

共同抑制 mTORC2 和热休克蛋白 90 对多发性骨髓瘤细胞凋亡的影响

傅云峰 张亚男 张帆 刘竞 桂嵘

【摘要】 目的 探讨共同抑制 mTORC2 信号通路和热休克蛋白 90 对多发性骨髓瘤(MM)细胞 AKT 蛋白表达及细胞凋亡的影响。**方法** 采用雷帕霉素(20 nmol/L)、17-烯丙胺-17-脱甲氧格尔德霉素(17-AAG)(600 nmol/L)分别及两药联合处理 MM 细胞株 U266、KM3 细胞 0、8、24、48 h, MTT 法检测其对细胞增殖的影响;流式细胞术检测其对细胞凋亡及细胞周期的影响;Western blot 法检测其对 p-AKT(ser473)、p-AKT(thr450)、p-S6(S235/236)及 AKT 蛋白表达的影响。**结果** 与空白对照组比较,雷帕霉素、17-AAG 分别及两药联合后均可抑制 U266、KM3 细胞增殖,尤以联用后抑制作用最为明显(P 值均 <0.05);均可使细胞周期阻滞在 G₁ 期,尤其在作用 48 h 时周期阻滞最明显(P 值均 <0.01);处理 48 h 后空白对照组、雷帕霉素组、17-AAG 组、两药联用组 KM3 细胞的凋亡率分别为(12.21±0.89)%、(18.88±1.83)%、(21.04±0.60)%、(60.07±2.13)%, U266 细胞的凋亡率分别为(8.72±0.15)%、(16.45±0.65)%、(17.14±0.59)%、(54.25±1.76)%,与空白对照组比较差异均有统计学意义,两药联用组促凋亡作用更为明显(P 值均 <0.01)。雷帕霉素作用 48 h 后可抑制 mTORC2 信号通路;单用雷帕霉素或 17-AAG 时可降低 AKT 蛋白的表达,两药联用作用更为明显(P 值均 <0.01)。**结论** 共同抑制 mTORC2 和 HSP90 活性可降低 AKT 蛋白的表达,在体外可明显促进 MM 细胞株 U266、KM3 细胞的凋亡。

【关键词】 雷帕霉素; 多发性骨髓瘤; 细胞凋亡; mTORC2 信号通路; HSP90 热休克蛋白抑制剂

Research on multiple myeloma cell apoptosis by inhibition of mTORC2 and chaperon pathways Fu Yunfeng, Zhang Ya'nan, Zhang Fan, Liu Jing, Gui Rong. The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China

Corresponding author: Liu Jing, Email: jingliu0318@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore apoptosis of multiple myeloma (MM) cells and its mechanism by the combined inhibition of mTORC2 signaling pathway and heat shock protein 90. **Methods** The effects of Rapamycin, 17-AAG and the combination on proliferation of MM cell lines U266 and KM3 were assessed using MTT at different time points (0, 8, 24, 48 hour). Cell apoptosis and cell cycle distribution were measured by flow cytometry. The specific proteins p-AKT(ser473), p-AKT(thr450), p-S6(S235/236) and AKT were detected by Western blotting. **Results** Rapamycin, 17-AAG and the combination suppressed the proliferation of MM cell lines U266 and KM3, especially the combination of Rapamycin and 17-AAG synergistically inhibited the proliferation ($P<0.05$); Rapamycin induced G₁ arrest both at 24 and 48 hours, 17-AAG also induced G₁ arrest, especially at 48 hours ($P<0.01$); Rapamycin, 17-AAG alone decreased the expression of AKT and induced MM cell apoptosis to some extent ($P<0.01$); Chronic rapamycin treatment inhibited mTORC2; Inhibition of both mTORC2 and chaperon pathways degraded AKT and induced MM cell apoptosis, which was significantly higher than that of any single agent ($P<0.01$). **Conclusion** Inhibition of both mTORC2 and chaperon pathways decreased the expression of AKT to induce apoptosis of MM cells in vitro.

