

异硫氰酸苯己酯对 K562/G01 细胞伊马替尼耐药性的影响

吴荣娟 黄轶群 马旭东

【摘要】目的 体外观察异硫氰酸苯己酯(PHI)对人慢性髓性白血病细胞株 K562/G01 细胞伊马替尼耐药性的影响,探讨其可能的机制。**方法** 采用 MTT 法检测不同浓度的 PHI 和伊马替尼单独或联合处理对 K562/G01 细胞增殖的抑制作用。流式细胞术检测不同浓度的 PHI 和(或)伊马替尼作用下 K562/G01 细胞的凋亡率。Western blot 检测 PHI 处理 K562/G01 细胞后 P-gp、P210^{bcr-abl} 蛋白、磷酸化 P210^{bcr-abl} 蛋白(p-P210^{bcr-abl})表达水平的变化。**结果** PHI 单独处理 24 h 可抑制 K562/G01 细胞增殖,诱导细胞凋亡。PHI 浓度由 0 增至 40 μmol/L,细胞增殖抑制率由 0 增至(51.22 ± 1.41)%,凋亡率由(3.76 ± 1.46)% 增至(35.35 ± 3.70)%。浓度分别为 10、20、40 μmol/L 的 PHI 与不同浓度伊马替尼联合处理后,伊马替尼的 IC₅₀ 分别为(10.49 ± 1.24)、(6.33 ± 1.42)、(0.85 ± 0.17) μmol/L。PHI 20 μmol/L 和浓度为 10、20 μmol/L 的伊马替尼分别共同作用 24 h 后,K562/G01 细胞凋亡率分别为(43.62 ± 4.23)% 和(55.41 ± 4.35)%,较单用伊马替尼组及单用 PHI 组均明显升高。PHI 浓度由 0 增至 40 μmol/L 分别作用 7 h 后,K562/G01 细胞 P210^{bcr-abl}/β-actin 比值由 0.944 ± 0.034 降至 0.392 ± 0.025,p-P210^{bcr-abl}/β-actin 比值由 0.906 ± 0.019 降至 0.361 ± 0.021,但 P-gp 表达无明显变化。**结论** PHI 能抑制 K562/G01 细胞增殖,诱导细胞凋亡。PHI 与伊马替尼联合有协同作用,可部分逆转细胞对伊马替尼的耐药,其机制可能与抑制 P210^{bcr-abl} 和 p-P210^{bcr-abl} 蛋白表达有关。

【关键词】 异硫氰酸苯己酯; 伊马替尼; K562/G01 细胞; P-糖蛋白; bcr-abl 融合蛋白

Effect of phenylhexyl isothiocyanate on drug – resistance to imatinib in K562/G01 cell line WU Rong-juan, HUANG Yi-qun, MA Xu-dong. Department of Hematology, Zhangzhou Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, China

Corresponding author: MA Xu-dong, Email: xudongma05@yahoo.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of phenylhexyl isothiocyanate (PHI) on the drug-resistance to imatinib in K562/G01 cell line and to elucidate its possible mechanisms. **Methods** MTT assay was employed to access K562/G01 cell growth inhibition after exposure to PHI and/or imatinib at different concentrations. Apoptotic rate of K562/G01 cells was measured by flow cytometry. The levels of P-gp, P210^{bcr-abl} and p-P210^{bcr-abl} protein were detected by Western blot. **Results** PHI inhibited proliferation and induced apoptosis of K562/G01 cells after treated with PHI alone for 24 h. PHI concentration increased from 0 to 40 μmol/L, the inhibitory rate of cell proliferation from 0 to (51.22 ± 1.41)%, and the apoptosis rate from (3.76 ± 1.46)% to (35.35 ± 3.70)%. Combination of 10, 20, 40 μmol/L PHI and various concentrations of imatinib, IC₅₀s of imatinib were (10.49 ± 1.24), (6.33 ± 1.42), and (0.85 ± 0.17) μmol/L, respectively. When K562/G01 cells treated with 20 μmol/L PHI combined with 10 and 20 μmol/L imatinib for 24 hours, apoptosis rate were (43.62 ± 4.23)% and (55.41 ± 4.35)%, respectively, being significantly higher than that with imatinib or PHI alone. PHI concentrations increased from 0 to 40 μmol/L for 7 hours, the P210^{bcr-abl}/β-actin decreased from (0.944 ± 0.034) to (0.392 ± 0.025), and the p-P210^{bcr-abl}/β-actin decreased from (0.906 ± 0.019) to (0.361 ± 0.021), while the alteration of P-gp was not seen. **Conclusions** PHI inhibits the proliferation and induces apoptosis of K562/G01 cell line. PHI has synergistic effect with imatinib. It partially reverses the drug-resistance to imatinib. The mechanism of reversal of drug resistance in K562/G01 cells might be by inhibiting P210^{bcr-abl} and p-P210^{bcr-abl}.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.02.013

