用逐渐增强(图 1)。采用 SPSS16.0 软件计算得出 BIIB021 对 Molt-4 作用 48、72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 384.6 nmol/L 和 301.8 nmol/L。

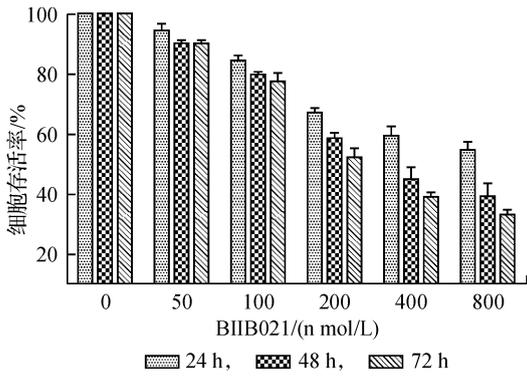


图 1 BIIB021 对 Molt-4 细胞生长抑制作用

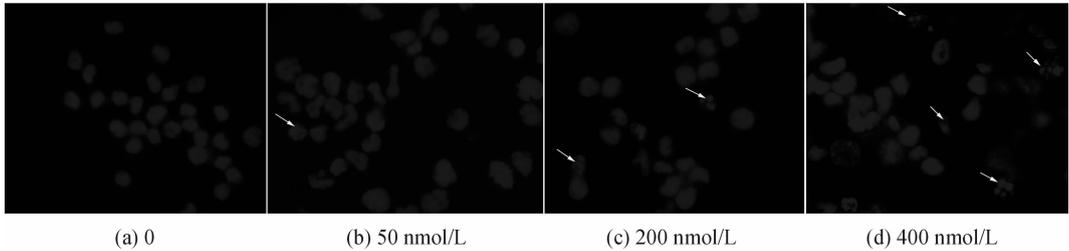


图 2 BIIB021 处理 Molt-4 细胞后凋亡形态学变化

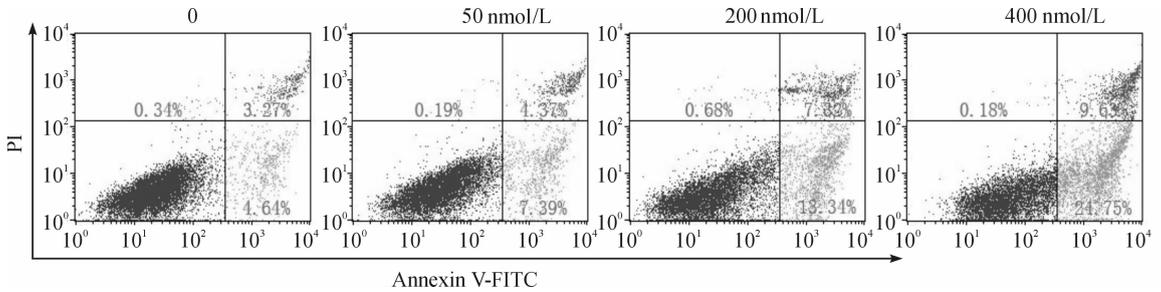


图 3 不同剂量 BIIB021 对 Molt-4 细胞凋亡率的影响

2.3 BIIB021 对 Molt-4 细胞周期的影响

分别用 100、200 nmol/L 的 BIIB021 处理 Molt-4 细胞,24 h 后收集细胞进行 PI 染色,FACS 检测细胞周期。结果如图 4 所示,不加药物处理时,细胞

G₀/G₁ 期比率为 47.30%,S 期为 47.27%,200 nmol/L BIIB021 处理后,G₀/G₁ 期细胞比率增至 86.30%,S 期细胞比率则下降至 9.65%,而 G₂/M 期变化不明显,提示 BIIB021 可以使 Molt-4 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞。

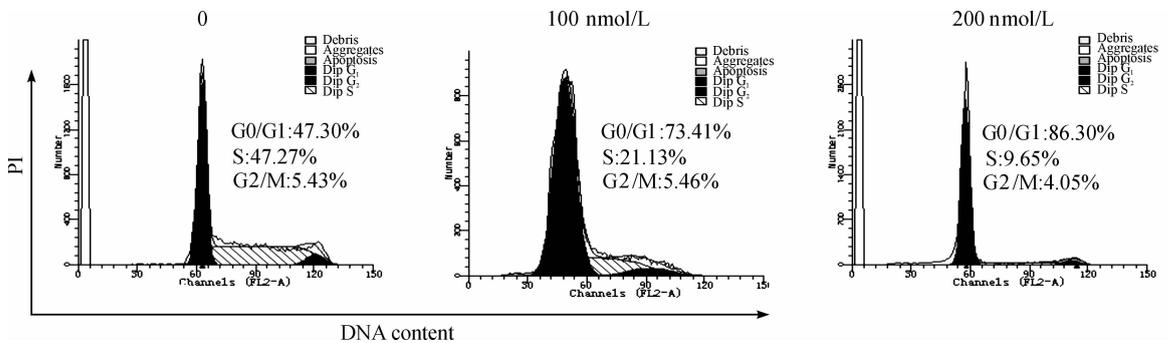


图 4 不同剂量 BIIB021 对 Molt-4 细胞周期的影响

2.4 Western blotting 检测细胞凋亡及细胞周期相关蛋白的变化

分别用 50 ~ 400 nmol/L 的 BIIB021 作用 Molt-4 细胞 24 h 后,提取总蛋白,Western blotting 检测细胞周期及凋亡相关蛋白表达水平的变化。结

