

· 原 著 ·

细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂诱导 HL-60 细胞凋亡及分子机制研究

韩艳霞^{1,2}, 尤良顺¹, 刘 辉¹, 毛莉萍¹, 叶琇锦¹, 钱文斌¹

1. 浙江大学医学院附属第一医院血液科, 浙江 杭州 310003

2. 嘉兴市第二医院血液科, 浙江 嘉兴 314000

[摘 要] 目的:探讨细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)抑制剂 SNS-032 诱导人急性髓系白血病 HL-60 细胞凋亡的效应及可能的机制。方法:以 CDK 抑制剂 SNS-032 作用于 HL-60 细胞株,实验细胞分为对照组、SNS-032 组、白细胞介素(IL)-6 组和 SNS-032 + IL-6 组。MTT 法检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡, microRNA 芯片技术分析细胞 microRNA 的表达谱差异,蛋白质印迹法检测 JAK/STAT3 相关信号通路蛋白的表达。结果:SNS-032 可降低细胞存活率,诱导 HL-60 细胞凋亡,对照组、100nmol/L 和 200nmol/L 的 SNS-032 干预组细胞凋亡率分别为 $(5.9 \pm 1.7)\%$ 、 $(12.1 \pm 3.1)\%$ 和 $(59.4 \pm 3.6)\%$ 。microRNA 芯片分析结果显示, SNS-032 显著下调 HL-60 细胞 miR-30a、miR-183、miR-20b、miR-26b、miR-20a、miR-589、miR-107、miR-181a、miR-106a、miR-17 和 miR-378c 的表达水平,显著上调 miR-320a 的表达水平。蛋白质印迹法显示 SNS-032 可抑制 STAT3 的磷酸化和 JAK2、MCL-1、C-MYC 蛋白的表达。作为 JAK/STAT3 通路的激活剂,IL-6 联合 SNS-032 不能逆转后者对 HL-60 细胞的杀伤作用($P > 0.05$),也不能逆转 SNS-032 对 JAK2 蛋白表达和磷酸化 STAT3 的抑制作用。结论:SNS-032 能显著诱导人急性髓系白血病 HL-60 细胞发生凋亡,其机制可能与抑制 JAK2 和 STAT3 磷酸化、抑制 MCL-1 和 C-MYC 及与之相关的 miR-17-92 基因簇表达水平有关。

[关键词] 白血病,髓样,急性;微 RNAs;细胞周期蛋白质依赖激酶类/生物合成;Janus 激酶类;STAT3 转录因子;蛋白酪氨酸激酶类/代谢;信号传导;HL-60 细胞;细胞凋亡;肿瘤细胞,培养的

[中图分类号] R552 **[文献标志码]** A

Apoptosis of acute myeloid leukemia HL-60 cells induced by CDK inhibitor SNS-032 and its molecular mechanisms

HAN Yan-xia^{1,2}, YOU Liang-shun¹, LIU Hui¹, MAO Li-ping¹, YE Xiu-jin¹, QIAN Wen-bin¹ (1. Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Zhejiang University

收稿日期:2014-09-05 接受日期:2015-03-04

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20120101110010);浙江省科技厅项目(2011C23014);浙江省医药卫生科技计划(2013KYA083);浙江省中医药管理局科技计划(2013ZA074)

作者简介:韩艳霞(1976-),女,硕士研究生,副主任医师,主要从事血液病基础和临床研究;E-mail: hanyanxia@tom.com

通讯作者:钱文斌(1964-),男,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事血液病基础和临床研究;E-mail: qianwenb@hotmail.com

School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 2. Department of Hematology, Jiaxing Second People's Hospital, Jiaxing 314000, China)

