

Akt 抑制剂 MK-2206 清除衰老神经母细胞瘤细胞的实验研究

李 芬¹, 周 琦¹, 丁丽丽², 刘爱国¹, 杨 燕¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030;

2. 武汉儿童医院, 湖北 武汉 430000)

摘 要: [目的] 探讨 Akt 抑制剂 MK-2206 清除衰老神经母细胞瘤细胞 IMR-32 的效果及可能机制。[方法] 极光激酶 A 抑制剂 MLN8237 处理神经母细胞瘤细胞系 IMR-32, 利用衰老相关 β 半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色检测细胞状态、免疫荧光法检测组蛋白磷酸化和甲基化情况评估细胞衰老状况。CCK-8 检测不同浓度 MK-2206 及 MK-2206 与 MLN8237 联合对 IMR-32 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡状况。Western blot 法检测 MK-2206 与 MLN8237 联合用药对 IMR-32 细胞 Akt、p-Akt、STAT3 和 N-Myc 表达的影响。[结果] MLN8237 作用 IMR-32 细胞后, 细胞核体积明显增大, 细胞呈现大而扁平的衰老状态, 细胞蓝染数显著增多; 组氨酸 H3 Ser10 磷酸化水平和组氨酸 H3 K9 甲基化水平显著性升高。Western blot 显示衰老 IMR-32 细胞内磷酸化 Akt 和 STAT3 蛋白显著性上调。10 μ mol/L MK-2206 干预衰老细胞 72h 和 96h 后细胞存活率分别为 (80.13 $\pm$ 5.30)%、(74.29 $\pm$ 4.06)%, 较不干预衰老细胞组显著性下降。在 MK-2206 与 MLN8237 联合作用下细胞出现明显凋亡, 凋亡率为 (15.70 $\pm$ 0.97)%, 而不干预衰老细胞组细胞凋亡率为 (8.81 $\pm$ 1.33)%, 同时两药联合组胞内 p-Akt、STAT3 和 N-Myc 蛋白显著性下调。[结论] MK-2206 可能通过抑制衰老神经母细胞瘤细胞内 p-Akt, 下调 STAT3 和 N-Myc 蛋白的机制, 诱导细胞凋亡, 从而达到清除 MLN8237 诱导的衰老细胞目的。
关键词: Akt 抑制剂; MK-2206; MLN8237; 化疗诱导的细胞衰老; 神经母细胞瘤
中图分类号: R739.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)05-0396-06
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.05.B006

Elimination of Senescent Neuroblastoma Cells by Akt Inhibitor MK-2206

LI Fen¹, ZHOU Qi¹, DING Li-li², LIU Ai-guo¹, YANG Yan¹

(1. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect and possible mechanism of Akt inhibitor MK-2206 on elimination of senescent neuroblastoma cells. [Methods] Neuroblastoma IMR-32 cells were treated with aurora A inhibitor MLN8237, and cell senescence was assessed by β galactosidase (SA- β -gal) activity assay and immunofluorescence assay for the detection of histone phosphorylation and methylation. CCK-8 assay was used to detect the effects of MK-2206 combined with MLN8237 on the proliferation of IMR-32 cells. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of Akt, p-Akt, STAT3 and N-Myc proteins were detected by Western blot analysis. [Results] MLN8237 treatment induced senescence of neuroblastoma IMR-32 cells, and the enlarged and flattened morphology with increased activity of SA- β -gal was observed in senescent IMR-32 cells. Immunofluorescence showed up-regulation of phosphorylation of histone H3Ser10 and methylation of histone H3K9 in MLN8237-treated IMR-32 cells. Western blot showed a significant up-regulation of phosphorylated Akt and STAT3 proteins in senescent IMR32 cells. The survival rate of senescent cells was (80.13 $\pm$ 5.30)% and (74.29 $\pm$ 4.06)% at 72h and 96h after 10 μ mol/L MK-2206 intervention, which was significantly lower than that of the senescent cells without intervention. Treatment of MLN8237 combined with MK-2206 showed a significantly increased apoptosis rate (15.70 $\pm$ 0.97)%, while that without intervention was (8.81 $\pm$ 1.33)%. The expressions of p-Akt, STAT3 and N-Myc proteins in the combination group were also significantly down-regulated. [Conclusion] Akt inhibitor MK-2206 can enhance the apoptosis of MLN8237-induced senescent neuroblastoma cells, which may be associated with the inhibiting p-Akt, down-regulating STAT3 and N-Myc.

