

小檗胺选择性诱导 FLT3 突变急性髓系白血病细胞 MV4-11 凋亡及其机制研究

黄宇¹, 余庆峰², 徐荣臻², 凌云^{1*}

1. 浙江中医药大学 动物实验研究中心/比较医学研究所, 浙江 杭州 310053

2. 浙江大学医学院附属第二医院 血液科, 浙江 杭州 310009

摘要:目的 探讨小檗胺选择性诱导 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3) 基因突变急性白血病细胞凋亡及其可能作用机制。方法 应用 MTT 法比较小檗胺对 FLT3 突变阳性急性髓系白血病细胞株 MV4-11 和野生型 FLT3 肿瘤细胞胰腺癌细胞株 PANC-1、淋巴瘤细胞株 Pfeiffer、肺癌细胞株 A549 增殖的影响; 流式细胞术检测小檗胺处理 MV4-11 后细胞凋亡和细胞周期的变化; Western blotting 法检测 FLT3 及下游信号分子磷酸化 STAT5 (p-STAT5) 蛋白的变化。结果 MTT 结果显示, 小檗胺作用于 MV4-11 细胞 24、48、72 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别是 (7.039±0.700)、(4.840±0.271)、(2.088±0.376) μmol/L, 明显低于野生型 FLT3 肿瘤细胞株; 小檗胺作用于 MV4-11 细胞 48 h 后, 随着小檗胺浓度增加, 凋亡细胞比例增高, 细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期。小檗胺呈浓度依赖性下调 FLT3 突变蛋白和 p-STAT5 蛋白的表达。结论 小檗胺能选择性下调 FLT3 突变蛋白及其下游信号分子 p-STAT5, 诱导 FLT3 突变急性髓系白血病 MV4-11 细胞凋亡和生长抑制。

关键词: 小檗胺; 急性髓系白血病; MV4-11 细胞; 增殖; 凋亡; FLT3 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)18-4331-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.017

Research on mechanisms of acute myeloid leukemia MV4-11 cells with FLT3 mutation apoptosis selectively induced by berbamine

HUANG Yu¹, YU Qing-feng², XU Rong-zhen², LING Yun¹

1. Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

Abstract: Objective To investigate whether berbamine (BBM) can induce FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) acute myeloid leukemia cells apoptosis selectively and its possible mechanism. **Methods** The growth inhibitory activities of BBM were evaluated between acute myeloid leukemia cells with FLT3 mutant and other cell lines without FLT3 mutant by MTT assay. Apoptotic rate and cell cycle were analyzed by flow cytometry. The related proteins of FLT3 pathway and the apoptosis associated proteins expression were measured by Western blotting. **Results** The growth of MV4-11 with BBM was inhibited significantly in a dose and time dependent manner with IC₅₀ (7.039 ± 0.700), (4.840 ± 0.271), and (2.088 ± 0.376) μmol/L at 24, 48, and 72 h, respectively. Meanwhile, the apoptotic rate was increased dose-dependently, cell cycle arrested in G₀/G₁ phase. Furthermore, phosphorylation of STAT5, which was the downstream signaling of FLT3, was significantly reduced by BBM in a dose-dependent manner. **Conclusion** BBM can induce apoptosis in MV4-11 cells by the inhibition of FLT3 and downstream P-STAT5 signal pathway.

Key words: berbamine; acute myeloid leukemia; MV4-11 cells; proliferation; apoptosis; FLT3 signal pathway

急性髓系白血病 (AML) 是一种高病死率的异质性疾病^[1]。基因变异在白血病的发生发展中起了重要的作用, 其中 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like

tyrosine kinase 3, FLT3) 基因突变存在于大约 1/3 的急性白血病病人中^[2]。FLT3 属于 III 型受体酪氨酸激酶 (RTKIII) 家族, 存在于细胞膜上。正常情

收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30873095); 浙江省自然科学基金青年项目 (LQ13H280004)

作者简介: 黄宇 (1986—), 男, 本科, 工程师, 研究方向为新药研究与开发。E-mail: soososo@163.com

*通信作者 凌云, 博士, 助理研究员, 研究方向为药理学。E-mail: lingyun0244808@163.com

况下, FLT3 表达仅限 CD34⁺干/祖细胞, FLT3 突变主要是 FLT3 基因内部串联重复突变 (FLT3-ITD), 通常发生于 AML 病人且往往提示预后很差^[3]。靶向治疗 AML, 特别是 FLT3 抑制剂显示出了良好的治疗前景。

