

拉帕替尼通过激活p38MAPK信号通路 促进NB4细胞凋亡

刘 路^{1,2} 刘北忠^{1,2} 赵 毅¹ 陈 敏¹ 姚仕菲¹ 李连文¹ 肖春兰¹
单志灵² 徐 婷¹ 淦柳根¹ 钟 梁^{2*}

(¹重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160;

²重庆医科大学, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文探讨了拉帕替尼对急性早幼粒细胞白血病NB4细胞增殖和凋亡的影响及相关分子机制。用p38MAPK抑制剂和不同浓度的拉帕替尼处理NB4细胞24 h, CCK-8(cell counting kit-8)实验检测细胞增殖, FITC-Annexin V/PI双染色法检测细胞凋亡, 光学显微镜和Hoechst 33258染色观察细胞形态, Western blot检测Bcl-2(B cell leukemia-2)、Bax(Bcl-2 associated X protein)、caspase-3、PARP(poly-ADP-ribose polymerase)、PML-RAR α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha)、p38MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase)和p-p38MAPK(phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase)等蛋白质水平。结果显示, 随着拉帕替尼药物浓度的增加, 细胞增殖率显著降低, 细胞凋亡数量明显增加, Hoechst 33258染色可见染色质浓缩、碎裂等凋亡现象。同时, 拉帕替尼能降低Bcl-2和PML-RAR α 蛋白质水平, 增加Bax、cleaved caspase-3、cleaved PARP和p-p38MAPK等蛋白质水平。用p38MAPK抑制剂预处理后, 细胞增殖率升高, 凋亡率降低, p-p38MAPK、Bax、cleaved caspase-3和cleaved PARP等蛋白质水平降低。该文结果提示, 拉帕替尼能够抑制NB4细胞增殖并促进细胞凋亡, 并且p38MAPK信号通路可能参与这些过程。

关键词 拉帕替尼; NB4细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; p38MAPK

Effects of Lapatinib on Cell Proliferation and Apoptosis in NB4 Cells

Liu Lu^{1,2}, Liu Beizhong^{1,2}, Zhao Yi¹, Chen Min¹, Yao Shifei¹, Li Lianwen¹, Xiao Chunlan¹,
Shan Zhiling², Xu Ting¹, Gan Liugen¹, Zhong Liang^{2*}

(¹Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

²Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education Faculty of Laboratory Medicine,
Key Laboratory of Chongqing, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study was aimed to investigate the effect of lapatinib on cell proliferation and apoptosis in NB4 cells, and its related mechanisms. NB4 cells were treated with p38MAPK inhibitor and different concentrations of lapatinib for 24 h. The proliferation of NB4 cells was detected by CCK-8 (cell counting kit-8) assay. Apoptosis was determined by Annexin V/PI double binding assay and Hoechst 33258 fluorescent staining. Morphological changes were observed under optical microscope. The protein levels of Bcl-2 (B cell leukemia-2), Bax (Bcl-2 associated X protein), caspase-3, PARP (poly-ADP-ribose polymerase), PML-RAR α (promyelocytic leukemia-

收稿日期: 2017-06-20 接受日期: 2017-08-25

国家自然科学基金(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金(批准号: 2011BA5037)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485388, E-mail: 530659075@qq.com

Received: June 20, 2017 Accepted: August 25, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and the Natural Science Foundation of Major Project of Chongqing (Grant No.2011BA5037)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485388, E-mail: 530659075@qq.com

网络出版时间: 2017-10-25 17:29:49

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1729.010.html>

retinoic acid receptor alpha), p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) and p-p38MAPK (phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase) were detected by Western blot. The results showed that lapatinib significantly inhibited proliferation and induced apoptosis of NB4 cells. Chromatin condensation and fragmentation were observed in lapatinib treated group. Lapatinib decreased the levels of Bcl-2 and PML-RAR α , increased the levels of Bax, cleaved caspase-3, cleaved PARP and p-p38MAPK. Meanwhile, SB203580 partially increase the viability of NB4 cells and reduced apoptosis induced by lapatinib; and decreased the levels of p-p38MAPK, Bax, cleaved caspase-3 and cleaved PARP. These results suggested that lapatinib inhibited proliferation and induced apoptosis in NB4 cells, and p38MAPK signal pathway may be involved in these processes.

