

# Z-VRPR-FMK 对 Burkitt 淋巴瘤细胞内 MALT1 和 A20 蛋白表达的影响<sup>\*</sup>

王佳蕊, 冯江龙, 杨文秀<sup>\*\*</sup>

(贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 用聚丙烯酸甲酯/离子霉素(PMA/IONO)和 MALT1 抑制剂 Z-VRPR-FMK 刺激 Burkitt 淋巴瘤细胞,检测细胞内 MALT1 和 A20 蛋白的表达。方法:采用 200  $\mu\text{g/L}$  + 1  $\mu\text{mol/L}$  的 PMA/IONO 和不同浓度(25、50 和 75  $\mu\text{mol/L}$ )的 Z-VRPR-FMK,在不同的作用时间(0.25、0.5 和 2 h)下刺激培养的 Burkitt 淋巴瘤细胞 Raji,根据各组细胞中 A20 蛋白的表达情况确定抑制剂 Z-VRPR-FMK 的最佳作用浓度及时间;将培养的 Raji 细胞分为设对照组、激动剂 PMA/IONO 处理组和抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组;对照组不加入 Z-VRPR-FMK 和 PMA/IONO 处理,抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组和激动剂 PMA/IONO 处理组分别根据筛选的 Z-VRPR-FMK 最佳作用浓度和时间进行刺激培养,采用 Western blotting 法各组检测各组细胞中 MALT1 和 A20 蛋白的表达。结果:最适的 Z-VRPR-FMK 作用浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$ 、作用时间为 0.5 h;与对照组相比,激动剂 PMA/IONO 处理组与抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组 MALT1 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但两组的 A20 蛋白表达均明显升高( $P < 0.01$ )。结论:抑制剂 Z-VRPR-FMK 能促进培养的 Raji 细胞内 A20 蛋白表达上调。

**[关键词]** 淋巴瘤; 细胞蛋白; MALT1; Z-VRPR-FMK

**[中图分类号]** R361.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)10-1125-05

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.10.003

## Influence of Z-VRPR-FMK on the Expression of MALT1 and A20 Protein in Burkitt Lymphoma Cells

WANG Jiarui, FENG Jianglong, YANG Wenxiu

(Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To stimulate cultured Burkitt lymphoma cell with PMA/IONO and Z-VRPR-FMK separately, and detect the expression of MALT1 and A20 protein. **Methods:** Raji cells were cultured. According to A20 protein expression condition, the best concentration and time of Z-VRPR-FMK was screened by using different concentration (25  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 75  $\mu\text{mol/L}$ ) and time (0.25 h, 0.5 h, 2 h) of Z-VRPR-FMK as well as 200 mg/L and 1  $\mu\text{mol/L}$  PMA/IONO. Cultured Raji cells were divided into control group and PMA/IONO agonist treatment group and inhibitor Z-VRPR-FMK treatment group, control group didn't treat with Z-VRPR-FMK or PMA/IONO, PMA/IONO agonist treatment group and inhibitor Z-VRPR-FMK treatment group were given Z-VRPR-FMK at screened optimum concentration and time. MALT1 and A20 protein was detected by western blotting. **Results:** The best concentration and time of Z-VRPR-FMK were 75  $\mu\text{mol/L}$  and 0.5 h separately. Compared with control, there was no change of MALT1 expression in two experimental groups, but A20 expression was significantly increased in the two groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The inhibitor Z-VRPR-FMK can promote the expression of A20 protein in cultured Raji cells.

**[Key words]** lymphoma; cell protein; MALT1; Z-VRPR-FMK

<sup>\*</sup>[基金项目]国家自然科学基金(81160299)

<sup>\*\*</sup>通信作者 E-mail:ypq1964@163.com

网络出版时间:2017-10-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171017.2231.022.html>

