

蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导 KG-1 细胞凋亡的机制研究

陈 磊, 范 丽, 李 新, 谢国良, 何国清, 路巧然, 吴欣欣, 李恭楚

(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)

摘 要: 研究蛋白酶体抑制剂 MG132 对人急性髓性白血病细胞株 KG-1 的致凋亡作用及其对细胞内信号传导因子 NF- κ B 与凋亡蛋白 PARP 表达的影响。采用 CCK-8 法检测 MG132 对 KG-1 细胞增殖的抑制作用; 利用 Hoechst33342 染色法, 从形态学上观察凋亡的 KG-1 细胞; Western blot 检测 NF- κ B 活性及与凋亡相关的蛋白变化情况。CCK-8 法检测结果表明, MG132 能明显抑制 KG-1 细胞生长, 并呈现时间依赖性和浓度依赖性; Hoechst 染色和 Western blot 检测实验证明, MG132 诱导 KG-1 细胞发生凋亡的同时, NF- κ B 活性明显降低, 细胞凋亡蛋白 PARP 降解为 P89 蛋白。以上结果显示, MG132 能诱导 KG-1 细胞凋亡, 其机制可能与 MG132 抑制 NF- κ B 信号转导通路, 下调 NF- κ B 表达继而增加凋亡蛋白 PARP 剪切有关。

关键词: 蛋白酶体抑制剂; KG-1 细胞; 细胞凋亡; NF- κ B; PARP

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A

0 引 言

近年来, 已有越来越多的临床和实验研究资料显示, 白血病患者体内存在着一群比例极少的白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs)^[1], 它们在启动白血病发生和发展过程中起着决定性的作用, 被认为是白血病耐药和复发的主要根源, 目前认为只有清除 LSC 才有可能根治白血病。KG-1 细胞是人急性髓性白血病(AML)细胞株, 在急性髓系白血病和白血病干、祖细胞(CD34⁺、CD38⁻、CD123⁺)中都可以检测到激活的 NF- κ B, 并且大多数以 P50 与 P65 异源二聚体的形式存在。白血病细胞内被激活的 NF- κ B 转位于核内, 与 DNA 结合后改变多种目的基因的表达, 保护白血病细胞对抗由促凋亡基因表达引起的凋亡, 并提高白血病细胞对放、化疗的抵抗作用^[2]。

泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP)是生物界普遍存在的蛋白质降解途径。该途径降解细胞内异常蛋白的基本过程是泛素蛋白对异常蛋白进行标记, 蛋白酶体识别标记有泛素蛋白的异常蛋白, 对其进行靶向降解。UPP 是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径^[3]。MG132(Z-Leu-Leu-Leu-CHO)是一种常见的肽醛类的蛋白酶体抑制剂, 它能够进入细胞中可逆性地抑制蛋白酶体的糜蛋白酶样活力, 从而抑制泛素-蛋白酶体通路所介导蛋白质的降解, 进而影响细胞周期进程和诱导细胞凋亡。目前, 许多文献报道 MG132 能够诱导多种肿瘤细胞发生凋亡, 是一种潜在的抗肿瘤药物。

大量实验研究表明, 蛋白酶体抑制剂可有效诱导白血病细胞凋亡^[4], 但研究其致白血病细胞凋亡的具体机制尚少见报道。本研究旨在研究不同剂量蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导 KG-1 细胞凋亡的过程中, NF- κ B 活性的变化、细胞凋亡蛋白 PARP 剪切水平, 初步探讨 MG132 抑制 KG-1 细胞生长的作用机制, 为蛋白酶体

抑制剂应用于白血病患者治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

MG132(Z-Leu-Leu-Leu-al,美国 Sigma 公司);KG-1 细胞(由浙江大学血液所钱文斌教授惠赠);RPMI-1640 培养基,FBS(Gibco 公司);Cell Counting Kit-8,NF- κ B p65 Rabbit Antibody,Beta-Actin Rabbit Antibody,RIPA Lysis Buffer,PMSF(碧云天公司);PARP Rabbit Antibody (Santa Cruz); Donkey anti-Rabbit (LICOR);Hoechst33342(KeyGen 公司);BCA Protein Assay Kit(Thermo 公司)。

