

来那度胺诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡机制

杨 毅,李学荣,邓 玲,陈 静,王 胜,张榜硕

(重庆三峡中心医院血液风湿科,重庆 404000)

摘要:目的 探讨来那度胺通过降解转录因子伊卡洛斯家族锌指蛋白(Ikaros family zinc finger, IKZF)1、IKZF3 诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的机制。方法 对数生长期人源多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 细胞分为 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、1 $\mu\text{mol/L}$ 组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 组,分别添加浓度为 0、1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 来那度胺至细胞培养基中,培养 24 h 后采用台盼蓝染色法测定各组细胞活力,采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况,应用实时 PCR 检测各组细胞 CRBN mRNA 表达水平,采用 ELISA 法检测各组细胞内 IKZF1、IKZF3、干扰素调节因子 4(interferon regulatory factor 4, IRF4)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)蛋白表达水平。结果 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、1 $\mu\text{mol/L}$ 组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 组的 RPMI 8226 细胞生存率[(100.00 $\pm$ 0.00)%、(98.25 $\pm$ 0.63)%、(80.02 $\pm$ 2.37)%、(57.24 $\pm$ 4.55)%、(22.86 $\pm$ 4.13)%、(18.41 $\pm$ 3.06)%]依次降低,细胞凋亡率[0、(1.88 $\pm$ 0.21)%、(18.64 $\pm$ 3.50)%、(41.04 $\pm$ 5.62)%、(70.49 $\pm$ 10.11)%、(79.70 $\pm$ 12.35)%]依次升高,CRBN mRNA 上调倍数(0、0.68 $\pm$ 0.11、1.35 $\pm$ 0.24、2.23 $\pm$ 0.30、2.99 $\pm$ 0.35、3.21 $\pm$ 0.38)依次升高,IKZF1[(36.75 $\pm$ 3.04)、(33.18 $\pm$ 3.11)、(30.55 $\pm$ 3.84)、(28.71 $\pm$ 2.18)、(25.60 $\pm$ 2.05)、(20.44 $\pm$ 1.84) $\mu\text{g/L}$]、IKZF3[(41.04 $\pm$ 3.13)、(38.26 $\pm$ 3.45)、(33.60 $\pm$ 3.02)、(30.58 $\pm$ 2.87)、(22.03 $\pm$ 2.22)、(19.66 $\pm$ 2.15) $\mu\text{g/L}$]、IRF4[(12.30 $\pm$ 1.65)、(11.66 $\pm$ 1.33)、(10.24 $\pm$ 0.87)、(8.35 $\pm$ 1.21)、(6.04 $\pm$ 1.03)、(5.74 $\pm$ 1.00) $\mu\text{g/L}$]和 IL-2[(8.63 $\pm$ 1.21)、(8.02 $\pm$ 1.15)、(6.80 $\pm$ 0.96)、(5.34 $\pm$ 0.69)、(4.87 $\pm$ 0.52)、(4.22 $\pm$ 0.37) $\mu\text{g/L}$]水平依次降低,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 来那度胺可调节 CRL4-CRBN 复合物的活性,增加转录因子 IKZF1 和 IKZF3 的泛素化,降低 IKZF1 和 IKZF3 蛋白活性,下调 IRF4、IL-2 蛋白表达水平,最终诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡。

