文章编号:1000-5404(2012)17-1775-04

论著

硼替佐米对A549细胞增殖及p21、p27表达的影响

谢 燕,喻秀丽,童立纺 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院青杠老年护养中心)

[摘要] **目的** 研究蛋白酶体抑制剂硼替佐米对人肺癌A549细胞增殖、细胞周期及在体成瘤的影响。**方法** 采用不同浓度的硼替佐米(0、100、200 nmol/L)作用于A549细胞4 h,观察其对蛋白酶体活性的影响。用硼替佐米(0、100、200 nmol/L)处理A549细胞48 h,采用MTT法、^{3}H-TdR掺入法检测细胞增殖;流式细胞术PI染色检测细胞周期;Western blot检测p21、p27表达水平的变化;连续注射观察硼替佐米对裸鼠A549细胞移植瘤体积及质量的影响。**结果** 硼替佐米可显著抑制A549细胞的蛋白酶体活性。MTT法、^{3}H-TdR法检测显示,100 nmol/L处理组细胞较对照组增殖率分别降低24.5%、29.5%,200 nmol/L处理组进一步显著下降($P<0.05$);细胞周期分析显示,100、200 nmol/L处理组G_0/G_1期较对照组明显增加($P<0.05$)。Western blot检测显示,48 h时100、200 nmol/L处理组p21、p27蛋白表达较对照组明显增加,且呈浓度依赖($P<0.05$),48 h蛋白质水平高于24 h。连续注射硼替佐米后裸鼠移植瘤的质量抑制率达(36.0±12.4)%。**结论** 硼替佐米可抑制A549细胞增殖,诱导细胞凋亡及发生G_0/G_1期阻滞,在体注射可抑制裸鼠成瘤,其抗肿瘤活性可能与抑制细胞周期蛋白p21、p27的降解有关。

[关键词] 硼替佐米;肺癌;细胞周期
[中图法分类号] R73-361; R730.23; R734.2 [文献标志码] A

Anti-proliferation effect of proteasome inhibitor bortezomib in human lung adenocarcinoma A549 cells

Xie Yan, Yu Xiuli, Tong Lifang (Department of Qinggang Geriatrics, Frist Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of a proteasome inhibitor bortezomib on the proliferation, cell cycle and tumor formation of human lung adenocarcinoma A549 cells, and to explore the possible mechanisms involved. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 cells were cultured and treated with different concentrations of bortezomib (0, 100 and 200 nmol/L) for 4 h, and the proteasome activity were measured to confirm its inhibitory effects. The A549 cells were further treated with different concentrations of bortezomib (0, 100 and 200 nmol/L) for 24 – 48 h. Cell proliferation was determined by MTT assay and ^{3}H-TdR absorption, respectively. Cell cycle was detected by flow cytometry, and the protein levels of p21 and p27 were determined by Western blotting. A549 cells were implanted subcutaneously into nude mice to establish the xenograft tumor models, and the xenograft tumor bearing mice were subjected to bortezomib. The tumor volume and weight in all groups were measured, and the tumor inhibitory rate was calculated. **Results** Bortezomib significantly inhibited the proteasome activity in A549 cells. The MTT and ^{3}H-TdR results showed that cell proliferation decreased by 24.5% and 29.5% in the 100 nmol/L bortezomib group, respectively, and a more significant decease was observed in the 200 nmol/L bortezomib group compared with the control group ($P<0.05$). Cell cycle analysis showed that the number of cells at G_0/G_1 phase was significantly increased in the 100 nmol/L and 200 nmol/L bortezomib groups compared with the control group ($P<0.05$). Western blot results showed that p21 and p27 significantly increased in a dose-dependent manner in the 100 nmol/L and 200 nmol/L bortezomib groups compared with the control group ($P<0.05$). In addition, the levels of p21 and p27 in the bortezomib group were significantly higher at 48 h than those at 24 h. After continuous injection, the weight of the xenograft tumors was reduced by (36.0±12.4)% in the bortezomib group compared with the

[通信作者] 喻秀丽,电话:(023)89012299

control group. **Conclusion** Bortezomib can inhibit A549 cell proliferation and induce cell cycle arresting at G_0/G_1 phase, probably by inhibiting the degradation of p21 and p27 proteins in A549 cells.

