

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.11.006

LBH589/来那度胺调控多发性骨髓瘤细胞中 IRF4 并促进凋亡反应的研究

唐思诗^{1,3}, 马丹², 成冰清¹, 余琨琳¹, 王季石^{2△}, 彭焱⁴

(1. 贵州医科大学, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院血液科, 贵阳 550004; 3. 南华大学附属怀化医院血液科 418000; 4. 湖南省人民医院肿瘤科, 长沙 410000)

[摘要] **目的** 体外观察组蛋白去乙酰化酶抑制剂 LBH589 和来那度胺作用于多发性骨髓瘤(MM)细胞后转录因子干扰素调节因子 4(IRF4)表达变化以及凋亡情况及机制。**方法** LBH589 和来那度胺以不同浓度单独或者联合作用于 RPMI8226 细胞株, CCK8, Annexin V/propidium iodide 染色、流式细胞仪观察细胞活力和凋亡情况, 评价药物的协同效应, Western blot 法检测相关转录因子及凋亡基因蛋白表达水平。**结果** LBH589 和来那度胺单独作用均可呈药物浓度依赖性地抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡, 两药协同效应显著。相关蛋白 PARP 激活, Bcl-x1、Bcl-2 表达均相对下调, 转录相关因子 IRF4、c-MYC 下调。**结论** LBH589 和来那度胺单独或者联合作用 RPMI8226 细胞株, 可降低转录因子 IRF4 以及 c-MYC 的表达, 两个药物合用呈显著协同效应, 并且高表达 IRF4 的 RPMI8226-R 可减少其增殖抑制作用。

[关键词] 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 来那度胺; 多发性骨髓瘤; IRF4**[中图分类号]** R733.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)11-1452-05

LBH589/lenalidomide regulates IRF4 and promotes apoptosis of multiple myeloma cells

TANG Sishi^{1,3}, MA Dan², CHENG Bingqing¹, YU Kun ling¹, WANG Jishi^{2△}, PENG Yan⁴

(1. Guizhou Medical University, Guizhou, Guiyang 550004, China; 2. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guizhou, Guiyang 550004, China; 3. Department of Hematology, Huaihua Hospital Affiliated to Nanhua University, Hunan, Huaihua 418000, China; 4. Department of Hematology, Hunan Provincial People's Hospital, Hunan, Changsha 410000, China)

[Abstract] **Objective** We aimed to investigate the expression of IRF4 and apoptosis of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against MM cells in vitro, and study the mechanism of apoptosis when LBH589 alone or/and combined with lenalidomide in RPMI8226 cell so as to provide a new strategy for the treatment of multiple myeloma. **Methods** The cell viability on the growth of RPMI8226 cell were assessed by CCK8 assay. Apoptosis were measured by flow cytometry, The Grandpad software analyzes the statistical significance and evaluates the synergistic effect of the drug. The expression level of the related transcription factor and apoptotic gene protein were determined by western blot. The cell viability on the growth of RPMI8226-R cell were assessed by CCK8. **Results** LBH589 combined with lenalidomide have significant effect on inhibit cell proliferation and induce apoptosis in a dose-dependent manner. Apoptosis induced by LBH589/lenalidomide alone or combination was shown to involved PARP activation, decreased Bcl-2 and Bcl-x1 expression, significantly down regulated transcriptional related factors of IRF4 and c-MYC expression compared with either agent alone. **Conclusion** LBH589 and lenalidomide alone or combination decrease the expression of transcription factor IRF4 and c-MYC, and have a significant synergistic effect, and highly expression of IRF in RPMI8226-R reduce proliferation inhibition.

