

蛋白酶体抑制剂MG132通过FOXO3a/Puma通路对急性T淋巴 巴细胞白血病细胞增殖凋亡的影响

张祖涵¹, 林文浩², 刘小俭¹, 梁 聪¹, 罗学群¹, 黄礼彬¹

(1. 中山大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510000; 2. 广州市妇女儿童医疗中心儿科, 广东 广州 510000)

摘要:【目的】研究蛋白酶体抑制剂MG132对急性T淋巴母细胞白血病(T-ALL)细胞株的作用及其机制。【方法】将不同浓度的MG132作用于T-ALL细胞株CCRF-CEM, MTS技术检测细胞增殖、流式细胞技术检测细胞凋亡。用qRT-PCR、Western blotting分别从RNA及蛋白水平检测FOXO3a及其下游Puma的表达。利用慢病毒干扰技术构建FOXO3a-shRNA稳定细胞株, 再次验证MG132对其作用。【结果】MG132对CCRF-CEM细胞起抑制增殖、促进凋亡作用, 而对健康人外周血单个核细胞增殖抑制作用较弱。MG132作用于CCRF-CEM细胞后: FOXO3a的mRNA表达水平无明显改变, Puma的mRNA表达明显上升; 细胞中FOXO3a及Puma蛋白表达量增加; 其中胞核中FOXO3a蛋白表达量上升明显, 胞浆中亦略有上升。FOXO3a shRNA干扰后: CCRF-CEM细胞的FOXO3a及Puma蛋白表达均下降; MG132的细胞增殖抑制作用减弱。【结论】MG132能够抑制T-ALL细胞株CCRF-CEM增殖, 诱导其凋亡, 其机制与抑制泛素-蛋白酶体对FOXO3a的降解、使FOXO3a胞核内含量增加、并激活下游基因Puma相关。

关键词:蛋白酶体抑制剂; MG132; 急性T淋巴母细胞白血病; FOXO3a; Puma; 凋亡

中图分类号: R725.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)02-0237-06

Proteasome Inhibitor MG132 Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Apoptosis in Acute T Lymphoblastic Leukemia Cell Via FOXO3a/Puma Pathway

ZHANG Zu-han¹, LIN Wen-hao², LIU Xiao-jian¹, LIANG Cong¹, LUO Xue-qun¹, HUANG Li-bin¹

(1. Department of Pediatric, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China; 2. Guangzhou Women And Children's Medical Center, Guangzhou 510000, China)

Corresponding to: HUANG Li-bin, E-mail: lizihuang2000@163.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effect and the possible mechanism of the proteasome inhibitor MG132 on acute T lymphoblastic leukemia cells. 【Methods】 The influence of different concentrations of MG132 in the viability and proliferation of CCRF-CEM was measured by MTS. Apoptosis rates of CCRF-CEM treated by MG132 were determined by flow cytometry. After being exposed to MG132, the protein levels of FOXO3a in cytoplasm and nucleus were analyzed by Western blotting. qRT-PCR was applied to detect the mRNA of FOXO3a and Puma in cells treated by MG132. Then CCRF-CEM was stably transfected with antisense FOXO3a using Lentivirus infection. We further investigated the effects of MG132 in FOXO3a-shRNA cells and elucidated the mechanisms of FOXO3a and Puma. 【Results】 MG132 inhibits the proliferation of CCRF-CEM, but has no cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Cellular apoptosis was induced in cells treated with MG132. At mRNA level, MG132 had no influence on FOXO3a, but increased the expression of Puma. However, MG132 promoted the expression of both FOXO3a and Puma at protein level. Interestingly, the expression of FOXO3a increased very little in cytoplasm. In FOXO3a-shRNA cells the expression of FOXO3a and Puma decreased at protein level. FOXO3a's knockdown attenuated the proliferation inhibition mediated by MG132. 【Conclusion】 MG132 inhibits the proliferation and promotes to apoptosis of CCRF-CEM. One of the mechanism is that MG132 inhib-

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81600112); 广东省自然科学基金(S2013010015359)

作者简介: 张祖涵, 硕士研究生, 研究方向: 儿童血液与肿瘤, E-mail: 122534138@qq.com; 黄礼彬, 通信作者, 博士研究生, 主治医师, 硕士生导师, 研究方向: 儿童血液与肿瘤, E-mail: lizihuang2000@163.com

its the degradation of FOXO3a, and then activates FOXO3a/Puma pathway.

