

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.16.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200326.0909.002.html\(2020-03-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200326.0909.002.html(2020-03-26))

PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂与 TKI 对 AML 小鼠的影响研究*

王松霞¹, 韦涌涛^{2△}, 王东平²

(山东省青岛市第八人民医院:1. 输血科;2. 检验科 266100)

[摘要] **目的** 观察 GSK2126458 联合尼洛替尼对急性髓细胞白血病(AML)小鼠细胞增殖、凋亡的影响,探讨磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)/雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)信号通路抑制剂与酪氨酸激酶抑制剂(TKI)对 AML 小鼠病情发生、发展的影响。**方法** 成功造模 40 只 AML 小鼠模型,分为 4 组,每组各 10 只。其中 GSK2126458 组给予 10 mg/kg GSK2126458 治疗,尼洛替尼组给予 75 mg/kg 尼洛替尼治疗,GSK2126458 联合尼洛替尼组(联合组)给予 10 mg/kg GSK2126458 和 75 mg/kg 尼洛替尼治疗,对照组给予等量生理盐水,均连续给药 2 周。检测各组细胞增殖、凋亡和原癌基因(c-myc)、生存素(survivin) mRNA 表达水平。**结果** GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组外周血和骨髓中白血病细胞的细胞增殖率明显低于对照组($P < 0.05$)。GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组骨髓中细胞凋亡率明显高于对照组,且联合组骨髓中细胞凋亡率明显高于 GSK2126458 组和尼洛替尼组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平明显低于对照组,且联合组骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平明显低于 GSK2126458 组和尼洛替尼组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** GSK2126458 联合尼洛替尼可降低 AML 小鼠 c-myc 和 survivin 表达水平,其通过抑制 PI3K/mTOR 活性进而抑制白血病细胞的增殖。

[关键词] 白血病,髓样,急性;磷酸肌醇 3-激酶类;蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶;他克莫司结合蛋白质类;酪氨酸激酶抑制剂;尼洛替尼;GSK2126458

[中图法分类号] R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)15-2612-05

Study on the effect of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway inhibitor and TKI on the development of acute myeloid leukemia mice*

WANG Songxia¹, WEI Yongtao^{2△}, WANG Dongping²

(1. Department of Blood Transfusion; 2. Department of Clinical Laboratory, Qingdao Eighth People's Hospital, Qingdao, Shandong 266100, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of GSK2126458 combined with nilotinib on cell proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia (AML) mice, and investigate the effect of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway inhibitor and tyrosine kinase inhibitor (TKI) on the occurrence and development of AML mice. **Methods** A total of 40 AML mouse models were successfully constructed, then they were divided into 4 groups with 10 mice in each group. The GSK2126458 group was treated with 10 mg/kg GSK2126458, the nilotinib group was treated with 75 mg/kg nilotinib, the GSK2126458 combined with nilotinib group (the combined group) were treated with 10 mg/kg GSK2126458 and 75 mg/kg nilotinib, the control group was treated with the same amount of normal saline. All the groups were given drugs continuously for 2 weeks. Cell proliferation, apoptosis and expression levels of c-myc and survivin gene mRNA were detected. **Results** The growth rates of leukemic cells in peripheral blood and bone marrow of the GSK2126458 group, the nilotinib group and the combined group were significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The apoptosis proportion of bone marrow in the GSK2126458 group, the nilotinib group and the combined group were significantly higher than that in the control group, and the percentage of apoptosis in the combined group was higher than those in the GSK2126458 group and the nilotinib group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

* 基金项目:山东省卫生和计划生育委员会课题(20168C3026)。 作者简介:王松霞(1974-),主管技师,本科,主要从事血液检验研究。

△ 通信作者, E-mail: Weiyongtao29901@163.com。

The mRNA expression levels of c-myc and survivin gene in the GSK2126458 group, the nilotinib group and the combined group were lower than that in the control group, and the mRNA expression of c-myc and survivin gene was lower than those in the GSK2126458 group and the nilotinib group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** GSK2126458 combined with nilotinib could reduce the expression levels of c-myc and survivin in AML mice, which inhibits the proliferation of leukemia cells by inhibiting the activity of PI3K/mTOR.