Corresponding author: QIAN Wen-bin, E-mail: qianwenb@hotmail.com

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects of cycle-dependent kinase (CDK) inhibitor SNS-032 on apoptosis in human acute myeloid leukemia (AML) HL-60 cells and its molecular mechanisms. **Methods:** Cultured AML HL-60 cells were treated with various concentrations of SNS-032. Cell apoptosis was determined with flow cytometry; cell viability was measured by MTT assay; the profiles of microRNA expression of HL-60 cells were analyzed by microRNA microarray; the protein expressions of JAK2/STAT3 pathway were detected by Western blotting. **Results:** Apoptosis of AML HL-60 cells was induced by SNS-032; the rate of apoptosis was $(5.9 \pm 1.7)\%$, $(12.1 \pm 3.1)\%$ and $(59.4 \pm 3.6)\%$ when HL-60 cells were treated with 0, 100 and 200 nmol/L SNS-032. MicroRNA microarray analysis revealed that the levels of miR-30a, miR-183, miR-20b, miR-26b, miR-20a, miR-589, miR-107, miR-181a, miR-106a, miR-17 and miR-378c were down-regulated by SNS-032, whereas the levels of miR-320a and miR-H7* were up-regulated. Western blotting showed that SNS-032 strongly inhibited phosphorylation of STAT3 and protein expression of JAK2, C-MYC and MCL-1. **Conclusion:** CDK inhibitor SNS-032 can induce apoptosis of AML HL-60 cells, which is associated with the inhibition of MCL-1, C-MYC and JAK2/STAT3, and down-regulation of miR-17-92 family.

[**Key words**] Leukemia, myeloid, acute; MicroRNAs; Cyclin-dependent kinases/biosynthesis; Janus kinases; STAT3 transcription factor; Protein-tyrosine kinases/metabolism; Signal transduction; HL-60 cells; Apoptosis; Tumor cells, cultured

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2015, 44(2):174-178.]

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是成人急性白血病最常见的一种类型, 在分子生物学特点、临床治疗反应等方面具有明显的异质性。联合化疗、造血干细胞移植和支持治疗等手段极大改善了 AML 患者的预后, 但仍存在治疗相关毒副作用大、治疗效果不理想和复发率高等诸多问题, 促使研究者致力于探索更具靶向性的治疗方法。

细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 按其功能主要分成两大类: 调控细胞周期的 CDK 和调控 RNA 转录的 CDK, 后者包括 CDK7 和 CDK9, 这两者参与调控 RNA 聚合酶 II 羧基末端结构域磷酸化, 而 RNA 聚合酶 II 则是参与调节 microRNA (miR) 基因转录的主要因子^[1-4]。近年来研究发现, 抑制 CDK 不仅抑制肿瘤细胞增殖, 还能诱导细胞凋亡。Walsby 等^[5] 报道选择性

CDK 抑制剂 SNS-032 对 AML 细胞有明显杀伤作用, 但其机制仍不明确。本研究通过流式细胞术、microRNA 芯片技术、蛋白质印迹法等观察 SNS-032 对人 AML HL-60 细胞凋亡的作用、microRNA 表达谱的改变和 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 通路的影响, 并用 JAK2/STAT3 通路激活剂白细胞介素 6 (IL-6) 进行干预, 进一步对可能的分子机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人 AML 细胞株 HL-60 由浙江大学血液病研究所保存。10% 胎牛血清和 RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; SNS-032 购自美国 Selleck 化学有限公司; Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公

司;miRNeasyMini Kit 购自美国 QIAGEN 公司; β -Actin单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。JAK2、磷酸化 STAT3 (p-STAT3)、STAT3、C-MYC 和 MCL-1单克隆抗体购于美国 Cell Signaling 公司;ECL Western-blotting luminal 试剂盒购于以色列 Biological Industries 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有限公司;辣根标记山羊抗兔 IgG (H + L) 和辣根标记山羊抗鼠 IgG (H + L) 购于杭州联科生物有限公司;显影粉、定影粉购自中美华东医药股份有限公司。

1.2 细胞培养及分组

HL-60 细胞悬浮生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养,2~3 天换液传代一次。取对数生长期的细胞为实验对象。实验细胞分为对照组、终浓度为 100 nmol/L 的 SNS-032 组、终浓度为 20 ng/mL 的 IL-6 组和上述浓度的 SNS-032 + IL-6 联合组。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

