

• 论 著 •

CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽或联合 imatinib 对 K562 细胞增殖的影响

肖 恒¹, 任彦斌², 杨志明¹, 周淑杰¹, 尹 蕾¹, 秦志梅¹, 许 玲¹, 李守霞^{1△}

(河北省邯郸市中心医院: 1. 检验科; 2. 功能科 056000)

摘 要:目的 研究 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽及联用 imatinib 对 K562 细胞增殖的影响。方法 将前期制备的 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽或连同 imatinib 作用于 K562 细胞后, 应用细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(MTT)、克隆形成试验方法检测和比较细胞增殖情况。结果 MTT 检测发现, CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽能够抑制 K562 细胞增殖, 联用 imatinib 后, 效果更加明显; 克隆形成试验结果显示, CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 可抑制 K562 细胞株的克隆形成能力。结论 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽可以特异性抑制 K562 细胞的增殖, 并增加 imatinib 的敏感性。

关键词:慢性粒细胞白血病; 融合肽; 细胞增殖; BCR-ABL

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 14. 002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)14-1876-03

The influence of CTP-OD1-HA and CTP-OD2-HA fusion peptides or combine with imatinib on proliferation of K562 cells

XIAO Heng¹, REN Yanbin², YANG Zhiming¹, ZHOU Shujie¹, YIN Lei¹, QIN Zhimei¹, XU Ling¹, LI Shouxia^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Function, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056000, China)

Abstract: Objective To study the influence of CTP-OD1-HA and CTP-OD2-HA fusion peptides and combined with imatinib on proliferation of K562 cells. **Methods** K562 cells were treated with CTP-OD1-HA and CTP-OD2-HA peptides or together with imatinib. The proliferation of cells were detected and compared by MTT and clone formation methods. **Results** MTT examination demonstrated that CTP-OD1-HA and CTP-OD2-HA peptides could inhibit the proliferation of K562 cells, and the effect was more obvious when acted along with imatinib; Clone formation showed that CTP-OD1-HA and CTP-OD2-HA peptides suppressed the continuous colony forming ability of K562 cells. **Conclusion** CTP-OD1-HA and CTP-OD2-HA could specially inhibit the proliferation of K562 cells, and increase the sensitivity of imatinib.

Key words: chronic myeloid leukemia; fusion peptide; cell proliferation; BCR-ABL

慢性粒细胞白血病(CML)是一种以形成 BCR-ABL 融合基因为特征的造血干细胞恶性克隆性疾病^[1], 其编码生成的 BCR-ABL 融合蛋白具有高酪氨酸激酶活性, 而激活下游多条信号通路^[2], 导致细胞发生癌性转化^[3]。目前, 临床上主要依靠 imatinib 等酪氨酸激酶抑制剂进行治疗, 且疗效显著^[4]。但近年来, 由于点突变及白血病干细胞等原因^[5-6], 耐药情况日趋严重, 亟待寻找新的治疗靶点。寡聚化结构域(OD)是位于 BCR 蛋白 N 端的重要结构域。已有研究表明, 通过病毒载体将外源性 BCR1-72 载入 CML 细胞中, 可对 CML 起到较强的抑制作用^[7-8]。Huang 等^[9]制备的含 BCR1-72 结构的外源性融合肽 CTP-OD-HA, 可通过与 BCR-ABL 竞争结合形成异源二聚体抑制 CML 细胞的增殖, 但因其相对分子质量较大而受到局限。近年来 BCR1-72 的晶体结构研究发现 BCR30-63 在 OD 域中起关键作用^[10], 因此, 本研究在前期分别制备了含 BCR30-63 的融合肽 CTP-OD2-HA 和含 BCR1-29+64-72 的融合肽 CTP-OD1-HA, 拟以 CTP-OD-HA 融合肽为阳性对照, 不含 OD 域的 CTP-HA 和 PBS 为阴性对照, 体外观察融合肽对 K562 细胞株及 CML 慢性期患者骨髓细胞增殖的影响, 以及与 imatinib 联用的作用效果, 为开发新的 CML 治疗药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及融合肽 K562 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。5 例 CML 患者和 3 例健康人骨髓细胞由重庆医科大学附属第一医院血液科提供, 取得重庆医科大学伦理委员会的批准, 受试者签署知情同意书。

CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA 和 CTP-HA 融合肽为本课题组前期制备。

1.2 仪器与试剂 二氧化碳细胞培养箱为美国 Thermo 公司产品, RPMI1640 培养液和胎牛血清为 Gibco 公司产品, 细胞增殖及细胞毒性(MTT)检测试剂盒购自美国 Promega 公司(PBS 溶解, 配制终浓度为 2 mg/mL), 甲基纤维素购自美国 Sigma 公司(无菌 RPMI1640 溶解, 配制终浓度为 2.7%)。