[Key words] histone deacetylase inhibitor; lenalidomide; multiple myeloma; IRF4

多发性骨髓瘤(MM)是一种侵袭性强并且不可治愈的血液系统恶性肿瘤^[1]。目前为止,来那度胺、硼替佐米等仍然是MM的首选药物,然而,部分MM患者在治疗后仍然复发,对骨髓瘤细胞致病机制的深入研究显示,干扰素调节因子 4(IRF4)是骨髓瘤生长中不可缺少的转录因子,在骨髓瘤细胞中表达失调,而且会在相应的肿瘤细胞染色体上发生变异、扩增和突

变^[2]。表明 IRF4 可以作为寻找治疗 MM 的新的治疗靶点,而降低 MM 的耐药复发性已经成为 MM 的重要问题。

LBH589 是一种 FDA 批准为治疗 MM 的化疗药物,已经用于临床治疗 MM 患者,它是一种广谱的去乙酰化酶抑制剂^[3],作用机制很多,目前尚不完全明确。而来那度胺是一种免疫调节剂,已经用于 MM 的

治疗^[4],但 MM 患者仍然会产生耐药或者复发。目前组蛋白乙酰化酶抑制剂(HDACi)与其他化疗药物联合治疗是诱导肿瘤细胞凋亡的主要方法,并且可以有效减少肿瘤细胞的耐药以及复发^[5]。本研究主要分析 LBH589 单药或者联合来那度胺在 MM 中的作用机制以及相关靶点,为临床治疗 MM 患者提供新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

人 MM 细胞株 RPMI8226 以及人 MM 耐来那度胺细胞株 RPMI8226-R 由贵州医科大学附属医院造血干细胞移植中心实验室冻存。LBH589 (帕比斯他)购自美国 Selleck 公司,TRIzol、逆转录试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品,CCK8、二甲基亚砷(DMSO)为赛兰博科技有限公司产品,RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自杭州四季青公司,AnnexinV-FITC/PI 试剂盒(凯基生物)、HO-1 一抗及二抗购自碧云天生物技术研究, Bax 一抗购自上海晶天生物技术有限公司,PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

RPMI8226 和 RPMI8226-R 使用含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基 37 °C、5% CO₂、100% 饱和湿度 CO₂ 培养箱培养,细胞接种密度(4~5)×10⁵ 个/mL,使用处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞增殖抑制检测

台盼蓝检测细胞活力, LBH589 单独或者联合来那度胺处理 RPMI8226 细胞 24 h,根据制造商的指导,将 5×10³ 个细胞在培养基中或不用处理的 96 孔板中孵育,然后向每个孔中加入 20 μL 的 CCK8 溶液。在 37 °C 下孵育 40 min 后,使用分光光度计测量 450 nm 处的吸光度,作出细胞增殖抑制率的曲线。

1.2.3 细胞凋亡率检测

取对数生长期的 RPMI8226 细胞,调整细胞密度 2×10⁵ 个/mL,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,同时设置空白对照组、LBH589 组,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 195 μL AnnexinV-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μL 膜联蛋白 V-FITC,轻轻混匀。室温避光孵育 10 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 190 μL AnnexinV-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置,随即进行流式细胞仪检测,每组平行实验 3 次。

1.2.4 Western blot 检测

收集各组细胞,提取细胞总蛋白。每份样本取 40 μg 总蛋白,经 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至醋酸纤维素膜上,经封闭液封闭过夜后加鼠抗人 β-actin 一抗(1:500),兔抗人 HO-1 一抗(1:1 000),兔抗人 IRF4 一抗(1:500),兔抗人 c-Myc 一抗(1:500),兔抗人 Bcl-2 一抗(1:1 000),兔抗人 Bcl-xl 一

抗(1:1 000),兔抗人 Bax 一抗(1:1 000),兔抗人 c-PARP 一抗(1:1 000),兔抗人 Bad 一抗(1:1 000)室温摇膜 90 min 后 TBST 洗膜,分别加入兔 IgG 二抗(1:1 000)室温孵育 45 min,TBST 洗膜后用 ECL 试剂染色后曝光,每个实验至少重复 3 次。

1.2.5 Real-time PCR 检测

使用 Trizol 试剂(Invitrogen,美国)从细胞株中提取总 RNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix(北京天根生物)和 PRISM 7500 实时 PCR 系统(ABI,美国)进行 qPCR。分析相对于 β-actin 基因转录物水平的基因表达水平。cDNA 样品与引物和 SYBR Master Mix 混合,总体积为 20 μL。方案中使用的热循环条件在 94 °C 下 1 min;随后在 94 °C 下持续 10 s,在 60 °C 下持续 15 s 进行 40 个循环。