果显示,BIIB021 能激活 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 和 PRAP,呈剂量依赖性(图 5)。此外,BIIB021 能显著下调 CDK4 和 CDK6 的表达量,上调 p18、p21 的表达量,均呈剂量依赖性,而对 Cyclin D3 没有明显影响(图 6)。

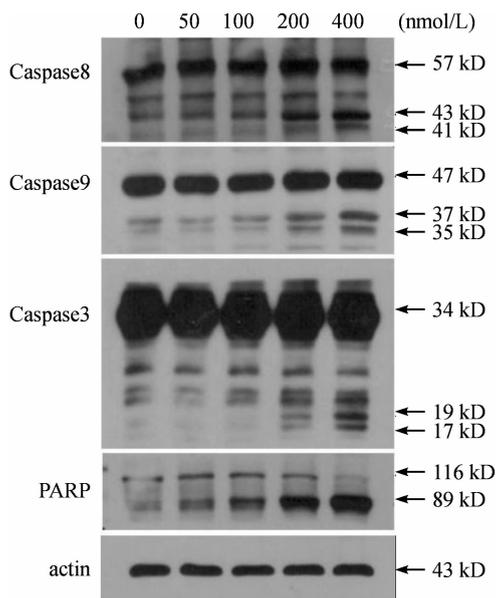


图5 BIIB021对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

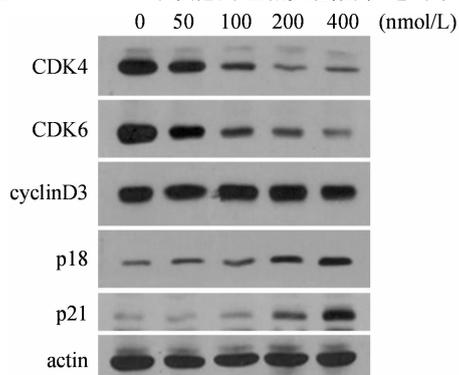


图6 BIIB021对细胞周期G0/G1期相关蛋白表达的影响

2.5 BIIB021抑制Hsp90伴侣蛋白Akt及下游NF- κ B的表达

用50~400 nmol/L的BIIB021作用Molt-4细胞24 h后,提取总蛋白,Western blotting检测Akt和p65蛋白的表达。结果显示,BIIB021显著抑制磷酸化Akt(p-Akt)表达,对总Akt的表达也有抑制作用。此外,BIIB021也抑制p65蛋白表达(图7)。

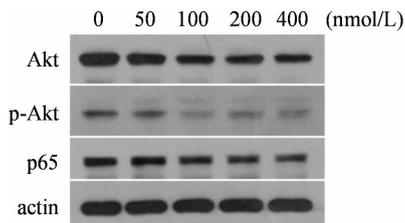


图7 BIIB021对Akt和p65蛋白表达的影响

3 讨论

目前,Hsp90抑制剂有很多种,按来源可分为天然类和人工合成类^[9],天然类抑制剂如17-AAG

等在临床试验中发现具有稳定性差、分子量大、生物利用度低等缺陷(<http://www.clinicaltrials.gov/>)。BIIB021是第一个进入临床试验的人工合成的小分子Hsp90抑制剂,目前正在进行晚期实体瘤、淋巴瘤、慢性B淋巴细胞白血病的I期临床和乳腺癌、胃肠道间质细胞瘤的II期临床研究(<http://www.clinicaltrials.gov/>)。本实验首次报道了BIIB021对T-ALL细胞株Molt-4的生长有显著抑制作用,且呈时间-剂量依赖性,其48 h的IC₅₀为384.6 nmol/L,与Kurashina R等^[10]报道的17-AAG相似(300~700 nmol/L)。笔者还发现,BIIB021作用于Molt-4细胞后,使得细胞阻滞于G₀/G₁期,并且诱导细胞凋亡,提示BIIB021在治疗T-ALL中具有潜在的应用价值。

