

蛋白酶在肿瘤中的作用研究专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.07.002

蛋白酶抑制剂 BMS-345541 和 MG-132 对人脑胶质瘤细胞 凋亡及活力的影响*

周保丹¹, 李 君², 高 飞¹, 乔卿均¹, 董 辉¹1. 河南省南阳市第二人民医院神经外科, 河南南阳 473000; 2. 南阳医学
高等专科学校第一附属医院神经内科, 河南南阳 473000

摘 要:目的 研究蛋白酶抑制剂 BMS-345541 和 MG-132 对人脑胶质瘤细胞凋亡及活力的影响。方法 将 15 株人脑胶质瘤细胞平均分为对照组、BMS-345541 组和 MG-132 组, 每组 5 株。对照组进行传代培养, BMS-345541 组加入 BMS-345541 进行传代培养, MG-132 组加入 MG-132 进行传代培养。采用 MTT 比色法检测细胞活力, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 采用荧光定量 PCR 法检测 GRP78 mRNA 相对表达量, 采用蛋白质免疫印迹法检测蛋白表达水平。结果 对照组、BMS-345541 组、MG-132 组细胞数量分别为 $(730\ 000 \pm 154)$ 、 $(257\ 000 \pm 256)$ 、 $(210\ 000 \pm 333)$ 个, BMS-345541 组和 MG-132 组的细胞数量明显少于对照组, 且 MG-132 组的细胞数量明显少于 BMS-345541 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); BMS-345541 组和 MG-132 组细胞活力明显低于对照组, 细胞凋亡率明显高于对照组, MG-132 组的细胞活力高于 BMS-345541 组, 细胞凋亡率低于 BMS-345541 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组、BMS-345541 组、MG-132 组的细胞 GRP78 mRNA 表达水平分别为 $(2.21 \pm 0.08)\%$ 、 $(15.98 \pm 1.58)\%$ 、 $(13.55 \pm 1.12)\%$, BMS-345541 组和 MG-132 组的细胞 GRP78 mRNA 表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); BMS-345541 组和 MG-132 组 GRP78、JNK1 蛋白表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 蛋白酶抑制剂 BMS-345541 和 MG-132 对人脑胶质瘤细胞的凋亡有诱导作用, 可增强患者疗效。

关键词: BMS-345541; MG-132; 人脑胶质瘤; 细胞凋亡; 细胞活力

中图分类号: R739.41

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)07-0868-04

Effects of protease inhibitors BMS-345541 and MG-132 on cell apoptosis and cell viability of human glioma*

ZHOU Baodan¹, LI Jun², GAO Fei¹, QIAO Qingjun¹, DONG Hui¹1. Department of Neurosurgery, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang,
Henan 473000, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital
of Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of protease inhibitors BMS-345541 and MG-132 on cell apoptosis and cell viability of human glioma. **Methods** A total of 15 strains of human glioma cells were divided into control group, BMS-345541 group and MG-132 group, 5 strains in each group. The control group was subcultured, BMS-345541 group was added with BMS-345541 and subcultured, MG-132 group was added with MG-132 and subcultured. MTT colorimetric assay was used to detect cell viability, cell apoptosis rate, fluorescence quantitative assay was used to detect GRP78 mRNA expression, western blotting was used to detect protein expression. **Results** The number of cells in the control group, BMS-345541 group and MG-132 group were $(730\ 000 \pm 154)$, $(257\ 000 \pm 256)$ and $(210\ 000 \pm 333)$ respectively, the number of cells in BMS-345541 group and MG-132 group were significantly lower than that in control group, the number of cells in MG-132 group was significantly lower than that in BMS-345541 group ($P < 0.05$). The cell viability of BMS-345541 group and MG-132 group were significantly lower than that of control group, but the cell apoptosis rate of MG-132 group were lower than that of control group ($P < 0.05$). The cell viability in MG-132 group was higher than that in BMS-345541 group, the cell apoptosis rate in MG-132 group was lower than that in BMS-

* 基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20191471)。

作者简介: 周保丹, 男, 主治医师, 主要从事神经外科相关疾病研究。

本文引用格式: 周保丹, 李君, 高飞, 等. 蛋白酶抑制剂 BMS-345541 和 MG-132 对人脑胶质瘤细胞凋亡及活力的影响[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(7): 868-870.

