

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001744

沉默 NUPR1 基因对人多发性骨髓瘤 U266 细胞自噬的影响及机制研究

李星欣, 曾沉思, 杨泽松, 黎安茂, 陈建斌

(重庆医科大学附属第一医院血液科、实验研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨沉默核蛋白 1(nuclear protein 1, NUPR1)对人多发性骨髓瘤 U266 细胞自噬的影响及可能机制。**方法:**以正常人骨髓单个核细胞为对照, 采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测人多发性骨髓瘤 U266 细胞 NUPR1 和自噬相关基因(ATG5 和 Beclin1)mRNA 水平。构建含有靶向抑制 NUPR1 基因表达的小发夹 RNA(small hairpin RNA, shRNA)序列的 NUPR1-shRNA 慢病毒载体, 并将其转染人多发性骨髓瘤 U266 细胞。实验分为未转染组、阴性对照转染组和转染组, qRT-PCR、Western Blot 检测 NUPR1 干扰效果、3 组细胞自噬相关指标(ATG5、Beclin1、P62、LC3 II/LC3 I)及相关通路蛋白(p-AKT/T-AKT、p-mTOR/T-mTOR)的表达; 单丹磺酰戊二胺(monodansylcadaverine, MDC)染色后, 荧光显微镜下观察自噬囊泡的聚集。**结果:**人多发性骨髓瘤 U266 细胞较正常人骨髓单个核细胞及转染组细胞 NUPR1 ($F=7.747, P=0.004$)、Beclin1 ($F=5.548, P=0.013$) 和 ATG5 ($F=4.031, P=0.034$) mRNA 水平明显增高。转染组 NUPR1 ($F=9.798, P=0.013$)、ATG5 ($F=7.017, P=0.027$)、Beclin1 ($F=7.213, P=0.025$) 和 LC3 II/LC3 I ($F=7.040, P=0.027$) 蛋白表达较未转染组和阴性对照转染组明显降低, 而 P62 ($F=52.622, P=0.000$)、p-AKT/T-AKT ($F=6.584, P=0.031$) 和 p-mTOR/T-mTOR ($F=7.950, P=0.021$) 蛋白表达明显增高; 转染组细胞胞质内自噬囊泡聚集明显减少 ($F=12.172, P=0.008$)。**结论:**人多发性骨髓瘤 U266 细胞 NUPR1 高表达, 自噬水平较正常人骨髓单个核细胞高。沉默 NUPR1 可下调 U266 细胞自噬水平。NUPR1 基因可能通过 AKT/mTOR 通路调节 U266 细胞自噬。

【关键词】核蛋白 1; 多发性骨髓瘤; 自噬; AKT/mTOR 信号通路**【中图分类号】**R551.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-12-26

Effect of silencing NUPR1 gene on autophagy in human multiple myeloma U266 cells and its mechanism

Li Xingxin, Zeng Chensi, Yang Zesong, Li Anmao, Chen Jianbin

(Department of Hematology, Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of silencing NUPR1 on autophagy in human multiple myeloma(MM) U266 cells and its possible mechanism. **Methods:** Normal human bone marrow mononuclear cells were taken as control, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA level of NUPR1 and autophagy-related genes(ATG5 and Beclin1) in MM U266 cells. The NUPR1 shRNA lentiviral vector containing the small hairpin RNA(shRNA) targeting NUPR1 gene was constructed and transfected into MM U266 cells. The experiment was divided into parental group, control shRNA-transfected group and NUPR1 shRNA-transfected group. The interference effects of NUPR1, the expression of autophagy related genes(ATG5, Beclin1, P62, LC3 II/LC3 I) and related pathway proteins(p-AKT/T-AKT, p-mTOR/T-mTOR) were detected by qRT-PCR and Western blot. Autophagy was measured by monodansylcadaverine(MDC) under fluorescence microscope. **Results:** The mRNA level of NUPR1 ($F=7.747, P=0.004$), Beclin1 ($F=5.548, P=0.013$) and ATG5 ($F=4.031, P=0.034$) in MM U266 cells were significantly higher than those in normal human bone marrow mononuclear cells and NUPR1 shRNA-transfected group cells. The expression of NUPR1 ($F=9.798, P=0.013$), ATG5 ($F=7.017, P=0.027$), Beclin1 ($F=7.213, P=0.025$) and LC3 II/LC3 I ($F=7.040, P=0.027$) at protein level in NUPR1 shRNA-transfected group was significantly lower than that in parental group and control shRNA-transfected group, while the expression of P62 ($F=52.622, P=0.000$), p-AKT/T-AKT ($F=6.584, P=0.031$) and p-mTOR/T-mTOR ($F=7.950, P=0.021$) was the opposite. Moreover, the downregulation of NUPR1 suppressed autophagy in U266 cells ($F=12.172, P=0.008$). **Conclusion:** The expression of NUPR1 in MM U266 cells is higher than that in normal human bone marrow mononuclear cells. Silencing NUPR1 can down-regulate the autophagy

