

亚硒酸钠抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路诱导白血病细胞HL-60凋亡的机制研究

许京淑¹,朱晓健²,李松³

- 1.恩施土家族苗族自治州中心医院血液病科,湖北 恩施 445000;
- 2.华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科,湖北 武汉 430030;
- 3.恩施土家族苗族自治州中心医院血液病实验室,湖北 武汉 445000

【摘要】 目的 探究亚硒酸钠诱导白血病细胞HL-60凋亡的信号通路及其对信号通路的影响。方法 应用不同浓度的亚硒酸钠处理白血病细胞HL-60,或者应用亚硒酸钠按照不同的时间点处理白血病细胞HL-60,使用流式细胞仪检测亚硒酸钠对HL-60细胞凋亡的影响。应用10 μmol/L亚硒酸钠处理HL-60细胞,Western blot检测p-PI3K、总PI3K、p-AKT、总AKT、p-mTOR和总mTOR的表达情况。在过表达PI3K的HL-60细胞中应用10 μmol/L亚硒酸钠处理白血病细胞HL-60,流式细胞仪检测HL-60细胞的凋亡情况,Western blot检测p-PI3K、总PI3K、p-AKT、总AKT、p-mTOR和总mTOR的表达变化。同时以加蒸馏水处理的HL-60细胞为空白对照组。结果 与空白对照组凋亡比例(0.045±0.0013)相比,10 μmol/L及20 μmol/L亚硒酸钠处理组可有效诱导白血病细胞HL-60凋亡[凋亡比例分别为(0.254±0.001 6)和(0.435±0.002 1)],差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外与10 μmol/L的亚硒酸钠处理0 h组相比[凋亡比例(0.055±0.001 1)],10 μmol/L亚硒酸钠作用24 h、48 h、72 h后,HL-60细胞的凋亡显著[凋亡比例分别为(0.179±0.0018)、(0.384±0.0023)和(0.535±0.0034)],差异均有统计学意义($P<0.05$)。亚硒酸钠处理细胞能下调PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平,但对总的PI3K、AKT以及mTOR的表达没有影响。在过表达PI3K的细胞中,AKT、mTOR表达上调,而亚硒酸钠可逆转过表达PI3K导致的PI3K/AKT/mTOR信号通路的过度激活。过表达PI3K使细胞凋亡被抑制,而亚硒酸钠可诱导过表达PI3K的细胞凋亡增加。结论 亚硒酸钠可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活,诱导白血病细胞HL-60凋亡。

【关键词】 亚硒酸钠;人白血病细胞株HL-60;磷脂酰肌醇3-激酶;蛋白激酶 B;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

【中图分类号】 R733.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)03-0300-05

Mechanism of sodium selenite-induced apoptosis of leukemia cell line HL-60 by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. XU Jing-shu¹, ZHU Xiao-jian², LI Song³. 1. Department of Hematology, the Central Hospital of Tujia and Miao Autonomous Prefecture of Enshi, Enshi 445000, Hubei, CHINA; 2. Department of Hematology, Tongji Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei, CHINA; 3. Hematology Laboratory, the Central Hospital of Tujia and Miao Autonomous Prefecture of Enshi, Enshi 445000, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the signal pathway for sodium selenite-induced apoptosis of leukemia cell line HL-60 and sodium selenite's effects on the signaling pathway. **Methods** Treating leukemia cell line HL-60 with different concentrations of sodium selenite or using sodium selenite to deal with HL-60 cells at different time points, the effect of sodium selenite on the apoptosis of HL-60 cells was detected by flow cytometry. HL-60 cells were treated with 10 μmol/L sodium selenite, and the expression of p-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), total (PI3K), p-AKT, total AKT, p-mammalian target of rapamycin (mTOR), and total (mTOR) were detected by Western blot. The PI3K-overexpressing HL-60 cells were treated with 10 μmol/L sodium selenite, and flow cytometry was performed to detect the apoptosis of HL-60 cells. Besides, Western blot was performed to detect the expression of p-PI3K, total PI3K, p-AKT, total AKT, p-mTOR, and total mTOR. **Results** Compared with the blank control group, 10 μmol/L and 20 μmol/L sodium selenite can induce the apoptosis of leukemia cells HL-60: the apoptosis ratio (0.045±0.001 3) vs (0.254±0.001 6) and (0.435±0.002 1), $P<0.05$. In 10 μmol/L sodium selenite treatment condition, comparing with 0 h treatment (the ratio of apoptosis), the treatment of 24 h, 48 h and 72 h significantly induced the apoptosis of HL-60 cells: the apoptosis ratio (0.055±0.001 1) vs (0.179±0.001 8), (0.384±0.002 3), (0.535±0.003 4), $P<0.05$. Sodium selenite could down-regulate the phosphorylation levels of PI3K, AKT and mTOR, but had no effect on the total expression of PI3K, AKT and mTOR. In PI3K-overexpressing HL-60 cells, the expression of AKT and mTOR were up-regulated, but sodium selenite could inhibit the over-activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway resulting from the overexpression of PI3K. The overexpression of PI3K could inhibit the apoptosis, but sodium selenite could induce the increase of apoptosis of PI3K-overexpressing cells. **Conclusion** Sodium selenite can induce the apoptosis of leukemia cell line HL-60 by inhibiting the activation of PI3K/AKT/mTOR pathway.