Keywords lapatinib; NB4 cells; proliferation; apoptosis; p38MAPK

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)的一种亚型, 其遗传学特征是t(15;17)(q22;q21), 从而形成PML-RAR α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha)融合蛋白, 使粒细胞分化受阻在早幼粒细胞阶段, 导致白血病细胞发生恶性增殖^[1]。临床上, APL的治疗方案以全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)诱导细胞分化和三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)诱导细胞凋亡为主^[2]。虽然APL治疗已取得巨大进展, 但是仍有10%~30%的患者对ATRA或者ATO耐药^[3], 因而限制了这些药物的临床应用。因此, 寻找新的治疗药物变得十分重要。

拉帕替尼是一种针对表皮生长因子受体的小分子酪氨酸激酶(tyrosine kinase)抑制剂^[4], 是治疗表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)阳性转移性乳腺癌的一线药物^[5]。近年来, 拉帕替尼已被应用于三阴乳腺癌、鼻咽癌、宫颈癌等多种肿瘤的治疗^[6-8]。此外, 拉帕替尼能促进骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)和急性髓细胞白血病(AML)细胞凋亡, 诱导K562细胞分化, 促进U937细胞自噬等^[9-11]。然而, 关于拉帕替尼对急性早幼粒细胞白血病作用的研究较少, 本文主要研究拉帕替尼对急性早幼粒细胞白血病NB4细胞增殖和凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

拉帕替尼购自Selleck 公司, 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解成0.05 mol/L的母液, -80 °C保存。NB4细胞株由重庆医科大学临床

检验诊断学教育部重点实验室保存。RPMI-1640、新鲜胎牛血清购自Gibco公司。CCK-8试剂购自七海复泰生物科技有限公司。Hoechst 33258试剂和p38MAPK抑制剂SB203580购自碧云天生物技术有限公司。抗caspase-3、PML-RAR α 、p-p38MAPK和p38MAPK抗体购自Cell Signaling Technology公司。抗Bcl-2(B cell leukemia-2)、Bax(Bcl-2 associated X protein)、PARP(poly-ADP-ribose polymerase)抗体购自万类生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

NB4细胞培养于含有10%新鲜胎牛血清、100 μ g/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI-1640中, 置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 细胞增殖实验

取生长对数期的NB4细胞, 按照 1×10^4 /孔均匀接种于96孔板中, 拉帕替尼浓度为0(DMSO)、5、10、15、20 μ mol/L, 同时, 设置DMSO为阴性对照组。用10 μ mol/L SB203580预处理后, 拉帕替尼浓度为15 μ mol/L, 每组设置5个复孔。常规培养24 h后, 在普通光学显微镜下观察细胞状态。然后, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 置于培养箱中培养2 h, 在450 nm波长下检测吸光度(D)值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

按照 1×10^5 /mL密度接种于6孔板中, 每孔3 mL。拉帕替尼浓度为0、15、20 μ mol/L, 同时设置DMSO为阴性对照组, 用10 μ mol/L SB203580预处理时, 拉帕替尼浓度为15 μ mol/L。细胞培养24 h后, 收集细胞, 用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗3次, 3 000 r/min离心2 min。流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.5 Hoechst 33258实验观察细胞形态变化

收集各组细胞, PBS清洗3次, 将细胞悬液制成

细胞涂片。加入4%的多聚甲醛固定20 min, PBS清洗3次, 加入0.1% Triton透膜15 min, PBS清洗2次, 加入Hoechst 33258染液, 避光染5 min, PBS清洗3次, 封片, 荧光显微镜下观察细胞核形态。

1.6 Western blot检测NB4细胞中Bax、Bcl-2、caspase-3、PARP、PML-RAR α 、p38MAPK、p-p38MAPK等蛋白质水平

细胞培养24 h后, 收集细胞, 预冷PBS清洗3次, 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液冰上裂解细胞。每隔10 min震荡1次, 30 min后, 置于4 °C条件下, 13 000 r/min离心30 min, 取上清液, BCA(bicinchoninic acid)法测蛋白质浓度。取50 μ g待测蛋白质溶液, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电转于PVDF(polyvinylidene fluoride)膜, 5%的脱脂奶粉封闭1~2 h后, 4 °C一抗孵育过夜。TBST(tris buffered

saline tween)清洗2次, TBS(tris buffered saline)清洗1次, 每次10 min, 孵育二抗, 室温1 h, TBST清洗2次, TBS清洗1次, 每次10 min, 用显色剂ECL(electrochemical luminescence)试剂显色, 曝光。