Subject words: Akt inhibitor; MK-2206; MLN8237; chemotherapy-induced senescent cells; neuroblastoma

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81472706); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2015LC042)

通信作者: 杨燕, 副主任技师, 博士; 华中科技大学同济医学院附属同济医院实验医学研究中心,

湖北省武汉市蔡甸区蔡甸大街健康大道 2 号 (430030); E-mail: yyang@tjh.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2019-10-08; **修回日期:** 2019-12-03

神经母细胞瘤是一种起源于肾上腺髓质或椎旁交感神经系统的颅外实体瘤,常见于儿童,约占小儿恶性实体肿瘤的9.8%^[1]。神经母细胞瘤起病较为隐匿,发展迅速,恶性化程度高;大部分神经母细胞瘤患者在诊断时已出现全身转移,化疗是临床首选方案^[2]。化疗可以通过诱导细胞凋亡,抑制肿瘤生长;另一方面,低浓度化疗药物也可以诱导细胞衰老,衰老细胞停止分裂进入休眠期,达到控制肿瘤恶性生长,实现临床缓解的目的。近来有越来越多的证据表明化疗诱导的细胞衰老是一把双刃剑,在有效控制肿瘤生长的同时,细胞可自分泌或旁分泌生长因子、细胞因子以及蛋白酶等,这种现象称为衰老相关的分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)。SASP可使衰老的成纤维细胞转成促炎细胞,产生炎症因子和基质金属蛋白酶,促进周边非衰老肿瘤细胞的生长和复发^[3]。研究还发现部分衰老细胞在药物压力下启动了重编程,发生衰老逃逸,细胞重新进入细胞周期并激活肿瘤转移浸润相关基因的表达,促进肿瘤复发与转移^[4]。因此,及时清除化疗诱导的衰老肿瘤细胞有利于临床预后。

课题组前期研究发现,极光激酶A(aurora kinase A, AURKA)抑制剂MLN8237(Alisertib)在诱导IMR-32细胞衰老的同时促进Akt磷酸化^[5]。Akt,又名蛋白激酶B(protein kinase B, PKB),是PI3K-Akt-mTOR信号通路的核心蛋白,该通路在调控肿瘤细胞凋亡、增殖和侵袭等方面发挥重要功能^[6]。MK-2206是一种新型、口服的、具有生物活性的Akt变构抑制剂^[7]。多项I~II期临床试验显示,单纯使用MK-2206即可抑制肿瘤,联合其他抗肿瘤药物可产生协同作用,减少不良反应发生^[8-10]。p-Akt上调是MLN8237诱导细胞衰老、控制肿瘤发展中的不利因素。本文以人神经母细胞瘤细胞IMR-32为研究对象,探究Akt抑制剂MK-2206清除衰老IMR-32细胞的效果。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

DMEM高糖培养基、胎牛血清、胰酶(Gibco公司),MK-2206(MCE公司),CCK-8(Dojindo Laboratories公司),SA- β -gal染色试剂盒(Genmed科技),N-

Myc抗体(Novusbio公司),羊抗兔/鼠IgG-HRP、Survivin抗体(Abcam公司),Histone H3、p-Akt、Akt、STAT3抗体均购自Cell Signaling Technology公司。IMR-32细胞由武汉协和医院提供。

1.2 细胞衰老相关的 β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)活性检测

细胞消化种于6孔板中,待细胞贴壁生长至80%融合,加入2 μ mol/L MLN8237干预72h,设置正常对照组。按照Genmed科技的SA- β -gal染色试剂盒说明书提前配制工作液(Reagent D:Reagent E=19:1),于37 $^{\circ}$ C中预热。弃去6孔板内培养基,用Reagent A清洗细胞,再用Reagent B固定细胞,室温下放置5 min。弃去Reagent B,每孔用Reagent C清洗2次后,加入2ml提前配制并预热的工作液,于37 $^{\circ}$ C孵育16h,镜下观察蓝染细胞。

