

【基础研究】

通信作者:钟加滕(1983-),男,山东滕州人,博士,副教授,研究方向:肿瘤靶向治疗与分子病理;E-mail:zhongjiatengxxmu@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects of 3-bromopyruvate (3-BP) alone or combination with sodium taursus deoxycholate (TUDCA) on the survival, proliferation and apoptosis of human myeloid leukemia cells and its mechanism.

Methods The human myeloid leukemia cells K562 in the logarithmic growth phase were randomly divided into 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group and 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, which were cultured with RPMI-1640 medium containing final concentrations of 0, 40, 80 and 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP, respectively; the cell viability was detected by the cell counting kit-8 (CCK-8) method, the cell apoptosis was detected by the flow cytometry, and the expressions of the apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved-capsase-3 and endoplasmic reticulum stress excitation-related protein immunoglobulin-binding protein (Bip), eukaryotic translation initiation factor-2 α (EIF-2 α), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor-2 α (p-EIF-2 α), activating transcription factor 4 (ATF4) were detected by Western blot. Human myeloid leukemia cells K562 in the logarithmic growth phase were randomly divided into 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, which were cultured with RPMI-1640 medium containing final concentrations of 0, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP, respectively; the cell proliferation ability was detected by CCK-8 method at 0, 24, 48, 72, 96 h of culture. In addition, the logarithmic growth phase K562 cells were randomly divided into control group, 3-BP group, TUDCA group and 3-BP + TUDCA group, which were cultured with 100 μL of RPMI-1640 medium containing final concentrations of 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP and 0 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP, 0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP and 0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA, respectively; the cell viability was detected by CCK-8 method, the apoptosis of cells was detected by flow cytometry, the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and cleaved-capsase-3 were detected by Western blot.

Results When 3-BP intervened for 16 h, with the increase of drug concentration, the viability of cells in the 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group was significantly decreased ($F = 542.170, P < 0.05$). After drug intervention for 16 h, the viability of cells in the 3-BP group, TUDCA group and 3-BP + TUDCA group was significantly lower than that in the control group, and the viability of cells in the 3-BP + TUDCA group was significantly lower than that in the 3-BP group and TUDCA group ($P < 0.05$). When 3-BP intervened for 24, 48, 72 and 96 h, with the increase of 3-BP intervention concentration, the proliferation ability of cells in the 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group showed a significant decrease trend ($F = 284.875, 819.658, 199.535, 467.633; P < 0.05$). With the increase of 3-BP intervention concentration, the apoptosis rate and the relative expression level of Bax and cleaved-capsase-3 protein of cells were significantly increased, and the relative expression level of Bcl-2 protein was significantly decreased in the 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group and 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group ($F = 2148.278, 1176.838, 1350.646, 6765.482; P < 0.05$). With the increase of 3-BP concentration, the relative expression of Bip, p-EIF-2 α and ATF4 protein of cells in the 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group showed a significant increase trend ($F = 1600.447, 504.672, 1949.837; P < 0.05$); there was no significant difference in the relative expression level of EIF-2 α protein of cells among the 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group, 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP group ($F = 1.034, P > 0.05$). The apoptosis rate and the relative expression of Bax and cleaved-capsase-3 proteins in the 3-BP + TUDCA group were significantly higher than those in the control group, 3-BP group and TUDCA group ($P < 0.05$); the relative expression of Bcl-2 protein in the 3-BP + TUDCA group was significantly lower than that in the control group, the 3-BP group and the TUDCA group ($P < 0.05$).

Conclusion 3-BP can significantly inhibit the proliferation and survival of human myeloid leukemia cells K562, promote the apoptosis of K562 cells, and induce the occurrence of endoplasmic reticulum stress. The endoplasmic reticulum stress inhibitor TUDCA can increase the pro-apoptotic effect of 3-BP on K562 cells and inhibit the survival of K562 cells.