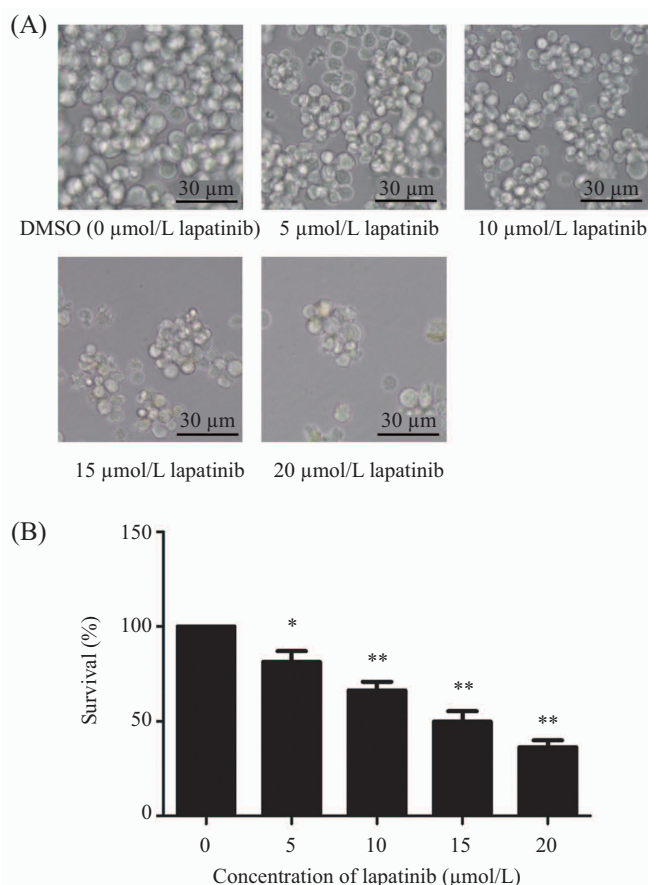
1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计学软件进行统计学分析, 所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。每组实验至少重复3次。

2 结果

2.1 拉帕替尼对NB4细胞增殖的影响

用0、5、10、15、20 μ mol/L的拉帕替尼处理NB4细胞24 h后, 在光学显微镜下观察细胞形态变化(图1A)。结果显示, 随着拉帕替尼药物浓度的增加, 细胞数量明显减少, 并出现不同程度的碎片。CCK-8结果显示, 随着拉帕替尼药物浓度的增加, NB4细胞的增殖率明显降低, 与对照组相比, 差异具

