

MLN4924 促进人肺腺癌细胞株 A549 凋亡的机制研究

董 扬 黎友伦

摘要 目的:观察 MLN4924 对人肺腺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响,探讨 MLN4924 促进凋亡的作用机制。**方法:**不同浓度的 MLN4924 作用细胞不同时间后,采用 CCK-8 检测细胞增殖抑制率;Hoechst33342 荧光染色、流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期;Western blot 检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、NF- κ B p65 及 CDT1 相对表达量。**结果:**MLN4924 能够明显抑制 A549 细胞的增殖,并且具有浓度和时间依赖性。流式细胞仪检测结果显示药物作用后,细胞被阻滞在 S 期。Western blot 结果显示药物作用后细胞内 Caspase-3、CDT1 蛋白的表达量增加,而 NF- κ B p65 的表达量减少。**结论:**MLN4924 能够明显抑制 A549 细胞增殖、促进细胞凋亡,其相关机制为 MLN4924 可阻滞细胞于 S 期,增加 Caspase-3 蛋白表达,抑制 NF- κ B 通路的激活。

关键词 MLN4924 肺癌 增殖 凋亡 DNA 再复制

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.24.017

In vitro Study on the Mechanism of MLN4924-induced Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549

Yang DONG, Youlun LI

Correspondence to: Youlun Li; E-mail: liyoulun83@163.com

Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract Objective: To study the effect of MLN4924 on the proliferation and apoptosis of lung epithelial carcinoma A549 cells. **Methods:** A549 cells were treated with MLN4924 at different concentrations and incubation times. The inhibition rate of cell growth was detected using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Apoptosis was observed using Hoechst 33342 and flow cytometry. The protein expression of the associated proteins in cell apoptosis, including caspase-3, NF- κ B p65, and CDT1, was determined through Western blot analysis. **Results:** The proliferation of A549 cells decreased when the concentration of MLN4924 increased or the incubation time was prolonged. MLN4924 induced S phase cell cycle arrest. The protein expression of the associated proteins caspase-3 and CDT1 was higher than that of the control group. NF- κ B p65 was lower than that in the control group. **Conclusion:** MLN4924 effectively inhibited the proliferation and induced cell apoptosis in A549 cells. MLN4924 treatment induced the S phase cell cycle arrest, increased the caspase-3 protein expression, and inhibited the NF- κ B pathway activation.

Keywords MLN4924; Lung cancer; Proliferation; Apoptosis; DNA replication

MLN4924 是最近报道的一种选择性的 NEDD8 (neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated) 活化酶的小分子抑制剂^[1], 能够与 NEDD8 活化酶结合形成 NEDD8 活化酶-MLN4924 化合物, 从而抑制 NEDD8 活化酶, 控制部分依赖于 CRL (cullin-RING ligase) 酶的泛素化途径, 最终影响相关蛋白质的降解^[2]。目前有研究显示 NEDD8 活化酶有望成为抗肿瘤药物的新靶点^[3], 而 MLN4924 作为 NEDD8 活化酶的抑制剂可能成为新型抗肿瘤药物^[4]。目前报道 MLN4924 抗肿瘤作用与促进细胞凋亡、衰老、自噬有关, 但是具体机制尚不

清楚^[5-8]。本研究以不同浓度 MLN4924 作用于人肺腺癌 A549 细胞, 观察其对于 A549 细胞形态、增殖、凋亡、细胞周期的影响, 探讨其促进肿瘤细胞凋亡的相关机制, 为其临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

A549 细胞株为重庆医科大学第一附属医院肺科实验室冻存, 改良型 RPM1-1640 培养基、胎牛血清、胰酶溶液购自 Hyelone 公司; DMSO 购自 Sigma 公司; CDT1 购自 Abgent 公司; CCK-8、Hoechst33342 染色液、Caspase-3 抗体、NF- κ B p65 抗体、SDS-PAGE 凝

胶配制试剂盒等均购自碧云天生物技术有限公司。MLN4924购自TCR公司,用DMSO溶解,-20℃保存,临用前解冻,用RPM1-1640培养基稀释到所需浓度,使DMSO的终浓度<0.1%。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌A549细胞接种于100 mL培养瓶中,培养基为含10%的胎牛血清、10 000 U/L的青霉素和0.1 g/L的链霉素的RPM1-1640,置入37℃、5%CO₂培养箱孵育,待细胞融合度70%~80%,用胰酶进行消化,计数、传代。