1.3 细胞衰老相关的组蛋白H3磷酸化和甲基化免疫荧光检测

IMR-32细胞消化后,以3 $\times 10^4$ /孔密度接种到板内,待细胞贴壁生长至80%融合,模型组加入2 μ mol/L MLN8237干预72h,正常对照组不做处理。药物处理72h后,弃去培养基,4 $^{\circ}$ C预冷PBS清洗3次后加入预冷的甲醇丙酮(1:1)混合固定液,常温下孵育细胞30min。除去固定液后,用1% BSA于37 $^{\circ}$ C封闭1h。完成一抗、二抗孵育后,室温DAPI孵育10min后封片观察。

1.4 CCK-8检测MK-2206对细胞增殖的影响

IMR-32细胞消化后,以5 $\times 10^3$ /孔密度接种到96孔板内,待细胞贴壁生长至80%融合,设置8个组:正常组, MK-2206组(1、5、10 μ mol/L), MLN8237(2 μ mol/L)+ MK-2206(1、5、10 μ mol/L), MLN8237组(2 μ mol/L),分别干预0、24、48、72、96h,每个药物浓度设6个副孔。达到药物处理时间后,弃去旧培养基,每孔加入100 μ l CCK-8工作液(CCK-8原液与培养基按10:1配制),37 $^{\circ}$ C孵育1h,用多功能酶标仪检测450nm处OD值。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A(\text{加药组}) - A(\text{空白组})}{A(\text{正常组}) - A(\text{空白组})} \times 100\%$$

1.5 流式细胞术检测MK-2206对细胞凋亡的影响

IMR-32细胞消化后,以3 $\times 10^5$ /孔密度接种到6孔板内,设置组:正常组,10 μ mol/L MK-2206组, MLN8237组, MLN8237+10 μ mol/L MK-2206。培养

72h 后胰酶消化离心收集细胞。冷 PBS 洗涤细胞后, 每管加入 1×Annexin-binding buffer 100μl 重悬细胞沉淀。每管加入 Alexa Fluor 488 annexinV 5μl, 100μg/ml PI 工作液 1μl。充分混匀后室温孵育 15min (避光)。每管加入 1×Annexin-binding buffer 400μl, 轻柔混合后, 放置冰上并尽快流式细胞仪上机检测凋亡细胞。

1.6 Western blot 检测 p-Akt、Akt、STAT3、N-Myc 等蛋白表达

IMR-32 细胞消化后, 以 3×10^5 /孔密度接种到 6 孔板内, 待细胞贴壁生长至 80% 融合, 设置 8 个组: 正常组, MK-2206 组 (1、5、10 μmol/L), MLN8237 (2 μmol/L) + MK-2206 (1、5、10 μmol/L), MLN8237 组 (2 μmol/L), 干预 72h, 每个药物浓度设 3 个副孔。72h 后, 每孔细胞加入 100μl 蛋白裂解液冰上裂解 15min, 以 12 000r/min 在 4℃ 下离心 10min, 提取每孔蛋白。蛋白浓度用 BCA 试剂盒测定。蛋白按 1:4 加入 5×Loading buffer, 于 100℃ 煮沸 5min。蛋白样品经 SDS-PAGE 胶电泳分离、电转移法转移至 PDVF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 2h, 加入相应一抗, 4℃ 过夜。次日用 TBST 溶液洗涤条带 3 次后, HRP 标记的二抗孵育, 室温下孵育 1h。TBST 洗膜 3 次后用 ECL 化学发光法曝光显影, 然后用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图像进行灰度值分析。

1.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLN8237 诱导 IMR-32 细胞衰老

神经母细胞瘤细胞 IMR-32 经 2 μmol/L MLN8237 作用 72h 后镜下可见细胞和细胞核体积明显增大, 细胞呈现大而扁平的衰老状态, 且细胞蓝染数明显高于正常组 (Figure 1)。由 Figure 2 可知, 与正常组比较, MLN8237 组细胞核变大且胞内组氨酸 H3 Ser10 和组氨酸 H3 K9 的荧光显著性增强, 即组氨

