

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0599-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250305

BTK抑制剂BGB-3111联合硼替佐米对人多发性骨髓瘤细胞 凋亡的影响及其机制

李洪杰¹, 兰茂卓², 王 潇¹, 冯冉冉¹, 陶燕燕¹, 刘佳庆¹, 孙海柏¹

(1. 天津市海河医院检验科, 天津 300350; 2. 吉林大学第一医院肿瘤精准医学实验室,
吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨泽布替尼 (BGB-3111) 联合硼替佐米 (Btz) 对人多发性骨髓瘤 (MM) 细胞凋亡的影响, 并阐明其可能的机制。**方法:** 体外培养人 MM U266、PS-R、RPMI8226、KMS28-PE、KMS28-BM 和 H929 细胞, Western blotting 法检测不同细胞中布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 蛋白表达水平。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测 0、10、20、30、40 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 处理的 RPMI8226、U266 及 KMS28-BM 细胞存活率。取对数生长期 RPMI8226、U266 和 KMS28-BM 细胞, 分为对照组、BGB-3111 组、Btz 组和 BGB-3111+Btz 组, 采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率, Western blotting 法检测各组细胞中髓细胞白血病因子 1 (MCL-1)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相互作用细胞死亡介质蛋白 (Bim)、磷酸化 Bim (p-Bim)、P65、磷酸化 P65 (p-P65)、肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF) 2 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导蛋白 3 (A20) 蛋白表达水平。U266 细胞分为 A20 过表达组 (A20-OE 组) 和空载对照组 (EV 组), 2 组细胞各分为对照组、BGB-3111 组、BTZ 组和 BGB-3111+BTZ 组, 转染相应质粒, 采用 Western blotting 法检测各组细胞转染效率, 流式细胞术检测过表达 A20 后各组细胞凋亡率。**结果:** Western blotting 法检测, 与 KMS28-BM 细胞比较, U266、RPMI8226 和 H929 细胞中 BTK 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。CCK-8 法检测, 与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组比较, 10、20、30、40 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 RPMI8226 细胞及 U266 细胞存活率均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 20、30、40 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 KMS28-BM 细胞存活率均明显降低 ($P<0.01$)。与 RPMI8226 和 U266 细胞比较, 20、30 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 KMS28-BM 细胞存活率均明显升高 ($P<0.05$), 选取 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 用于后续实验。流式细胞术检测, 与对照组比较, BGB-3111 组、Btz 组和 BGB-3111+Btz 组 RPMI8226 及 U266 细胞凋亡率均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 BGB-3111 组和 Btz 组比较, BGB-3111+Btz 组 RPMI8226 及 U266 细胞凋亡率均明显升高 ($P<0.01$); 与对照组比较, Btz 组和 BGB-3111+Btz 组 KMS28-BM 细胞凋亡率均明显升高 ($P<0.01$); 与 BGB-3111 组比较, BGB-3111+Btz 组 KMS28-BM 细胞凋亡率明显升高 ($P<0.01$); 与 EV 组细胞比较, Btz 组和 BGB-3111+Btz 组中 A20-OE 细胞凋亡率均明显升高 ($P<0.01$)。Western blotting 法检测, 与对照组比较, BGB-3111 组、Btz 组和 BGB-3111+Btz 组 RPMI8226 细胞及 U266 细胞中 Bim 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$), Btz 组和 BGB-3111+Btz 组 RPMI8226 细胞及 U266 细胞中 MCL-1、p-Bim 和 Bcl-2 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$); 与 BGB-3111 组和 Btz 组比较, BGB-3111+Btz 组 RPMI8226 细胞和 U266 细胞中 Bim 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$), MCL-1、p-Bim 和 Bcl-2 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$)。与对照组比较, Btz 组和 BGB-3111+Btz 组 RPMI8226 及 U266 细胞中 p-P65 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$),

[收稿日期] 2024-04-20 [录用日期] 2024-08-26

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20190201163JC)

[作者简介] 李洪杰 (1991—), 女, 吉林省长春市人, 医学硕士, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究。

[通信作者] 孙海柏, 副教授 (E-mail: 18920180082@189.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

TRAF2和A20蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$);与BGB-3111组和Btz组比较,BGB-3111+Btz组RPMI8226和U266细胞中p-P65蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),TRAF2和A20蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。与EV组比较,A20-OE组细胞中A20蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。

结论: BGB-3111通过抑制BTK活性诱导MM细胞发生凋亡,并增强Btz的促凋亡作用,过表达A20增加MM细胞对联合用药的敏感性,其抗肿瘤作用可能与核因子 κ B(NF- κ B)信号通路抑制有关。

[关键词] 多发性骨髓瘤;布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂;硼替佐米;肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3;核因子 κ B

[中图分类号] R733.3 **[文献标志码]** A

Effect of BTK inhibitor BGB-3111 combined with bortezomib on apoptosis of human multiple myeloma cells and its mechanism

LI Hongjie¹, LAN Maozhuo², WANG Xiao¹, FENG Ranran¹, TAO Yanyan¹, LIU Jiaqing¹, SUN Haibai¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Haihe Hospital, Tianjin 300350, China; 2. Laboratory of Cancer Precision Medicine, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of zanubrutinib (BGB-3111) combined with bortezomib (Btz) on the apoptosis of the human multiple myeloma (MM) cells, and to clarify its possible mechanism.