1.2.2 CCK-8检测细胞增殖抑制率 调整细胞浓度为1500个/100 μL,各取100 μL细胞悬液接种于96孔培养板。将培养板移入培养箱,在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养24 h,分别加入含有不同浓度MLN4924的RPM1-1640培养液200 μL。设立对照组,对照组加入200 μL的空白培养基。MLN4924组加入不同剂量的MLN4924溶液,使其终浓度为0.001,0.01,0.1,1,10 μmol/L。加药组和对照组均设立3个复孔,继续将培养板移入培养箱中培养48、72 h后,每孔加入20 μL CCK-8溶液,在培养箱内继续孵育1.5 h后用酶标仪检测吸光值,检测波长为450 nm,测量每孔吸光值(A)。细胞生长抑制率(%)=(1-加药组A值/对照组A值)×100%。

1.2.3 Hoechst33342染色检测细胞凋亡 取对数期细胞制备成细胞悬液,并按2×10⁴个/孔接种于24孔板中,待贴壁后加入含不同药物浓度的培养液,并设置对照组,置入培养箱中继续培养48h后洗净培养液,PBS冲洗2次,每孔加入1 mL Hoechst33342染色液,培养箱内继续培养30 min,用PBS洗2次,置于荧光显微镜下观察。实验重复3次。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 取对数期生长的A549细胞,以浓度1×10⁶个/mL接种于6孔板,每孔1 mL,置于培养箱中过夜。按浓度0.25、0.5、1 μM加入药物,同时设立对照组。置于培养箱继续孵育48 h,胰酶消化,PBS洗涤2次,1 000 r/min离心5 min收集细胞,70%乙醇4℃固定过夜,加入RNAase A 3 μL至终浓度50 μg/mL,37℃恒温水浴1 h,碘化丙啶(PI)避光染色,流式细胞仪测定细胞周期。实验重复3次。

1.2.5 流式细胞仪测定细胞凋亡 细胞处理及分组同细胞周期检测实验。细胞培养48 h后收集细胞,将细胞悬于500mL的Binding Buffer中,加入FITC标记的Annexin2V(20 μg/mL)5 μL以及PI染液(50 μg/mL)10 μL,轻轻混匀;室温、避光、孵育10min。在1h进行流式细胞仪检测。实验重复3次。

1.2.6 Western blot检测 取药物处理48 h后的A549细胞,并设置相应对照组,用1×SDS裂解,提取总蛋

白,BCA法进行蛋白定量,取等量蛋白(20 μg),经SDS-PAGE电泳分离,将蛋白转移到PVDF膜上。5%脱脂奶粉(TBS、0.1% Tween-20)封闭1 h,分别加入Caspase-3抗体(1:1 000)、CDT1(1:400)、NF-κB p65抗体(1:800)。4℃过夜,1×TBST(1% Tween-20,TBS)漂洗3次,10 min/次;二抗体(1:800),室温孵育2 h。Actin作为内参照。ECL化学发光剂孵育,Bio-Rad凝胶成像系统采集图片,结果采用Quantity One软件分析。实验重复3次。

1.3 统计学处理

不同药物浓度、处理不同时间的细胞增殖抑制率实验结果,使用SPSS 19.0进行方差分析,事后检验采用SNK方法,检验水平为α=0.01。流式细胞仪检测凋亡率和细胞周期结果以表示,采用SPSS 19.0统计软件单因素方差分析SNK方法,检验水平为α=0.01。以P<0.01为有统计学意义。

2 结果

2.1 MLN4924对A549细胞增殖的抑制作用

MLN4924作用48 h时IC₅₀(半数抑制浓度)为0.5 μM、72 h IC₅₀约为0.2 μM。并且随着剂量增加和时间延长,抑制效果有增强趋势(图1)。同一浓度不同时间之间除高浓度10 μM组48 h与72 h之间无统计学意义(P>0.01)外,其他时间两两比较有显著性统计学差异(P<0.001);同一时浓度之间比较,除0.001、0.01 μM浓度之间差异无统计学意义外(P>0.01),其他浓度两两比较均有显著性差异。

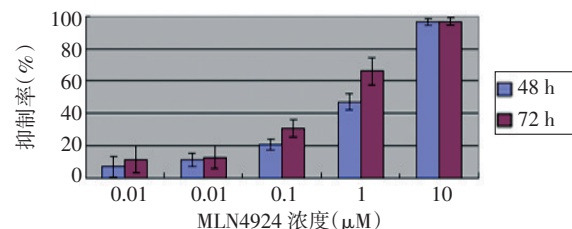


图1 不同时间不同浓度MLN4924对A549细胞生长的抑制作用

Figure 1 Inhibition rate of MLN4924 in A549 cells at different time periods and concentrations

