

尼洛替尼以 PU. 1 非依赖性调节 K562 细胞活性*

李有强^{1,2}, 曾建明^{1△}, 姚子涛³, 肖倩¹, 王丽娜¹, 李沫¹ (1. 广东省中医院检验科, 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广州 510405; 3. 广东医学院检验学院, 广东东莞 523808)

【摘要】 目的 研究尼洛替尼对 K562 细胞活性和转录因子 PU. 1 的影响。**方法** 以不同浓度的尼洛替尼分别处理 K562 细胞 48 h 后, 采用 CCK-8 法观察 K562 细胞增殖活性的变化; 采用 Western blot 法检测 PU. 1 的表达情况。**结果** CCK-8 法显示细胞存活率随尼洛替尼浓度的升高而下降, 尼洛替尼对 K562 细胞株的半数抑制量 (IC₅₀) 为 51.9 nmol/L; Western blot 法显示尼洛替尼处理后 PU. 1 的蛋白表达水平未见明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** 尼洛替尼可抑制 K562 细胞活性, 但其作用方式非依赖于 PU. 1。

【关键词】 尼洛替尼; K562 细胞; Bcr-Abl; PU. 1

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.06.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)06-0745-02

Nilotinib for regulating K562 cell viability in PU. 1-independent manner* LI You-qiang^{1,2}, ZENG Jian-ming^{1△}, YAO Zi-tao³, XIAO Qian¹, WANG Li-na¹, LI Mo¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 3. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of nilotinib on the viability and transcription factor PU. 1 in K562 cells. **Methods** K562 cells were treated with different concentrations of nilotinib for 48 h; the CCK-8 method was adopted to observe the change of K562 cells proliferation viability; the expression of PU. 1 was determined by using Western Blot. **Results** The CCK-8 method showed that the survival rate of K562 cells was decreased with the nilotinib concentration increase. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of nilotinib to K562 cells was 51.9 nmol/L; the Western blot test indicated that the expression of PU. 1 in K562 cells had no significant difference after nilotinib treatment ($P > 0.05$). **Conclusion** Nilotinib could inhibit the viability of K562 cells in a PU. 1-independent manner.

【Key words】 Nilotinib; K562 cells; Bcr-Abl; PU. 1

尼洛替尼是人工合成的新型酪氨酸激酶抑制剂 (TKI), 可竞争结合断裂点簇集区-艾贝尔逊白血病病毒 (Bcr-Abl) 融合蛋白三磷酸腺苷 (ATP) 结合位点, 抑制 Bcr-Abl 蛋白的酪氨酸激酶活性, 阻断下游多条信号传导通路, 达到有效治疗慢性粒细胞白血病 (CML) 的目的^[1]。但由于信号传导通路的复杂性, 尼洛替尼通过 Bcr-Abl 调节下游信号通路的机制尚未完全明确。PU. 1 蛋白是调控粒系分化的转录因子, 不仅在造血干细胞向髓系分化的早期过程中起作用, 还与细胞增殖活性有关。有研究表明, Bcr-Abl 在 mRNA 翻译水平通过多聚胞嘧啶结合蛋白 E2 (hnRNP E2) 抑制转录因子 C/EBP α 的表达^[2], 而 PU. 1 与 C/EBP α 有协同作用, 可共同调节粒细胞分化增殖^[3]。因此, 本研究拟探讨尼洛替尼作用于 K562 细胞株后对 PU. 1 的影响, 进一步探索尼洛替尼治疗 CML 的分子机制。

1 资料与方法

1.1 细胞株来源 K562 细胞株由南方医科大学附属珠江医院血液病实验室提供。

1.2 仪器与试剂 尼洛替尼由诺华制药公司提供。CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; 细胞裂解液 RIPA 和电化学发光 (ECL) 显影试剂购自美国 Pierce 公司; 丙烯酰胺和双丙烯酰胺均购自美国 Sigma 公司。二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒购自上海百赛生物技术有限公司; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 和磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自上海生工; 蛋白 Marker 购自北京赛百盛公司。PU. 1 单克隆抗体和 β -actin 单克隆抗体均购自美国 CST 公司。

