

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.01.0052

Ruxolitinib 对人红白血病 HEL 细胞增殖、凋亡作用的研究

徐倩^{1,2}, 刘贵敏^{1,2}, 谷蕾¹, 梁文同^{1*}, 成志勇^{1*}

1. 保定市第一医院血液内科, 保定 071000
2. 承德医学院研究生院, 承德 067000

[摘要] **目的** 探讨 JAK2 抑制剂 Ruxolitinib 对人红白血病 HEL 细胞增殖、凋亡作用的机制。**方法** 用不同浓度(0、1、5、10、50、100、500 nmol/L)的 Ruxolitinib 处理 HEL 细胞,其中 0 nmol/L 为对照组。CCK-8 法检测细胞活力;Hoechst33342 荧光染色检测细胞凋亡;流式细胞术检测细胞周期;罗丹明 123 检测线粒体膜电位变化;试剂盒检测 Caspase-3/7 活性;RT-PCR 检测 JAK2 mRNA 水平;蛋白质印迹法检测 p-JAK2、p-ERK、Bcl-2、Bim 蛋白表达。**结果** 不同浓度 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 48 h 后,细胞活力分别为(97.0±4.4)%、(92.0±3.9)%、(88.0±3.7)%、(81.0±3.1)%、(64.0±2.9)%、(38.0±2.2)%;Hoechst33342 凋亡细胞染色显示 100 nmol/L Ruxolitinib 处理细胞 48 h 后,亮蓝色凋亡细胞[(49.21±1.80)%]较对照组[(10.02±1.40)%]增多($P<0.05$);流式细胞术结果显示 100 nmol/L Ruxolitinib 作用细胞 48 h 后 G₀/G₁ 期细胞比率[(73.1±3.6)%]高于对照组[(45.2±3.0)%];1~500 nmol/L Ruxolitinib 作用 12、24 h 后,HEL 细胞线粒体膜电位降低,Caspase-3/7 活性增强;RT-PCR 结果显示,不同浓度 Ruxolitinib 处理 HEL 细胞 48 h 后 JAK2 mRNA 表达呈剂量依赖性减低;蛋白质印迹检测结果显示,实验组细胞 p-JAK2、p-ERK、Bcl-2 蛋白表达较对照组降低(均 $P<0.01$),Bim 蛋白表达增加($P<0.01$)。**结论** Ruxolitinib 可能通过抑制 JAK2 及 ERK 激酶途径诱导 HEL 细胞凋亡。

[关键词] 骨髓增殖性肿瘤;鲁索替尼;ERK;Bcl-2;Bim

[中图分类号] R 733.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)01-0052-07

Effect of Ruxolitinib on proliferation and apoptosis in human erythroleukemia leukemia cells

XU Qian^{1,2}, LIU Gui-min^{1,2}, GU Lei¹, LIANG Wen-tong^{1*}, CHENG Zhi-yong^{1*}

1. Department of Hematology, The First Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei, China
2. Graduate School, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism by which JAK2 inhibitor Ruxolitinib affecting the proliferation and apoptosis of human erythroleukemia leukemia(HEL) cells. **Methods** The HEL cells were treated with Ruxolitinib at different concentrations (1, 5, 10, 50, 100, and 500 nmol/L). Then the cell viability was detected by CCK-8 assay; the cell apoptosis was detected by Hoechst staining method, the cell cycle was detected by flow cytometry, the mitochondrial membrane potential was assessed by rhodamine 123 with flow cytometry, and the Cysteine aspartic acid specific protease (Caspase)-3/7 protein activities were tested by kits. Moreover, the expression of JAK2 mRNA was measured by RT-PCR and the protein expressions of p-JAK2, p-ERK, Bcl-2 and Bim were observed by Western blotting analysis. **Results** After treated with different concentrations of Ruxolitinib at 1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, and 500 nmol/L for 48 h, the HEL cell viabilities were (97.0±4.4)%, (92.0±3.9)%, (88.0±3.7)%, (81.0±3.1)%, (64.0±2.9)%, and (38.0±2.2)%, respectively. The ratio of high blue cells was significantly increased after treatment with 100 nmol/L Ruxolitinib for 48 h compared with the control group [(49.21±1.80)% vs [10.02±1.40)%, $P<0.05$]. Flow cytometry showed G₀/G₁ phase cell ratio was higher after HEL cells exposed to 100nmol/L Ruxolitinib for 48 h compared with the control group [(73.1±3.6)% vs [45.2±3.0)%. The mitochondrial membrane potential was significantly decreased and Caspase-3/7 activity was significantly enhanced by treatment with Ruxolitinib at different concentrations (1-500 nmol/L) for 12 h and 24 h. RT-PCR