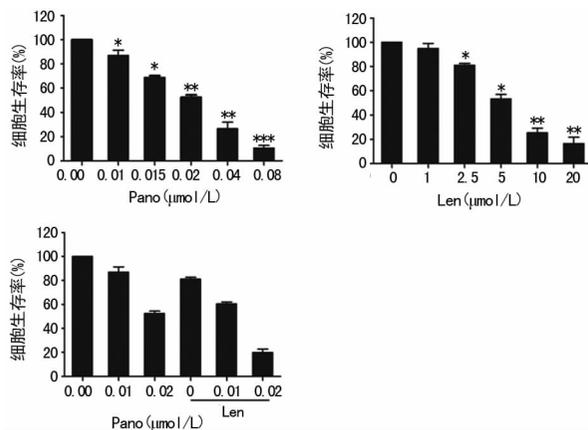
1.3 统计学处理

使用 Graph Pad Prism 5.0 软件统计分析数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用方差分析(ANOVA)和 *t* 检验进行统计学分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBH589 与来那度胺单独或者联合作用于 RPMI8226 细胞后的增殖抑制率

LBH589 与来那度胺分别作用于 RPMI8226 的增殖抑制率呈剂量依赖关系, LBH589 在浓度为 0.08 μmol/L 时,来那度胺浓度为 20 μmol/L 时,作用浓度分别达到峰值。LBH589 联合来那度胺比单用 LBH589 或者来那度胺效果明显,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1。



*: *P*<0.05, **: *P*<0.01, 与空白对照组比较

图 1 LBH589 与来那度胺对 RPMI8226 增殖抑制率的影响

2.2 LBH589 和来那度胺单独或者协同诱导细胞凋亡

LBH589 单独或者协同诱导 RPMI8226 细胞凋亡呈剂量依赖关系, RPMI8226 细胞凋亡率随着 LBH589 浓度的增加而增加。LBH589 0.01、0.02 μmol/L 时诱导 RPMI8226 细胞凋亡率分别为(11.6±7.42)%、(27.66±7.1)%,单独使用来那度胺 2.5 μmol/L 时凋亡率为(12.8±6.94)%,联合用药后,各株细胞凋亡率大幅度增长,在 LBH589 0.01 μmol/L 以及 0.02 μmol/L,来那度胺为 2.5 μmol/L