小檗胺是从我国小檗属中药中提取出来的一种新型钙调蛋白拮抗剂, 其结构为一种双苄基生物碱, 具有抗炎和抗肿瘤活性, 而对正常的骨髓造血细胞几乎没有抑制作用^[4], 但其具体机制尚不明确。本研究拟用小檗胺作用于 FLT3 突变急性髓系白血病细胞株 MV4-11, 检测其对细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制, 为 FLT3 突变的急性髓系白血病提供新的治疗候选药物。

1 材料

FLT3 突变的人急性髓系白血病细胞株 MV4-11 购自 ATCC; 胰腺癌细胞株 PANC-1、淋巴瘤细胞株 Pfeiffer、肺癌细胞株 A549 均来自浙江大学肿瘤研究所冻存。小檗胺(质量分数 99.5%, 批号 20161007-1, 陕西凤县植物化学研究所); 噻唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司; IMDM 培养基、RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物技术公司); 青霉素-链霉素双抗 (Gibco 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 AP105)、细胞周期检测试剂盒 (货号 CCS012), 联科生物技术有限公司; 流式细胞仪 (Beckman 公司); GAPDH 抗体 (货号 60004-1), Protech 公司; FLT3 抗体 (货号 3462)、PARP 抗体 (货号 9532)、cleaved-Caspase-3 抗体 (货号 9664), Cell Signaling Technology (CST) 公司; Caspase-3 抗体 (货号 ET1602-39)、Phospho-Stat5 抗体 (货号 ET1610-48), HuaBio 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MV4-11 细胞使用 IMDM 培养基 (加 10%胎牛血清和 100 U/mL 双抗), PANC-1、Pfeiffer、A549 细胞均使用 RPMI 1640 培养基 (加 10%胎牛血清和 100 U/mL 双抗), 细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中, 2~3 d 换液。

2.2 MTT 实验

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 向加过细胞的 96 孔板中加入不同浓度 (0、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L) 的小檗胺, 每孔体积 200 μL, 每个浓度设 8 个复孔, 分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT, 孵育 4 h 后吸弃 100

μL 上清, 加入 100 μL 三联液 (10% SDS-5%异丙醇-12 mmol/L HCl), 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱孵育过夜, 在 570 nm 处用酶标仪测定各孔的吸光度 (A) 值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 Western blotting 实验

将对数生长期的 MV4-11 细胞接种于 24 孔板中, 加入含有不同浓度 (0、2、4、8 μmol/L) 的小檗胺, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱孵育 48 h, 弃去培养基, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 加入细胞裂解液, BCA 法测蛋白浓度, 加入上样蛋白缓冲液, 沸水中煮沸变性, 经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移至 PVDF 膜上, 室温封闭后, 4 °C 孵育一抗过夜, 用对应的二抗孵育后化学发光显色。每组实验重复 3 次。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞培养及处理方法同“2.3”项, 收集细胞后用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 加入结合缓冲液重悬细胞, 使细胞浓度为 1×10⁶~1×10⁷ 个/mL, 样本管中加入 Annexin-V-APC 和 7-AAD 后室温避光孵育 15 min, 上机分析。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

细胞培养及处理方法同“2.3”项, 收集细胞后离心弃上清, 用 PBS 冲洗 1 次, 加入 1 mL DNA 染色液和破膜剂, 混匀后室温避光孵育 30 min, 上机分析。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均值采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), LSD 法进行多组间比较检验。

3 结果

3.1 小檗胺选择性抑制 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞增殖

为明确小檗胺能否选择性抑制 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞增殖, 首先应用 MTT 法比较小檗胺对 FLT3 突变阳性细胞株 MV4-11 和野生型 FLT3 肿瘤细胞株 PANC-1、Pfeiffer、A549 增殖的影响。结果见图 1, 随着小檗胺作用浓度和时间的增加, 其对 MV4-11 细胞增殖抑制作用强于其他 3 种野生型细胞。表 1 结果显示, 小檗胺对 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 显著低于 FLT3 野生型细胞株, 提示小檗胺选择性抑制 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞增殖。