Methods: The human MM cell lines U266, PS-R, RPMI8226, KMS28-PE, KMS28-BM, and H929 were cultured *in vitro*. Western blotting method was used to detect the expression level of Bruton's tyrosine kinase (BTK) protein in various cells; cell counting kit-8(CCK-8) method was used to detect the survival rates of the RPMI8226, U266, and KMS28-BM cells after treated with 0, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111. The RPMI8226, U266, and KMS28-BM cells at the logarithmic growth phase were selected and divided into control group, BGB-3111 group, Btz group, and BGB-3111+Btz group. Flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of myeloid cell leukemia 1 (MCL-1), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-interacting mediator of cell death (Bim), phosphorylated Bim (p-Bim), P65, phosphorylated P65 (p-P65), tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2, and tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (A20) in different kinds of cells. The U266 cells were divided into A20 overexpression group (A20-OE group) and empty vector control group (EV group). Each group was further divided into control group, BGB-3111 group, Btz group, and BGB-3111+Btz group. The corresponding plasmids were transfected; Western blotting method was used to detect the transfection efficiency of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups after over-expression of A20. **Results:** The Western blotting results showed that compared with KMS28-BM cells, the expression levels of BTK protein in the U266, RPMI8226, and H929 cells were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The CCK-8 results showed that compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 group, the survival rates of the RPMI8226 and U266 cells in 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 groups were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the survival rates of the KMS28-BM cells in 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 groups were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with RPMI8226 and U266 cells, the survival rates of the KMS28-BM cells in 20, 30, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 groups were significantly increased ($P<0.05$). Therefore, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 was selected for subsequent experiments. The flow cytometry results showed that compared with control group, the apoptotic rates of the RPMI8226 and U266 cells in BGB-3111 group, Btz group, and BGB-3111+Btz

group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with BGB-3111 group and Btz group, the apoptotic rates of the RPMI8226 and U266 cells in BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with control group, the apoptotic rates of the KMS28-BM cells in Btz group and BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with BGB-3111 group, the apoptotic rate of the KMS28-BM cells in BGB-3111+Btz group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with EV group, the apoptotic rates of the cells in A20-OE group in Btz group and BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Bim protein in the RPMI8226 and U266 cells in BGB-3111 group, Btz group, and BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of MCL-1, p-Bim, and Bcl-2 proteins in the RPMI8226 and U266 cells in Btz group and BGB-3111+Btz group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with BGB-3111 group and Btz group, the expression levels of Bim protein in the RPMI8226 and U266 cells in BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of MCL-1, p-Bim, and Bcl-2 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the expression levels of p-P65 protein in the RPMI8226 and U266 cells in Btz group and BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of TRAF2 and A20 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with BGB-3111 group and Btz group, the expression levels of p-P65 protein in the RPMI8226 and U266 cells in BGB-3111+Btz group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of TRAF2 and A20 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). The flow cytometry results showed that compared with EV group, the expression level of A20 protein in A20-OE group cells was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** BGB-3111 induces apoptosis in the MM cells by inhibiting BTK activity and enhances the pro-apoptotic effect of Btz. Over-expression of A20 increases the sensitivity of the MM cells to the combined treatment. The antitumor effect may be related to the inhibition of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway.

KEYWORDS Multiple myeloma; Bruton's tyrosine kinase inhibitor; Bortezomib; Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3; Nuclear factor kappa B

多发性骨髓瘤 (multiplemyeloma, MM) 是一种起源于骨髓中终末分化浆细胞的恶性肿瘤, 位居血液系统恶性肿瘤发病率的第 2 位^[1-2]。蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (bortezomib, Btz) 能够提高 MM 患者生存率, 但大部分患者仍然无法治愈, 主要是由于患者对 Btz 产生了获得性耐药, 因此迫切需要寻找更为有效的治疗方法提高患者生存率^[3]。Btz 在 MM 中的主要作用机制是抑制 20S 蛋白水解核心的凝乳蛋白酶样位点, 进而发挥多种作用, 如阻断核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活、阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡等^[4]。VO 等^[5]研究发现: 至少约 45% MM 患者存在 NF- κ B 信号通路的改变, 而肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导蛋白 3 (TNF- α -induced protein 3, A20) 是 NF- κ B 信号通路的下游靶基因, 具有修饰泛素并调节 NF- κ B 信号通路负反馈信号的诱导酶, 能够负反馈抑制 NF- κ B 信号通路^[6-7]。

A20 是多种癌症的关键调节因子, 其在浸润性

乳腺癌中表达上调, 敲除 A20 会增加乳腺癌细胞对放疗和化疗的敏感性^[8], 但在胶质瘤^[9]、肝细胞癌^[10]、低分化头颈癌和未分化鼻咽癌^[11]等实体肿瘤中起非致瘤作用。A20 也是 B 细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤中易缺失及失活的肿瘤抑制因子^[12], 其在肿瘤中的功能依赖于细胞类型。

MM 患者具有特殊的骨髓微环境, 布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 是一种胞质酪氨酸激酶, 对 B 淋巴瘤的增殖与肿瘤微环境中各成分的关联性较为重要, 在 B 淋巴细胞发育、分化和 B 细胞抗原受体 (B cell antigen receptor, BCR) 信号传导中发挥重要作用^[13-14]。2019 年 11 月, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准泽布替尼 (zanubrutinib, BGB-3111) 上市, 其作为 BTK 的二代选择性抑制剂对 BTK 的抑制表现出更高的选择性和更强的效果, 可以抑制多种慢性淋巴瘤细胞白血病 (chronic lymphoma leukemia, CLL) 和弥

慢性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell Lymphoma, DLBCL) 细胞增殖^[15]。在 MM 中联合应用 Btz 和 BGB-3111 对 MM 细胞凋亡的影响及其机制的报道较少。因此,本研究探讨 BGB-3111 和 Btz 联合用药对 MM 细胞凋亡率、凋亡相关蛋白和 NF- κ B 信号通路相关蛋白的作用,分析过表达 A20 后人 MM 细胞的凋亡情况及其可能的作用机制,为 MM 的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人 MM 细胞 U266 (野生型,对 Btz 敏感细胞)、PS-R (对 Btz 耐药的 U266 细胞)、RPMI8226、KMS28-PE、KMS28-BM、H929 和 HEK293T 细胞均由吉林大学第一医院肿瘤精准医学实验室提供。RPMI-1640 培养液、胎牛血清和青-链霉素双抗 (美国 Gibico 公司), Annexin V -FITC/PI 双染流式试剂 (天津三箭生物技术股份有限公司), BGB-3111 (德国 Sigma 公司), Btz (美国 Selleck 公司), 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (德国 Merck 公司), 质粒提取试剂盒 (德国 QIAGEN 公司), LipofectamineTM3000 和 Opti-MEM (美国 Thermo 公司), psPAX2 和 pMD2. G (美国 Addgene 公司), BTK 抗体、GAPDH、 β -Tubulin、髓细胞白血病因子 1 (myeloid cell leukemin-1, MCL-1)、P65/磷酸化 P65 (phosphorylated P65, p-P65)、肿瘤坏死因子受体相关因子 (TNF receptor-associated factor, TRAF) 2、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相互作用细胞死亡介质蛋白 (Bcl-2 interaction mediator of cell death, Bim) /磷酸化 Bim (phosphorylated Bim, p-Bim) (位点为 Ser69) (美国 CST 公司)。蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养及分组 U266、PS-R、RPMI8226、KMS28-PE、KMS28-BM 和 H929 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养。取处于对数生长期的 RPMI8226、U266 和 KMS28-BM 细胞,分为对照组、BGB-3111 组 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111)、Btz 组 ($3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Btz) 和 BGB-3111+Btz 组,对照组加入与干预组药物同体积的 DMSO。KMS28-BM 细胞采用相同分组, Btz 作用浓度为 $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。RPMI8226 和 U266 细胞作用 24 h, KMS28-BM 细胞作用 48 h。

