

论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2024-04

NVP-BEZ235 增敏左旋棉酚杀伤肝癌 HepG2 细胞的作用

王 滨,倪振洪,丁 雯,秦利燕,连继勤,何凤田 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 增敏左旋棉酚[(-)-gossypol]杀伤肝癌细胞 HepG2 的作用及可能机制。**方法** 用 NVP-BEZ235、左旋棉酚或二者联合处理 HepG2 细胞,CCK-8 法检测不同处理对细胞增殖的影响,流式细胞术检测不同处理对细胞凋亡的影响,Western blot 检测不同处理对细胞中 mTOR 磷酸化水平以及 Mcl-1 蛋白水平的影响。**结果** 联合使用 NVP-BEZ235 和左旋棉酚可显著抑制 HepG2 细胞增殖,并促进细胞凋亡,其中左旋棉酚可上调 HepG2 细胞中 mTOR 磷酸化水平及 Mcl-1 蛋白水平,导致抵抗发生,NVP-BEZ235 能够剂量依赖性抑制 mTOR 磷酸化($P < 0.01$),并抑制左旋棉酚对 Mcl-1 的上调作用。**结论** NVP-BEZ235 可通过抑制 mTOR 进而下调 Mcl-1 来增强左旋棉酚杀伤 HepG2 细胞的效果。

[关键词] 左旋棉酚;NVP-BEZ235;mTOR;肝细胞癌

[中图法分类号] R73-361; R735.7; R979.1

[文献标志码] A

Effect of NVP-BEZ235 on sensitization of HepG2 cells to (-)-gossypol

Wang Bin, Ni Zhenhong, Ding Wen, Qin Liyan, Lian Jiqin, He Fengtian (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect and associated mechanisms of PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 on the sensitization of HepG2 cells to Bcl-2 inhibitor, (-)-gossypol. **Methods** HepG2 cells were treated with NVP-BEZ235, (-)-gossypol or combined these 2 agents. The anti-proliferation effects of different treatments were detected by CCK-8 assay and cell apoptosis was detected by flow cytometry. Protein level of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and phosphorylation levels of mTOR were detected by Western blotting. **Results** Compared to (-)-gossypol alone, the combination of NVP-BEZ235 and (-)-gossypol significantly inhibited the proliferation and induced the apoptosis in HepG2 cells. (-)-gossypol upregulated the protein expression of Mcl-1 and the phosphorylation of mTOR in HepG2 cells, while NVP-BEZ235 inhibited the phosphorylation levels of mTOR in dose-dependent manner and attenuated (-)-gossypol-induced Mcl-1 accumulation. **Conclusion** NVP-BEZ235 sensitized HepG2 cells to (-)-gossypol partly by inhibiting mTOR phosphorylation and down-regulating Mcl-1.

[Key words] (-)-gossypol; NVP-BEZ235; mTOR; hepatocellular carcinoma

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5030). Corresponding author: Lian Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com; He Fengtian, E-mail: hefengtian@tom.com

左旋棉酚[(-)-gossypol]是一种多酚类化合物,最早在棉籽中被提取出来,并发现其具有抗生育功能。近年来,左旋棉酚的抗肿瘤活性越来越受到重视。实验证明,左旋棉酚对白血病、前列腺癌、肺癌等多种肿瘤具有良好的抗瘤活性,并且通过与相关的抗肿瘤药物联合使用,能够达到较满意的临床效果,相关的临床试验已经进入临床 II 期^[1-4]。

