

学者介绍

Author introduction

上海交通大学医学院

卢敏
研究员、博士生导师
博士

ORCID ID: 0000-0001-6902-3751

卢敏 (1982—)，上海交通大学医学院附属瑞金医院上海血液学研究所研究员、博士生导师。2008 年获浙江大学生物化学研究所及哈佛医学院贝斯以色列女执事医学中心联合培养博士学位。2009—2015 年于牛津大学纳菲尔德临床医学学院路德维格癌症研究所从事博士后研究工作。现任上海交通大学医学院附属瑞金医院上海血液学研究所医学基因组学国家重点实验室秘书长、中国病理生理学会实验血液学青年专业委员会主任委员。

LU Min

Ph.D
Professor,
Doctoral Supervisor

• 长期致力于 *p53* 突变治疗的基础研究以及血液系统肿瘤 *p53* 治疗的临床研究。其链条式研究的长期目标是获得具有我国完全自主知识产权的、临床上市的 *p53* 靶向药物。先后主持牛顿高级学者基金、国家自然科学基金优秀青年科学基金等多个项目。近年来，以第一作者或通信作者于 *Cell*、*Cancer Cell*、*Nat Rev Mol Cell Biol* 等发表论文 30 余篇，以第一发明人申请专利合作协定专利若干项。2017 年获“973 计划”青年科学家专题项目“首席科学家”称号。2016 年入选上海市教育委员会高峰高原学科建设计划。

LU Min born in 1982, professor and doctoral supervisor of Shanghai Institute of Hematology, Ruijin hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. In 2008, he got his joint doctor's degree from Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC) of Harvard Medical School and Institute of Biochemistry, Zhejiang University. From 2009 to 2015, he worked as a postdoctoral research fellow in Nuffield College, Oxford University. Currently, he is secretary-general of State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, and chairman of experimental hematology youth professional committee of Chinese Association of Pathophysiology.

• Prof. LU has long been engaged in the basic research of *p53*

mutation therapy and the clinical research of *p53* therapy for hematologic malignancies. The final goal of the chain research is to obtain *p53* targeted drugs that have completely independent intellectual property rights in China and can be administrated clinically. He has taken charge of several research grants, such as Newton Advanced Fellowship, Outstanding Youth Science Foundation of National Nature Science Foundation of China, and so on. Recently, he has published more than 30 articles as the first author or corresponding author in *Cell*, *Cancer Cell*, and *Nat Rev Mol Cell Biol*, and has applied for a number of patent cooperation treaty (PCT) family patents as the first inventor. He was awarded chief scientist of 973 Program Young Scientist Project in 2017, and enrolled into “Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support” in 2016.



论著·基础研究

3- 羟基 -3- 甲基 - 辅酶 A 合成酶 1 调控 PI3K/AKT 信号通路影响 HL-60 细胞的药物敏感性

贾 妍^{1,2}, 王惠雯¹, 易晋牟¹, 曾 辉^{2#}, 卢 敏^{3#}

1. 中南大学湘雅医院血液科, 长沙 410008; 2. 暨南大学附属第一医院血液科, 广州 510630; 3. 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海血液学研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·探讨 3- 羟基 -3- 甲基 - 辅酶 A 合成酶 1 (3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA synthase 1, HMGCS1) 对于急性髓细胞性白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) HL-60 细胞株药物敏感性的作用机制。**方法**·培养 HL-60 细胞, 分别通过感染阴性对照慢病毒和 HMGCS1 慢病毒构建阴性对照组和 HMGCS1 过表达组细胞株, 设置未作处理的 HL-60 细胞为空白对照组。采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测 3 组细胞中 HMGCS1 mRNA 含量, 并验证 HMGCS1 过表达组细胞株是否构建成功。应用 Western blotting 检测 HMGCS1 对磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 AKT) 信号通路中 AKT 及磷酸化 AKT 表达水平的影响。采用 CCK8 法检测 HMGCS1 及 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY29400 对 HL-60 细胞活力的影响。应用 qPCR 和 Western blotting 检测 LY29400 对 HMGCS1 表达水平的影响。**结果**·与阴性对照组相比, HMGCS1 过表达组细胞中 HMGCS1 mRNA 水平显著增加 ($P=0.000$)。与空白对照组及阴性对照组相比, HMGCS1 过表达组细胞中的磷酸化 AKT 的表达水平明显升高, 而 AKT 的水平则无明显差异。与空白对照组及阴性对照组相比, HMGCS1 可降低阿霉素对细胞活力的影响 ($P=0.003$, $P=0.006$), 而 LY29400 则可抑制由 HMGCS1 产生的作用 ($P=0.000$)。在阴性对照组及过表达组细胞中, 予以 LY29400 干预可降低 HMGCS1 mRNA (均 $P=0.000$) 和蛋白的表达水平。**结论**·HMGCS1 可以降低 HL-60 细胞对化学治疗药物阿霉素的敏感性, 而 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY29400 则可恢复其敏感性。