[Key words] leukemia, myeloid, acute; phosphatidylinositol 3-kinases; protein-serine-threonine kinases; tacrolimus binding proteins; tyrosine kinase inhibitor; nilotinib; GSK2126458

急性髓细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是血液系统常见的恶性肿瘤, 也是白血病的常见类型之一, 占整个白血病类型的 57.6%, 严重威胁着人类健康^[1]。磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (Akt)/雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR) 信号通路在多种细胞中广泛分布, 具有维持蛋白质合成、转移、生长、凋亡的重要作用。研究显示, PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关基因突变或过表达与 AML 的发生、发展密切相关^[2]。目前针对该信号通路的小分子抑制剂已被用于多种癌症的治疗, 如选择性 PI3K 抑制剂、Pan-PI3K 抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 活性位点抑制剂、雷帕霉素及其类似物和双靶点抑制剂等^[3]。酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 在 AML 的治疗中具有十分重要的地位, 尼洛替尼作为 2012 年新上市的强效双向 TKI, 在 AML 的治疗中展现出了良好的疗效^[4]。虽然 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂和 TKI 在 AML 治疗中的作用均得到广泛肯定, 但 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂与 TKI 的联合应用对 AML 发生、发展的作用机制还不十分清楚。因此, 本研究通过构建 AML 小鼠模型, 探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂联合 TKI 对 AML 小鼠的影响, 为 AML 的临床治疗提供更多选择, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞

40 只无特殊病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 C57BL/6 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~40 g, 购于中国科学院上海实验动物中心。HL-60 细胞购于上海拜力生物科技有限公司。

1.1.2 试剂与仪器

尼洛替尼 (瑞士 Novartis Pharma Schweiz AG 公司); GSK2126458 (美国 Sigma Aldrich 公司); RNA 提取试剂盒和逆转录 PCR (RT-PCR) 试剂盒 (大连宝生物公司); DMEM 培养基 (四季青公司)。超净工作台 (AIRTECH, 苏州净化设备有限公司); 电动移液器

(德国 Eppendorff 公司); 精密电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 血细胞计数板 (德国 Brand 公司); GENETEST/GT5422 梯 PCR 仪 (北京林音科技有限公司); Cytomics™ FC 500 系列流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的构建

小鼠饲养于 20~25 °C 室内铁笼中, 自由进食、饮水。参考文献 [5] 的方法制作 AML 小鼠模型。HL-60 细胞株培养于 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养条件: 37 °C、5% CO₂, 1~2 d 换液传代 1 次。各组小鼠经 60 Co 照射 24 h 后, 取对数生长期 HL-60 细胞悬浮于生理盐水中 (5×10^6 个/mL), 在无菌操作台内, 每只小鼠尾静脉注射 1×10^6 个 HL-60 细胞。

1.2.2 给药

造模成功后 (CD33 表达率高于 30%), 将小鼠分为对照组、GSK2126458 组、尼洛替尼组和 GSK2126458 联合尼洛替尼组 (联合组), 每组 10 只。GSK2126458 组给予 10 mg/kg GSK2126458 治疗, 尼洛替尼组给予 75 mg/kg 尼洛替尼治疗, 联合组给予 10 mg/kg GSK2126458 和 75 mg/kg 尼洛替尼治疗, 对照组给予等量生理盐水, 各组小鼠均连续给药 2 周。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖

采用断头法处死小鼠, 提取骨髓细胞, 将其在 96 孔板上铺板, 1×10^4 个/孔, 弃去细胞培养液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 弃去 PBS, 加入 0.25% 胰酶, 直至显微镜下细胞变圆, 且边缘出现光圈, 加入新鲜培养基, 将少许细胞悬液吸出滴在盖片边缘, 使计数板和盖片之间充满悬液, 静置 3 min 后计数, 将细胞密度调整至 1×10^5 个/mL, 取 100 μ L 细胞悬液加入 96 孔板内, 使每孔为 1×10^4 个细胞, 将其放入培养箱内。将 1 mL 完全培养基与 100 μ L CCK-8 混合均匀后, 每孔加入 100 μ L CCK-8, 避免产生气泡, 置于培养箱内孵育 4 h, 然后将培养基移至酶标仪中, 于 450 nm 处测定吸光度值。

1.2.4 细胞凋亡及细胞周期检测

采用淋系标记 B220、CD3 和髓系标识 Mac-1、Gr-1 确定白血病细胞的表型,利用膜联蛋白 V(Annexin V)抗体进行细胞凋亡的检测,Annexin V 阳性细胞定义为凋亡细胞,Annexin V 阴性细胞定义为活细胞。