Key words: myelogenous leukemia; 3-bromopyruvate; sodium taursus deoxycholate; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是骨髓造血干细胞异常克隆性增殖形成的恶性肿瘤,绝大多数患者起病缓慢。随着酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼的研发,患者保守治疗取得不错的效果,但是长期接受伊马替尼治疗的CML患者超过30%出现了耐药或者不耐受,这使得寻找新的治疗策略和靶点迫在眉睫^[1-2]。肿瘤细胞不受控制的生长和增殖需要通过糖酵解获得大量的能量和代谢产

物。3-溴丙酮酸(3-bromopyruvate, 3-BP)是糖酵解中关键激酶己糖激酶(hexokinase, HK)2的抑制剂。有文献报道,3-BP可通过抑制肿瘤细胞糖酵解抑制肿瘤细胞生长^[3]。内质网应激相关信号通路作为凋亡途径通路的一种,在抑制肿瘤细胞生长中同样发挥着重要作用^[4]。3-BP对髓系白血病细胞的作用及对内质网应激相关信号通路的影响还未见报道。研究显示,牛熊去氧胆酸钠(sodium taursus

deoxycholate, TUDCA) 治疗胆石症及肝病有显著的效果^[5-6]。近年来, TUDCA 在其他疾病的治疗方面也引起了广泛的关注, 有研究发现, TUDCA 具有抑制内质网应激发生的作用, 可以作为内质网应激的抑制剂^[16]。本研究通过探讨 3-BP 单独或联合 TUDCA 对髓系白血病细胞存活、增殖、凋亡及内质网应激相关信号通路蛋白表达的影响, 以期为临床治疗 CML 及联合用药提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 人髓系白血病细胞 K562 购自武汉普诺赛生物科技有限公司; 3-BP、Tubulin 抗体购自美国 Sigma 公司, TUDCA、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自美国 Med Chem Express 公司, B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体购自上海 Abways 公司, cleaved-caspase-3、免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin-binding protein, Bip)、真核翻译起始因子-2 α (eukaryotic translation initiation factor-2 α , EIF-2 α) 抗体购自美国 CST 公司, 磷酸化真核翻译起始因子-2 α (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor-2 α , p-EIF-2 α)、转录激活因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 抗体购自德国 Snta cruz 公司, 人膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 凋亡检测试剂盒购自日本同仁公司, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶配制试剂盒、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, RPMI-1640 培养液、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 购自武汉普诺赛生物科技公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶购自武汉塞维尔公司; 酶标仪购自武汉赛默飞公司, 流式细胞仪购自美国贝克曼公司, 电转仪、电泳仪购自北京六一仪器公司, 金属浴购自山东博科科学仪器公司。

1.2 细胞培养 将 K562 细胞接种于含体积分数 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 °C 含体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 CCK-8 检测细胞存活能力 收集对数生长期 K562 细胞, 胰蛋白酶消化后, 用培养基重悬, 以每孔 1.2×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 并随机分为

0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组, 分别用含终浓度 0、40、80、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 的 RPMI-1640 培养液培养; 另铺 96 孔板, 并随机分为对照组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组, 分别使用含终浓度 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 和 0 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP、0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 和 0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA 的 RPMI-1640 培养液培养。每组设 6 个复孔。细胞铺板并加药后, 每隔 2 h 观察细胞生长状态, 药物干预 16 h 后, 加入 CCK-8 试剂, 置于 37 °C 细胞培养箱孵育 2 h。使用酶标仪于波长 450 nm 处测定光密度 (optical density, OD) 值。OD 值越高表示细胞存活能力越强。实验重复 3 次, 取均值。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 收集对数生长期 K562 细胞, 以每孔 3 000 个细胞接种于 5 个 96 孔板, 每个 96 孔板随机分为 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组, 分别用含终浓度 0、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 的 RPMI-1640 培养液培养。5 组细胞使用不同浓度 3-BP 培养 0、24、48、72、96 h 时, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 置于 37 °C 细胞培养箱孵育 2 h, 使用酶标仪于波长 450 nm 处检测 OD 值。OD 值越高表示细胞增殖能力越强。实验重复 3 次, 取均值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集对数生长期 K562 细胞, 以每孔 2.5×10^6 个细胞均匀铺于 6 孔板中, 并随机分为 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组, 分别用含终浓度 0、40、80、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 的 RPMI-1640 培养液培养。另取对数生长期 K562 细胞铺 6 孔板, 并随机分为对照组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组细胞分别用含终浓度 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP、0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 和 0.25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ TUDCA 培养, 对照组细胞不加药培养。每组设 6 个复孔。药物作用 12 h 后, 使用 Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒处理细胞, 按照试剂盒说明书进行操作, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次, 取均值。

1.6 Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白及内质网应激相关蛋白的表达 取药物干预 12 h 的 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组及对