【Key words】 Rapamycin; Multiple myeloma; Apoptosis; mTORC2; HSP90 heat-shock proteins inhibitors

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.09.013

基金项目:国家自然科学基金(81470361);湖南省科学技术厅科技计划(2013SK3057)

作者单位:410013 长沙,中南大学湘雅三医院

通信作者:刘竞,Email:jingliu0318@aliyun.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞中常见的异常调节或基因突变(如RAS、PTEN、FGF、c-Myc和CKKN等)信号均需通过哺乳动物雷帕霉素(mTOR)信号通路^[1-2]。有研究表明白血病细胞慢性暴露于雷帕霉素中可抑制mTOR复合物2(mTORC2)信号通路,从而产生抗白血病效应^[3]。而热休克蛋白90(HSP90)在人MM中高表达,可促进细胞恶性转化和存活,导致瘤细胞最终对热、化疗及其他应激耐受^[4]。作为最常用的HSP90抑制剂17-烯丙胺-17-脱甲氧格尔德霉素(17-AAG)因其高效低毒的特性,而被广泛应用于临床研究^[5]。MM细胞中PI3K/mTOR/AKT(丝氨酸/苏氨酸激酶)信号途径是被异常激活的,mTORC2和HSP90能调节AKT和PKC(蛋白激酶C)蛋白的稳定性^[6]。因此,探讨共同抑制mTORC2和HSP90活性对下游蛋白AKT和PKC的影响可能为MM的临床治疗提供一个新的思路。

材料和方法

1. 药物和试剂:雷帕霉素和17-AAG购自美国Gene Operation公司;Annexin V-FITC & PI凋亡检测试剂盒、AKT抗体、 β -actin抗体、p-S6(S235/236)抗体及p-AKT(ser473)抗体购于美国Cell Signal公司;p-AKT(thr450)抗体购于美国Abcam公司。

2. 细胞株及细胞培养:MM细胞株KM3、U266细胞分别由第二军医大学长征医院侯健教授及中南大学湘雅二医院申建凯教授馈赠。两种细胞株均在37℃、5%CO₂培养箱中正常培养,培养基为RPMI 1640完全培养基(美国Hyclon公司产品)+10%FBS(杭州四季青公司产品)+100 U/ml青霉素+100 μ g/ml链霉素构成。培养基根据细胞生长状况每天或隔天更换。取对数生长期细胞进行后续实验。

3. 细胞增殖抑制实验:将细胞接种于96孔板。接种密度为 1×10^5 /ml,每孔接种150 μ l。实验分为空白对照、雷帕霉素(20 nmol/L)、17-AAG(600 nmol/L)和两药联用组;分别作用于KM3、U266细胞不同时间(0、8、24、48 h)。采用MTT法检测细胞增殖抑制率,用酶标仪检测波长490和630 nm处的吸光度(A)值。每组实验设6个复孔,实验重复3次。按下列公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

4. 流式细胞术检测细胞周期分布及凋亡:实验

分组同上。分别收集雷帕霉素、17-AAG作用不同时间的KM3、U266细胞(细胞密度为 1×10^6 /ml)。采用PI单染法检测细胞周期分布,采用Annexin V/PI双染色法检测细胞凋亡。分别按试剂盒说明书进行操作,处理后的细胞上流式细胞仪(美国BD公司产品)进行相关检测,数据采用FLOWJO software(Version 6.0)软件进行分析。每组实验设3个复孔,实验重复3次。

5. Western blot法检测目标蛋白:实验分组同上。收集不同实验组细胞,将蛋白提取并定量后,每孔取蛋白样品50 μ g进行SDS-PAGE,转膜后经脱脂奶粉溶液室温封闭1 h后,分别加入一抗[AKT、p-S6(S235/236)、p-AKT(ser473)及p-AKT(thr450)](1:1 000)和 β -actin(1:4 000)孵育,清洗后加入二抗(1:3 000)孵育,经ECL显色和曝光显影后进行底片扫描。采用IPP6.0软件进行条带相对定量灰度分析。以目标蛋白表达量与内参蛋白表达量的比值表示目标蛋白的相对表达水平。每组实验设3个复孔,实验重复3次。