[关键词] 3- 羟基 -3- 甲基 - 辅酶 A 合成酶 1; 胆固醇代谢; 磷酸酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B 信号通路; 急性髓细胞性白血病

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.09.009 **[中图分类号]** R557.3 **[文献标志码]** A

Effect of the PI3K/AKT signaling pathway regulated by HMGCS1 on drug sensitivity of HL-60 cells

JIA Yan^{1,2}, WANG Hui-wen¹, YI Jin-mou¹, ZENG Hui^{2#}, LU Min^{3#}

1. Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China; 3. Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To explore the mechanism of 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (HMGCS1) on drug sensitivity of acute myelocytic leukemia (AML) HL-60 cells. **Methods**·HL-60 cells were cultured. The negative control group and the HMGCS1 overexpressed group were constructed by infecting the negative control lentivirus and HMGCS1 lentivirus, and the untreated HL-60 cells were set as the blank control group. Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of HMGCS1 mRNA in the 3 groups, and to verify whether the cell lines of the HMGCS1 overexpressed group were successfully constructed. The effect of HMGCS1 on the expression of AKT and phosphorylated AKT (p-AKT) in phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / protein kinase B (PKB / AKT) signaling pathway was detected by Western blotting. CCK8 method was used to detect the effects of HMGCS1 and PI3K/AKT signaling pathway inhibitor LY29400 on the activity of HL-60 cells. The effect of LY29400 on HMGCS1 expression was detected by qPCR and Western blotting. **Results**·Compared with the negative control group, the HMGCS1 mRNA expression was increased significantly in the HMGCS1 overexpressed group ($P=0.000$). Compared with the blank control group and the negative control group, the p-AKT protein level in the HMGCS1 overexpression group was significantly increased, while the AKT expression of the 3 groups was not significantly different. CCK8 method showed that compared with the blank control group and the negative control group, HMGCS1 could reduce the effect of adriamycin on cell viability in the HMGCS1 overexpressed group ($P=0.003$, $P=0.006$), while LY29400 could inhibit the effect produced by HMGCS1 ($P=0.000$). The intervention of LY29400 could reduce the expression levels of HMGCS1 and p-AKT protein and HMGCS1 mRNA (both $P=0.000$) in the negative control group and the blank control group. **Conclusion**·HMGCS1 can reduce the sensitivity of HL-60 cells to chemotherapy drug adriamycin, while PI3K/AKT signaling pathway inhibitor LY29400 can restore its sensitivity.

[Key words] 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (HMGCS1); cholesterol metabolism; phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / protein kinase B (PKB / AKT) signaling pathway (PI3K/AKT); acute myelocytic leukemia (AML)

[基金项目] 国家自然科学基金 (81770184); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20161305) (National Natural Science Foundation of China, 81770184; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20161305)。

[作者简介] 贾 妍 (1992—), 女, 住院医师, 博士生; 电子信箱: jiayan1992@outlook.com。

[通信作者] 曾 辉, 电子信箱: androps2011@hotmail.com。卢 敏, 电子信箱: min.lu@shsmu.edu.cn。# 为共同通信作者。