HL-60 细胞以 2×10^5 /mL 接种于 24 孔板,分别加入不同浓度的 SNS-032 (0、100 nmol/L 和 200 nmol/L) 孵育 24h 后收集细胞,用冷磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,4℃ $300 \times g$ 离心 7min,弃上清液。将细胞重悬于 1mL $1 \times$ 结合缓冲液,取 100 μ L 细胞置于试管中,加 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶 (PI),轻轻混匀,室温避光反应 15min,加入 300 μ L $1 \times$ 结合缓冲液,立即用流式细胞仪检测,Cellquest 1.2 软件分析结果。

1.4 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期细胞,新鲜培养液洗涤后,重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,以 $2 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞/mL 的终浓度接种于 96 孔板,分别加入 1.2 所述浓度的 SNS-032、IL-6、或联合加入 SNS-032 和 IL-6,对照组用无血清 RPMI 1640,每孔总体积 0.2mL,处理 24h,加 MTT 工作液 20 μ L/孔(终浓度 0.5mg/mL),置 37℃、5% 二氧化碳培养箱中孵育 4h, $300 \times g$ 离心,小心吸弃上清液,加入二甲亚砜 0.2mL/孔,吹打,使紫蓝色甲臞沉淀充分溶解。在酶标仪 570nm 波长处读取吸光度值,计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组吸光度值 - 空白组吸光度值) / (对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次,每次设复孔 3 个,取平均值为最终结果。

1.5 芯片技术分析 microRNA 表达谱的变化

按照 Trizol 试剂盒和 miRNeasy 试剂盒说明书,分别提取各组 HL-60 细胞的总 RNA。利用 Nanodrop 于波长为 230nm、260nm 与 280nm 处测定上述 RNA 吸光度值,对总 RNA 进行定量测定,通过计算 260nm 和 280nm 处的吸光度比值以及甲醛变性凝胶电泳,分析 RNA 质量,用于 microRNA 芯片检测。芯片实验和分析委托上海康成生物工程有限公司完成。采用丹麦 Exiqon 公司第六代 microRNA 芯片检测 microRNA 表达谱。各组实验均重复 3 次。与对照组相比, SNS-032 作用后 microRNA 表达上调 1.2 倍或下调超过 20% 为差异表达。

1.6 蛋白质印迹法检测 JAK2/STAT3 相关蛋白表达

收集药物处理后 HL-60 细胞 5×10^6 个,离心,弃上清液,用预冷磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,加细胞裂解液 120-160 μ L,反复吹打,置冰上,用超声波细胞粉碎机处理 (160w, 持续 3s, 间隔 5s, 共 3 次),至溶液不再黏稠,4℃ $700 \times g$ 离心 10 min,取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒测蛋白质浓度后备用。制胶后,每孔加入 30 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后按半干法将电泳产物转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2h,加一抗 (1:1000 稀释),4℃ 过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10min,加二抗 (1:5000 稀释),室温孵育 2h, TBST 洗膜 10min $\times 3$ 次后,加 ECL 试剂在室温反应 1 min 后,曝光到 X 线胶片上,在暗室中一次性完成显影、定影。

1.7 统计学分析

采用 Prism 4 软件进行统计。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

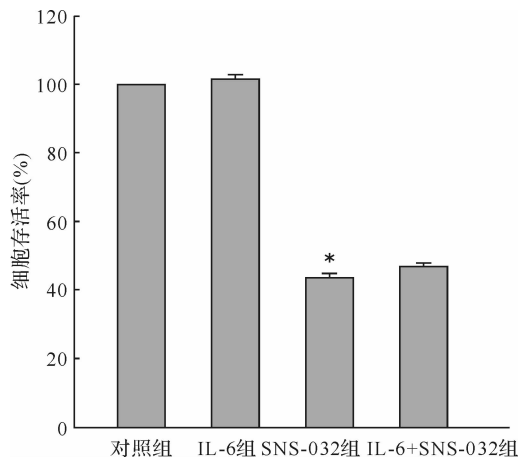
2.1 SNS-032 对 HL-60 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,加入 SNS-032 干预后 HL-60 细胞凋亡率增加。对照组、100nmol/L 和 200nmol/L SNS-032 干预组细胞凋亡率分别为 $(5.9 \pm 1.7)\%$ 、 $(12.1 \pm 3.1)\%$ 和 $(59.4 \pm 3.6)\%$ 。