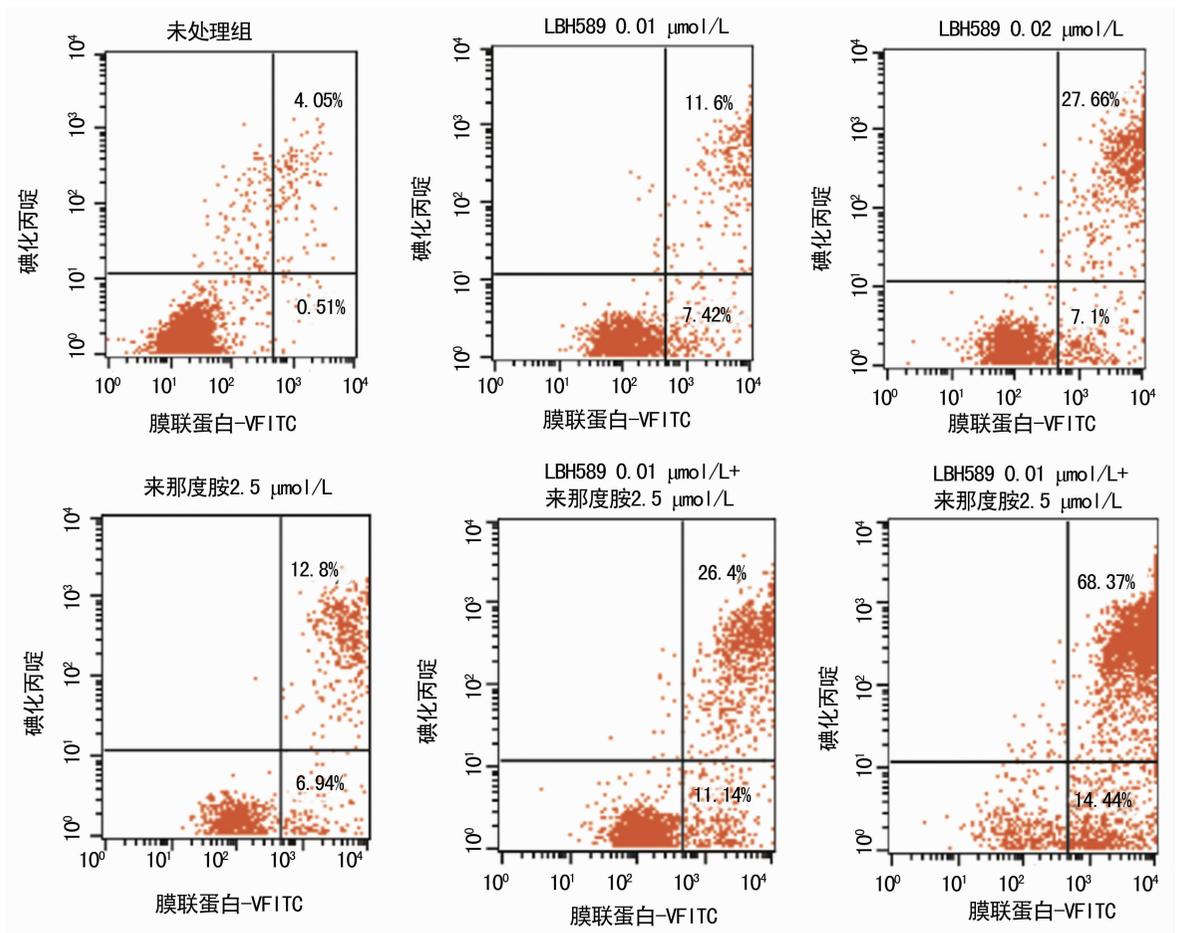


图 2 LBH589 与来那度胺对 RPMI8226 细胞凋亡的影响

时凋亡率分别为 $(36.4 \pm 11.1)\%$ 、 $(68.37 \pm 14.4)\%$ ，说明 LBH589 和来那度胺联合应用时，显著协同诱导凋亡作用，组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 2。

抗凋亡蛋白均有所下降，凋亡蛋白有所增加，见图 3。

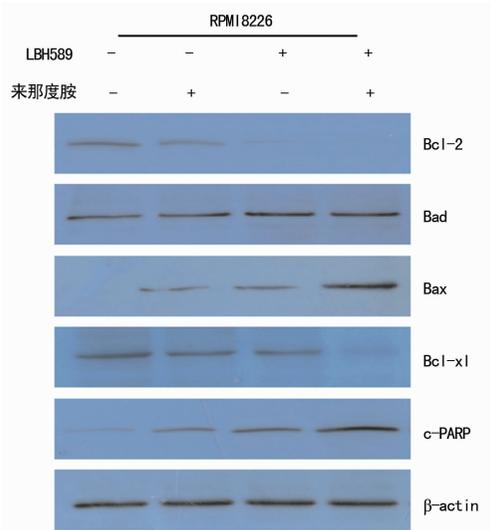
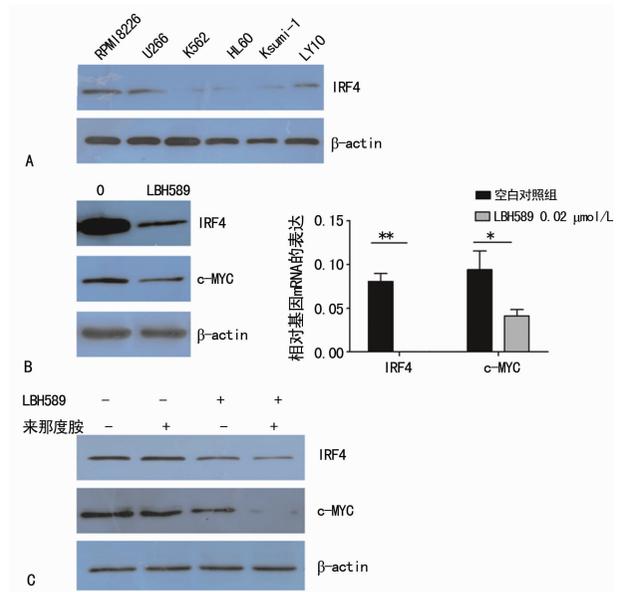