作者介绍: 李星欣, Email: 695360221@qq.com,

研究方向: 多发性骨髓瘤的发病机制和临床治疗。

通信作者: 陈建斌, Email: cqchenjianbin2007@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.1614.052.html>

(2018-05-25)

of U266 cells. The NUPR1 gene may regulate autophagy in U266 cells through the AKT/mTOR signaling pathway.

【Key words】nuclear protein 1; multiple myeloma; autophagy; AKT/mTOR signaling pathway

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性浆细胞肿瘤,主要表现为浆细胞异常增殖、单克隆免疫球蛋白过表达等^[1]。近年来虽然随着硼替佐米、来那度胺等新治疗药物和自体造血干细胞移植广泛应用,提高了该病的缓解率和长期生存率,但除异基因造血干细胞移植外,迄今该病仍无法治愈。深入探索 MM 发病机制,将有助于拓展其治疗思路。

多项针对 MM 发病机制的研究表明,诱导细胞自噬是 MM 细胞为免受错误折叠蛋白或未折叠蛋白的损害,同时满足自身能量供应需求的一种重要机制^[2]。自噬可以清除 MM 细胞过度合成的一些免疫球蛋白,从而维持内环境稳定,以保护 MM 细胞。有研究显示,MM 细胞基础水平的自噬对于其生存是必需的,若运用药物或基因干扰技术抑制自噬,将促进 MM 细胞死亡^[3]。另一方面,过度诱导自噬也会使 MM 细胞生存能力下降,导致自噬性死亡^[4]。

核蛋白 1(nuclear protein 1, Nupr1)又称 Com1 或 p8,是一种多功能的小分子蛋白质。NUPR1 位于人类基因的第 16 号染色体 p11.2 处,编码 82 个氨基酸多肽,选择性剪接产生 2 个亚型:a 和 b,亚型 a 具有 18 个额外的氨基酸,其功能意义尚不清楚^[5-7]。研究发现 NUPR1 在乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌等多种恶性肿瘤中表达上调^[8]。本课题组前期研究证实 NUPR1 在 MM 细胞中高表达,且敲低 NUPR1 可抑制 U266 细胞的增殖^[9],但具体机制尚不清楚。现有多项研究表明 MM 细胞自噬水平高于正常浆细胞^[10],而自噬可以调控 MM 细胞的增殖、凋亡等。因此,本课题将利用 RNA 干扰技术研究 NUPR1 对骨髓瘤细胞自噬的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 人 MM 细胞株 U266 细胞 由上海仁济医院侯健教授惠赠。

1.1.2 人骨髓单个核细胞 来源于前期研究工作中收集的非血液肿瘤或正常骨髓标本,已提取单个核细胞并保存于 -80 ℃ 冰箱。

1.1.3 实验试剂 人骨髓单个核细胞分离液(天津灏洋公司);慢病毒(吉凯基因);RPMI1640(Sigma Aldrich 公司);胎牛血清(PAN-Biotech GmbH 公司);TRIzol、PCR 试剂盒及 PCR 引物(Takara 公司);蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 Western blot 常规试剂(碧云天生物技术有限公司);PVDF 膜(Milipore 公司);NUPR1 抗体(Novus Biologicals 公司);微