研究表明,左旋棉酚的抗癌作用主要通过抑制癌细胞 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白来实现。Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白主要包括 Bcl-2 (B cell lymphoma/Leukemia-2)、Bcl-X_L (Bcl-extra long) 和 Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1),作为细胞内源性凋亡途径中的拮抗分子,其功能丧失会使细胞内的促凋亡蛋白 Bak 和 Bax 发生寡聚,进而引起线粒体膜极性和通透性改变,启动 Caspase 家族的活化,诱导内源性凋亡的发生。左旋棉酚可特异性抑制 Bcl-2 与 Bcl-X_L 活性,但对 Mcl-1 抑制作用较弱,甚至能上调 Mcl-1 的表达,从而造成肿瘤细胞对左旋棉酚治疗抵抗。因此,通过抑制 Mcl-1 来增强左旋棉酚的抗癌活性具有重要的临床意义^[5-6]。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5030)

[通信作者] 连继勤, E-mail: lianjiqin@sina.com

何凤田, E-mail: hefengtian@tom.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130726.1058.019.html> (2013-07-26)

NVP-BEZ235 是一种新型的磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 双抑制剂,能够同时抑制 PI3K 与 mTOR 活性^[7]。有研究表明,PI3K/mTOR 通路不仅在肝癌细胞中被过度活化^[8],而且此通路还可促进 Mcl-1 的翻译从而增强其表达^[9]。因此,使用 NVP-BEZ235 抑制 PI3K/mTOR 通路活性并下调 Mcl-1 的表达可能是增强左旋棉酚抗癌效果的有效措施,本研究拟以肝癌细胞 HepG2 为模型对这一设想进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝细胞癌细胞系 HepG2 购自美国菌种保藏中心 (ATCC),由第三军医大学基础部生化教研室保存并传代。

1.1.2 试剂 胎牛血清、胰酶和 DMEM 高糖细胞培养基为美国 HyClone 公司产品;DMSO、左旋棉酚和 NVP-BEZ235 为美国 Sigma 公司产品;CCK-8 试剂盒为日本 Dojindo Laboratories 产品;细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、青霉素溶液和 Tubulin 抗体购自江苏碧云天生物技术公司;蛋白酶抑制剂为 Roche 公司产品;Mcl-1 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;mTOR、p-mTOR 抗体为美国 Cell Signaling Technology 公司产品;二抗、化学发光底物试剂盒以及细胞培养板为美国 Thermo 公司产品;PVDF 膜购自 Millipore 公司;牛血清白蛋白 (BSA) 购自 USB 公司;封闭蛋白粉购自武汉博士德公司。

1.2 细胞培养

HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素的 DMEM 高糖培养液中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,待其贴壁生长,常规换液和传代后,待细胞进入对数生长期,即可接种于细胞培养板中进行实验。

1.3 CCK-8 法检测左旋棉酚对细胞增殖的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板,用细胞计数板计数,每孔约 4×10^3 个细胞于 200 μ L 培养基中,待其完全贴壁后加药处理。分为对照组 (DMSO)、左旋棉酚处理组 (10 μ mol/L)、NVP-BEZ235 处理组 (50、100 nmol/L) 以及左旋棉酚与两种浓度 NVP-BEZ235 的联合处理组,共 6 组,每组设 3 个复孔。加药处理 36~48 h,待对照孔细胞长满后,将培养基弃去,各加入含 5 μ L CCK-8 检测试剂的 DMEM 溶液 100 μ L,于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内孵育 1~2 h。最后,在 450 nm 波长下测定光密度值 [D(450)],计算左旋棉酚、NVP-BEZ235 和联合处理组对细胞增殖的抑制率。细胞抑制率 = [对照孔 D(450) - 加药孔 D(450)] / 对照孔 D(450) \times 100%。

1.4 细胞总蛋白的提取和 Western blot 检测

加药处理结束后,胰酶消化细胞并经 PBS 洗涤后用 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min。于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清并用 BCA 法测量蛋白浓度,经浓度标化后进行 Western blot 检测。取 60 μ g 总蛋白,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将蛋白转至 PVDF 膜上。用 5% BSA 常温封闭 2 h,然后用 1:1 000 稀释的一抗 4 °C 孵育过夜,用含 0.1% Tween20 的

PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,之后用 1:10 000 稀释的二抗常温孵育 2 h,PBST 洗涤后用化学发光底物法将 PVDF 膜用 X 线胶片曝光。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