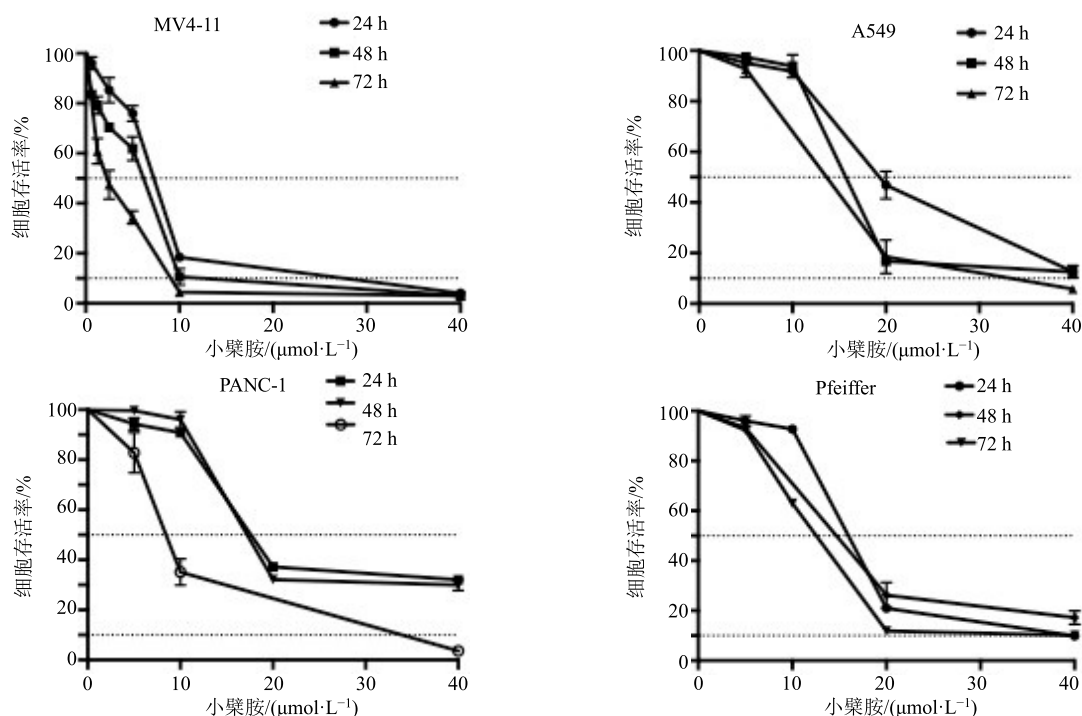


图 1 小檗胺对 FLT3 突变型和野生型肿瘤细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of berbamine on viability of cancer cells with FLT3 mutation and wide types ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 1 小檗胺对 FLT3 突变型和野生型肿瘤细胞的 IC₅₀ 值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 IC₅₀ value of berbamine against various cancer lines with FLT3 mutation and wide types ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 细胞株 | t/h | IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|----------|-----|---|
| MV4-11 | 24 | 7.039 ± 0.700 ^{***#ΔΔ} |
| | 48 | 4.840 ± 0.271 ^{***#ΔΔ} |
| | 72 | 2.088 ± 0.376 ^{***#ΔΔ} |
| A549 | 24 | 19.910 ± 1.435 |
| | 48 | 15.350 ± 0.570 |
| | 72 | 11.900 ± 0.412 |
| Pfeiffer | 24 | 15.800 ± 1.107 |
| | 48 | 14.500 ± 0.546 |
| | 72 | 11.570 ± 0.439 |
| PANC-1 | 24 | 21.140 ± 1.153 |
| | 48 | 19.880 ± 1.111 |
| | 72 | 8.237 ± 0.370 |

与 A549 细胞株比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 Pfeiffer 细胞株比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 PANC-1 细胞株比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs A549 cell lines; ^{##} $P < 0.01$ vs Pfeiffer cell lines; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs PANC-1 cell lines

3.2 小檗胺呈剂量依赖诱导 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞凋亡

为明确小檗胺选择性抑制 MV4-11 细胞增殖的

作用机制, 应用流式细胞术检测小檗胺处理 MV4-11 细胞后凋亡的变化。结果见图 2, 不同浓度 (0、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 的小檗胺作用 MV4-11 细胞 48 h 后, 随着小檗胺浓度的增加, 凋亡细胞所占的比例明显升高, 并且呈浓度依赖性。图 2 中 Q1 区域代表早期凋亡细胞, Q2 区域代表晚期凋亡细胞和坏死细胞, Q3 区域代表活细胞。进一步应用 Western blotting 检测凋亡蛋白表达结果发现, 随着小檗胺作用浓度的增加, 凋亡分子 cleaved-Caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白表达水平显著增加, 结果见图 3。这些结果说明小檗胺通过诱导细胞凋亡抑制 MV4-11 细胞生长。