急性髓细胞性白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 是一种血液系统高发的恶性肿瘤, 具有生存期短、死亡率高等特点, 严重威胁人们的健康和生命。目前阿糖胞苷联合蒽环类药物的使用是 AML 的核心化学治疗 (化疗) 方案^[1-2], 且造血干细胞移植 (hemopoietic stem cell transplantation, HSCT) 可有效根治 AML^[3-4]。然而, 由于化疗后骨髓抑制期机会感染的增加以及 HSCT 后并发症的出现, 大多数患者的预后情况并不乐观^[5]。近年来, 随着对肿瘤发生机制的深入研究, 有关肿瘤细胞在代谢组学方面的改变逐渐成为了白血病研究的热点。甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA 途径) 作为胆固醇代谢的一部分, 是存在于真核生物中的一种重要代谢途径^[6]。在正常细胞中, MVA 途径受到高度调控; 在肿瘤细胞中, 该途径则由多种机制调控而发生失调^[7]。既往研究^[8]发现, 在 AML 和多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 中 MVA 途径可对细胞的增殖和转化发挥调控作用。3-羟基-3-甲基辅酶 A (3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) 还原酶 (HMG-CoA reductase, HMGR) 是 MVA 途径中唯一的限速酶, 3-羟基-3-甲基-辅酶 A 合成酶 1 (3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA synthase 1, *HMGCS1*) 为 HMGR 的上游基因。目前, 越来越多的证据表明, 胆固醇代谢与磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 AKT) 信号通路 (PI3K/AKT 信号通路) 相关联, 两者在肿瘤的发生与发展中均扮演着重要作用。PI3K/AKT 信号通路的激活可引起胆固醇的积累, 从而增强了前列腺癌的增殖能力^[9]; 而 MVA 途径的抑制剂则可通过使 PI3K/AKT 信号通路的传导失活来抑制乳腺癌的增殖^[10]。

在 AML 中, PI3K/AKT/雷帕霉素受体蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路的持续性活化极其常见, 其可在细胞周期、细胞分化、蛋白定位、凋亡与代谢等细胞活动中发挥关键作用, 影响 AML 的耐药与复发^[11]。研究^[12]发现, 在 PI3K/AKT/mTOR 信号通路上调的 AML 患者中, 其无病生存时间及总体生存率均有显著减少。

本研究拟探讨 *HMGCS1* 与 PI3K/AKT 信号通路间的相互作用对 AML HL-60 细胞耐药的影响, 为白血病的治疗及预后提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

HL-60 细胞株购自中南大学细胞中心。RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、双抗 (青、链霉素混合液) 均购自美国 Hyclone 公司, HMGCS1、AKT、磷酸化 AKT (p-AKT) 一抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 兔抗人 GAPDH 多克隆抗体、RIPA 蛋白裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司。CO₂ 细胞培养箱、酶标仪均购自美国 Thermo 公司, 12 孔板、96 孔板均购自美国 Corning 公司, 电泳仪、荧光显微镜均购自美国 Bio-rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 慢病毒感染及稳定转染细胞株构建 *HMGCS1* 慢病毒和阴性对照慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。将 HL-60 细胞接种于装有 8 mL 完全培养基 (89% RPMI 1640、10% FBS 及 1% 双抗) 的 25 cm 培养瓶中, 并置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中静置培养。取复苏后 10 代以内的处于对数生长期的细胞进行实验。将 HL-60 细胞按照 5×10^4 个/mL 接种于 12 孔板, 每孔 1 mL 共接种 3 个孔。依据慢病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 30, 向其中 2 个孔分别加入 *HMGCS1* 慢病毒 (*HMGCS1* 过表达组) 和阴性对照慢病毒 (阴性对照组) 各 7.5 μ L, 另一孔不作处理 (空白对照组)。将感染后的细胞放置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中继续培养 72 h。而后取出 12 孔板并于荧光显微镜下观察。使用含 2 μ mol/L 嘌呤霉素的完全培养基筛选稳定转染的 *HMGCS1* 过表达组及阴性对照组细胞, 用于后续研究。

1.2.2 qPCR 检测 *HMGCS1* mRNA 的表达 分别收集 1×10^6 个上述 3 组细胞, 用 TRIzol (美国 Promega 公司) 及相关试剂提纯细胞中的总 RNA。冰上测量 RNA 的浓度及纯度后, 使用 RNA 反转录试剂盒 (广州市锐博生物科技有限公司) 将 RNA 反转录为 cDNA, 并进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测, 引物序列见表 1。根据 qPCR 获得的溶解曲线和扩增曲线分析结果的可靠性并输出 C_t 值; 以 *GAPDH* 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 *HMGCS1* mRNA 的相对表达水平。

为研究 PI3K/AKT 信号通路与胆固醇代谢中重要基因 *HMGCS1* 之间的关系, 以阴性对照组及 *HMGCS1* 过表达组细胞为研究对象, 用 20 μ mol/L LY294002 处理 2 组细胞后, 抽提总 RNA 并按上述步骤进行 qPCR 分析, 检测 *HMGCS1* mRNA 的表达水平, 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 的引物序列
Tab 1 Primer sequences for qPCR

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>HMGCS1</i>	5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'	5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'	5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