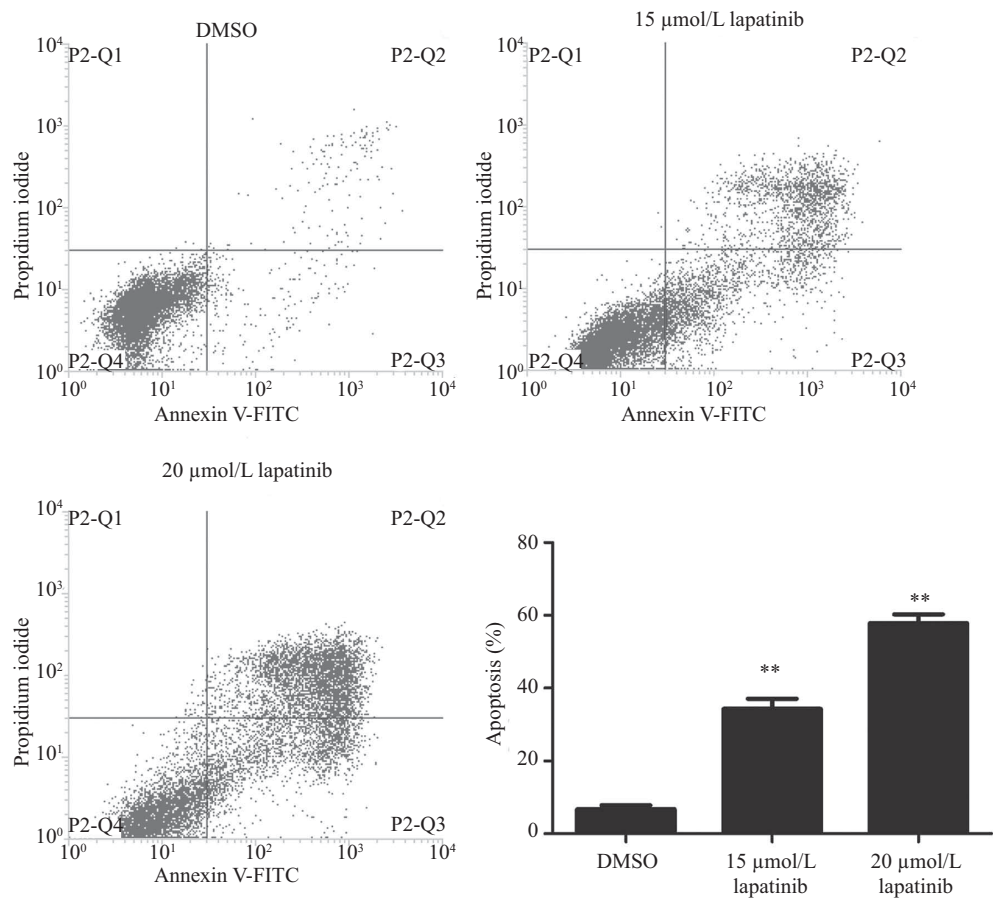


A: 不同浓度拉帕替尼处理NB4细胞24 h后, 光学显微镜观察细胞; B: CCK-8检测NB4细胞活力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(0 μ mol/L)比较。

A: NB4 cells were treated with different concentrations of lapatinib for 24 h, and observed under optical microscope; B: cell viability was detected by CCK-8 assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group (0 μ mol/L).

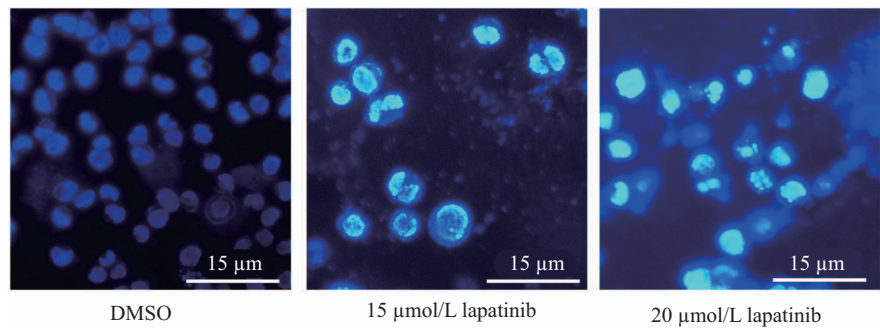
图1 拉帕替尼对NB4细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of lapatinib on the proliferation of NB4 cells



流式细胞术检测NB4细胞凋亡, ** $P<0.01$, 与对照组(DMSO)比较。
Apoptosis was analyzed by flow cytometry, ** $P<0.01$ vs control group (DMSO).

图2 拉帕替尼对NB4细胞凋亡的影响
Fig.2 Effect of lapatinib on the apoptosis of NB4 cells



用Hoechst 33258将NB4细胞染色后, 荧光显微镜下观察细胞形态。
Cells stained with Hoechst 33258 were imaged with fluorescence microscope.

