

Rita 通过 P53 通路促进急性淋巴细胞白血病细胞凋亡

骆梓燕 江华 徐令 张晓红

Rita induce acute lymphoblastic leukemia cell apoptosis by activating P53 pathway Luo Ziyang, Jiang Hua, Xu Ling, Zhang Xiaohong

Corresponding author: Jiang Hua, Department of Hematology, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, China. Email: yanwo1990@163.com

随着多药联合化疗的应用,急性淋巴细胞白血病(ALL)的治愈率得到了极大的提高,但仍有15%~20%的ALL患儿难以到达长期缓解^[1]。白血病细胞耐药是导致白血病治疗失败的最主要原因^[2-3]。因此寻找区别于目前临床治疗药物的新类型化疗靶向药物,有可能克服常用药物形成耐药的问题。

近年来研究发现的一种天然小分子化合物——Rita (Reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis)能激活细胞内P53蛋白,促进肿瘤细胞凋亡,可能成为肿瘤治疗的新药物^[4]。目前关于Rita的报道多集中在实体瘤^[5-7], ALL中鲜有报道。尽管ALL中P53表达阳性的比例仅占10%^[8],但54%复发耐药的ALL患者表达P53^[9]。Rita能否通过恢复耐药ALL细胞中P53的功能,从而改善耐药ALL的治疗效果,目前尚不明确。我们提供探讨Rita在P53野生型ALL细胞系中的功能及调控机制,以期ALL治疗引入新型化疗靶向药物提供理论依据。

材料与方 法

1. 细胞株及细胞培养:人ALL细胞株NALM6细胞及Molt4细胞均购自中国科学院细胞库。两株细胞均从ALL复发患者中取得,NALM6细胞为T细胞来源,而Molt4细胞为B细胞来源。两种细胞均对糖皮质激素及化疗药物敏感。细胞接种于含有15%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的RPMI 1640培养液中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

2. 细胞活性检测:利用CCK-8试剂盒(日本同仁公司产品)检测细胞活性。实验按照产品说明书进行。具体步骤:

取对数生长期的NALM6、Molt4细胞,调整细胞密度为 3×10^5 /孔,接种于96孔板,分别加入不同浓度(终浓度分别为0、0.5、1、2、4、8、10 μmol/L)Rita(Abmo公司产品),并设置空白对照。每组设3个复孔,实验重复3次。培养22 h后每孔加入10 μl CCK-8试剂,继续培养2 h,应用多功能酶标仪检测450 nm处吸光度(A)值,以630 nm为参比波长。根据公式计算细胞存活率及半数抑制浓度(IC₅₀),选择存活率为20%~30%时的两个浓度进行后续实验。

3. 流式细胞术检测细胞凋亡率:取对数生长期的NALM6和Molt4细胞,以 3×10^5 /ml密度接种于12孔板,每孔1 ml。加入终浓度2.5 μmol/L和4.5 μmol/L Rita,每组设3个复孔,置于37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱培养,NALM6细胞培养0、12、24、36 h后收集细胞;Molt4细胞培养0、24、36、48 h后收集细胞,使用PBS洗涤细胞1次。以500 μl 1×结合缓冲液重悬细胞,加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl PI(上海联科生物公司产品),避光室温孵育5 min。采用流式细胞术进行凋亡分析,以Annexin V⁺/PI⁺细胞为凋亡细胞,检测各组细胞凋亡率,实验重复3次。

4. Western blot法检测PARP、caspase-3及P53蛋白的表达水平:分别收集未加药处理组及Rita处理组的NALM6和Molt4细胞,使用事先加入蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液(美国Thermo公司产品)裂解细胞,冰上放置30 min,13 000 r/min(离心半径9 cm)离心30 min后,加入5×蛋白上样缓冲液,100℃变性10 min。总蛋白经BCA法(美国Thermo公司产品)检测蛋白浓度。总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳(上样量每孔20 μg)分离后转膜,用50 g/L脱脂奶粉封闭2 h后,洗膜3次,用抗P53(美国Proteintech公司产品)、抗PARP(美国Cell Signaling公司产品)及抗caspase-3(美国Cell Signaling公司产品)的一抗4℃孵育过夜,洗膜3次,用辣根过氧化物酶偶联的二抗(美国Proteintech公司产品)室温孵育1 h,洗膜3次,加入化学发光剂,应用蛋白印迹成像系统(美国Bio-Rad公司产品)显色,扫描保存。