加药处理结束后,胰酶消化细胞,用 PBS 重悬后用 Annexin V 与碘化丙啶 (PI) 染色 30 min,之后用流式细胞仪进行信号检测,统计凋亡及不同细胞周期的细胞数目及比例。

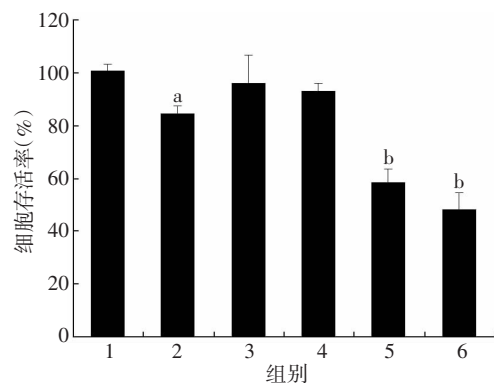
1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间方差分析和两两比较。

2 结果

2.1 NVP-BEZ235 联合左旋棉酚显著抑制 HepG2 细胞的增殖

采用 10 μ mol/L 左旋棉酚同 NVP-BEZ235 (50、100 nmol/L) 联合处理 HepG2 细胞,采用 CCK-8 法检测两种药物单用或联用对 HepG2 细胞的增殖抑制作用,结果见图 1。与对照组相比,左旋棉酚对于 HepG2 细胞有一定的杀伤作用;与左旋棉酚单独使用相比,NVP-BEZ235 和左旋棉酚联用可显著增强左旋棉酚对细胞增殖的抑制作用。



1:对照组;2:左旋棉酚 10 μ mol/L 处理组;3:NVP-BEZ235 50 nmol/L 处理组;4:NVP-BEZ235 100 nmol/L 处理组;5:左旋棉酚 10 μ mol/L 联合 NVP-BEZ235 50 nmol/L 处理组;6:左旋棉酚 10 μ mol/L 联合 NVP-BEZ235 100 nmol/L 处理组 a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与左旋棉酚 10 μ mol/L 处理组比较

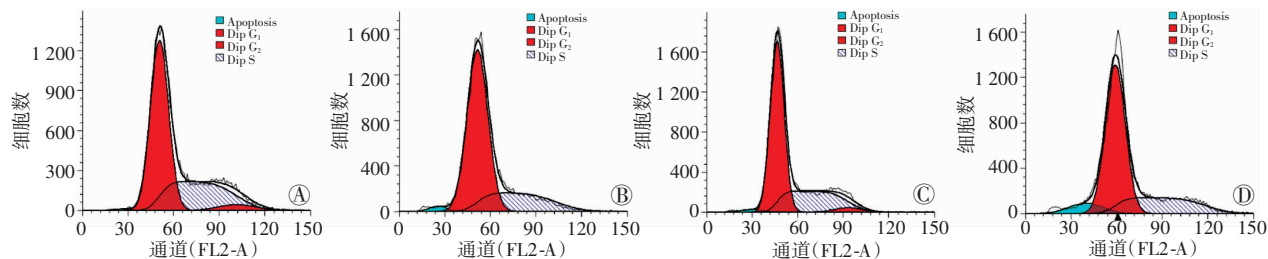
图1 NVP-BEZ235 同左旋棉酚联用对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

2.2 NVP-BEZ235 联合左旋棉酚增加 HepG2 细胞的凋亡

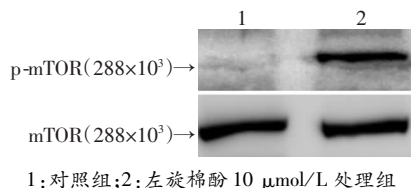
用左旋棉酚 (10 μ mol/L)、NVP-BEZ235 (100 nmol/L) 或二者联合处理 HepG2 细胞 24 h,然后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。如图 2 所示,左旋棉酚和 NVP-BEZ235 联合使用可明显增加 HepG2 细胞的凋亡率。

