

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.11.1325

· 论 著 ·

布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂联合硼替佐米对人多发性骨髓瘤细胞的作用及其机制

张雯,程辉,唐古生,丁静,胡晓霞,杨建民,王健民,吕书晴*

第二军医大学长海医院血液内科,上海 200433

[摘要] **目的** 探讨布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)抑制剂依鲁替尼(ibrutinib)和 AVL-292 单药及联合蛋白酶体抑制剂硼替佐米对人多发性骨髓瘤细胞系 H929 和 RPMI8226 的作用及其机制。**方法** 用不同浓度的依鲁替尼、AVL-292 单药以及联合硼替佐米处理 H929、RPMI8226 细胞。采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况,蛋白质印迹法检测药物处理前后细胞内 BTK 信号通路蛋白及凋亡相关蛋白的表达水平。**结果** 依鲁替尼和 AVL-292 均可抑制 H929、RPMI8226 细胞增殖,其抑制作用呈浓度依赖性,依鲁替尼对 H929、RPMI8226 细胞 48 h 的半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC_{50})分别为 $(10.41 \pm 3.29) \mu\text{mol/L}$ 和 $(51.65 \pm 13.58) \mu\text{mol/L}$, AVL-292 对 H929、RPMI8226 细胞 48 h 的 IC_{50} 分别为 $(7.77 \pm 2.99) \mu\text{mol/L}$ 和 $(6.44 \pm 1.06) \mu\text{mol/L}$ 。不同浓度的依鲁替尼(5、10 $\mu\text{mol/L}$)和 AVL-292(5、10 $\mu\text{mol/L}$)分别与不同浓度的硼替佐米(5、10、20、50 nmol/L)联合应用对 H929、RPMI8226 细胞增殖的抑制率均高于相应浓度单药组($P < 0.05$, $P < 0.01$),不同组合的协同系数 R 均 > 1.0 。10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼、10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 和 20 nmol/L 硼替佐米单独作用 48 h 后, H929 细胞的凋亡率分别为 $(15.12 \pm 1.59)\%$ 、 $(18.23 \pm 6.38)\%$ 和 $(10.71 \pm 1.62)\%$,均高于对照组 $[(6.46 \pm 1.18)\%$; $P < 0.05$, $P < 0.01$]; RPMI8226 细胞的凋亡率分别为 $(9.29 \pm 1.44)\%$ 、 $(15.01 \pm 4.99)\%$ 和 $(7.58 \pm 1.13)\%$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼和 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 单药组与对照组 $[(5.54 \pm 1.61)\%$] 比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼和 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 分别与 20 nmol/L 硼替佐米联合后, H929 细胞凋亡率分别为 $(40.31 \pm 3.94)\%$ 和 $(51.55 \pm 6.39)\%$, RPMI8226 细胞凋亡率分别为 $(31.86 \pm 1.93)\%$ 和 $(43.23 \pm 4.03)\%$,均高于相应单药组($P < 0.01$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼单药和 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 单药作用 24 h 后, H929 细胞内 BTK、NF- κ B p65、Akt 和 ERK 的磷酸化水平及 Bcl-x $_l$ 蛋白表达水平均较对照组降低($P < 0.05$), cleaved caspase-3 表达水平均较对照组升高($P < 0.01$); 两药分别联合 20 nmol/L 硼替佐米后,对上述蛋白的调节作用均较相应单药组增强($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** BTK 抑制剂依鲁替尼和 AVL-292 对多发性骨髓瘤细胞系 H929、RPMI8226 有增殖抑制和凋亡诱导作用,并与蛋白酶体抑制剂硼替佐米有协同作用,其机制可能与抑制细胞内 BTK 活性及下游 NF- κ B、Akt、ERK 信号通路活性,下调抗凋亡蛋白 Bcl-x $_l$ 表达、激活 caspase-3 依赖的凋亡途径有关。

[关键词] 多发性骨髓瘤;布鲁顿酪氨酸激酶;依鲁替尼;AVL-292;硼替佐米;药物协同作用

[中图分类号] R 733.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)11-1325-08

Effect of Bruton's tyrosine kinase inhibitors combined with bortezomib on human multiple myeloma cell lines and its mechanism

ZHANG Wen, CHENG Hui, TANG Gu-sheng, DING Jing, HU Xiao-xia, YANG Jian-min, WANG Jian-min, LÜ Shu-qing*
Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors, ibrutinib and AVL-292 alone or in combination with proteasome inhibitor bortezomib on human multiple myeloma (MM) cell lines H929 and RPMI8226 and the related mechanism. **Methods** H929 and RPMI8226 cells were treated with ibrutinib or AVL-292 alone or in combination with bortezomib *in vitro*. The cell viability was detected by CCK-8 assay after treatment, the apoptosis levels were analyzed by

[收稿日期] 2016-08-17 **[接受日期]** 2016-10-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30873042,81100361),上海市自然科学基金(07ZR14146). Supported by National Natural Science Foundation of China (30873042, 81100361) and Natural Science Foundation of Shanghai (07ZR14146).