【Key words】 Sodium selenite; Human leukemia cell line HL-60; Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); Protein kinase B (PKB); Mammalian target of rapamycin (mTOR)

白血病是一种以不成熟白细胞异常增多为特征的血液系统恶性肿瘤^[1]。目前治疗白血病的方法主要有两种:化学药物治疗和骨髓移植^[2]。骨髓移植是治疗白血病最有效的方法,但是由于其配型困难,移植后会产生诸多并发症等问题,使骨髓移植在临床上的应用受到限制^[3]。由于临床上常用的传统化学药物毒性大,副作用多,复发率高,所以研究者们极力寻找和研发新的药物。硒是具有抗癌作用的人体必需微量元素之一,许多研究表明硒可以抑制肿瘤发生、促进肿瘤凋亡、减少动物模型中小鼠体内肿瘤的大小^[4-6]。此外,硒在白血病领域也有研究表明其具有抗肿瘤的作用^[7],亚硒酸钠可促进白血病细胞凋亡^[8],但是其机制仍然不清楚,有待进一步研究。本实验以 HL-60 为研究对象,检测亚硒酸钠对其凋亡的影响,并检测与细胞凋亡密切相关的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的关键分子的表达情况,为阐明硒诱导白血病细胞凋亡的分子机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人急性髓系白血病细胞系 HL-60 细胞(AML-M2 型白血病细胞)购自中国科学院上海生命科学研究院。亚硒酸钠(sodium selenite)和二甲基亚砜(DMSO)购自西格玛化工有限公司(Sigma-Aldrich)。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购自上海贝博生物。Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司;RIPA 裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司。逆转录试剂盒(Prime-Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser)、实时荧光定量(SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)试剂盒等均购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。兔抗人 p-PI3K、总 PI3K、p-AKT、总 AKT、p-mTOR 和总 mTOR 多克隆抗体购自 Cell Signaling Technology (CST)中国有限公司。鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Proteintech 有限公司。山羊抗兔 IgG (二抗)和山羊抗鼠 IgG (二抗)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。TRIzol 试剂、化学发光检测试剂盒等均购自北京天根生物科技有限公司。PI3K、GAPDH 的 qRT-PCR 引物等均由生工生物工程(上海)有限公司合成。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 细胞培养 人急性髓系白血病细胞系 HL-60 细胞置于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养,用含 100 U/mL 双抗、10%胎牛血清的 DMEM 培养基(Gibco, USA)全培养液换液传代培养。

1.3 细胞转染 将 HL-60 传代,种于 6 cm 培养皿中,过夜,待细胞长到 70%时换无血清培养基培养,按照 Lipofectamine 2 000 转染试剂操作说明将 20 μg 质粒转染入细胞,静置 6 h 后换有血清培养基继续培养。