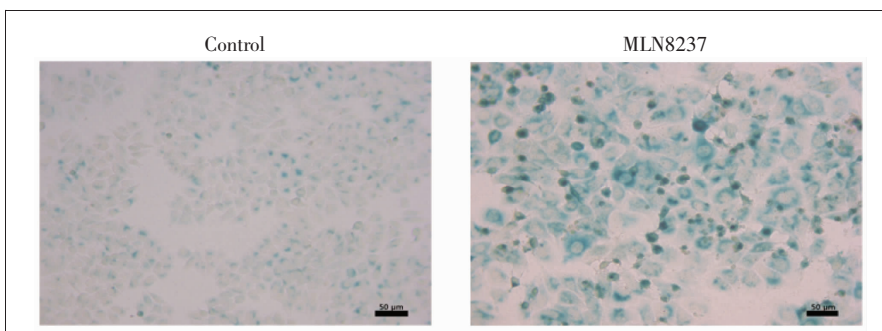


Figure 1 Effects of MLN8237 on β galactosidase activity in IMR-32 cells

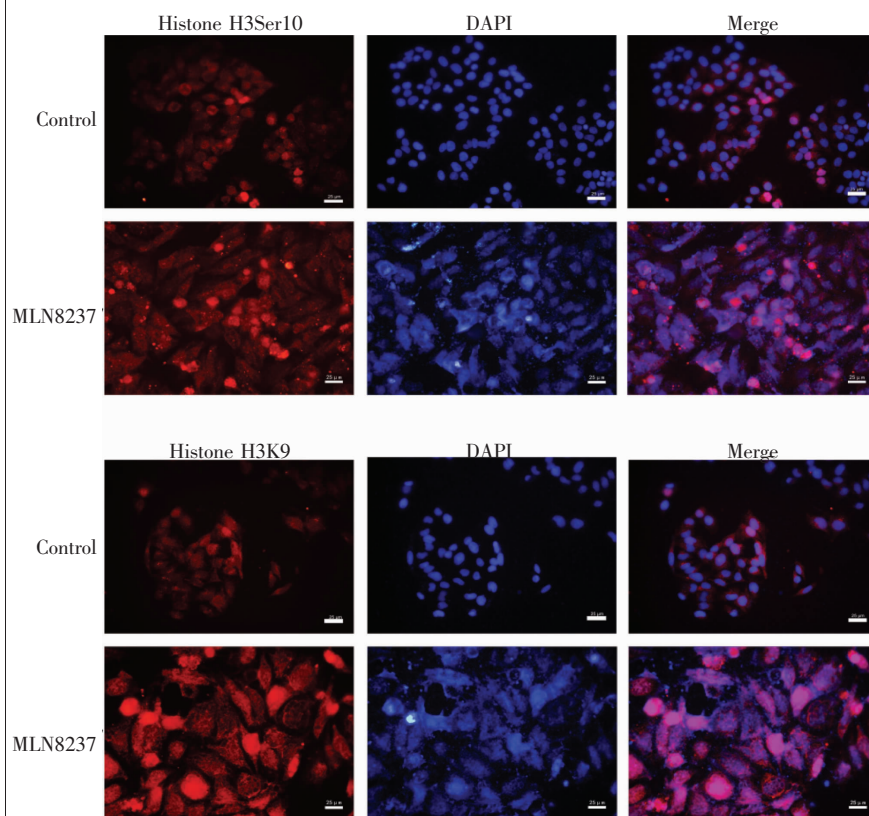


Figure 2 Effects of MLN8237 on histone H3Ser10 and histone H3K9 in IMR-32 cells

酸 H3 Ser10 磷酸化水平和组氨酸 H3 K9 甲基化水平显著性升高,可见,2 μ mol/L MLN8237 作用 IMR-32 细胞 72h 后细胞呈现明显衰老状态。

2.2 Akt 抑制剂 MK-2206 与 MLN8237 联用降低 IMR-32 细胞存活率

选用不同浓度(1、5、10 μ mol/L)的 MK-2206 处理正常或衰老 IMR-32 细胞,检测不同时间点细胞活力。10 μ mol/L MK-2206+MLN8237 干预 IMR-32 细胞 72h 和 96h 后细胞存活率分别为(80.13 $\pm$ 5.30)%、(74.29 $\pm$ 4.06)%,而 MLN8237 组的衰老细胞 72h 和 96h 存活率分别为(94.08 $\pm$ 6.87)%、(91.97 $\pm$ 4.61)%。MLN8237 组和 10 μ mol/L MK-2206 组细胞存活率显著性高于 10 μ mol/L MK-2206+MLN8237 组(P <0.01)(Figure 3),即 10 μ mol/L MK-2206+MLN8237 能有效抑制 IMR-32 细胞增殖。