3.3 小檗胺诱导 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期

为明确小檗胺对 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞周期的影响, 应用流式细胞术测定小檗胺处理后 MV4-11 细胞周期变化。结果见表 2, 不同浓度 (0、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 的小檗胺作用 MV4-11 细胞 48 h 后, 细胞增殖周期停滞在 G₀/G₁ 期。G₀/G₁ 期细胞比例逐渐从 (37.47 ± 1.92) % (对照组) 增加到 (50.36 ± 1.52) % (小檗胺 8 $\mu\text{mol/L}$ 组)。这些结果表明, 小檗胺通过诱导 FLT3 突变阳性 MV4-11 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期抑制细胞生长。

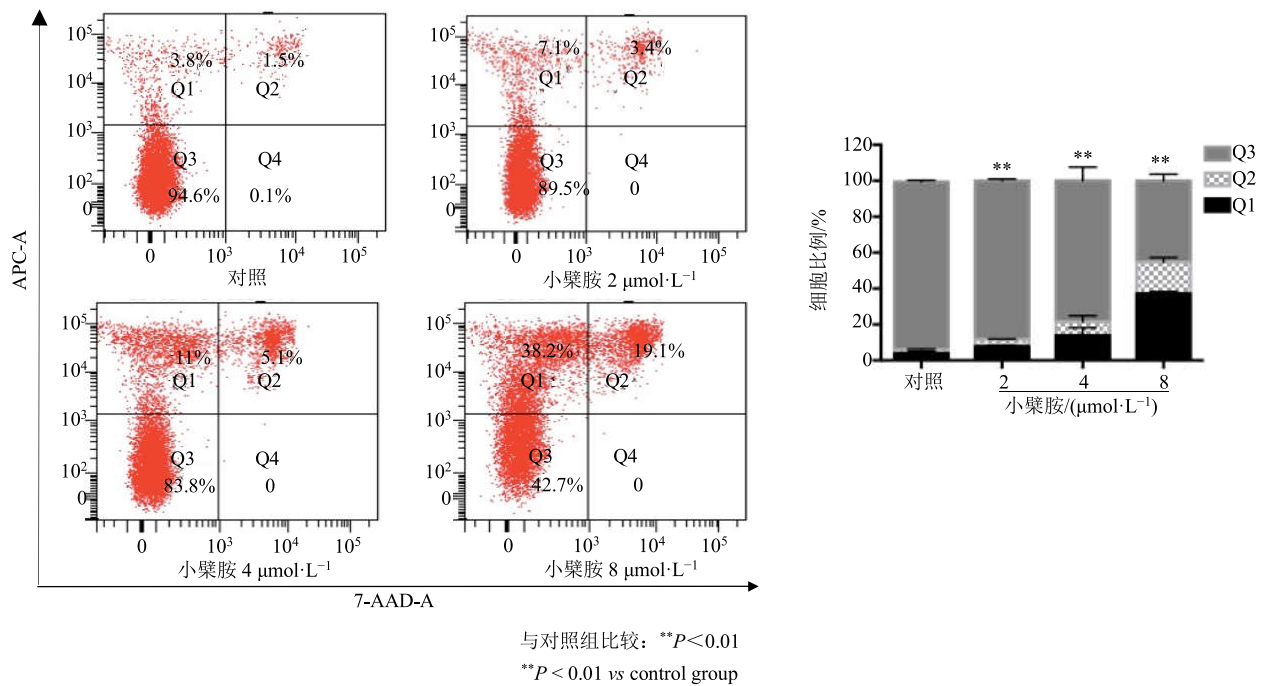


图 2 小檗胺对 MV4-11 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of berbamine on cell apoptosis of MV4-11 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

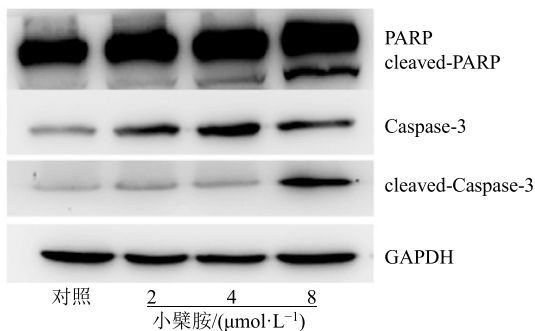


图 3 小檗胺对 MV4-11 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of berbamine on expression of apoptosis related proteins in MV4-11 cells