Key words: proteasome inhibitor; MG132; acute T lymphoblastic leukemia; FOXO3a; puma; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2016, 37(2): 237-242]

儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是儿童期最常见的恶性肿瘤,其中急性T淋巴细胞白血病(T cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)约占15%~20%^[1-2]。尽管现代医疗技术已使儿童ALL的5年总生存率达到90%左右^[3],但T-ALL因复发率高等问题是导致儿童ALL预后不良的重要因素^[4-5]。因此,有必要研究针对T-ALL研究新的治疗策略,寻找新的治疗靶点。本研究团队前期研究发现:在复发的儿童ALL,叉头转录调节因子3(forkhead transcription factors of the O class 3, FOXO3a)呈低表达^[6]。已有研究报导转录因子FOXO3a是FOXO亚家族的一员,可激活下游包括Puma在内的靶基因起抑癌作用^[7-9]。因此我们推测FOXO3a在儿童ALL发挥重要抑癌作用。FOXO3a蛋白从细胞核进入细胞浆,即失去转录活性,进而通过泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP)进行降解^[10]。MG132是一种26S蛋白酶体抑制剂,能抑制UPP介导的蛋白质降解,已有研究表明其在体外对多种肿瘤细胞有促凋亡作用^[11],具有较好的应用前景。因此我们猜想,MG132是否可以通过FOXO3a/Puma信号通路对复发率较高的T-ALL起抑癌作用,目前尚无相关研究。本研究以T-ALL最常用细胞系CCRF-CEM为模型,探讨MG132对T-ALL细胞的作用,以及是否通过FOXO3a/Puma信号通路的激活而实现,以期对T-ALL治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

儿童T-ALL细胞系CCRF-CEM购买于美国细胞保藏中心(ATCC)。人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)提取于健康自愿献血者外周静脉血。用含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养液于含体积分数5%的CO₂ 37℃培养箱中培养。MG132(购自英国Abcam公司)溶于DMSO(dimethyl sulfoxide, 二甲

基亚砷,购自美国Sigma公司),DMSO在培养基的终浓度小于0.1%(体积百分比浓度)。FOXO3a抗体购自英国Abcam公司,Puma抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,GAPDH抗体购自美国Sigma公司。MTS液:购买于Promega公司。Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自南京凯基。流式细胞仪(Cytomics FC500)购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞活性检测 采用MTS法检测细胞活性。将细胞按 1×10^4 个/孔接种至96孔板,并加入不同浓度MG132处理细胞。孵育24 h后,按照操作说明进行MTS检测细胞活性。

1.2.2 凋亡检测 采用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒进行凋亡检测。取对数生长期的细胞,稀释成细胞浓度为 1×10^8 个/L的细胞悬液,接种于6孔板内,予不同浓度的MG132处理。加药后继续培养24 h,收集细胞离心(离心机半径4 cm, 2000 r/min, 5 min),冷PBS洗涤细胞2次,加入binding buffer重悬细胞。先后加入Annexin V-FITC和PI各5 μL混匀染色。室温避光孵育10 min。随即进行流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.3 RNA的提取 qRT-PCR将细胞裂解于Trizol试剂,用氯仿分离出RNA,无水乙醇洗涤多次。cDNA的合成采用Promega RR047A试剂盒。实时定量PCR以cDNA为模版,同时扩增GAPDH和目的基因。所用引物:GAPDH forward:GCCA ACACAGTGCTGTCTGG; reverse: GCTCAGGAGGA GCAATGATCTTG; FOXO3a forward: GCAAGCACA GAGTTGGATGA; reverse: CAGGTCGTCCATGAGG TTTT; Puma forward: GGACGACCTCAACGCACAG T; reverse: AATTGGGCTCCATCTCGGGG。反应条件为95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s,重复40次。溶解曲线单一。