管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein lightchain3, LC3)、总 AKT(total-AKT)、磷酸化 AKT(phospho-AKT, p-AKT)、ATG5 抗体(万类生物科技);自噬相关蛋白 Beclin1、 β 肌动蛋白(β -actin)、总 mTOR(total-mTOR, T-mTOR)、磷酸化 mTOR(phospho-mTOR, p-mTOR)、P62 抗体(Proteintech 公司)。单丹磺酰戊二酸(MDC)染色试剂盒(雷根生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 序列合成及重组慢病毒载体的构建与鉴定 通过 GenBank 检索获取 NUPR1 基因编码序列,根据 shRNA 序列设计原则,通过 BLAST 查询后,确定 NUPR1 基因的特异性 shRNA 干扰序列为 5'-CCAAGCTGCAGAAATTCAGA-3';同时设计无关序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCTACGT-3'。将以上 RNA 序列重组进慢病毒,构建干扰 NUPR1 表达的 NUPR1-shRNA 慢病毒载体和无关序列 shRNA 慢病毒载体。慢病毒载体的构建、慢病毒包装及效价测定均由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。

1.2.2 细胞转染及稳定株筛选 收集处于对数生长期的 U266 细胞,按每孔 5×10^4 个接种细胞于 24 孔板中,将实验细胞分为未转染组、阴性对照转染组和转染组。将无关序列 shRNA 和 NUPR1-shRNA 慢病毒分别感染阴性对照转染组和转染组细胞[感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100],同时加入 Polybrene(5 g/mL)轻轻摇匀,培养 12 h 后更换培养液。转染 72 h 后,观察慢病毒中绿色荧光蛋白的表达情况并测定荧光率。本课题组前期已测定荧光率约 80%^[9]。荧光表达后,用 0.5 mg/L 嘌呤霉素溶液进行筛选,每 1~2 d 换新鲜嘌呤霉素溶液,荧光显微镜下观察荧光表达情况。筛选 2 周后获得稳定转染细胞株。

1.2.3 人骨髓单个核细胞分离 将收集的骨髓标本用 EDTA 抗凝管保存,按人骨髓单个核细胞分离液试剂盒操作步骤提取单个核细胞。

1.2.4 qRT-PCR 收集不同组细胞提取 RNA。按逆转录试剂盒说明,总体系 20 μ L 逆转录,得到各组 cDNA。PCR 反应条件:95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s,共进行 50 个循环。每个样本设置 3 个复孔,实验重复 3 次。相关基因的引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列、产物长度

基因	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
NUPR1	上游:AGGACTTATTCCCGCTGACTGA 下游:TGCCGTGCGTGTCTATTTATTG	194
Beclin1	上游:TTGGCACAATCAATAACTTCAGGC 下游:CCGTAAGGAACAAGTCGGTATCTC	157
ATG5	上游:CACAAGCAACTCTGGATGGGA 下游:CAGCCACAGGACGAAACAGC	175
β -actin	上游:CCACGAACCTACCTCAACTCC 下游:GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT	132

1.2.5 Western blot 检测 收集不同处理组细胞,预冷 PBS 洗 3 次,按照蛋白提取试剂盒说明书步骤提取蛋白,BCA 法

测定蛋白浓度。每组取 30 μg 蛋白质样本进行凝胶电泳,然后转膜、封闭。一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日 TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,化学发光法(ECL)显影,测定灰度值。以 β -actin 作为内参照,实验重复 3 次。

1.2.6 MDC 染色 800 g 离心 5 min 收集不同组细胞,用 1 $\times$ Wash Buffer 清洗细胞 1 次,并重悬细胞,计数并调节细胞浓度至 10^6 个/mL,取 90 μL 细胞悬液至 EP 管中,加入 10 μL MDC Stain,室温避光染色 45 min,收集细胞并用 1 $\times$ Wash Buffer 清洗细胞 2 次,加入 100 μL Collection Buffer 重悬细胞,滴加于载玻片上并加盖玻片,荧光显微镜下观察,并拍照计数。细胞内出现点状染色为阳性表现。

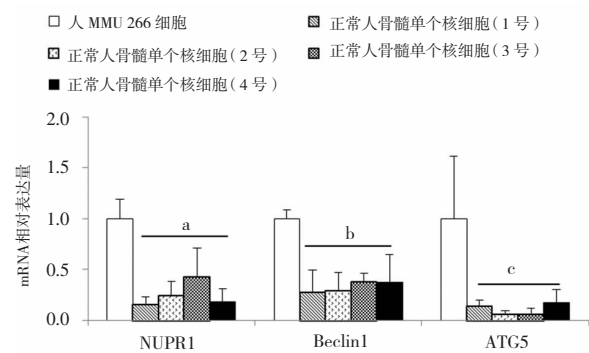
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,各组均数间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 正常人骨髓单个核细胞与 U266 细胞 NUPR1、Beclin1 和 ATG5 mRNA 表达比较