1.4 构建稳定过表达 PI3K 的 HL-60 细胞 在

6 cm 培养皿中将 HA-NC 和 HA-PI3K 质粒转染入 HL-60 细胞中。48 h 后,用遗传霉素(G418)筛选阳性克隆;挑选阳性的单克隆细胞簇,在低剂量 G418 的条件下将单克隆细胞扩大培养。进一步应用 qRT-PCR 和 Western blot 验证整合入细胞 DNA 的质粒能表达并上调 PI3K 的表达。

1.5 亚硒酸钠溶剂的制备 亚硒酸钠溶解在 DMSO 中并保存在 -20℃。对于所有的实验中,不同终浓度的熊果酸由储存液用 DMEM 培养基稀释得到,控制培养基的载体溶剂浓度为 0.1% DMSO。

1.6 细胞凋亡检测 收集用 0 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L 亚硒酸钠处理 24 h 后的 HL-60 细胞,或者是用 10 μmol/L 亚硒酸钠处理 0 h、12 h、24 h 和 48 h 的 HL-60 细胞,微量离心机转速 1 000 r/min,离心时间 5 min,弃培养基,用冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞两次,然后用 400 μL 1×binding buffer 重悬浮细胞使其为单细胞悬液并调整细胞浓度大约为 1×10⁶/mL;在细胞悬浮液中加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后于 4℃避光条件下孵育 15 min;后加入 10 μL PI 后轻轻混匀于 4℃避光条件下孵育 5 min;在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.7 qRT-PCR 检测 HL-60 细胞中的 PI3K 和 GAPDH mRNA 水平 收集经 G418 筛选的阳性克隆细胞,应用 TRIzol 试剂法提取各组细胞的总 RNA,用逆转录试剂盒将其反转录成 cDNA,反应条件如下:37℃ 15 min,85℃ 5 s,随后以此 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。PCR 反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s、60℃ 30 s,共 40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 值表示各基因 mRNA 的相对表达水平。PI3K 和 GAPDH 的 qRT-PCR 引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
PI3K	
正向引物	CCAGGGAAATTCTGGGCTCC
反向引物	GTATTCAGTCAATTGCAGAAG
GAPDH	
正向引物	TGGACCAAGTACATGAACCACC
反向引物	CTGGTGATTGGACACGGTGA

1.8 Western blot 检测 p-PI3K、总 PI3K、p-AKT、总 AKT、p-mTOR、总 mTOR 和 GAPDH 的蛋白表达水平 收集各组 HL-60 细胞,提取细胞总蛋白。用 10% SDS-PAGE 胶将提取的适量的蛋白质分离,然后将蛋白质转移至 PVDF 膜上,封闭液封闭 1 h;将相应的 PVDF 膜浸入含 1:1 000 的抗 p-PI3K、总 PI3K、p-AKT、总 AKT、p-mTOR、总 mTOR 或 GAPDH 抗体的一抗稀释液中 4℃孵育过夜;第二天将膜取出用 TBST 液漂洗 3 次,每次 10 min,按 1:10 000 稀释浓度加入羊抗兔

IgG (二抗)或者羊抗鼠IgG (二抗),室温孵育2 h;然后用TBST液漂洗3次,每次10 min;将漂洗液倒干净后加入化学发光试剂显影成像,Image Lab软件分析蛋白条带灰度值。蛋白的表达情况以p-PI3K、总PI3K、p-AKT、总AKT、p-mTOR、总mTOR条带的灰度值与GAPDH条带灰度值的比值表示。

1.9 统计学方法 应用SPSS17.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组样本均数比较采用方差分析,两组间比较采用t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 10 $\mu\text{mol/L}$ 及20 $\mu\text{mol/L}$ 的亚硒酸钠可有效诱导白血病细胞HL-60凋亡 为探究亚硒酸钠对白血病细胞HL-60凋亡的影响,分别应用0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠处理细胞24 h,然后使用流式细胞仪技术检测细胞凋亡情况,同时以加蒸馏水处理的HL-60细胞为空白对照组,结果如表2所示:当浓度低于10 $\mu\text{mol/L}$ 时,亚硒酸钠对HL-60细胞的凋亡影响不大;当浓度在10 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,亚硒酸钠能促进HL-60细胞凋亡。