2.2 Hoechst 33342染色检测结果

用不同浓度MLN4924处理细胞48 h后,通过Hoechst 33342染色,荧光显微镜下观察细胞凋亡效应(图2)。对照组染色质均匀,无浓缩现象,细胞核染色均一,无明显亮蓝色,而MLN4924处理组细胞体积变大,细胞核染色质致密固缩,聚集于细胞核边缘,可见境界分明的块状小体,并有核碎裂出现凋亡小体,随着浓度增加亮蓝色细胞明显增多(箭头标注)。

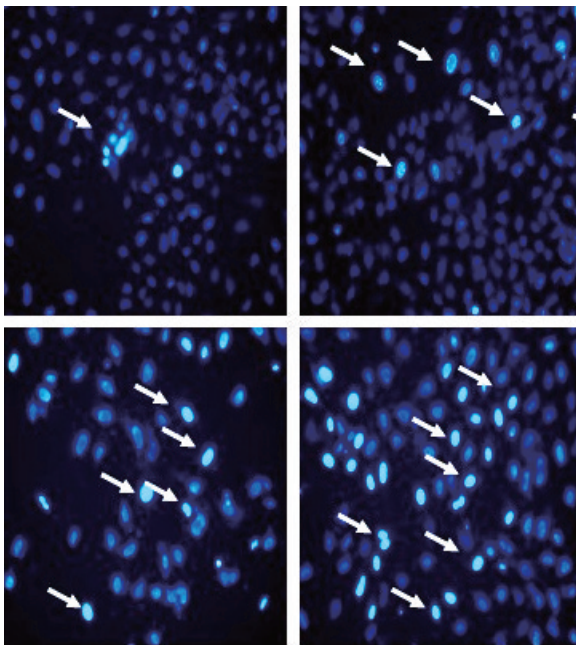


图2 Hoechst33342染色观察细胞凋亡情况(×200)
Figure 2 Fluorescence photomicrographs of A549 cells with Hoechst 33342 staining(×200)

2.3 Western blot 检测 Caspase-3、CDT1 及 NF-κB p65 蛋白相对表达

采用Western blot检测Caspase-3、CDT1及NF-κB p65蛋白相对表达。用浓度分别为0、0.25(0.5×IC₅₀)、0.5(IC₅₀)、1 μM(2×IC₅₀)的MLN4924处理细胞48 h后,NF-κB p65蛋白表达依次降低,Caspase-3、CDT1蛋白含量逐渐增加(图3)。

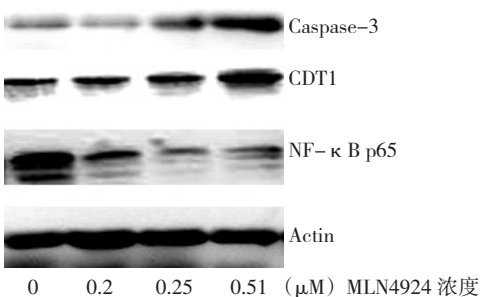


图3 Western blot 检测不同浓度 MLN4924 对 A549 细胞 Caspase-3、CDT1 及 NF-κB p65 蛋白表达的影响

Figure 3 Western blot analysis of caspase-3, NF-κB p65, and CDT1 expression by treating A549 cells with MLN4924 at different concentrations

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率及周期

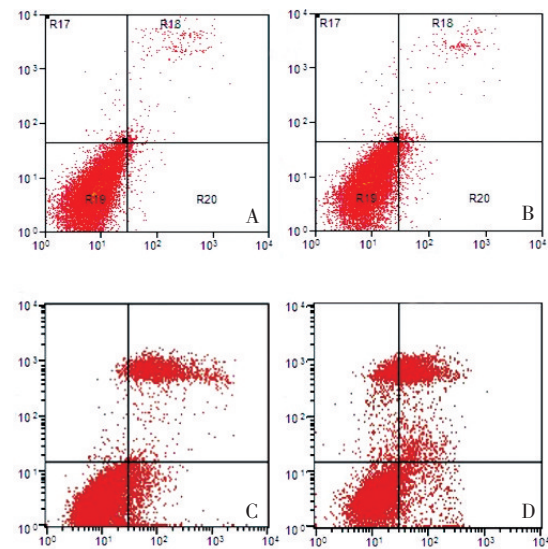
用浓度为分别为0、0.25(0.5×IC₅₀)、0.5(IC₅₀)、1 μM(2×IC₅₀)的MLN4924处理细胞48 h后流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率。随着MLN4924浓度的增加细胞凋亡率增加,S期细胞所占比例也明显增加,并且具有统计学意义(表1,图4、5)。