5. 统计学处理:采用SPSS 16.0软件进行统计分析,结果以至少3次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表达,两样本组间的比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Rita对NALM6和Molt4细胞活性的影响:不同浓度的Rita处理表达野生型P53的ALL细胞株NALM6和Molt4细胞后,细胞存活率均随着浓度增加而降低。其中NALM6细胞IC₅₀值为0.73 μmol/L,Molt4细胞为1.81 μmol/L(图1)。选择20%~30%存活率的两个浓度(2.5、4.5 μmol/L)进行后续

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.015

基金项目:广东省自然科学基金(2015A030313769);广东省医学科研基金(A2015149)

作者单位:510623 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心血液肿瘤科

通信作者:江华,Email:yanwo@163.com

实验。

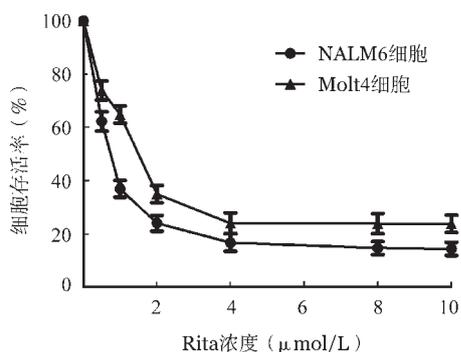


图1 不同浓度Rita处理后细胞存活率

2. Rita对NALM6和Molt4细胞凋亡的影响:为了验证Rita能否诱导NALM6及Molt4细胞凋亡,我们用2.5~4.5 μmol/L Rita处理NALM6及Molt4细胞,通过流式细胞术检测其不同时间点的凋亡情况,结果见表1。结果显示,Rita可以诱导NALM6及Molt4细胞凋亡,且Rita作用的方式具有时间依赖性。

3. Rita对细胞凋亡蛋白剪切的PARP和caspase-3表达的影响:Western blot检测结果显示,与对照组(0 h)相比,2.5 μmol/L和4.5 μmol/L的Rita处理NALM6细胞8 h后,均可检测到剪切的PARP和caspase-3蛋白,24 h时表达明显升高

(图2)。同样,2.5 μmol/L和4.5 μmol/L的Rita处理Molt4细胞24 h后,可检测到剪切的PARP及caspase-3蛋白,60 h时表达明显升高。结果进一步表明Rita能诱导NALM6和Molt4细胞凋亡(图3)。

4. Rita激活p53促进ALL细胞凋亡:为了研究Rita诱导白血病细胞凋亡的具体机制,我们采用Western blot法检测了Rita处理NALM6及Molt4细胞后多个时间点的P53的表达变化水平。结果显示,与对照组相比,2.5、4.5 μmol/L的Rita处理NALM6细胞8 h后,均可见P53表达升高,约24 h时,P53表达量最高(图4)。同样,2.5、4.5 μmol/L的Rita处理Molt4细胞24 h后,P53表达升高,约60 h时,P53表达量最高(图5)。表明在ALL细胞株NALM6及Molt4细胞中,Rita可通过激活P53促进其凋亡。