关键词:多发性骨髓瘤;来那度胺;伊卡洛斯家族锌指蛋白 1;伊卡洛斯家族锌指蛋白 3;干扰素调节因子 4;白细胞介素-2

Mechanism of multiple myeloma cell apoptosis induced by lenadomide

YANG Yi, LI Xuerong, DENG Ling, CHEN Jing, WANG Sheng, ZHANG Bangshuo

(Department of Blood and Rheumatism, Chongqing Three Gorges Center Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of multiple myeloma cell apoptosis by lenadomide via degrading transcription factors Ikaros family zinc finger (IKZF)1 and IKZF3. **Methods** RPMI8226 cells in logarithmic growth phase were divided 0, 1, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ lenalidomide groups according to the concentrations after 24 h culture. Trypan blue staining was used to detect the activity of RPMI 8226 cell, flow cytometry was used to detect the apoptosis of RPMI8226 cells, real-time PCR was used to detect the expression level of CRBN mRNA, and ELISA was used to detect the expressions of IKZF1, IKZF3, interferon regulatory factor 4 (IRF4) and interleukin-2 (IL-2) proteins in all groups. **Results** The survival rates of RPMI 8226 cells reduced gradually ((100.00 $\pm$ 0.00%, (98.25 $\pm$ 0.63)%, (80.02 $\pm$ 2.37)%, (57.24 $\pm$ 4.55)%, (22.86 $\pm$ 4.13)%, (18.41 $\pm$ 3.06)%) ($P<0.05$), the apoptosis rates increased gradually (0, (1.88 $\pm$ 0.21)%, (18.64 $\pm$ 3.50)%, (41.04 $\pm$ 5.62)%, (70.49 $\pm$ 10.11)%, (79.70 $\pm$ 12.35)%) ($P<0.05$), the expressions of CRBN mRNA increased gradually (0, 0.68 $\pm$ 0.11, 1.35 $\pm$ 0.24, 2.23 $\pm$ 0.30, 2.99 $\pm$ 0.35, 3.21 $\pm$ 0.38) ($P<0.05$), while IKZF1 ((36.75 $\pm$ 3.04), (33.18 $\pm$ 3.11), (30.55 $\pm$ 3.84), (28.71 $\pm$ 2.18), (25.60 $\pm$ 2.05), (20.44 $\pm$ 1.84) $\mu\text{g/L}$), IKZF3 ((41.04 $\pm$ 3.13), (38.26 $\pm$ 3.45), (33.60 $\pm$ 3.02), (30.58 $\pm$ 2.87), (22.03 $\pm$ 2.22), (19.66 $\pm$ 2.15) $\mu\text{g/L}$), IRF4 ((12.30 $\pm$ 1.65), (11.66 $\pm$ 1.33), (10.24 $\pm$ 0.87), (8.35 $\pm$ 1.21), (6.04 $\pm$ 1.03), (5.74 $\pm$ 1.00) $\mu\text{g/L}$) and IL-2 ((8.63 $\pm$ 1.21), (8.02 $\pm$ 1.15), (6.80 $\pm$ 0.96), (5.34 $\pm$ 0.69), (4.87 $\pm$ 0.52), (4.22 $\pm$ 0.37) $\mu\text{g/L}$) decreased gradually ($P<0.05$) in 0, 1, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ lenalidomide groups in turns. **Conclusion** Lenalidomide induces apoptosis of multiple myeloma cells by regulating the activity of CRL4-CRBN complex, increasing the ubiquitination of transcription factor IKZF1 and IKZF3, decreasing the activities of IKZF1 and IKZF3 protein, and downregulating the expressions of IRF4 and IL-2.

Key words: multiple myeloma; lenalidomide; Ikaros family zinc finger 1; Ikaros family zinc finger 3; interferon regulatory factor 4; interleukin-2

