

# 伊马替尼干扰多药耐药的卡波济氏肉瘤细胞的存活

尹杰

新疆维吾尔自治区石河子大学 新疆 石河子 832003

**【摘要】**多药耐药 (Multi-drug resistance, MDR) 是指肿瘤细胞对无关药物产生耐药性的能力。酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼已被证明可以有效的治疗某些肿瘤。特别是伊马替尼抑制 Bcr-Abl 激酶活性 c-kit 和血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体的磷酸化。在本研究中, 我们发现伊马替尼不仅在 wt-Kaposi 肉瘤 (KS) 中抑制 PDGF 磷酸化, 而且在多药耐药的 KS 细胞中也抑制 PDGF 磷酸化。这与 wt 细胞凋亡增加和 MDR-KS 细胞自噬增加有关。这些数据为伊马替尼在克服 KS 细胞 MDR 中的应用提供了新的见解。

**【关键词】**伊马替尼; 卡波西氏肉瘤; 耐药性; 细胞凋亡; 自噬

## 1 介绍

受体酪氨酸激酶已被提议作为抗肿瘤治疗的潜在靶标。甲磺酸伊马替尼 (也称为 STI571 或 Gleevec, 以下简称伊马替尼) 属于被分类为信号转导抑制剂的新药, 已被批准作为治疗慢性粒细胞白血病的更有效方法。伊马替尼抑制 Bcr-Abl 激酶活性, 从而导致大多数 CML 患者的 Philadelphia 细胞凋亡并诱导细胞遗传学缓解。伊马替尼可抑制其他酪氨酸激酶: c-kit, 试剂盒配体的受体 (KL) 和两种结构相似的血小板衍生生长因子受体 (PDGFR $\alpha$ ), PDGFR $\beta$  和 PDGFR $\gamma$ 。最近的临床研究结果表明, 伊马替尼治疗耐受良好, 并导致 c-kit 阳性胃肠道间质瘤 (GIST) 的患者在 c-kit 中包含功能获得性突变。伊马替尼还被报道抑制包括 Kaposi 肉瘤 (KS) 在内的几种肿瘤的生长, 所有这些肿瘤都可能表达 PDGF / PDGFR 或 KL / c-kit 自分泌生长环。许多细胞因子和生长因子与 KS 进展有关。特别是, 有人提出激活 PDGF 和 c-kit 受体在介导与 AIDS 有关的 KS 的生长中发挥作用。在这里, 我们显示伊马替尼主要诱导 KS 细胞凋亡, 更关键的是, 在 MDR-KS 细胞中自噬。

## 2 材料和方法

### 2.1 细胞培养与治疗

野生型卡波济氏肉瘤细胞系 (wt-SLK) 和对阿霉素 (DOX) 的 MDR 细胞 (SLK-DOX) 使细胞在充满 10% FCS, 2 mm 谷氨酰胺和抗生素的 RPMI-1640 中生长。通过暴露于 50ng/ml 药物, 从原始 wt-SLK 细胞系中选择了 SLK-DOX 细胞。通过每 4 周添加相关浓度的药物来维持耐药性。在实验程序之前, 将细胞在无毒培养基中培养至少十天。抵抗程度根据 MTT 分析和 P-gp 和 / 或 MRP 功能进行评估。在 37°C 的 5% CO<sub>2</sub> 气氛中, 在生长培养基中以不同浓度 (15、25 和 35  $\mu$  M) 的伊马替尼 (Novartis) 处理细胞 48 小时。

### 2.2 细胞生长

通过在 wt-SLK 和 SLK-DOX 细胞中执行生长曲线来分析细胞增殖。通过使用锥虫蓝 (GIBCO, Loughborough, UK) 排除试验每天计数细胞来确定细胞数。

### 2.3 分析细胞学

对于静态和流式细胞仪分析, 在室温下, 将对照细胞和处理过的细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 4% 多聚甲醛固定 30 分钟。在相同缓冲液中洗涤后, 将细胞用 PBS 中的 0.5 Triton X-100 透化 5 分钟。对于 PDGFR $\alpha$  磷酸化和非磷酸化, 使用针对这些抗原的单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 美国)。对于 Bcl-2 和 Beclin-1 (Santa Cruz Biotechnology)。30 分钟后洗涤细胞, 然后与抗小鼠荧光素连接的或抗兔荧光素连接的完整抗体 (Sigma) 一起孵育。为了检测细胞凋亡, 将细胞核用 Hoechst 33258 (Sigma) 在 37°C 下染色 15 分钟。为了进行定性分析, 所有样品均用甘油-PBS (2: 1) 固定在玻璃盖玻片上, 并通过配有 Zeiss CCD 相机的尼康 Microphot 荧光显微镜通过增强视频显微镜 (IVM) 进行分析。关于流式细胞仪分析, 所有样品均使用配备了 488nm 氩激光的 FACScan 流式细胞仪 (Becton-Dickinson) 进行记录。至少获得了 20,000 个样本。