1.3 质粒转染和 A20 过表达细胞制备 将配制好的 LB 培养基高压后,取成品菌液 $5 \mu\text{L}$ 加入 5 mL LB 培养基中,于摇床上 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温培养 12~16 h。获取菌液,按质粒提取试剂盒说明书操作,提取质粒进行转染,转染步骤按照 LipofectamineTM 3000 说明书进行。利用 HEK 293T 细胞制备慢病毒包装液,将其培养至可转染的密度后去除旧培养基,采用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 1 次。配置转染液, A 液: $1 \mu\text{g DNA} + 1 \mu\text{g psPAX2} + 0.5 \mu\text{g pMD2. G} + 5 \mu\text{L P3000}$ 加入 $125 \mu\text{L Opti-MEM}$ 中; B 液: $3.75 \mu\text{L Lipofectamine}^{\text{TM}} 3000 + 125 \mu\text{L Opti-MEM}$; 分别混匀于试验台内静置 5 min 后,将 A 液与 B 液混合,室温孵育 15 min。处理好的转染试剂加入培养板中,置于细胞培养箱中培养,48 h 后收病毒液。将过滤好的病毒液与合适密度 U266 细胞悬液按 1:1 比例混合,放入 6 孔细胞培养板中培养 48 h 以上,采用 Western blotting 法检测细胞转染效率,荧光显微镜观察到细胞均带有荧光标记即为成功转染。将转染后的 U266 细胞分为 A20 过表达组 (A20-OE 组) 和空载对照组 (EV 组),2 组细胞各分为对照组、BGB-3111 组、Btz 组和 BGB-3111+Btz 组,处理条件同 U266 细胞,流式细胞术检测细胞凋亡情况,实验重复 3 次。

1.4 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测不同浓度 BGB-3111 处理的 MM 细胞存活率 取处于对数生长期的 RPMI8226、U266 和 KMS28-BM 细胞,调整细胞密度为每孔 3×10^5 个细胞,接种于 96 孔细胞培养板中,分别给予 0、10、20、30、40 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 处理 24 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,继续孵育 4 h,无菌操作,期间每隔 1 h 取出培养板,震荡 5 min。采用酶标仪于波长 450 nm 处测定吸光度 (A) 值,实验重复 3 次。细胞存活率 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.5 Annexin V -FITC/PI 双染法检测各组 MM 细胞凋亡率 细胞计数后以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种于 12 孔细胞培养板中,分组处理后收集细胞,于室温 $1500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后,冷 PBS 缓冲液悬浮细胞,反复洗涤 2 次,弃上清,加入 $300 \mu\text{L}$ $1 \times$ Binding Buffer 悬浮细胞,再加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V -FITC 混匀后,室温避光孵育 15 min,

随后加入 5 μL PI 染色并补加 200 μL 1 \times Binding Buffer, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 最后采用 FlowJo V7.6 软件分析数据, 实验重复 3 次。其中, Annexin V⁺PI⁻代表早期凋亡细胞群, Annexin V⁺PI⁺代表晚期凋亡细胞群。细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数 \times 100%。

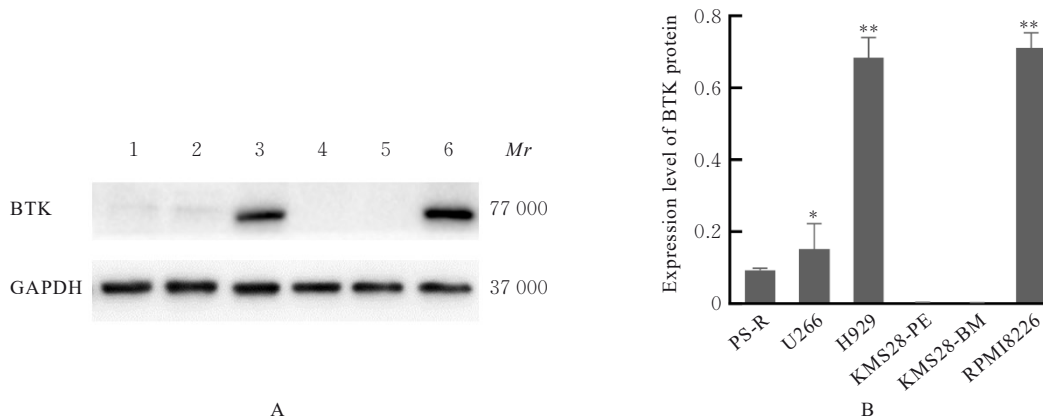
1.6 Western blotting 法检测各组 MM 细胞中凋亡相关蛋白表达水平 收集处于对数生长期的 PS-R、U266、H929、KMS28-PE、KMS28-BM 和 RPMI8226 细胞。使用预冷的 PBS 缓冲液清洗 3 次, RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 加入蛋白质上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。恒压 200 V、45 min SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 中室温封闭 1 h, 根据 BTK、MCL-1、Bim、p-Bim、P65、p-P65、TRAF2、A20 和 Bcl-2 相对分子质量裁膜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, TBST 溶液清洗 3 次后, 相应二抗室温孵育 1 h, TBST 溶液清洗后滴加 ECL 液化学发光, 应用成

像系统采集, Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -Tubulin 为内参, 计算目的蛋白表达水平, 实验重复 3 次。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件和 GraphPad prism10.0 软件进行统计学分析及绘图。各组细胞存活率和细胞凋亡率以及细胞中 MCL-1、Bim、p-Bim、P65、p-P65、TRAF2、A20 和 Bcl-2 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 MM 细胞中 BTK 蛋白表达水平 与 KMS28-BM 细胞比较, U266、RPMI8226 和 H929 细胞中 BTK 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), PS-R 细胞中 BTK 蛋白表达水平升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。KMS28-PE 细胞中不表达 BTK 蛋白。见图 1。



Lane 1: PS-R cells; Lane 2: U266 cells; Lane 3: H929 cells; Lane 4: KMS28-PE cells; Lane 5: KMS28-BM cells; Lane 6: RPMI8226 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with KMS28-BM cells.