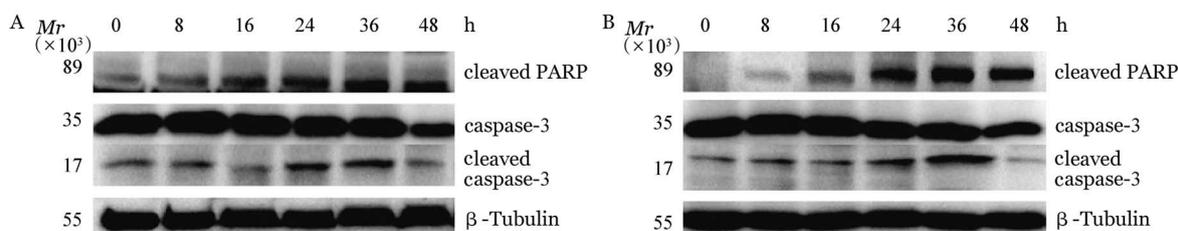
讨 论

目前临床上对ALL细胞耐药缺乏有效的药物,因此探索新型有效治疗药物已成为当前ALL研究的重大课题。已有研究表明Rita在不影响正常细胞活性的前提下通过调节P53的功能而诱导多种肿瘤细胞凋亡^[10-15]。本研究中,我们发现Rita对ALL细胞具有杀伤作用,证实了ALL细胞经Rita处理后发生凋亡,且具有明显的时间依赖性。在凋亡过程中,P53蛋白的表达量明显增高,表明Rita结合P53导致其聚集,最终诱导细胞凋亡。这与Kazemi^[16]和Nahi等^[17]研究报

表1 Rita对NALM6和Molt4细胞凋亡的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

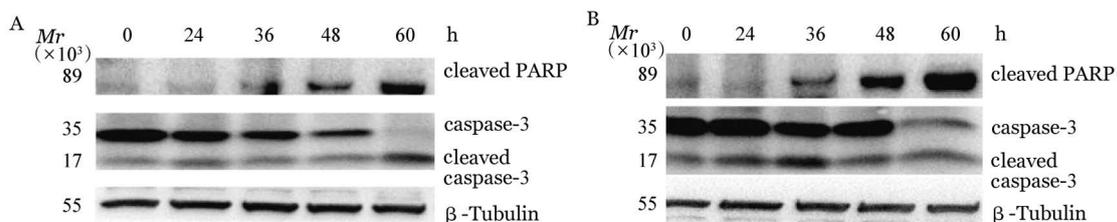
组别	NALM6细胞				Molt4细胞			
	0 h	12 h	24 h	36 h	0 h	24 h	36 h	48 h
2.5 μmol/L作用组	2.74±0.61	3.14±0.73	9.38±0.99 ^b	26.70±1.02 ^c	0.71±0.35	6.18±0.69 ^c	25.40±0.85 ^c	26.40±0.90 ^c
4.5 μmol/L作用组	2.49±0.96	4.56±0.84 ^a	10.30±0.89 ^b	26.70±1.03 ^c	0.82±0.43	13.90±0.74 ^c	18.20±0.78 ^c	20.90±0.95 ^c