1.2.4 Western blot 不同浓度的MG132处理细胞24 h之后,收集、洗涤、裂解细胞。提取细胞总蛋白,或核蛋白及胞浆蛋白,并定量,变性后十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后

转移到硝酸纤维素膜(NC)上,一抗4℃过夜孵育印迹,采用增强型化学发光法(ECL)检测辣根过氧化物酶(HRP)耦联的抗体免疫反应从而确定目标蛋白的表达强弱,GAPDH作为内参确定总蛋白及胞浆蛋白上样,H3作为内参确定核蛋白上样。

1.2.5 慢病毒感染 FOXO3a的shRNA表达质粒购买于Clontech公司。慢病毒包装质粒PLP1、PLP2、PLP/VSVG购于Invitrogen公司。以含10%血清的培养基调整包装病毒用293FT细胞的密度为 5×10^5 ,接种于100 mm培养皿,24 h后将DNA混合液滴入培养皿,36 h后收获病毒。在CCRF-CEM对数生长状态时,按 2.0×10^5 cell/孔接种24孔板,将慢病毒液加入孔板,在培养箱中孵育。24 h后用嘌呤霉素筛选阳性细胞。

1.3 统计学分析

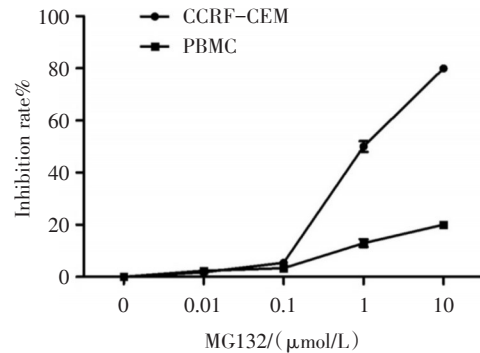
实验数据均来自于3次或3次以上结果相似的独立实验,采用SPSS20.0软件。采用直方图和Kolmogorov-Smirnov 检验正态性。两独立样本的比较,用 t 检验。多个样本均数的比较用方差分析,若方差不齐则用秩和检验。多样本均数两两比较用Bonferroni法。定义 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MG132抑制CCRF-CEM细胞的增殖

为明确MG132对T-ALL的治疗作用,本实验采用MTS法检测其对CCRF-CEM细胞增殖的影响,以健康人外周血单个核细胞为对照。我们将不同浓度梯度MG132(0、0.001、0.01、0.1、1及10 $\mu\text{mol/L}$)作用于CCRF-CEM细胞24h后,检测CCRF-CEM细胞增殖受抑制的情况。结果显示MG132对人T-ALL细胞株CCRF-CEM有明显的增殖抑制作用,而且随着MG132浓度的增加,增殖抑制作用更明显。析因设计方差分析结果显示,不同细胞与MG132浓度两种因素间交互作用、主效应均有统计学意义(P 均 < 0.001)。MG132浓度为0.1时,PBMC组和CCRF-CEM组抑制率分别为3.4%(95% CI: 1.2%~5.6%)和5.4%(95% CI: 3.3%~7.6%),差异无统计学意义。MG132浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 时,PBMC组和CCRF-CEM组抑制率分别为13.0%(95% CI: 10.8%~15.2%)

和50.0%(95% CI: 7.9%~52.2%),差异有统计学意义。如图1,当MG132浓度大于1 $\mu\text{mol/L}$ 时,



CCRF-CEM cells were treated with different concentrations of MG132 and cell proliferation was detected by MTS test after 24 h. According to factorial design variance analysis, $F(\text{cell} \times \text{concentration}) = 347.21$, $F(\text{cell}) = 885.56$, $F(\text{concentration}) = 899.20$, $P < 0.001$.