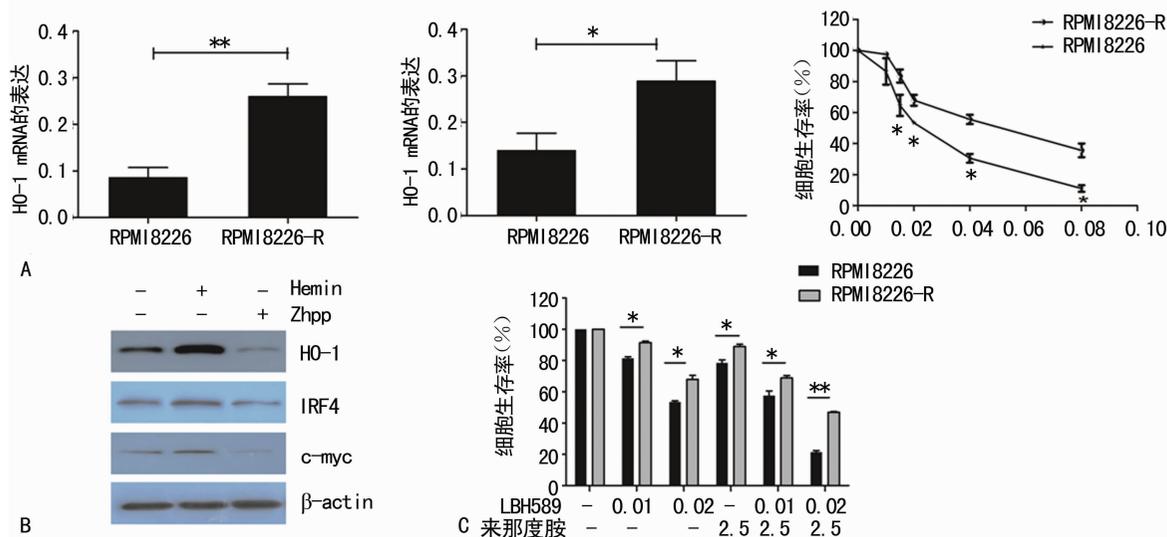
图 3 LBH589 与来那度胺对 RPMI8226 细胞凋亡相关蛋白的影响

2.3 LBH589 单独以及联合来那度胺作用于 RPMI8226 细胞后对凋亡相关 Bcl-2、Bcl-xl、bad、Bax、c-PARP 蛋白表达水平的影响 凋亡相关蛋白水平在 LBH589 与来那度胺合用时表达最低，与空白对照组 (未处理组) 比较，在用 LBH589 或者来那度胺后，细胞



A: Western blot 检测不同细胞株中 IRF4 蛋白的表达，以及 LBH589 处理后 IRF4、c-MYC 等蛋白的表达，以 β -actin 为内参；B: Realtime PCR 检测不同浓度 LBH589 处理后 IRF4、c-MYC 在 mRNA 水平上的表达。C: 不同浓度 LBH589 单独或者联合来那度胺处理 RPMI8226 细胞 24 h 后 IRF4、c-MYC 等蛋白的表达，以 β -actin 为内参。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, 与空白对照组比较

图 4 LBH589 作用于 RPMI8226 细胞后 IRF4、c-MYC 表达下降



A:使用 Realtime PCR 检测 RPMI8226 细胞与 RPMI8226-R 细胞 HO-1 与 IRF4 等 mRNA 的表达,以 β -actin 为内参,CCK8 检测细胞的增殖抑制率;B:Western blot 检测调控 HO-1 后 IRF4、c-MYC 蛋白水平的表达,以 β -actin 为内参;* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$,与对照组比较;C:CCK8 检测 LBH589 单独或者联合来那度胺 24 h 后细胞的增殖抑制率

图 5 HO-1 及 IRF4 对 LBH589 作用于 RPMI8226-R 细胞的影响

2.4 LBH589 诱导 RPMI8226 细胞中 IRF4、c-MYC 转录因子的下降 Western blot 检测不同来源的血液恶性肿瘤中 IRF4 的蛋白水平,发现 IRF4 在骨髓瘤细胞株中表达最高。检测相关转录基因 IRF4、c-MYC 等转录因子蛋白表达随 LBH589 浓度增高而明显减低,以 β -actin 为内参,与空白对照组比较,IRF4 各蛋白表达随 LBH589 浓度增加而降低明显,见图 4A。其作用浓度同 Realtime PCR 浓度一致,见图 4B。联合使用药物后,IRF4 与 c-MYC 表达更加低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4C。