qRT-PCR 结果发现,正常人骨髓单个核细胞 NUPR1、Beclin1 和 ATG5 mRNA 水平均明显低于 U266 细胞。人多发性骨髓瘤 U266 细胞及正常人骨髓单个核细胞 1、2、3、4 号 NUPR1 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.190 、 0.157 ± 0.076 、 0.245 ± 0.141 、 0.429 ± 0.284 、 0.186 ± 0.122 ($F=7.747$, $P=0.004$); Beclin1 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.090 、 0.282 ± 0.213 、 0.292 ± 0.176 、 0.386 ± 0.078 、 0.373 ± 0.273 ($F=5.548$, $P=0.013$); ATG5 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.611 、 0.142 ± 0.059 、 0.064 ± 0.032 、 0.067 ± 0.054 、 0.171 ± 0.129 ($F=4.031$, $P=0.034$) (图 1)。



a: 与人 MM U266 细胞比较, $P=0.001$ (1 号), $P=0.002$ (2 号), $P=0.009$ (3 号), $P=0.001$ (4 号); b: 与人多发性骨髓瘤 U266 细胞比较, $P=0.003$ (1 号), $P=0.003$ (2 号), $P=0.007$ (3 号), $P=0.006$ (4 号); c: 与人多发性骨髓瘤 U266 细胞比较, $P=0.012$ (1 号), $P=0.008$ (2 号), $P=0.008$ (3 号), $P=0.015$ (4 号)

图 1 正常人骨髓单个核细胞、人 MM U266 细胞 NUPR1、Beclin1 及 ATG5 mRNA 相对表达量

2.2 NUPR1-shRNA 慢病毒在 U266 细胞中的转染效果验证

NUPR1-shRNA 慢病毒转染 U266 细胞后,细胞荧光表达较强(图 2)。未转染组、阴性对照转染组和转染组 NUPR1 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.026 、 1.078 ± 0.298 、 0.057 ± 0.039 ($F=21.269$, $P=0.002$)。两两比较,转染组 mRNA 表达较未转染组和阴性对照转染组均明显下调 ($P<0.05$);而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.669$)。未转染组、阴性对照转染组和转染组 NUPR1 蛋白表达量分别为 1.497 ± 0.251 、 1.337 ± 0.298 、 0.483 ± 0.173 ($F=9.798$, $P=0.013$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显下调 ($P=0.006$),较阴性对照转染组也下调 ($P=0.013$);而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.540$) (图 3)。

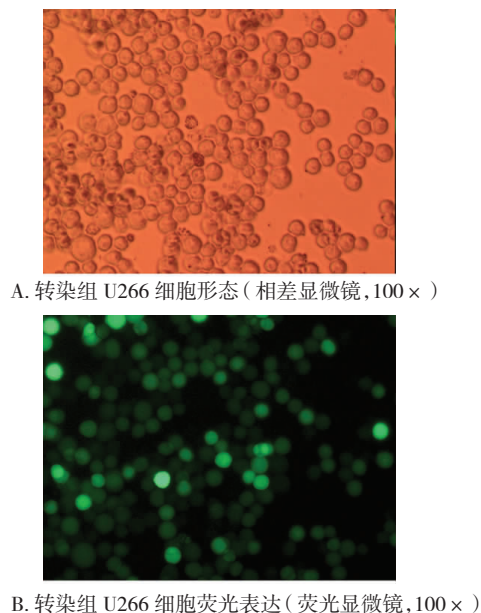
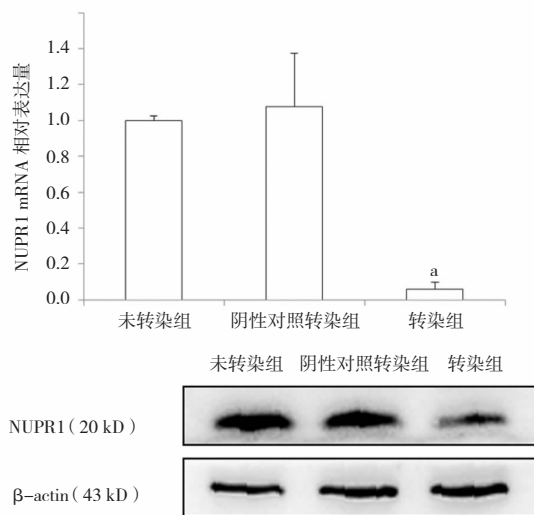