[收稿日期] 2015-06-15 **[接受日期]** 2015-08-03

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划(08966107D), 2012 年保定市科学技术研究与发展指导计划(12ZF105). Supported by Science and Technology Research and Development Program of Hebei Province (08966107D) and 2012 Science and Technology Research and Development Guide Program of Baoding Municipality (12ZF105).

[作者简介] 徐倩, 硕士生. E-mail: xuqianqian37@126.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 0312-2098886, E-mail: liangwentong1967@sina.com; Tel: 0312-2096685, E-mail: dzcyz@sohu.com

showed that Ruxolitinib decreased JAK2 mRNA expression in a concentration-dependent manner in HEL cells after 48 h treatment. Western blotting analysis showed that the protein expressions of p-JAK2, p-ERK and Bcl-2 were significantly lower and Bim protein was significantly higher than those of control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Ruxolitinib may induce HEL cell apoptosis via JAK2 and ERK 1/2 pathways.

[Key words] myeloproliferative neoplasms; Ruxolitinib; ERK; Bcl-2; Bim

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(1): 52-58]

骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPNs)是一类起源于造血干细胞的血液系统恶性疾病,主要特点为骨髓中一系或多系细胞异常增殖^[1]。研究报道,95%的真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)、50%的原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)及原发性骨髓纤维化(primary myelofibrosis, PMF)患者中可检测到 Jauns 激酶 2(Jauns kinase 2, JAK2)突变,提示 JAK2 V617F 是引起骨髓增殖性肿瘤的主要致病因素^[2]。传统的通过化疗或放血等常规治疗 PV、ET 和 PMF 的方法不仅不能降低恶性克隆细胞,甚至有演变为骨髓增生异常综合征和急性白血病的风险。目前针对 JAK2 的靶向治疗的研究已成为热点,多种 JAK2 的特异性抑制剂已进入临床试验,Ruxolitinib(鲁索替尼)是 2011 年被美国食品和药物管理局批准的用于治疗中、高风险骨髓纤维化的选择性 JAK1/2 抑制剂^[3],但在国内尚未见 Ruxolitinib 应用报道,本文通过研究 Ruxolitinib 对 JAK2 V617F 突变阳性白血病 HEL 细胞的凋亡作用,为 Ruxolitinib 在国内临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 RPMI1640(Gibco 公司)、新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、荧光染料 Hoechst33342(Sigma)、Ruxolitinib(瑞士诺华)、Cell Counting Kit-8(CCK-8,日本同仁化学研究所)、引物(北京赛百胜基因技术有限公司)、抗体(Santa Cruz 公司)、Caspase-Glo 3/7 检测试剂盒(Promega, USA)、Gen 5 酶标仪(Bio-Tek 公司),BD FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 细胞系及细胞培养 人红白血病 HEL 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。HEL 细胞于孵育箱中培养,孵育箱条件为 37℃、5%CO₂。细胞培养液为加入 10%胎牛血清的

RPMI1640 培养液。根据细胞生长状况,2~3 d 换液 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验分组 将对数期细胞分为实验组和对照组,实验组根据加入 Ruxolitinib 的浓度不同分为 1、5、10、50、100、500 nmol/L 组。对照组为不加入 Ruxolitinib 药物。

1.4 CCK-8 检测细胞活力 收集对数生长期细胞,加入细胞悬液 100 μL 到 96 孔板,边缘孔用无菌水或磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)填充,设置空白组及对照组,空白组加 100 μL 无细胞培养基及不同浓度 Ruxolitinib,对照组加 100 μL 细胞不加 Ruxolitinib,实验组及空白组分别加不同浓度 Ruxolitinib,每组设 5 个平行孔,分别于 0、24、48、72 h 后加入 CCK-8 溶液 10 μL,待 2~4 h 后酶标仪测定 450 nm 处光密度 D_{450} ,按照公式:细胞活力(%) = $\frac{D_{实验组} - D_{空白组}}{D_{对照组} - D_{空白组}} \times 100\%$,绘制细胞生长曲线。