[作者简介] 张雯,硕士生. E-mail: zhangwentt2013@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161298, E-mail: shuqing7266@163.com

flow cytometry, the expression and phosphorylation levels of BTK pathway proteins and apoptosis-related proteins were measured by Western blotting analysis. **Results** The proliferation of H929 and RPMI8226 cells was inhibited by ibrutinib and AVL-292 in a dose-dependent manner. The 48 h median inhibitory concentration (IC_{50}) values of ibrutinib in the two cell lines were $(10.41 \pm 3.29) \mu\text{mol/L}$ and $(51.65 \pm 13.58) \mu\text{mol/L}$, respectively, and the 48 h IC_{50} values of AVL-292 were $(7.77 \pm 2.99) \mu\text{mol/L}$ and $(6.44 \pm 1.06) \mu\text{mol/L}$, respectively. The inhibition effects of different concentrations of ibrutinib ($5 \mu\text{mol/L}$, $10 \mu\text{mol/L}$) and AVL-292 ($5 \mu\text{mol/L}$, $10 \mu\text{mol/L}$) combined with different concentrations of bortezomib (5 nmol/L , 10 nmol/L , 20 nmol/L , and 50 nmol/L) were significantly higher than those of the corresponding single agents ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the coefficients of concordance (R) of different combinations were all above 1.0. After treatment with $10 \mu\text{mol/L}$ ibrutinib, $10 \mu\text{mol/L}$ AVL-292 and 20 nmol/L bortezomib alone for 48 h, the apoptosis levels of H929 cells were $(15.12 \pm 1.59)\%$, $(18.23 \pm 6.38)\%$ and $(10.71 \pm 1.62)\%$, respectively, which were all significantly higher than that of the control group ($[6.46 \pm 1.18]\%$; $P < 0.05$, $P < 0.01$); the apoptosis levels of RPMI8226 cells were $(9.29 \pm 1.44)\%$, $(15.01 \pm 4.99)\%$ and $(7.58 \pm 1.13)\%$, respectively, and those of treated with $10 \mu\text{mol/L}$ ibrutinib and $10 \mu\text{mol/L}$ AVL-292 were significantly higher than that of the control group ($[5.54 \pm 1.61]\%$, $P < 0.05$). The apoptosis levels of H929 cells in the 20 nmol/L bortezomib+ $10 \mu\text{mol/L}$ ibrutinib and 20 nmol/L bortezomib+ $10 \mu\text{mol/L}$ AVL-292 groups were $(40.31 \pm 3.94)\%$ and $(51.55 \pm 6.39)\%$, respectively, and those of RPMI8226 cells were $(31.86 \pm 1.93)\%$ and $(43.23 \pm 4.03)\%$, respectively, and they were all significantly higher than those in their corresponding single agent groups ($P < 0.01$). Compared with control group, the phosphorylation levels of BTK, NF- κ B p65, Akt and ERK and expression of Bcl- x_L protein were significantly decreased in H929 cells treated with $10 \mu\text{mol/L}$ ibrutinib or $10 \mu\text{mol/L}$ AVL-292 for 24 h ($P < 0.05$), and the expression of cleaved caspase-3 was significantly increased ($P < 0.01$). The regulation effects on the above indices were significantly more evident when the two agents were combined with 20 nmol/L bortezomib ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Both ibrutinib and AVL-292 can inhibit proliferation and induce apoptosis of human MM cell lines H929 and RPMI8226; there are significant synergistic effects between them and proteasome inhibitor bortezomib, which may be related to inhibition of BTK activity and the downstream pathways (NF- κ B, Akt and ERK), down-regulation of Bcl- x_L and activation of caspase-3 apoptotic pathway.

[Key words] multiple myeloma; Bruton's tyrosine kinase; ibrutinib; AVL-292; bortezomib; drug synergism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(11): 1325-1332]

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性浆细胞增殖性疾病,其发病率居血液系统恶性肿瘤的第2位^[1]。虽然近年来对其治疗取得了一定进展,如蛋白酶体抑制剂硼替佐米(bortezomib)的应用极大提高了治疗的总反应率,延长了患者的生存期^[2],但MM仍不可治愈,复发率高。除初治不敏感的患者外,有近一半的初治敏感患者复发后对硼替佐米治疗的反应性降低^[3],因此寻找新的治疗药物、探索联合用药方案是进一步提高MM疗效和预后的关键。布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)是一种胞质酪氨酸蛋白激酶,主要表达于各分化阶段的B细胞,在除T细胞、NK细胞和正常浆细胞之外的其他造血细胞中也有表达,对正常B细胞的分化、发育及功能有重要影响^[4-5]。近年的研究表明, BTK在多种造血系统恶性肿瘤,如慢性淋巴

性髓细胞白血病及MM中的表达均升高^[6]。针对BTK的选择性抑制剂依鲁替尼(ibrutinib)可通过与BTK活性位点的半胱氨酸残基(Cys-481)共价结合而抑制其磷酸化,从而不可逆地抑制其激酶活性,其对BTK的半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC_{50})为 0.5 nmol/L ^[7],目前已在慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤及急性髓细胞白血病中显示出有效的体内外抗肿瘤活性^[8-11],对MM的作用也有报道^[12-13]。AVL-292(CC-292)是另一种新型的BTK选择性抑制剂,其作用机制与依鲁替尼相似,对BTK的 $IC_{50} < 0.5 \text{ nmol/L}$,目前有关AVL-292的研究正处于针对某些复发难治性B细胞性非霍奇金淋巴瘤及慢性淋巴细胞白血病的临床I期试验^[14]中,但该药对MM的作用研究报道尚少。本研究通过观察比较两种BTK抑制剂依鲁替尼和AVL-292对人MM细胞系H929、RPMI8226