Burkitt 淋巴瘤是一种高侵袭性淋巴瘤,常表现为急性白血病形式或发生在结外,具有很高的增殖活性,临床预后很差。核因子  $\kappa$ B (nuclear factory-kappaB, NF- $\kappa$ B) 是重要的核转录因子,能调控多种细胞因子和生存基因表达<sup>[1]</sup>。NF- $\kappa$ B 家族有 5 种成员,可分为两大类,一类是 NF- $\kappa$ B1 (p50) 和 NF- $\kappa$ B2 (p52),另一类是 RelA (p65)、RelB 和 c-Rel。RelA、RelB 和 c-Rel 能产生活性蛋白,以同源或异源二聚体蛋白质结构存在于大多数的细胞中。NF- $\kappa$ B 的活化形式是由 p50 和 p65 的亚单位组成的一种异源二聚体,在多种转录过程中发挥关键作用,故通过检测 p50 和 p65 的表达可以了解 NF- $\kappa$ B 的活化程度<sup>[2]</sup>。黏膜相关淋巴组织淋巴瘤易位基因 1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1, MALT1 基因)、含 caspase 募集结构的膜相关鸟氨酸激酶 1 (caspase re-cruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase 1, CARMA1 基因) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3 基因 (tumor necrosis factor  $\alpha$  induced protein 3, TNFAIP3, A20 基因) 编码的蛋白是 NF- $\kappa$ B 活化通路中重要的调节蛋白<sup>[3]</sup>,有报道 MALT1 基因编码的 MALT1 蛋白能抑制 A20 分子,从而解除 A20 对 NF- $\kappa$ B 活化的抑制作用<sup>[4]</sup>; Ferch U 等<sup>[5-6]</sup> 利用 MALT1 蛋白酶抑制剂处理活化后 B 细胞样弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DL-BCL), 可以阻碍 A20 和 BCL10 的裂解,降低了 NF- $\kappa$ B 的活性和 NF- $\kappa$ B 靶基因的表达,因此推测 DL-BCL 中 MALT1 蛋白酶活性增强可影响淋巴瘤细胞的生长。故本研究选择了 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞作研究材料,并采用聚丙烯酸甲酯/离子霉素 (phorbol-12-myristate-13-acetate/ionomycin, PMA/IONO) 与 MALT1 抑制剂 (Z-VRPR-FMK) 刺激细胞,检查细胞内 MALT1 和 A20 蛋白的表达,探讨 Z-VRPR-FMK 与 MALT1 和 A20 的表达的关系,以期发现侵袭性 B 细胞淋巴瘤治疗的新靶点提供可靠的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji, 购自中科院上海细胞库; 佛波酯 (PMA) 及离子霉素 (Ionomycin, IONO), 购自德国 Sigma 公司; Z-VRPR-FMK, 购自美国 Enzo 公司; 鼠抗人  $\beta$ -Actin (C4) 单克隆抗体及

MALT1 (H-300) 多克隆抗体, 购自美国 Santa Cruz 公司; 鼠抗人 TNFAIP3 (59A426) 单克隆抗体, 购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** 采用 10% 胎牛血清联合 90% RPMI1640 加入 1% 双抗混合培养基, 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 温箱中培养 Raji 细胞。(1) 筛选 Z-VRPR-FMK 最佳作用浓度和时间: 用不同浓度 Z-VRPR-FMK、不同时间加入 PMA/IONO 刺激 Raji 细胞, 根据 A20 蛋白的表达选择最佳作用浓度及作用时间; Z-VRPR-FMK 梯度终浓度分别为 0、25、50 和 75  $\mu$ mol/L, 刺激细胞 0.5 h 后, 加入 PMA/IONO, 使其终浓度达到 200  $\mu$ g/L + 1  $\mu$ mol/L, 再刺激细胞 4 h; 选用 75  $\mu$ mol/L Z-VRPR-FMK 刺激细胞, 分别在刺激 0.25、0.5 和 2 h 后加入 PMA/IONO, 使其终浓度达到 200  $\mu$ g/L + 1  $\mu$ mol/L, 再刺激细胞 4 h。(2) 分组与处理: 选择 Z-VRPR-FMK 最佳作用浓度和时间设立对照组、激动剂 PMA/IONO 处理组、抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组<sup>[4]</sup>, 对照组为不加入 Z-VRPR-FMK 和 PMA/IONO 的 Raji 细胞组, 抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组和激动剂 PMA/IONO 处理组分别根据筛选的 Z-VRPR-FMK 最佳作用浓度和时间进行操作。