1.5 Hoechst33342 细胞凋亡形态观察 分别取 48 h 后对照组及 100 nmol/L Ruxolitinib 处理组的 HEL 细胞,取 100 μL 细胞悬液,加入终浓度为 10 μg/mL 的 Hoechst33342,避光染色 15~20 min,取 40 μL 细胞悬液滴于载玻片,荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。

1.6 流式细胞仪检测 HEL 细胞的线粒体膜电位变化 收集不同浓度 Ruxolitinib 作用 12、24 h 的 HEL 细胞。PBS 清洗 2 次,加入 5 μg/mL 罗丹明 123,在 37℃、5%CO₂ 条件下作用 30 min,流式细胞仪检测各处理组细胞荧光强度。

1.7 细胞 Caspase-3/7 蛋白活性检测 选取不同浓度 Ruxolitinib 作用 12、24 h 后的 HEL 细胞各约 5 000 个,分别加入 96 孔板,每组 3 个复孔,同时将 Caspase-Glo 3/7 底物与缓冲液相混合,取 100 μL 加入孔板,混合孵育 4 h,检测波长 405 nm 处的 D

值,计算细胞活化程度。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期 HEL 细胞,在 6 孔板中接种 3 mL 细胞悬液,约含 10^5 个细胞,按照实验分组分别加入不同浓度 Ruxolitinib,分别孵育 0、24、48、72 h。收取细胞,0.5 mL PBS 洗 2 次, $120 \times g$ 离心,弃去上清液;75%冰乙醇固定过夜,离心,弃上清;0.5 mL PBS 洗 1 次,加入 RNAase 1 mL,37°C 恒温水浴 30 min, $120 \times g$ 离心,弃上清;加入 DNA 抽提液 1 mL,室温静置 30 min, $1\ 800 \times g$ 离心 5 min,弃上清。加入 500 μ L 0.1 mg/mL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液,置于 4°C 避光染色 30 min,流式细胞仪检测。

1.9 RT-PCR 检测 JAK2 mRNA 表达 收集不同浓度 Ruxolitinib 作用 48 h 后的 HEL 细胞,TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 纯度及含量。根据 Vazyme HiScript 合成试剂盒反转录合成 cDNA,反转录反应体系 20 μ L,包括细胞 RNA 2 μ g,50 U/ μ L RNasin 0.5 μ L,50 μ g/mL 随机物 1 μ L,10 mol/L dNTP 2 μ L,5 \times 反转录反应缓冲液 4 μ L,M-MLV 反转录酶 200 U,余用焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理水补足至 20 μ L。37°C 反应 60 min,95°C 反应 5 min 后终止反应。产物进行 PCR 扩增或分装稀释,放置于 -20°C,保存时间不超过 6 个月。PCR 反应体系 20 μ L, JAK2 上游引物为 5'-CAG CAA GTA TGA TGA GCA AGC TTT-3',下游引物为 5'-TGA ACC AGA ATA TTC TCG TCT CCA C-3'。内参基因 β actin 上游引物为 5'-CTG GCA CCA CAC CTT CTA CAA T-3',下游引物为 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CCG C-3'。JAK2 扩增片段产物长度 101 bp, β actin 扩增片段长度 382 bp。取 cDNA 2 μ L 作为模板,建立 20 μ L 反应体系。反应条件:94°C 变性 5 min,94°C 变性 45 s,60°C 退火 1 min,68°C 延伸 45 s,40 个循环。扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳,全自动凝胶成像仪下分析。

1.10 蛋白质印迹法检测 p-JAK2、p-ERK、Bcl-2、Bim 蛋白水平 收集各组细胞,提取蛋白;根据蛋白定量结果分装蛋白,将分装好的蛋白置于沸水中煮沸变性 5 min,配电泳分离胶、浓缩胶,蛋白上样,电泳使蛋白