基金项目:卫生部科学研究基金;福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ2008-2-55);福建医科大学科学研究发展专项基金计划项目(FZS08018);福建省漳州市 2010 科技计划项目(Z2010080)

作者单位:363000 福建医科大学附属漳州市医院血液科

通信作者:马旭东, Email: xudongma05@yahoo.com

【 Key words 】 Phenylhexyl isothiocyanate (PHI); Imatinib; K562/G01 cell line; P-glycoprotein; Fusion proteins, bcr-abl

甲磺酸伊马替尼(IM)是作用于 bcr-abl 酪氨酸激酶的抑制剂(TKI),是目前治疗慢性髓性白血病(CML)的一线药物。随着 IM 治疗时间的延长,耐药导致的治疗失败已严重影响了其临床应用。研究显示组蛋白去乙酰化酶抑制剂可有效逆转肿瘤细胞的耐药性^[1],且不引起正常细胞增殖停滞或凋亡^[2]。

异硫氰酸苯己酯(PHI)是天然的异硫氰酸盐(ITC)人工合成衍生物,具有组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制活性,上调组蛋白乙酰转移酶水平,调控 HL-60 及 Molt-4 细胞的乙酰化及甲基化水平并诱导细胞凋亡^[3-4]。为探讨 PHI 能否有效降低细胞对 IM 的耐药性及其可能机制,我们以人 CML IM 耐药株 K562/G01 为模型,观察 PHI 对耐药白血病细胞增殖、凋亡及耐药性的影响。

材料和方法

1. 主要试剂:PHI 购自美国 LKT Laboratories 公司,以 75% 甲醇配成 5 mmol/L 存储液,0.22 μm 微孔滤膜正压过滤后 -20 ℃ 保存。甲磺酸 IM 胶囊购自瑞士 Novartis 公司,溶解于灭菌注射用水中,配成 10 mmol/L 存储液,0.22 μm 微孔滤膜正压过滤后 -20 ℃ 保存。RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司,膜联蛋白 V/碘化丙锭(Annexin V/PI)试剂盒购自美国 BD 公司。P-gp、P210^{bcr-abl}、磷酸化 P210^{bcr-abl} (p-P210^{bcr-abl});β-actin 单克隆抗体(单抗)及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

2. 细胞株及细胞培养:K562 细胞系购自中国科学院上海细胞库。K562/G01 细胞株购自中国医学科学院血液学研究所,其主要的耐药机制为上调 bcr-abl 融合基因及其融合蛋白 P210^{bcr-abl} 表达,增强 P210^{bcr-abl} 磷酸化活性^[5]。细胞用含 10% 胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/ml + 链霉素 100 μg/ml)及 2 mmol/L 左旋谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液置 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱培养。K562/G01 细胞培养体系中含 IM(终浓度 4 μmol/L),保持其耐药性。实验时改用无 IM 的培养液培养。