照组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组细胞,用胰蛋白酶消化并收集细胞至离心管中,800 r · min⁻¹离心 5 min,收集细胞沉淀。加入适量细胞裂解液吹打混匀,置于冰上裂解 20 min,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将所提蛋白置于金属浴 100 ℃、10 min 变性。使用 SDS-PAGE 分离蛋白,并将蛋白恒压转至聚偏氟乙烯膜上,脱脂牛奶室温封闭 2 h,Tris 缓冲生理盐水洗涤;加入 Bcl-2、Bax、cleaved-caspase-3、Bip、EIF-2α、p-EIF-2α、ATF4 一抗(稀释度 1 : 1 000),4 ℃孵育过夜,Tris 缓冲生理盐水洗涤 3 次,每次 10 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度 1 : 2 000),室温摇床孵育 1 h,Tris 缓冲生理盐水洗膜 3 次,每次 10 min;滴加电化学发光显色剂,暗室中曝光、显影,应用凝胶成像系统扫描、分析各条带灰度值,以 Tubulin 为内参,以目的蛋白条带灰度值与 Tubulin 条带灰度值比值表示蛋白相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 20.0 和 GraphPad Primer 9.0 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3-BP 对髓系白血病细胞 K562 存活能力的影响 3-BP 干预 16 h 时,0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、80 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、120 μmol · L⁻¹ 3-BP 组细胞的 OD 值分别为 1.164 ± 0.031、0.910 ± 0.037、0.729 ± 0.033、0.384 ± 0.010;随着药物浓度的升高,0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、

表 1 不同浓度 3-BP 组髓系白血病细胞 K562 增殖能力的比较

Tab.1 Comparison of the proliferation of myeloid leukemia K562 cells among different concentrations of 3-BP groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	增殖能力(OD 值)					<i>F</i>	<i>P</i>
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h		
0 μmol · L ⁻¹ 3-BP 组	3	0.340 ± 0.005	0.646 ± 0.010	0.916 ± 0.019	1.443 ± 0.085	1.815 ± 0.024	652.055	0.000
5 μmol · L ⁻¹ 3-BP 组	3	0.355 ± 0.010	0.582 ± 0.003	0.615 ± 0.006	0.864 ± 0.037	1.085 ± 0.071	182.670	0.000
10 μmol · L ⁻¹ 3-BP 组	3	0.343 ± 0.011	0.525 ± 0.006	0.572 ± 0.006	0.716 ± 0.002	0.934 ± 0.009	2 666.780	0.000
20 μmol · L ⁻¹ 3-BP 组	3	0.338 ± 0.006	0.487 ± 0.011	0.534 ± 0.007	0.681 ± 0.007	0.821 ± 0.006	1 771.547	0.000
40 μmol · L ⁻¹ 3-BP 组	3	0.352 ± 0.003	0.414 ± 0.012	0.494 ± 0.008	0.593 ± 0.014	0.652 ± 0.029	189.698	0.000
<i>F</i>		2.284	284.875	819.658	199.535	467.633		
<i>P</i>		0.083	0.000	0.000	0.000	0.000		

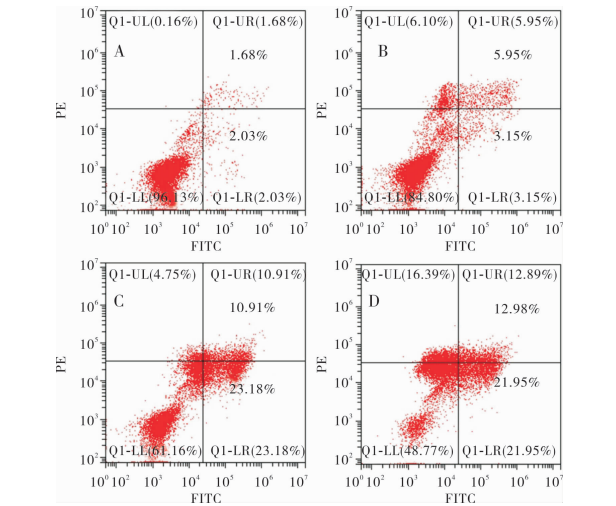
2.4 3-BP 对髓系白血病细胞 K562 凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响 结果见图 1、图 2 和表 2。随着 3-BP 干预浓度的增加,0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、80 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、120 μmol · L⁻¹ 3-BP 组细胞的凋亡率及 Bax、

40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、80 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、120 μmol · L⁻¹ 3-BP 组细胞存活能力(OD 值)呈显著降低趋势,差异有统计学意义(*F* = 542.170, *P* < 0.05)。