分离,转移至 PVDF 膜上,配 5%脱脂奶粉,37°C 烤箱中封闭 2 h,封一抗,4°C 过夜;Tris 盐酸缓冲液洗膜,封二抗,37°C 烤箱中 2 h,化学发光液混合,应用 Alpha Innotech 系统对 PVDF 膜进行扫描及图像分析。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 19.00 统计软件进行分析处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析,组间两两比较选用 *q* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Ruxolitinib 对 HEL 细胞活力的影响 CCK-8 结果显示:不同浓度的 Ruxolitinib(1、5、10、50、100、500 nmol/L)作用 HEL 细胞后,随着时间延长细胞活力逐渐下降,Ruxolitinib 作用 48 h 后,HEL 细胞活力分别为 (97.0 \pm 4.4)%、(92.0 \pm 3.9)%、(88.0 \pm 3.7)%、(81.0 \pm 3.1)%、(64.0 \pm 2.9)%、(38.0 \pm 2.2)%;随着 Ruxolitinib 药物浓度增大,HEL 细胞活力下降,并呈时间依赖性,通过计算 48 h Ruxolitinib IC₅₀ 为 283.47 nmol/L(图 1)。

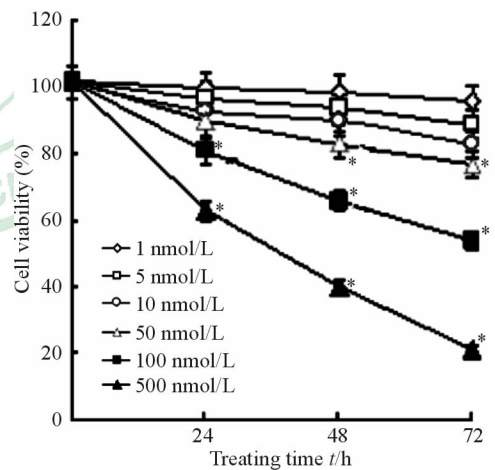


图 1 CCK-8 检测不同浓度 Ruxolitinib 作用不同时间的 HEL 细胞活力

Fig 1 HEL cell viability was detected by CCK-8 assay after treated with Ruxolitinib at different concentrations for different periods

* $P < 0.05$ vs 0 h, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 荧光染色 Hoechst33342 观察细胞凋亡 100 nmol/L Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 48 h 后, Hoechst33342 染色对照组 Hoechst 着色为淡蓝色,细胞核内 DNA 分布均匀,核呈圆形或卵圆形,无固

缩、变形(图 2A)。实验组 Hoechst 着色核由于浓集而呈亮蓝色,细胞出现凋亡,核固缩、变形(图 2B)。100 nmol/L Ruxolitinib 组亮蓝色细胞[(49.21±1.80)%]较对照组[(10.02±1.40)%]增多($P<0.05$)。

2.3 Ruxolitinib 对 HEL 细胞线粒体膜电位的影响 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞不同时间(12 及 24 h)后,罗丹明 123 荧光强度在对照组 HEL 细

胞内均最强,随着 Ruxolitinib 浓度的增加,罗丹明 123 荧光强度逐渐减弱,呈剂量依赖性降低(表 1)。

2.4 凋亡蛋白 Caspase-3/7 活性检测 不同浓度 Ruxolitinib 干预 HEL 细胞 12、24 h 后凋亡蛋白 Caspase-3/7 活性呈现剂量依赖性升高($P<0.01$)。见表 2。

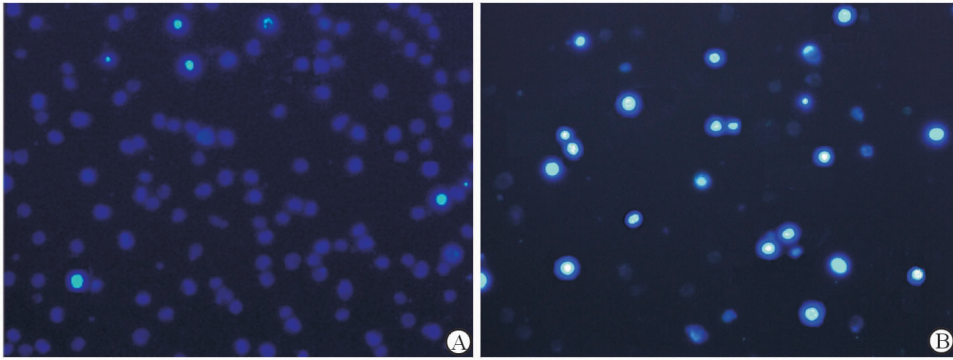


图 2 Hoechst33342 荧光染色检测 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 48 h 后凋亡形态图