1.2.3 Western blotting 检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达 取上述 3 组处于对数生长期的细胞并置于 EP 管中, 向每管加入 100 μ L RIPA 蛋白裂解液和 1 μ L 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 蛋白酶抑制剂, 轻轻吹打混匀后置于冰上反应 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 10 min, 上清液即为所需蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 \times 上样缓冲液, 于 100 $^{\circ}$ C 水浴中变性 5 min。取 20 μ g 蛋白于 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 转膜后用快速封闭液封闭 15 min, 加入一抗 (抗 HMGCS1、抗 AKT、抗 p-AKT、抗 GAPDH 的工作浓度分别为 1:2 500, 1:1 000, 1:1 500, 1:5 000) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗 (工作浓度为 1:5 000) 室温孵育 1.5 h, 漂洗后进行曝光、显影。

为研究 PI3K/AKT 信号通路与胆固醇代谢中重要基因 *HMGCS1* 之间的关系, 采用不同浓度 (0、10、20、40 μ mol/L) 的 LY294002 处理阴性对照组和 *HMGCS1* 过表达组细胞后, 按上述步骤检测 2 组细胞的蛋白表达水平。

1.2.4 CCK8 检测细胞活力 将上述 3 组细胞分别按照 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔含完全培养基 90 μ L。分别向每孔加入 0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μ mol/L 阿霉素 10 μ L (德国 Biofroxx 公司) 并培养 48 h, 将含有细胞的培养基及加药孔设置为实验孔, 含有细胞的培养基但未加药孔设为对照孔, 不含细胞及药物的培养基孔设为空白孔, 每个浓度设置 3 个复孔。通过 CCK8 试剂盒 (上海七海复泰生物科技有限公司) 检测细胞活力。相对细胞活力 (%) 的计算公式为: (实验孔 - 空白孔) / (对照孔 - 空白孔) \times 100%。

将 *HMGCS1* 过表达组细胞按照 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔含完全培养基 90 μ L, 共接种 2 块 96 孔板。分别向每孔加入 0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μ mol/L 阿霉素 10 μ L, 分为实验孔、对照孔和空白孔 (与上述实验的设置相同), 每个浓度设置 3 个复孔。向其中一块 96 孔板的每孔中加入 0.2 mmol/L 的 LY294002 10 μ L, 设置为实验组; 向另一块 96 孔板的每孔中加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 10 μ L, 设置为对照组。将该 2 组于培养箱中培养 48 h, 采用 CCK8 试剂盒检测细胞活力。相对细胞活力 (%) 的计算公式与上述实验相同。

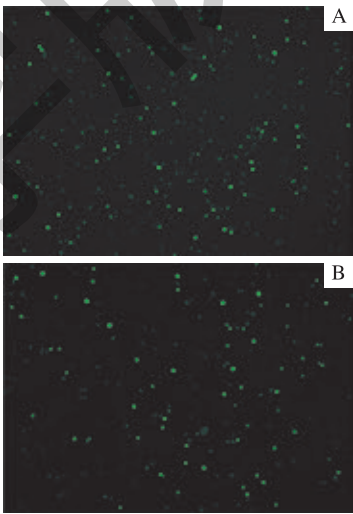
1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件对研究数据进行统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间数据比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

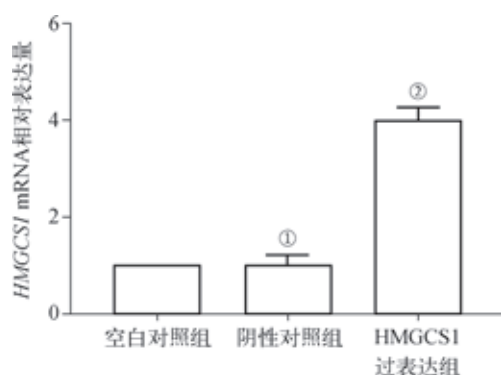
2.1 阴性对照及 HMGCS1 过表达细胞株的构建

本研究通过感染阴性对照慢病毒和 *HMGCS1* 慢病毒构建阴性对照及 *HMGCS1* 过表达细胞株。将感染慢病毒 [带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记] 后的细胞继续培养 72 h 后, 于荧光显微镜下观察发现, 细胞均携带绿色荧光, 继而表明阴性对照及 *HMGCS1* 过表达细胞株构建成功 (图 1)。



注: A. 阴性对照细胞; B. *HMGCS1* 过表达细胞
图 1 荧光显微镜下观察 HL-60 细胞慢病毒感染情况 ($\times 40$)
Fig 1 Observation of HL-60 cells after lentivirus infection by fluorescence microscopy ($\times 40$)