图1 MG132浓度依赖性抑制CCRF-CEM细胞的增殖
Fig.1 MG132 could effectively inhibit the proliferation of CCRF-CEM cells in different concentrations

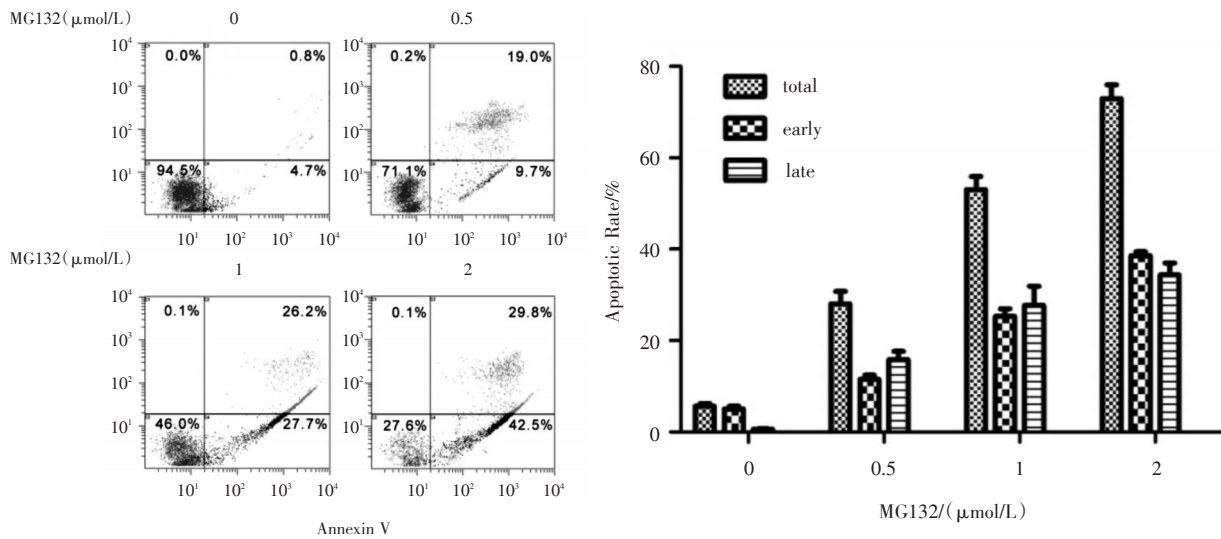
MG132对CCRF-CEM细胞增殖抑制作用明显,而对健康人外周血单个核细胞的生长抑制较弱。说明MG132可选择性作用于肿瘤细胞,用于临床治疗较安全。

2.2 MG132促进CCRF-CEM细胞凋亡

根据细胞增殖实验,当MG132浓度小于0.1时,其对白血病细胞的抑制作用较弱,且浓度越大,对正常人外周血单个核细胞影响越大,因此我们选择MG132浓度为0、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 作用于CCRF-CEM细胞,24h后经流式细胞仪检测凋亡率,进一步了解MG132对T-ALL细胞的作用。发现MG132明显促进CCRF-CEM细胞凋亡,并且随着浓度的增加作用更明显。实验结果均重复三次, $n = 3$ 。以总凋亡率为例,根据单因素的方差分析,不同浓度MG132致CCRF-CEM细胞凋亡率不全相同,差异有统计学意义($F = 134.982$, $P < 0.001$),Bonferroni法两两比较显示差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),如图2。表明随着药物浓度增加,促凋亡作用越明显。

2.3 MG132处理CCRF-CEM细胞后FOXO3a及Puma mRNA的变化

为了研究FOXO3a信号通路的变化,将CCRF-CEM细胞以MG132 0、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ 处理24 h,提



CCRF-CEM cells were treated with 0, 0.5, 1, 2 μmol/L MG132 for 24 h, then cell apoptosis was analyzed by Annexin V/PI staining.