图3 拉帕替尼对NB4细胞形态学的影响
Fig.3 Effect of lapatinib on the morphological of NB4 cells

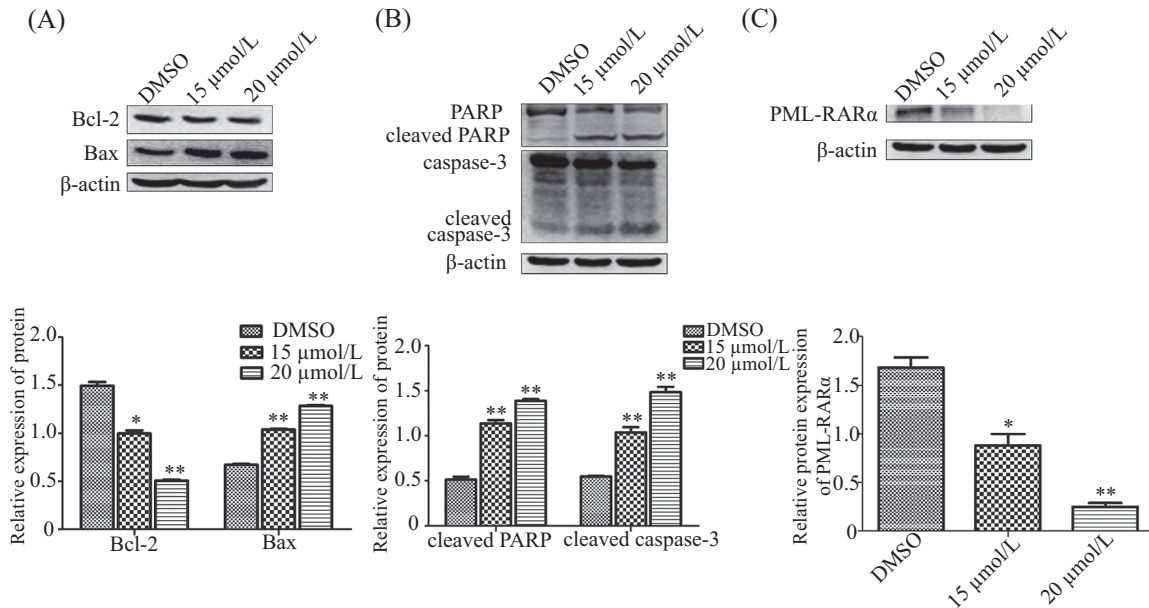
有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)(图1B)。

2.2 拉帕替尼对NB4细胞凋亡的影响

用0、15、20 μmol/L的拉帕替尼处理NB4细胞24 h后, 用FITC-Annexin V/PI双染色检测NB4细胞凋亡。结果显示, 随着拉帕替尼浓度升高, 细胞凋亡数量逐渐增加, 与对照组比较, 有显著性差异($P<0.01$)(图2)。

2.3 拉帕替尼对NB4细胞形态学的影响

用0、15、20 μmol/L的拉帕替尼处理NB4细胞24 h后, Hoechst 33258染色在荧光显微镜下观察细胞, 结果显示, 对照组的细胞核被染成密度均匀的淡蓝色, 而拉帕替尼处理后的细胞核呈片状或碎块状的致密浓染状态, 同时细胞核呈现较强的蓝色荧光(图3)。

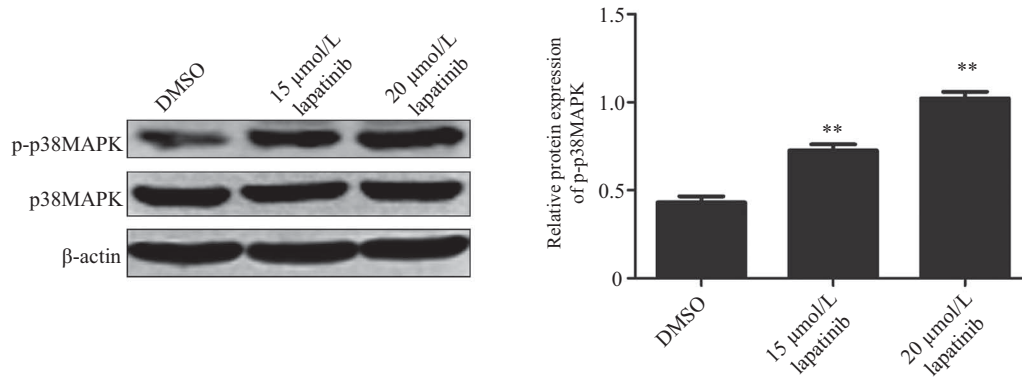


A: Western blot检测Bcl-2、Bax蛋白质水平; B: Western blot检测PARP、caspase-3蛋白质水平; C: Western blot检测PML-RARα蛋白质水平。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组(DMSO)比较。

A: the levels of Bcl-2, Bax were detected by Western blot; B: the levels of PARP, caspase-3 were detected by Western blot; C: the level of PML-RARα was detected by Western blot. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group (DMSO).