图 2 NUPR1-shRNA 慢病毒转染 U266 细胞

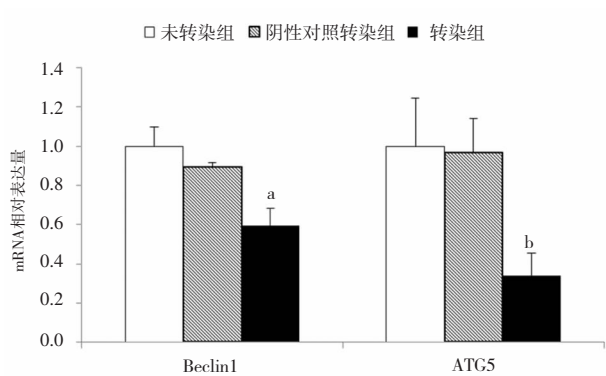


a: 与未转染组比较, $P=0.002$; 与阴性对照转染组比较, $P=0.001$

图 3 qRT-PCR、Western blot 检测各组细胞 NUPR1 mRNA 及蛋白表达

2.3 NUPR1-shRNA 转染 U266 细胞后 ATG5 和 Beclin1 mRNA 表达

qRT-PCR 结果显示,未转染组、阴性对照转染组和转染组 Beclin1 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.098 、 0.889 ± 0.028 、 0.591 ± 0.092 ($F=13.911$, $P=0.006$)。两两比较,转染组 mRNA 表达较未转染组和阴性对照转染组均明显下调 ($P<0.05$);而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.208$);ATG5 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.245 、 0.965 ± 0.174 、 0.335 ± 0.118 ($F=8.153$, $P=0.019$)。两两比较,转染组 mRNA 表达较未转染组和阴性对照转染组均明显下调 ($P<0.05$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.865$) (图 4)。



a: 与未转染组比较, $P=0.002$; 与阴性对照转染组比较, $P=0.010$; b: 与未转染组比较, $P=0.012$; 与阴性对照转染组比较, $P=0.014$

图 4 沉默 NUPR1 对 U266 细胞 Beclin1 和 ATG5 mRNA 表达的影响

2.4 NUPR1-shRNA 转染 U266 细胞后 LC3 II/LC3 I、Beclin1、ATG5 和 P62 蛋白表达

Western blot 结果表明,未转染组、阴性对照转染组和转染组 LC3 II/LC3 I 蛋白表达量分别为 2.503 ± 0.550 、 2.183 ± 0.113 、 1.173 ± 0.309 ($F=7.040$, $P=0.027$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显下调 ($P=0.011$),较阴性对照转染组也下调 ($P=0.034$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.420$);Beclin1 蛋白表达量分别为 2.087 ± 0.453 、 1.787 ± 0.105 、 1.093 ± 0.005 ($F=7.213$, $P=0.025$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显下调 ($P=0.010$),较阴性对照转染组也下调 ($P=0.042$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.306$);ATG5 蛋白表达量分别为 0.938 ± 0.132 、 0.961 ± 0.178 、 0.468 ± 0.129 ($F=7.017$, $P=0.027$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显下调 ($P=0.019$),较阴性对照转染组也下调 ($P=0.016$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.884$);P62 蛋白表达量分别为 0.750 ± 0.163 、 1.01 ± 0.184 、 2.140 ± 0.042 ($F=52.622$, $P=0.000$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显上调 ($P=0.000$),

较阴性对照转染组也上调 ($P=0.000$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.121$) (图 5)。