3. MTT 法检测 PHI 和 IM 单独或联合处理对细胞增殖的影响:取对数生长期 K562/G01 细胞,将其密度调整为 1 × 10⁵/ml 接种于 96 孔细胞培养板,每

孔 100 μl。PHI 单独处理组分别加入 PHI(终浓度分别为 10、20、40、80 μmol/L);PHI 联合 IM 处理组分别加入终浓度为 10、20、40 μmol/L PHI,并在每个处理浓度分别加入 1、5、10、20、40 μmol/L IM;同时设不加药物的对照组,每组设 3 个平行孔。饱和湿度条件下培养 24 h,加 5 mg/ml MTT 10 μl,继续培养 4 h,离心弃上清后,每孔加 100 μl 二甲基亚砜(DMSO),充分振荡混匀,用酶标仪测 492 nm 和 630 nm 双波长吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率及 IM 的半数抑制浓度(IC₅₀),计算 K562/G01 细胞的相对耐药倍数。实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率(\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$$\text{耐药倍数} = \frac{IC_{50\text{耐药细胞}}}{IC_{50\text{敏感细胞}}}$$

4. 流式细胞术分析细胞凋亡:将 2 × 10⁶ 细胞接种于含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于 75 ml 培养瓶中培养,每瓶接种细胞密度为 2 × 10⁵/ml。PHI 单独处理组浓度分别为 0、10、20、40 μmol/L;IM 单独处理组浓度分别为 0、5、10、20 μmol/L;联合用药组为:PHI 20 μmol/L + IM 10 μmol/L;PHI 20 μmol/L + IM 20 μmol/L。作用 24 h 后,室温离心(1000 r/min × 5 min)收集处理后细胞。按照 BD 公司试剂盒说明书操作。实验重复 3 次。

5. Western blot 检测 PHI 作用前后 K562 及 K562/G01 细胞 P-gp、P210^{bcr-abl}、p-P210^{bcr-abl} 的表达:取对数生长期细胞,调整细胞密度为 2 × 10⁵/ml,接种于 75 ml 培养瓶内,加入不同浓度 PHI(终浓度为 0、10、20、40 μmol/L)培养 3 和 7 h 后收集细胞。提取总蛋白,用 Bradford 法测定含量,SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,加入 P-gp、P210^{bcr-abl}、p-P210^{bcr-abl} 和 β-actin 一抗(滴度均为 1:500),4 ℃ 过夜,洗膜 5 次,加入二抗,常规处理后应用 AlphaDigiDoc 图像分析软件进行分析比较。

6. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. PHI 对 K562/G01 细胞增殖抑制及 IM 耐药的逆转作用:PHI 对 K562/G01 细胞有明显的增殖抑制作用,且呈浓度依赖性(图 1)。IM 作用于



K562/G01 细胞的 IC_{50} 为 $(17.56 \pm 1.31) \mu\text{mol/L}$ 。在含 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHI 的培养体系中,IM 作用 24 h 的 IC_{50} 值分别为 (10.49 ± 1.24) 、 (6.33 ± 1.42) 和 $(0.85 \pm 0.17) \mu\text{mol/L}$ (见表 1), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 40.56, P < 0.05$)。提示随着 PHI 浓度的增加, 细胞对 IM 的耐药性逐渐下降。

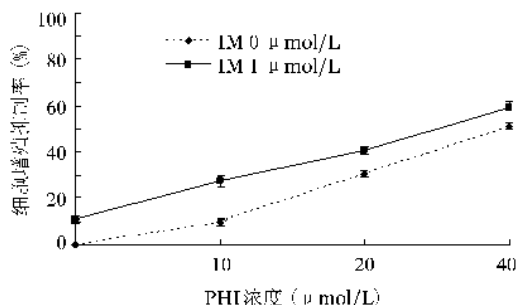
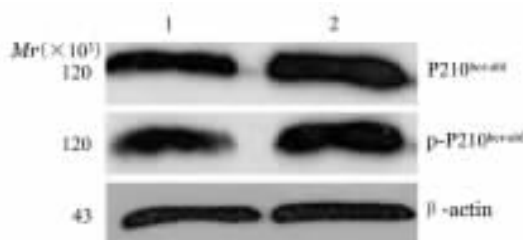