### 2.4 酸室检测

通过将细胞与 0.05 mm MDC 在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中于 37°C 孵育 10 分钟, 用自发荧光药物 (MDC, Sigma) 标记自噬泡。通过在 37°C 的培养基中将细胞与 1 $\mu$ M Lyso Tracker (LTR, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 孵育 15 分钟, 也可以标记酸区室。然后在室温 (25°C) 下用 4% 多聚甲醛固定细胞 1 小时。关于流式细胞仪分析, 所有样品均使用配备有 488 nm 氩激光的 FACScan 流式细胞仪 (Becton-Dickinson) 进行评估。至少获得了 20 000 个事件。荧光强度直方图的中值用于提供半定量分析。

### 2.5 形态分析

在 Hoechst 标记后, 在荧光显微镜下以高放大倍数 (500x) 计数至少 300 个细胞, 进行凋亡细胞的定量评估。

### 2.6 半胱天冬酶活性

通过使用 CaspGLOW 荧光素活性胱天蛋白酶染色试剂盒 (MBL, Woburn, MA) 评估胱天蛋白酶<sup>3</sup>、8、9 和 3 的激活状态。该试剂盒为检测活细胞中激活的胱天蛋白酶提供了一种灵敏的手段。该测定法利用与 FITC 偶联的特异性胱天蛋白酶抑制剂 (半胱天冬酶 8 为 IETD-FMK, 半胱天冬酶 9 为 LEHD-FMK, 半胱天冬酶 3 为 DEVD-FMK) 作为荧光标记。这些抑制剂是细胞渗透性的, 无毒的, 并且不可逆地结合半胱天冬酶活性形式。FITC 标签可直接通过流式细胞仪检测凋亡细胞中激活的胱天蛋白酶。将细胞与 FITC-IETD-FMK, FITC-LEHD-FMK 或 FITC-DEVD-FMK 在 37°C 孵育 1 小时, 遵循制造商的说明。此后, 将样品洗涤三遍, 并立即使用 FL-1 通道在流式细胞仪上进行分析。还考虑了另外两个实验对照: (i) 通过用 caspase 8、9 或 3 的特异性抑制剂预处理细胞而制备的样品, 以及 (ii) 未标记的细胞 (阴性对照)。

### 2.7 蛋白质印迹

为了研究对 PDGFR $\alpha$  和 PDGFR $\beta$  磷酸化的影响, 将亚融合细胞移至 0.1% FBS, 在有和没有 15 $\mu$ mol/l 伊马替尼的情况下培养 4 小时, 然后在 10 ng / ml PDGF-BB (Roche) 的存在情况下再孵育 10 分钟。孵育结束时, 将细胞用 PBS 洗涤, 收集并在冰冷的放射免疫沉淀测定 (RIPA) 缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) 中裂解细胞沉淀。使用 Bradford 蛋白测定方法确定蛋白浓度, 将等量 (80  $\mu$ g) 的样品蛋白上样到 7% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 然后电转移到硝酸纤维素膜上, 将其与以下一级抗体的 1: 300 稀释液孵育: 亲和纯化的多克隆兔抗磷酸-PDGFR $\alpha$  (抗 p-PDGFR $\alpha$ ), 抗磷酸-PDGFR $\beta$  (抗 p-PDGFR $\beta$ ) 和单克隆小鼠抗肌动蛋白 (Santa Cruz Biotechnology)。然后将膜与过氧化物酶偶联的二抗 (1:10000 稀释)。使用增强的化学发光法 (ECL, Amersham Life Science, 阿灵顿高地, IL) 进行检测。单独的二抗用作阴性对照。使用光密度测定计算机软件 (Kodak Digital Science) 通过光密度测定对蛋白条带进行定量分析。

### 2.8 统计分析

通过使用 Cell Quest 软件的参数 Kolmogorov-Smirnov 测试对细胞荧光测定结果进行统计分析。使用 Student t 检验分析形态计量学数据 (报告为平均值  $\pm$  标准偏差, 至少四个独立实验)。仅 P < 0.05 被认为是显著的。

### 3 结果和讨论

#### 3.1 PDGFR 表达

我们首先通过 Western 印迹和流式细胞术检查了 wt 和耐药 SLK 细胞中非磷酸化和磷酸化的 PDGFR- $\beta$ , PDGFR- $\alpha$  和 c-kit 表达。易知, wt-SLK 和 SLK-DOX 细胞均表达 PDGF 受体, 而 c-kit 几乎无法检测到。在用伊马替尼处理的细胞中, 配体诱导的 PDGFR- $\beta$ , PDGFR- $\alpha$  和 c-kit 的磷酸化被抑制到背景水平, 而不会影响受体的表达水平。由于提示 PDGFR 磷酸化的抑制与凋亡诱导有关。为了验证伊马替尼是否诱导了细胞凋亡及其机制, 进行了实验。