图2 MG132促进CCRF-CEM细胞凋亡

Fig.2 MG132 promotes apoptosis of CCRF-CEM

RNA 做 qRT-PCR, 实验结果均重复 3 次, $n = 3$ 。发现: FOXO3a mRNA 的相对表达无明显上升, 根据 3 组定量资料的秩和检验, $H = 0.368, P = 0.832$, 表明 MG132 对 FOXO3a mRNA 的表达无影响, 如图 3A。Puma mRNA 的表达则明显上升, 根据 3 组定量资料的秩和检验, MG132 使 Puma mRNA 的表达升高, 差异有统计学意义 ($H = 7.448, P = 0.024$), 如图 3B。因此我们可以提出假说: MG132 对 FOXO3a 的生成无影响, 但促进 FOXO3a 的下游靶基因表达, 可能是通过减少 FOXO3a 的降解而发挥作用。

2.4 MG132对CCRF-CEM细胞FOXO3a、Puma蛋白表达的影响

为了进一步验证以上假说, 继续以 MG132 0、0.5、1 μmol/L 处理 CCRF-CEM 细胞 24 h, 提蛋白做 western blot, 观察蛋白水平的变化。用药后, FOXO3a 及 Puma 蛋白表达量均上升, 如图 4A。实验结果均重复 3 次, $n = 3$ 。根据 3 组定量资料的秩和检验, CCRF-CEM 细胞用 MG132 后, FOXO3a 蛋白水平上升, 差异有统计学意义 ($H = 6.713, P = 0.035$)。结合 FOXO3a mRNA 水平无变化, MG132 使细胞内 FOXO3a 蛋白量增加, 是通过抑制其蛋白降解起作用。Puma 蛋白水平上升, 差异有统计学意义 ($H = 7.448, P = 0.024$)。FOXO3a 在细胞核内发挥作用, 因此我们分别提取胞核内、胞浆蛋白, 发现 FOXO3a 核内及胞浆蛋白 FOXO3a 表

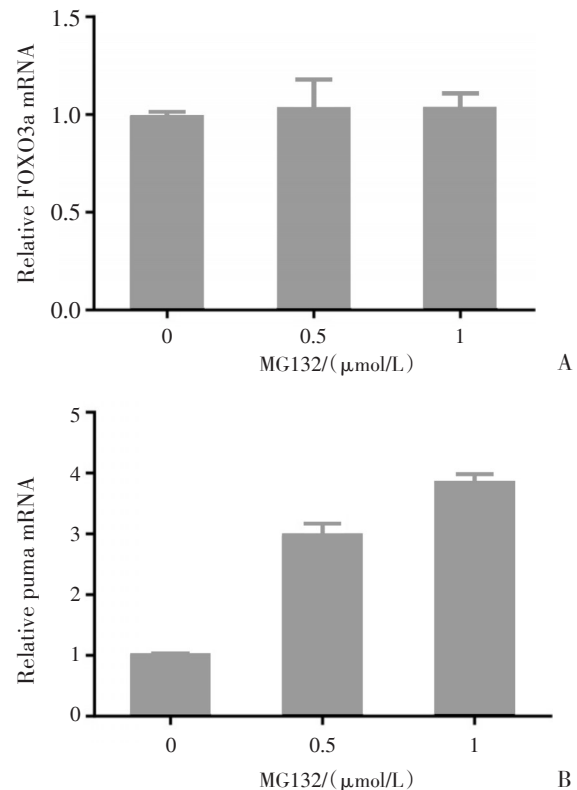
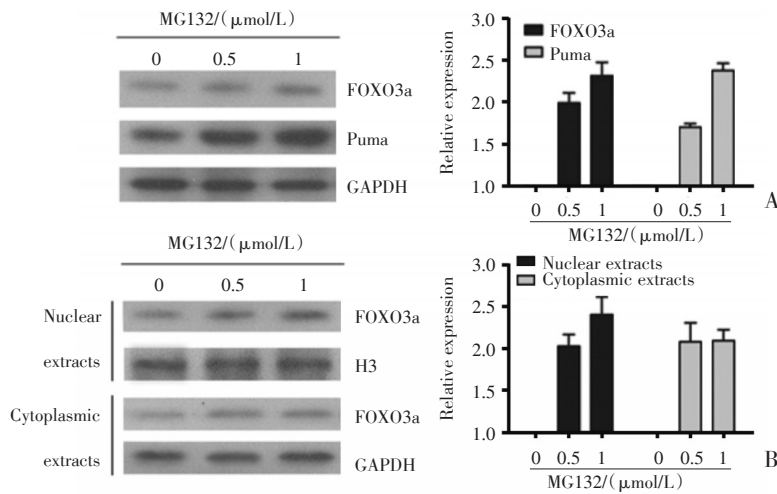