细胞增殖和凋亡的影响, 以及与硼替佐米的联合效应, 探讨其可能的效应机制, 以期为 BTK 抑制剂的临床应用提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物及主要试剂 依鲁替尼、AVL-292 (Selleck 公司; 目录号: S2680, S7173), 硼替佐米 (西安杨森制药有限公司, 批号 FCZTA00)。RPMI 1640 培养基 (HyClone 公司), 胎牛血清 (Gibco 公司), CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 [东仁化学科技 (上海) 有限公司], p65 (NF- κ B p65)、p-p65 (p-NF- κ B p65)、p-BTK (Tyr223)、p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 和 cleaved caspase-3 单抗 (Cell Signaling 公司), ERK1/2 单抗 (巴傲得生物科技有限公司), Akt、p-Akt (Ser473) 单抗 (Affinity 公司), Bcl-x_L 单抗 (Santa Cruz 公司), BTK 多抗 (Proteintech 公司), β -actin 单抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗、BCA 蛋白定量检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (武汉谷歌生物科技有限公司)。

1.2 细胞株和细胞培养 人 MM 细胞系 H929 和 RPMI8226 购自广州吉妮欧生物科技有限公司。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱中培养, 2~3 d 换液一次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖活性 取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 5×10^4 /mL, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L。向各孔加入不同浓度的依鲁替尼 (终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、5、10、50、100 μ mol/L) 或 AVL-292 (终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、5、10、50、100 μ mol/L)。以加药孔为实验孔, 不加药孔为对照孔, 另设空白孔, 每组 4 个复孔。培养 24 h 或 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L, 继续培养 2 h 后检测 450 nm 处光密度 (D) 值。实验重复 3 次。细胞生存率 (%) = $(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$, 增殖抑制率 (%) = $100\% - \text{细胞生存率}$ 。用 GraphPad Prism 5 软件计算药物的 IC₅₀。药物联合实验时, 将依鲁替尼 (5、10 μ mol/L) 或

AVL-292 (5、10 μ mol/L) 分别与不同浓度的硼替佐米 (5、10、20、50 nmol/L) 联合处理 H929 和 RPMI8226 细胞, 48 h 后采用上述方法评价各组细胞的增殖活性。应用公式 $R = S_{\text{exp}} / S_{\text{obs}}$ 评价两种药物的协同作用, 其中 R 为协同系数, S_{exp} 为两种单药作用后细胞生存率之乘积, S_{obs} 为实际检测的联合用药的细胞生存率。当 $R > 1.0$ 时, 两种药物具有协同作用^[15]。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 接种于 6 孔板。实验设 6 组: 对照组 (无药物)、20 nmol/L 硼替佐米组、10 μ mol/L 依鲁替尼组、10 μ mol/L AVL-292 组、20 nmol/L 硼替佐米 + 10 μ mol/L 依鲁替尼组和 20 nmol/L 硼替佐米 + 10 μ mol/L AVL-292 组。向各孔加入上述不同浓度药物。培养 48 h 后收集细胞, 离心去上清, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 将细胞重悬于 500 μ L 结合缓冲液中, 取 100 μ L, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L PI, 混匀; 室温避光反应 15 min 后, 再加入 400 μ L 结合缓冲液。1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 总细胞凋亡率 (%) = Annexin V-FITC 单阳性细胞 (早期凋亡) 百分率 + Annexin V-FITC 和 PI 双阳性细胞 (晚期凋亡) 百分率。实验重复 3 次。

1.5 蛋白质印迹法检测 H929 细胞内 BTK 信号通路蛋白及凋亡相关蛋白表达 取对数生长期 H929 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 接种于 6 孔板, 实验分组同上。培养 24 h 后, 收集各组细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 每孔取 30 μ g 蛋白上样, 10% SDS-PAGE 分离, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 分别加入适当稀释的一抗过夜, 洗膜后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 2 h, 洗膜后 ECL 显影曝光, 扫描胶片。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 两个以上样本均数的比较采用单因素方差分析并用 LSD 法进行两两比较。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 依鲁替尼和 AVL-292 对人 MM 细胞系增殖活性的影响 CCK-8 法检测结果显示, 依鲁替尼和

AVL-292 均可抑制 H929、RPMI8226 细胞增殖,其抑制作用呈浓度依赖性。对于 H929 细胞,当依鲁替尼浓度为 10、50、100 $\mu\text{mol/L}$, AVL-292 浓度为 5、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 时,24 h 细胞活性与 48 h 细胞活性差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),呈现出时间依赖性。依鲁替尼对 H929、RPMI8226 细