doi:10.13507/j.issn.1674-3474.2018.12.024

基金项目:重庆市万州区科委面上项目(20150320)。

通信作者:张榜硕,E-mail:971135735@qq.com。

多发性骨髓瘤发病率约占全部恶性肿瘤的1%,约占血液恶性肿瘤的10%^[1]。与转移到骨的其他恶性肿瘤不同,骨髓瘤的溶骨性病变无新骨形成,主要临床表现为贫血、高钙血症、肾功能衰竭和感染风险增加。1%~2%患者初诊时患有髓外疾病,有8%患者为病程中发展为髓外疾病^[2-4]。来那度胺是一种治疗多发性骨髓瘤的高效药物,在其他B细胞淋巴瘤中具有活性。此外,来那度胺及其类似物具有多种额外的生物学效应,包括致畸性、刺激T细胞产生白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、抑制单核细胞产生肿瘤坏死因子等,但这些多效性活性的分子基础尚未完全明确^[5],可能是由靶蛋白的泛素化改变所引起^[6]。有研究^[7]从蛋白质和泛素位点水平上分析来那度胺的作用机理,发现与其关联性最高的2个蛋白为伊卡洛家族锌指蛋白(Ikaros family zinc finger, IKZF)1、IKZF3。本研究以人源多发性骨髓瘤细胞株RPMI 8226细胞为实验对象,从降解转录因子IKZF1和IKZF3蛋白方面探讨来那度胺诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料 人源多发性骨髓瘤细胞株RPMI 8226细胞,购自武汉普诺赛生命科技有限公司(CCL-0564,规格:1×10⁶ cells/T25培养瓶)。来那度胺购自上海瀚香生物科技有限公司(BCP01390CAS号:191732-72-6,纯度:98%)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 RPMI 8226细胞使用含体积分数10%胎牛血清、100 mg/L链霉素以及100 u/mL青霉素的RPMI-1640培养基于37℃、体积分数5% CO₂、100%饱和湿度CO₂培养箱中培养,细胞接种密度(4~5)×10⁵个/mL,培养至对数生长期进行实验,分为0、1、2.5、5、10、20 μmol/L组,分别添加浓度为0、1、2.5、5、10、20 μmol/L来那度胺至培养基中培养24 h后测定相关指标。

1.2.2 台盼蓝染色法测定细胞活力 来那度胺处理细胞24 h,各组分别取5×10³个细胞采用96孔板进行孵育,每孔加入20 μL CCK8溶液。于37℃孵育40 min后,采用分光光度计测定450 nm波长处的吸光度值,绘制细胞增殖抑制率曲线,计算细胞生存率。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况 各组细胞处理24 h后,采用Annexin-V单染流式细胞术进行Annexin-V染色,应用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.2.4 实时PCR检测细胞CRBN mRNA表达水平 采用实时PCR检测各组细胞CRBN mRNA表达水平,计算CRBN mRNA上调倍数。

1.2.5 ELISA法检测细胞IKZF1、IKZF3、干扰素调节因子4(interferon regulatory factor 4, IRF4)及IL-2蛋白表达水平 应用全自动酶标仪(美国BIO-RAD公司,型号680)采用ELISA法测定各组细胞内

IKZF1、IKZF3、IRF4及IL-2蛋白表达水平。ELISA试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司,操作步骤严格按照说明书进行。

1.3 统计学处理 应用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,组间两两比较采用LSD检验;计数资料比较采用 χ^2 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组细胞生存率、凋亡率比较 处理24 h后,0、1、2.5、5、10、20 μmol/L组细胞生存率呈依次降低趋势,细胞凋亡率呈依次升高趋势,各组细胞生存率、凋亡率比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组细胞生存率、凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞生存率	细胞凋亡率
0 μmol/L组	100.00±0.00	0
1 μmol/L组	98.25±0.63	1.88±0.21
2.5 μmol/L组	80.02±2.37	18.64±3.50
5 μmol/L组	57.24±4.55	41.04±5.62
10 μmol/L组	22.86±4.13	70.49±10.11
20 μmol/L组	18.41±3.06	79.70±12.35
F值	25.396	26.889
P值	<0.001	<0.001

2.2 各组细胞CRBN mRNA表达水平比较 处理24 h后,0、1、2.5、5、10、20 μmol/L组CRBN mRNA上调倍数分别为0、0.68±0.11、1.35±0.24、2.23±0.30、2.99±0.35、3.21±0.38,CRBN基因mRNA表达水平呈依次升高趋势,各组CRBN基因mRNA表达水平比较差异有统计学意义($F=15.337, P<0.001$)。