2.2 3-BP 联合 TUDCA 对髓系白血病细胞 K562 存活能力的影响 药物干预 16 h 时,对照组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组细胞 OD 值分别为 0.968 ± 0.417、0.760 ± 0.010、0.740 ± 0.012、0.315 ± 0.010。3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组细胞的存活能力(OD 值)显著低于对照组,3-BP + TUDCA 组细胞的存活能力(OD 值)显著低于 3-BP 组和 TUDCA 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。3-BP 组与 TUDCA 组细胞的存活能力(OD 值)比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.3 3-BP 对髓系白血病细胞 K562 增殖能力的影响 结果见表 1。3-BP 干预 0 h 时,0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、5 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、10 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、20 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组细胞的增殖能力(OD 值)比较差异无统计学意义(*F* = 2.284, *P* > 0.05)。3-BP 干预 24、48、72、96 h 时,随 3-BP 干预浓度的升高,0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、5 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、10 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、20 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组细胞的增殖能力(OD 值)呈显著降低趋势(*F* = 284.875、819.658、199.535、467.633, *P* < 0.05)。3-BP 干预 0、24、48、72、96 h 时,随干预时间的延长,0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、5 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、10 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、20 μmol · L⁻¹ 3-BP 组、40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组细胞的增殖能力(OD 值)呈显著升高趋势,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量呈显著升高趋势, Bcl-2 蛋白相对表达量呈显著降低趋势,差异有统计学意义(*F* = 2 148.278、1 176.838、1 350.646、6 765.482, *P* < 0.05)。



A;0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组;B;40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组;C;80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组;D;120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组。

图1 不同浓度3-BP组K562细胞凋亡率

Fig.1 Apoptosis rate of K562 cells in different concentrations of 3-BP groups

表2 不同浓度3-BP组K562细胞凋亡率及K562细胞中凋亡相关蛋白相对表达量的比较

Tab.2 Comparison of apoptosis rate of K562 cells and the relative expression of apoptosis-related proteins in K562 cells among different concentrations of 3-BP groups

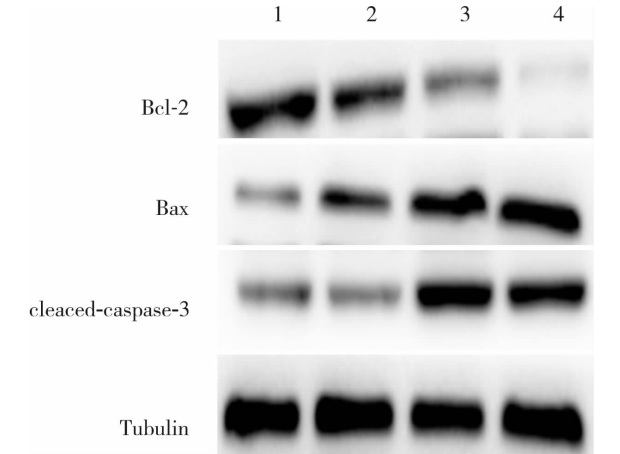
组别	n	凋亡率/%	蛋白相对表达量		
			Bcl-2	Bax	cleaved caspase-3
0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	3.657 \pm 0.383	0.851 \pm 0.029	0.248 \pm 0.001	0.378 \pm 0.001
40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	9.067 \pm 0.162	0.624 \pm 0.004	0.489 \pm 0.005	0.321 \pm 0.001
80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	33.450 \pm 0.720	0.452 \pm 0.006	0.789 \pm 0.009	0.893 \pm 0.004
120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	35.783 \pm 0.909	0.122 \pm 0.008	0.820 \pm 0.024	0.703 \pm 0.011
F		2 148.278	1 176.838	1 350.646	6 765.482
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.5 3-BP对髓系白血病细胞K562细胞内质网应激相关蛋白表达的影响 结果见表3和图3。随着3-BP浓度的升高,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组细胞Bip、p-EIF-2 α 、ATF4蛋白相对表达量呈显著

表3 不同浓度3-BP组K562细胞中内质网应激相关蛋白相对表达量的比较

Tab.3 Comparison of the relative expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins in K562 cells among different concentrations of 3-BP groups