2.3 左旋棉酚增强 HepG2 细胞中 mTOR 磷酸化

采用 10 μ mol/L 左旋棉酚对 HepG2 细胞处理 24 h,Western blot 检测细胞中 mTOR 磷酸化水平和总 mTOR 蛋白水平。如图 3 所示,左旋棉酚可显著增加 mTOR 的磷酸化水平 [p-mTOR/mTOR 比值:对照组 (1.00 \pm 0.12),左旋棉酚 10 μ mol/L 处理组 (6.12 \pm 0.14), $P < 0.01$],导致 mTOR 活性增强。



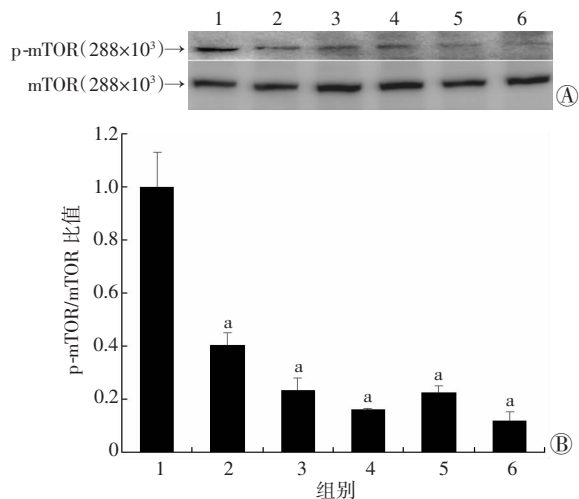
A: 对照组; B: 左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组; C: 3-NVP-BE235 100 nmol/L 处理组; D: 左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 联合 NVP-BE235 100 nmol/L 处理组
图2 NVP-BE235 同左旋棉酚联用对细胞凋亡的影响



1: 对照组; 2: 左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组
图3 Western blot 检测左旋棉酚处理 HepG2 细胞 24 h 对 mTOR 磷酸化水平的影响

2.4 NVP-BE235 剂量依赖性抑制 HepG2 细胞中 mTOR 活性

用不同浓度的 NVP-BE235 (10、50、100、200、500 nmol/L) 处理 HepG2 细胞 24 h, Western blot 检测 mTOR 的磷酸化状况。如图 4 所示, 与对照组相比, NVP-BE235 剂量依赖性抑制 HepG2 细胞中 mTOR 的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 从而抑制 mTOR 活性。

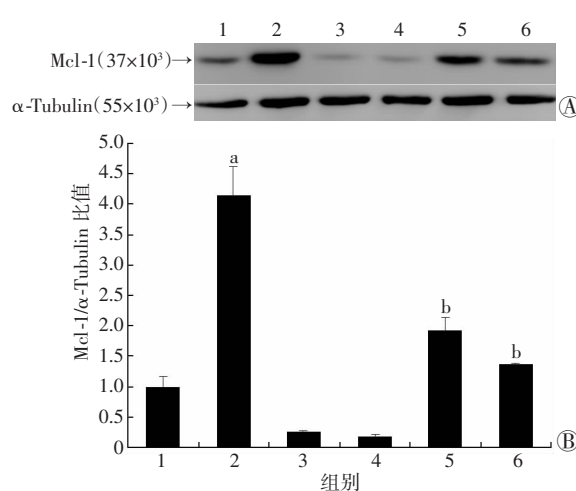


1: 对照组; 2: NVP-BE235 10 nmol/L 处理组; 3: NVP-BE235 50 nmol/L 处理组; 4: NVP-BE235 100 nmol/L 处理组; 5: NVP-BE235 200 nmol/L 处理组; 6: NVP-BE235 500 nmol/L 处理组
A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.01$, 与对照组比较