1.2.5 RT-PCR 检测原癌基因(c-myc)、生存素(survivin)mRNA 表达水平

Trizol 法分别提取各组小鼠淋巴结总 RNA,总 RNA 采用纯化柱纯化。逆转录得 cDNA,引物设计, β -actin(239 bp)上游引物:5'-AGG CCC TGA CAT CCT GAA GTA-3';下游引物:5'-GAG AGG GAC AAC GCA TAC ACA G-3'。c-myc 上游引物:5'-ATC CAT ATC GAT ACT GCG AC-3';下游引物:5'-TTT GAT CTC CAT CCT GCA A-3'。survivin 上游引物:5'-AAG TCT AGG CAG CAG ATG C-3';下游引物:5'-CAT CAC CAG AAA TCT AGC G-3'。逆转录为 cDNA,应用 RT-PCR 检测 c-myc、survivin 基因 mRNA 转录水平。以 β -actin 作为内参照,同一标本的 β -actin 表达水平校正各自目的基因的表达水平,相对表达水平 = 目的基因表达水平/ β -actin 表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞增殖情况

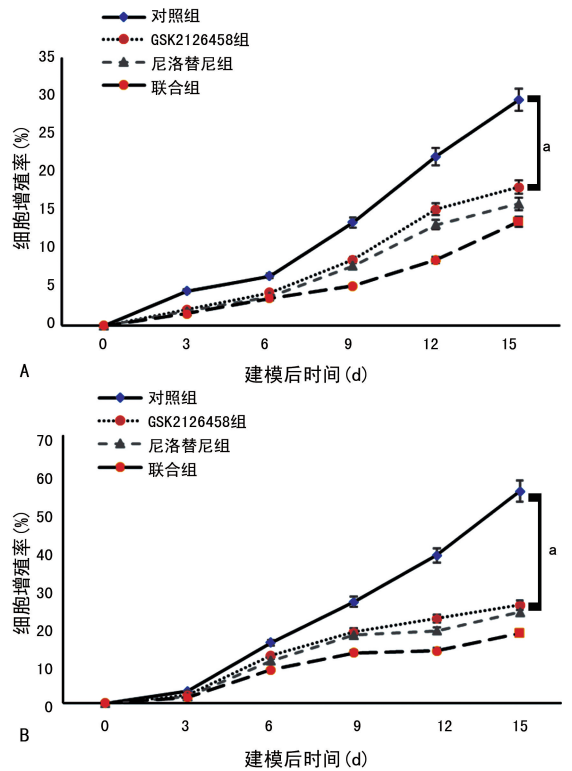
GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组小鼠外周血和骨髓中白血病细胞的增殖率明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 细胞凋亡情况

GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组小鼠骨髓中细胞凋亡率高于对照组,且联合组骨髓中细胞凋亡率高于 GSK2126458 组和尼洛替尼组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

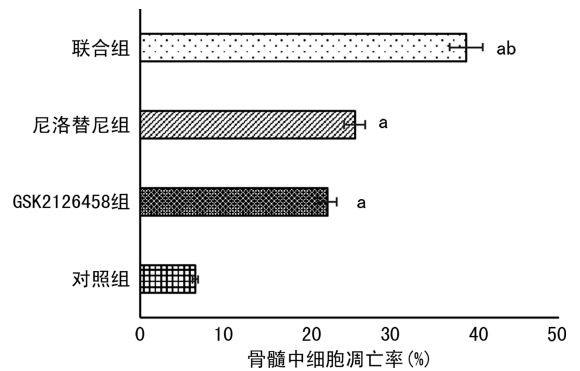
2.3 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平

GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组小鼠骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平低于对照组,且联合组骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平低于 GSK2126458 组和尼洛替尼组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



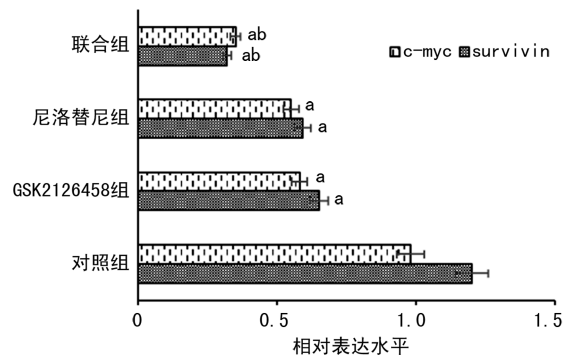
A:外周血白血病细胞增殖率;B:骨髓中白血病细胞增殖率;^a: $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠细胞增殖率