图 1 不同浓度异硫氰酸苯己酯 (PHI) 单独及联合 1 $\mu\text{mol/L}$ 伊马替尼 (IM) 作用 24 h 对 K562/G01 细胞增殖的影响

2. PHI 诱导 K562/G01 细胞凋亡作用: PHI 浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时, K562/G01 细胞凋亡率分别为 $(3.76 \pm 1.46)\%$ 、 $(8.89 \pm 2.31)\%$ 、 $(18.10 \pm 3.56)\%$ 、 $(35.35 \pm 3.70)\%$ ($\chi^2 = 34.27, P < 0.05$)。IM 浓度为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率分别为 $(3.76 \pm 1.46)\%$ 、 $(5.69 \pm 1.67)\%$ 、 $(17.10 \pm 2.25)\%$ 、 $(25.51 \pm 3.35)\%$ ($\chi^2 = 31.32, P < 0.05$), 提示虽然 K562/G01 细胞对 IM 耐药, 但较高浓度的 IM 还是能诱导 K562/G01 细胞凋亡。联合应用 PHI 及 IM 有协同作用。PHI 20 $\mu\text{mol/L}$ + IM 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, K562/G01 细胞凋亡率为 $(43.62 \pm 4.23)\%$, PHI 20 $\mu\text{mol/L}$ + IM 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, 细胞凋亡率为 $(55.41 \pm 4.35)\%$, 对比相同浓度的单独用药组均有明显的升高 ($\chi^2 = 48.21, P < 0.05$)。

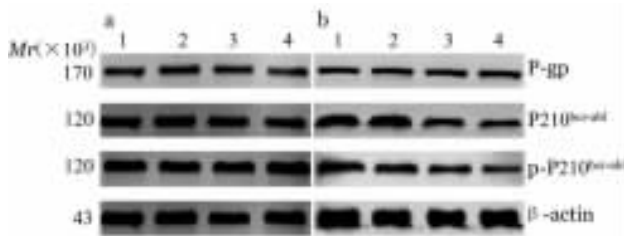
3. PHI 对 K562/G01 细胞 P-gp 及 P210^{ber-abl}、p-P210^{ber-abl} 表达的影响: 未经药物处理的 K562/G01 细胞 P210^{ber-abl}、p-P210^{ber-abl} 呈高水平表达, P210^{ber-abl}/

β -actin 比值为 1.982 ± 0.063 , 与 K562 细胞 (1.241 ± 0.074) 相比差异有统计学意义 ($\chi^2 = 17.24, P < 0.05$); p-P210^{ber-abl}/ β -actin 比值为 1.341 ± 0.032 , 与 K562 细胞 (0.963 ± 0.035) 相比差异亦有统计学意义 ($\chi^2 = 15.61, P < 0.05$) (图 2)。PHI 可以下调 K562/G01 细胞 P210^{ber-abl} 及其磷酸化水平, 但对 P-gp 表达水平无明显影响。浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PHI 作用 3 h 后, P-gp、P210^{ber-abl}、p-P210^{ber-abl} 表达水平均无明显变化; 而上述浓度 PHI 作用于 K562/G01 细胞 7 h 后, P210^{ber-abl}/ β -actin 比值分别为 0.944 ± 0.034 、 0.806 ± 0.028 、 0.561 ± 0.027 和 0.392 ± 0.025 ($\chi^2 = 11.43, P < 0.05$)。p-P210^{ber-abl}/ β -actin 比值分别为 0.906 ± 0.019 、 0.749 ± 0.031 、 0.624 ± 0.037 、 0.361 ± 0.021 ($\chi^2 = 14.81, P < 0.05$); P-gp/ β -actin 比值分别为 0.537 ± 0.024 、 0.545 ± 0.035 、 0.574 ± 0.026 、 0.549 ± 0.020 ($\chi^2 = 2.75, P > 0.05$) (图 3)。