表1 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期

Table 1 Flow cytometry of the cell cycle and rate of apoptosis after 48 h at different concentrations of MLN4924.*Compared with the control group (P<0.01)

MLN4924浓度(μM)	细胞凋亡率(%)	S期细胞(%)	P
0	7.69 ± 0.85	30.14 ± 0.35	
0.25	12.97 ± 0.43	43.63 ± 1.40*	<0.01
0.5	15.37 ± 0.47	48.36 ± 1.38*	<0.01
1	19.82 ± 0.58	56.27 ± 1.45*	<0.01

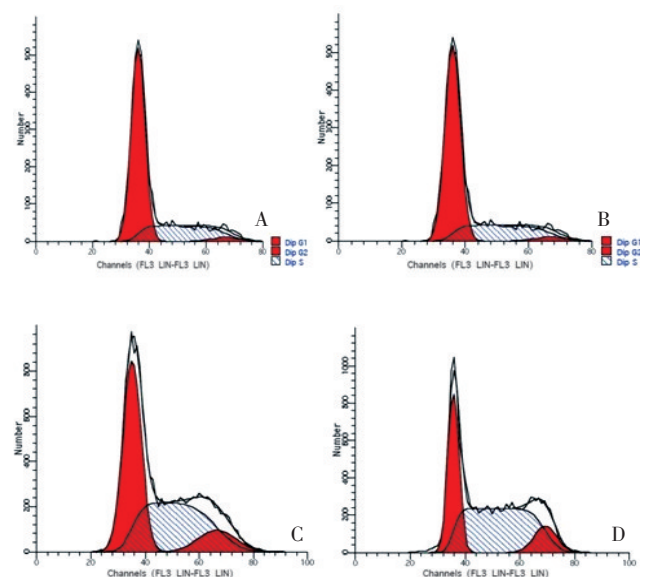
*与对照组相比P<0.01



A:0;B:0.25;C:0.5;D:1

图4 不同浓度MLN4924(μM)作用A549细胞48h后流式细胞仪检测细胞凋亡率

Figure 4 Flow cytometry of the rate of apoptosis of A549 cells after 48 h of MLN4924 treatment at different concentrations



A:0;B:0.25;C:0.5;D:1

图5 不同浓度MLN4924(μM)作用A549细胞48h后流式细胞仪检测细胞周期分布

Figure 5 Flow cytometry of the cell cycle in A549 cells after 48 h of MLN4924 treatment at different concentrations

3 讨论

MLN4924 是 AMP(腺嘌呤核苷酸)类似物,AMP 与 NEDD8 活化酶之间存在很高的亲和力,由于 MLN4924 与 AMP 结构非常类似,能够与 NEDD8 活化酶结合形成 NEDD8 活化酶-MLN4924 化合物,从而抑制 NEDD8 活化酶,控制部分依赖于 CRL 酶的泛素化途径,最终影响相关蛋白质的降解,从而抑制肿瘤生长^[9-10]。临床上用于多发性骨髓瘤患者治疗的硼替佐米可作用于蛋白酶体从而达到抑制肿瘤生长的作用,而研究发现通过 MLN4924 特异性干扰 NEDD8 活化酶通路相比阻断蛋白酶体通路而言,能更特异性地干扰肿瘤细胞的内环境稳态^[4,11]。