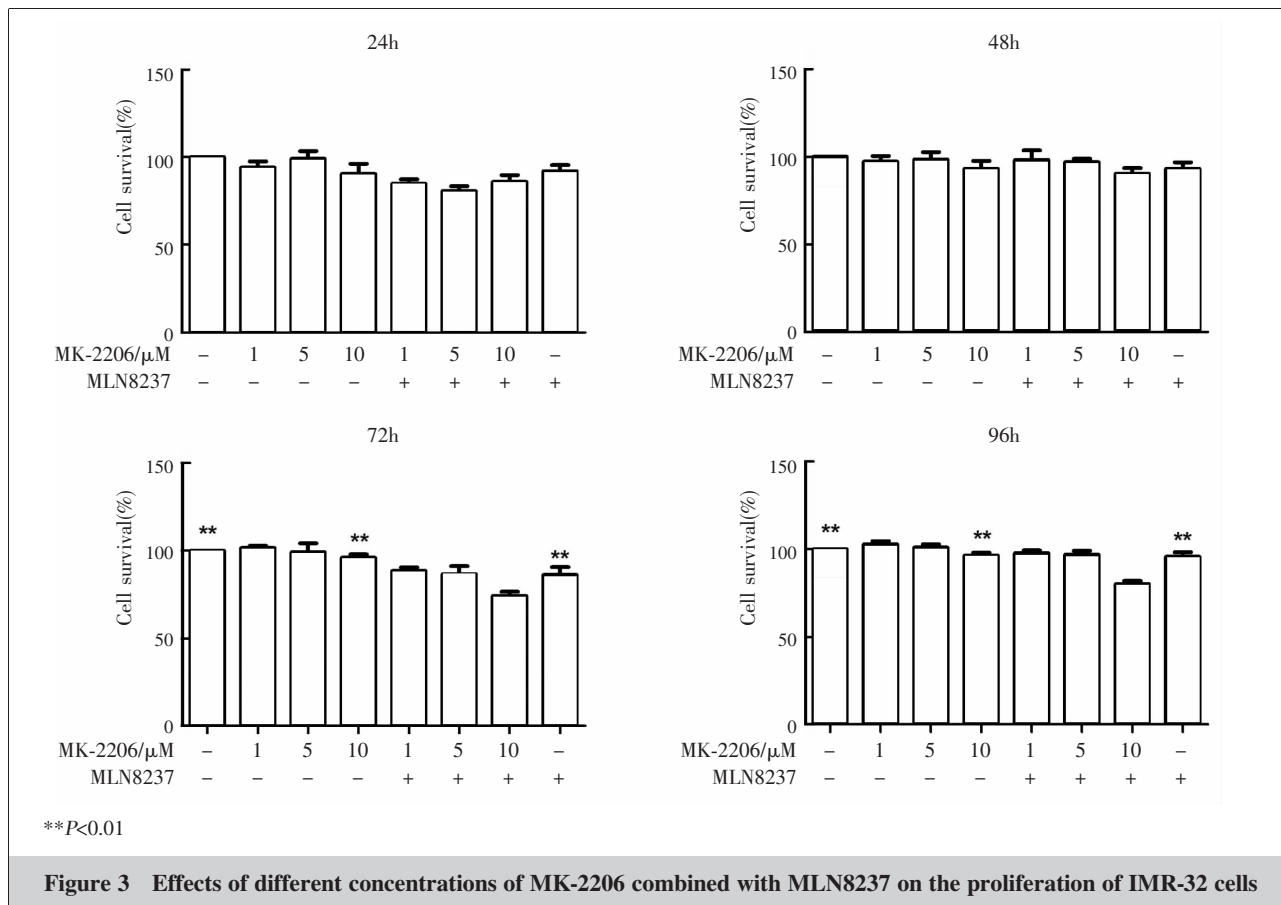
2.3 MK-2206 促进衰老 IMR-32 细胞凋亡

正常组细胞凋亡率仅为(3.17 $\pm$ 1.01)%,10 μ mol/L MK-2206 干预正常细胞没有出现明显凋亡,凋亡率为(5.92 $\pm$ 0.51)%;而 MLN8237 组出现小部分细胞凋亡,凋亡率为(8.81 $\pm$ 1.33)%;10 μ mol/L MK-2206 干