图3 MG132对ALL细胞株FOXO3a及Puma mRNA相对表达的影响

Fig.3 MG132 had an influence on FOXO3a/Puma pathway in mRNA level

达均上升, 当 MG132 浓度为 1 μmol/L 时, 核内升高更明显, 如图 4B。



Cells were exposed to MG132. A: Total proteins were detected; B: Cytoplasm and nucleus extracts were prepared separately.

图4 MG132对ALL细胞株中FOXO3a、Puma蛋白表达的影响
Fig.4 MG132 had an influence on FOXO3a/Puma pathway in protein level

2.5 敲低FOXO3a后,FOXO3a及Puma的表达减低

用慢病毒构建FOXO3a敲低的稳定细胞株,与对照株相比,干扰株FOXO3a及Puma蛋白的表达均明显下降,如图5。实验结果均重复3次, $n = 3$ 。根据两独立样本的 t 检验,FOXO3a的蛋白水平下降,差异有统计学意义($t = 19.042, P < 0.001$)。Puma的蛋白水平下降有统计学差异($t = 12.347, P < 0.001$)。FOXO3a-shRNA稳定细胞株构建成功。

2.6 FOXO3a敲低的细胞对MG132敏感性下降

为进一步明确MG132作用于细胞后,FOXO3a信号通路所发挥的作用,予MG132 0、0.2、0.4、0.8及1.6 μmol/L处理FOXO3a敲低的细胞株,24 h后MTS试验发现,与对照株相比,MG132对干扰株的细胞增殖活性的抑制相对减弱,即对MG132的敏感性下降。析因设计方差分析结果显示,不同株别与MG132浓度间交互作用、主效应均有统计学意义(P 均 < 0.001)。MG132浓度为0.2 μmol/L时,对照株和干扰株抑制率分别为6.1%(95% CI: 3.8%~8.4%)和4.4%(95% CI: 2.1%~6.7%),差异均无统计学意义。MG132浓度为0.4 μmol/L时,对照株和干扰株抑制率分别为21.4%(95% CI: 19.1%~

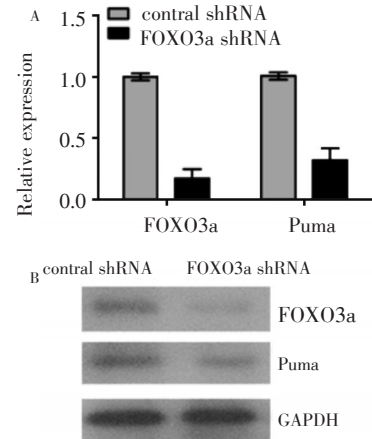
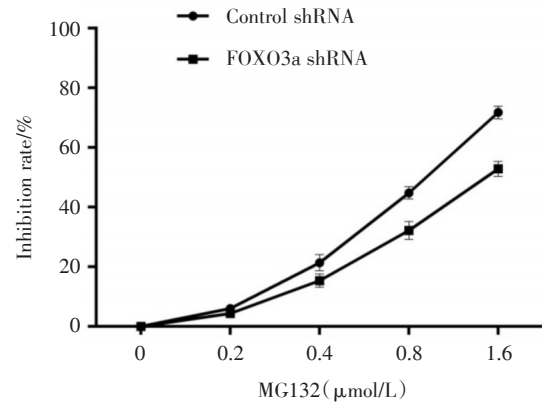


图5 ALL细胞株在FOXO3a shRNA干扰后FOXO3a及Puma蛋白表达情况
Fig.5 The expression of FOXO3a and Puma in FOXO3a after the reaction with shRNA in ALL cell line

23.7%) 和 15.4%(95% CI: 13.1%~17.7%), 差异有统计学意义(图6)。



Cells were treated with different concentrations of MG132 and cell proliferation was detected by MTS test after 24 h. According to factorial design variance analysis, $F(\text{cell} \times \text{concentration}) = 25.393$, $F(\text{cell}) = 126.27$, $F(\text{concentration}) = 1085.21$, $P < 0.001$.