3.4 小檗胺下调 FLT3 突变蛋白及其下游 p-STAT5 分子表达

为进一步研究小檗胺抑制 MV4-11 细胞增殖的分子机制,应用 Western blotting 法检测小檗胺作用后 FLT3 突变蛋白及其下游信号分子 p-STAT5 影响。结果见图 4,小檗胺呈浓度依赖性抑制 FLT3 突变蛋白及其下游信号分子 p-STAT5 的表达水平。2 μmol/L 的小檗胺作用 MV4-11 细胞 48 h,即可见 FLT3 突变蛋白及其下游信号分子 p-STAT5 下调。这些结果表明,抑制 FLT3 下游信号蛋白 p-STAT5 的表达水平可能是小檗胺抑制 MV4-11 细胞增殖的重要分子机制之一。

表 2 小檗胺对 MV4-11 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of berbamine on cell cycle of MV4-11 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | C/(μmol·L ⁻¹) | 细胞周期分布比例/% | | |
|-----|---------------------------|--------------------------------|--------------|-------------------|
| | | G ₀ /G ₁ | S | G ₂ /M |
| 对照 | — | 37.47±1.92 | 48.27±2.35 | 14.26±0.84 |
| 小檗胺 | 2 | 41.05±1.45 | 45.95±1.58 | 13.01±0.42 |
| | 4 | 47.83±2.25** | 40.22±1.72** | 11.95±1.43 |
| | 8 | 50.36±1.52** | 38.59±2.58** | 11.05±0.46** |

与对照组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs control group

4 讨论

急性髓系白血病是一种常见、复杂的血液系统恶性肿瘤,它的发病率随年龄的增长而增加。目前治疗的完全缓解率为 65%~85%,年龄大于 60 岁的病人,完全缓解率仅为 39%~64%^[5]。FLT3-ITD 突变加速了急性髓系白血病的疾病进程,提示预后不良。在急性髓系白血病中,FLT3 突变可以持续激活下游信号通路包括 PI3K-AKT、RAS-MAPK 和 STAT5^[6]。其中 p-STAT5 表达于多种造血系统肿瘤细胞,被酪氨酸激酶驱动激活,促进白血病干细胞的生存和自我更新。针对 FLT3 突变的 FLT3 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 是一个很有前景的治疗急性髓

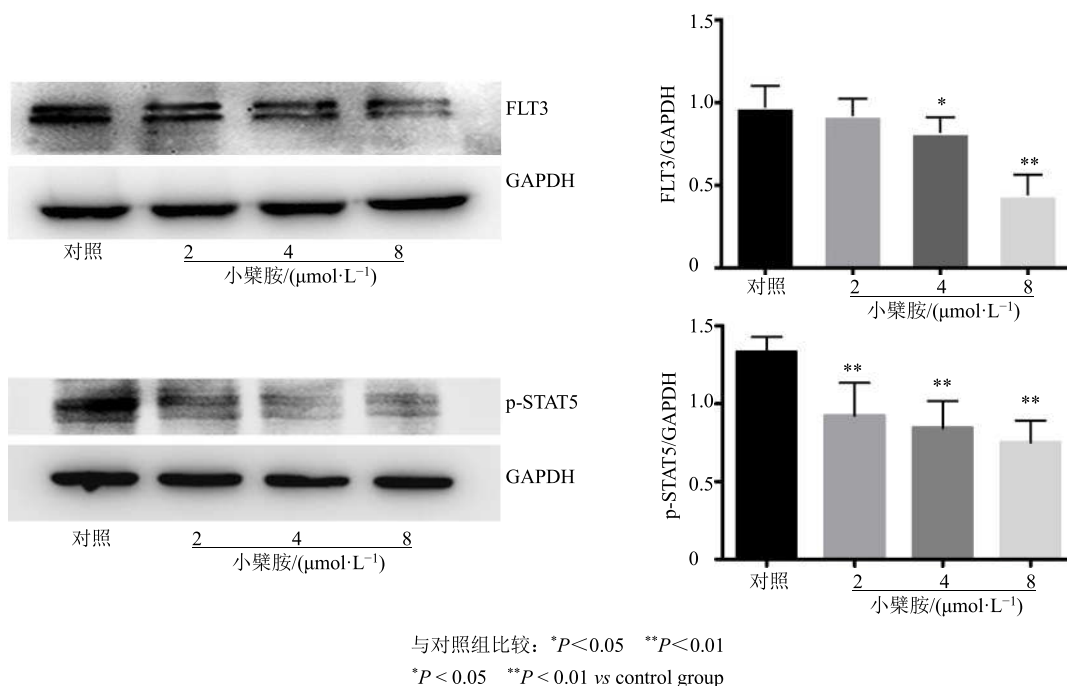


图 4 小檗胺对 FLT3 及其下游主要转录因子 p-STAT5 活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of berbamine on activation of FLT3 and its downstream transcription factor p-STAT5 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