^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 GSK2126458 组、尼洛替尼组比较。

图 2 各组小鼠骨髓中细胞凋亡率



^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 GSK2126458 组、尼洛替尼组比较。

图 3 各组小鼠骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平

3 讨 论

AML 具有较高的发病率和病死率,其临床特点表现为正常血细胞受到抑制,骨髓和其他造血组织中的白血病细胞大量增殖,浸润全身各组织和脏器,影响器官的功能,导致出血、贫血、感染、发热等症状^[6],目前治疗以联合化疗和造血干细胞移植为主。近年来,信号通路抑制剂在 AML 的治疗中取得了长足的进展,如 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂和 TKI 等^[7]。

造血细胞中有丝分裂信号机制十分复杂,包括多种蛋白的协调运转。有研究显示,AML 是一种异质性疾病,其白血病细胞中存在 200 多种染色体易位和基因突变。酪氨酸激酶在信号传导中起重要作用,可作为 AML 治疗的靶点之一^[8]。TKI 正是基于酪氨酸激酶研发的一类靶向治疗 AML 药物,目前已发展到第 3 代。TKI 药物均具有 1 个杂环骨架,如嘧啶、嘌呤、咪唑、吡唑、喹啉或喹唑啉等,该杂环骨架是 TKI 的核心。一方面,TKI 通过模仿三磷酸腺苷(ATP)中腺嘌呤环结构,竞争性地与 ATP 结合位点结合,抑制相关激酶的磷酸化,最终阻断下游的信号转导;另一方面,TKI 为一类能抑制酪氨酸激酶活性的化合物,可阻碍 ATP 结合口袋与 ATP 结合,从而发挥抑制酪氨酸激酶的作用^[9-10]。尼洛替尼是第 2 代 TKI 的典型代表,属于新型高亲和力的 ATP 竞争性抑制剂,其保留了伊马替尼的部分化学结构,可通过多靶点与 ABL 的非活化区结合,阻断 BCR-ABL 相关信号途径的活化。尼洛替尼与伊马替尼一样,都是通过结合非活化形态的 ABL 酪氨酸激酶,导致 P-环折叠覆盖 ATP 结合位点,阻断了底物的结合,从而抑制酶的活化,形成 BCR/ABL 蛋白无活性构象,但其对 BCR-ABL 激酶的抑制作用更强^[11]。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是细胞内的重要信号通路,参与细胞增殖、分化、迁移和凋亡等多个环节。刘梦等^[11]研究证实,50% 以上的 AML 患者中,PI3K/Akt/mTOR 信号通路的持续活化可导致白血病细胞过度增殖,使其生长处于竞争优势。目前,针对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的小分子抑制剂众多,大致可分为泛 PI3K 抑制剂、PI3K 亚型选择性抑制剂、Akt 抑制剂、PI3K/mTOR 抑制剂和 mTOR 选择性抑制剂 5 类^[12]。GSK2126458 属于 PI3K/mTOR 抑制剂,可通过抑制 PI3K/mTOR 活性来抑制白血病细胞的增殖^[13]。目前,GSK2126458 已开始用于实体瘤和白血病的临床治疗。焦宁等^[14]研究表明,GSK2126458 具有很好的药代动力学性质,可明显

抑制肿瘤的生长。本研究结果显示,GSK2126458 联合尼洛替尼可明显抑制白血病细胞的生长,促进其凋亡,提示联合应用 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂和 TKI 可为 AML 的临床治疗提供一个新的方案,有助于提高治疗效果,改善预后。

c-myc 和 survivin 均是重要的凋亡相关基因。c-myc 是 myc 基因家族的重要成员,在细胞增殖、分化和凋亡过程中具有重要的调控作用,其表达水平升高可导致细胞发生恶性转变^[15]。survivin 是凋亡抑制蛋白家族成员,可抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)的活化进而阻止细胞凋亡。本研究结果显示,GSK2126458 组、尼洛替尼组和联合组小鼠骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平低于对照组,且联合组骨髓中 c-myc、survivin 基因 mRNA 表达水平低于 GSK2126458 组和尼洛替尼组($P < 0.05$),表明 GSK2126458 联合尼洛替尼可通过降低 c-myc 和 survivin 基因的表达水平来参与促白血病细胞的凋亡过程。