组别	n	蛋白相对表达量			
		Bip	EIF-2 α	p-EIF-2 α	ATF4
0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.385 \pm 0.014	1.066 \pm 0.015	0.711 \pm 0.002	0.423 \pm 0.007
40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.651 \pm 0.002	1.089 \pm 0.005	0.917 \pm 0.006	0.735 \pm 0.010
80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.700 \pm 0.008	0.958 \pm 0.007	1.079 \pm 0.029	0.798 \pm 0.004
120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.901 \pm 0.009	1.025 \pm 0.012	1.181 \pm 0.011	0.921 \pm 0.011
F		1 600.447	1.034	504.672	1 949.837
P		<0.05	>0.05	<0.05	<0.05



1;0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组;2;40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组;3;80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组;4;120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组。

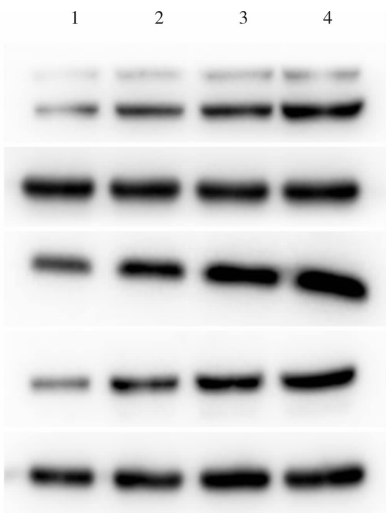
图2 不同浓度3-BP组K562细胞中凋亡相关蛋白的表达

Fig.2 Expression of apoptosis-related proteins of K562 cells in different concentrations of 3-BP groups

升高趋势,差异有统计学意义($F=1\ 600.447$ 、504.672、1 949.837, $P<0.05$)。0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP组细胞的EIF-2 α 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($F=1.034$, $P>0.05$)。

Tab.3 Comparison of the relative expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins in K562 cells among different concentrations of 3-BP groups

组别	n	蛋白相对表达量			
		Bip	EIF-2 α	p-EIF-2 α	ATF4
0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.385 \pm 0.014	1.066 \pm 0.015	0.711 \pm 0.002	0.423 \pm 0.007
40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.651 \pm 0.002	1.089 \pm 0.005	0.917 \pm 0.006	0.735 \pm 0.010
80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.700 \pm 0.008	0.958 \pm 0.007	1.079 \pm 0.029	0.798 \pm 0.004
120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组	3	0.901 \pm 0.009	1.025 \pm 0.012	1.181 \pm 0.011	0.921 \pm 0.011
F		1 600.447	1.034	504.672	1 949.837
P		<0.05	>0.05	<0.05	<0.05



A:0 μmol · L⁻¹ 3-BP 组;B:40 μmol · L⁻¹ 3-BP 组;C:80 μmol · L⁻¹ 3-BP 组;D:120 μmol · L⁻¹ 3-BP 组。

图 3 不同浓度 3-BP 组 K562 细胞中内质网应激相关蛋白的表达

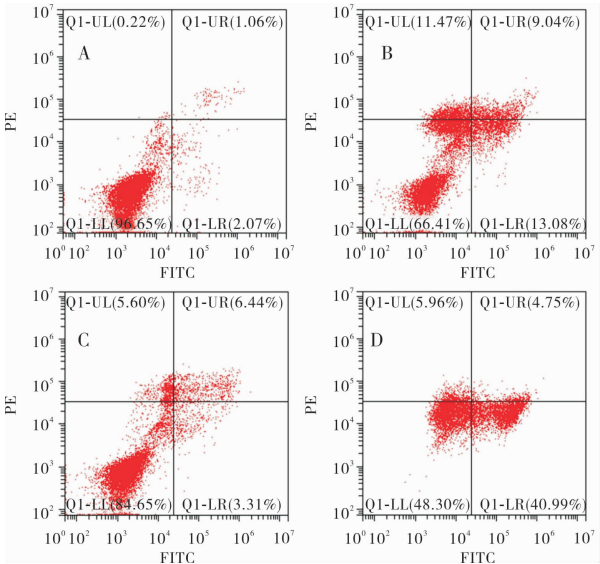
Fig. 3 Expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins in K562 cells in different concentrations of 3-BP groups

表 4 对照组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组 K562 细胞凋亡率及 K562 细胞中凋亡相关蛋白相对表达量的比较

Tab.4 Comparison of apoptosis rate of K562 cells and the relative expression of apoptosis-related proteins in K562 cells among the control group, 3-BP group, TUDCA group and 3-BP + TUDCA group