345541 group ($P < 0.05$). The expression of GRP78 mRNA in control group, BMS-345541 group and MG-132 group were $(2.21 \pm 0.08)\%$, $(15.98 \pm 1.58)\%$, $(13.55 \pm 1.12)\%$. The expression of GRP78 mRNA in BMS-345541 group and MG-132 group were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The relative expressions of GRP78 and JNK1 protein in BMS-345541 group and MG-132 group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The protease inhibitors BMS-345541 and MG-132 could induce the cell apoptosis of human glioma and enhance patients' efficacy.

Key words: BMS-345541; MG-132; human glioma; cell apoptosis; cell viability

胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤。目前,胶质瘤的病因并不十分明确,但可能与遗传因素、环境因素、电离辐射、病毒感染等有关^[1]。胶质瘤约占中枢神经系统原发性恶性肿瘤的 80%,基本上无法治愈^[2-3]。胶质瘤有很强的侵袭性和破坏性,复发率高,治疗方法有限^[4]。胶质瘤患者的治疗模式包括手术后联合放疗和化疗,尽管给予了积极治疗,但生存率还是很低,严重威胁了患者的生命^[5]。蛋白酶抑制剂可以抑制蛋白酶的活性,目前主要用于治疗艾滋病,它可以与病毒蛋白酶催化基因结合抑制酶活性,从而导致蛋白前体不能裂解及形成成熟病毒。蛋白酶抑制剂也可以治疗恶性肿瘤,它可以阻断癌细胞内蛋白酶分解蛋白的功效,让癌细胞内的蛋白不断积累,最后会引起恶性细胞死亡,尤其对于多发性骨髓瘤及胶质母细胞瘤效果较好。BMS-345541 和 MG-132 是两种不同的蛋白酶抑制剂,本研究主要探讨蛋白酶抑制剂 BMS-345541 和 MG-132 对人脑胶质瘤细胞凋亡及活力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质瘤细胞 15 株(SHG-44,中国科学院上海生物细胞生物研究所提供,批号:20190509),将 15 株人脑胶质瘤细胞分成 3 组,分别为对照组、BMS-345541 组和 MG-132 组,每组 5 株。

1.2 仪器与试剂 CO₂ 培养箱(Bio-Rad 公司,型号: BPN-150CH(UV));显微镜(上海光学仪器厂,型号: LJ-TS01);Trizol 试剂(美国 Thermo 公司,批号:20180421);BMS-345541 抑制剂(美国 SD 公司,批号:SH30022);MG-132 抑制剂(美国 SD 公司,批号:SH30256);胎牛血清(Gibco 公司)。

1.3 方法

1.3.1 SHG-44 细胞传代培养 将 SHG-44 细胞放入培养液中,在培养液中加入胎牛血清、青霉素和链霉素,最后将培养液放置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中。将对照组细胞进行传代培养;BMS-345541 组在细胞培养液中加入 BMS-345541 进行传代培养;MG-132 组在细胞培养液中加入 MG-132 进行传代培养。

1.3.2 测量细胞数量 取一定量的细胞悬浮液,将盖玻片安放在计数室上面,摇匀细胞悬浮液,转至高倍镜后,适当调节光度,使细胞和计数室线条均清晰,

然后将计数室一角的中格移至视野中,通常以计 5 个中格的细胞值来代表计数室中的细胞数量。计数时为了避免重复或遗漏,分布在各线上的细胞,一律以接触方格底线和右侧线上的细胞作为本格内的细胞数。

1.3.3 MTT 比色法检测各组细胞活力 吸取各组 SHG-44 细胞悬液(对数生长期,每孔 1×10^5 细胞)分别加入 96 孔板,BMS-345541 组加入蛋白酶抑制剂 BMS-345541, MG-132 组加入蛋白酶抑制剂 MG-132,然后每孔加入 10 μ L MTT 溶液,培养 4 h 后终止培养,加入二甲基亚砷(DMSO)充分振荡,溶解生成结晶紫,用酶标仪检测波长为 490 nm 处的吸光度值(A 值),最后计算 SHG-44 细胞的活力。