预衰老细胞后,细胞凋亡数量增多,凋亡率为(15.70 $\pm$ 0.97)%,与 MLN8237 组比较具有显著性差异(P <0.05)(Figure 4)。

2.4 MK-2206 通过阻断衰老细胞内 p-Akt 上调,下调 STAT3 及 N-Myc 蛋白

由 Figure 5 可知:MLN8237 诱导 IMR-32 细胞衰老 72h 后,与正常组比较,p-Akt 和 STAT3 蛋白的表达显著性上调(P <0.05)。与 10 μ mol/L MK-2206+MLN8237 联合组相比,正常组和单独 MLN8237 组的 p-Akt 和 STAT3 蛋白表达较高;而 10 μ mol/L MK-2206 组的 p-Akt 和 STAT3 蛋白表达显著性降低;即 MK-2206 对 p-Akt 及其下游 STAT3 蛋白的表达具有显著性抑制作用。10 μ mol/L MK-2206+MLN8237 联用能显著性抑制由 MLN8237 引起的 p-Akt 和 STAT3 蛋白表达增高。与正常组比较,MLN8237 诱导 IMR-32 细胞衰老后,N-Myc 蛋白显著性下调(P <0.01);10 μ mol/L MK-2206 +MLN8237 组 N-Myc 蛋白较 MLN8237 组、MK-2206 组和正常组表达显著性降低,即 10 μ mol/L MK-2206+MLN8237 能进一步抑制 N-Myc 蛋白的表达。



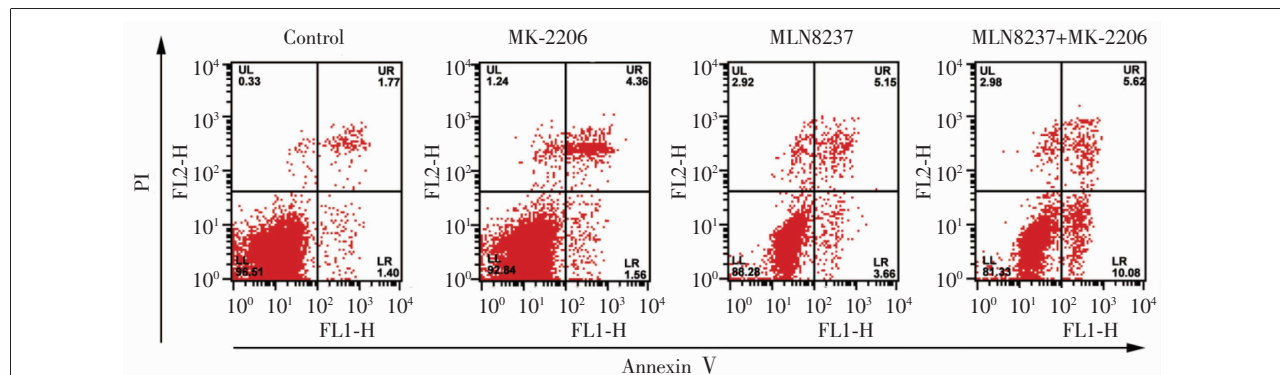
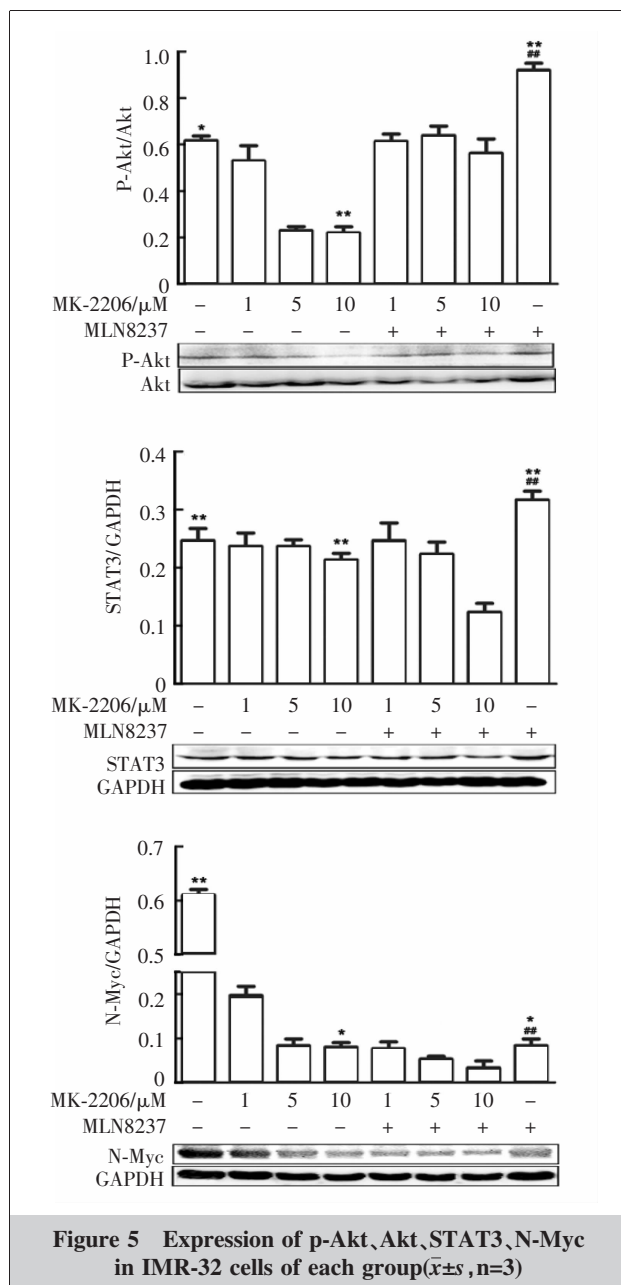