胞的 48 h IC_{50} 分别为 $(10.41 \pm 3.29) \mu\text{mol/L}$ 和 $(51.65 \pm 13.58) \mu\text{mol/L}$, AVL-292 对 H929、RPMI8226 细胞的 48 h IC_{50} 分别为 $(7.77 \pm 2.99) \mu\text{mol/L}$ 和 $(6.44 \pm 1.06) \mu\text{mol/L}$, 两药对 RPMI8226 细胞的 IC_{50} 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

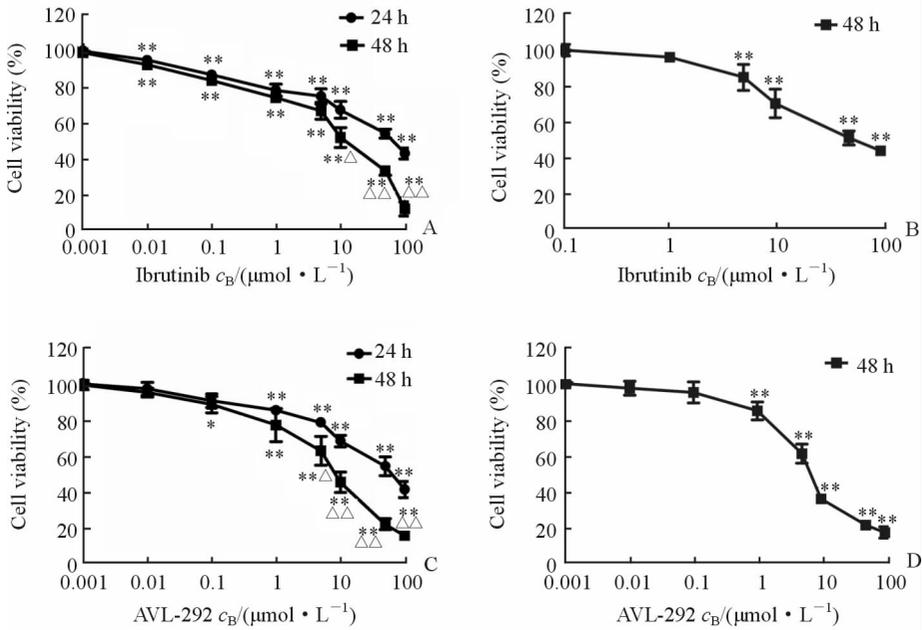


图 1 依鲁替尼和 AVL-292 对 H929、RPMI8226 细胞增殖的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of ibrutinib and AVL-292 against proliferation of H929 and RPMI8226 cells

A, C: H929 cells; B, D: RPMI8226 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group (100%); $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 24 h. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 依鲁替尼和 AVL-292 与硼替佐米联合对人 MM 细胞系增殖活性的影响 将不同浓度的依鲁替尼(5、10 $\mu\text{mol/L}$)和 AVL-292(5、10 $\mu\text{mol/L}$)分别与不同浓度的硼替佐米(5、10、20、50 nmol/L)联合处理 H929、RPMI8226 细胞 48 h。CCK-8 法检测结果显示,随着硼替佐米作用浓度的增加,H929 和 RPMI8226 细胞的生存率逐渐降低。联合依鲁替尼或 AVL-292 后,生存率下降更为明显;各联合用药组对两种 MM 细胞的增殖抑制作用均高于相应浓度的单药组($P < 0.05, P < 0.01$);并且两种细胞各联合用药组的协同系数 R 均 > 1.0 ,表明依鲁替尼与硼替佐米、AVL-292 与硼替佐米对 H929、RPMI8226 细胞增殖的抑制具有协同作用(图 2)。

2.3 依鲁替尼和 AVL-292 与硼替佐米对人 MM 细胞系凋亡的影响 流式细胞分析结果显示,经 20 nmol/L 硼替佐米、10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼、10 $\mu\text{mol/L}$

AVL-292、20 nmol/L 硼替佐米+10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼和 20 nmol/L 硼替佐米+10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 作用 48 h 后,H929 细胞的凋亡率均较对照组升高($P < 0.05, P < 0.01$);且 20 nmol/L 硼替佐米+10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼组和 20 nmol/L 硼替佐米+10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 组的细胞凋亡率均高于相应单药组,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明联合用药对凋亡诱导具有协同作用。而同样的处理后,10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼组和 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 组 RPMI8226 细胞的凋亡率与其对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);20 nmol/L 硼替佐米组 RPMI8226 细胞的凋亡与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);联合用药组 RPMI8226 细胞的凋亡率亦高于相应单药组,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明联合用药对 RPMI8226 细胞凋亡诱导亦具有协同作用。见图 3。