目前研究表明,Hsp90抑制剂可通过Apaf-1和p-Akt影响caspase-9的激活,诱导细胞凋亡^[11]。本研究结果显示,BIIB021作用于Molt-4细胞后,Caspase-9、-3和PARP激活,与文献报道一致。笔者还发现BIIB021作用后Caspase-8也呈剂量依赖性活化,提示BIIB021作用于Molt-4还可激活外源性细胞凋亡途径,但其详细机制尚不清楚。细胞周期蛋白激酶CDK4/6是Hsp90的伴侣蛋白之一,Hsp90抑制剂能抑制CDK4/6,阻止癌细胞进入细胞周期^[12],本研究中BIIB021抑制CDK4/6表达,导致Molt-4细胞G₀/G₁期捕获。p21和p18分别是CDK2和CDK4/6的上游途径,起着负调控作用,BIIB021以浓度依赖性方式上调p21和p18,可能是抑制淋巴细胞肿瘤CDK4/6的机制之一。BIIB021显著抑制Molt-4细胞中的Akt蛋白表达,同时对Akt下游NF- κ B途径中的p65蛋白表达也有抑制作用。Akt和p65活化在肿瘤细胞耐凋亡中起重要作用,是T-ALL的特征之一^[1],为靶向治疗T-ALL提供新方法。

综上所述,本实验证明,BIIB021以时间和剂量依赖性方式抑制T-ALL细胞株Molt-4细胞生长,使细胞捕获于G₀/G₁期,并能诱导细胞凋亡,其作用机制与多个促凋亡和抗凋亡信号途径有关,提示其在T-ALL治疗中有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Zhao W L. Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways[J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 13-21.
- [2] Li Y, Zhang T, Schwartz S J, et al. New developments

- in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics; mechanisms, clinical perspective and more potential[J]. *Drug Resist Updat*, 2009, 12(1/2): 17-27.
- [3] Workman P, Burrows F, Neckers L, et al. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1113(1): 202-216.
- [4] Zhang D, Xu L, Cao F, et al. Celastrol regulates multiple nuclear transcription factors belonging to Hsp90's clients in a dose-and cell type-dependent way[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15(6): 939-946.
- [5] Klein H O, Demir G. "Multi-enzyme-targeted" immunotherapy: a salvage therapy protocol[J]. *Anti-cancer Res*, 1999, 19(4C): 3451-3458.
- [6] Lundgren K, Zhang H, Brekken J, et al. BIIB021, an orally available, fully synthetic small-molecule inhibitor of the heat shock protein Hsp90[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(4): 921-929.
- [7] Yin X, Zhang H, Lundgren K, et al. BIIB021, a novel Hsp90 inhibitor, sensitizes head and neck squamous cell carcinoma to radiotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1216-1225.
- [8] Böll B, Eltaib F, Reiners K S, et al. Heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 (CNF2024) depletes NF- κ B and sensitizes hodgkin's lymphoma cells for natural killer cell-mediated cytotoxicity[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5108-5116.
- [9] Taldone T, Sun W, Chiosis G. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(6): 2225-2235.
- [10] Kurashina R, Ohyashiki J H, Kobayashi C, et al. Anti-proliferative activity of heat shock protein (Hsp)90 inhibitors via beta-catenin/TCF7L2 pathway in adult T cell leukemia cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 284(1): 62-70.
- [11] Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1): 15-27.
- [12] Xu W, Neckers L. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1625-1629.

Effects of Hsp90 Inhibitor BIIB021 on Apoptosis and Cell Cycle in Human T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia Cell Line Molt-4

LI Min¹, CAO Hui¹, QIAN Web-bin^{1,2}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Abstract: In order to observe the effects of Hsp90 inhibitor BIIB021 on the proliferation, cell cycle and apoptosis in human T-cell acute lymphocytic leukemia cell line Molt-4, and to investigate its mechanisms, MTT assay is used to evaluate cell growth inhibition, the morphological changes are observed using Hoechst33258 staining, apoptosis and cell cycle are detected by flow cytometry analysis, the expression of proteins which are associated with apoptosis and cell cycle are examined by western blotting. The results show that BIIB021 can significantly inhibit growth of Molt-4 cells in a time-and concentration-dependent manner, with IC₅₀ values of 384.6 nmol/L for 48h and 301.8 nmol/L for 72 h; apoptotic bodies are observed by Hoechst33258 staining, with the increase of drug concentration, the number of apoptotic bodies increases gradually; flow cytometry analysis also shows continual increase of apoptotic rate as drug dose rises, when the dose is added to 400nmol/L, cell apoptotic rate is 34.4%; besides, BIIB021 causes the cell cycle arrest in G₀/G₁ phase; western blotting shows an activation of Caspase-8, -9, -3, and PRAP, and down-regulation of CDK4/6, p-Akt and p65 proteins and up-regulation of p21 and p18 are also observed in Molt-4 cells after treatment with BIIB021. So, the authors conclude that BIIB021 activates both death receptor pathway and mitochondrial pathway to induce apoptosis of human T-cell acute lymphocytic leukemia cell line Molt-4, inhibits cell growth, and results in arrest of G₀/G₁ phase via inhibiting CDK4/6 and up-regulation of p21, and p18; also, it decreases the expression level of Akt and p65.

Key words: Hsp90 inhibitor; BIIB021; T-cell acute lymphocytic leukemia; apoptosis; cell cycle

(责任编辑: 许惠儿)