

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.008

· 基础研究 ·

苦瓜蛋白 MAP30 通过 AKT/mTOR 通路促进多发性骨髓瘤细胞的自噬和凋亡

何颖¹, 方芳¹, 颜宏利², 江松福¹(1. 温州医科大学附属第一医院 血液科, 浙江 温州 325015; 2. 海军军医大学附属长海医院 实验诊断科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨苦瓜蛋白 MAP30 在多发性骨髓瘤中的作用及其机制。**方法:**将人骨髓瘤 RPMI-8226、NCI-H929 和 U266 细胞为靶细胞,以不同浓度(1~10 $\mu\text{mol/L}$)的 MAP30 处理后,采用 CCK-8 法检测多发性骨髓瘤细胞株 RPMI-8226、NCI-H929 和 U266 的增殖能力,Annexin V/PI 流式细胞术检测骨髓瘤细胞的凋亡情况,Wb 实验检测骨髓瘤细胞凋亡相关蛋白(PARP)、自噬相关蛋白(LC3II、P62)及 AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达水平,CCK-8 法、流式细胞术和 Wb 实验检测 MAP30 联合自噬激动剂雷帕霉素(Rap)或自噬抑制剂巴弗洛霉素(Baf)作用后骨髓瘤细胞增殖、凋亡和自噬的变化。**结果:**MAP30(1~10 $\mu\text{mol/L}$)抑制骨髓瘤细胞的增殖,且其对增殖的抑制呈时间和剂量依赖关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。MAP30 单独作用骨髓瘤细胞后,细胞凋亡和细胞自噬增加,PARP 裂解增多,LC3II 表达水平增加,P62 表达明显下降(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$);MAP30+Rap 作用骨髓瘤细胞后,较单用 MAP30 细胞增殖率增加、细胞凋亡率减少、细胞自噬减少、PARP 裂解降低、LC3II 表达降低及 P62 表达增加(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$);相反,MAP30+Baf 作用骨髓瘤细胞较单用 MAP30,细胞增殖率减少、细胞凋亡率增加、细胞自噬增加、PARP 裂解增加、LC3II 表达增加、P62 表达降低(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$);MAP30 作用骨髓瘤细胞后,AKT/mTOR 通路相关蛋白 p-AKT 和 p-mTOR 表达水平明显降低(均 $P<0.05$)。**结论:**MAP30 可通过 AKT/mTOR 通路促进骨髓瘤细胞的凋亡和自噬,可能为骨髓瘤的治疗提供新的治疗策略。

[关键词] 多发性骨髓瘤;苦瓜蛋白;MAP30;AKT/mTOR 通路;自噬;凋亡

[中图分类号] R733.3; R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0299-07

Momordica protein MAP30 promotes apoptosis and autophagy via AKT/mTOR pathway in multiple myeloma cell

HE Ying¹, FANG Fang¹, YAN Hongli², JIANG Songfu¹(1. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, Zhejiang, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital Affiliated to Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role of momordica protein MAP30 in multiple myeloma (MM) and the possible mechanism. **Methods:** Human myeloma RPMI-8226, NCI-H929 and U266 cells were treated with MAP30 at different concentration (1-10 $\mu\text{mol/L}$) and then the proliferation rates of cells were detected by CCK-8 assay. Annexin V/PI flow cytometry was used to evaluate the apoptosis rate of myeloma cells, and the expressions of apoptosis-related protein (PARP), autophagy-related proteins (LC3II, P62) and Akt/mTOR pathway-related proteins in multiple myeloma cells were also detected via Wb. The changes in cell proliferation, apoptosis and autophagy after the treatment of MAP30 combined with autophagy agonist rapamycin (Rap) or autophagy inhibitor bafilomycin (Baf) were observed by CCK-8, flow cytometry and Wb, respectively. **Results:** MAP30 (1-10 $\mu\text{mol/L}$) inhibited the proliferation of myeloma cells in a time- and dose-dependent manner ($P<0.05$ or $P<0.01$). With MAP30 acting on myeloma cells alone, the apoptosis and autophagy of MM cells, as well as the expression of PARP cleavage and LC3II increased while the expression of P62 decreased significantly (all $P<0.05$ or $P<0.01$). After being treated with MAP30+Baf, compared with MAP30 treatment alone, the cell proliferation was remarkably enhanced while cell apoptosis and cell autophagy were suppressed, besides, the expression of PARP cleavage and LC3II were decreased and P62 level was augmented (all $P<0.05$ or $P<0.01$). Conversely, after being treated with MAP30+Baf, compared with MAP30 treat-