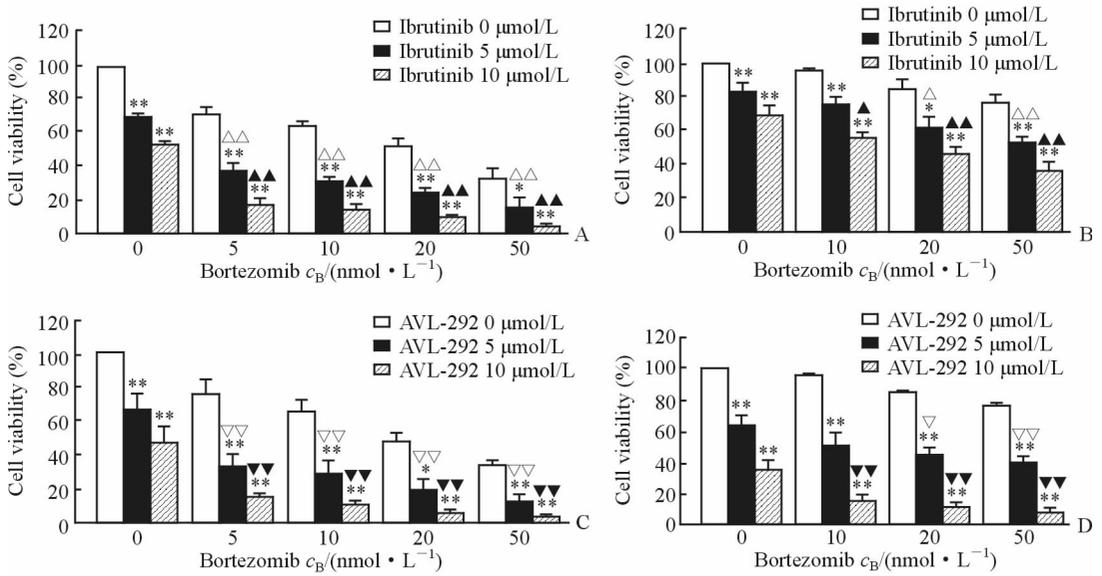


图 2 依鲁替尼、AVL-292 和硼替佐米对 H929、RPMI8226 细胞的增殖抑制作用

Fig 2 H929 and RPMI8226 cells were treated with ibrutinib and AVL-292 alone or in combination with bortezomib

A, C; H929 cells; B, D; RPMI8226 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs bortezomib alone group of corresponding concentration; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ ibrutinib + 0 nmol/L bortezomib group; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ ibrutinib + 0 nmol/L bortezomib group; $\nabla P < 0.05$, $\nabla\nabla P < 0.01$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 + 0 nmol/L bortezomib group; $\blacktriangledown P < 0.01$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 + 0 nmol/L bortezomib group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

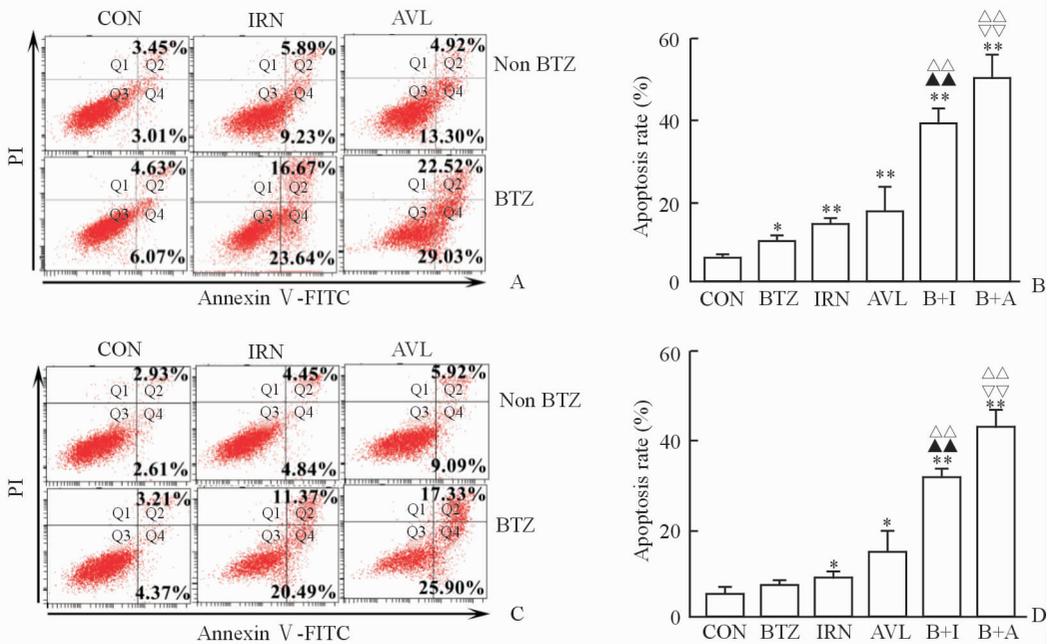


图 3 依鲁替尼、AVL-292 和硼替佐米对 H929、RPMI8226 细胞凋亡的诱导作用

Fig 3 Apoptosis of H929 and RPMI8226 cells induced by ibrutinib and AVL-292 alone or in combination with bortezomib

A, B; H929 cells; C, D; RPMI8226 cells. CON; Control; IRN; 10 $\mu\text{mol/L}$ ibrutinib; AVL; 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292; BTZ; 20 nmol/L bortezomib; B+I; 20 nmol/L bortezomib + 10 $\mu\text{mol/L}$ ibrutinib; B+A; 20 nmol/L bortezomib + 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs BTZ group; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs IRN group; $\nabla\nabla P < 0.01$ vs AVL group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 依鲁替尼和 AVL-292 与硼替佐米对人 MM 细胞内 BTK 信号通路蛋白磷酸化及凋亡相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹分析法检测药物作用前后