进一步行 qPCR 检测空白对照组、阴性对照组及 *HMGCS1* 过表达组细胞中 *HMGCS1* mRNA 的表达发现, 与空白对照组相比, *HMGCS1* 过表达组的细胞中 *HMGCS1* mRNA 的表达水平较高 (*P* = 0.000), 是前者的 (2.98 ± 0.17) 倍; 而阴性对照组细胞则无明显差异 (图 2)。结果提示 *HMGCS1* 过表达细胞株构建成功。



注: ① $P=0.963$, ② $P=0.000$, 与空白对照组比较

图 2 qPCR 检测 3 组 HL-60 细胞中 *HMGCS1* mRNA 的表达水平
Fig 2 *HMGCS1* mRNA expression of HL-60 cells in the 3 groups by qPCR

2.2 HMGCS1 过表达组细胞中 AKT 及 p-AKT 的表达

为进一步验证 HMGCS1 与 PI3K/AKT 信号通路的关系, 本研究通过 Western blotting 检测 3 组细胞中 AKT、p-AKT 的表达变化。结果显示, 与空白对照组及阴性对照组相比, HMGCS1 过表达组中 p-AKT 的表达水平显著提高, 而相应总蛋白 AKT 水平间则无明显差异 (图 3)。结果提示, HMGCS1 的过表达可能对 p-AKT 的表达存在一定的调控作用。

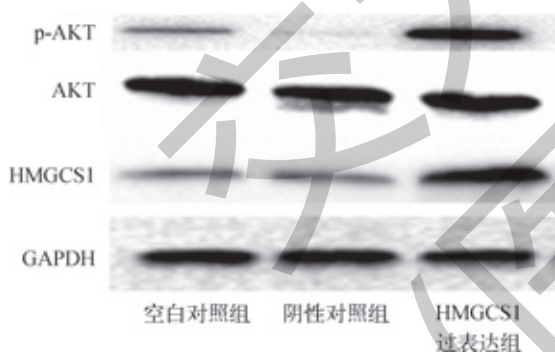


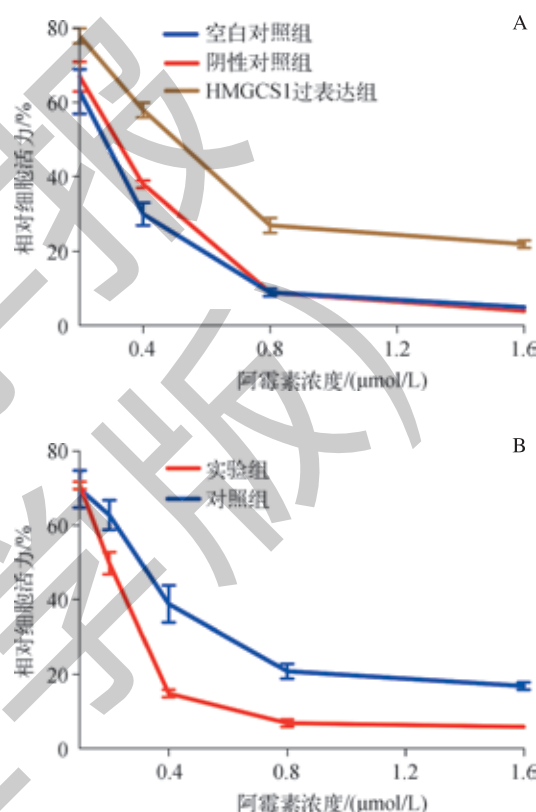
图 3 Western blotting 检测 3 组 HL-60 细胞中 AKT、p-AKT 的表达
Fig 3 AKT and p-AKT expression of HL-60 cells in the 3 groups by Western blotting

2.3 HMGCS1 过表达组细胞的药物敏感性分析

分别用不同终浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 $\mu\text{mol/L}$) 的阿霉素处理 3 组细胞 48 h, 采用 CCK8 法测定细胞活力。结果 (图 4A) 显示, 随着阿霉素浓度的增加, 3 组细胞的活力均呈现下降趋势; 与空白对照组和阴性对照组相比, HMGCS1 过表达组细胞活力下降程度较弱 ($P=0.003$, $P=0.006$), 即保持较高的活力。

随后, 以 HMGCS1 过表达组细胞为研究对象, 向其实验组加入不同终浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 $\mu\text{mol/L}$)