高速冷冻离心机(Hitachi 公司);纯水系统(Millipore 公司);倒置荧光显微镜(Olympus 公司);酶标仪(TECAN 公司);红外激光成像系统(LICOR 公司);二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞存活率

收集对数生长期的 KG-1 细胞悬浮于无血清 PRMI 1640 培养基,计数后,按照 2×10^4 cells/well 植入 96 孔培养板,加入不同浓度梯度的 MG132(1、1.5、2 μ M/L),20%FBS RPMI-1640 培养基 100 μ L/well,另设 PRMI 1640 培养基加 CCK-8 溶液作为空白对照孔,细胞加 CCK-8 溶液作为对照孔,每个浓度设 6 个复孔。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养条件下培养 36、46、60、94 h 后,倒置显微镜下观察,同时每孔加入 10 μ L CCK-8,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 90 min,在酶标仪上测定 A_{450} ,并据此绘制细胞存活率曲线。每组实验重复 3 次。

1.2.2 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡

收集对数生长期的 KG-1 细胞按 2×10^6 cells/well 植入 6 孔培养板,20%FBS RPMI-1640 培养基 2.2 mL/well,加药组加入 1.5、2 μ M/L MG132,对照组加等量的 PBS,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 46 h 后,每孔加入 1 mg/mL 的 Hoechst 33342 染料 5 μ L,继续在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min,置于荧光倒置显微镜下观察细胞核的变化并拍照。

1.2.3 Western blot 检测 NF- κ B 活性抑制及凋亡相关蛋白的变化

收集对数生长期的 KG-1 细胞按 2×10^6 cells/well 植入 6 孔培养板,20% FBS RPMI-1640 培养基 2.2 mL/well,加药组加入 1.5 μ M/L MG132,对照组加等量的 PBS,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 46 h 后,离心收集细胞,PBS 洗 1 次,每孔加入 80 μ L 蛋白裂解液(990 μ L 蛋白裂解液+10 μ L PMSF),冰上静置 10 min,12 000 r/min (10 min),收集上清,采用 Pierce[®] BCA Protein Assay Kit 进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳,蛋白样品中加入 5 $\times$ Loading Buffer,煮沸,每孔加入等量蛋白样品,电泳结束后按湿转法将电泳产物转印到 NC 膜上,5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 或者过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加一抗(1:1 000 稀释),室温孵育 3 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加荧光二抗(1:15 000 稀释),室温 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,红外激光成像系统进行蛋白分析。

1.2.4 统计学处理

统计学软件采用 Excel2003,所有定量实验均重复 3 次,各组数据以“均值 $\pm$ 标准差”表示。组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 代表差别显著。

2 结 果

2.1 MG132 抑制 KG-1 细胞的增殖

以 1、1.5、2 μ M/L 浓度的 MG132 作用于 KG-1 细胞后,分别在 36、46、60、94 h 后用 CCK-8 法检测细胞存活率,结果显示,不同浓度的 MG132 作用不同时间后,能明显抑制 KG-1 细胞生长,并呈现时间依赖性和浓度依赖性。CCK-8 细胞存活率=(加药组-空白组)/(对照组-空白组) $\times$ %。通过 Sigmaplot 绘图软件分析(图 1),改良寇式

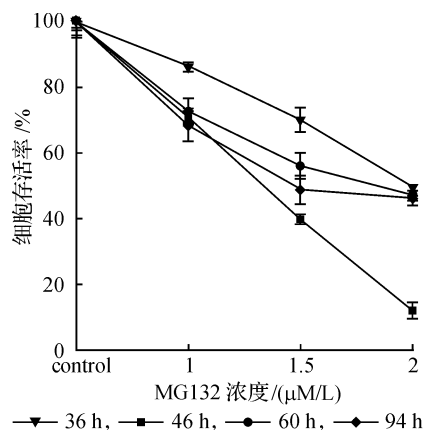


图 1 CCK-8 法检测细胞存活率

法计算 IC₅₀,MG132 作用KG-1细胞 36、46、60、94h,IC₅₀ 值分别为 1.80、1.36、1.63、1.57 μ M。上述结果表明,当 MG132 浓度达到 1.5 μ M/L,处理 46 h 后,能够有效地抑制 KG-1 细胞的增殖(图 2)。