1: K562 细胞; 2: K562/G01 细胞

图 2 K562 与 K562/G01 细胞 P210^{ber-abl}、p-P210^{ber-abl} 的表达



a: 处理 3 h; b: 处理 7 h; 1~4: 分别为 PHI 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理组
图 3 异硫氰酸苯己酯 (PHI) 对 K562/G01 细胞 P-gp、P210^{ber-abl} 和 p-P210^{ber-abl} 表达水平的影响

表 1 不同浓度异硫氰酸苯己酯 (PHI) 和伊马替尼作用后 K562/G01 细胞增殖抑制率 (%) 的变化

伊马替尼 ($\mu\text{mol/L}$)	PHI 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)			
	0	10	20	40
0	0	9.62 ± 1.20	30.27 ± 1.39	51.22 ± 1.41
1	10.92 ± 1.55	27.43 ± 2.42	40.67 ± 1.54	59.52 ± 2.45
5	26.68 ± 2.16	35.62 ± 2.17	48.24 ± 1.79	66.30 ± 1.83
10	39.34 ± 2.27	49.33 ± 2.48	57.24 ± 1.92	72.24 ± 1.32
20	54.26 ± 2.56	58.46 ± 1.47	69.24 ± 2.38	78.22 ± 1.82
40	62.12 ± 1.45	70.01 ± 1.42	79.21 ± 2.15	87.21 ± 0.97
IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	17.56 ± 1.31	10.49 ± 1.24^a	6.33 ± 1.42^a	0.85 ± 0.17^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。实验重复 3 次

讨 论

K562/G01 细胞株是以 K562 细胞作为亲代细胞,通过长期低剂量接触 IM 诱导而成的耐药细胞株。研究显示,其主要的耐药机制为上调 bcr-abl 融合基因及其融合蛋白 P210^{bcr-abl} 的表达,增强 P210^{bcr-abl} 磷酸化活性,并与多药耐药基因 mdr1 及其蛋白产物 P-gp 表达有关^[5]。本实验结果显示,与 K562 细胞相比,K562/G01 细胞的 P210^{bcr-abl} 及 p-P210^{bcr-abl} 水平均上调,与文献报道一致。

Barnes 等^[6]研究认为,bcr-abl 融合蛋白高表达的患者易出现 IM 耐药。因此在耐药细胞中降低 P210^{bcr-abl} 表达至关重要。P210^{bcr-abl} 的降低有助于克服耐药。

我们的实验结果显示,PHI 可抑制 K562/G01 细胞增殖,诱导细胞凋亡。PHI 浓度由 0 上调至 40 $\mu\text{mol/L}$,细胞增殖抑制率由 0 增至 (51.22 \pm 1.41)%,而细胞凋亡率由 (3.76 \pm 1.46)% 升至 (35.35 \pm 3.70)%。PHI 与 IM 联用后细胞凋亡率对比相同浓度的单独用药组均有明显的升高,提示 PHI 与 IM 可以协同作用诱导 K562/G01 细胞凋亡。随着 PHI 浓度增加至 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$,IM 的 IC₅₀ 值呈下降趋势,相对耐药指数分别下降 40.26%、63.95%、95.16%,提示 PHI 可部分逆转细胞对 IM 的耐药。进一步研究表明,PHI 作用后 P210^{bcr-abl} 蛋白、p-P210^{bcr-abl} 蛋白表达呈下降趋势,提示 PHI 逆转 K562/G01 细胞对 IM 的耐药性可能与诱导细胞凋亡及下调 P210^{bcr-abl} 蛋白表达、降低 P210^{bcr-abl} 蛋白磷酸化有关。研究发现 PHI 对 P-gp 没有明显影响。