注:与对照组(0 h)比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$ 。实验重复3次



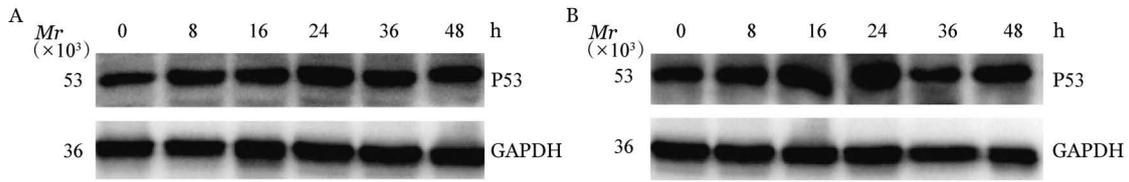
A: 2.5 μmol/L; B: 4.5 μmol/L

图2 不同浓度Rita处理NALM6细胞后凋亡蛋白表达水平



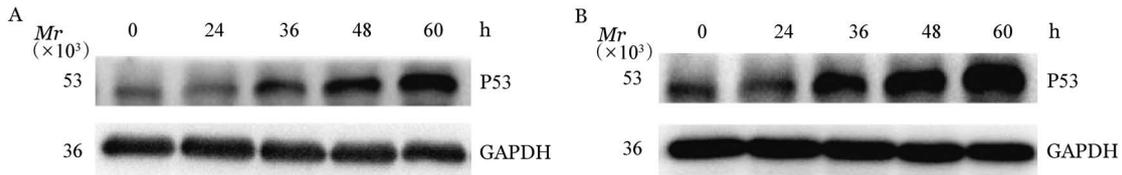
A: 2.5 μmol/L; B: 4.5 μmol/L

图3 不同浓度Rita处理Molt4细胞后凋亡蛋白表达水平



A: 2.5 μmol/L; B: 4.5 μmol/L

图 4 不同浓度 Rita 处理 NALM6 细胞后 P53 表达水平



A: 2.5 μmol/L; B: 4.5 μmol/L

图 5 不同浓度 Rita 处理 Molt4 细胞后 P53 表达水平

道一致。

尽管只有 10%~15% 的白血病患者在诊断时肿瘤细胞表达 P53 蛋白^[18-21], 但是表达 P53 蛋白的 ALL 患者复发后对原治疗方案易产生耐药, 预后较差。因此, P53 是 ALL 复发重要的分子标志物^[9]。已有研究证实了 Rita 可通过与 P53 蛋白氨基末端结合, 诱导细胞凋亡^[22-23]。因此, Rita 有望区别于传统的化疗药物而提高部分复发 ALL 患者的治疗效果。

目前大多数研究停留于研究 Rita 依赖 P53 起促进肿瘤细胞凋亡的作用。然而, 也有少量研究表明 Rita 能诱导 P53 突变或缺失型细胞发生凋亡。我们前期研究结果也显示在 P53 突变或缺失型 ALL 及 AML 细胞系 Reh 及 HL-60 细胞中, Rita 也起杀伤作用, 但是 Rita 的 IC₅₀ 值明显高于 NALM6 及 Molt4 细胞 (约 5 倍), 且作用的最佳时间也明显延长。进一步检测 P53 蛋白的表达情况, 并未见其表达增高 (结果未显示)。因此, 我们认为 Rita 主要通过结合野生型 P53 促进 ALL 细胞凋亡, 大剂量时可能通过 P53 以外的通路发挥促凋亡的作用。具体的机制还有待于进一步的研究。

综上所述, 本研究着重探讨了 Rita 在 P53 野生型 ALL 细胞系 NALM6 和 Molt4 细胞中靶向激活 P53 诱导凋亡的分子机制, 进一步阐明了 Rita 在人 ALL 细胞中的促凋亡功能, 为 Rita 作为新型的白血病治疗药物提供了理论依据。

参考文献

[1] Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group[J]. J Clin Oncol, 2012,30(14):1663-1669. DOI: 10.1200/JCO.2011.37.8018.

[2] Mörcke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to

2000 [J]. Leukemia, 2010, 24 (2):265- 284. DOI: 10.1038/leu.2009.257.

[3] 帖利军, 顾龙君, 宋得莲, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病治疗早期白血病细胞及微量残留病监测的预后价值[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26 (1):6- 9. DOI: 10.3760/j.issn:0253- 2727.2005.01.002.

[4] Grinkevich VV, Nikulenkov F, Shi Y, et al. Ablation of key oncogenic pathways by RITA- reactivated p53 is required for efficient apoptosis [J]. Cancer Cell, 2009,15 (5):441-453. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.03.021.

[5] Michaelis M, Rothweiler F, Agha B, et al. Human neuroblastoma cells with acquired resistance to the p53 activator RITA retain functional p53 and sensitivity to other p53 activating agents [J]. Cell Death Dis, 2012, 3:e294. DOI: 10.1038/cddis.2012.35.

[6] Chuang HC, Yang LP, Fitzgerald AL, et al. The p53-reactivating small molecule RITA induces senescence in head and neck cancer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(8):e104821. DOI: 10.1371/journal.pone.0104821.

[7] Henze J, Mühlenberg T, Simon S, et al. p53 modulation as a therapeutic strategy in gastrointestinal stromal tumors [J]. PLoS One, 2012,7(5):e37776. DOI: 10.1371/journal.pone.0037776.

[8] Kojima K, Ishizawa J, Andreeff M. Pharmacological activation of wild-type p53 in the therapy of leukemia [J]. Exp Hematol, 2016, 44(9):791-798. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.05.014.