表2 亚硒酸钠对HL-60细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡比例
空白对照组	0.045±0.0013
0 $\mu\text{mol/L}$	0.049±0.0017
5 $\mu\text{mol/L}$	0.057±0.0011
10 $\mu\text{mol/L}$	0.254±0.0016 ^a
20 $\mu\text{mol/L}$	0.435±0.0021 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.2 亚硒酸钠作用时间越长诱导白血病细胞HL-60凋亡更加明显 为探究药物作用时间对诱导凋亡的影响,应用10 $\mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠分别处理HL-60 12 h、24 h、48 h、72 h,收集各组细胞,应用流式细胞仪技术检测细胞凋亡情况,结果如表3所示:当处理时间为12 h时,亚硒酸钠诱导凋亡的作用并不明显($P=0.0743$);当处理时间超过24 h时,亚硒酸钠能有效诱导HL-60细胞凋亡,并且随着时间的延长,诱导凋亡的作用更加明显。

表3 处理时间对亚硒酸钠诱导HL-60细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡比例
空白对照组	0.055±0.0011
12 h	0.079±0.0014
24 h	0.179±0.0018 ^a
48 h	0.384±0.0023 ^b
72 h	0.535±0.0034 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.3 亚硒酸钠下调PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平 为探究亚硒酸钠诱导白血病细胞凋亡的信号通路机制,提取了使用10 $\mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠处理

24 h的HL-60细胞总蛋白,应用Western blot检测了PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平及其总蛋白的表达情况。结果发现:与空白对照组相比,亚硒酸钠能使PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平下调,但是对PI3K、AKT、mTOR的总蛋白表达无明显影响,见图1。

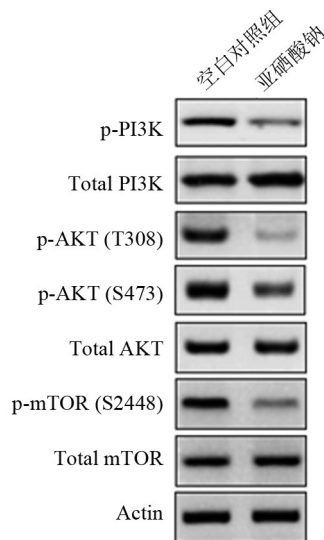


图1 亚硒酸钠下调PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平

注:与Control组相比,亚硒酸钠处理组中p-PI3K、p-AKT (T308)、p-AKT (S473)、p-mTOR (S2448)均下降,而总的PI3K、AKT、mTOR表达无变化。

2.4 在HL-60细胞中构建稳定过表达PI3K的细胞 使用亚硒酸钠处理的HL-60细胞中p-PI3K、p-AKT (T308)、p-AKT (S473)、p-mTOR (S2448)均下降,据此我们推测亚硒酸钠可能是通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路诱导白血病细胞凋亡。为验证推测,首先在HL-60细胞中构建稳定过表达PI3K的细胞系。分别在HL-60细胞中转染HA-vector和HA-PI3K质粒,用G418筛选阳性克隆,细胞经qRT-PCR和Western blot分析GRP94的表达情况(图2)。结果显示:qRT-PCR和Western blot检测发现,与转染了HA-vector质粒的细胞比较,转染了HA-PI3K质粒的HL-60细胞PI3K基因的mRNA和蛋白表达均明显上调,此外,p-PI3K也有所升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