的阿霉素及终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002 处理 48 h, 同时向其对照组加入 PBS 以代替 LY294002, 其余操作与实验组相同。采用 CCK8 法测定实验组及对照组的细胞活力, 结果 (图 4B) 显示, 与对照组相比, 实验组细胞的活力有了显著降低 ($P=0.000$)。上述结果提示, HMGCS1 的过表达可降低 HL-60 细胞对化疗药物的敏感性, 而 PI3K/AKT 信号通路的抑制剂 LY294002 则可恢复其敏感性; 继而推测, HMGCS1 可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路来影响 HL-60 细胞对阿霉素的敏感性。



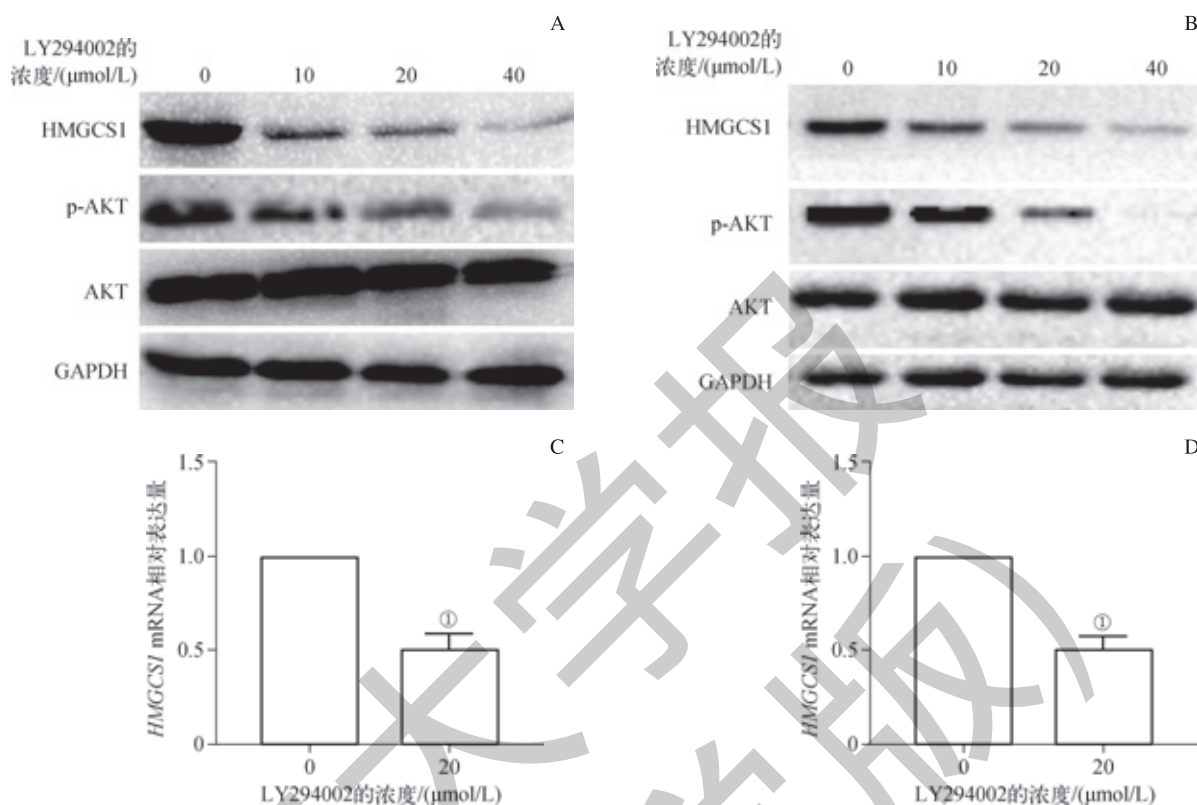
注: A. 分别加入不同终浓度的阿霉素后, 3 组细胞的相对活力检测; B. 不同终浓度阿霉素联合 LY294002 对 HMGCS1 过表达组细胞的相对活力影响
图 4 CCK8 法检测 HL-60 细胞对阿霉素的药物敏感性变化
Fig 4 Sensitivity of HL-60 cells to adriamycin by CCK8

2.4 抑制 PI3K/AKT 信号通路可影响 HMGCS1 的表达

文献^[13]表明, PI3K/AKT 信号通路的抑制剂可通过降低甾醇调节因子结合蛋白 -2 (sterol regulatory element binding protein-2, SREBP-2) 的活性来调节胆固醇代谢。为进一步研究 PI3K/AKT 信号通路与胆固醇代谢中的重要基因 *HMGCS1* 之间的关系, 本研究采用 Western blotting 检测经不同浓度 LY294002 处理后的阴性对照组和 HMGCS1 过表达组细胞的蛋白表达。结果 (图 5A、B) 显示, 随着 LY294002 浓度的增加, HMGCS1 和 p-AKT 的表达量逐渐降低。采用 qPCR 分析经 20 $\mu\text{mol/L}$