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(No. LY16H080006)。Project supported by the Nature Science Foundation of Zhejiang Province (No. Ly16H080006)

[作者简介] 何颖(1990-),女,硕士生,主要从事血液恶性肿瘤的研究,E-mail: 490492763@qq.com

[通信作者] 江松福(JIANG Songfu, corresponding author),硕士,副主任医师,硕士生导师,主要从事血液恶性肿瘤的研究,E-mail: jiang-songfu@189.cn

ment or Baf treatment alone, cell proliferation and P62 level were reduced, while apoptosis and autophagy as well as the expressions of PARP cleavage and LC3II level were increased (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expressions of p-AKT and p-mTOR were significantly reduced with the effect of MAP30 on myeloma cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** MAP30 can promote the apoptosis and autophagy of myeloma cells through AKT/mTOR pathway, which may provide a new therapeutic strategy for treatment of multiple myeloma.

[Key words] multiple myeloma; momordica charantia protein; MAP30; AKT/mTOR pathway; autophagy; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(3): 299-305. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.008]

多发性骨髓瘤是一种起源于骨髓浆细胞的恶性肿瘤,以骨髓微环境中恶性浆细胞克隆性增生、病态产生和分泌大量单克隆免疫球蛋白为特征,并伴随多器官浸润进而引起功能障碍。临床主要表现为骨痛、贫血、肾功能不全和感染等^[1]。据统计,多发性骨髓瘤是第二常见的血液系统肿瘤,发病率占总数的10%~15%,由于其难治性,其病死率占血液系统肿瘤总数的15%~20%,约占所有肿瘤病死率的2%^[2]。随着蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂等新药的使用和自体干细胞移植技术的应用,在过去的几年里,骨髓瘤患者的总体生存率得到显著提高^[3],但随着骨髓瘤克隆演化、耐药等因素,寻找新型药物以改善多发性骨髓瘤的预后迫在眉睫。在多发性骨髓瘤的抗肿瘤机制中,抗凋亡分子的表达是众多抗肿瘤机制之一。其中包括3条主要的凋亡途径:内源性途径(线粒体途径);外源性途径(死亡受体途径);内质网应激途径,这3条途径最终都激活聚-ADP-核糖聚合酶(PARP)^[4]。另一种细胞死亡过程是自噬。自噬是真核生物中一种高度保守的自我消化途径,特征是能够形成具有双层膜囊泡结构的自噬体,回收细胞质内错误折叠的蛋白和受损的细胞器等,实现机体的内环境稳态,在正常生理和疾病过程中都发挥着关键作用^[5-6]。有研究^[7]显示,自噬过程复杂多样,涉及大量分子和蛋白质,例如 Beclin1、P62 和 LC3 等,而这些蛋白的表达水平在某种程度上能反映出细胞的自噬水平。MAP30 是从苦瓜种子中纯化提取的一种单链核糖体失活蛋白,其相对分子质量约 30 000。MAP30 具有抗肿瘤和抗病毒双重活性,其抗肿瘤和抗病毒活性可能与其 RNA 中 N-糖苷酶活性有关^[8],即 MAP30 通过水解腺嘌呤的糖苷键使核糖体构象发生改变而影响其蛋白质合成^[9]。MAP30 在多种实体肿瘤,如膀胱癌、肝癌、直肠癌中显示出促进肿瘤细胞凋亡的活性^[10-11]。本课题组前期研究^[12]已经证实,在血液系统疾病中,MAP30 对急性髓系白血病细胞有类似的促凋亡作用;而 MAP30 对多发性骨髓瘤的作用目前尚未有研究报道,且 MAP30 具有来源广泛,不易产生耐药性,探究 MAP30 对骨髓瘤的作用及其机制有助于为治疗骨髓瘤提供新的思路。因此,本研究首先研究苦瓜蛋白 MAP30 是否影响骨髓瘤细胞的增殖,再进一步研究 MAP30 单药及联合自噬抑

制剂或自噬激动剂作用骨髓瘤细胞后,对细胞凋亡和自噬的影响。另外,有报道证实 AKT/mTOR 信号通路参与调节 MM 中的凋亡和自噬^[13-14]。因此本研究最后探讨 MAP30 是否也通过这一通路来参与调节骨髓瘤细胞的凋亡和自噬,为复发性骨髓瘤的治疗提供策略。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药物及主要试剂