[**Key words**] bortezomib; lung cancer; cell cycle

Corresponding author: Yu Xiuli, Tel: 86-23-89012299

硼替佐米(bortezomib)通过抑制蛋白酶体功能,阻断蛋白酶体对泛素化蛋白的降解,进而发挥生物学功能,调控多种细胞的生理及病理过程。既往研究证实,硼替佐米可有效治疗造血系统肿瘤,并被美国食品与药品管理局批准用于多发性骨髓瘤和套细胞淋巴瘤的治疗[1]。新近研究发现,硼替佐米不仅可有效治疗多发性骨髓瘤和淋巴瘤,其单独应用或与化疗药联合在多种其他肿瘤细胞上也显示出较好的疗效[2],并在部分肺肿瘤疾病治疗中也显示出较好的效果[3]。但关于硼替佐米单独对肺癌细胞株A549的抗肿瘤作用及机制国内尚少见报道。本研究拟从在体和离体探讨硼替佐米对A549细胞增殖的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株A549由第三军医大学新桥医院肿瘤科惠赠。BALB/c裸鼠,雌性,4~6周龄,体质量18~20 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。DMEM培养基、胎牛血清购于HyClone公司,硼替佐米、MTT购于Sigma公司,^{3}H-TdR购自重庆医科大学附属第一医院核医学科,碘化吡啶(PI)购于上海生工公司,蛋白质提取试剂、p21及p27抗体购于碧云天公司,20S蛋白酶体试剂盒购自Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 A549细胞于37 ℃、5% CO_2条件下采用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养,至对数生长期,按1×10^4/ml接种至96孔板中,每孔200 μl。过夜贴壁后,加入0、100、200 nmol/L硼替佐米干预,以添加同等浓度DMSO作为阴性对照组,每组设3个复孔,将培养板置于细胞培养箱中继续培养48 h后处理细胞。

1.2.2 A549细胞20S蛋白酶体功能检测 将A549细胞在蛋白酶体活性缓冲液中裂解(50 mmol/L Hepes pH 7.5, 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, and 1% Triton X-100)。裂解液与20S特异性荧光底物LLVY-AMC在37 ℃反应2 h。LLVY被20S蛋白酶体降解后,释放的AMC激发波长为380 nm,发射波长460 nm,酶标仪检测。

1.2.3 MTT法检测A549细胞增殖 向各孔中加入MTT溶液(5 g/L) 20 μl,继续培养4 h终止培养,将各孔内上清液弃去,加入150 μl DMSO,振荡10 min,在酶联免疫检测仪上570 nm测定各孔吸光度值[D(570)],并计算细胞生长抑制率。

1.2.4 ^{3}H-TdR掺入法检测A549细胞增殖 A549细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养至对数生长期,按细胞数5×10^4/ml接种至24孔板中,每孔500 μl,过夜贴壁后,加入硼替佐米干预,硼替佐米终浓度分别为0(对照组)、100、200 nmol/L,每组设3个复孔。培养板置细胞培养箱中,于37 ℃、5% CO_2条件下继续培养48 h,终止培养前4 h,各孔加入1 μCi的^{3}H-TdR,终止培养时弃掉各孔内上清液,经细胞收集器将细胞收集至玻璃滤膜上,加入液体闪烁杯6 h后,在液体闪烁仪上检测,记录放射性计数,并计算对A549细胞增殖的抑制率。

1.2.5 PI单染流式细胞检测A549细胞周期 对数生长期培养的A549细胞,按1×10^6/ml接种至6孔板中,贴壁后,弃上清,加入硼替佐米干预48 h,硼替佐米终浓度分别为0、100、200 nmol/L。胰蛋白酶消化细胞后,用4 ℃预冷的0.1 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗3次,弃上清,加入1 ml预冷的70%乙醇固定,4 ℃过夜。收集所有固定标本,离心弃上清,PBS清洗1次,加入浓度为1 mg/ml的RNA酶,用PI染液(50 μg/ml),室温下避光染色30 min,流式细胞仪进行细胞周期DNA含量分析,确定细胞周期分布。

1.2.6 Western blot检测p21、p27蛋白表达 按照蛋白提取试剂说明提取硼替佐米处理48 h后A549细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度后,SDS-PAGE凝胶电泳,半干转膜后,5%脱脂牛奶封闭,一抗孵育过夜,漂洗过后,孵育二抗,ECL试剂盒化学发光,凝胶成像采集系统采集结果,Quantity One对条带进行定量分析。