2.2 MG132 可以有效诱导 KG-1 细胞凋亡

分别以 1.5、2 μ M/L 的 MG132 作用 KG-1 细胞 46 h 后,通过 Hoechst 染色,荧光显微镜下观察细胞凋亡效应。对照组染色质均匀,无浓缩现象,细胞核染色均一,无明显亮蓝色,而 MG132 处理组部分细胞体积变小,细胞核染色质致密固缩,聚集于细胞核边缘,可见境界分明的块状或新月形小体,并有核碎裂出现凋亡小体,这表明有明显的凋亡现象发生,且加大 MG132 浓度,凋亡作用增加(图 3)。

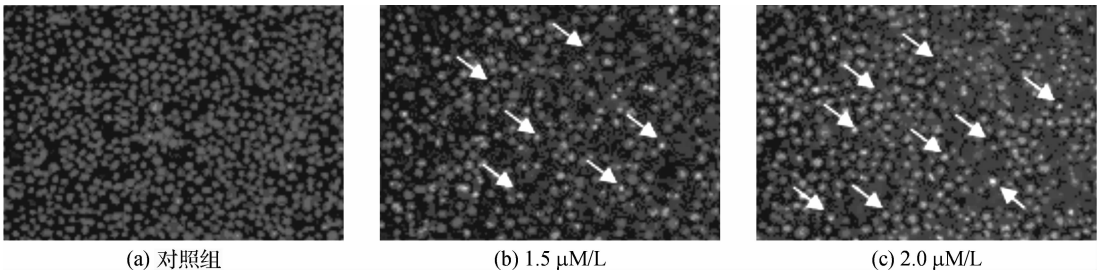


图 3 分别以 1.5 μ M/L 和 2 μ M/L 的 MG132 作用 KG-1 细胞 46 h 后,Hoechst 33342 染色(200 $\times$)

2.3 Western blot 检测 NF- κ B 活性抑制及其分子机制

为了进一步探讨 KG-1 细胞经 MG132 处理后发生凋亡及其机制,采用 Western blot 方法检测 NF- κ B 活性及 PARP 的剪切。核转录因子 NF- κ B 在多种白血病细胞中处于激活状态,由于激活状态的 NF- κ B 具有抗凋亡、促进肿瘤细胞增殖的作用。当 1.5 μ M/L MG132 作用于 KG-1 细胞 46 h 后,细胞出现明显凋亡,且 NF- κ B 活性明显降低(图 4),同时 PARP 降解为 P89 蛋白(图 5)。PARP 剪切被认为是细胞凋亡的一个重要指标,也通常被认为是 Caspase-3 激活的指标,这两个分子的剪接活化都可以作为凋亡过程发生的指示蛋白分子。这表明 MG132 能够诱导 KG-1 细胞发生凋亡,其机制可能与 MG132 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。

3 讨 论

UPP 是降解细胞生命活动中产生的异常蛋白的重要代谢途径,参与调节细胞周期进程、细胞分化、信号传导、应激反应和细胞凋亡等细胞过程。2004 年的诺贝尔化学奖颁给了发现该途径的科学家。蛋白酶体抑制剂包括醛基肽、硼酸肽、3,4-氯异香豆素、乳胞素几类。MG132 是一种有效、可逆的醛基肽类特异性蛋白酶体抑制剂,能阻止蛋白酶体对泛素结合蛋白的降解、抑制蛋白酶体的糜凝乳蛋白酶活性,从而阻断 UPP。近年的研究表明,MG132 能有效地抑制大肠癌、白血病细胞的生长,并能诱导这些肿瘤细胞凋亡^[5-7]。

大量研究证明^[8-11],在很多肿瘤细胞株中和某些人类肿瘤中均存在 NF- κ B 的异常活化,后者与肿瘤发生、生长、播散和放化疗抵抗密切相关。核因子- κ B(NF- κ B)是细胞内信号传导因子,在白血病细胞的增殖及