2.5 检测 RPMI8226、RPMI8226-R 中 HO-1、IRF4 的表达,此时 LBH589 产生的增殖抑制率作用比 IRF4 表达低的明显减少(图 5A)。使用 Hemin 提高 HO-1 的表达,ZNPP 降低 HO-1 的表达,使用 Realtime PCR 检测 IRF4 的表达,发现 IRF4 表达与 HO-1 下降的程度一致(图 5B),使用 LBH589 单独或者联合来那度胺处理 RPMI8226 以及 RPMI8226-R 后检测发现 RPMI8226-R 的增殖抑制率率低于 RPMI8226,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5C。

3 讨论

本研究分别观察了广谱组蛋白去乙酰化酶抑制剂 LBH589 和来那度胺单独或者协同作用于骨髓瘤细胞系 RPMI8226 导致的增殖抑制以及凋亡的作用,结果显示 LBH589 与来那度胺协同抑制肿瘤细胞的增殖以及诱导凋亡的作用,但相应机制并不清楚。LBH589 作为一种广谱的去乙酰化酶抑制剂,是 FDA 批准为治疗 MM 的化疗药物^[3]。而来那度胺是一种免疫调节剂,已经用于 MM 的治疗^[4],但 MM 患者仍然会产生耐药或者复发。目前 HDACi 与其他化疗药

物联合治疗是诱导肿瘤细胞凋亡的主要治疗方法,并且可以有效减少肿瘤细胞的耐药以及复发^[5]。为此本课题组选择使用 LBH589 与来那度胺联合治疗 MM,并且探讨其相应的机制,结果发现,Bcl-2 随着药物的作用表达逐渐下降,且 Bax 出现出上升趋势,在不同的效应细胞中,Bcl-2、Bax 等蛋白因子在 HDACi 和免疫调节剂诱导肿瘤细胞凋亡中的分子机制还有待进一步的研究。

本实验中已经探查出 IRF4 在骨髓瘤细胞中高表达,与之前的研究一致^[6],本研究也证实了 IRF4 在骨髓瘤中表达水平也高于其他的血液恶性肿瘤细胞,为进一步评价 LBH589 与来那度胺联合治疗 MM 的相应的机制,本研究选择了人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 细胞,证实随着 LBH589 与来那度胺单独或者联合作用时 IRF4 表达下降,c-MYC 的表达不太明显,提示 IRF4 涉及 LBH589 和来那度胺诱导骨髓瘤凋亡的分子机制。

IRF4 又称为多发性骨髓瘤癌基因 1,仅表达于淋巴系统,并且参与了淋巴系统的发育^[7],IRF4 又是 B 细胞发育和功能的关键转录调节因子^[8]。IRF4 基因在淋巴系、造血系统等肿瘤中常常发生变异,其表达水平可作为临床相关肿瘤治疗的预后标志^[5,9],此外,IRF4 调控区有着 c-MYC 结合位点,c-MYC 属于 MYC 家族,是一类表达较弱,但相对稳定,影响范围非常广泛的转录因子,c-MYC 调控区也存在着 IRF4 的结合位点^[10],为了更进一步地证实 IRF4 参与了 LBH589 以及来那度胺介导的凋亡作用,本课题组加用了 RPMI226-R 细胞株,因为 RPMI8226 细胞株中 IRF4 表达较 RPMI8226-R 高,由此来进一步证实