图6 MG132对FOXO3a敲低的细胞抑制效果不如对照组
Fig.6 FOXO3a's knockdown attenuated the proliferation inhibition mediated by MG132

3 讨论

本研究通过细胞功能实验阐明,蛋白酶体抑制剂MG132对T-ALL细胞株CCRF-CEM起抑制增殖

及促凋亡作用,对健康人外周血单个核细胞抑制作用较弱。这说明MG132可特异地作用于ALL细胞,对正常细胞毒性较弱。这可能是由于肿瘤细胞依赖于蛋白酶体的程度要高于正常细胞,因蛋白酶体可使参与调节细胞周期和凋亡的蛋白发生异常表达^[12]。因此MG132有望成为新型抗白血病药物。本研究发现,MG132作用于CCRF-CEM细胞后,FOXO3a核内蛋白及下游Puma表达均升高;CCRF-CEM细胞在FOXO3a shRNA干扰后,抑制增殖作用减弱,可见对MG132的敏感性下降。说明FOXO3a在MG132诱导ALL细胞凋亡的过程中起重要作用。MG132作用于CCRF-CEM细胞后,FOXO3a蛋白表达增加以核内为主,而mRNA相对表达量无明显改变,说明MG132作用ALL细胞后,胞内FOXO3a蛋白的增加主要是由于MG132使其降解减少,而非FOXO3a mRNA表达的增加。因此,尽管没有做UPP相应的产物检测,本研究结果可以推断:MG132通过抑制FOXO3a的UPP降解途径,提高ALL细胞株内FOXO3a浓度,从而起到抑制肿瘤细胞增殖、促进其凋亡的作用。

Puma是促凋亡基因,能促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长。有研究报导Puma为FOXO3a下游靶基因,发挥抑癌作用^[7-8]。本研究发现,在CCRF-CEM细胞中,MG132减少FOXO3a的降解使其在胞内表达增加,从而激活下游Puma而发挥作用。MG132作用后,细胞中FOXO3a下游Puma mRNA及蛋白表达量均上升,而FOXO3a shRNA干扰后,FOXO3a及Puma蛋白表达均下降。上述结果说明,在ALL细胞中,MG132促凋亡作用与FOXO3a/Puma通路相关。

但是,本研究也存在一些不足,如未检测FOXO3a的上游包括Akt、ERK等磷酸化信号,对下游靶基因也未进行深入研究,后续将完善上述研究,以期进一步阐明分子机制。

综上所述,本课题发现了蛋白酶体抑制剂MG132通过FOXO3a/Puma通路诱导CCRF-CEM细胞凋亡中的生物学作用,主要是通过抑制FOXO3a降解,激活Puma发挥促凋亡作用。本研究为T-ALL的治疗提供有效靶标和理论依据。

参考文献:

[1] Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373

- (16): 1541-1552.
- [2] Lo NL. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2013, 35(4): 245-252.
- [3] Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(14): 1663-1669.
- [4] Stary J, Zimmermann M, Campbell M, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002 [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(3): 174-184.
- [5] Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study [J]. *Blood*, 2011, 118(8): 2077-2084.
- [6] Han BW, Feng DD, Li ZG, et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(24): 4903-4915.
- [7] Zhang Y, Liu X, Wang J, et al. Inhibition of AKT/FoxO3a signaling induced PUMA expression in response to p53-independent cytotoxic effects of H1: A derivative of tetrandrine [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(6): 965-975.
- [8] Dey P, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta upregulates FOXO3a and causes induction of apoptosis through PUMA in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33(33): 4213-4225.
- [9] You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, et al. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1657-1663.
- [10] Huang H, Tindall DJ. Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(11): 1961-1964.
- [11] Wu WK, Cho CH, Lee CW, et al. Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 15-22.
- [12] Magill L, Lynas J, Morris TC, et al. Proteasome proteolytic activity in hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia and multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2004, 89(12): 1428-1433.

(编辑 孙慧兰)