图1 6种MM细胞中BTK蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of BTK protein in 6 kinds of MM cells

2.2 不同浓度 BGB-3111 处理的 MM 细胞存活率

与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组比较, 10、20、30、40 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 RPMI8226 及 U266 细胞存活率均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 KMS28-BM 细胞存活率降低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 20、30、40 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 KMS28-BM 细胞存活率均明显降低 ($P<0.01$)。与 RPMI8226 和

U266 细胞比较, 20、30 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 组 KMS28-BM 细胞存活率均明显升高 ($P<0.05$)。见表 1。10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 作用于 RPMI8226、U266 和 KMS28-BM 细胞时, 其对 3 种细胞活性抑制作用较弱, 便于观察联合用药效果, 因此选取 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 用于后续实验。

2.3 各组 MM 细胞凋亡率 与对照组比较,

表1 不同浓度BGB-3111作用后各组MM细胞存活率

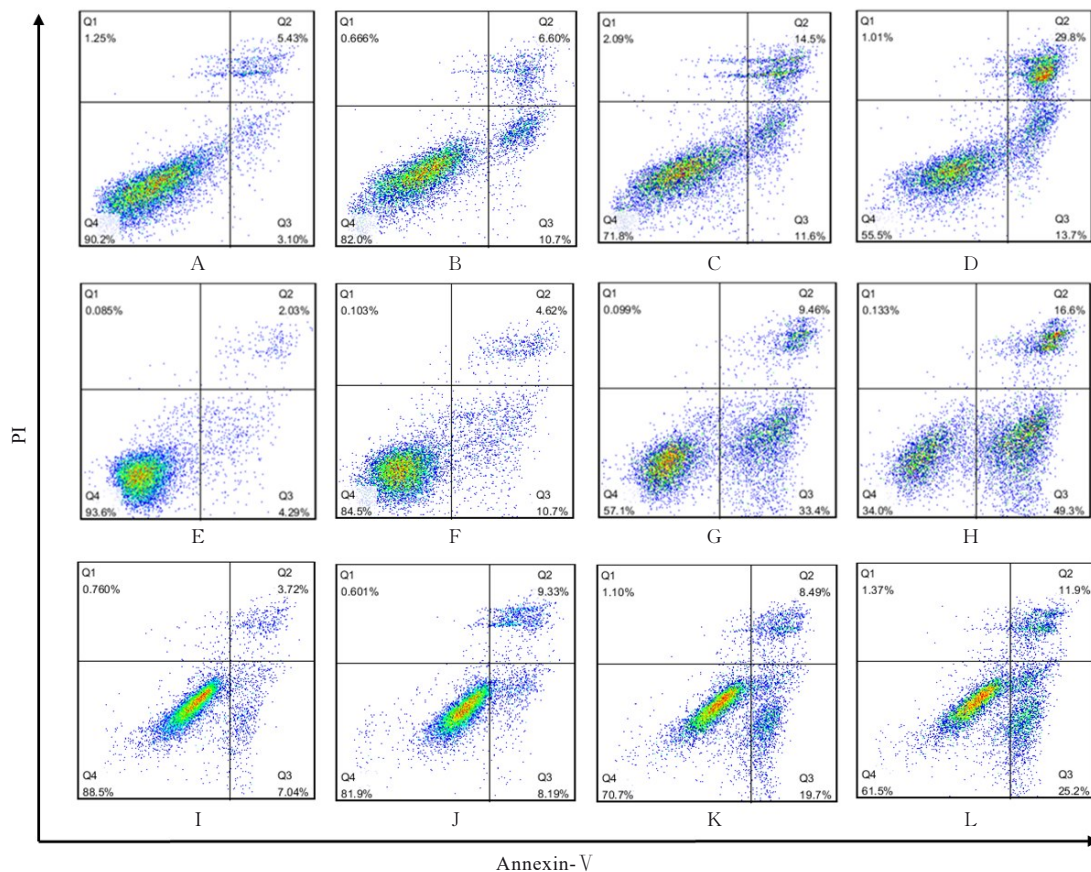
Tab. 1 Survival rates of MM cells in various groups after treated with different concentrations of BGB-3111 ($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Survival rate					
	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-311	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-311	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-311	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-311	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-311	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-311
RPMI8226	91.18 \pm 1.16	83.97 \pm 1.55*	65.57 \pm 2.44**	47.30 \pm 1.63**	32.27 \pm 1.39**	21.51 \pm 6.43**
U266	90.21 \pm 2.49	82.67 \pm 2.86*	69.63 \pm 2.39**	53.67 \pm 0.62**	40.53 \pm 0.55**	27.28 \pm 2.13**
KMS28-BM	89.87 \pm 2.45	85.83 \pm 0.91	72.63 \pm 2.95** Δ #	61.17 \pm 3.20** Δ #	45.00 \pm 4.22** Δ #	24.61 \pm 4.61**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BGB-3111 group; $\Delta P<0.05$ compared with RPMI8226 cells; # $P<0.05$ compared with U266 cells.