人骨髓瘤细胞株 RPMI-8226、NCI-H929 和 U266 为本实验室保存,均培养于含 10% 胎牛血清(Gibco)的 RPMI 1640(Gibco)培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱。MAP30 购于成都医学院,使用前将其冻干粉融于磷酸盐缓冲液中,配制成为 5 mg/ml,过滤除菌,4 °C 贮存。CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 生物试剂公司,Annexin V/PI 凋亡试剂盒购用中国联科生物试剂公司,PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白质测定试剂盒购于碧云天生物科技公司,磷酸酶抑制剂购于罗氏生物试剂公司,GAPDH 单克隆抗体、LC3II 单克隆抗体、P62 单克隆抗体、PARP 单克隆抗体、AKT/p-AKT 单克隆抗体、mTOR/p-mTOR 单克隆抗体均购于美国 CST 公司。自噬激动剂雷帕霉素(rapamycin, Rap)、自噬抑制剂巴弗洛霉素(bafilomycin, Baf)购于美国 Selleck 公司。

1.2 人骨髓瘤 RPMI-8226、NCI-H929 和 U266 细胞的培养和分组

人骨髓瘤细胞株 RPMI-8226、NCI-H929 和 U266 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,待细胞汇合度达 90% 时,将细胞洗脱后按照 1:2 稀释,并将细胞悬液传到新的培养瓶中,加入新鲜含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养。实验分组:对照组 0 μmol/L MAP30(Con),5 nmol/L Rap,10 nmol/L Baf;实验组 4 μmol/L MAP30,4 μmol/L MAP30+5 nmol/L Rap,4 μmol/L MAP30+10 nmol/L Baf。

1.3 CCK-8 法检测 MAP30 对骨髓瘤细胞增殖活性的影响

将人骨髓瘤细胞株 RPMI-8226、NCI-H929 和 U266 以 5×10^4 个/ml 的细胞密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl 细胞悬液,并加入不同浓度的 MAP30(0、1、2、4、8、10 μmol/L),每个浓度设 3 个平行孔。药物分别

作用24、48和72 h后,每孔加入10 μl CCK-8试剂后,再继续作用1~4 h后,用酶标仪在450 nm处检测光密度(D)值,观察不同时间下不同浓度MAP对骨髓瘤细胞增殖率的影响。另外,同样按照 5×10^4 个/ml的细胞密度接种于96孔板,每孔依照上述实验分组分别加入MAP30、Rap或Baf,药物联合作用48 h后,加入CCK-8后测定细胞增殖活性。实验重复3次。

1.4 流式细胞术检测MAP30对骨髓瘤细胞凋亡的影响

将人骨髓瘤细胞以 1×10^5 个/ml的细胞密度接种于12孔板,每孔加入细胞悬液2 ml,每孔加入不同浓度的MAP30(0、1、4 $\mu\text{mol/L}$)。药物作用24、48 h后,收集细胞悬液,洗涤混匀后,取200 μl 细胞悬液至流式细胞管,分别加入5 μl 的Annexin V-FITC和10 μl 的PI,室温避光孵育15 min,用细胞流式仪检测细胞凋亡率。另外,同样按照 1×10^5 个/ml的细胞密度将细胞接种于12孔板,每孔按照上述实验分组分别加入MAP30、Rap或Raf,药物联合作用48 h后采用流式细胞术测定细胞凋亡率。实验重复3次。

1.5 Wb实验检测MAP30对骨髓瘤细胞凋亡、自噬及AKT/mTOR通路相关蛋白表达的影响

将骨髓瘤细胞以 1×10^6 个/ml的细胞密度接种于6孔板,每孔加入细胞悬液6 ml,每孔加入不同浓度的MAP30(0、1、4 $\mu\text{mol/L}$)。药物作用48 h后,收集细胞悬液,提取总蛋白,采用BCA蛋白质测定试剂盒测定蛋白浓度。按照蛋白质印迹分析技术^[12],进行