图4 拉帕替尼对NB4细胞凋亡相关蛋白的影响

Fig.4 Effects of lapatinib on the levels of apoptosis-related proteins in NB4 cells



Western blot检测p38MAPK和p-p38MAPK蛋白质水平, ** $P<0.01$, 与对照组(DMSO)相比。

The levels of p38MAPK and p-p38MAPK were detected by Western blot. ** $P<0.01$ vs control group (DMSO).

图5 拉帕替尼对p38MAPK信号通路的影响

Fig.5 Effect of lapatinib on the p38MAPK signal pathway

2.4 拉帕替尼对NB4细胞凋亡相关蛋白的影响

用0、15、20 μmol/L的拉帕替尼处理NB4细胞24 h后, Western blot检测Bcl-2、Bax、PARP、caspase-3、PML-RARα等蛋白质水平。结果显示, 用15和20 μmol/L的拉帕替尼处理细胞后, Bcl-2水平下降, Bax水平增加($P<0.05$)(图4A)。Cleaved caspase-3、cleaved PARP水平增加($P<0.05$)(图4B)。PML-RARα水平减少($P<0.05$)(图4C)。

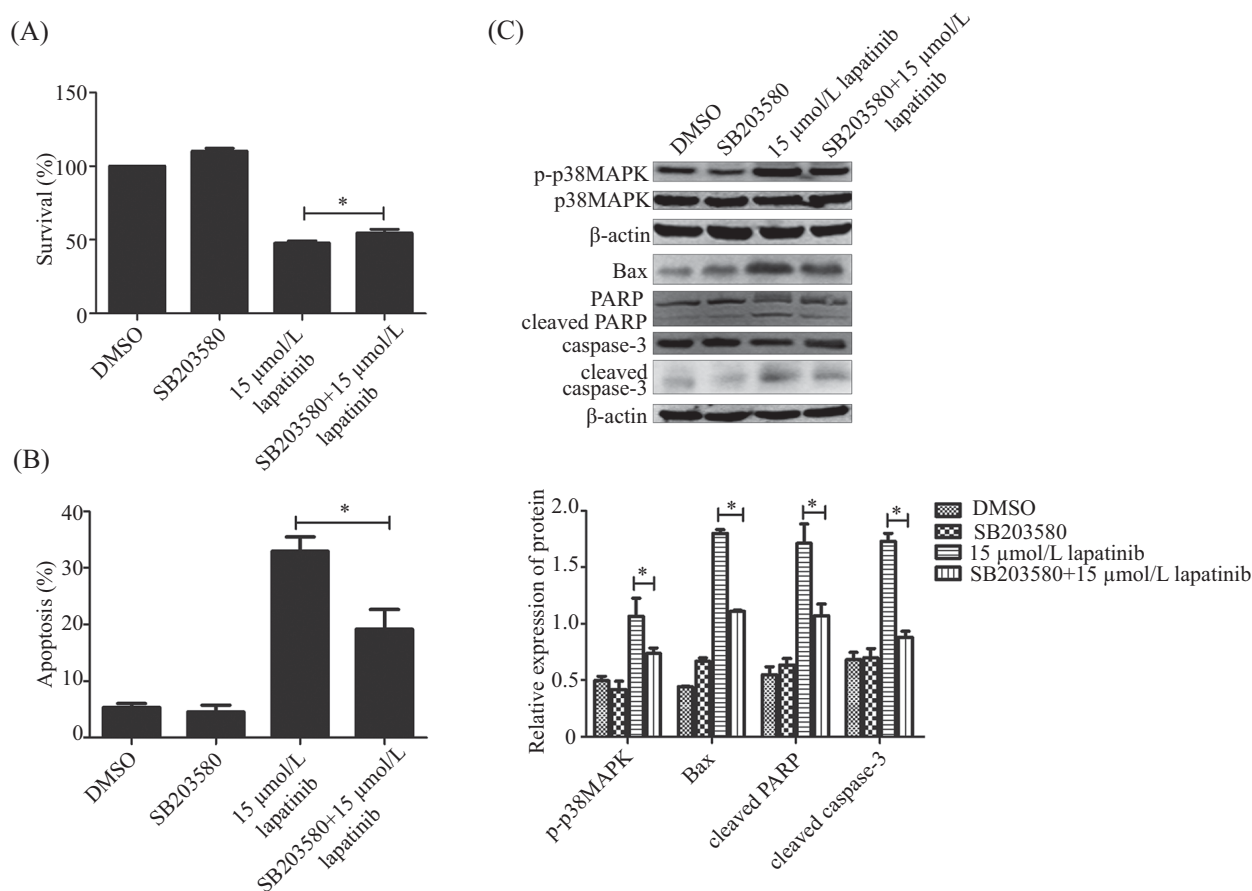
2.5 拉帕替尼对p38MAPK信号通路的影响

用0、15、20 μmol/L的拉帕替尼处理NB4细胞

24 h后, Western blot检测p38MAPK和p-p38MAPK蛋白质水平。如图5所示, 用15和20 μmol/L的拉帕替尼处理细胞后, 与对照组相比, p-p38MAPK水平呈增加趋势($P<0.01$)。

2.6 SB203580减弱拉帕替尼对NB4细胞的作用

用10 μmol/L p38MAPK抑制剂SB203580预处理30 min后, 再用15 μmol/L拉帕替尼处理NB4细胞24 h, CCK-8检测细胞增殖率, 流式细胞仪检测细胞凋亡数量, Western blot检测相关蛋白质水平。结果显示, 抑制剂预先处理的细胞增殖比例较单独



A: CCK-检测NB4细胞活力; B: 流式细胞术检测NB4细胞凋亡; C: Western blot检测p-p38MAPK、Bax、PARP、caspase-3蛋白质水平。* $P<0.05$ 。