2.2 SNS-032 对 HL-60 细胞存活率的影响

100 nmol SNS-032 作用 HL-60 细胞 24 h 后, HL-60 细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$);联合 IL-6

后不能逆转 SNS-032 对细胞存活率的抑制作用 ($P>0.05$)。见图 1。



SNS-032 组与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 1 各组 HL-60 细胞存活率的比较

Fig.1 Comparison of the cell viability of HL-60 cells in different groups

2.3 SNS-032 对 HL-60 细胞 microRNA 表达谱的影响

microRNA 芯片分析结果显示: SNS-032 下调 HL-60 细胞 miR-30a、miR-183、miR-20b、miR-26b、miR-20a、miR-589、miR-107、miR-181a、miR-106a、miR-17 和 miR-378c 的表达, 上调 miR-320a 和 miR-H7* 的表达。

2.4 SNS-032 对 JAK2/STAT3 通路相关因子的作用

miR-20a 和 miR-17 属于 miR-17-92 基因簇, 而 miR-17-92 与 JAK2/STAT3 调控密切相关。从上述结果可知, SNS-032 下调 miR-20a 和 miR-17 的表达, 进一步采用蛋白质印迹法检测, 结果 SNS-032 显著抑制 JAK2 蛋白的表达和其下游 STAT3 的磷酸化水平, IL-6 并不能逆转 SNS-032 对 HL-60 细胞 JAK2 和磷酸化 STAT3 的抑制作用; 同时, SNS-032 对 MCL-1 和 C-MYC 蛋白也有抑制作用, 见图 2。

3 讨论

SNS-032 是一种新型选择性 CDK 抑制剂, 能抑制调控 RNA 转录的 CDK, 包括 CDK7 和 CDK9 的活性。2011 年, Walsby 等^[5]报道 SNS-032 能有效诱导 HL-60、NB4 细胞株及原代 AML 细胞凋亡, 其机制是下调 CDK2、CDK7 和 CDK9, 进而抑

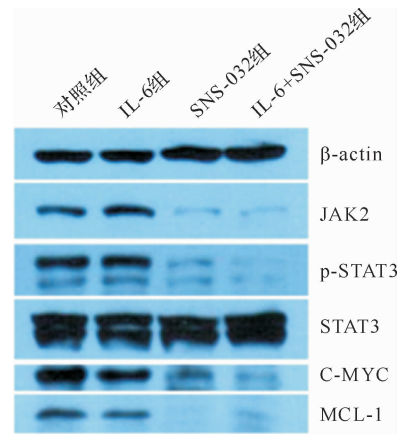


图 2 各组细胞 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达

Fig.2 The protein expressions of JAK2/STAT3 pathway in different groups

制 RNA 聚合酶 II 羧基末端结构域第二位和第五位丝氨酸磷酸化, 导致 Caspase-3 激活和细胞凋亡。我们的实验结果证实了 SNS-032 显著诱导 HL-60 细胞凋亡。由于 CDK7 和 CDK9 参与调节 microRNA 基因的转录^[6-7], 因此, 我们研究了 SNS-032 干预 HL-60 细胞后 microRNA 表达谱的变化。结果表明, SNS-032 显著下调 HL-60 细胞的 11 种 microRNA, 其中 miR-20a 和 miR-17 等与 AML 密切相关, 而 miR-20a 和 miR-17 属于 miR-17-92 基因簇, 该基因簇位于染色体 13q31 区, 含有 6 个 microRNA (miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b 和 miR-92)。近年来研究表明 miR-17-92 是肿瘤治疗的新靶点, 在混合型白血病基因重排中高表达^[8-9], 文献报道其高表达的原因有: ①基因扩增; ②MYC 和/或 STAT3 介导其转录增加^[10-11]。基于上述理由, 我们研究了 SNS-032 调控 miR-17-92 的可能机制。本研究结果显示, SNS-032 作用于 HL-60 细胞株后抑制 JAK2 蛋白表达和下游 STAT3 的磷酸化, 还抑制 MCL-1 和 C-MYC 蛋白的表达。