组别	n	细胞凋亡率/%	Bcl-2 蛋白相对表达量	Bax 蛋白相对表达量	cleaved caspase-3 蛋白相对表达量
对照组	3	3.757 ± 0.575	0.869 ± 0.013	0.216 ± 0.023	0.255 ± 0.001
3-BP 组	3	24.113 ± 1.870 ^a	0.712 ± 0.006 ^a	0.401 ± 0.006 ^a	0.407 ± 0.001 ^a
TUDCA 组	3	10.283 ± 0.574 ^{ab}	0.629 ± 0.016 ^a	0.593 ± 0.006 ^a	0.569 ± 0.001 ^a
3-BP + TUDCA 组	3	44.200 ± 3.421 ^{abc}	0.401 ± 0.023 ^{abc}	0.758 ± 0.008 ^{abc}	0.667 ± 0.008 ^{abc}

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与 3-BP 组比较^b*P* < 0.05;与 TUDCA 组比较^c*P* < 0.05。



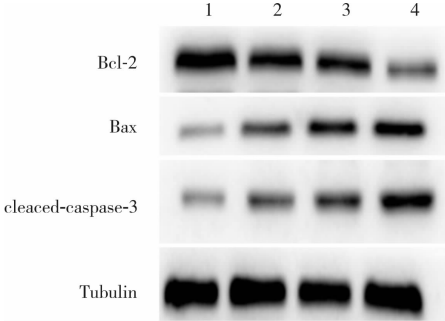
A:对照组;B:3-BP 组;C:TUDCA 组;D:3-BP + TUDCA 组。

图 4 对照组、3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组 K562 细胞凋亡情况

Fig.4 Apoptosis of K562 cells in the control group, 3-BP group, TUDCA group and 3-BP + TUDCA group

2.6 3-BP 联合 TUDCA 对髓系白血病细胞 K562

细胞凋亡率及凋亡相关蛋白相对表达量的影响 结果见表 4 和图 4、5。3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组细胞的凋亡率显著高于对照组,TUDCA 组细胞凋亡率显著低于 3-BP 组,3-BP + TUDCA 组细胞凋亡率显著高于 3-BP、TUDCA 组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。3-BP 组、TUDCA 组、3-BP + TUDCA 组细胞中 Bcl-2 蛋白相对表达量均显著低于对照组,Bax、cleaved caspase-3 蛋白相对表达量均显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。3-BP 组与 TUDCA 组细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。



1:对照组;2:3-BP 组;3:TUDCA 组;4:3-BP + TUDCA 组。

图 5 对照组、3-BP 组、TUDCA 组和 3-BP + TUDCA 组 K562 细胞中凋亡相关蛋白的表达

Fig. 5 Expression of apoptosis-related proteins in K562 cells in control group,3-BP group,TUDCA group and 3-BP + TUDCA group

3 讨论

CML 是一种起源于多能干细胞的增殖性髓系肿瘤,急变期 CML 患者缓解率较低,预后差。因此,寻找新的有效的治疗方案尤其是联合用药方案成为

控制 CML 发生发展的关键。

肿瘤细胞往往通过糖酵解的方式获取能量,而不是正常细胞的有氧循环方式获取能量,肿瘤细胞这种代谢方式的改变称为代谢重编程,也称为“Warburg 效应”^[8-9]。糖酵解途径中第一限速酶 HK 的基因参与了肿瘤细胞代谢重编程的过程。HK 已知有 4 种类型,由不同染色体的不同基因控制,其中 HK2 与肿瘤发生发展的关系最为密切^[10-11]。大量研究显示, HK2 在多种肿瘤中呈高表达,并且在肿瘤发生发展中发挥重要的调控作用^[12-14]。3-BP 是研究最广泛的 HK2 抑制剂,但是其对白血病细胞生物学行为的影响目前尚不清楚,且关于是否存在可能的联合用药方案报道较少^[15-16]。基于此,本研究通过给予人髓系白血病细胞 K562 不同浓度的 3-BP,研究 3-BP 对 K562 细胞存活、增殖和凋亡的影响。本研究结果发现,3-BP 干预 16 h 时,随着药物浓度的升高,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组细胞存活能力(OD 值)呈显著降低趋势;3-BP 干预 24、48、72、96 h 时,随 3-BP 干预浓度的升高,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组细胞的增殖能力(OD 值)呈显著降低趋势;随着 3-BP 干预浓度的增加,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组细胞的凋亡率及促凋亡相关蛋白 Bax、cleaved-caspase-3 呈显著升高趋势,抑制性凋亡蛋白 Bcl-2 呈显著降低趋势;提示 3-BP 可以显著抑制 K562 细胞的增殖能力,降低细胞存活率,促进细胞凋亡的发生。Bax 基因是人体线粒体凋亡途径中最主要的凋亡基因,对 Bcl-2 具有抑制作用^[17]。研究发现,Bax/Bcl-2 蛋白比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素,Bax 被认为是非常重要的促细胞凋亡基因之一^[18]。正常情况下,caspase 3 以酶原的形式存在,但是当细胞发生凋亡时,caspase 3 被活化成为 cleaved-caspase-3,并发挥促进细胞凋亡的作用^[19]。