BGB-3111组、Btz组和BGB-3111+Btz组RPMI8226及U266细胞凋亡率均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与BGB-3111组和Btz组比较,BGB-3111+Btz组RPMI8226和U266细胞凋亡率均明显升高($P<0.01$)。与对照组比较,Btz组和BGB-3111+Btz组KMS28-BM细胞凋亡率均明显升高($P<0.01$),BGB-3111组KMS28-BM细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$);与

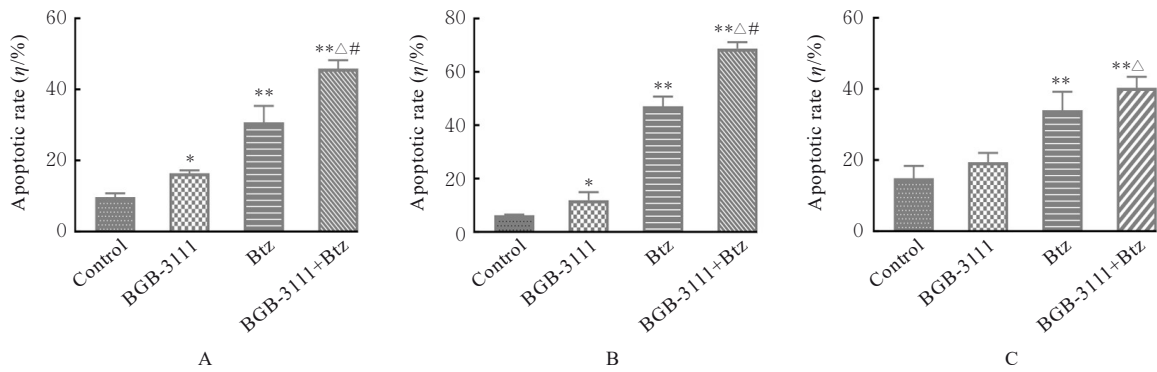
BGB-3111组比较,BGB-3111+Btz组KMS28-BM细胞凋亡率明显升高($P<0.01$);与Btz组比较,BGB-3111+Btz组KMS28-BM细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。与EV组细胞比较,Btz组和BGB-3111+Btz组A20-OE细胞凋亡率均明显升高($P<0.01$);BGB-3111组A20-OE细胞和EV细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2~5。



A—D: RPMI8226 cells group, 24 h; E—H: U266 cells group, 24 h; I—L: KMS28-BM cells group, 48 h; A, E, I: Control group; B, F, J: BGB-3111 group; C, G, K: Btz group; D, H, L: BGB-3111+Btz group.

图2 流式细胞术检测各组MM细胞凋亡情况

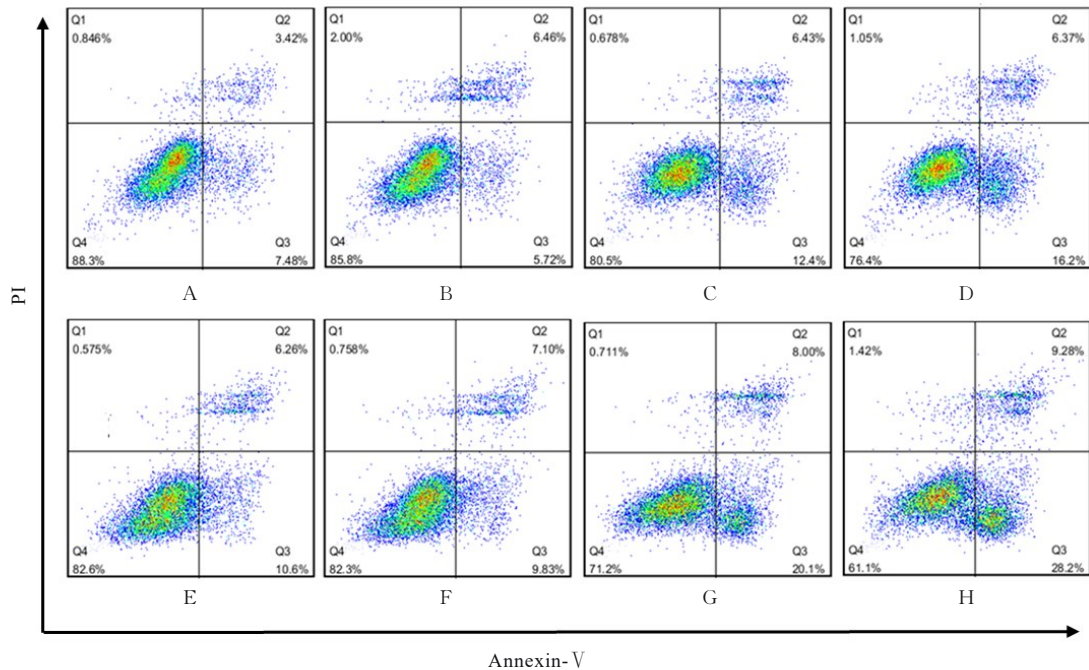
Fig. 2 Apoptosis of MM cells in various groups detected by flow cytometry



A: RPMI8226 cells; B: U266 cells; C: KMS28-BM cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group; $\triangle P < 0.01$ compared with BGB-3111 group; # $P < 0.01$ compared with Btz group.

图3 各组MM细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptotic rates of MM cells in various groups



A—D: EV cells; E—H: A20-OE cells; A, E: Control group; B, F: BGB-3111 group; C, G: Btz group; D, H: BGB-3111+Btz group.

图4 流式细胞术检测BGB-3111和Btz作用后各组EV及A20-OE细胞凋亡情况

Fig. 4 Apoptosis of EV and A20-OE cells after treated with BGB-3111 and Btz detected by flow cytometry

2.4 各组MM细胞中MCL-1、p-Bim、Bim和Bcl-2蛋白表达水平 与对照组比较, BGB-3111组、Btz组和BGB-3111+Btz组RPMI8226及U266细胞中Bim蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), Btz组和BGB-3111+Btz组RPMI8226及U266细胞中MCL-1、p-Bim以及Bcl-2蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), BGB-3111组RPMI8226和U266细胞中MCL-1、p-Bim及Bcl-2蛋白表达水平差异

均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与BGB-3111组和Btz组比较, BGB-3111+Btz组RPMI8226和U266细胞中Bim蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), MCL-1、p-Bim和Bcl-2蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见图6。

2.5 各组MM细胞中P65、p-P65、TRAF2和A20蛋白表达水平 与对照组比较, Btz组和BGB-3111+Btz组RPMI8226及U266细胞中p-P65蛋白表达水