1.3 方法

1.3.1 K562 细胞株的培养 将复苏后的 K562 细胞株在含有终浓度为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 3~4 天换液传代, 细胞接种密度为每毫升 1×10^5 个。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞增殖 将对数生长期的 0.5×10^4 K562 细胞接种于 96 孔板 (每孔总体积为 200 μ L), 加入不同终浓度的尼洛替尼 (0~100 nmol/L) 作用 48 h, 相同体积的二甲基亚砜 (DMSO) 为阴性对照组, 空白组为不含细胞和尼洛替尼, 每组设 5 个复孔。37 ℃、5% CO₂、饱和湿度下共计培养 48 h 后, 取出 96 孔板, 每孔加 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 培养箱中继续培养 4 h 后, 酶标仪下测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度值 (A₄₅₀ 值)。按公式计算存活率: 存活率 (%) = (A 实验组 - A 空白组) / (A 对照组 - A 空白组) $\times 100\%$; 根据公式计算半数抑制量 (IC₅₀): $IC_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\Sigma P - 0.5)]^{[4]}$ 。X_m 为设计的最大浓度的对数值, i 为各浓度倍比浓度的对数值, ΣP 为各组生长抑制率之和, 0.5 为经验常数。

1.3.3 Western blot 检测 PU. 1 的蛋白表达 用 RIPA 细胞裂解液裂解待测细胞, 提取总蛋白质, 用 BCA 法测蛋白含量。等量蛋白质采用 SDA-PAGE 垂直电泳进行分离, 然后转至 PVDF 膜上, 用封闭液 [含 5% 牛血清蛋白 (BSA) 的磷酸盐吐温缓冲液 (PBST)] 4 ℃ 下封闭 1 h 后, 加入 PU. 1 单克隆抗体 (1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜, 室温下洗膜后加相应辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联羊抗兔二抗 (1:4 000) 室温孵育 1 h, ECL 显

* 基金项目: 广东省自然科学基金 (S2012010008916)。

作者简介: 李有强, 男, 硕士, 主管技师, 主要从事临床生化和临床血液检验。△ 通讯作者, E-mail: labo9@126.com。

影。以 β -actin 作为内参对照。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理和统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

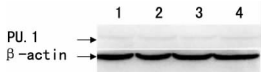
2.1 K562 细胞增殖活性 比较各处理组细胞增殖抑制率,CCK8 法检测结果显示尼洛替尼对 K562 细胞增殖有明显的抑制作用,随尼洛替尼浓度的增加,K562 细胞增殖明显下降。尼洛替尼对 K562 细胞株的 IC50 为 51.9 nmol/L。见表 1。

表 1 不同浓度尼洛替尼对 K562 细胞增殖活性的影响

组别	A450 值($\bar{x} \pm s$)	存活率(%)	χ^2	P
阴性对照组(DMSO)	2.58 $\pm$ 0.14	100.00	—	—
处理组(nmol/L)				
0.0	2.56 $\pm$ 0.16	99.42	0.03	>0.05
5.0	2.36 $\pm$ 0.08	91.82	0.43	>0.05
10.0	2.51 $\pm$ 0.15	97.48	0.13	>0.05
15.0	2.45 $\pm$ 0.23	95.21	0.25	>0.05
20.0	2.55 $\pm$ 0.04	99.17	0.04	>0.05
25.0	2.49 $\pm$ 0.06	96.72	0.17	>0.05
30.0	2.49 $\pm$ 0.08	96.70	0.17	>0.05
35.0	2.56 $\pm$ 0.15	99.26	0.04	>0.05
40.0	2.19 $\pm$ 0.09	84.89	0.82	>0.05
45.0	2.12 $\pm$ 0.15	82.33	0.97	>0.05
51.9	1.44 $\pm$ 0.08	55.92	2.83	<0.05
55.0	0.48 $\pm$ 0.03	18.54	6.87	<0.05
60.0	0.41 $\pm$ 0.01	15.81	7.27	<0.05
100.0	0.40 $\pm$ 0.05	15.53	7.31	<0.05

注: χ^2 、P 分别表示各处理组与阴性对照组比较的统计量;—表示无数据。

2.2 Western blot 检测 PU.1 蛋白表达结果 不同浓度的尼洛替尼(40.0、45.0、51.9 nmol/L)作用于 K562 细胞 48 h 后 PU.1 的蛋白表达量与尼洛替尼处理后比较未见明显差异,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。