图4 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BE235 对 mTOR 蛋白磷酸化水平的影响

2.5 NVP-BE235 可抑制左旋棉酚对 Mcl-1 的上调作用

用不同浓度 (50、100 nmol/L) NVP-BE235 联合左旋棉酚处理 HepG2 细胞 24 h, Western blot 检测胞内 Mcl-1 和内参 $\alpha\text{-Tubulin}$ 的表达水平, 如图 5 所示, 左旋棉酚单独处理 HepG2 细胞导致 Mcl-1 的累积进而介导抵抗的发生, NVP-BE235 可以明显降低左旋棉酚对 Mcl-1 的上调作用。



1: 对照组; 2: 左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组; 3: NVP-BE235 50 nmol/L 处理组; 4: NVP-BE235 100 nmol/L 处理组; 5: 左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 联合 NVP-BE235 50 nmol/L 处理组; 6: 左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 联合 NVP-BE235 100 nmol/L 处理组
A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与左旋棉酚 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比较

图5 NVP-BE235 对左旋棉酚诱导的 Mcl-1 累积的影响

3 讨论

肝细胞癌目前已成为世界上第五大常见的肿瘤, 并且在所有肿瘤致死率中高居第三位, 尤其在我国, 乙肝相关的肝硬化以及肝癌的发生率高居不下, 目前尚无有效的治疗方法^[10]。PI3K/Akt/mTOR 通路作为细胞中重要的存活通路, 在肿瘤细胞中多为异常激活状态, 可能导致下游诸多靶基因的激活从而促进肿瘤细胞的生存, 因此是目前重要的肿瘤治疗靶点^[11]。NVP-BE235 作为新近开发的一种靶向抗肿瘤药物, 在多种肿瘤细胞中显示了较好的作用。有研究表明在肾细胞癌中, 体内外实验都证实索拉菲尼 (Sorafenib) 同 NVP-BE235 联合用药得到了比药物单独作用更加明显的杀细胞作用^[12]; 在胰腺导管细胞癌中, 联合应用一线化疗药物吉西他滨和 NVP-BE235 在体内及体外实验中也取得了较好的杀伤肿瘤细胞效果^[13]。NVP-BE235 还可以通过改变肿瘤微环境使肿瘤的血管形态正常化从而达到增敏肿瘤的放疗活性的治疗效果^[14], 因此在肿瘤治疗中可能具有较广阔的临床应用前景。

左旋棉酚作为一种天然化合物,目前普遍认为其主要通过同BH3样蛋白竞争Bcl-2的BH3结构域发挥作用,激活促凋亡蛋白而促进细胞凋亡^[15]。同时左旋棉酚因具有良好的药动学活性以及低毒性而进入临床II期试验,取得了良好的临床效果^[5]。随着Bcl-2靶向药物研究的深入,有更多、疗效更好的Bcl-2靶向药物被研究出来的同时,发现在抑制了一种抗凋亡蛋白Bcl-2的同时,另一种抗凋亡蛋白Mcl-1会诱导性上调而同促凋亡蛋白Bak和Bax结合,不能在线粒体膜表明发生寡聚而诱导内源性凋亡的发生。Mcl-1作为抗凋亡家族中的重要成员,具有和Bcl-2相似的功能,可以通过与促凋亡蛋白结合从而抑制凋亡的发生。

因此,如何减低Bcl-2抑制剂导致的Mcl-1上调进而缓解抵抗的发生成为Bcl-2靶向药物临床应用的关键,目前有多篇文献报道通过联合用药来缓解抵抗发生,进而达到增敏Bcl-2靶向药物杀伤细胞作用。通过siRNA或者周期素依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制剂下调Mcl-1的表达在人白血病细胞中可以增敏ABT-737的杀细胞作用^[16];靶向药物索拉菲尼可以通过下调Mcl-1和激活Bak进而增敏左旋棉酚在杀伤前列腺癌细胞中的作用^[6];伊马替尼(Imatinib)可以通过下调Mcl-1增敏左旋棉酚在人慢性髓细胞白血病中的治疗作用^[17];铂类化合物也可以通过调控Mcl-1/Noxa轴^[18]并促进Mcl-1降解而可以增敏ABT-737的杀细胞作用^[19]。