2.3 各组细胞IKZF、IKZF3、IRF4及IL-2蛋白表达水平比较 处理24 h后,0、1、2.5、5、10、20 μmol/L组细胞IKZF、IKZF3、IRF4、IL-2蛋白表达水平均依次降低,各组IKZF、IKZF3、IRF4、IL-2蛋白水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 各组细胞IKZF、IKZF3、IRF4及IL-2蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	IKZF1	IKZF3	IRF4	IL-2
0 μmol/L组	36.75±3.04	41.04±3.13	12.30±1.65	8.63±1.21
1 μmol/L组	33.18±3.11	38.26±3.45	11.66±1.33	8.02±1.15
2.5 μmol/L组	30.55±3.84	33.60±3.02	10.24±0.87	6.80±0.96
5 μmol/L组	28.71±2.18	30.58±2.87	8.35±1.21	5.34±0.69
10 μmol/L组	25.60±2.05	22.03±2.22	6.04±1.03	4.87±0.52
20 μmol/L组	20.44±1.84	19.66±2.15	5.74±1.00	4.22±0.37
F值	24.694	30.018	30.557	29.630
P值	0.003	<0.001	<0.001	0.001

3 讨论

多发性骨髓瘤患者临床症状多样,包括高钙血症、贫血、肾损害和/或骨痛等,严重影响患者生活质量^[8-9]。随着沙利度胺类似物和蛋白酶体抑制剂的临床应用,多发性骨髓瘤患者3 a生存率明显提高,新的治疗方法如免疫调节剂来那度胺、沙利度胺以及蛋白酶体抑制剂硼替佐米,与类固醇和偶尔的细胞毒性剂

联合使用,一定程度上改善了骨髓瘤患者的预后^[10-12]。

独立的蛋白质组学证实来那度胺和沙利度胺可通过促进 CRBN-DDB1 结合,从而治疗多发性骨髓瘤,表明泛素连接酶复合物是该类分子的主要直接蛋白结合伙伴^[13-15],因此,来那度胺的多效性作用与靶蛋白的泛素化改变有关^[16]。CRL4 泛素连接酶的特异性是由可互换的底物受体所介导,但尚未确定 CRBN(假定的底物受体)的靶点。本研究结果显示,随着来那度胺浓度的升高,细胞生存率依次降低、细胞凋亡率依次升高,CRBN mRNA 表达水平依次升高,与上述研究结论一致。

来那度胺可调节 IKZF1 和 IKZF3 泛素化和丰富度^[17]。IKZF1 和 IKZF3 是 B 和 T 细胞系终末分化的重要转录因子。虽然 IKZF1 在早期淋巴祖细胞中高表达,但在更成熟的 B 细胞肿瘤中,IKZF3 仍存在高水平表达,且 IKZF3 是产生多个骨髓瘤细胞的生理对应物的细胞所必需的。缺乏完整 DNA 结合区的显性负性 IKZF3 亚型的表达可导致肿瘤细胞凋亡。本研究结果显示,随着来那度胺浓度的升高,细胞生存率依次降低,细胞凋亡率依次升高,IKZF1、IKZF3 蛋白表达水平均依次降低,说明来那度胺在多发性骨髓瘤细胞中的抗增殖、促凋亡作用是通过 IKZF1 和 IKZF3 的降解介导的^[18-19]。

IRF4 曾被报道为多发性骨髓瘤发生发展中的一个必需基因。本研究对来那度胺处理后 RPMI 8226 细胞中 IRF4、IL-2 蛋白表达水平进行检测,采用不同浓度来那度胺进行处理后,结果显示 RPMI 8226 细胞内 IRF4、IL-2 蛋白表达水平均明显降低,且随来那度胺浓度增加,二者均呈下降趋势,说明来那度胺可下调 IRF4、IL-2 蛋白表达水平。