#### 3.2 凋亡和细胞生长评估

为了验证伊马替尼是否可以诱导细胞凋亡, 我们将两种 SLK 细胞系<sup>[4]</sup>都暴露于不同浓度的伊马替尼中 (15、25、35  $\mu$  M, 持续 48 h)。此外, 考虑到在接受治疗的患者中观察到的伊马替尼的血浆稳态水平对应于 3 至 10  $\mu$  M 之间的值, 我们将注意力集中在伊马替尼以 15  $\mu$  M 诱导的对 wt 和耐药性 SLK 细胞的作用上。特别是, 在 wt 和 SLK-DOX 细胞中暴露 15  $\mu$  M 伊马替尼后, 检测到细胞生长明显减少。因此, 伊马替尼能够损害细胞生长并诱导 wt 和 MDR-KS 细胞凋亡。

#### 3.3 Bcl-2 表达

然后, 我们分析了 Bcl-2<sup>[5]</sup>的表达, Bcl-2 是主要位于线粒体外膜上的完整膜蛋白。它的过度表达可防止细胞响应各种刺激而凋亡。在我们的实验中, 在 wt 和耐药 SLK 细胞中均对该蛋白进行了定量分析。

#### 3.4 半胱天冬酶活性

凋亡通过两个主要途径发生。第一条, 称为外在或细胞质途径, 是通过死亡受体触发的。第二个是内在或线粒体途径, 当被刺激时, 它会导致线粒体中细胞色素 c 的释放和死亡信号的激活。两种途径均涉及称为胱天蛋白酶的蛋白酶级联的激活, 所述蛋白酶裂解调节性和结构性分子, 最终导致细胞死亡。考虑到内在和外在途径都通过 caspase 8 (在外在途径) 和 caspase 9 (在内在途径) 汇聚到 caspase 3, 我们评估了这些蛋白酶在 wt 和 SLK-DOX 细胞中的激活状态。有趣的是, 在 SLK-DOX 细胞中, 伊马替尼诱导的 caspase 激活相对于 wt 细胞要高得多。在胱天蛋白酶 8 的激活状态中未检测到差异(数据未显示)。这可能表明线粒体途径可

能在伊马替尼诱导的细胞死亡中起关键作用。

#### 3.5 伊马替尼和溶酶体功能

自噬是一种典型的细胞降解机制, 其中溶酶体区室的增加和自噬泡的形成可以被检测到。为了确定伊马替尼是否能调节 KS 细胞中的溶酶体区室, 使用了特异性的溶酶体标记物 lysotracker。该探究使我们能够研究溶酶体功能的改变, 即溶酶体的酸化和它们在细胞中的运输。通过荧光显微镜进行的分析表明, 相对于未处理的细胞, 在暴露于伊马替尼的细胞中存在弥散的溶酶体囊泡。通过流式细胞仪分析获得的定量评估强调伊马替尼治疗后溶酶体酸化增加。重要的是, 这种增加在 MDR-KS 细胞, 即 SLK-DOX 细胞中更为明显。

获得的结果强调了伊马替尼诱导的细胞凋亡与自噬之间的联系。自噬诱导可以被认为是伊马替尼诱导肉瘤细胞生长停滞并促进细胞死亡的另一种机制。此外, 考虑到对化疗药物的耐药性主要是通过凋亡信号通路中的缺陷而发生的, 因此可以刺激自噬的药物(如伊马替尼)的鉴定可能在卡波济肉瘤的临床管理中引起人们的兴趣。实际上, 伊马替尼抑制 PDGFR 磷酸化的可能性可能触发一系列细胞途径, 导致细胞凋亡(在 wt 细胞中)或诱导自噬(在 MDR 中), 也可以开辟新的治疗策略, 例如在联合药物治疗方面。

#### 参考文献:

- [1]李铭东,李东,吉民,et al.甲磺酸伊马替尼的合成[J].中国药学杂志,2008,43(3):228-229.
- [2]Rosenthal L J, Peters S M, Razzaque A. 分析艾滋病卡波济氏肉瘤活检组织中及外周血淋巴细胞样品中人巨噬细胞病毒转化的DNA序列(英文)[J]. Virologica Sinica,1988(4).
- [3]李现亭,夏东岚,莫晓宁,et al.人重组胱天蛋白酶原-3的表达和体外活化[J].北京大学学报(医学版),2002,34(4):316-320.
- [4]丁媛,吴秀娟,向芳,et al.miR-181b-5p对于卡波西肉瘤细胞SLK细胞增殖和凋亡的影响%The Effects of MicroRNA-181b-5p on Proliferation and Apoptosis of Human Kaposi's Sarcoma Cell Line SLK[J].现代生物医学进展,2015,015(021):4005-4008,4013.
- [5]Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al.Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.[J].Oncogene,1994,9(6):1799.