H929 细胞内 BTK 信号通路蛋白 BTK、NF- κ B p65、Akt、ERK 和磷酸化蛋白 p-BTK、p-p65、p-Akt、p-ERK 以及凋亡相关蛋白 Bcl-x_L、cleaved caspase-3

表达水平,结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 依鲁替尼和 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292 作用 24 h 后, H929 细胞内 p-BTK、p-p65、p-Akt、p-ERK 和 Bcl-x_L 蛋白水平均较对照组降低($P < 0.05$), cleaved caspase-3 蛋白水平均较对照组升高($P < 0.01$); 两药分别联合

20 nmol/L 硼替佐米后, p-BTK、p-p65、p-Akt、p-ERK 和 Bcl-x_L 蛋白降低及 cleaved caspase-3 蛋白增加的程度均较依鲁替尼、AVL-292 单独用药组进一步增强($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4。

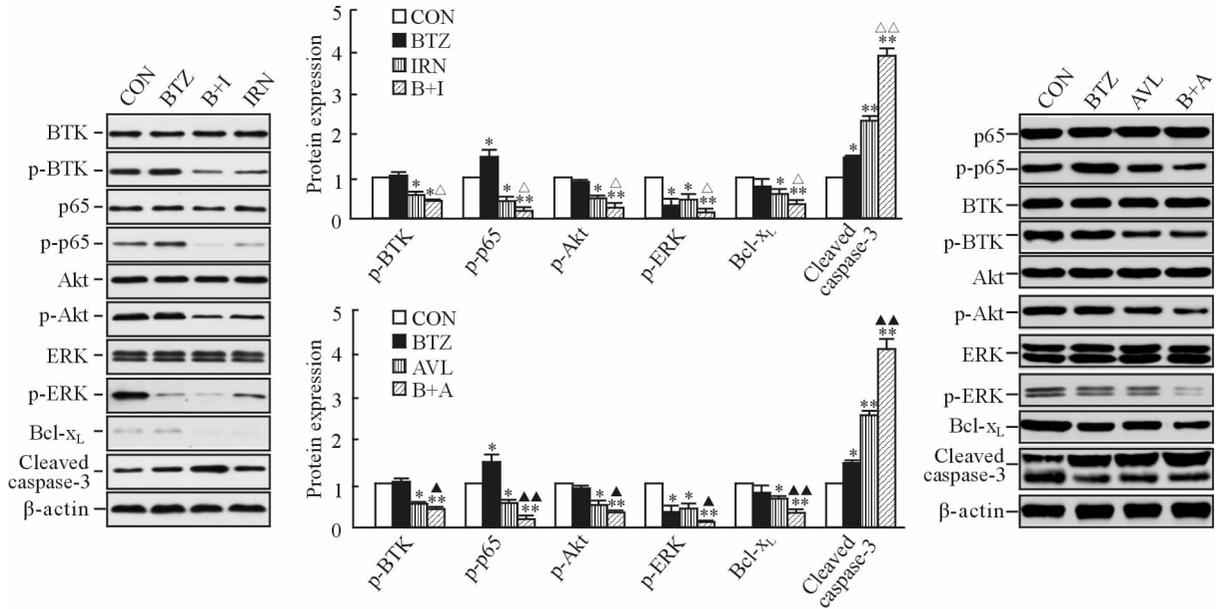


图 4 依鲁替尼、AVL-292 和硼替佐米对 H929 细胞内 BTK 信号通路蛋白及凋亡相关蛋白的调节作用

Fig 4 Effects of ibrutinib, AVL-292 and bortezomib on expression of multiple BTK-associated signaling pathway proteins and apoptosis-associated proteins in H929 cells

CON; Control; BTZ; 20 nmol/L bortezomib; IRN; 10 $\mu\text{mol/L}$ ibrutinib; B+I; 20 nmol/L bortezomib + 10 $\mu\text{mol/L}$ ibrutinib; AVL; 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292; B+A; 20 nmol/L bortezomib + 10 $\mu\text{mol/L}$ AVL-292; BTK; Bruton's tyrosine kinase; p-BTK; Phospho-BTK; p-p65; Phospho-p65; Akt; Protein kinase B; p-Akt; Phospho-Akt; ERK; Extracellular signal-related kinase; p-ERK; Phospho-ERK. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs IRN group; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs AVL group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

NF- κ B 是一种重要的信号转录因子,其家族由 p65 (RelA)、RelB、c-Rel、p50 (NF- κ B 1) 和 p52 (NF- κ B 2) 5 个成员组成。在未激活的细胞中,大部分 NF- κ B 与胞质中的抑制因子 I κ B 结合而以无活性状态存在,当细胞受到外界信号刺激后,I κ B 激酶复合体(I κ B kinase, IKK)活化将 I κ B 磷酸化,磷酸化的 I κ B 经泛素-26S 蛋白酶体系统降解,使得 NF- κ B 与之分离,并进入细胞核内参与众多介导细胞增殖、抗凋亡及细胞因子分泌的基因的表达^[16]。在 MM 中,NF- κ B 蛋白表达及活性水平升高,对疾病发生、发展产生重要影响^[17]。蛋白酶体抑制剂硼替佐米能够抑制泛素-26S 蛋白酶体对 I κ B 的降解,逆转 NF- κ B 活化而发挥抗肿瘤效应^[18]。然而,