LY294002 处理 2 组细胞后的 *HMGCS1* mRNA 的表达, 结果 (图 5C、5D) 显示, 与未经 LY294002 处理组 (浓度为 0) 相比, 2 组细胞中经 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理后

HMGCS1 mRNA 的表达量均较有显著下降 (均 $P=0.000$)。上述结果提示, 抑制 PI3K/AKT 信号通路可以抑制 *HMGCS1* 的表达。



注: A、B. Western blotting 检测不同浓度 LY294002 对阴性对照组 (A) 和 *HMGCS1* 过表达组 (B) 细胞中蛋白表达的影响; C、D. qPCR 检测浓度为 0、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002 对阴性对照组 (C) 和 *HMGCS1* 过表达组 (D) 细胞中 *HMGCS1* mRNA 表达的影响。^① $P=0.000$, 与 LY294002 浓度为 0 比较

图 5 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 对 HL-60 细胞中 *HMGCS1* 表达的影响

Fig 5 Effect of PI3K/AKT signaling pathway inhibitor LY294002 on *HMGCS1* expression in HL-60 cells

3 讨论

为实现快速增殖, 肿瘤细胞可通过改变自身代谢来获取所必需的能量、中间产物以及保持合适的氧化还原态^[14]。目前, 已有相关研究对肿瘤细胞代谢的改变在其快速增殖方面发挥的作用进行报道, 但仅集中在糖代谢和能量平衡这 2 个方面^[15-16]。胆固醇代谢作为另一重要的细胞代谢过程, 其在 AML 细胞中的作用研究也较为有限。

在 AML 细胞的胆固醇合成途径研究中, 其限速酶 HMGCR 受到了广泛关注。他汀类药物作为该限速酶的抑制剂应用于治疗 AML 已进入 III 期临床试验阶段^[17], 但由于 AML 细胞存在一系列负反馈调节机制^[13], 使得他汀类药物对该疾病的治疗效果呈现出较大的个体差异。作为 HMGCR 的上游基因, *HMGCS1* 是胆固醇代谢的关键基因, 可催化乙酰辅酶 A 和乙酰乙酰辅酶 A 生成 HMG-CoA。研究^[14]发现, *HMGCS1* 在 $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ 突变的黑色素

瘤和结直肠癌中能够显著促进肿瘤的增殖, 这一结果提示 *HMGCS1* 可能在肿瘤细胞增殖中发挥重要作用。本研究相关结果显示 (未发表数据), 在 AML 患者中, 相对于完全缓解组, 复发 / 难治组中 *HMGCS1* 的蛋白及 mRNA 水平均有显著增加, 且 *HMGCS1* 高表达患者的血清胆固醇及三酰甘油水平均较 *HMGCS1* 低表达患者高; 且本研究结果显示, *HMGCS1* 过表达组细胞对阿霉素的药物敏感性有所下降, 继而提示 *HMGCS1* 可能在 AML 的耐药机制中发挥重要作用。

PI3K/AKT 信号通路的激活可使肿瘤细胞的生长失去控制, 最终导致肿瘤细胞的转移能力增强及其耐药性的出现。目前有研究^[18]表明, PI3K/AKT 信号通路 with 血液肿瘤、肝癌、胆管癌等多种恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关。LY294002 作为 PI3K/AKT 信号通路的抑制剂, 可通过特异性抑制 AKT 的磷酸化来发挥作用。三氧化二砷 (As_2O_3) 和 LY294002 对 HS-5 骨髓基质细胞共

培养的AML细胞具有协同杀伤作用^[19]。且有研究^[20]发现,LY294002能够抑制慢性髓细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)和AML细胞的增殖,并能够与靶向酪氨酸激酶抑制剂协同作用于CML和AML细胞。本研究结果显示,HMGCS1过表达组细胞对阿霉素的药物敏感性较低,而加入LY294002则可恢复其药物敏感性;继而提示,HMGCS1在白血病中的耐药机制可能与激活PI3K/AKT信号通路相关。