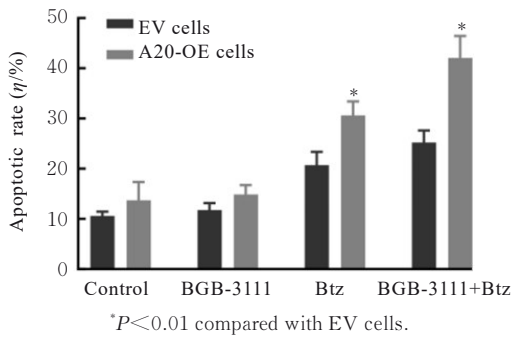


图5 各组EV和A20-OE细胞凋亡率

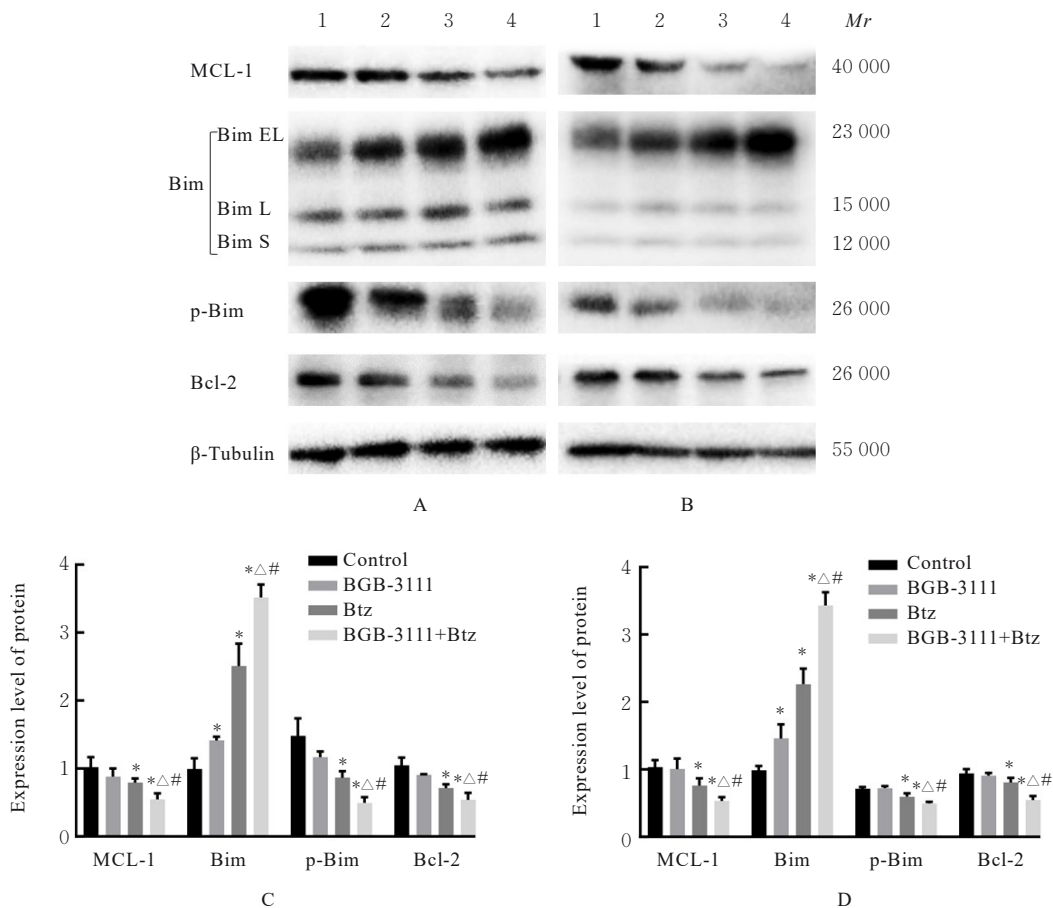
Fig. 5 Apoptotic rates of EV and A20-OE cells in various groups

平均明显升高 ($P < 0.05$), TRAF2和A20蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), BGB-3111组RPMI8226和U266细胞中P65、p-P65、TRAF2和A20蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);

与BGB-3111组和Btz组比较, BGB-3111+Btz组RPMI8226和U266细胞中p-P65蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), TRAF2和A20蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 各组RPMI8226和U266细胞中P65蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与EV组比较, A20-OE组细胞中A20蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见图7和8。

3 讨论

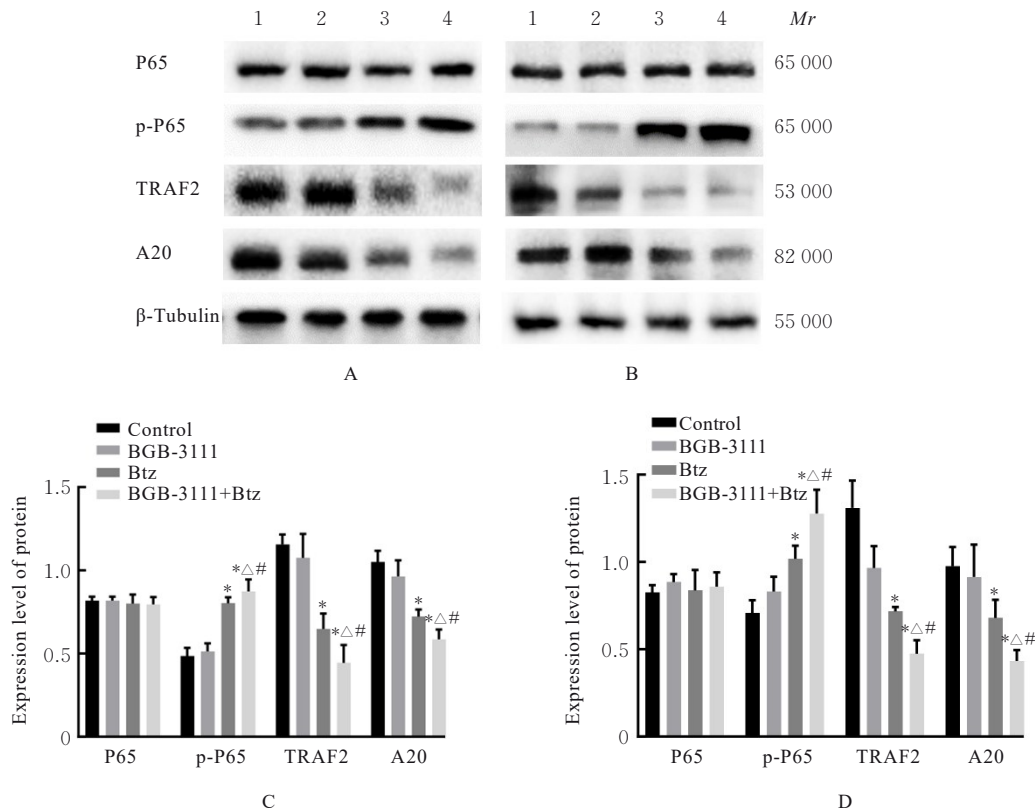
BTK属于胞质酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine-protein kinase, TEC) 家族, 是人类第二大非受体激酶家族, 除T淋巴细胞外, 其在造血系统的所有细胞中均有表达^[16]。BCR信号通路上游Src家族激酶激活BTK后, 反馈至磷酸化磷脂酶C γ (phosphorylated phospholipase-C γ , PLC γ), 导致钙离子动员和NF- κ B/丝裂原活化蛋白激酶