1.3 细胞培养 K562 细胞使用含 10% 小牛血清(FCS)的 RPMI1640 培养液, 置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养, 取对数生长期的细胞进行试验。

1.4 MTT 检测融合肽细胞增殖抑制率 试验分为 CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA、CTP-HA 和 PBS 共 5 个组, 其中 CTP-OD-HA 为阳性对照组, CTP-HA 融合肽和 PBS 为阴性对照组。取对数生长期的 K562 细胞及采用单个核细胞分离技术分离新鲜骨髓标本(5 例 CML 慢性期患者骨髓标本和 3 例健康人骨髓标本)中的单个核细胞, 分别加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 同时加入终浓度为 60 μmol/L 的融合肽。细胞株在 37℃, 5%CO₂ 培养箱内分别培养 24、48、72 h, CML 慢性期患者和健康人的骨髓细胞培养 48 h。到达设定时间时, 加入 MTT 试剂并继续培养 4 h, 离心弃去上清, 加入 DMSO 裂解细胞 5 min, 在酶标仪波长为 490 nm 处读取吸光度值, 以 100 μL 无血清 1640 中加入与试验组等体积的融合肽作为空白对照组。取上述读数的平均值, 与 PBS 组相比, 用下述公式求增殖抑制率: 增殖抑制率 = [1 - (融合肽处理组 - 空白对照组) / (PBS 组 - 空白对照组)] × 100%。

1.5 MTT 检测融合肽联合 imatinib 对细胞增殖抑制率 试验分为 CTP-OD-HA + imatinib, CTP-OD1-HA + imatinib, CTP-OD2-HA + imatinib, CTP-HA + imatinib 和 imatinib 组。取对数生长期的 K562 细胞进行试验。在 37 ℃, 5%CO₂ 培养箱内培养 24 h 后, 在上述细胞培养基中分别加入 imatinib 并继续培养 24 h, imatinib 浓度为 1 μmol/L。后续操作步骤同上, 增殖抑制率=[1-(融合肽联合 imatinib 处理组-空白对照组)/(PBS 组-空白对照组)]×100%。

1.6 克隆形成试验检测细胞的增殖能力 试验分为 CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA、CTP-HA 和 PBS 组, 其中 CTP-OD-HA 为阳性对照组, CTP-HA 和 PBS 为阴性对照组。取对数生长期的 K562 细胞株进行试验。用含 20% FBS 的 RPMI1640 培养液将 K562 细胞调整为每毫升 200 个, 分别将上述细胞悬液与甲基纤维素混合后加入 6 孔板内, 使甲基纤维素终浓度为 0.9%。充分搅匀后, 37 ℃, 5%CO₂ 培养箱内静置培养 1~2 周。经常观察, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。将其在倒置显微镜下观察并计数克隆形成数, 按下列公式计算克隆形成率: 克隆形成率=(处理组克隆形成数/PBS 组克隆形成数)×100%。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理及统计学分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析中的多重比较检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测融合肽对 CML 细胞株的增殖抑制作用 K562 分别与终浓度为 60 μmol/L 的 CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA 和 CTP-HA 融合肽作用 24、48、72 h 后, 各细胞增殖抑制率见表 1。CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA 与 K562 细胞株作用 48 h 时, 对其增殖抑制作用最强。此时, 这 3 种融合肽处理组分别与 CTP-HA 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA

组分别与 CTP-OD-HA 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 对 CML 细胞株的增殖抑制能力相当。24 h 和 72 h 时各组间的细胞增殖抑制率明显下降。CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽与 CTP-OD-HA 在 48 h 时发挥抑制 K562 细胞株增殖的作用, 且 3 种融合肽具有相似的抑制 K562 细胞株增殖的作用。

表 1 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 在不同时间对 K562 细胞株的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	CTP- OD-HA	CTP OD1-HA	CTP OD2-HA	CT P-HA
24	9.66±2.67	10.15±2.44	7.61±2.10	2.90±1.97
48	34.00±4.00	31.67±3.51	31.00±2.65	7.67±1.53
72	7.67±1.74	12.19±3.35	4.29±1.44	2.89±1.17