SDS-PAGE电泳分离、转移至PVDF膜、抗体封闭,分别加入凋亡相关蛋白PARP、自噬相关蛋白LC3II、P62及AKT/mTOR通路相关蛋白AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR和内参GAPDH等抗体孵育后,用Bio-Rad图像分析分析条带的光密度,观察蛋白表达水平的变化。另外,同样按照 1×10^6 个/ml的细胞密度将细胞接种于12孔板,每孔按照上述实验分组分别加入MAP30、Rap或Raf,药物联合作用48 h后采用Wb测定药物联合作用后骨髓瘤细胞凋亡、自噬及AKT/mTOR通路相关蛋白表达情况。实验重复3次。

1.6 统计处理

采用SPSS19.0和GraphPad Prism 5.0统计学软件,计算数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MAP30抑制骨髓瘤细胞的增殖能力

CCK-8法检测结果(图1)显示,3种骨髓瘤细胞PRMI-8226、NCI-H929、U266在不同浓度(1~10 $\mu\text{mol/L}$)的MAP30作用下,细胞增殖的抑制效果呈现剂量依赖性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);不同作用时间下(24~72 h),对细胞增殖的抑制呈现时间依赖性(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。上述结果表明,MAP30可抑制骨髓瘤细胞的增殖活性,且其对细胞增殖的抑制作用呈时间和剂量依赖关系。

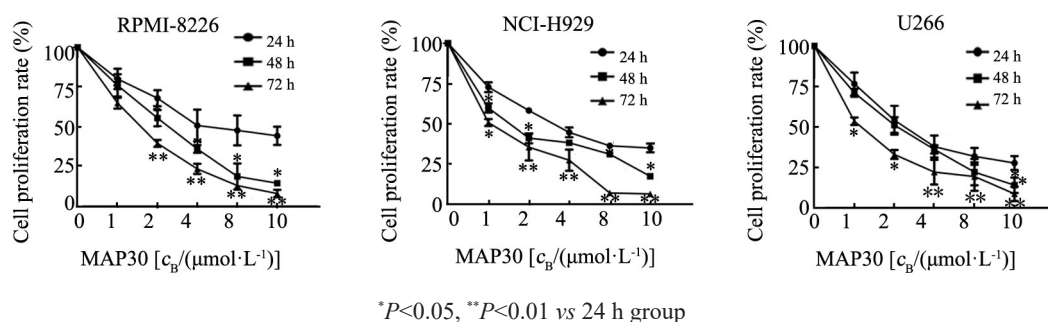


图1 CCK-8法检测MAP30对3种不同骨髓瘤细胞株增殖的抑制效果
Fig.1 MAP30 inhibits cell proliferation of multiple myeloma cells by CCK-8

2.2 MAP30促进骨髓瘤细胞的凋亡和自噬

流式细胞术检测结果显示,不同浓度(0~4 $\mu\text{mol/L}$)的MAP30作用骨髓瘤细胞24、48 h后,细胞凋亡率明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图2A)。Wb检测结果显示,不同浓度(0~4 $\mu\text{mol/L}$)的MAP30作用骨髓瘤细胞48 h后,细胞凋亡相关蛋白PARP裂解程度明显增加($P < 0.05$,图2B);自噬相关蛋白P62表达水平明显降低,LC3II表达水平明显升高(均 $P < 0.05$,图