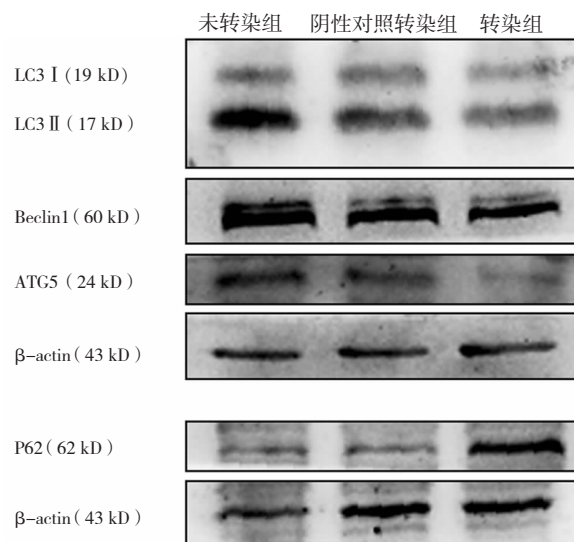


图 5 沉默 NUPR1 对 U266 细胞 LC3 II/LC3 I、ATG5、Beclin1 和 P62 蛋白表达的影响

2.5 MDC 染色观察自噬囊泡聚集

MDC 染色结果显示,未转染组、阴性对照转染组和转染组阳性细胞率分别为 0.022 ± 0.003 、 0.014 ± 0.005 、 0.004 ± 0.003 ($F=12.172$, $P=0.008$)。两两比较,转染组阳性细胞数较未转染组明显减少 ($P=0.003$),较阴性对照转染组也减少 ($P=0.043$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.056$) (图 6)。

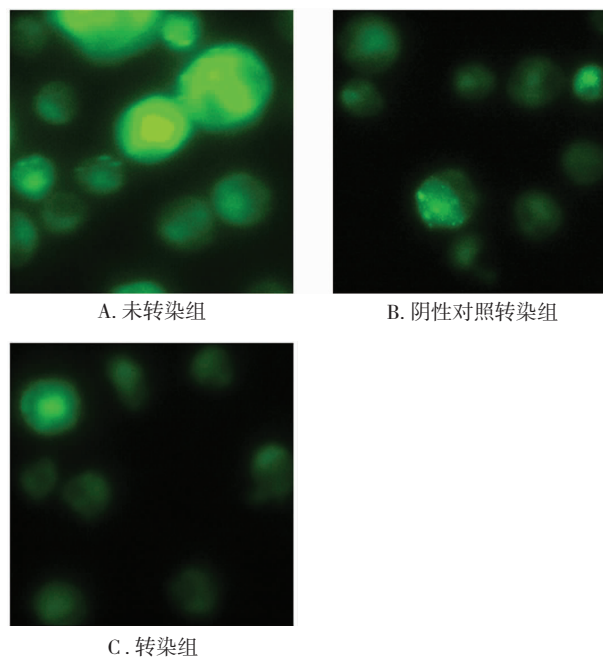


图 6 人 MM U266 细胞 MDC 染色 (400 ×)

2.6 NUPR1-shRNA 转染 U266 细胞后对 AKT/mTOR 通路蛋白的影响

Western blot 结果表明,未转染组、阴性对照转染组和转染组 p-AKT/T-AKT 蛋白表达量分别为 1.284 ± 0.189 、 1.223 ± 0.107 、 1.750 ± 0.167 ($F=6.584$, $P=0.031$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显增加 ($P=0.026$),较阴性对照转染组也增加 ($P=0.016$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.711$); p-mTOR/T-mTOR 蛋白表达量分别为 1.587 ± 0.070 、 1.491 ± 0.042 、 2.014 ± 0.228 ($F=7.950$, $P=0.021$)。两两比较,转染组蛋白表达较未转染组明显增加 ($P=0.022$),较阴性对照转染组也增加 ($P=0.010$),而未转染组与阴性对照转染组差异无统计学意义 ($P=0.530$) (图 7)。