1.2.7 硼替佐米处理A549细胞移植瘤裸鼠 BALB/c裸鼠20只,饲养于SPF条件下,A549细胞培养传代至对数期,取细胞0.3 ml (5.0×10^6个)接种于裸鼠背部皮下。待瘤体直径大于5 mm时,取10只瘤体大小一致的裸鼠随机分为2组,每组5只,第2天开始,隔天给处理组裸鼠腹腔注射硼替佐米(0.5 mg/kg),对照组注射等量的生理盐水。饲养21 d后取移植瘤比较瘤体大小。

1.3 统计学方法

计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 硼替佐米对A549细胞蛋白酶体功能的作用

分别采用0、100、200 nmol/L硼替佐米作用于A549细胞,给药4 h后,检测到荧光强度随着浓度增加而下降。硼替佐米100、200 nmol/L组的底物降解荧光强度为对照组的(36.7±1.31)%和(25.8±1.45)%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 硼替佐米对A549细胞增殖的影响

分别采用0、100、200 nmol/L硼替佐米作用于A549细胞,给药48 h后,分别采用MTT及^{3}H-TdR法检测对增殖的作用。与对照组相比,100 nmol/L组A549细胞的增殖显著下降($P<0.05$),MTT法检测吸光度值下降24.5%,^{3}H-TdR掺入法检测下降29.5%。硼替佐米200 nmol/L处理时,MTT的吸光度值以及放射性计数均显著性下降($P<0.05$,表1)。提示,硼替佐米对A549细胞增殖的抑制作用均呈浓度依赖型。

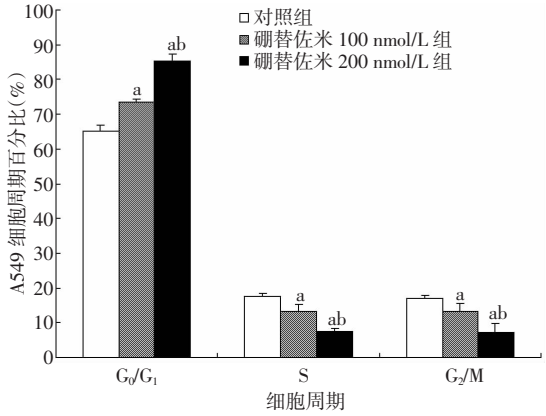
表 1　不同浓度硼替佐米对 A549 细胞增殖的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	D(570)	放射性计数(cpm)
对照组	1.374 ± 0.062	9 317.33 ± 476.04
硼替佐米 100 nmol/L 组	1.036 ± 0.065[a]	6 572.66 ± 545.23[a]
硼替佐米 200 nmol/L 组	0.777 ± 0.079[ab]	4 873.00 ± 795.05[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与硼替佐米 100 nmol/L 组比较

2.3　硼替佐米对 A549 细胞周期的影响

100 nmol/L 硼替佐米作用 A549 细胞 48 h 后,G_0/G_1 期细胞比例明显增加,G_2/M 期细胞比例显著低于对照组($P<0.05$);硼替佐米 200 nmol/L 组 G_2/M 期细胞比例也显著低于对照组($P<0.05$,图 1)。