Hideshima 等^[19]发现硼替佐米也可诱导 MM 细胞中 IKK 活化及 I κ B 磷酸化降解,从而激活 NF- κ B 信号,降低硼替佐米的疗效甚至导致耐药。

近年的研究表明,BTK 在多种造血系统恶性肿瘤中的表达及活性升高^[6],其选择性抑制剂依鲁替尼在抑制 BTK 磷酸化激活的同时,也可降低 PI3K/Akt、MAPK/ERK 和 NF- κ B 信号通路活性而发挥良好的抗肿瘤效应^[8-11]。Rushworth 等^[12]证明,MM 细胞系及原代 MM 细胞中有 BTK 表达,依鲁替尼抑制 RPMI8226、U266 和原代 MM 细胞中 NF- κ B p65 的磷酸化,而 p65 是 NF- κ B 经典通路中最重要的效应元件,从而抑制 NF- κ B 通路活性来发挥抗肿瘤效应。Tai 等^[13]发现,依鲁替尼能够抑制 MM 细胞系 ANBL6、INA6 和原代 CD138⁺ MM 细胞中 NF- κ B 及 ERK 磷酸化激活,抑制肿瘤细胞增

殖。Yu 等^[20]发现,在多种 B 淋巴细胞系和原代 B 细胞中,BTK 可以诱导 NF- κ B 的活化,而活化后的 NF- κ B 又可以促进 BTK 的转录,这种正反馈显著地放大了 BTK 及 NF- κ B 的信号强度。尤其在硼替佐米耐药的 MM 细胞中,NF- κ B 和 BTK 的磷酸化水平显著升高,并且硼替佐米失去了对 NF- κ B 活化的抑制作用^[21]。

本研究中,我们评估了 BTK 抑制剂依鲁替尼和 AVL-292 单药及与蛋白酶体抑制剂硼替佐米联合应用对 MM 细胞系 H929 和 RPMI8226 细胞增殖、凋亡的影响,并观察了对 BTK、NF- κ B 等信号通路蛋白和凋亡相关蛋白的表达及磷酸化的调节作用。在前期实验中我们发现,RPMI8226 细胞对生长环境变化较敏感,传代、铺板等操作会对细胞活性产生一定影响。即便在不加药对照组,铺板后 24 h 以内的细胞活性分析亦显示较大的组内差异;而于铺板后 48 h 检测细胞活性时,复孔间的组内差异减小至正常范围,药物作用趋势清晰,考虑细胞已适应孔板中的生长环境,细胞本身状态一致,组间结果差异主要是由药物浓度差异引起的。因此,在评估依鲁替尼和 AVL-292 对细胞增殖的影响时,对于 H929 细胞,我们选取了 24 h 和 48 h 的结果进行分析;对于 RPMI8226 细胞,我们仅以 48 h 的结果进行分析。结果显示,依鲁替尼对 H929 和 RPMI8226 细胞具显著增殖抑制作用,与硼替佐米联合应用有明显的协同增殖抑制作用。Kokabee 等^[22]发现前列腺癌细胞中有 BTK 表达,AVL-292 (1、10、20、30 μ mol/L)能够抑制表达 BTK 的前列腺癌细胞系 LNCaP 和 DU145 细胞增殖。本研究证实 AVL-292 亦可有效地抑制 H929、RPMI8226 细胞增殖,与硼替佐米也有明显的协同增殖抑制作用。依鲁替尼和 AVL-292 对 H929 细胞 48 h 的 IC_{50} 分别为 $(10.41 \pm 3.29) \mu$ mol/L 和 $(7.77 \pm 2.99) \mu$ mol/L,对 RPMI8226 细胞 48 h 的 IC_{50} 分别为 $(51.65 \pm 13.58) \mu$ mol/L 和 $(6.44 \pm 1.06) \mu$ mol/L,AVL-292 对两株细胞的 48 h IC_{50} 值均较依鲁替尼更低;在 RPMI8226 细胞,两药 IC_{50} 值差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。流式细胞术分析发现,依鲁替尼和 AVL-292 均可诱导 H929、RPMI8226 细胞凋亡,相同浓度 (10 μ mol/L) 的 AVL-292 对 H929 和 RPMI8226 细胞的凋亡诱导率均高于依鲁替尼,而

且两药与硼替佐米都有明显的协同凋亡诱导作用,AVL-292 联合硼替佐米较依鲁替尼联合硼替佐米能够更显著地诱导细胞凋亡。进一步研究发现,H929 细胞有 BTK 蛋白及活化的 BTK 蛋白的表达,依鲁替尼和 AVL-292 作用后 p-BTK、p-p65、p-Akt、p-ERK 蛋白水平均下调,表明这两种 BTK 抑制剂可通过抑制 BTK 活性来抑制下游 NF- κ B、Akt、ERK 信号通路的活性;另外检测结果显示两药分别与硼替佐米联合后,对此 3 条信号途径的抑制作用进一步增强。此外,依鲁替尼和 AVL-292 均能下调 H929 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl- x_L 表达,诱导 caspase-3 剪切,从而激活 caspase-3 依赖的凋亡;联合硼替佐米后,对 Bcl- x_L 、cleaved caspase-3 的调节作用也明显增强。