综上所述,GSK2126458 联合尼洛替尼可降低 AML 小鼠 c-myc 和 survivin 基因表达水平,通过抑制 PI3K/mTOR 活性抑制白血病细胞的增殖,促进其凋亡,这可为 AML 的临床治疗提供参考。

参考文献

- [1] 杨莉,何浩明. 急性髓细胞白血病患者外周血淋巴细胞亚群的检验分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016,37(6):817-819.
- [2] ZHANG Z, WEN H, WENG J, et al. Silencing of EPCAM suppresses hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation in mice with alcoholic hepatitis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Cell Cycle, 2019, 18(18): 2239-2254.
- [3] LU P W, LI L, WANG F, et al. Inhibitory role of large intergenic noncoding RNA-ROR on tamoxifen resistance in the endocrine therapy of breast cancer by regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2):1904-1912.
- [4] 曲蕴慧,刘红涛,贺付成,等. PP242 联合达沙替尼抑制急性髓细胞白血病在小鼠体内发生、发展的分子机制研究[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(20):1584-1588.

- [5] LI Y J, WANG Y, WANG Y Y. MicroRNA-99b suppresses human cervical cancer cell activity by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9577-9591.
- [6] CHEN Y, ZHENG X, WANG Y, et al. Effect of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on JNK3 in Parkinsonian rats[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 1771-1775.
- [7] 丁亦含, 李玉峰. 酪氨酸激酶抑制剂治疗慢性髓系白血病疗效预测的研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(1): 249-254.
- [8] 张华, 张松泉, 王艳, 等. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂对大鼠尘肺纤维化干预的研究[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2019, 37(6): 408-415.
- [9] 张乾坤, 郝吉庆. TP53/EGFR 基因共突变对肺腺癌患者 EGFR-TKIs 疗效的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(6): 967-971.
- [10] 李海霞, 王子奇, 张国伟, 等. 第一代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂与含铂化疗一线治疗表皮生长因子受体罕见突变阳性晚期肺腺癌患者的疗效[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(10): 783-791.
- [11] 刘梦, 陈琦. PI3K/Akt/mTOR 信号通路及其相关抑制剂在急性髓系白血病中的作用[J]. *海南医学*, 2016, 16(20): 3367-3369.
- [12] 黄深巧, 张少华, 王文静, 等. 重症胆源性胰腺炎预后情况及影响因素分析[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(5): 82-85.
- [13] 赵光辉, 宋晓旭, 刘宁, 等. PI3K/Akt/MTOR 信号通路抑制剂在胃癌中的研究进展[J]. *癌症进展*, 2019, 17(9): 1003-1007.
- [14] 焦宁, 陈冲, 徐瑞荣. 益气养阴方及其拆方对急性髓细胞白血病小鼠细胞凋亡及相关蛋白的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(2): 42-45.
- [15] ELBADAWY M, USUI T, YAMAWAKI H, et al. Emerging roles of c-myc in cancer stem cell-related signaling and resistance to cancer chemotherapy: a potential therapeutic target against colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2340.

(收稿日期: 2019-12-08 修回日期: 2020-03-06)

(上接第 2611 页)

- [10] LING H Y, OU H S, FENG S D, et al. CHANGES in microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(9): e32-39.
- [11] YU J, LV Y, DI W, et al. MiR-27b-3p regulation in browning of human visceral adipose related to central obesity [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2018, 26(2): 387-396.
- [12] CHAKRABORTY C, DOSS C G, BANDYOPADHYAY S, et al. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014, 5(5): 697-712.
- [13] YAN S, WANG T, HUANG S, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2016, 53(5): 693-702.
- [14] GUO Y, ZHANG X, HUANG W, et al. Identification and characterization of differentially expressed miRNAs in subcutaneous adipose between Wagyu and Holstein cattles[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(8): 44026.
- [15] HAMAM D, ALI D, VISHNUBALAJI R, et al. microRNA-320/RUNX2 axis regulates adipocytic differentiation of human mesenchymal (skeletal) stem cells[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(12): e1499.
- [16] DIHINGIA A, OZAH D, GHOSH S, et al. Vitamin K1 inversely correlates with glycemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes (T2D) and positively regulates SIRT1/AMPK pathway of glucose metabolism in liver of T2D mice and hepatocytes cultured in high glucose[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 52(8): 103-114.

(收稿日期: 2020-01-08 修回日期: 2020-03-01)