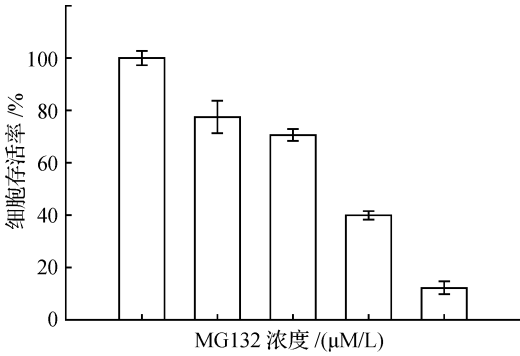


图 2 多个浓度梯度的 MG132 作用 KG-1 细胞 46 h 后,CCK-8 法检测细胞存活率

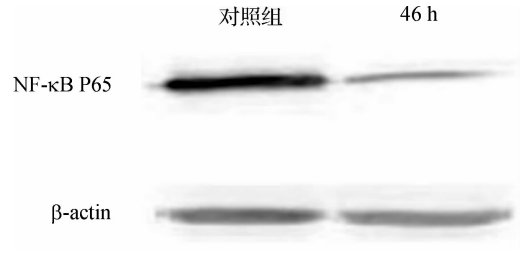


图 4 1.5 μ M/L MG132 作用 KG-1 细胞 46 h 后,Western blot 检测 NF- κ B 表达

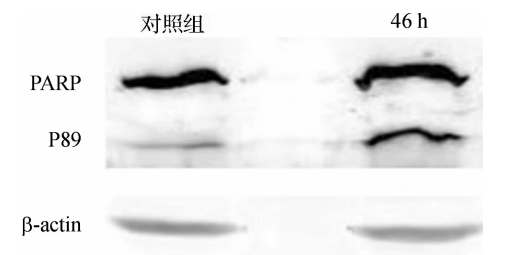


图 5 1.5 μ M/L MG132 作用 KG-1 细胞 46 h 后,Western blot 检测 PARP 的剪切水平

分化中起重要作用^[12]。蛋白酶体抑制剂 MG132 能穿透细胞膜进入细胞,通过抑制 26S 蛋白酶体的活性进而抑制 I κ B 的磷酸化降解从而阻止 NF- κ B 的释放。它以剂量依赖性的方式抑制 NF- κ B 的活化,从而抑制由 NF- κ B 所启动的基因转录,使细胞的生长受到抑制,最终诱导细胞发生凋亡。

NF- κ B 对细胞凋亡的影响。NF- κ B 可调控 Bcl-2 同系物 A1/Bfl-1, IEX-1L, c-IAP1, c-IAP2, TRAF1, TRAF2 和 Mn-SOD。Bcl-2 蛋白家族成员分为促凋亡(Bax, Bak, Bad, Bid 等)和抗凋亡(Bcl-2, Bcl-X1, A1/Bfl-1 等)两类,其中 Bcl-X1 和 A1/Bfl-1 这两种抗凋亡成员由 NF- κ B 调控^[13]。最近研究揭示, NF- κ B 介导的细胞生存与 c-Jun N 末端激酶(JNK)有关。JNKs 是进化保守的丝裂原活化蛋白激酶家族成员,并且参与到被环境刺激或 TNF α 刺激引起的细胞死亡途径。在 NF- κ B 活化中发现两种抑制 JNK 的蛋白,一种是 gadd45b/myd118 蛋白,它的转录被 NF- κ B 的激活而增强,可以降低由 TNF α 受体介导的 JNK 信号途径的活化^[14];另一种蛋白是 NF- κ B 介导的 x 染色体连锁的凋亡抑制因子,它在 TNF α 的刺激下产生,并依赖 NF- κ B 而阻断 JNK 的激活^[15]。

本实验研究表明, MG132 可以诱导 KG-1 细胞凋亡和生长抑制,其机制可能是通过下调 NF- κ B 的表达来实现的,从而引起细胞凋亡蛋白 PARP 的剪切,并表现出对药物浓度的依赖性。研究证实,白血病细胞表达高活性的 NF- κ B, NF- κ B 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^[16]。相反,抑制 NF- κ B 活性,则能诱导细胞凋亡、抑制肿瘤的生长。当然,在 MG132 诱导 KG-1 细胞凋亡的过程中,各种机制都是相互影响和互为因果的,决不能单一地认为是某一种机制的作用。相信随着对 MG132 研究更进一步的深入,人们将会对 MG132 诱导白血病细胞凋亡的机制有一个更加清楚和全面的认识。