**1.2.2 MALT1 和 A20 蛋白测定** 采用 Western blotting 法测定 Raji 细胞中 MALT1 和 A20 蛋白的表达。(1) 蛋白提取及定量: 每孔  $3 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板中培养, 吸取 6 孔板细胞, 1 500 r/min 离心 5 ~ 10 min, 收集细胞; 用冷 PBS 或无血清培养基洗涤细胞, 加入 300  $\mu$ L 冷裂解液, 充分吹打后转入 1.5 mL EP 管, 冰浴 20 min, 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min, 收集上清 (总蛋白), -80 °C 保存; 用 BCA 法进行蛋白定量: 取适量 25 g/L 蛋白标准溶液, 稀释至终浓度为 1 g/L。根据样品数量, 按 50 : 1 配制适量 BCA 工作液, 酶标仪测定各标准品在 570 nm 处的光吸收值制作标准曲线; 分别加入 10、2 和 1  $\mu$ L 待测蛋白样品, 加双蒸水补足 10  $\mu$ L, 以相同条件加入 200  $\mu$ L BCA 工作液, 37 °C 孵育 30 min, 酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度值, 测定待测样品中 MAIL1 和 A20 蛋白浓度。(2) 蛋白样品制备: 每个样本加入  $5 \times$  SDS 蛋白电泳上样缓冲液 4  $\mu$ L, 再用  $1 \times$  SDS 蛋白电泳上样缓冲液 (每个样品含蛋白 20  $\mu$ g) 制备 20  $\mu$ L 样品, 于沸水浴中煮 5 min。(3) SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 制胶后每孔加入蛋白预染 Maker 和蛋白

样品,电泳,转膜,封闭,杂交和显色;一抗稀释度 MALT1 为 1: 500, A20 为 1: 250,  $\beta$ -Actin 为 1: 1 000。采用 Image-ProPlus 图像分析软件进行 Western-Blot 结果的灰度分析,各条带的灰度值代表蛋白的表达量。计算每个蛋白条带与对应的内参条带灰度值的比值,以对照组为 1 进行校对,进行统计分析。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。方差分析前对数据进行方差齐性检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。同一时间不同浓度药物作用及同浓度药物不同时间作用的多组与对照组比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 Raji 细胞 A20 蛋白表达

与对照组比较,50  $\mu\text{mol/L}$  和 75  $\mu\text{mol/L}$  Z-VRPR-FMK 刺激下 Raji 细胞中 A20 蛋白表达差异有统计学意义 ( $P = 0.006, 0.000$ );与对照组比较, Raji 细胞在 75  $\mu\text{mol/L}$  Z-VRPR-FMK 刺激 0.5 h 和 2 h 时, Raji 细胞中 A20 蛋白的表达差异有统计学意义 ( $P = 0.039, 0.000$ )。根据结果,后续实验选用 75  $\mu\text{mol/L}$  Z-VRPR-FMK, 刺激时间为 0.5 h。见图 1。

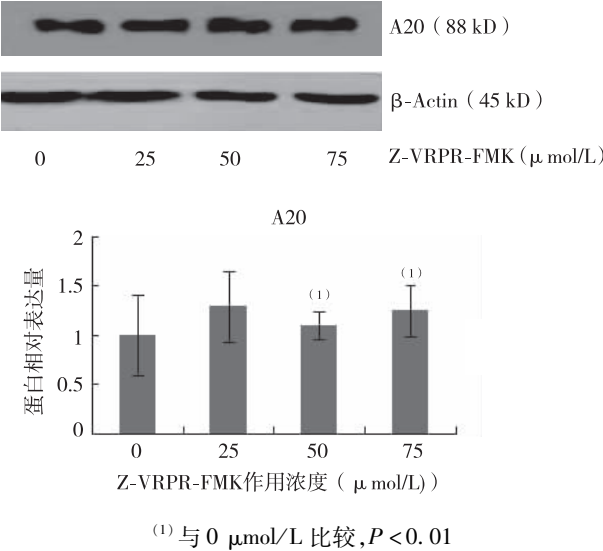


图 1 不同浓度 Z-VRPR-FMK 对 Raji 细胞中 A20 蛋白表达的影响  
Fig. 1 Expressions of A20 in Raji cells when stimulated by different concentration of Z-VRPR-FMK

2.2 Raji 细胞中 MALT1 和 A20 蛋白的表达

与对照组比较,激动剂 PMA/IONO 处理组、抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组 Raji 细胞中 MALT1 蛋白的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );与对照组比较,激动剂 PMA/IONO 处理组、抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组 Raji 细胞中 A20 蛋白的表达增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),且抑制剂 Z-VRPR-FMK 处理组 A20 表达量高于激动剂 PMA/IONO 处理组。见图 2、图 3。