mTOR作为PI3K下游的信号转导分子,具有丝、苏氨酸激酶活性,在细胞的生长、增殖、分化以及凋亡中都发挥重要的作用,目前发现其与肿瘤的关系密切,许多癌基因例如c-myc、cyclinD的水平均受到其调控。有文献表明mTOR可以促进延长因子eIF4E和eIF4F的聚合,促进Mcl-1的翻译来促进细胞的存活,因此Mcl-1作为一个癌基因其水平也受到mTOR的调控^[9]。本研究创新性地采用PI3K/mTOR双抑制剂NVP-BEZ235同左旋棉酚联用,通过抑制mTOR的活性达到降低Mcl-1的表达水平,进而增敏Bcl-2靶向药物的作用。联合用药作为一种治疗趋势,可以明显降低药物用量并减少副作用的发生,因此可以作为一种新的治疗尝试,给临床上肿瘤的治疗带来一些新的启示。

参考文献:

[1] Ready N, Karaseva N A, Orlov S V, et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase 2 study of the proapoptotic agent AT-101 plus docetaxel, in second-line non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(4): 781-785.
[2] Bagstrom M Q, Qi Y, Koczywas M, et al. A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(10): 1757-1760.

[3] Liu G, Kelly W K, Wilding G, et al. An open-label, multicenter, phase I/II study of single-agent AT-101 in men with castrate-resistant prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(9): 3172-3176.
[4] Balakrishnan K, Wierda W G, Keating M J, et al. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells[J]. Blood, 2008, 112(5): 1971-1980.
[5] Lessene G, Czabotar P E, Colman P M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(12): 989-1000.
[6] Lian J, Ni Z, Dai X, et al. Sorafenib sensitizes (-)-gossypol-induced growth suppression in androgen-independent prostate cancer cells via Mcl-1 inhibition and Bak activation[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(2): 416-426.
[7] Maira S M, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent *in vivo* antitumor activity[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 1851-1863.
[8] Masuda M, Shimomura M, Kobayashi K, et al. Growth inhibition by NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Oncol Rep, 2011, 26(5): 1273-1279.
[9] Mills J R, Hippo Y, Robert F, et al. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(31): 10853-10858.
[10] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
[11] Engelman J A, Luo J, Cantley L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism[J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(8): 606-619.
[12] Roulin D, Waselle L, Dormond-Meuwly A, et al. Targeting renal cell carcinoma with NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in combination with sorafenib[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 90.
[13] Awasthi N, Yen P L, Schwarz M A, et al. The efficacy of a novel, dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 to enhance chemotherapy and antiangiogenic response in pancreatic cancer[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(3): 784-791.
[14] Fokas E, Im J H, Hill S, et al. Dual inhibition of the PI3K/mTOR pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature[J]. Cancer Res, 2012, 72(1): 239-248.
[15] Kang M H, Reynolds C P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1126-1132.
[16] Chen S, Dai Y, Harada H, et al. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation[J]. Cancer Res, 2007, 67(2): 782-791.
[17] Meng Y, Li Y, Li J, et al. (-)-Gossypol and its combination with imatinib induce apoptosis in human chronic myeloid leukemic cells[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48(11): 2204-2212.
[18] Simonin K, N' Diaye M, Lheureux S, et al. Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis[J]. Apoptosis, 2013, 18(4): 492-508.
[19] Zhang C, Cai T, Zhu H, et al. Synergistic antitumor activity of gemcitabine and ABT-737 *in vitro* and *in vivo* through disrupting the interaction of USP9X and Mcl-1[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(7): 1264-1275.

(收稿:2013-04-12;修回:2013-06-02)

(编辑 郭建秀)