参考文献:

- [1] Bonnet D, Dick J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nature Medicine*, 1997, 3: 730-737.
- [2] Woon S, Zwain S, Schooltink M. NF-kappa B activation in vivo in both host and tumour cells by the antivascular agent 5, 6-dimethylxanthene-4-acetic acid (DMXAA)[J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(8): 1176-1183.
- [3] Guo F, Qu S, Sun W, et al. Mechanism involved in the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by proteasome inhibitor MG132[J]. *Journal of Jilin University: Medicine Edition*, 2006, 7(3): 224-230.
- [4] An W, Hwang S, Trepel J, et al. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition[J]. *Leukemia*, 2000, 14: 1276-1283.
- [5] Yan X, Yang D, Gao X, et al. Caspase-8 dependent osteosarcoma cell apoptosis induced by proteasome inhibitor MG132[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(10): 1136-1143.
- [6] Lee C, Han E, Ha Y, et al. Differential effect of calmodulin antagonists on MG132 induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells[J]. *Brain Res Bull*, 2005, 67(3): 225-234.
- [7] Bang J H, Han E, Lim L, et al. Differential response of MG132 cytotoxicity against small cell lung cancer cells to changes in cellular GSH contents[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(4): 659-666.
- [8] Kim S, Koh S, Kim T. Induction of human leukemia HL-60 cell differentiation via a PKC/ERK pathway by helenalin, a pseudoguaienolide sesquiterpene lactone[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 5: 1189-1197.
- [9] Cuzman M, Neering S, Upchurch D, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells[J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2301-2307.
- [10] Thomas R, Reed D, Olf J, et al. Part I. Hodgkin's lymphoma: molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells[J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5: 11-18.
- [11] Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, et al. Transcription factor NF- κ B is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2000, 14: 399-402.
- [12] Bortol R, Tazzari P, Cappellini A, et al. Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF-kappaB activation and cFLIP(L) up-regulation[J]. *Leukemia*, 2003, 17(2): 379-389.
- [13] Viatour P, Bentires-Alj M, Chariot A, et al. NF-kappaB2/p100 induces Bcl-2 expression[J]. *Leukemia*, 2003, 17(7): 1349-1356.

- [14] De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling[J]. Nature, 2001, 414: 308-313.
- [15] Tang G, Minemoto Y, Dibling B, et al. Inhibition of JNK activation through NF-kB target genes[J]. Nature, 2001, 414: 313-317.
- [16] Karin M, Cao Y, Greten F, et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit[J]. Nat Rev Can, 2002, 2(4): 301-310.

Study on the Mechanism of Apoptosis by Proteasome Inhibitor MG132 in Acute Myeloid Leukemia Cell Line KG-1

CHEN Lei, FAN Li, LI Xin, XIE Guo-liang, HE Guo-qing, LU Qiao-ran, WU Xin-xin, LI Gong-chu

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,

Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The study is aimed to explore the apoptosis effect of proteasome inhibitor MG132 on human acute myeloid leukemia(AML) cell line KG-1 and the expression of nuclear factor-kappa B(NF- κ B) and the apoptotic signaling pathway protein. CCK-8 assay tests the growth inhibition effect of MG132 on KG-1 cell; the apoptosis of KG-1 cells induced by MG132 is observed through Hoechst 33342 staining under fluorescent microscope; the NF- κ B activity and the expression of apoptotic signaling pathway protein are found by Western blot analysis. CCK-8 assay shows that the growth of KG-1 cell was inhibited by MG132 and presented double manners of concentration and time dependence; the Hoechst 33342 staining and Western blot analysis indicated that the activity of NF- κ B is decreased by MG132 on KG-1 cell, and the apoptotic signaling pathway protein PARP is cleaved to a 89KD protein. All the results confirmed that MG132 can obviously inhibit the growth of KG-1 cells, and the possible mechanism was that the apoptotic signaling pathway of NF- κ B is inhibited by MG132 and the low expression of NF- κ B in turn increasing the apoptotic protein PARP cleavage.

Key words: proteasome inhibitor; KG-1 cell; apoptosis; NF- κ B; PARP

(责任编辑: 许惠儿)