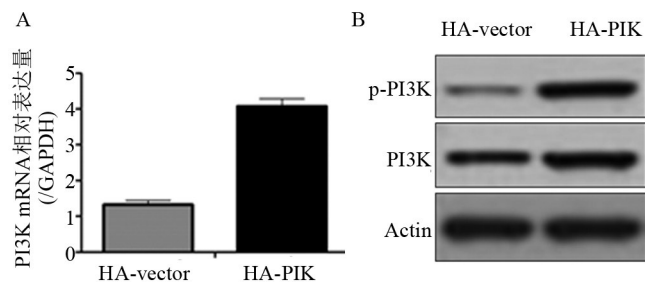


图2 在HL-60细胞中构建稳定过表达PI3K的细胞

注:A为qRT-PCR结果统计直方图, $P<0.05$;B为Western blot成像图。

2.5 亚硒酸钠可抑制 PI3K 过表达导致的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的过度激活 在稳定过表达 PI3K 的 HL-60 细胞中,使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠处理 24 h,提取各组细胞的总蛋白,应用 Western blot 检测了 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平及其总蛋白的表达情况。结果见图 3:与空白对照组相比,HA-PI3K 组的 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平上调;而另一方面,与 HA-PI3K 组相比,HA-PI3K+亚硒酸钠组的 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平恢复,与 NC 组持平,甚至低于 NC 组。

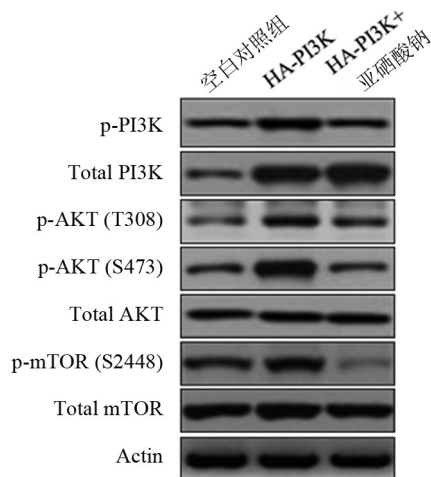


图 3 亚硒酸钠可抑制 PI3K 过表达导致的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的过度激活

注:与 HA-PI3K 组比较,HA-PI3K+亚硒酸钠组的 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平恢复。

2.6 过表达 PI3K 的 HL-60 细胞的凋亡被亚硒酸钠诱导 为探究亚硒酸钠能否促进过表达 PI3K 的 HL-60 细胞的凋亡,采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 亚硒酸钠分别处理 HL-60 24 h,然后使用流式细胞仪技术检测细胞凋亡情况,结果如表 4 所示:与空白对照组相比,过表达 PI3K 组的细胞凋亡受到抑制;而在过表达 PI3K 的细胞中加入亚硒酸钠则可诱导细胞凋亡。

表 4 HL-60 细胞凋亡情况

组别	凋亡比例
空白对照组	0.065±0.001 2
HA-PI3K	0.015±0.001 5*
HA-PI3K+亚硒酸钠	0.057±0.001 4*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

据估算,全球每年有 14 万左右的人被诊断为白血病,大多数为急性白血病,是世界范围内常见的血液系统恶性肿瘤^[9]。在我国,白血病的发病率大约为 2.67/10 万,是十大高发恶性肿瘤之一^[10]。目前对白血病的治疗主要是诱导化学疗法,可以使大约 75% 的患者得到缓解,但是,即使是缓解的患者复发率也很高,且易产生耐药,对化学药物的耐药是导致白血病治疗