PI3K/AKT信号通路可通过多种机制激活MVA途径。例如,胰岛素、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等对PI3K/AKT信号通路的激活可以使SREBP-1和SREBP-2的mRNA和蛋白的表达增加^[21-23]。由PI3K-AKT-SREBP轴介导的脂质和胆固醇的产生增加可以促进肿瘤细胞的发生和增殖^[24-25]。

相反,抑制MVA途径则可降低PI3K的活性^[26],从而证实PI3K/AKT信号通路与MVA途径之间存在双向调节关系。但目前,上述两者在AML的发生、发展中的具体关系及作用机制尚不明确。本研究通过Western blotting检测HMGCS1过表达组细胞中AKT和p-AKT的表达,结果显示HMGCS1的过表达可以增加p-AKT的表达;在阴性对照组及HMGCS1过表达组细胞中,通过Western blotting和qPCR检测加入LY294002后对细胞蛋白表达的变化,结果显示HMGCS1的mRNA和蛋白表达均有所降低。上述结果均表明,HMGCS1可能与PI3K/AKT信号通路之间存在相互作用。

综上所述,HMGCS1的过表达可降低HL-60细胞对阿霉素的敏感性,其作用机制可能与激活PI3K/AKT信号通路相关。该研究结果或将为进一步探究胆固醇代谢与AML耐药机制之间的关系提供新的思路。

参·考·文·献

- [1] Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(1): 53-61.
- [2] Yang X, Wang J. Precision therapy for acute myeloid leukemia[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 3.
- [3] Kassim AA, Savani BN. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a review[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2017, 10(4): 245-251.
- [4] Takami A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2018, 107(5): 513-518.
- [5] Bartlett AW, Cann MP, Yeoh DK, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in immunocompromised children: an Australian national 10-year review[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2019, 66(4): e27564.
- [6] Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway[J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 244-258.
- [7] Bhardwaj A, Singh H, Trinidad CM, et al. The isomiR-140-3p-regulated mevalonic acid pathway as a potential target for prevention of triple negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1): 150.
- [8] Pandya A, Mullen PJ, Kalkat M, et al. Immediate utility of two approved agents to target both the metabolic mevalonate pathway and its restorative feedback loop[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(17): 4772-4782.
- [9] Yue S, Li J, Lee SY, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness[J]. *Cell Metab*, 2014, 19(3): 393-406.
- [10] Wang T, Seah S, Loh X, et al. Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2532-2544.
- [11] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(2): 89-103.
- [12] Martelli AM, Evangelisti C, Follo MY, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(18): 2715-2726.
- [13] Reiner Z. Resistance and intolerance to statins[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014, 24(10): 1057-1066.
- [14] Zhao L, Fan J, Xia S, et al. HMG-CoA synthase1 is a synthetic lethal partner of BRAF^{V600E} in human cancers[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(24): 10142-10152.
- [15] Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3): 391-402.
- [16] Gan B, Hu J, Jiang S, et al. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2010, 468(7324): 701-704.
- [17] Mullen PJ, Yu R, Longo J, et al. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 718-731.
- [18] Zhu AX, Hezel AF. Development of molecularly targeted therapies in biliary tract cancers: reassessing the challenges and opportunities[J]. *Hepatology*, 2011, 53(2): 695-704.
- [19] Chen P, Wu J, Yuan Q, et al. The synergistic killing of AML cells co-cultured with HS-5 bone marrow stromal cells by As₂O₃ and the PI3K/Akt signaling pathway inhibitor LY294002[J]. *Pharmazie*, 2015, 70(5): 322-327.
- [20] Weisberg E, Banerji L, Wright RD, et al. Potentiation of antileukemic therapies by the dual PI3K/PDK-1 inhibitor, BAG956: effects on BCR-ABL- and mutant FLT3-expressing cells[J]. *Blood*, 2008, 111(7): 3723-3734.
- [21] Fleischmann M, Lynedjian PB. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt[J]. *Biochem J*, 2000, 349(Pt 1): 13-17.
- [22] Luu W, Sharpe LJ, Stevenson J, et al. Akt acutely activates the cholesterologenic transcription factor SREBP-2[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2): 458-464.
- [23] Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, et al. PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP[J]. *Oncogene*, 2005, 24(43): 6465-6481.
- [24] Ricoult SJ, Yecies JL, Ben-Sahra I, et al. Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP[J]. *Oncogene*, 2016, 35(10): 1250-1260.
- [25] Yamauchi Y, Furukawa K, Hamamura K, et al. Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14): 4989-4997.
- [26] Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 308-317.

[收稿日期] 2019-01-10

[本文编辑] 邢宇洋