1.3.4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 采用 Annexin V-FITC/PI 双标记染色法,用胰酶消化贴壁细胞,先用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,再重悬成单细胞悬液,加入 Annexin V-FITC/PI 试剂及 Binding Buffer,轻轻混匀,在室温下避光反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.5 荧光定量 PCR 法检测 GRP78 mRNA 的相对表达量 将各组加入 Trizol 试剂提取总 RNA,分光光度计检测 GRP78 mRNA 水平及纯度, A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.1。最后计算 GRP78 mRNA 相对表达量。

1.3.6 蛋白质免疫印迹法检测蛋白表达水平 取样品蛋白质 30 μ g 用十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺(PAGE)电泳分离,将蛋白条带用半干电转膜仪转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,再用 5%的小牛血清蛋白封闭。最后置于图像分析系统行扫描及分析,计算蛋白表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理及统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组细胞数量比较 对照组、BMS-345541 组、MG-132 组细胞数量分别为 $(730\ 000 \pm 154)$ 、 $(257\ 000 \pm 256)$ 、 $(210\ 000 \pm 333)$ 个,BMS-345541 组和 MG-132 组的细胞数量明显少于对照组,且 MG-132 组的细胞数量明显少于 BMS-345541 组,差异有

统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 3 组细胞活力和细胞凋亡率比较 BMS-345541 组和 MG-132 组细胞活力明显低于对照组,细胞凋亡率明显高于对照组,MG-132 组的细胞活力高于 BMS-345541 组,细胞凋亡率低于 BMS-345541 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组细胞活力和细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	细胞活力	细胞凋亡率
对照组	5	81.23 $\pm$ 1.78	18.73 $\pm$ 2.56
BMS-345541 组	5	31.33 $\pm$ 0.12	68.67 $\pm$ 3.28
MG-132 组	5	39.58 $\pm$ 0.23	61.42 $\pm$ 0.58
<i>F</i>		3 328.099	619.939
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.3 3 组细胞 GRP78 mRNA 表达比较 对照组、BMS-345541 组、MG-132 组的细胞 GRP78 mRNA 表达水平分别为(2.21 $\pm$ 0.08)%、(15.98 $\pm$ 1.58)%、(13.55 $\pm$ 1.12)%,BMS-345541 组和 MG-132 组的细胞 GRP78 mRNA 表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 3 组细胞蛋白表达水平比较 BMS-345541 组和 MG-132 组 GRP78、JNK1 蛋白表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2 和图 1。

表 2 3 组细胞蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GRP78 蛋白	JNK1 蛋白
对照组	5	0.245 $\pm$ 0.019	0.169 $\pm$ 0.01
BMS-345541 组	5	1.824 $\pm$ 0.099	1.989 $\pm$ 0.088
MG-132 组	5	1.598 $\pm$ 0.094	1.756 $\pm$ 0.073
<i>F</i>		697.004	1 341.444
<i>P</i>		<0.001	<0.001

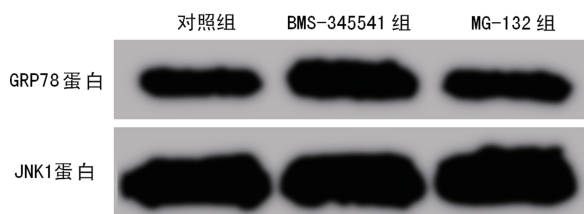


图 1 3 组细胞蛋白质电泳图

3 讨 论

胶质瘤细胞由正常细胞突变而来,并表现为生长失控,形成胶质瘤后会引发多种神经系统症状,主要表现为头痛、癫痫发作、喷射状呕吐、视物模糊、感觉丧失、乏力、口吐白沫、四肢抽搐等症状。胶质瘤若没有得到及时诊断和治疗,随病情进一步发展,可能出现颅内压升高、认知功能障碍等并发症^[6]。蛋白酶体