A, C: RPMI8226 cells; B, D: U266 cells; A, B: Electrophoregrams (Lane 1: Control group; Lane 2: BGB-3111 group; Lane 3: Btz group; Lane 4: BGB-3111+Btz group); C, D: Histograms (* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with BGB-3111 group; # $P < 0.05$ compared with Btz group).

图6 各组MM细胞中MCL-1、Bim、p-Bim和Bcl-2蛋白表达电泳图及直条图

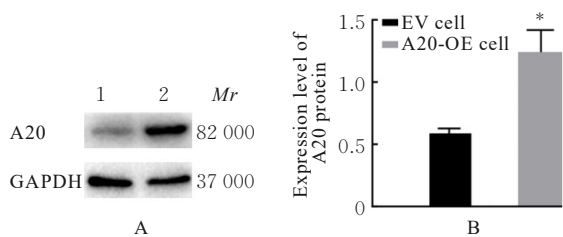
Fig. 6 Electrophoregrams and histograms of expressions of MCL-1, Bim, p-Bim, and Bcl-2 proteins in MM cells in various groups



A, C: RPMI8226 cells; B, D: U266 cells; A—B: Electrophoregrams (Lane 1: Control group; Lane 2: BGB-3111 group; Lane 3: Btz group; Lane 4: BGB-3111+Btz group); C—D: Histograms (* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with BGB-3111 group; # $P < 0.05$ compared with Btz group).

图7 各组MM细胞中P65、p-P65、TRAF2和A20蛋白表达电泳图及直条图

Fig. 7 Electrophoregrams and histograms of expressions of P65, p-P65, TRAF2, and A20 proteins in MM cells in various groups



Lane 1: EV group; Lane 2: A20-OE group. * $P < 0.01$ compared with EV group.

图8 2组MM细胞中A20蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of A20 protein in MM cells in two groups

(mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路激活, 相关信号促进增殖和存活相关基因的表达^[10-11]。目前靶向BTK治疗血液肿瘤多集中于部分淋巴瘤的治疗。本研究结果显示: RPMI8226和H929细胞高表达BTK蛋白, U266和PS-R细胞低

表达BTK蛋白, KMS28-PE和KMS28-BM细胞不表达BTK蛋白, 且不表达BTK蛋白的MM细胞对BGB-3111的抑制作用不敏感。流式细胞术检测结果显示: 在表达BTK蛋白的MM细胞中, BGB-3111能够增强Btz的促凋亡作用, 而在不表达BTK蛋白的MM细胞中联合用药效果较差, 几乎全部为Btz单药的作用, 提示MM细胞中BTK蛋白表达水平对BGB-3111的效应起重要作用。共价BTK抑制剂依鲁替尼能够有效抑制BCR信号, 在CLL小鼠模型中产生明显的抗肿瘤反应, 尽管存在这种靶向抑制机制, 但不良反应较多, 而且逐渐出现耐药^[17]。BGB-3111具有更高的选择性, 同时极大地降低了脱靶效应, 不良反应少^[18], 与Btz的联合应用于淋巴瘤的治疗中具有潜在的优势, 然而在MM中的作用机制尚未完全阐明。

为进一步研究联合用药对MM细胞凋亡的影响及其机制, 本研究采用Western blotting法检测凋

亡相关蛋白表达情况,结果显示:与单药组比较,联合用药组细胞中MCL-1、Bcl-2和p-Bim蛋白表达水平明显降低,Bim蛋白表达水平明显升高,提示BGB-3111通过抑制Bim的磷酸化,增加其蛋白稳定性,使MM细胞对Btz诱导的凋亡更加敏感。Btz可通过下调MCL-1诱导凋亡,可能是两药联合作用的机制之一,抗凋亡蛋白Bcl-2下调提示MM细胞的抗凋亡作用减弱,BGB-3111与Btz联合应用效果更佳,可进一步促进MM细胞凋亡,与贾晓辉^[19]在套细胞淋巴瘤中的研究结果一致。

尽管慢性淋巴瘤和MM代表的肿瘤分别处于B淋巴细胞分化的不同阶段,但其在病理上均与NF- κ B异常活化有关^[20]。NF- κ B通常以二聚体形式存在,受到炎症刺激后 κ B抑制蛋白a(inhibitor of kappa B alpha, I κ Ba)被 κ B抑制蛋白(inhibitor of kappa B, I κ B)激酶磷酸化,磷酸化I κ B入核调控靶基因的转录,促进肿瘤发生^[21]。Btz抑制泛素化I κ Ba通过蛋白酶体降解,I κ Ba则通过结合P65,使其无法入核发挥转录因子作用,导致P65和p-P65滞留于胞质,从而无法发挥转录因子的作用^[21-22]。本研究结果显示:与单药组比较,联合用药组p-P65蛋白表达水平升高;在Btz和联合用药的作用下A20蛋白表达下调,可能是因NF- κ B信号通路的抑制导致其表达下调。TRAF2作为NF- κ B途径的上游调节分子,其下调反映出NF- κ B途径被抑制。