6. 统计学处理:采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,四组间比较采用单一因素的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 雷帕霉素和17-AAG对MM细胞增殖抑制的影响:各药物浓度采用浓度梯度MTT法所确定:雷帕霉素最佳浓度为20 nmol/L,17-AAG最佳浓度为600 nmol/L(图表未在此展示)。结果显示雷帕霉素、17-AAG分别及两药联用后均可抑制U266、KM3细胞增殖,尤以两药联用后抑制作用最为明显(P 值均 < 0.05),并随着时间延长,抑制作用逐渐增强,药物作用48 h时抑制最明显。两种细胞株均呈现相似结果(图1)。

2. 雷帕霉素及17-AAG对MM细胞细胞周期分布及凋亡的影响:KM3和U266细胞分别用雷帕霉素(20 nmol/L)、17-AAG(600 nmol/L)处理24、48 h后,细胞周期阻滞在G₁期,作用在48 h时最为明显,故作用24 h的结果未在表1中展示。结果显示,与空白对照组比较,雷帕霉素、17-AAG分别及两药联用均可将U266、KM3细胞周期阻滞在G₁期(P 值均 < 0.01)(表1);各实验组KM3和U266细胞的凋亡率增加,差异均有统计学意义,两药联用组

促凋亡作用更为明显(P 值均 <0.01)(表1)。

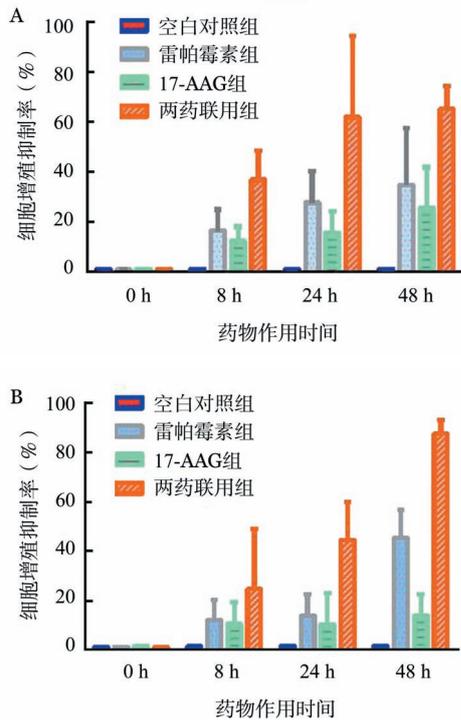


图1 雷帕霉素(20 nmol/L)与17-AAG(600 nmol/L)对 KM3(A)和 U266细胞(B)增殖的影响(每组实验设6个复孔,实验重复3次)

3.雷帕霉素对MM细胞 mTORC2 信号通路的影响:结果显示雷帕霉素作用48 h后,mTORC2信号通路特异性下游蛋白 p-AKT(ser473)和 p-AKT(thr450)的表达均受到抑制,而 mTORC1 特异性下游蛋白 p-S6(S235/236)的表达亦受抑制(图2)。

4.雷帕霉素与17-AAG联用对MM细胞总AKT的影响:雷帕霉素与17-AAG两药联合作用 KM3 和 U266 细胞48 h后,结果显示对 AKT 蛋白表达的下调作用较雷帕霉素和17-AAG单药组明显($P<0.01$)(表2、图3)。