系是一种多价复合酶,具有催化活性,细胞依赖蛋白酶体系可清除不利于自身的异常蛋白,肿瘤细胞亦是如此,蛋白酶抑制剂可诱导肿瘤细胞凋亡,其在乳腺癌和前列腺癌中的作用已得到证实。

蛋白酶抑制剂 BMS-345541 是一种新型抑制剂,以剂量依赖性方式抑制 IKK-2 和 IKK-1。BMS-345541 在高达 100 μ mol/L 的浓度下不能抑制丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸激酶,且未能阻断茴香霉素刺激的 c-Jun 磷酸化和脂多糖(LPS)刺激的 THP-1 细胞中 MAPKAP K2 的激活,以及内皮生长因子(EGF)刺激的 H292 细胞中 STAT3 的磷酸化。BMS-345541 处理导致 SK-MEL-5、A375 和 Hs 294T 细胞中黑色素瘤细胞增殖的浓度依赖性抑制^[7]。TUNEL 染色和核浓缩技术显示 BMS-345541 具有细胞凋亡作用,此药物具有作为新型抗肿瘤药物的潜在价值^[8]。本研究结果显示,BMS-345541 组的人脑胶质瘤细胞数量少于对照组,细胞活力明显低于对照组,细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明蛋白酶抑制剂 BMS-345541 对人脑胶质瘤细胞具有抑制作用,可降低其细胞活力,这与以往的研究具有相同的结果。

MG-132 是一种可透过细胞的蛋白酶抑制剂,属于合成肽醛类抑制剂^[9],能够抑制不同类型蛋白酶的活性,包括丝氨酸蛋白酶、钙蛋白酶等。MG-132 和其他肽醛类抑制剂可以有效抑制蛋白酶体系多个肽酶的蛋白酶活性,并能抑制钙蛋白酶的活性。它通过 26S 复合物降低哺乳动物细胞和酵母可渗透菌株中泛素-共轭蛋白的降解,而不影响其 ATP 酶或肽酶活性。蛋白酶体系是细胞功能不可分割的一部分。MG-132 与其他蛋白酶抑制剂一样,对细胞和组织是有毒的,使用浓度过高或治疗时间过长会导致细胞死亡。可取的做法是选择稀释 $>1\ 000$ 倍的最适浓度。最适浓度不仅与细胞类型有关,也取决于细胞培养参数,如细胞饱和度、血清水平、培养基成分。MG-132 可用于诱导细胞凋亡和自噬的机制研究,它可以通过干扰肿瘤细胞的周期,阻止其无限增殖,尤其可以选择恶性程度高的肿瘤细胞首先发挥毒性作用。MG-132 是一种天然的蛋白酶抑制剂,目前的研究已经证明 MG-132 能够对肝癌细胞发挥毒性作用^[9]。本研究显示,MG-132 组的人脑胶质瘤细胞数量少于对照组,细胞活力明显低于对照组,细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明蛋白酶抑制剂 MG-132 对人脑胶质瘤细胞具有抑制作用,可降低其细胞活力。

综上所述,蛋白酶抑制剂 BMS-345541 和 MG-132 可以诱导人脑胶质瘤细胞的凋亡,可增强患者疗效。(下转第 875 页)