内质网是细胞内蛋白质合成、折叠、存储的重要细胞器。当内质网发生错误蛋白折叠或钙离子超载时,细胞会发生内质网应激^[20]。内质网应激发生时,未折叠蛋白在内质网上堆积,会导致内质网应激蛋白 Bip 从跨膜蛋白上解离,并与未折叠蛋白结合^[21]。当内质网应激过于强烈时,会导致细胞凋

亡。有研究显示,内质网应激在抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞死亡中发挥着双重作用,既可以促进肿瘤细胞凋亡,也可维持肿瘤细胞内稳态^[22-23]。本研究使用不同浓度 3-BP 处理 K562 细胞,结果发现,随着 3-BP 浓度的升高,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-BP 组细胞中内质网应激相关蛋白 Bip、p-EIF-2 α 、ATF4 相对表达量呈显著升高趋势,提示 3-BP 所诱导的 K562 细胞凋亡可能通过激活 Bip、p-EIF-2 α 、ATF4 蛋白表达引起了内质网应激的发生。

本研究进一步研究内质网应激抑制剂 TUDCA 和 3-BP 联合应用对 K562 细胞存活、凋亡的影响及机制,结果发现,3-BP + TUDCA 组细胞的存活能力显著低于对照组、3-BP 组、TUDCA 组,凋亡率显著高于对照组、3-BP 组、TUDCA 组;3-BP + TUDCA 组细胞中促凋亡相关蛋白 Bax、cleaved-caspase-3 相对表达量显著高于对照组、3-BP 组、TUDCA 组,抑制性凋亡蛋白 Bcl-2 相对表达量显著低于对照组、3-BP 组、TUDCA 组,提示 3-BP 作用于 K562 细胞所引起的内质网应激反应对 K562 细胞发挥了保护作用;3-BP 和内质网应激抑制剂 TUDCA 联合用药则抑制了内质网应激反应,进一步促进了 K562 细胞凋亡,抑制 K562 细胞存活。

综上所述,3-BP 可显著抑制人髓系白血病细胞 K562 的增殖和存活能力,促进 K562 细胞凋亡,并可诱导内质网应激的发生。此外,3-BP 和内质网应激抑制剂 TUDCA 联合用药可增加 3-BP 对 K562 细胞的促凋亡作用,抑制 K562 细胞存活。本研究为临床靶向有氧糖酵解治疗白血病提供了一定的方向和理论依据,也为联合用药治疗 CML 提供了新的策略。

参考文献:

[1] ELSAYED A G, SRIVASTAVA R, JAMIL M O. Treatment-free remission: a new therapeutic goal in chronic myelogenous leukemia [J]. *Curr Oncol Rep*, 2017, 19 (12) : 77.

[2] HEHLMANN R. Chronic myeloid leukemia in 2020 [J]. *Hemasphere*, 2020, 4 (5) : e468.

[3] 曾常茜, 吴思宇. 3-溴丙酮酸抗肿瘤作用及机制研究 [J]. *中国新药杂志*, 2009, 18 (9) : 793-796.

ZENG C Q, WU S Y. Study on the antitumor effect and mechanism of 3-bromopyruvate [J]. *Chin J New Drug*, 2009, 18 (9) : 793-796.

[4] 段园园, 陈梦娇, 杨雪松, 等. 内质网应激信号在姜黄素诱导 Jurkat 细胞凋亡中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42 (3) : 659-662.