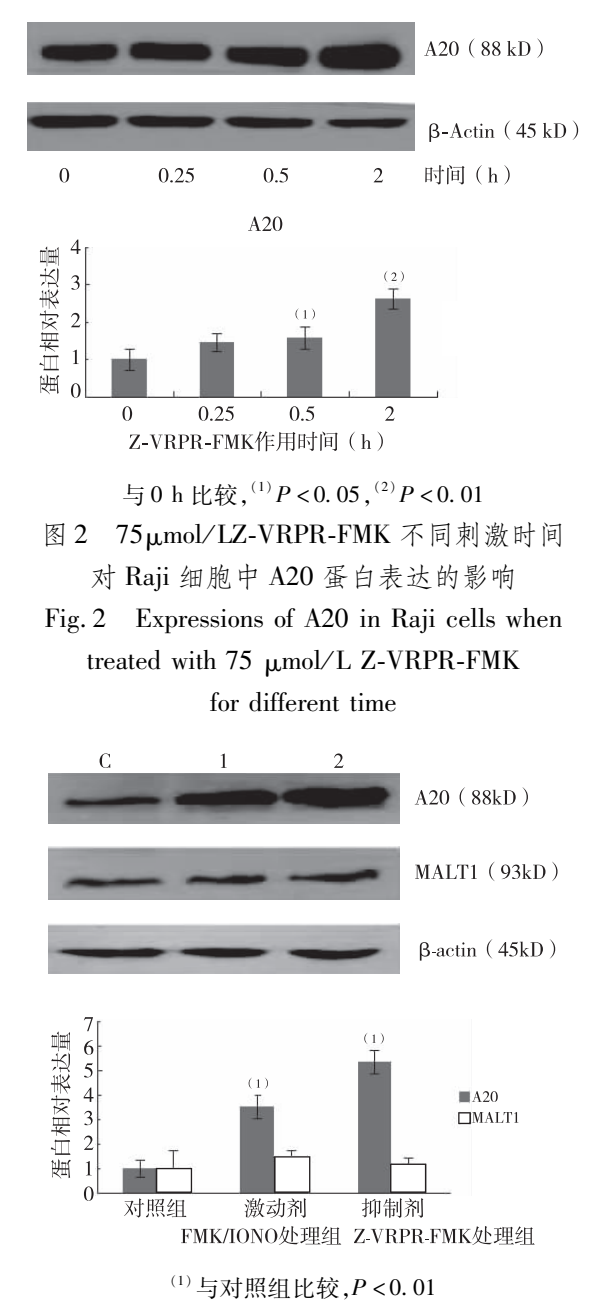


图 2 75  $\mu\text{mol/L}$  Z-VRPR-FMK 不同刺激时间对 Raji 细胞中 A20 蛋白表达的影响  
Fig. 2 Expressions of A20 in Raji cells when treated with 75  $\mu\text{mol/L}$  Z-VRPR-FMK for different time

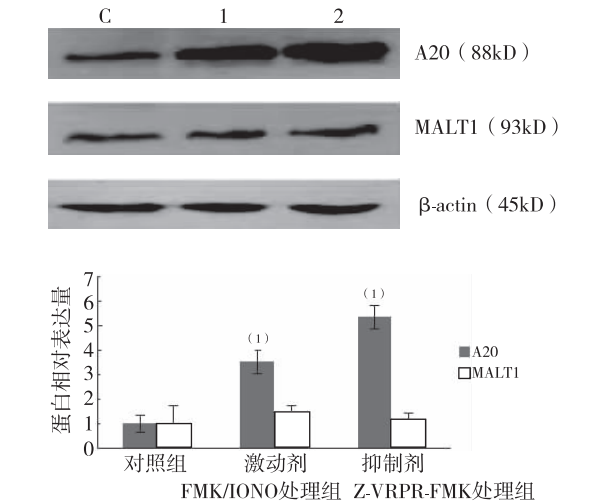


图 3 各组 Raji 细胞中 MALT1 和 A20 蛋白的表达  
Fig. 3 Expressions of A20 and MALT1 in Raji cells in each group