- 的关联性[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(1): 8-12.
- [7] MAKINO N, NAKAMURA Y, YASHIRO M, et al. Descriptive epidemiology of Kawasaki disease in Japan, 2011—2012: from the results of the 22nd nationwide survey[J]. J Epidemiol, 2015, 25(3): 239-245.
- [8] GALEOTTI C, KAVERI S V, CIMA Z R, et al. Predisposing factors, pathogenesis and therapeutic intervention of Kawasaki disease[J]. Drug Discov Today, 2016, 21(11): 1850-1857.
- [9] SHI R, LUO Y, LI S, et al. Single-nucleotide polymorphism rs17860041 A/C in the promoter of the PPIA gene is associated with susceptibility to kawasaki disease in Chinese children[J]. Immunol Invest, 2021, 50(2/3): 230-242.
- [10] GHIRLANDO R, FELSENFELD G. CTCF: making the right connections[J]. Genes Dev, 2016, 30(8): 881-891.
- [11] TANWAR V S, JOSE C C, CUDDAPAH S. Role of CTCF in DNA damage response[J]. Mutat Res, 2019, 780: 61-68.
- [12] NORA E P, GOLOBORODKO A, VALTON A L, et al. Targeted degradation of ctf decouples local insulation of chromosome domains from genomic compartmentalization[J]. Cell, 2017, 169(5): 930-944.
- [13] LAVARONE E, BARBIERI C M, PASINI D. Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity [J]. Nature Commun, 2019, 10(1): 1679.
- [14] XU B, FANG Z, HE S, et al. ANRIL polymorphism rs4977574 is associated with increased risk of coronary artery disease in Asian populations: a Meta-analysis of 12 005 subjects[J]. Medicine, 2018, 97(39): e12641.
- [15] HU L, SU G, WANG X. The roles of ANRIL polymorphisms in coronary artery disease: a Meta-analysis[J]. Biosci Rep, 2019, 39(12): BSR20181559.
- [16] WANG P, DONG P, YANG X. ANRIL rs2383207 polymorphism and coronary artery disease (CAD) risk: a Meta-analysis with observational studies[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016, 62(12): 6-10.
- [17] YANG J, GU L, GUO X, et al. LncRNA ANRIL expression and ANRIL gene polymorphisms contribute to the risk of ischemic stroke in the Chinese Han population [J]. Cel Mol Neurobio, 2018, 38(6): 1253-1269.
- [18] DENG Y, ZHOU L, LI N, et al. Impact of four lncRNA polymorphisms (rs2151280, rs7763881, rs1136410, and rs3787016) on glioma risk and prognosis: a case-control study[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(12): 2218-2229.
- [19] ZHU B, ZHU Y, TIAN J, et al. A functional variant rs1537373 in 9p21. 3 region is associated with pancreatic cancer risk[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(5): 760-766.
- [20] SONG C L, WANG J P, XUE X, et al. Effect of circular ANRIL on the inflammatory response of vascular endothelial cells in a rat model of coronary atherosclerosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(3): 1202-1212.
- [21] JARINOVA O, STEWART A F, ROBERTS R, et al. Functional analysis of the chromosome 9p21. 3 coronary artery disease risk locus [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(10): 1671-1677.

(收稿日期: 2021-08-10 修回日期: 2022-01-05)

(上接第 870 页)

参考文献

- [1] 张春丽, 张彩彩. 不同浓度七氟醚对人脑胶质瘤细胞 U251 替莫唑胺抵抗的影响及机制初探[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 659-663.
- [2] 高远, 龙妮娅, 出良钊, 等. 人脑胶质瘤细胞来源外泌体的提取鉴定及微环境中的摄取[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2021, 24(9): 737-742.
- [3] WANG H X. The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas[J]. Neoplasia, 2015, 17(3): 239-255.
- [4] 罗冬冬, 彭彪, 罗爱萍, 等. 干扰 MGMT 的人胶质瘤 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性变化[J]. 海南医学, 2018, 29(13): 1777-1779.
- [5] STOLL S J, PITT S C, CHEN H. Follicular thyroid cancer cell growth inhibition by proteasome inhibitor MG132 [J]. J Surg Res, 2009, 156(1): 39-44.
- [6] 王宇, 杨欣, 李晓冬, 等. 雌激素抑制内质网应激引起的血管内皮细胞凋亡及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(3): 217-223.
- [7] MILACIC V, CHEN D, RONCONI L, et al. A novel anti-cancer gold (Ⅲ) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts[J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10478-10486.
- [8] 王宇暄, 王燕, 苏文洲, 等. BMS-345541 对人骨肉瘤细胞 MG63 凋亡及其作用机制[J]. 解剖学研究, 2018, 40(2): 132-136.
- [9] 张新民, 李岳春, 陈鹏, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 对 VMC 小鼠氧化应激和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(9): 984-988.

(收稿日期: 2021-08-08 修回日期: 2021-12-15)