A: cell viability was detected by CCK-8 assay; B: apoptosis was analyzed by flow cytometry; C: the levels of p-p38MAPK, Bax, cleaved PARP, cleaved caspase-3 were detected by Western blot. * $P<0.05$.

图6 SB203580减弱拉帕替尼对NB4细胞的作用
Fig.6 SB203580 weakened the effects of lapatinib on NB4 cells

用拉帕替尼处理的比例高($P<0.05$)(图6A)。细胞凋亡比例较单独用拉帕替尼处理的低($P<0.05$)(图6B); p-p38MAPK、Bax、cleaved PARP和cleaved caspase-3蛋白质水平较单独用拉帕替尼的为低($P<0.05$)(图6C)。

3 讨论

急性早幼粒细胞白血病(APL)是临床上常见的恶性血液系统疾病,细胞无限增殖和凋亡、分化受阻是其主要病理特征。近年来的研究表明,拉帕替尼对多种肿瘤有抑制作用。例如,拉帕替尼能通过下调PI3K/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B)信号通路阻碍头颈部肿瘤细胞的增殖^[12],也可通过调节MAPK/ERK(mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase)信号通路来抑制胃癌细胞的生长^[13],但其对APL细胞

的作用及相关机制尚未明确。

本文探讨了拉帕替尼对NB4细胞增殖和凋亡的影响。结果表明,用不同浓度拉帕替尼处理NB4细胞后,随着药物浓度的增加,细胞数量明显减少,细胞活力明显降低,提示拉帕替尼能以剂量依赖的方式抑制NB4细胞的增殖。细胞凋亡是一种程序化的细胞死亡过程^[14],以细胞核固缩、溶解和碎裂为特征,对细胞的生长、衰老及细胞稳态等发挥重要调节作用。本研究结果显示,拉帕替尼能诱导NB4细胞凋亡,并使细胞产生染色质浓缩、碎裂等典型凋亡现象。此外,细胞凋亡是一个复杂的调控过程,涉及到很多凋亡调控因子,例如Bcl-2蛋白质家族,包括抑制凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL(B-cell lymphoma extra large)和促凋亡蛋白Bax、Bad(Bcl-2/Bcl-XL associated death promoter)等关键蛋白^[15],而Bax与Bcl-2的比例决定细胞存活。本研究发现,拉帕替尼