### 3 讨论

环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松方案(CHOP 方案)一直是非霍奇金淋巴瘤的主要治疗方案。由于各型非霍奇金淋巴瘤在病因和发病机制、遗传学改变、临床过程和预后等方面的异质性,使得 CHOP 方案的疗效差别较大。高侵袭性 Burkitt 淋巴瘤来源于生发中心细胞,该病预后很差,老年发病者治疗效果尤为不佳。因此,寻找侵袭性淋巴瘤新的治疗新靶点、开辟新的治疗途径是很有必要的。

NF- $\kappa$ B 信号通路的活化与肿瘤的发生、发展密切关系已在多种肿瘤中得到证实。多种肿瘤细胞生长和凋亡的调控基因都有 NF- $\kappa$ B 基因的结合位点而受其调控。有报道 NF- $\kappa$ B 的激活后通过多种机制参与肿瘤的发生:使 Ras 处于持续激活状态,从而上调前列腺癌、直肠癌等肿瘤细胞增殖能力;通过 Bcl-2 家族成员抑制 caspase-8、TNF 受体相关因子(TNFR-associated factor, TRAF)及凋亡抑制因子(inhibitor-of-apoptosis, IAP)家族,从而抑制凋亡;上调白介素 8(Intercicukin 8, IL-8)、金属基质蛋白酶及尿激酶型纤溶酶原活化因子(urokinase-type plasminogen activator, uPA)等增强肿瘤的侵袭性,还可以上调耐药基因表达而影响肿瘤治疗效果<sup>[5-6]</sup>。因此,抑制 NF- $\kappa$ B 信号传导通路的活化可能是肿瘤治疗的重要思路。

目前研究发现 NF- $\kappa$ B 信号传导通路的异常持续活化是淋巴造血系统肿瘤发生的重要原因<sup>[7]</sup>。ABC 样 DLBCL 中 NF- $\kappa$ B 活化相关基因异常对其临床过程和预后有重要影响。然而,在生发中心细胞(GCB)来源的 DLBCL 和 Burkitt 淋巴瘤中 NF- $\kappa$ B 活化的相关因素研究报道很少见。MALT1 基因位于染色体 18q21,是淋巴瘤中较为活跃的基因。在粘膜相关淋巴组织结外边缘区 B 细胞淋巴瘤(extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, MALT 淋巴瘤)中 MALT 参与了两种染色体易位的形成,即 t(11;18)和 t(14;18),可以通过多种方式参与 NF- $\kappa$ B 传导通路异常活化的过程,如影响 IKK 复合物的形成是通过自身寡聚化等作用、通过与 BCL10, CARMA1 形成 CBM 复合物<sup>[8-9]</sup>、通过 t(11;18)形成的 API2-MALT1 融合基因<sup>[10]</sup>。近期报道发现, MALT1 基因编码的 MALT1 蛋白具有蛋白水解酶活性,通

过酶解作用而调节 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化。A20 和肿瘤抑制因子(cylindromatosis, CYLD)都是 NF- $\kappa$ B 活化的负调节因子,为去泛素化调节的细胞因子,被视为肿瘤抑制基因。有研究报道, A20, CYLD 和 BCL10 都是 MALT1 蛋白作用的底物<sup>[11]</sup>。本研究中,用 MALT1 特异性抑制剂 Z-VRPR-FMK 和 PMA/IONO 处理 Burkitt 细胞 Raji,观察其对细胞生长及 MALT1 和 A20 蛋白表达的影响,结果发现:在被不同浓度和不同时间的 Z-VRPR-FMK 处理后, Raji 细胞内的 MALT1 蛋白表达虽无明显变化,但其 A20 表达水平明显高于相应对照细胞,这提示在 Z-VRPR-FMK 的作用下, Raji 细胞内虽然 MALT1 蛋白表达量无改变,但 MALT1 蛋白的水解酶活性可能降低,故而明显提高了 PMA/IONO 刺激引起的 A20 蛋白表达水平。

综上所述,抑制剂 Z-VRPR-FMK 能促进培养的 Raji 细胞内 A20 蛋白表达上调,其作用是否通过不可逆性抑制 MALT1 蛋白活性而实现还需要进一步的研究证实。A20 蛋白可能是 Burkitt 淋巴瘤治疗的潜在靶标。Raji 细胞内可能存在 MALT1 蛋白活性的异常,由此引起 NF- $\kappa$ B 的持续异常活化可能是 Burkitt 淋巴瘤发生和发展的重要机制,这可能与淋巴瘤的治疗有关,有待于进一步的深入研究。