[9] Hof J, Krentz S, van Schewick C, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2011, 29 (23):3185- 3193. DOI: 10.1200/JCO.2011.34.8144.

[10] Issaeva N, Bozko P, Enge M, et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors [J]. Nat Med, 2004, 10 (12):1321- 1328. DOI:

- 10.1038/nm1146.
- [11] Grinkevich VV, Nikulenkov F, Shi Y, et al. Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis[J]. *Cancer Cell*, 2009,15(5):441-453. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.03.021.
- [12] Janouskova H, Ray AM, Noulet F, et al. Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(2):307-318. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.03.018.
- [13] Chiu HC, Chou DL, Huang CT, et al. Suppression of Stat3 activity sensitizes gefitinib-resistant non small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(11):1263-1270. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.03.003.
- [14] Zhao CY, Grinkevich VV, Nikulenkov F, et al. Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(9):1847-1855. DOI: 10.4161/cc.9.9.11545.
- [15] Sorrentino G, Mioni M, Giorgi C, et al. The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(2):198-208. DOI: 10.1038/cdd.2012.112.
- [16] Kazemi A, Safa M, Shahbazi A. RITA enhances chemosensitivity of pre-B ALL cells to doxorubicin by inducing p53-dependent apoptosis[J]. *Hematology*, 2011, 16(4):225-231. DOI: 10.1179/102453311X12953015767536.
- [17] Nahi H, Selivanova G, Lehmann S, et al. Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(4):445-453. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07046.x.
- [18] Cheek CF, Verma CS, Baselga J, et al. Translating p53 into the clinic[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(1):25-37. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.174.
- [19] Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer[J]. *Biochem J*, 2015, 469(3):325-346. DOI: 10.1042/BJ20150517.
- [20] Khoo KH, Hoe KK, Verma CS, et al. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(3):217-236. DOI: 10.1038/nrd4236.
- [21] Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis [J]. *Blood*, 2014, 124(2):251-258. DOI: 10.1182/blood-2014-02-558833.
- [22] Andrade AF, Borges KS, Castro-Gamero AM, et al. Zebularine induces chemosensitization to methotrexate and efficiently decreases AhR gene methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(1):72-81. DOI: 10.1097/CAD.000000000000028.
- [23] Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(21):16202-16212.

(收稿日期:2016-07-13)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

2017年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液	PBS	乳酸脱氢酶	LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子	GM-CSF
胎牛血清	FBS	凝血酶原时间	PT	巨噬细胞集落刺激因子	M-CSF
血红蛋白	HGB	部分激活的凝血活酶时间	APTT	粒-巨噬细胞集落形成单位	CFU-GM
红细胞计数	RBC	EB病毒	EBV	细胞毒性T淋巴细胞	CTL
白细胞计数	WBC	巨细胞病毒	CMV	噻唑蓝实验	MTT实验
血小板计数	PLT	乙型肝炎病毒	HBV	弥漫性血管内凝血	DIC
中性粒细胞绝对计数	ANC	丙型肝炎病毒	HCV	磁共振成像	MRI
核因子- κ B	NF- κ B	人类免疫缺陷病毒	HIV	正电子发射断层扫描	PET
聚合酶链反应	PCR	自然杀伤细胞	NK细胞	乙二胺四乙酸	EDTA
逆转录-聚合酶链反应	RT-PCR	白细胞介素	IL	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS-PAGE
酶联免疫吸附实验	ELISA	干扰素	IFN	二甲基亚砜	DMSO
辅助性T淋巴细胞	Th	肿瘤坏死因子	TNF	荧光原位杂交	FISH
丙氨酸转氨酶	ALT	红细胞生成素	EPO	美国国家综合癌症网络	NCCN
天冬氨酸转氨酶	AST	血小板生成素	TPO	国际预后积分系统	IPSS
谷氨酰转移酶	GGT	干细胞生长因子	SCF	常见不良反应事件评价标准	CTCAE
碱性磷酸酶	ALP	粒细胞集落刺激因子	G-CSF		

本刊编辑部