能够显著下调Bcl-2蛋白质水平,上调Bax蛋白质水平,说明Bcl-2和Bax参与拉帕替尼诱导的细胞凋亡。此外,caspase家族也是调控凋亡的重要成员,其中,caspase-3激活是细胞凋亡的终末环节,该蛋白质的激活常伴随其切割底物PARP的裂解^[16]。本实验发现,拉帕替尼能够剂量依赖性的增加PARP和caspase-3蛋白质的裂解,说明拉帕替尼可能通过激活caspase途径来引起细胞凋亡。PML-RAR α 融合蛋白是APL发病的标志性蛋白质,该蛋白质的降解是观察APL治疗效果的重要指标^[1]。本研究发现,拉帕替尼能显著降低PML-RAR α 蛋白质水平,说明拉帕替尼诱导细胞凋亡是伴随PML-RAR α 融合蛋白降解产生的。

研究表明,p38MAPK信号通路在肿瘤发生发展中起重要作用,它参与细胞的生长、凋亡和分化等过程^[17],而其磷酸化形式(p-p38MAPK)的增多能促进细胞发生凋亡。本研究结果显示,拉帕替尼能增加p-p38MAPK的水平,进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,用抑制剂SB203580将p38MAPK通路阻断后,拉帕替尼抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的能力有所减弱,相关促凋亡蛋白质水平下降。结果提示,拉帕替尼可能通过激活p38MAPK信号通路发挥抗肿瘤作用。

综上所述,拉帕替尼能够抑制NB4细胞增殖并促进细胞凋亡,同时p38MAPK信号通路可能参与这些过程。因此,拉帕替尼有望成为治疗APL的新药物。

参考文献 (References)

- 1 Ma H, Yang J. Insights into the all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide combination treatment for acute promyelocytic leukemia: a meta-analysis. *Acta Haematol* 2015; 134(2): 101-8.
- 2 Brown G, Hughes P. Retinoid differentiation therapy for common types of acute myeloid leukemia. *Leuk Res Treatment* 2012; doi: 10.1155/2012/939021.
- 3 Kawasaki K, Akaike H, Miyauchi A, Ouchi K. Sivelestat relieves respiratory distress refractory to dexamethasone in all-trans retinoic acid syndrome: a report of two cases. *Eur J Haematol* 2006; 77(5): 448-52.
- 4 Ito Y, Tokudome N, Sugihara T, Takahashi S, Hatake K. Does lapatinib, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor, constitute a breakthrough in the treatment of breast cancer? *Breast Cancer* 2007; 14(2): 156-62.
- 5 Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, *et al* . Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1630-9.
- 6 Liu CY, Hu MH, Hsu CJ, Huang CT, Wang DS, Tsai WC, *et al* . Lapatinib inhibits CIP2A/PP2A/p-Akt signaling and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(8): 9135-49.
- 7 Liu L, Huang PY, Wang ZH, Chen N, Tang C, Lin Z, *et al* . Inhibition of eEF-2 kinase sensitizes human nasopharyngeal carcinoma cells to lapatinib-induced apoptosis through the Src and Erk pathways. *BMC Cancer* 2016; doi: 10.1186/s12885-016-2853-5.
- 8 Gore J, Imasuen-Williams IE, Conteh AM, Craven KE, Cheng M, Korc M. Combined targeting of TGF- β , EGFR and HER2 suppresses lymphangiogenesis and metastasis in a pancreatic cancer model. *Cancer Lett* 2016; 379(1): 143-53.
- 9 Lainey E, Thépot S, Bouteloup C, Sébert M, Adès L, Tailler M, *et al* . Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia: delineation of anti-leukemic mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(10): 1457-66.
- 10 Huang HL, Chen YC, Huang YC, Yang KC, Pan H, Shih SP, *et al* . Lapatinib induces autophagy, apoptosis and megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *PLoS One* 2011; doi: 10.1371/journal.pone.0029014.
- 11 Chen YJ, Fang LW, Su WC, Hsu WY, Yang KC, Huang HL. Lapatinib induces autophagic cell death and differentiation in acute myeloblastic leukemia. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 4453-64.
- 12 Beck TN, Georgopoulos R, Shagisultanova EI, Sarcu D, Handorf EA, Dubyk C, *et al* . EGFR and RB1 as dual biomarkers in HPV-negative head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(10): 2486-97.
- 13 Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, *et al* . Lapatinib sensitivities of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric Cancer* 2014; 17(3): 450-62.
- 14 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
- 15 Ola M S, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011; 351(1/2): 41-58.
- 16 McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; doi: 10.1101/cshperspect.a026716.
- 17 Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human disease: an update. *Arch Toxicol* 2015; 89(6): 867- 82.