注:1~3 号泳道分别为 40.0、45.0、51.9 nmol/L 尼洛替尼;4 号泳道为 DMSO 对照组。

图 1 尼洛替尼对 PU.1 蛋白表达的影响

3 讨 论

分子靶向药物尼洛替尼能够特异性地竞争抑制 Bcr-Abl 酪氨酸激酶活性,且具有较高的反应率和良好的耐受性,已成为 CML 的一线治疗方案。相对于第 1 代酪氨酸激酶抑制剂,第 2 代尼洛替尼具有选择性更强、耐药率更低的优势^[1]。同时,由于酪氨酸激酶能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,进而启动下游不同的信号转导分子。因此,寻找 Bcr-Abl 的下游作用蛋白,对进一步阐明尼洛替尼治疗 CML 的分子机制具有重要意义。然而,本实验发现采用不同浓度的尼洛替尼处理 K562 细胞后,与 K562 细胞增殖和分化密切相关的转录因子 PU.1 的表达量并未出现明显差异,表明尼洛替尼对 K562 细胞的调节作用非依赖于 PU.1。

PU.1 是 Ets 转录因子家族的成员之一,其具有的“螺旋-转角-螺旋”结构的 DNA 结合区能识别 1 个富含嘌呤 GGAA/T(PU box)基因序列的核心 DNA 元件,并与之结合,故名 PU.1^[5]。PU.1 不仅在造血干细胞向髓系分化的早期过程中起作用,还在后续的髓细胞和 B 淋巴细胞的增殖分化中发挥

作用。PU.1 通过与造血相关基因启动子上的 PU.1 位点特异性结合,调节靶基因转录表达,如巨细胞集落刺激因子受体(M-CSFR)、粒细胞集落刺激因子受体(G-CSFR)、CD11b、粒细胞过氧化物酶、白细胞介素-7(IL-7)、IL-18 和环氧化酶 2(COX2)等。同时,CML 转归与 PU.1 基因功能的恢复有关,PU.1 基因功能恢复是 CML 治疗好转的一个重要指标^[6-8]。

目前,有研究表明 PU.1 与转录因子 C/EBP α 存在协同作用,可共同调节粒细胞分化^[3],而且 Bcr-Abl 可通过 hnRNP E2 抑制 C/EBP α 的表达^[2]。另外,在髓系细胞分化过程中,PU.1 的发挥作用比 C/EBP α 更早,且在干扰素- α (IFN- α)或 STI571 治疗好转的 CML 患者身上发现 PU.1 表达上调^[9]。另有研究表明,降低小鼠 PU.1 基因的表达能够导致小鼠白血病的发生。因此本研究探讨了在 K562 细胞株中,Bcr-Abl 抑制剂尼洛替尼是否对 PU.1 的表达有调节作用。在本实验中,通过 CCK-8 法探索尼洛替尼对 K562 细胞株增殖活性的影响,发现随着药物浓度的升高,细胞存活率下降,说明尼洛替尼作用于 K562 细胞后细胞增殖活性发生改变,可促进细胞的死亡。另外,Western blot 检测显示尼洛替尼不影响 K562 细胞中 PU.1 的表达,表明尼洛替尼未通过 Bcr-Abl 调节 PU.1 的表达,证实转录因子 PU.1 并不是 Bcr-Abl 的作用底物。

本实验阐明尼洛替尼可明显影响 K562 细胞株的活性,但其作用方式并不依赖于转录因子 PU.1,对进一步探索 Bcr-Abl 下游相关分子具有一定的借鉴作用。

参考文献

[1] Weisberg E, Manley P, Mestan J, et al. AMN107 (Nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL[J]. Br J Cancer, 2006, 94(12): 1765-1769.

[2] Ferrari-Amorotti G, Keeshan K, Zattoni M, et al. Leukemogenesis induced by wild-type and STI571-resistant BCR/ABL is potently suppressed by C/EBP α [J]. Blood, 2006, 108(4): 1353-1362.

[3] Dahl R, Walsh JC, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1/C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor[J]. Nat Immunol, 2003, 4(10): 1029-1036.

[4] 赵荣荣, 赵瑶, 张仕状. 肿瘤细胞状态对检测壁虎活性单体 IC50 的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2012, 34(1): 18-20.

[5] Moreau-Gachelin F. Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1198(2-3): 149-163.

[6] Ito T, Nishiyama C, Nakano N, et al. Roles of PU.1 in monocyte and mast cell-specific gene regulation: PU.1 transactivates CIITA pIV in cooperation with IFN- γ [J]. Int Immunol, 2009, 21(7): 803-816.

[7] Kueh HY, Champhekar A, Nutt SL, et al. Positive feedback between PU.1 and the cell cycle controls myeloid differentiation[J]. Science, 2013, 341(6146): 670-673.

[8] Kastner P, Chan S. PU.1: a crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(1): 22-27.

[9] Albajar M, Gutierrez P, Richard C, et al. PU.1 expression is restored upon treatment of chronic myeloid leukemia patients[J]. Cancer Lett, 2008, 270(2): 328-336.