失败的主要原因^[11]。针对这一问题,许多科学家对治疗白血病的药物进行了改良,并寻找新的药物来治疗白血病。硒是人体必需的微量元素之一,在机体的抗氧化系统、免疫系统、心血管系统中起重要作用^[12]。亚硒酸钠是目前临床上用途广泛的无机硒化合物,可作为治疗癌症的辅助用药^[13],有研究表明亚硒酸钠对胃癌及结肠癌细胞具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[14-15],在白血病中同样有研究表明亚硒酸钠可诱导白血病细胞 NB4 凋亡^[16];但是,亚硒酸钠对 HL-60 凋亡的影响仍不甚清楚。为阐明亚硒酸钠对 HL-60 凋亡的影响,使用不同浓度的亚硒酸钠处理白血病细胞 HL-60,或者应用亚硒酸钠按照不同的时间点处理白血病细胞 HL-60,充分分析了药物浓度以及药物作用时间对我们研究的影响,如表 2、表 3 中的数据显示:低剂量的亚硒酸钠对白血病细胞并无诱导凋亡的作用,当浓度超过 10 $\mu\text{mol/L}$ 时便可有效诱导肿瘤细胞凋亡,且与浓度呈正相关。因为硒本来就是人体必需的微量元素,所以低剂量的亚硒酸钠并无抗肿瘤的作用。当浓度超过某一个指标时,硒可出现细胞毒性作用,进而诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。但是值得注意的是,过量的亚硒酸钠会导致人体中毒,因此在动物实验或者临床使用过程中需要特别关注它的中毒剂量以及致死剂量。此外,在不同处理时间点的实验中我们也发现亚硒酸钠可诱导 HL-60 细胞凋亡并与时间的长短成正比关系。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路具有抑制凋亡、促进增殖等功能,在肿瘤的发生发展过程中起着至关重要的作用。研究发现在白血病细胞中存在着许多 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的关键原件有突变,这让研究者们认为在急性白血病的发病机制中,PI3K/Akt/mTOR 是一个中枢回路^[17]。PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)有许多不同的上游因子,包括将受体酪氨酸激酶(RTK)、G 蛋白偶联受体(GPCR)和 GTP 结合蛋白连接到受体的蛋白等^[18]。PI3K 属于一类具有磷酸化肌醇磷脂肌醇环的 3-羟基的脂质激酶,当受到生长因子通过表皮生长因子受体、血小板衍生因子受体、胰岛素样生长因子受体或者 c-Met 等刺激磷酸酪氨酸激酶时,PI3K 被活化,其磷酸化水平升高。在本研究中,运用亚硒酸钠处理白血病细胞 HL-60 后,PI3K 的活性受到抑制,表现为其磷酸化水平下降,进而降低了其下游激酶的激活,导致整个通路受到抑制。因此猜想亚硒酸钠可能是通过竞争结合上述的某个受体,使生长因子无法再刺激到磷酸酪氨酸激酶,从而抑制了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路。此外,当 PI3K 的表达量增加时,虽然没有增加生长因子的刺激,但是接受磷酸化的 PI3K 多了,所以导致了 PI3K 通路的过度活化,其磷酸化水平升高,其下游的激活磷酸化水平也升高。

PI3K 通路的活化导致脂类的肌醇环在细胞膜上磷酸化并且转换成 3-磷酸磷脂酰肌醇(PI)和 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂);而 I 类 PI3Ks 的脂质底物则转换成 3,4,5 三磷酸肌醇磷脂酰肌醇(PIP₃)。PIP₂、PIP₃ 和含 PH 结构域的蛋白质在质膜内表面区域相互作用,进而导致这些蛋白质的构象变化。PH 结构域在许多蛋白中都存在,其中就包括 AKT^[19]。AKT 是一个丝氨酸苏氨酸激酶,又被称为蛋白激酶 B。它通常存在于细胞浆内,当 PI3K 被激活时它则转运到细胞膜,进而发生构象的变化。AKT 包括一个核心激酶结构域,通过这个结构域内的酪氨酸残基(T308)与磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)结合;此外它的 C 末端结构域则通过丝氨酸残基(S473)与 mTOR 结合。因此,通常认为 T308 和 S473 这两个位点的磷酸化水平可以代表 AKT 激酶的活性,本研究中也是通过检测这两个位点的磷酸化水平来判断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的活性情况。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可整合细胞外信号,磷酸化下游靶蛋白核糖体 p70S6 激酶,如 S6K1 及 4E-BP1,影响基因转录与蛋白质翻译,从而参与调控细胞生长、增殖等过程^[20]。mTOR 是一种高度保守的蛋白激酶,是 PI3K/Akt 通路中的效应物,可调节肿瘤细胞的增殖、生长、存活和血管生成^[21]。mTOR 存在多个磷酸化位点,目前研究比较透彻的是 2 448 位的丝氨酸的磷酸化对 mTOR 的活性以及它的功能起到很重要的作用。在本研究中发现亚硒酸钠能抑制 PI3K/AKT 信号通路从而使 mTOR 的磷酸化水平下降,此外,亚硒酸钠能诱导白血病细胞 HL-60 凋亡。据此,可以推测亚硒酸钠是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活诱导白血病细胞凋亡。为进一步验证推测,笔者在过表达 PI3K 的 HL-60 细胞中加入亚硒酸钠处理,发现亚硒酸钠可以抑制 PI3K 过表达导致的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的过度激活,同时,还能诱导过表达 PI3K 的 HL-60 细胞的凋亡。