### 4 参考文献

- [1] Francesco T. Constitutive NF- $\kappa$ B activation underlines major mechanism of drug resistance in relapsed refractory diffuse large B cell lymphoma[J]. Biomed Research International, 2015(23):1-5.
- [2] Espinosa I, Briones J, Bordes R, et al. Activation of the NF-kappaB signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications [J]. Histopathology, 2008(4): 441-449.
- [3] Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010(6):1-30.
- [4] Chanudet E, Huang Y, Ichimura K, et al. A20 is targeted by promoter methylation deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma [J]. Leukemia, 2010(2):483-487.
- [5] Yugo M, Kaoru A, Shuhei T, et al. MUC1 protein induces urokinase-type plasminogen activator(uPA) by forming a complex with NF- $\kappa$ B p65 transcription factor and binding to the uPA promoter, leading to enhanced invasiveness of cancer cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014(289):35193-35204.

[6]Turturro F. Constitutive NF-κB activation underlines major mechanism of drug resistance in relapsed refractory diffuse large B cell lymphoma [J]. Biomed Res Int. 2015, 2015;54 – 62.

[7]Grégoire M, Guilloton F. Neutrophils trigger a NF-κB dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas [J]. Oncotarget, 2015 (18):16471 – 16487.

[8]Karim ZA, Vemana HP, Khasawneh FT. MALT1-ubiquitination triggers non-genomic NF-κB/IKK signaling upon platelet activation[J]. Plos One, 2015(3):672 – 678.

[9]Mcallisterlucas LM, Baens M, Lucas PC. MALT1 protease;a new therapeutic target in B lymphoma and beyond? [J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2011 (21): 6623 – 6631.

[10]Karim ZA, Vemana HP, Khasawneh FT. MALT1-ubiquitination triggers non-genomic NF-κB/IKK signaling upon platelet activation [J]. Plos One, 2015(3):215 – 219.

[11]Linda M, McAllister-Lucas, Mathijs B, et al. MALT1 Protease;A new therapeutic target in B lymphoma and beyond [J]. Clin Cancer Res, 2011(21):6623 – 6631.

(2017-06-27 收稿, 2017-09-15 修回)

中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 周 凌

(上接第 1124 页)

[13]John C. Wood, Guidelines for quantifying iron overload [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Progam, 2014 (1):210 – 215.

[14]刘兴梅, 苏莉, 李贵芳, 等. 贵州地区重型 β 地中海贫血基因突变类型分析[J]. 贵阳医学院学报, 2014 (4):407 – 409.

[15]张强, 何升, 阙婷, 等. ROC 曲线确立血液学各指标在地中海贫血筛查中的 CUT – OFF 值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013(1):25 – 27.

[16]汤丽霞, 杨光, 曾劲伟, 等. 用 ROC 曲线确定 Hb-A2 在地贫诊断中的界值[J]. 现代预防医学, 2004(3): 353 – 355.

[17]冯桂玲, 林桢, 林敏, 等. ROC 曲线评价 β – 地中海贫血血红蛋白 A2 的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2013(13):2187 – 2189.

[18]曾劲伟, 杨光, 崔金环, 等. 高效液相色谱法检测血红蛋白 A2 诊断 β – 地中海贫血携带者的最佳阈值 [J]. 中国循证医学杂志, 2009(8):828 – 831.

[19]霍梅, 吴文苑, 刘妹, 等. 中国深圳地区孕妇毛细血管血红蛋白电泳筛查地中海贫血截断值的探讨[J]. 中国实验血液学杂志, 2016(2):536 – 539.

[20]张新华, 李平萍, 罗瑞贵, 等. 高效液相色谱法定量分析 HbA2 在珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用 [J]. 临床检验杂志, 2007(3):172 – 173.

[21]阮丽明, 周艳洁, 朱茂灵, 等. 全自动毛细管电泳法定量测定血红蛋白 A2 快速筛查 β – 珠蛋白生成障碍性贫血的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012 (19):2313 – 2314.

(2017-08-16 收稿, 2017-09-15 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森