Fig 2 Apoptosis was detected by Hoechst33342 staining in HEL cells after treated with Ruxolitinib for 48 h

A: Control group; B: 100 nmol/L Ruxolitinib treatment group

表 1 不同浓度 Ruxolitinib 作用 12 及 24 h 后 HEL 细胞内线粒体膜电位的变化

Tab 1 Mitochondrial membrane potential in HEL cells treated with different concentrations of Ruxolitinib for 12 or 24 h

$n=3, \bar{x}\pm s$

Treating time t/h	Control	Ruxolitinib $c_B/(nmol \cdot L^{-1})$					
		1	5	10	50	100	500
12	380±51	340±40**	296±38**	245±32**	201±26**	134±25**	98±21**
24	411±55	302±32**	256±31**	197±29**	142±24**	103±22**	56±18**

** $P<0.01$ vs control group

表 2 不同浓度 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 12 和 24 h 后凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-7 活性变化

Tab 2 Caspase-3 and -7 protein activity change of HEL cells after treated with different concentrations of Ruxolitinib for 12 or 24 h

$n=3, \bar{x}\pm s$

Treating time t/h	Control	Ruxolitinib $c_B/(nmol \cdot L^{-1})$					
		1	5	10	50	100	500
12	0.145±0.010	0.198±0.014**	0.221±0.016**	0.275±0.020**	0.340±0.023**	0.410±0.028**	0.523±0.035**
24	0.151±0.011	0.225±0.019** $\Delta\Delta$	0.287±0.021** $\Delta\Delta$	0.315±0.027** $\Delta\Delta$	0.357±0.031** $\Delta\Delta$	0.451±0.034** $\Delta\Delta$	0.589±0.039** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs 12 h group

2.5 Ruxolitinib 对 HEL 细胞凋亡的影响 孵育 0、24、48、72 h 不同浓度下 Ruxolitinib 对 HEL 细胞周期的影响结果显示,随着 Ruxolitinib 药物浓度的增加及作用时间的延长, G_0/G_1 期细胞比率逐渐上

升, G_2/M 期比率减少。100 nmol/L Ruxolitinib 作用细胞 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比率[(73.1±3.6)%]明显高于对照组[(45.2±3.0)%]。见图 3、表 3。

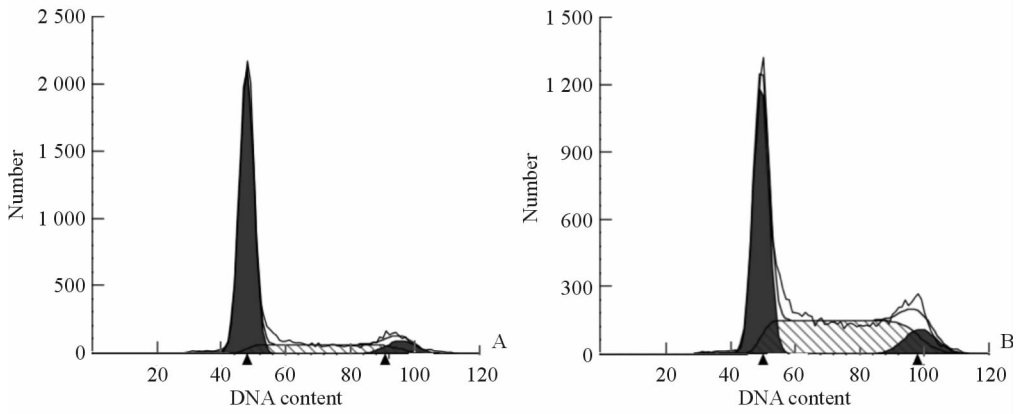


图3 流式细胞术检测 Ruxolitinib 对 HEL 细胞周期的影响

Fig 3 Cell cycle was detected by flow cytometry after HEL cells were treated with Ruxolitinib