- DUAN Y Y, CHEN M J, YANG X S, *et al.* The role of endoplasmic reticulum stress signaling in curcumin-induced apoptosis of Jurkat cells[J]. *Chin J Geront*, 2022, 42 (3): 659-662.
- [5] 邢欣, 魏重操, 周咪咪, 等. 牛磺熊去氧胆酸与熊去氧胆酸治疗非酒精性脂肪性肝病患者疗效和安全性的 Meta 分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(6): 852-855.
- XING X, WEI C C, ZHOU M M, *et al.* Meta-analysis of the efficacy and safety of tauroursodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid in the treatment of patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Pract Hepat*, 2019, 22(6): 852-855.
- [6] 李慧博, 刘爽, 秦又发, 等. 牛磺熊去氧胆酸治疗胆石症有效性、安全性和经济性的卫生技术评估[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(1): 80-86.
- LI H B, LIU S, QIN Y F, *et al.* Hygienic technology evaluation on the efficacy, safety and economy of tauroursodeoxycholic acid in the treatment of cholelithiasis[J]. *Chin J New Drug*, 2021, 30(1): 80-86.
- [7] ZHOU S, YANG J, WANG M W, *et al.* Endoplasmic reticulum stress regulates epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 173-180.
- [8] TYAGI K, MANDAL S, ROY A. Recent advancements in therapeutic targeting of the Warburg effect in refractory ovarian cancer: a promise towards disease remission[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188563.
- [9] SUN L, SUO C, LI S T, *et al.* Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: beyond the Warburg effect[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870(1): 51-66.
- [10] NISHIHASHI K, KAWASHIMA K, NOMURA T, *et al.* Cobalt chloride induces expression and function of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(1): 82-87.
- [11] YANG H J, XU W J, GUAN Y H, *et al.* Expression of Glut-1 and HK-II in pancreatic cancer and their impact on prognosis and FDG accumulation[J]. *Transl Oncol*, 2016, 9(6): 583-591.
- [12] 李莉, 侯志敏. 卵巢癌组织中 miR-125B-5p 通过调控己糖激酶-2 降低肿瘤能量代谢和抑制肿瘤细胞增殖[J]. 癌症, 2021, 40(9): 394-403.
- LI L, HOU Z M. MiR-125B-5p reduces tumor energy metabolism and inhibits tumor cell proliferation by regulating hexokinase-2 in ovarian cancer tissue[J]. *Cancer*, 2021, 40(9): 394-403.
- [13] 张宇, 蒙轩, 王勋. HK2 在肝癌中的差异表达及其对肝癌细胞的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(2): 231-236.
- ZHANG Y, MENG X, WANG X. Differential expression of HK2 in liver cancer and its effect on liver cancer cells[J]. *J Anhui Med Univ*, 2019, 54(2): 231-236.
- [14] 李兰兰, 付生军, 陶燕, 等. HK2 基因表达与泌尿系肿瘤的发生、免疫细胞浸润及预后的相关性分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2021, 42(1): 40-47.
- LI L L, FU S J, TAO Y, *et al.* Correlation analysis of HK2 gene expression with the occurrence, immune cell infiltration and prognosis of urinary tract tumors[J]. *J Jinan Univ (Nat Sci Med Ed)*, 2021, 42(1): 40-47.
- [15] ABBASZADEH H, VALIZADEH A, MAHDAVINIA M, *et al.* 3-bromopyruvate potentiates TRAIL-induced apoptosis in human colon cancer cells through a reactive oxygen species- and caspase-dependent mitochondrial pathway[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97(12): 1176-1184.
- [16] CHONG D, MA L, LIU F, *et al.* Synergistic antitumor effect of 3-bromopyruvate and 5-fluorouracil against human colorectal cancer through cell cycle arrest and induction of apoptosis[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(8): 831-840.
- [17] AGHAEI M, KHANAHMAD H, AGHAEI S, *et al.* The role of Bax in the apoptosis of leishmania-infected macrophages[J]. *Microb Pathog*, 2020, 139: 103892.
- [18] PEÑA-BLANCO A, GARCÍA-SÁEZ A J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis[J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-431.
- [19] JURAVER-GESLIN H A, DURAND B C. Early development of the neural plate: new roles for apoptosis and for one of its main effectors caspase-3[J]. *Genesis*, 2015, 53(2): 203-224.
- [20] LIU Y, TAN Z, YANG Y. Negative feedback and modern anti-cancer strategies targeting the ER stress response[J]. *FEBS Lett*, 2020, 594(24): 4247-4265.
- [21] GARG A D, AGOSTINIS P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2014, 13(3): 474-487.
- [22] DENG T, XIE J, GE H, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid enhanced intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryo developmental competence by ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibiting apoptosis[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2020, 37(1): 119-126.
- [23] ROY A, KUMAR A. ER Stress and unfolded protein response in cancer cachexia[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1929.

(本文编辑: 郭 潇)