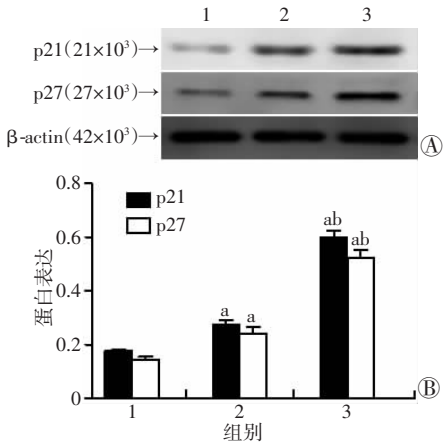


a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与硼替佐米 100 nmol/L 组比较

图 1　不同浓度硼替佐米对 A549 细胞周期的影响

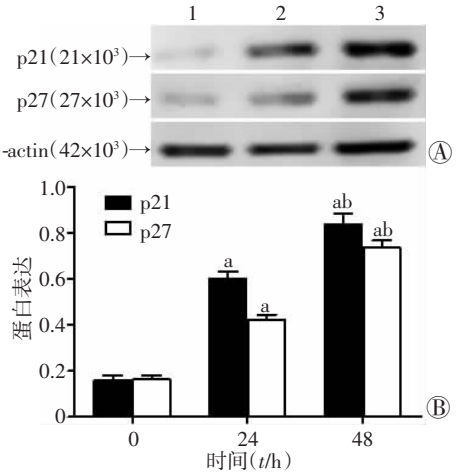
2.4　硼替佐米对细胞周期相关蛋白降解的影响

硼替佐米作用细胞 48 h 后,细胞周期相关的蛋白 p21、p27 表达水平均显著增高。硼替佐米 100 nmol/L 组 p21、p27 蛋白质水平显著高于对照组;200 nmol/L 组 p21、p27 表达水平均高于 100 nmol/L 组和对照组($P<0.05$,图 2)。说明,硼替佐米可抑制 p21、p27 的降解,使其含量增高,且呈浓度依赖型。和硼替佐米 200 nmol/L 处理 24 h 相比,48 h 时 p21、p27 的水平也显著升高($P<0.05$,图 3),提示硼替佐米抑制后 p21、p27 的水平因降解受阻而不断累积升高。



1:对照组;2:硼替佐米 100 nmol/L 组;3:硼替佐米 200 nmol/L 组
A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与硼替佐米 100 nmol/L 组比较

图 2　Western blot 检测不同浓度硼替佐米作用 48 h 对 A549 细胞 p21 及 p27 蛋白表达的影响



A:Western blot 检测　1:0 h,2:24 h,3:48 h;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与作用 24 h 比较

图 3　Western blot 检测 200 nmol/L 硼替佐米作用不同时间 A549 细胞 p21 及 p27 蛋白的表达

2.5　硼替佐米对裸鼠 A549 细胞成瘤性的影响

A549 细胞裸鼠成瘤后第 21 天,硼替佐米处理组大体成瘤组织块显著小于对照组,瘤体体积以及质量均显著低于对照组,肿瘤质量下降了(36.0 ± 12.4)%($P<0.05$,表 2)。裸鼠体质量未见显著差异。在体给药结果表明硼替佐米可抑制 A549 细胞体内的成瘤性。

表 2　硼替佐米对裸鼠移植瘤体积及质量的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	初始体积(mm^3)	最终体积(mm^3)	最终质量(g)	抑制率(%)
对照组	88.9 ± 14.2	1 335.0 ± 146.8	2.6 ± 0.4	—
硼替佐米组	89.8 ± 16.4	851.6 ± 118.3[a]	1.7 ± 0.4[a]	36.0 ± 12.4

a:$P<0.05$,与对照组比较

3　讨论

机体细胞内蛋白质降解大多经由泛素蛋白酶体系统完成。泛素蛋白酶体系统对于细胞内信号蛋白的灭活,细胞维持正常的生理功能,以及应对外界压力反应有重要意义。近年来,以泛素蛋白酶体为靶点在治疗肿瘤疾病中的研究取得了很大进展。很多针对泛素蛋白酶体系统的化合物被研究发现可以抑制肿瘤的过度增殖[4]。目前开发出来的蛋白酶体抑制剂从结构上大致可分为 5 类:包括醛基肽类、乙烯砜肽类、硼酸肽类、环氧酮肽类及 β-内酯类。硼替佐米属于硼酸肽类化合物,可选择性作用于 26S 蛋白酶体,可逆性地抑制蛋白酶体活性,阻断多种蛋白的降解过程,最终影响细胞周期进程。本研究首先验证了硼替佐米对 A549 细胞的蛋白酶体活性的检测,发现可以有效抑制蛋白酶体酶的活性,这和既往研究报道一致,也即表明可以选用该药物检测蛋白酶体抑制后 A549 的功能变化。用

MTT及^{3}H-TdR掺入法测定硼替佐米对A549细胞活力的影响,结果显示,100 nmol/L硼替佐米作用24 h以及48 h后与对照组相比,浓度依赖性以及时间依赖性地抑制A549增殖。进一步在体验证了其对A549增殖以及成瘤的抑制作用。这种作用与硼替佐米抑制A549细胞的细胞周期进展有关,而对细胞周期的抑制则与抑制了细胞周期调控相关的p21、p27蛋白的降解有关[5-6]。