本研究结果提示,来那度胺具有调节人源多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 细胞内 CRL4-CRBN 复合物活性的作用,可增加转录因子 IKZF1 和 IKZF3 的泛素化,降低 IKZF1 和 IKZF3 蛋白表达水平,下调 IRF4、IL-2 蛋白表达水平,最终诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡。

参考文献

- [1] 陈浩宇,叶润清,吴晓蔓. 免疫固定电泳和免疫球蛋白含量在多发性骨髓瘤诊断中价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(8):795-797.
- [2] GANDHI A K, KANG J, HAVENS C G, et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.)[J]. Br J Haematol,2014,164(6):811-821.
- [3] 苑冬阳,高欣,杨融辉,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂对多发性骨髓瘤细胞的杀伤机制及临床应用现状[J]. 中国肿瘤临床,2018,45(13):691-694.

- [4] POURABDOLLAH M, BAHMANYAR M, ATENAFU E G, et al. High IKZF1/3 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of relapsed/refractory multiple myeloma patients treated with lenalidomide[J]. J Hematol Oncol,2016,9(1):123.
- [5] GRYGOROWICZ M A, BORYCKA I S, NOWAK E, et al. Lenalidomide potentiates CD4⁺ CD25⁺ Treg-related suppression of lymphoma B-cell proliferation[J]. Clin Exp Med,2017,17(2):193-207.
- [6] 王立岩,全晓丽,赫东芸,等. 来那度胺对小鼠子宫癌 SiHa 细胞移植肿瘤抑制作用的研究[J]. 中国实验诊断学 2018,22(5):881-885.
- [7] 王晨,程艳杰. 锌指蛋白 A20 在自身免疫病中的作用及调控机制[J]. 临床检验杂志,2017,35(1):59-61.
- [8] 郭淑丽,田永芳,王洪丽,等. 维吾尔族与汉族多发性骨髓瘤患者凝血指标对比分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(1):87-88.
- [9] 陈浩宇,叶润清,吴晓蔓,等. 免疫固定电泳和免疫球蛋白含量在多发性骨髓瘤诊断中价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(8):795-797.
- [10] KRONKE J, UDESHI N D, NARLA A, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells[J]. Science,2014,343(6168):301-305.
- [11] 安然,侯健. CRBN 在免疫调节剂治疗多发性骨髓瘤中的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2016,24(6):1888-1891.
- [12] KRONKE J, HURST S N, EBERT B L. Lenalidomide induces degradation of IKZF1 and IKZF3[J]. Oncoimmunology,2014,3(7):e941742.
- [13] LU G, MIDDLETON RE, SUN H, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins[J]. Science,2014,343(6168):305-309.
- [14] 黄海宁,张浩,汪海. 沙利度胺抗肿瘤机制及其作用靶点 CRBN 的研究进展[J]. 中国药理学通报,2015,31(6):745-749.
- [15] GOPALAKRISHNAN R, MATT A H, TOLANI B, et al. Immunomodulatory drugs target IKZF1-IRF4-MYC axis in primary effusion lymphoma in a cereblon-dependent manner and display synergistic cytotoxicity with BRD4 inhibitors [J]. Oncogene,2016,35(14):1797-1810.
- [16] KRONKE J, KUCHENBAUER F, KULL M, et al. IKZF1 expression is a prognostic marker in newly diagnosed standard-risk multiple myeloma treated with lenalidomide and intensive chemotherapy: a study of the German Myeloma Study Group (DSMM)[J]. Leukemia,2017,31(6):1363-1367.
- [17] KRONKE J, FINK E C, HOLLENBACH P W, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS[J]. Nature,2015,523(7559):183-188.
- [18] BJORKLUND C C, LU L, KANG J, et al. Rate of CRL4 (CRBN) substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4[J]. Blood Cancer J,2015,5:e354.
- [19] 蔡倩倩,李剑. CRBN 基因与免疫调节剂治疗多发性骨髓瘤耐药机制的相关性研究[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(3):892-897.

收稿日期:2018-08-15 修回日期:2018-10-23 本文编辑:徐小红