A: Control group; B: 100 nmol/L Ruxolitinib treatment group

表3 不同浓度 Ruxolitinib 对 HEL 细胞周期的影响结果

Tab 3 Changes of HEL cell cycle after treated with different concentrations of Ruxolitinib

$n=3, \bar{x} \pm s$

Cell cycle	Control	Ruxolitinib $c_B / (nmol \cdot L^{-1})$					
		1	5	10	50	100	500
G ₀ /G ₁	45.2±3.0	49.1±3.0**	54.6±3.4**	59.8±3.4**	67.4±3.6**	73.1±3.6**	80.4±3.7**
G ₂ /M	28.0±2.1	21.5±1.9**	17.4±1.8**	12.3±1.7**	8.4±1.1**	4.6±0.9**	3.6±0.4**

** $P < 0.01$ vs control group

2.6 RT-PCR 检测 JAK2 mRNA 表达 不同浓度 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 48 h 后, 实验组 JAK2 mRNA 表达比对照组减低, 并随着药物浓度的增加呈逐渐减低趋势(图 4), 对照组和 5、10、50、100、500 nmol/L Ruxolitinib 组 JAK2 mRNA 相对表达量分别为 (0.98±0.09)、(0.83±0.07)、(0.65±0.06)、(0.52±0.04)、(0.32±0.03)、(0.12±0.01)。

Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 0、24、48 h 后, HEL 细胞 p-JAK2、p-ERK、Bcl-2 蛋白表达逐渐下降, Bim 蛋白表达增加($P < 0.01$, 图 5)。

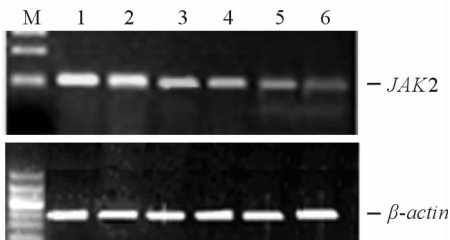


图4 RT-PCR 检测不同组细胞 JAK2 mRNA 表达结果

Fig 4 mRNA level of JAK2 was measured by RT-PCR in each group

M: Marker; 1: Control group; 2: 5 nmol/L Ruxolitinib; 3: 10 nmol/L Ruxolitinib; 4: 50 nmol/L Ruxolitinib; 5: 100 nmol/L Ruxolitinib; 6: 500 nmol/L Ruxolitinib

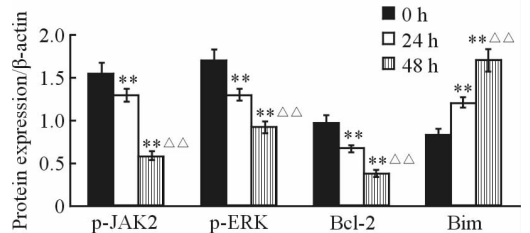
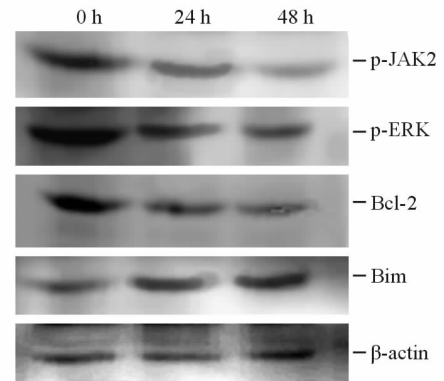


图5 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞后 p-JAK2、p-ERK、Bcl-2 及 Bim 蛋白表达变化

Fig 5 Changes of p-JAK2, p-ERK, Bcl-2, and Bim protein expressions in HEL cells after treated with 100 nmol/L Ruxolitinib

** $P < 0.01$ vs 0 h group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 24 h group. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.7 蛋白质印迹法检测 p-JAK2、p-ERK、Bcl-2、Bim 蛋白表达 与对照组(0 h)相比, 100 nmol/L