Figure 4 Apoptotic effect of MK-2206 on IMR-32 cells by flow cytometry

Figure 5 Expression of p-Akt, Akt, STAT3, N-Myc in IMR-32 cells of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

通常衰老细胞形态变化表现为体积和细胞核增大、核膜内折、细胞器变形,同时伴随 β -半乳糖苷酶的活性上调,底物 X-Gal 在 β -半乳糖苷酶的催化下生成蓝色产物^[11]。真核生物染色质中蛋白质主要组分是组蛋白,其在调控基因转录、DNA 复制、损伤修复等与 DNA 相关的生物学过程中发挥重要作用。组氨酸 H3Ser10 的磷酸化提示细胞阻滞于 G2/M 期,组氨酸 H3K9 甲基化是细胞衰老的标志之一^[12]。MLN8237 作用 IMR-32 细胞能诱导细胞和细胞核体积明显增大,细胞呈现大而扁平的衰老状态,且在 β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)活性检测实验中,细胞出现大面积的蓝染现象,组氨酸 H3 K9 甲基化水平明显升高,衰老状态明显。同时,MLN8237 能显著性上调组氨酸 H3 Ser10 磷酸化水平,细胞周期阻滞在 G2/M 期。因此,MLN8237 诱导 IMR-32 细胞发生 G2/M 型衰老。Western blot 结果显示衰老 IMR-32 细胞内磷酸化 Akt 和 STAT3 蛋白显著性上调。持续激活的 STAT3 能够加快肿瘤细胞增殖且阻碍凋亡,诱导细胞向恶性转化。研究报道,STAT3 持续激活能导致神经母细胞瘤发生耐药进而引起复发^[13],因此 STAT3 可能促进衰老细胞再次进入细胞周期,导致衰老的肿瘤细胞重新生长分裂,引发肿瘤复发。STAT3 作为 Akt/mTOR 的下游靶点蛋白,MLN8237 上调磷酸化 Akt 的同时,STAT3 也表现出相应的上调;而 MK-2206 能显著性下调衰老 IMR-32 细胞的 p-Akt 和 STAT3,伴随表现是细胞出现明显凋亡。