系白血病的候选药物^[7], 如索拉非尼、quizartinib 等已经应用于临床或进入临床试验^[8], 但考虑到这些药物治疗效果的有限性、靶点的选择性及疾病的易复发性, 结合临床数据的积累分析, 目前仍亟需研发更有效的治疗 FLT3 突变的急性髓系白血病的药物。

植物是传统中药的主要来源, 现代药物中有 50% 是从天然植物中提取而来, 其中许多具有抑制肿瘤细胞的潜能^[9]。小檗胺是一种双苄基异喹啉类生物碱, 在慢性粒细胞白血病、肝癌、肺癌等多种疾病的治疗中都显示出了较强的药用价值^[10-11]。本研究结果显示, 小檗胺能明显抑制 FLT3 突变驱动的急性白血病 MV4-11 细胞的增殖活性, IC₅₀ 明显低于其他非 FLT3 突变的细胞株如 A549、Pfeiffer 和 PANC-1, 表现出了显著的选择性差异。其作用机制可能是阻止 MV4-11 细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期转化, 逐渐增加 G₀/G₁ 期细胞比例, 使增殖的 MV4-11 细胞不能通过 G₁/S 检查点, 从而抑制 MV4-11 细胞的增殖, 并促进细胞的凋亡, 同时上调凋亡相关蛋白 cleaved-Caspase-3 和 cleaved-PARP 表达水平。此外, FLT3 及其下游信号通路蛋白 p-STAT5 表达水平下调, 提示抑制 FLT3 下游的 STAT5 信号通路是小檗胺抑制 FLT3 突变 MV4-11 细胞增殖并诱导其凋亡的重要机制。

综上所述, 小檗胺呈浓度依赖性抑制 FLT3 突变 MV4-11 细胞的增殖并促进细胞凋亡, 其机制可能与阻滞细胞周期的进展, 激活凋亡分子 Caspase-3 和 PARP, 并通过下调 FLT3 及其下游信号分子 p-STAT5 的表达从而抑制 STAT5 信号通路有关。FLT3 突变广泛存在于急性白血病病人中, 故本研究为小檗胺治疗 FLT3 突变诱导的急性白血病提供了重要的实验和理论依据。

参考文献

- [1] Elli P, Moritz G, Lars B, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(23): 2209-2221.
- [2] Gilliland D G, Griffin J D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia [J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1532-1542.
- [3] Jiang X, Mak P Y, Mu H, et al. Disruption of Wnt/beta-catenin exerts anti-leukemia activity and synergizes with FLT3 inhibition in FLT3-mutant acute myeloid leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1556.
- [4] Gu Y, Chen T, Meng Z, et al. CaMKII γ , a critical regulator of CML stem/progenitor cells, is a target of the natural product berbamine [J]. *Blood*, 2012, 120(24): 4829-4839.
- [5] Lee H J, Lee J, Jeong P, et al. Discovery of a FLT3

- inhibitor LDD1937 as an anti-leukemic agent for acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 924-936.
- [6] Metts J, Bradley H L, Wang Z, *et al.* Imipramine blue sensitively and selectively targets FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia cells [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-04796-1.
- [7] Li Y Z, Yu S, Yan P A, *et al.* Crotonoside exhibits selective post-inhibition effect in AML cells via inhibition of FLT3 and HDAC3/6 [J]. *Oncotarget*, 2017, 61(8): 103087-103099.
- [8] Li X, Yin X, Wang H, *et al.* The combination effect of homoharringtonine and ibrutinib on FLT3-ITD mutant acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 12764-12774.
- [9] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 311-335.
- [10] 程汝滨, 杨波, 钟晓明, 等. 小檗胺对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1967-1973.
- [11] Waechter F, da Silva G N S, Willig J B, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of betulinic acid derivatives as new antitumor agents for leukemia [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(13): 1777-1785.