讨论

众所周知,在血液系统肿瘤中常常伴有异常激活的 AKT 信号,这使得肿瘤细胞对临床治疗中常用的化学治疗产生耐受。AKT 作为 MM 细胞增殖的中间介质,通过多个信号途径发挥功能。Huston 等^[7]发现下调 AKT 蛋白表达可抑制血管生成和破骨细胞形成,减少 MM 细胞迁移和附着力,从而对 MM 细胞发挥细胞毒性作用。

mTORC2 由六个组件构成,包括 mTOR、Rictor、mLST8/GβL、DEPTOR、PROTOR/PRR5 和

表1 雷帕霉素及17-AAG处理48 h对 KM3 和 U266 细胞周期分布及凋亡的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	KM3 细胞				U266 细胞			
	细胞周期分布			凋亡率	细胞周期分布			凋亡率
	G ₁	S	G ₂		G ₁	S	G ₂	
空白对照组	21.13±0.32	67.43±0.34	11.44±0.18	12.21±0.89	32.54±0.29	57.43±0.33	10.03±0.14	8.72±0.15
雷帕霉素组	73.02±0.26 ^a	24.76±0.26 ^a	2.22±0.08 ^a	18.88±1.83 ^a	84.16±0.46 ^a	13.64±0.31 ^a	2.20±0.07 ^a	16.45±0.65 ^a
17-AAG 组	63.30±0.38 ^a	30.19±0.27 ^a	6.31±0.16 ^a	21.04±0.60 ^a	75.28±0.37 ^a	4.62±0.33 ^a	20.10±0.44 ^a	17.14±0.59 ^a
两药联用组	60.56±0.41 ^a	29.32±0.21 ^a	10.12±0.18	60.07±2.13 ^a	78.72±0.51 ^a	19.26±0.28 ^a	2.02±0.09 ^a	54.25±1.76 ^a

注:雷帕霉素浓度为20 nmol/L;17-AAG浓度为600 nmol/L;与空白对照组比较,^a $P<0.01$;每组实验设3个复孔,实验重复3次

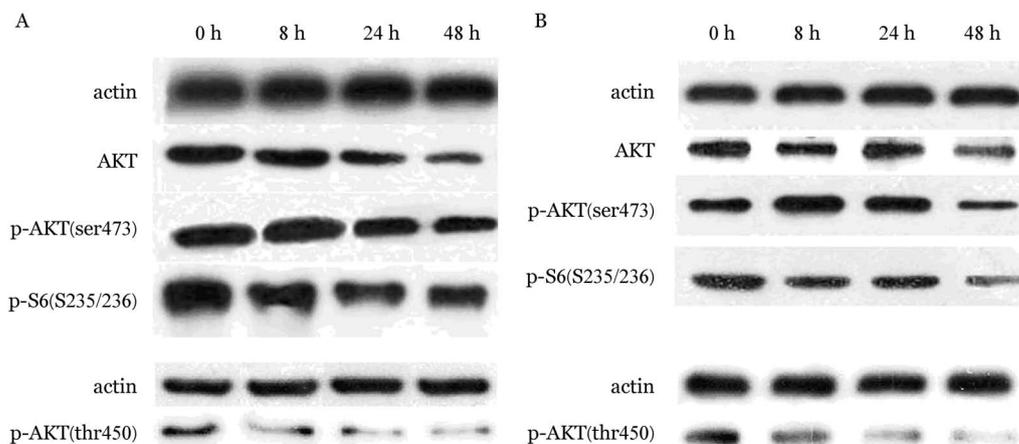


图2 雷帕霉素对 KM 细胞(A)和 U266 细胞(B)mTORC2 信号通路的影响



1:空白对照组; 2:雷帕霉素组; 3:17-AAG组; 4:两药联用组

图3 雷帕霉素(20 nmol/L)与17-AAG (600 nmol/L)单独或联合作用对KM3(A)及U266细胞(B)总AKT蛋白表达的影响

表2 雷帕霉素与17-AAG联合处理48 h对KM3和U266细胞总AKT蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	KM3细胞	U266细胞
空白对照组	0.519 5±0.005 0	0.521 5±0.000 5
雷帕霉素组	0.261 2±0.001 3 ^a	0.411 6±0.002 0 ^a
17-AAG组	0.163 8±0.001 8 ^a	0.324 0±0.001 6 ^a
两药联用组	0.066 4±0.001 9 ^a	0.123 5±0.001 4 ^a