综上所述,本研究证明了亚硒酸钠是通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来诱导白血病细胞凋亡的,这为亚硒酸钠运用于临床治疗白血病提供了有力的实验依据。

参考文献

[1] Jiang Q, Li F, Shi K, et al. Involvement of p38 in signal switching from autophagy to apoptosis via the PERK/eIF2 α /ATF4 axis in sele-

nite-treated NB4 cells [J]. Cell Death & Disease, 2014, 5(5): e1270.

- [2] 贾永清,滕熔,胡慧仙. 亚硒酸钠对 HL-60 细胞增殖、凋亡影响及作用机制探讨[J]. 交通医学, 2011, 25(2): 121-125.
- [3] 王承艳,丁明孝. 骨髓移植与造血干细胞研究[J]. 生物学通报, 2009, 44(1): 6-9.
- [4] Fang W, Han A, Bi X, et al. Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and suppression of β -catenin signaling [J]. International Journal of Cancer, 2010, 127(1): 32-42.
- [5] Yang Y, Luo H, Hui K, et al. Selenite-induced autophagy antagonizes apoptosis in colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncology Reports, 2015, 35(3): 1255-1264.
- [6] Luo H, Yang Y, Duan J, et al. PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells [J]. Cell Death & Disease, 2013, 4(2): e481.
- [7] 魏虎来. 硒酯多糖和亚硒酸钠抗白血病效应的实验研究[J]. 兰州大学学报, 1996, 32(1): 126-129.
- [8] 贾永清,滕熔,胡慧仙. 亚硒酸钠对 HL-60 细胞增殖、凋亡影响及作用机制探讨[J]. 交通医学, 2011, 25(2): 121-125.
- [9] Elert E. Living with leukaemia [J]. Nature, 2013, 498(7455): S2-S3.
- [10] 于方方,付菊芳,白燕妮,等. 急性白血病患者生活质量与支持性照顾需求的相关性研究[J]. 护理管理杂志, 2015, 15(1): 24-26.
- [11] 苗小艳,马红叶,张旭,等. N-糖基化修饰在髓性白血病耐药中的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(5): 506-510.
- [12] 胡滨,陈一资. 亚硒酸钠的急性、蓄积性、亚急性毒性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 258-262.
- [13] 赵鹏,赵上,王艳,等. Fas 及 TRF1、TRF2 在亚硒酸钠诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡过程中的表达[J]. 营养学报, 2014, 36(2): 149-153.
- [14] 王艳,赵上,苏衍萍,等. 亚硒酸钠通过线粒体途径诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的机制[J]. 解剖学报, 2016, 47(3): 353-358.
- [15] 黄方,黄艾,马虹,等. 亚硒酸钠诱导结直肠癌 SW480 细胞线粒体损伤及细胞凋亡[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(10): 1050-1054.
- [16] 段婧,罗慧,史可鉴,等. 亚硒酸钠通过 AMPK/mTOR 通路调控白血病 NB4 细胞凋亡[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(3): 297-302.
- [17] Fransecky L, Mochmann LH, Baldus C D. Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia [J]. Molecular and Cellular Therapies, 2015, 3(1): 2.
- [18] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655.
- [19] Matsuoka T, Yashiro M. The role of PI3K/Akt/mTOR signaling in gastric carcinoma [J]. Cancers, 2014, 6(3): 1441-1463.
- [20] 陈洪菊,屈艺,母得志. mTOR 信号通路的生物学功能[J]. 生命的化学, 2010, 30(4): 555-561.
- [21] Ziegler ME, Hatch MM, Wu N, et al. mTORC2 Mediates Cxcl12-induced angiogenesis [J]. Angiogenesis, 2016, 19(3): 359-371.

(收稿日期:2017-07-27)