多药耐药性的产生与肿瘤细胞表观遗传改变密切相关^[7]。目前认为,mdr1 的转录最初是由启动子 DNA 甲基化控制的。mdr1 启动子 CpG 岛高甲基化可导致 mdr1 基因沉默,而 CpG 的低甲基化与 mdr1 转录激活有关。El-Osta 等^[8]进一步研究显示,DNA 去甲基化与组蛋白乙酰化具有协同作用。

我们的前期实验结果表明,PHI 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可以提高 K562/G01 细胞组蛋白 H3、H4 乙酰化水平,上调组蛋白 H3K4 甲基化,下调 H3K9 甲基化。而 H3K9 甲基化可能是指导 DNA 甲基化的一种常规信号^[9]。Huo 等^[10]研究显示,H3K4 的甲基化能导致 mdr1 基因的活化。还有研究表明,组蛋白 H3 和 H4 高乙酰化也可参与多药耐药的形^[11]。因此推测,PHI 可以通过下调 H3K9 甲基化而抑制 mdr1 基因启动子的 DNA 甲基

化,激活 mdr1 基因转录。同时可以通过上调 H3K4 及提高组蛋白 H3、H4 乙酰化水平进一步使 mdr1 基因活化,从而提高 P-gp 水平。然而这与我们的实验结果并不相符。有学者发现,去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素(TSA)在肺小细胞肺癌耐药细胞株中可以下调 P-gp 的表达,这个作用是在转录水平实现的,与启动子的甲基化无关^[12]。PHI 是否也可通过类似的机制下调 mdr1 的表达,抑或是还存在着某些未知的机制,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Tsurutani J, Soda H, Oka M, et al. Antiproliferative effects of the histone deacetylase inhibitor FR901228 on small-cell lung cancer lines and drug-resistant sublines. *Int J Cancer*, 2003, 104: 238-242.
- [2] Brinkmann H, Dahler AL, Popa C, et al. Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibiting in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001, 276: 22491-22499.
- [3] Ma X, Fang Y, Beklemisheva A, et al. Phenylhexyl isothiocyanate inhibits histone deacetylases and remodels chromatin to induce growth arrest in human leukemia cells. *Int J Oncol*, 2006, 28: 1287-1293.
- [4] 黄轶群, 马旭东, 郑瑞玟, 等. 异硫氰酸苯己酯对 Molt-4 细胞组蛋白甲基化、乙酰化调控的实验研究. *中华血液学杂志*, 2007, 28: 612-616.
- [5] 齐静, 彭晖, 顾振纶, 等. 伊马替尼耐药的 K562 细胞系的建立及其生物学特性研究. *中华血液学杂志*, 2004, 25: 337-341.
- [6] Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, et al. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, 2005, 65: 8912-8919.
- [7] Baker EK, El-Osta A. The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Exp Cell Res*, 2003, 290: 177-194.
- [8] El-Osta A, Kantharidis P, Zalberg JR, et al. Precipitous release of methyl-CPG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 1844-1857.
- [9] Smallwood A, Estève PO, Pradhan S, et al. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev*, 2007, 21: 1169-1178.
- [10] Huo H, Magro PG, Pietsch EC, et al. Histone methyltransferase MLL1 regulates MDR1 transcription and chemoresistance. *Cancer Res*, 2010, 70: 8726-8735.
- [11] Huang C, Cao P, Xie Z. Relation of promoter methylation of mdr1-gene and histone acetylation status with multidrug resistance in MCF-7/Adr cells. *中南大学学报医学版*, 2009, 34: 369-374.
- [12] El-Khoury V, Breuzard G, Fourré N, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model. *Br J Cancer*, 2007, 97: 562-373.

(收稿日期:2012-08-14)

(本文编辑:徐丽娟)