综上所述,本研究表明,依鲁替尼和 AVL-292 一方面通过抑制 BTK 激酶活性,阻断 BTK 下游 NF- κ B、Akt 和 ERK 促生存信号通路,抑制人 MM 细胞增殖;另一方面,通过下调抗凋亡蛋白 Bcl- x_L 表达,促进 caspase-3 酶解活化,诱导人 MM 细胞凋亡;与硼替佐米联合应用,对这些信号通路蛋白及凋亡相关蛋白的调节作用增强,从而发挥协同抗 MM 效应。因此,依鲁替尼和 AVL-292 作为新型的 BTK 抑制剂,与硼替佐米联合应用有协同作用,在治疗 MM 中显示出良好的应用前景,为进一步提高 MM 患者临床疗效、延缓耐药、改善预后提供新的治疗方案选择。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 5-29.
- [2] PALUMBO A, ATTAL M, ROUSSEL M. Shifts in the therapeutic paradigm for patients newly diagnosed with multiple myeloma: maintenance therapy and overall survival[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17: 1253-1263.
- [3] LONIAL S, MITSIADES C S, RICHARDSON P G. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17: 1264-1277.
- [4] SATTERTHWAITTE A B, WITTE O N. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function: a genetic perspective[J]. Immunol Rev, 2000, 175: 120-127.
- [5] SMITH C I, BASKIN B, HUMIRE-GREIFF P,

- ZHOU J, OLSSON P G, MANIAR H S, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, *BTK*, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells[J]. *J Immunol*, 1994, 152: 557-565.
- [6] HENDRIKS R W, YUVARAJ S, KIL L P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 219-232.
- [7] PAN Z, SCHEERENS H, LI S, SCHULTZ B E, SPRENGELER P A, BURRILL L C, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase[J]. *ChemMedChem*, 2007, 2: 58-61.
- [8] HERMAN S E, GORDON A L, HERTLEIN E, RAMANUNNI A, ZHANG X L, JAGLOWSKI S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765[J]. *Blood*, 2011, 117: 6287-6296.
- [9] DASMAHAPATRA G, PATEL H, DENT P, FISHER R I, FRIEDBERG J, GRANT S. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 synergistically increases proteasome inhibitor activity in diffuse large-B cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) cells sensitive or resistant to bortezomib[J]. *Br J Haematol*, 2013, 161: 43-56.
- [10] RUSHWORTH S A, MURRAY M Y, ZAITSEVA L, BOWLES K M, MACEWAN D J. Identification of Bruton's tyrosine kinase as a therapeutic target in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2014, 123: 1229-1238.
- [11] ADVANI R H, BUGGY J J, SHARMAN J P, SMITH S M, BOYD T E, GRANT B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 88-94.
- [12] RUSHWORTH S A, BOWLES K M, BARRERA L N, MURRAY M Y, ZAITSEVA L, MACEWAN D J. BTK inhibitor ibrutinib is cytotoxic to myeloma and potently enhances bortezomib and lenalidomide activities through NF- κ B[J]. *Cell Signal*, 2013, 25: 106-112.
- [13] TAI Y Z, CHANG B Y, KONG S Y, FULCINITI M, YANG G, CALLE Y, et al. Bruton tyrosine kinase inhibition is a novel therapeutic strategy targeting tumor in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2012, 120: 1877-1887.
- [14] BURGER J A. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in clinical trials[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2014, 9: 44-49.
- [15] ROMANELLI S, PEREGO P, PRATESI G, CARENINI N, TORTORETO M, ZUNINO F. *In vitro* and *in vivo* interaction between cisplatin and topotecan in ovarian carcinoma systems[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998, 41: 385-390.
- [16] PERKINS N D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 121-132.
- [17] ANNUNZIATA C M, DAVIS R E, DEMCHENKO Y, BELLAMY W, GABREA A, ZHAN F H, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF- κ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma[J]. *Cancer Cell*, 2007, 12: 115-130.
- [18] MARKOVINA S, CALLANDER N S, O'CONNOR S L, XU G, SHI Y F, LEITH C P, et al. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF- κ B activity in myeloma cells[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 176.
- [19] HIDEHISHI T, IKEDA H, CHAUHAN D, OKAWA Y, RAJE N, PODAR K, et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells[J]. *Blood*, 2009, 114: 1046-1052.
- [20] YU L, MOHAMED A J, SIMONSON O E, VARGAS L, BLOMBERG K E, BJ RKSTRAND B, et al. Proteasome-dependent autoregulation of Bruton tyrosine kinase (Btk) promoter via NF- κ B[J]. *Blood*, 2008, 111: 4617-4626.
- [21] MARKOVINA S, CALLANDER N S, O'CONNOR S L, KIM J, WERNDLI J E, RASCHKO M, et al. Bortezomib-resistant nuclear factor- κ B activity in multiple myeloma cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6: 1356-1364.
- [22] KOKABEE L, WANG X H, SEVINSKY C J, WANG W L, CHEU L, CHITTUR S V, et al. Bruton's tyrosine kinase is a potential therapeutic target in prostate cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16: 1604-1615.