N-Myc 在细胞增殖、凋亡、肿瘤浸润等多种生理病理过程中均能发挥作用,是目前公认与神经母细

胞瘤预后密切关系的癌基因。在神经母细胞瘤细胞内,N-Myc 通过编码具有转录活性的核 DNA 结合磷蛋白,从而调控细胞的生长与分化^[14]。衰老 IMR-32 细胞中 N-Myc 蛋白明显降低,细胞增殖受到抑制。MK-2206 作用衰老 IMR-32 细胞后进一步下调 N-Myc 蛋白,对 IMR-32 细胞增殖的抑制作用更为明显。MK-2206 与 MLN8237 联合作用下细胞出现明显凋亡,胞内 p-Akt、STAT3、N-Myc 蛋白显著性下调。

因此,MK-2206 能够通过抑制 IMR-32 衰老细胞内 p-Akt,下调 STAT3 和 N-Myc 蛋白,诱导细胞凋亡,从而达到清除 MLN8237 诱导的衰老细胞目的。

参考文献:

- [1] Durbas M,Pabisz P,Wawak K,et al. GD2 ganglioside-binding antibody 14G2a and specific aurora a kinase inhibitor MK-5108 induce autophagy in IMR-32 neuroblastoma cells[J]. *Apoptosis*,2018,23(9-10):492-511.
- [2] Fischer J,Pohl A,Volland R,et al. Complete surgical resection improves outcome in INRG high-risk patients with localized neuroblastoma older than 18 months[J]. *BMC Cancer*,2017,17(1):520.
- [3] Wiley CD,Schaum N,Alimirah F,et al. Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype[J]. *Scientific Reports*,2018,8(1):2410.
- [4] Salminen A,Huuskonen J,Ojala J,et al. Activation of innate immunity system during aging;NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging[J]. *Ageing Research Reviews*,2008,7(2):100-105.
- [5] Zhou X,Pusalkar S,Chowdhury SK,et al. Mass balance, routes of excretion, and pharmacokinetics of investigational oral^[14C]-alisertib (MLN8237), an aurora a kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors[J]. *Invest New Drugs*,2019,37(4):666-673.
- [6] Chen JM,Lian XL,Du J,et al. Inhibition of phosphorylated ser473-Akt from translocating into the nucleus contributes to 2-cell arrest and defective zygotic genome activation in mouse preimplantation embryogenesis [J]. *Dev Growth Differ*,2016,58(3):280-292.
- [7] Winder A,Unno K,Yu Y,et al. The allosteric AKT inhibitor,MK2206,decreases tumor growth and invasion in patient derived xenografts of endometrial cancer[J]. *Cancer Biology & Therapy*,2017,18(12):958-964.
- [8] Uhlenbrock N,Smith S,Weisner Jörn,et al. Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt [J]. *Chemical Science*,2019,10(12):3573-3585.
- [9] Ma CX,Sanchez C,Feng G,et al. A phase I study of the AKT inhibitor MK-2206 in combination with hormonal therapy in postmenopausal women with estrogen receptor positive metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2016,22(11):2650-2658.
- [10] Narayan RS,Fedrico CA,Brands E,et al. The allosteric AKT inhibitor MK2206 shows a synergistic interaction with chemotherapy and radiotherapy in glioblastoma spheroid cultures[J]. *BMC Cancer*,2017,17(1):204.
- [11] Kim HI,Moon SH,Lee WC,et al. Inhibition of cell growth by cellular differentiation into adipocyte-like cells in dexamethasone sensitive cancer cell lines[J]. *Animal Cells and Systems*,2018,22(3):178-188.
- [12] Sadakierska-Chudy A,Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II :histone post-translational modification,nucleosome level,and chromatin regulation by ncRNAs[J]. *Neurotoxicity Research*,2015,27(2):172-197.
- [13] Zhao Z,Lv B,Zhang L,et al. miR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3[J]. *Molecular Medicine Reports*,2017,16(2):2281-2289.
- [14] Wang Y,Zhou Y,Tao F,et al. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) promotes the stem-like properties of lung cancer cells through stabilized c-Myc[J]. *Cancer Letters*,2017,401:53-62.