注:雷帕霉素浓度为20 nmol/L; 17-AAG浓度为600 nmol/L; 与空白对照组比较,^a $P < 0.01$; 每组实验设3个复孔, 实验重复3次

mSIN1^[8]。其作为一种蛋白激酶, mTORC2的功能可使AKT和SGK1分别在ser473位点及ser422位点发生磷酸化, 从而全面激活蛋白激酶和SGK1激酶活性。mTORC2的装配和成熟依赖于Tel2和TTI^[9-10], 而Tel2和HSP90介导TORCS与PIKKs的组装。Tel2介导的组件装配是否调节mTORC2信号通路仍有待进一步研究证实。

我们的研究结果显示, 随着干预时间的延长, 雷帕霉素对mTORC2特异性蛋白p-AKT(thr450)、p-AKT(ser473)以及mTORC1特异性蛋白p-S6(S235/236)表达的抑制作用逐渐增强, 明显下降均出现在作用48 h时, 考虑mTORC2信号被抑制的同时, mTORC1信号也同时被抑制或是提前被抑制, 推断p-S6K1可能通过mTORC1反馈控制mTORC2的活性。雷帕霉素及其相关类似物不能完全抑制mTORC1, 也不能直接抑制mTORC2, mTORC1和mTORC2在多种生命活动中的相互联系, mTORC1和mTORC2之间可能存在一个动态平衡, 推测共同抑制mTORC1和mTORC2的活性可能对MM细胞效果更佳^[11-12]。

mTORC2可直接通过磷酸化来调节细胞增殖信号, 表明mTORC2可能只是使AKT的疏水结构域(HM)的磷酸化发生基础活化, 而其他相关的AGC激酶可能在这些底物的磷酸化过程中给予补偿^[8]。mTORC2不仅可通过生长因子途径磷酸化AKT HM端ser473, 也可通过非生长因子依赖途径

磷酸化AKT的转角结构域(TM)端thr450。有研究者发现抑制AKT的HM端磷酸化不能完全抑制AKT信号通路^[13-14]。TM端的thr450磷酸化常常在翻译形成新的AKT过程中发生, 缺乏TM端的thr450的磷酸化将直接影响新生AKT翻译后的泛素化, 而HSP90可以使大部分缺乏TM端的p-AKT(thr450)结构保持稳定, 故在mTORC2遭受破坏的细胞中总AKT水平只有轻微衰减^[14-15]。另外, mTORC2与PKC的成熟和稳定相关, 特别是cPKC和NPKC亚型, 其TM及HM端的磷酸化也需要mTORC2的介导, 在缺乏mTORC2时cPKC的表达水平会显著的降低^[16-17]。cPKC的成熟与稳定取决于HM端的磷酸化及与HSP90的交互作用^[18]。在mTORC2遭受破坏的细胞中, 抑制HSP90活性可能会进一步削弱cPKC水平。由此可说明mTORC2信号通路及分子伴侣途径在促进激酶成熟和稳定中的重要性。

在本研究中我们发现mTOR抑制剂雷帕霉素抑制mTORC2对AKT的HM端ser473位点以及TM端thr450的磷酸化, 且HSP90抑制剂17-AAG抑制HSP的活性, 使翻译后的AKT无法正确折叠, 继而通过泛素化途径被降解, 从而增强抗肿瘤效应。我们的结果显示雷帕霉素和17-AAG均使MM细胞周期阻滞在G₁期, 对PI3K/mTOR信号通路均有影响, 对MM细胞均有单药效应, 且两药联用效果更为明显。雷帕霉素和17-AAG两药联用可能为MM的临床治疗提供一个新的思路。