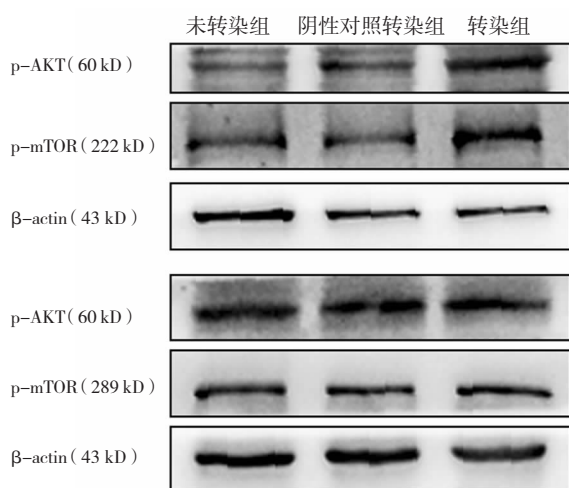


图 7 沉默 NUPR1 对 AKT、mTOR 蛋白表达的影响

3 讨论

自噬是一种高度进化保守的分解代谢过程。由于肿瘤细胞生长失控,线粒体功能异常以及蛋白质错误折叠等,导致肿瘤细胞长期生存于环境和代谢压力之下,自噬成为肿瘤细胞维持自身内环境稳定的重要途径。肿瘤细胞可依靠自噬所产生的代谢底物维持自身的增殖^[11]。很多研究认为自噬具有双向性,既可以抑制肿瘤的发生又可以促进肿瘤的生长^[12]。自噬调控有多种基因和蛋白质参与。LC3 是检测自噬活性的标志性蛋白,LC3 I 定位于前自噬泡和自噬膜表面,当自噬发生时,LC3 I 可被加工转化为 LC3 II,并结合到自噬小体的膜上。在自噬发生的早期阶段,Beclin1 主要通过调控其他自噬蛋白定位到前自噬小体膜上来控制自噬小体的形成^[13]。参与自噬调控的重要基因 ATG5 可与 ATG12 结合,形

成定位于自噬体膜表面的复合物,通过促进自噬体膜的伸展扩张来诱导自噬体的形成^[14]。自噬底物蛋白 P62 通过与泛素化的靶蛋白结合,进而与 LC3 II 形成复合体,最终在自噬溶酶体中被降解^[15]。本实验发现人多发性骨髓瘤 U266 细胞 ATG5 和 Beclin1 mRNA 表达明显高于正常人骨髓单个核细胞。该结果提示人多发性骨髓瘤 U266 细胞自噬水平高于正常人骨髓单个核细胞。

NUPR1 是一种定位于细胞核的生理性蛋白,缺乏稳定的二级结构,能结合多种蛋白质,参与不同的信号转导通路^[16-17],以调控细胞周期、凋亡和自噬等,进而影响肿瘤的生存和进展^[18]。NUPR1 对肿瘤的影响具有双面性。例如,NUPR1 被认为参与促进胰腺导管腺癌和乳腺癌的耐药机制,以及胰腺癌或肝癌细胞 NUPR1 沉默降低了癌细胞迁移和侵袭能力^[7]。相反,NUPR1 也被认为是前列腺癌、卵巢癌和滑膜肉瘤的抑制因子。本实验以正常人骨髓单个核细胞为对照,证实 MM 细胞 NUPR1 高表达,与本课题组前期研究结果一致。有文献报道,NUPR1 参与调节自噬溶酶体加工的晚期阶段,从而诱导体外肿瘤细胞死亡和抑制体内肿瘤发生^[19]。为进一步探究 NUPR1 是否与骨髓瘤细胞自噬存在相关性,本实验采用 NUPR1-shRNA 转染 U266 细胞,下调 NUPR1 的表达。伴随 NUPR1 沉默,Beclin-1、ATG5 mRNA 表达降低,LC3 II/LC3 I、Beclin-1 和 ATG5 蛋白表达下调,而 P62 蛋白表达增加。MDC 染色发现转染组细胞内自噬囊泡聚集较阴性转染组和未转染组明显减少。说明沉默 NUPR1 可下调 U266 细胞自噬水平。

自噬调节的信号通路主要分为 mTOR 依赖型和非依赖型 2 种。mTOR 是 PI3K 相关的丝氨酸/苏氨酸激酶,在调节 MM 的增殖、侵袭和化疗耐药中发挥关键作用,并接受多种上游信号的调控,如 PI3K/AKT、NFκB、JAK/STAT3 等^[20]。有研究报道,缺氧、饥饿等条件下可诱导胰腺癌细胞 NUPR1 表达上调,并通过抑制 AKT/mTOR 通路促进胰腺癌细胞的自噬性死亡^[21]。同时,罗国平等^[22]研究提出 AKT/mTOR 信号通路可能参与 MM U266 细胞自噬调节。于是本实验进一步检测了 AKT/mTOR 信号通路蛋白发现 p-AKT/T-AKT 及 p-mTOR/T-mTOR 蛋白表达增加,即沉默 NUPR1 可上调 AKT 磷酸化水平,使其

下游的 mTOR 磷酸化水平随之增高,而 p-mTOR 被认为是自噬启动阶段的负调节因子,因此可以阻断 U266 细胞自噬流的发生。实验表明 NUPR1 可能通过 AKT/mTOR 通路调控 U266 细胞自噬。