在NF- κ B信号通路的启动过程中,各种炎症因子的作用导致肿瘤坏死因子受体相关因子家族(tumor necrosis factor receptor associated factors, TRAFs)向受体募集。其中TRAF2通过一个蛋白复合物募集,该蛋白复合物由多个接头蛋白组成,包括受体相互作用蛋白1(receptor interacting protein 1, RIP1)、泛素连接酶凋亡抑制蛋白(cellular inhibitor of apoptosis protein, cIAP)1和cIAP2。cIAP促进在RIP1和TRAF2上及在自身上进行赖氨酸(lysine, Lys)63连接的多泛素化,Lys63连接的多泛素链与NF- κ B的必须调节分子NEMO、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤易位蛋白(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein, MALT1)等分子结合,进一步激活NF- κ B信号通路传导,A20通过从各种靶分子上切割Lys63连接的多泛素链来负性调节NF- κ B信号通路^[23-24]。SCHMITZ等^[25]研究发现:A20是霍奇金淋巴瘤和原发性纵隔B细胞淋巴瘤的肿瘤

抑制基因。异常NF- κ B活化的一个基本特性是抑制凋亡反应。研究^[26]显示:稳定表达微小RNA(microRNA, miR)-125a/b的DLBCL更能抵抗凋亡作用,而A20表达的重建恢复了miR-125a/b表达产生的抗凋亡特性。在幽门螺旋杆菌感染的胃上皮细胞中,A20负调控NF- κ B信号通路并破坏抗凋亡基因的表达^[27]。本研究结果显示:在A20过表达的U266细胞中,Btz组和BGB-3111+Btz组细胞凋亡率明显升高,与LORK等^[23]和SCHMITZ等^[25]的研究结果一致。

综上所述,BGB-3111通过抑制BTK活性诱导MM细胞发生凋亡,并增强Btz的促凋亡作用,过表达A20增加MM细胞对联合用药的敏感性,其抗肿瘤作用可能与抑制NF- κ B信号通路有关。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李洪杰参与研究选题、实验设计、数据分析和论文撰写,兰茂卓参与实验数据统计,王潇和冯冉冉参与数据收集,陶燕燕和刘佳庆参与数据分析,孙海柏参与论文指导和审校。

[参考文献]

- [1] HANAMURA I. Multiple myeloma with high-risk cytogenetics and its treatment approach [J]. *Int J Hematol*, 2022, 115(6): 762-777.
- [2] GULLA A, MORELLI E, SAMUR M K, et al. Bortezomib induces anti-multiple myeloma immune response mediated by cGAS/STING pathway activation[J]. *Blood Cancer Discov*, 2021, 2(5): 468-483.
- [3] 王亚茹, 马艳萍. 多发性骨髓瘤替佐米耐药机制的研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2023, 31(5): 1584-1587.
- [4] BAI Y, SU X. Updates to the drug-resistant mechanism of proteasome inhibitors in multiple myeloma [J]. *Asia-Pac J Clin Oncology*, 2021, 17(1): 29-35.
- [5] VO J N, WU Y M, MISHLER J, et al. The genetic heterogeneity and drug resistance mechanisms of relapsed refractory multiple myeloma[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3750.
- [6] ZHOU Q, WANG H Y, SCHWARTZ D M, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(1): 67-73.
- [7] ELBAZ O, SHAAT R M, GHAFFAR H AABD EL,

- et al. The prevalence of MYD88 L265P and TNFAIP3 mutations and their correlations with clinico-hematological profile in Egyptian patients with diffuse large B cell lymphoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2023, 24(7): 2485-2491.
- [8] YANG C Z, ZANG W C, TANG Z F, et al. A20/TNFAIP3 regulates the DNA damage response and mediates tumor cell resistance to DNA-damaging therapy [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4): 1069-1082.
- [9] GUO Q D, DONG H, LIU X N, et al. A20 is overexpressed in glioma cells and may serve as a potential therapeutic target [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(7): 733-741.
- [10] DONG B F, LV G Y, WANG Q, et al. Targeting A20 enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(2): 433-438.
- [11] CODD J D, SALISBURY J R, PACKHAM G, et al. A20 RNA expression is associated with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma and poorly differentiated head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Pathol*, 1999, 187(5): 549-555.
- [12] MALYNN B A, MA A. A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(5): 977-980.
- [13] AMMANN E M, SHANAFELT T D, WRIGHT K B, et al. Updating survival estimates in patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) based on treatment-free interval length [J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(3): 643-649.
- [14] MOHAMED A J, YU L, BÄCKESJÖ C M, et al. Bruton's tyrosine kinase (btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain [J]. *Immunol Rev*, 2009, 228(1): 58-73.
- [15] THOMPSON P A, BURGER J A. Bruton's tyrosine kinase inhibitors: first and second generation agents for patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(1): 31-42.
- [16] SMITH C I, BASKIN B, HUMIRE-GREIFF P, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, *BTK* is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells [J]. *J Immunol*, 1994, 152(2): 557-565.
- [17] HERMANSEM, MONTRAVETA A, NIEMANN C U, et al. The bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor acalabrutinib demonstrates potent on-target effects and efficacy in two mouse models of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(11): 2831-2841.
- [18] WU J J, LIU C, TSUI S T, et al. Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 80.
- [19] 贾晓辉. BTK在套细胞淋巴瘤中表达的临床意义及其抑制剂BGB-3111联合硼替佐米的协同抗肿瘤效应 [D]. 天津: 天津医科大学, 2017.
- [20] BURLEY T A, KENNEDY E, BROAD G, et al. Targeting the non-canonical NF- κ B pathway in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(6): 1489.
- [21] KALTSCHMIDT B, WITTE K E, GREINER J F W, et al. Targeting NF- κ B signaling in cancer stem cells: a narrative review [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 261.
- [22] ANDERSON K C. Proteasome inhibitors in multiple myeloma [J]. *Semin Oncol*, 2009, 36(2 Suppl 1): S20-S26.
- [23] LORK M, VERHELST K, CYLDBEYAERT R, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(7): 1172-1183.
- [24] MOONEY E C, SAHINGUR S E. The ubiquitin system and A20: implications in health and disease [J]. *J Dent Res*, 2021, 100(1): 10-20.
- [25] SCHMITZ R, HANSMANN M L, BOHLE V, et al. *TNFAIP3* (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(5): 981-989.
- [26] KIM S W, RAMASAMY K, BOUAMAR H, et al. microRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(20): 7865-7870.
- [27] LIM M C C, MAUBACH G, BIRKL-TOEGLHOFER A M, et al. A20 undermines alternative NF- κ B activity and expression of anti-apoptotic genes in *Helicobacter pylori* infection [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2): 102.