MM因各种内源性和获得性的抗药性, 目前仍不可治愈的。骨髓微环境通过不同机制诱导MM细胞增殖、生存和药物耐受, 纤连蛋白-细胞黏附介导MM细胞产生耐药性^[19]。细胞因子(IL-6, IGF-1和VEGF)在骨髓中诱导PI3K/AKT/mTOR和JAK-STAT3信号传导发生级联, 多个信号传导通路和蛋白质影响MM的发病机制^[20], 其中包括Wnt、PDCD5、Notch、胰岛素样生长因子、多效生长因子、RAS/RAF/MAPK、IKK/NF- κ B信号通路、Toll样受

体信号和VEGF信号通路、涉及脂质筏的胆固醇敏感信号通路等,mTORC2信号通路可通过骨髓微环境、自噬、内源性抑制和信号通路的多向性及反馈性等多个方面影响MM细胞的凋亡。我们的研究表明mTORC2信号通路和分子伴侣途径的激活与MM的发展密切相关,且其对MM的骨髓微环境有调节作用,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ramakrishnan V, Kimlinger T, Haug J, et al. Anti-myeloma activity of Akt inhibition is linked to the activation status of PI3K/Akt and MEK/ERK pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50005.
- [2] Zhang J, Choi Y, Mavromatis B, et al. Preferential killing of PTEN-null myelomas by PI3K inhibitors through Akt pathway[J]. Oncogene, 2003, 22(40): 6289-6295.
- [3] Zhang F, Lazorchak AS, Liu D, et al. Inhibition of the mTORC2 and chaperone pathways to treat leukemia[J]. Blood, 2012, 119(25): 6080-6088.
- [4] 黄灵娟, 马艳萍, 杨蕊蓉, 等. HSP90表达与人多发性骨髓瘤细胞迁移力的相关性研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 372-375.
- [5] Usmani SZ, Chiosis G. HSP90 inhibitors as therapy for multiple myeloma[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2011 (Suppl 1): S77-S81.
- [6] Sparks CA, Guertin DA. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy[J]. Oncogene, 2010, 29(26):3733-3744.
- [7] Huston A, Leleu X, Jia X, et al. Targeting Akt and heat shock protein 90 produces synergistic multiple myeloma cell cytotoxicity in the bone marrow microenvironment[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(3): 865-874.
- [8] Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions[J]. Cell Cycle, 2011, 10(14):2305-2316.
- [9] Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, et al. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly[J]. J Biol Chem, 2010, 285(26): 20109-20116.
- [10] Takai H, Wang RC, Takai KK, et al. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases[J]. Cell, 2007, 131(7):1248-1259.
- [11] Feldman ME, Apsel B, Uotila A, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2[J]. PLoS Biol, 2009, 7(2): e38.
- [12] Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12): 8023-8032.
- [13] Garcia-Martinez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1(SGK1)[J]. Biochem J, 2008, 416(3): 375-385.
- [14] Warfel NA, Niederst M, Newton AC. Disruption of the interface between the pleckstrin homology (PH) and kinase domains of Akt protein is sufficient for hydrophobic motif site phosphorylation in the absence of mTORC2[J]. J Biol Chem, 2011, 286(45): 39122-39129.
- [15] Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C[J]. EMBO J, 2008, 27(14):1932-1943.
- [16] Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, et al. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling[J]. EMBO J, 2008, 27(14):1919-1931.
- [17] Lee K, Gudapati P, Dragovic S, et al. Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways[J]. Immunity, 2010, 32(6): 743-753.
- [18] Gould CM, Kannan N, Taylor SS, et al. The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail[J]. J Biol Chem, 2009, 284(8): 4921-4935.
- [19] Cohen Y, Gutwein O, Garach-Jehoshua O, et al. The proliferation arrest of primary tumor cells out-of-niche is associated with widespread downregulation of mitotic and transcriptional genes[J]. Hematology, 2013, 19(5): 286-292.
- [20] Fuchs O. Targeting of NF- kappaB signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2013, 13(1):16-34.

(收稿日期:2015-03-23)

(本文编辑:刘志红)