综上所述,本研究表明沉默 NUPR1 在体外可下调多发性骨髓瘤 U266 细胞自噬水平,并初步讨论了其对 AKT/mTOR 信号通路的影响,为深入研究 NUPR1 对多发性骨髓瘤的作用机制提供了新的方向。有研究指出抑制自噬有助于 MM 细胞化疗增敏,与课题组前期研究发现抑制自噬能增加阿霉素细胞毒性的结果一致。沉默 NUPR1 是否通过抑制自噬增加化疗药物敏感性及其精确分子作用机制将是课题组下一步研究内容。

参 考 文 献

- [1] Al-Hujaily EM, Oldham RA, Hari P, et al. Development of Novel Immunotherapies for Multiple Myeloma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): E1506.
- [2] McBrayer SK, Cheng JC, Singhal S, et al. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11; implications for glucose transporter-directed therapy[J]. *Blood*, 2012, 119(20): 4686–4697.
- [3] Hoang B, Benavides A, Shi Y, et al. Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(7): 1974–1984.
- [4] Lamy L, Ngo VN, Emre NC, et al. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(4): 435–449.
- [5] Bingham C, Dickinson D, Cray J, et al. Expression of p8 in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck Pathol*, 2015, 9(2): 214–222.
- [6] Vincent AJ, Ren S, Harris LG, et al. Cytoplasmic translocation of p21 mediates NUPR1-induced chemoresistance; NUPR1 and p21 in chemoresistance[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(19): 3429–3434.
- [7] Emma MR, Iovanna JL, Bachvarov D, et al. NUPR1, a new target in liver cancer; implication in controlling cell growth, migration, invasion and sorafenib resistance[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2269.
- [8] 张兴博, 赵家莹, 张临友. 核蛋白 1 在肿瘤发展过程中的作用及相关研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(3): 445–448.
- [9] 曾沉思, 易蓓, 李星欣, 等. 敲低核蛋白 1(NUPR1) 基因抑制人 U266 多发性骨髓瘤细胞增殖并促进其凋亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(9): 1240–1246.
- [10] Gao LS, Zhang XH, Zhang H, et al. The influence of induced autophagy in vitro on proliferation of multiple myeloma cells[J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2012, 33(11): 932–937.
- [11] Pengo N, Scolari M, Oliva L, et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(3): 298–305.
- [12] Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(1): 37–45.
- [13] Dong X, Zhang J, Zhou Z, et al. Maslinic acid promotes autophagy by disrupting the interaction between Bcl2 and Beclin1 in rat pheochromocytoma PC12 cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74527–74538.
- [14] Shroff A, Sequeira R, Patel V, et al. Knockout of autophagy gene, ATG5 in mice vaginal cells abrogates cytokine response and pathogen clearance during vaginal infection of *Candida albicans*[J]. *Cell Immunol*, 2017, 324: 59–73.
- [15] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins[J]. *Autophagy*, 2011, 7(3): 279–296.
- [16] Urrutia R, Velez G, Lin M, et al. Evidence supporting the existence of a NUPR1-like family of helix-loop-helix chromatin proteins related to, yet distinct from, AT hook-containing HMG proteins[J]. *J Mol Model*, 2014, 20(8): 2357.
- [17] Cai D, Huang E, Luo B, et al. Nupr1/Chop signal axis is involved in mitochondrion-related endothelial cell apoptosis induced by methamphetamine[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2161.
- [18] Grasso D, Garcia MN, Hamidi T, et al. Genetic inactivation of the pancreatitis-inducible gene Nupr1 impairs PanIN formation by modulating Kras(G12D)-induced senescence[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(10): 1633–1641.
- [19] Mu Y, Yan X, Li D, et al. NUPR1 maintains autolysosomal efflux by activating SNAP25 transcription in cancer cells[J]. *Autophagy*, 2017, 13: 1–17.
- [20] Zhang L, Wang H, Zhu J, et al. Mollugin induces tumor cell apoptosis and autophagy via the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and ERK signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 247–254.
- [21] Hamidi T, Cano CE, Grasso D, et al. NUPR1 works against the metabolic stress-induced autophagy-associated cell death in pancreatic cancer cells[J]. *Autophagy*, 2013, 9(1): 95–97.
- [22] 罗国平, 刘芬, 谷文, 等. 褐藻糖胶对 U266 细胞自噬、迁移及侵袭的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(3): 312–317.

(责任编辑: 冉明会)