3 讨论

JAK-STAT 转导通路在细胞生长、分化、免疫功能和造血中发挥重要生理病理作用。JAK2-STAT5 信号通路在多种组织及细胞系中异常表达和活化,并与肿瘤的增殖、分化、凋亡、血管新生及肿瘤侵袭有密切关系^[1]。骨髓增殖性肿瘤患者大多存在 JAK2 V617F 突变,此突变作为一种组成性激活酪氨酸激酶,在缺乏细胞因子的情况下自发性激活 JAK2-STAT5 信号通路^[4-5]。HEL 细胞是 JAK2 V617F 突变阳性人红白血病细胞, JAK2 V617F 突变可使 JAK2-STAT5 信号通路活化,进而使细胞异常表达。Oku 等^[6]通过干扰 RNA (siRNA) 阻断 JAK2-STAT5,发现 JAK2 V617F 突变的骨髓增殖性肿瘤细胞增殖明显受到抑制,认为 JAK2 V617F 具有促进细胞增殖及抑制凋亡作用。

Ruxolitinib 是选择性 JAK1/2 激酶抑制剂,现已应用于临床,口服单剂量为每日 5~200 mg,能够被迅速吸收,在 1~2 h 内达到最大血药浓度^[7]。其通过抑制 JAK/STAT 的磷酸化发挥作用。在 JAK2 V617F 突变阳性的骨髓增殖性肿瘤动物模型中,Ruxolitinib 可明显逆转脾肿大,减少循环中炎症细胞因子的水平,优先消除肿瘤细胞,显著延长生存期而未抑制骨髓及免疫功能^[8-9]。一项在欧洲九国进行的开放、随机化 COMFORT-II 期研究结果显示,Ruxolitinib 在治疗 48 周后,28.5% 患者脾脏体积至少缩小至原体积的 35%^[10]。Quintás-Cardama 等^[11]研究显示,不同浓度 Ruxolitinib 能剂量依赖性抑制 JAK2 V617F 阳性 Ba/F3 细胞活力,其 IC₅₀ 为 127 nmol/L。本研究结果显示 Ruxolitinib 作用于人 JAK2 V617F 阳性红白血病 HEL 细胞后,细胞活力随着时间及浓度的加大而下降,48 h IC₅₀ 为 283.47 nmol/L。荧光染色显示 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞后,细胞形态出现明显凋亡改变。G₀/G₁ 期细胞呈剂量依赖性增加,G₂/M 期细胞减少,考虑 Ruxolitinib 诱导 HEL 细胞 G₀/G₁ 期周期阻滞。

在细胞凋亡过程中,线粒体膜渗透性转换通道开放,线粒体膜电位减低,释放细胞色素 C,导致凋亡蛋白 Caspase-3 的激活,从而诱导细胞凋亡^[12]。线粒体膜电位在细胞凋亡早期就开始下降,并早于 DNA 片段化。本实验结果表明,1~500 nmol/L 的

Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 12、24 h,线粒体膜电位水平进行性降低,呈剂量依赖性减低。Caspase-3/7 蛋白活性逐渐增加,从而诱导细胞凋亡。

BCL-2 家族是细胞凋亡通路中重要的调节蛋白,根据功能可以分为抗凋亡 BCL-2 亚家族和促凋亡 BAX 亚家族以及促凋亡 BH3 亚家族(也称 BH3-only 蛋白)。Bim 作为 BH3 亚家族成员之一,在细胞凋亡的启动和调节上具有重要的作用,并已被证实与 JAK2 信号通路有关^[13],可通过结合 Bcl-2 蛋白促进凋亡 Bax 和 Bak 样蛋白释放,诱导细胞凋亡。通过 siRNA 抑制 Bim 基因后,细胞凋亡明显减少。Bim 受多种刺激调节,包括 PI3K-AKT-FOXO-3A 和 ERK 1/2 的 MAP 激酶途径,这两条通路均可被 JAK2-STAT5 活化^[14-15]。本研究结果显示,1~500 nmol/L Ruxolitinib 作用于 HEL 细胞 48 h 后, JAK2 mRNA 及 p-JAK2 蛋白表达水平呈剂量依赖性减低,p-ERK 蛋白表达亦降低,Bcl-2 活性减低,同时 Bim 表达上调,表明 Ruxolitinib 通过抑制 JAK2 通路阻断 ERK 1/2,抑制 Bim 磷酸化,Bim 蛋白降解减少,Bim 活化增强,进而抑制细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡^[14, 16-17]。