2.2 MTT 检测融合肽对 CML 患者骨髓细胞的增殖抑制作用 60 μmol/L 的 CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA 和 CTP-HA 分别与 5 例 CML 患者慢性期骨髓细胞作用 48 h 后, 与 CTP-HA 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对其增殖均有抑制作用。对 3 例健康人骨髓细胞增殖抑制率取均值, 与 CTP-HA 比较, 融合肽 CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA 对其均无明显的抑制作用 ($P > 0.05$)。各组中 5 例患者标本增殖抑制率的平均值与 3 例健康人标本增殖抑制率的平均值分别进行比较, 结果显示融合肽 CTP-OD-HA、CTP-OD1-HA、CTP-OD2-HA 对 CML 患者慢性期骨髓细胞的增殖有抑制作用 ($P < 0.05$), 而对健康人骨髓细胞的增殖无明显抑制作用, 且 3 种融合肽处理组之间两两比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。融合肽能够特异性抑制 CML 患者骨髓标本的增殖, 且 2 种融合肽的增殖抑制能力相当。见表 2。

表 2 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 对 CML 患者慢性期骨髓细胞和健康人骨髓细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, \%$)

受试者	n	CTP-OD-HA	CTP-OD1-HA	CTP-OD2-HA	CTP-HA
CML 患者	5	32.82±4.86	33.00±6.54	23.91±6.43	4.94±1.92
健康人	3	7.28±1.48	5.15±1.08	4.61±0.64	3.57±1.00

2.3 MTT 检测融合肽分别与 imatinib 联用对 CML 细胞株 K562、K562G01 细胞增殖的影响 与单独使用 imatinib (15.33±3.73) 比较, 分别联合 CTP-OD-HA (56.83±4.73)、CTP-OD1-HA (38.67±5.82)、CTP-OD2-HA (40.25±6.59) 处理后, K562 细胞增殖抑制率均明显提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 imatinib 联用 CTP-OD-HA 与联用 CTP-OD1-HA 或 CTP-OD2-HA 比较, 对 K562 细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。imatinib 与 CTP-OD1-HA 或 CTP-OD2-HA 联合使用, 可增加对 K562 细胞的增殖抑制率。

2.4 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽对 CML 细胞株克隆形成能力的影响 经 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 处理的 K562 细胞 2 周时的克隆体积较 CTP-HA 和 PBS 处理后细胞的克隆体积明显减小。通过与 PBS 相比得出克隆形成率, 与 CTP-HA 组 (50.50±19.36) 比较, CTP-OD1-HA (15.00±5.60) 和 CTP-OD2-HA (21.5±4.65) 处理后的细胞克隆形成率均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 分别与 CTP-OD-HA (14.5±4.36) 两两比较, 差异无

统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1, 融合肽 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 对 K562 细胞株及耐药细胞株的增殖抑制能力与 CTP-OD-HA 相同。

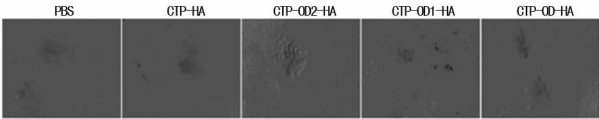


图 1 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 与 K562 细胞株作用后的克隆形成率

3 讨 论

BCR-ABL 激酶的异常活化可激活下游多条信号转导通路, 导致细胞无限增殖, 凋亡被抑制, 促使 CML 的发病和病情的进展^[11]。目前, 治疗 CML 的靶点多是针对 BCR-ABL 蛋白的酪氨酸激酶结构域, 但点突变等原因使得这类药物的耐药情况较普遍^[12], 此外, 残留的白血病干细胞也是导致 CML 复发的另一重要原因^[13]。而 BCR-ABL 蛋白 N 端的寡聚化结构域

在 BCR-ABL 蛋白酪氨酸激酶活性中起重要作用^[14],因此,靶向 BCR-ABL 融合蛋白的寡聚化结构域并采用联合治疗成为治疗 CML 的另一条新途径。

有研究将含有 OD 结构域(BCR1-72)的外源性融合肽导入 CML 细胞,通过抑制 BCR-ABL 激酶的活性,从而抑制了 CML 细胞的增殖并诱导其凋亡^[9,15],证明了 BCR 的 OD 结构域对于活化 BCR-ABL 激酶具有重要的作用。小分子多肽药物在治疗肿瘤方面具有较高的有效性、特异性,以及低毒性等特点,靶向 BCR-ABL 的小分子多肽药物也将会成为具有临床应用价值的新型抗癌药物。鉴于 BCR30-63 在 BCR1-72 活化 BCR-ABL 过程中的关键性作用,本试验研究了前期已成功构建并表达的含有 BCR30-63 和 BCR1-27+64-72 的可溶性融合肽 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 对 K562 细胞增殖的影响。试验结果表明,CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 可以抑制 K562 细胞株,以及 CML 患者慢性期骨髓细胞的增殖。CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 的生物学活性较含有 BCR1-72 结构的阳性对照 CTP-OD-HA 融合肽低,其原因可能与 2 种融合肽的分量过小导致有效生物学浓度低有关。

综上所述,CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽均可抑制 K562 细胞株的增殖,且与 imatinib 联合用药后,可有效增加 imatinib 对它的敏感性。同时,2 种融合肽对 CML 慢性期患者骨髓细胞也可起到有效抑制增殖的作用,证明了 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 在治疗 CML 中的潜力,为今后通过靶向 BCR1-72 开发新型小分子多肽药物治疗 CML 奠定了基础。

参考文献

[1] Ault PS,Rose DJ,Nodzon LA,et al. Bosutinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: practical consideration for management of side effects[J]. J Advanc Practit Oncol,2016,7(2):160-175.