研究报道硼替佐米不仅抑制细胞周期进展和细胞增殖,还可以促进多种肿瘤细胞的凋亡,尤其是在其浓度较大时[7-8]。而这种对凋亡的作用,是经由caspase-3途径实现的[9-11]。此外,硼替佐米还可影响多种其他细胞的降解,如可抑制炎症因子NF-κB的抑制因子的降解,进而阻滞NF-κB的活化[12-13]。除NF-κB通路之外,PI3K/Akt通路也被认为参与了硼替佐米的抗肿瘤过程[14]。PI3K/Akt通路是细胞内调控增殖及凋亡的重要信号传导通路,该通路的过度活化可导致细胞对抗肿瘤药物诱导的凋亡耐药。文献[15]报道,硼替佐米可以通过抑制细胞内Akt通路活性,抑制肝癌细胞的增殖。而在本研究中,我们检测了细胞周期相关的蛋白质如p21、p27两种蛋白质水平,此两种蛋白质均为短半衰期蛋白质。p21是p53的下游基因,是一种重要的细胞周期调控蛋白,广泛参与细胞的生长、分化、衰老及死亡过程,而且与肿瘤发生关系密切。既往研究表明p21与cyclin D/cdk形成复合物,将细胞周期停滞在G_1期;还可阻断PCNA活化,抑制DNA的合成,阻断细胞周期进展。p27也是细胞周期负调控因子,同样通过与cyclin/CDK复合物结合,抑制其活性,阻止细胞周期G_1/S期的转换,使细胞周期停滞于G_1期。本研究观察到硼替佐米作用后,A549细胞的G_1期比例显著高于对照组,这或许与p21、p27表达水平增高有关;降解受阻的p21、p27介导了硼替佐米诱导的细胞周期阻滞。

综上所述,硼替佐米可以抑制A549细胞增殖,诱导细胞凋亡及发生G_0/G_1期阻滞,在体注射可以抑制裸鼠成瘤,其抗肿瘤活性可能与抑制细胞周期蛋白p21、p27的降解有关。

参考文献:

[1] Pennisi A, Li X, Ling W, *et al*. The proteasome inhibitor, bortezomib suppresses primary myeloma and stimulates bone formation in myelomatous and nonmyelomatous bones *in vivo*[J]. Am J Hematol, 2009, 84(1): 6-14.

[2] Roccaro A M, Vacca A, Ribatti D. Bortezomib in the treatment of cancer[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006, 1(3): 397-403.

[3] Reddy K G. Activity of bortezomib in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2004, 6(3): 141-142.

[4] Fernandez Y, Miller T P, Denoyelle C, *et al*. Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death[J]. J Biol Chem, 2006, 281(2): 1107-1118.

[5] Canfield S E, Zhu K, Williams S A, *et al*. Bortezomib inhibits docetaxel-induced apoptosis *via* a p21-dependent mechanism in human prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(8): 2043-2050.

[6] Lashinger L M, Zhu K, Williams S A, *et al*. Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance *via* a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4902-4908.

[7] Huang C Y, Wei C C, Chen K C, *et al*. Bortezomib enhances radiation-induced apoptosis in solid tumors by inhibiting CIP2A[J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 9-15.

[8] Sun L, Zhang L, Qian J, *et al*. Combination of atiprimod and the proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis of mantle cell lymphoma *in vitro* and *in vivo*[J]. Leuk Res, 2012, 36(3): 363-368.

[9] 卓志红, 牧启田, 张乐鸣, 等. 硼替佐米上调fas、bcl2l12、caspase-9和caspase-3基因表达[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(5): 883-887.

[10] Albero M P, Vaquer J M, Andreu E J, *et al*. Bortezomib decreases Rb phosphorylation and induces caspase-dependent apoptosis in imatinib-sensitive and-resistant Bcr-Abl1-expressing cells[J]. Oncogene, 2010, 29(22): 3276-3286.

[11] Brooks A D, Jacobsen K M, Li W, *et al*. Bortezomib sensitizes human renal cell carcinomas to TRAIL apoptosis through increased activation of caspase-8 in the death-inducing signaling complex[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(5): 729-738.

[12] Allen C, Saigal K, Nottingham L, *et al*. Bortezomib-induced apoptosis with limited clinical response is accompanied by inhibition of canonical but not alternative nuclear factor-kappaB subunits in head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(13): 4175-4185.

[13] 周伟民, 金培英, 平金良, 等. 硼替佐米抑制核因子-κb活化对LOVO细胞增殖的影响[J]. 温州医学院学报, 2010, 40(2): 156-159, 163.

[14] Befani C D, Vlachostergios P J, Hatzidaki E, *et al*. Bortezomib represses HIF-1α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells[J]. J Mol Med (Berl), 2012, 90(1): 45-54.

[15] Chen K F, Yeh P Y, Yeh K H, *et al*. Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(16): 6698-6707.

(**收稿**:2012-03-06;**修回**:2012-05-28)

(编辑 汪勤俭)