本研究用 CCK-8 检测不同浓度和不同作用时间 MLN4924 对肺腺癌 A549 细胞增殖的影响,结果显示,MLN4924 在体外对 A549 细胞增殖具有明显的抑制作用,并且在一定范围内具有时间和浓度依赖性。但是在低浓度范围时(0.001 μM 、0.01 μM)增加药物浓度不能增加其对细胞增殖的抑制作用,原因可能与浓度太低,未达到药物作用的有效剂量有关。而在高浓度(10 μM)时,增加药物作用时间,也不能增加抑制率,推测可能与以下两个方面有关:其一观察的时间点设定不够,继续延长作用时间可能会增加抑制率;其二可能与 MLN4924 引起 S 期细胞 DNA 再复制,最终导致 DNA 损伤,诱导细胞凋亡这一机制有关,细胞群中处于或者进入 S 期的细胞才能触发上述机制,当 MLN4924 达到一定浓度后,抑制 DNA 复制期细胞增长达到饱和,故增加作用时间不能增强其抑制作用。为了进一步研究其抑制 A549 细胞生长的作用机制,用不同浓度 MLN4924 处理细胞 48h 后,通过 Hoechst33342 染色,荧光显微镜下观察细胞,结果显示随着 MLN4924 浓度增加,观察到的凋亡细胞越多。结果说明促进肿瘤细胞凋亡是 MLN4924 抑制 A549 细胞增殖的重要机制之一。为研究 MLN4924 促进 A549 细胞凋亡的机制,用 Western blot 检测了凋亡相关蛋白的表达。因为 Caspase-3 是 Caspase 相关凋亡途径中凋亡执行蛋白,而细胞核内 P65 是 NF- κB 信号传导途径激活的直接标志。结果显示随着浓度增加,Caspase-3 表达量增加,而 NF- κB p65 表达减少。因此推测 MLN4924 可以通过激活 Caspase 相关凋亡途径和抑制 NF- κB 信号传导途径而促进 A549 细胞凋亡。

同时还检测到细胞周期相关因子 CDT1 的表达量随 MLN4924 浓度增加而表达增加。CDT1 是一 65kDa 蛋白质,是细胞分裂、增殖的细胞周期的 S 期 DNA 复制的控制准许因子之一。所以推测 MLN4924 可能会对细胞周期产生影响,因此用流式细胞仪检

测不同浓度 MLN4924 作用下 A549 细胞的周期和凋亡率。结果显示随着浓度增加细胞凋亡率增加,与 Hoechst 33342 染色结果相吻合。不同浓度 MLN4924 作用 A549 细胞后,S 期细胞比例明显增加,根据 Western blot 检测的 CDT1 蛋白表达增加的结果分析,MLN4924 通过抑制 NEDD8 活化酶活性,从而控制部分依赖于 CRL 酶的泛素化途径,最终影响细胞周期相关因子 CDT1 蛋白质的降解,使得 CDT1 在细胞内蓄积,进而阻滞细胞于 S 期,最终导致肿瘤细胞增殖受到抑制。

本实验结果为以后 MLN4924 用于肺癌治疗提供一定的理论依据,下一步将进行动物实验,进一步评价 MLN4924 对于肺癌增殖的抑制作用及其安全性。

参考文献

- 1 Leung CH, Chan DS, Yang H, et al. A natural product-like inhibitor of NEDD8-activating enzyme[J]. Chem Commun(Camb), 2011, 47(9):2511-2513.
- 2 Petroski MD. Mechanism-based neddylation inhibitor[J]. Chem Biol, 2010, 17(1):6-8.
- 3 Swords RT, Kelly KR, Smith PG. Inhibition of NEDD8-activating enzyme: a novel approach for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2010, 115 (18):3796-3800.
- 4 Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer[J]. Nature, 2009, 458(7237):732-736.
- 5 Zhao L, Yue P, Lonial S, et al. The NEDD8-activating enzyme inhibitor, MLN4924, cooperates with TRAIL to augment apoptosis through facilitating c-FLIP degradation in head and neck cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(12):2415-2425.
- 6 Luo Z, Yu G, Lee HW, et al. The Nedd8-Activating Enzyme Inhibitor MLN4924 Induces Autophagy and Apoptosis to Suppress Liver Cancer Cell Growth[J]. Cancer Res, 2012, 72(13):3360-3371.
- 7 Yang D, Tan M, Wang G, et al. The p21-dependent radiosensitization of human breast cancer cells by MLN4924, an investigational inhibitor of NEDD8 activating enzyme[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34079.
- 8 Zhao Y, Sun Y. Targeting the mTOR-DEPTOR Pathway by CRL E3 Ubiquitin Ligases: Therapeutic Application. Neoplasia, 2012, 14(5):360-367.
- 9 Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, et al. Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ[J]. Mol Cell, 2010, 37(1):102-111.
- 10 Wei D, Li H, Yu J, et al. Radiosensitization of human pancreatic cancer cells by MLN4924, an investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor[J]. Cancer Res, 2012, 72(1):282-293.
- 11 Chen JJ, Tsu CA, Gavin JM, et al. Mechanistic studies of substrate-assisted inhibition of ubiquitin activating enzyme by adenosine sulfamate analogues[J]. J Biol Chem, 2011, 286(47):40867-40877.

(2012-07-11 收稿)

(2012-08-27 修回)

(本文编辑:郑莉)