[2] Sun X,Cai X,Yang J,et al. Cantharidin overcomes imatinib resistance by depleting BCR-ABL in chronic myeloid leukemia[J]. Molecules Cells,2016,39(12):869-876.

[3] Styles T,Wu M,Wilson R,et al. Population-based testing and treatment characteristics for chronic myelogenous leukemia[J]. J Reg Manag,2016,41(3):134-142.

[4] Pan CY,Xu N,He BL,et al. Clinical significance of cytogenetic monitoring in chronic myeloid leukemia[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi,2017,38(2):112-117.

[5] Lu X,Zhang Z,Ren X,et al. Synthesis and identification of GZD856 as an orally bioavailable Bcr-Abl T315I inhibitor overcoming acquired imatinib resistance[J]. J Enzym Inhib Med Chem,2017,32(1):331-336.

[6] Ma YX,Wang L,Mi RH,et al. Significance of BCR-ABL

fusion gene detection in CD34(+) cells of chronic myelogenous leukemia patients[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi,2017,38(2):164-166.

[7] He YP,Wertheim A,Xu LW,et al. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl[J]. Blood,2002,99(8):2957-2968.

[8] Beissert T,Puccetti E,Bianchini A,et al. Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface of BCR interferes with the transformation potential of BCR-ABL and increases sensitivity to STI571[J]. Blood,2003,102(8):2985-2993.

[9] Huang SF,Liu DB,Zeng JM,et al. Cloning,expression, purification and functional characterization of the oligomerization domain of Bcr-Abl oncoprotein fused to the cytoplasmic transduction peptide[J]. Protein Expr Purif,2009,64(2):167-178.

[10] Taylor M,Keating E. Orientation and oligomerization specificity of the Bcr coiled-coil oligomerization domain[J]. Biochemistry,2005,44(49):16246-16256.

[11] Lan X,Zhao C,Chen X,et al. Nickel pyrithione induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib via both Bcr/Abl-dependent and Bcr-Abl-independent mechanisms[J]. J Hemat Oncol,2016,9(1):129.

[12] Wang LX,Wang JD,Chen JJ,et al. Aurora a kinase inhibitor AKI603 induces cellular senescence in chronic myeloid leukemia cells harboring T315I mutation[J]. Scient Rep,2016,6:35533.

[13] Jin Y,Zhou J,Xu F,et al. Targeting methyltransferase PRMT5 eliminates leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia[J]. J Clin Invest,2016,126(10):3961-3980.

[14] Bruno BJ,Lim CS. Inhibition of bcr-abl in human leukemia cells with a coiled-coil protein delivered by a leukemia-specific cell-penetrating peptide[J]. Molec Pharm,2015,12(5):1412-1421.

[15] Huang ZL,Gao M, Ji MS,et al. TAT-CC fusion protein depresses the oncogenicity of BCR-ABL in vitro and in vivo through interrupting its oligomerization[J]. Amino Acids,2013,44(2):461-472.

(收稿日期:2017-02-01 修回日期:2017-04-01)

(上接第 1875 页)

[3] Marchaim D,Chopra T,Pogue JM,et al. Outbreak of colistin-resistant,carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in metropolitan Detroit, Michigan[J]. Antimicrob Agents Chemother,2011,55(2):593-599.

[4] 许亚丰,耿先龙,王春新,等.多重耐药鲍曼不动杆菌 β-内酰胺酶、膜孔蛋白及 β-内酰胺类靶位编码基因研究[J]. 中国抗菌药物杂志,2014,39(1):58-64.

[5] 孙洁,凌斌,李冰沁,等.细菌耐药机制的研究进展[J]. 中

原医刊,2007,34(2):54-56.

[6] 李天娇,王旭明,符生苗,等.海南发现 4 株产 NDM-1 多重耐药的肺炎克雷伯菌[J]. 中国热带医学,2013,13(12):1468-1474.

[7] 贾艳,孙长江,韩文瑜,等.肺炎克雷伯菌研究进展[J]. 微生物学杂志,2006,26(5):75-78.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-03-26)