IRF4 参与了 LBH589 以及来那度胺介导的细胞增殖作用,接下来,本课题组通过 CCK8 实验证实了高表达的 IRF4 的 RPMI8226-R 的确影响了 LBH589 单独以及联合来那度胺导致的细胞增殖作用。更进一步得出 LBH589 单独或者联合来那度胺作用引起的细胞凋亡与 IRF4 降低有关,IRF4 是潜在骨髓瘤药物的治疗靶点。已有研究证实激活蛋白-1(AP-1)寡聚复合体增强 HO-1 启动子活性^[11]。BODDICKER 等^[12]也已经证明 AP-1 是 IRF4 的启动子,本课题组已经证实 HO-1 在 MM 以及其他血液恶性肿瘤中高表达,并且与凋亡、耐药相关^[13-14]。因此笔者考虑 IRF4 的高表达引起的凋亡减少是否也与 HO-1 存在相关性,HO-1 与 IRF4 的相关性值得进一步研究。本研究表明 Hemin 提高 HO-1 表达以及 ZNPP 降低 HO-1 的表达均可以影响 MM 中 IRF4、c-MYC 的表达水平,证实二者存在相关性。HO-1、IRF4、c-MYC 三者相互之间复杂的调控环路以及在肿瘤细胞中表达的失调,考虑 HO-1/IRF4/c-MYC 轴可用于治疗 MM 的靶点,有潜力应用于今后 MM 的治疗,其具体分子机制有待于进一步深入研究。

综上所述,LBH589 可抑制 RPMI8226 细胞的增殖且诱导凋亡,联合来那度胺后这种作用更明显。使用 LBH589 与来那度胺治疗后明显降低了 IRF4 以及轻微下调其下游 c-MYC,使得抗凋亡蛋白 Bcl-2 下降以及促凋亡蛋白 Bax 表达增加而促进 MM 细胞的凋亡,HO-1 是 MM 的一个治疗靶点,当增强或者沉默 HO-1 时,IRF4 与 c-MYC 明显与 HO-1 的表达一致,这些数据均可表明 IRF4 有潜力成为去乙酰化酶抑制剂的治疗靶点,而 HO-1/IRF4/c-MYC 轴也有潜力用于治疗 MM。

参考文献

- [1] MAHINDRA A, HIDESHIMA T, ANDERSON K C. Multiple myeloma: biology of the disease[J]. *Blood Rev*, 2010, 24(S1): 5-11.
- [2] IIDA S, RAO P H, BUTLER M, et al. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma[J]. *Nature Genetics*, 1997, 17(2): 226.
- [3] FENICHEL M P. FDA Approves new agent for multiple myeloma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(6): 165.
- [4] RICHARSON P G, BLOOD E, MISTIADIS C S, et al. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma[J]. *Blood*, 2006, 108(10): 3458-3464.
- [5] HIDESHIMA T, COTTINI F, OHGUICH H, et al. Rational combination treatment with histone deacetylase inhibitors and immunomodulatory drugs in multiple myeloma[J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5(5): e312.
- [6] RYU D, KIM H J, JOUNG J G, et al. Comprehensive genomic profiling of IgM multiple myeloma identifies IRF4 as a prognostic marker[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 47127-47133.
- [7] OZATO K, TAILOR P, KUBOTA T. The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action[J]. *J Biologic Chem*, 2007, 282(28): 20065-20069.
- [8] ABRUZZESE M P, BILOTTA M T, FIONDA C, et al. Inhibition of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins increases NKG2D ligand MICA expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in multiple myeloma cells: role of cMYC-IRF4-miR-125b interplay[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 134.
- [9] HEINTEL D, ZOJER N, SCHREDER M, et al. Expression of MUM1/IRF4 mRNA as a prognostic marker in patients with multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2008, 22(2): 441-445.
- [10] DIB A, GABREA A, GLEBOV O K, et al. Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines[J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2008(39): 25-31.
- [11] YELIGAR S M, MACHIDA K, KALRA V K. Ethanol-induced HO-1 and NQO1 are differentially regulated by HIF-1 and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35359-35373.
- [12] BODDICKER R L, KIP N S, XING X, et al. The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF- κ B positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2015, 125(20): 3118-3127.
- [13] WU W, DAN M, PING W, et al. Potential crosstalk of the interleukin-6 heme oxygenase-1 dependent mechanism involved in resistance to lenalidomide in multiple myeloma cells[J]. *Febs J*, 2016, 283(5): 834-849.
- [14] 柴其翔, 韦四喜, 王娅婷, 等. 调控血红素加氧酶-1 诱导 K562A02 细胞增殖、凋亡及耐药机制研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(6): 727-730.

(收稿日期: 2017-09-20 修回日期: 2017-12-18)