IL-6 在 JAK/STAT3 通路的激活中起着非常重要的作用^[12]。本实验结果还发现, IL-6 不能逆转 SNS-032 对 HL-60 细胞的杀伤, 也不能逆转其对 JAK2 蛋白和磷酸化 STAT3 的抑制作用。Walsby 等^[5]分析了 SNS-032 对 87 例 AML 患者原代白血病细胞的抑制作用, 发现 SNS-032 的杀伤效应不受 FAB 分型、既往治疗、FLT3 突变状态 and 核仁磷酸蛋白 1 (NPM1) 突变状态的影响。这些结果提示 SNS-032 能克服 AML 的高危因素。

综上所述, SNS-032 作为一种新型选择性 CDK 抑制剂能显著诱导 HL-60 细胞凋亡, 其机制可能与抑制 JAK2 和 STAT3 磷酸化、抑制 MCL-1 和 C-MYC 及与之相关的 miR-17-92 基因簇表达水平有关, 但其具体机制还有待于进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] ASGHAR U, WITKIEWICZ A K, TURNER N C, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy [J]. **Nat Rev Drug Discov**, 2015, 14(2):130-146.
- [2] KUMAR S K, LAPLANT B, CHNG W J, et al. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma [J]. **Blood**, 2015, 125(3):443-448.
- [3] DICKSON M A. Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy [J]. **Clin Cancer Res**, 2014, 20(13):3379-3383.
- [4] CHEN R, WIERDA W G, CHUBB S, et al. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia [J]. **Blood**, 2009, 113(19):4637-4645.
- [5] WALSBY E, LAZENBY M, PEPPER C, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 has single agent activity in AML cells and is highly synergistic with cytarabine [J]. **Leukemia**, 2011, 25(3):411-419.
- [6] LEE Y, AHN C, HAN J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. **Nature**, 2003, 425(6956):415-419.
- [7] DENLI A M, TOPS B B, PLASTERK R H, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex [J]. **Nature**, 2004, 432(7014):231-235.
- [8] LI Z, LU J, SUN M, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2008, 105(40):15535-15540.
- [9] DIXON-MCIVER A, EAST P, MEIN C A, et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia [J]. **PLoS One**, 2008, 3(5):e2141.
- [10] JIN H Y, LAI M, XIAO C. microRNA-17~92 is a powerful cancer driver and a therapeutic target [J]. **Cell Cycle**, 2014, 13(4):495-496.
- [11] XIANG J, WU J. Feud or friend? The role of the miR-17-92 cluster in tumorigenesis [J]. **Curr Genomics**, 2010, 11(2):129-135.
- [12] CHANG Q, BOURNAZOU E, SANSONE P, et al. The IL-6/JAK/STAT3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis [J]. **Neoplasia**, 2013, 15(7):848-862.

[本文编辑 沈 敏 陈韶华]

- 消 息 -

第一届全国组织修复与再生学术大会消息

首届全国组织修复与再生医学大会由中华医学会组织修复与再生分会主办, 国家干细胞工程技术研究中心、解放军总医院、北京亦庄经济开发区、北京汉氏联合干细胞研究院、天津昂赛细胞基因工程有限公司等单位联合承办。会议将邀请来自中国、北美、欧洲和其它国家相关领域的著名科学家、教育家、临床医学家进行专题报告。

会议主题: 组织修复和再生医学与战略性新兴产业发展

主要议题: ①干细胞与组织修复和再生 ②组织工程与组织修复和再生 ③创烧伤后的组织修复与再生 ④疾病损伤后的组织修复与再生 ⑤组织修复与再生医学临床与产业化(伦理、标准、产业政策、审批、法规等)

会议日期: 2015 年 6 月 17—19 日

会议地点: 北京丰大国际大酒店

会议网站: <http://2015.cmatrr.com/>