综上所述,Ruxolitinib 可通过抑制 JAK2 及 ERK 1/2 的 MAPK 激酶途径抑制人红白血病 HEL 细胞增殖及促进肿瘤细胞凋亡,这为 Ruxolitinib 治疗骨髓增殖性肿瘤及白血病提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 成志勇,黄月华,梁文同,王宝艳,王亚丽,孙雪珊,等. 骨髓增殖性肿瘤中 JAK2 V617F 突变与 I 型细胞因子受体相关性研究[J]. 中国全科杂志,2012, 15: 1019-1022.
- [2] Constantinescu S N, Girardot M, Pecquet C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer [J]. Trends Biochem Sci, 2008, 33: 122-131.
- [3] Chase A, Bryant C, Score J, Haferlach C, Grossmann V, Schwaab J, et al. Ruxolitinib as potential targeted therapy for patients with JAK2 rearrangements [J]. Haematologica, 2013, 98: 404-408.
- [4] 郭慧梅,潘 峻,贺建辉,化罗明,曹志新,薛 蕾. 骨髓增殖性肿瘤患者血栓栓塞的相关因素[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40: 958-960.
- [5] 成志勇,李士辉,杨 琳,黄月华,潘 峻. 干扰素 α

- 对 JAK2 V617 阳性的骨髓增殖性疾病的影响[J]. 实用肿瘤杂志, 2008, 23: 318-321.
- [6] Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, et al. *JAK2 V617F* uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation[J]. *Br J Haematol*, 2010, 150: 334-344.
- [7] Shi J G, Chen X, McGee R F, Landman R R, Emm T, Lo Y, et al. The Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of orally dosed INCB018424 phosphate in healthy volunteers[J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51: 1644-1654.
- [8] Cervantes F, Vannucchi A M, Kiladjian J J, Al-Ali H K, Sirulnik A, Stalbovskaya V, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis [J]. *Blood*, 2013, 122: 4047-4053.
- [9] Oritani K, Okamoto S, Tauchi T, Saito S, Ohishi K, Handa H, et al. A multinational, open-label, phase 2 study ruxolitinib in Asian patients with myelofibrosis; Japanese subanalysis [J]. *Int J Hematol*, 2015, 101: 295-304.
- [10] Harrison C, Kiladjian J J, Al-Ali H K, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 787-798.
- [11] Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle P A, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424; therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms[J]. *Blood*, 2010, 115: 3109-3117.
- [12] Wang Y, Yang J, Chen L, Wang J, Wang Y, Luo J, et al. Artesunate induces apoptosis through caspase-dependent and independent mitochondrial pathways in human myelodysplastic syndrome SKM-1 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 219: 28-36.
- [13] Abutin R M, Chen J, Lung T K, Lloyd J A, Sawyer S T, Harada H. Erythropoietin induced phosphorylation/degradation of BIM contributes to survival of erythroid cells [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37: 151-158.
- [14] Will B, Siddiqi T, Jordà M A, Shimamura T, Luptakova K, Staber P B, et al. Apoptosis induced by *JAK2* inhibition is mediated by Bim and enhanced by the BH3 mimetic ABT-737 in *JAK2* mutant human erythroid cells [J]. *Blood*, 2010, 115: 2901-2909.
- [15] Rubert J, Qian Z, Andraos R, Guthy D A, Radimerski T. Bim and Mcl-1 exert key roles in regulating *JAK2V617F* cell survival [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 24.
- [16] Szymańska J, Smolewski P, Majchrzak A, Cebula-Obrzut B, Chojnowski K, Trelński J. Pro-apoptotic activity of ruxolitinib alone and in combination with hydroxyurea, busulphan, and PI3K/mTOR inhibitors in *JAK2*-positive human cell lines [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24: 195-202.
- [17] Barrio S, Gallardo M, Arenas A, Ayala R, Rapado I, Rueda D, et al. Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm [J]. *Br J Haematol*, 2013, 161: 667-676.

[本文编辑] 尹 茶