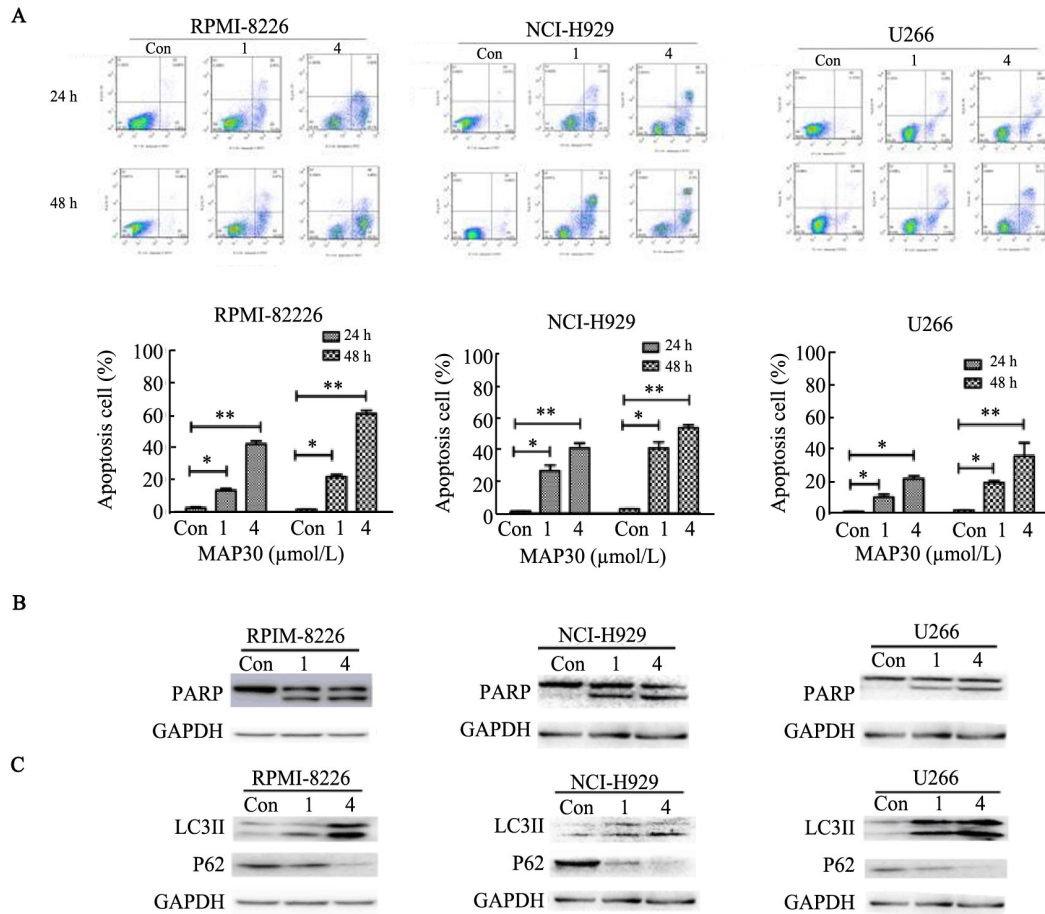
2C),提示在MAP30抑制骨髓瘤细胞增殖过程中有部分细胞发生自噬变化。

2.3 MAP30通过同时促进骨髓瘤细胞的自噬和凋亡发挥抗肿瘤作用

CCK-8法检测结果显示,MAP30+Rap作用骨髓瘤细胞后,对细胞增殖抑制率明显高于MAP30、Rap和Con,MAP30高于MAP30+Baf、Baf和Con(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图3A)。流式细胞术检测结果显示,

MAP30+Rap 组细胞凋亡率明显高于 MAP30、Rap 和 Con (均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3B), 表明 MAP30+Rap 相较单用 MAP30 或 Rap 细胞凋亡率明显增加, PARP 表达水平增加。Wb 检测结果显示, MAP30+Rap 作用骨髓瘤 RPMI-8226、H929、U266 细胞 48 h, 其凋亡

蛋白 PARP 表达升高、自噬蛋白 P62 降低和 LC3II 表达升高 (均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3C)。以上结果表明, MAP30 能抑制骨髓瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 诱导细胞自噬, 其中凋亡和自噬共同发挥杀伤肿瘤细胞作用。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: Flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of RPMI-8226, H929 and U266 cells 24 and 48 h after treatment with 0, 1 and 4 $\mu\text{mol/L}$ MAP30; B: Wb was used to detect the expression of PARP protein in RPMI-8226, H929 and U266 cells treated with 0, 1 and 4 $\mu\text{mol/L}$ MAP30 for 48 h; C: Wb was used to detect the expression levels of autophagic protein P62 and LC3II in RPMI-8226, H929, U266 cells for 48 h after treatment with 0, 1 and 4 $\mu\text{mol/L}$ MAP30. 1: MAP30 1 $\mu\text{mol/L}$ group; 4: MAP30 4 $\mu\text{mol/L}$ group

图2 MAP30对骨髓瘤细胞凋亡和自噬的影响

Fig.2 Effect of MAP30 on the apoptosis and autophagy of multiple myeloma cells

2.4 MAP30可能通过AKT/mTOR通路调节骨髓瘤细胞的自噬和凋亡

Wb检测结果(图4)显示, MAP30(0~4 $\mu\text{mol/L}$)作用骨髓瘤细胞后, 随着浓度的升高, 通路相关蛋白磷酸化的AKT(p-AKT)及磷酸化的mTOR(p-mTOR)表达水平明显降低(均 $P < 0.05$), 表明MAP30有可能通过AKT/mTOR通路来促进骨髓瘤细胞凋亡, 诱导细胞自噬。

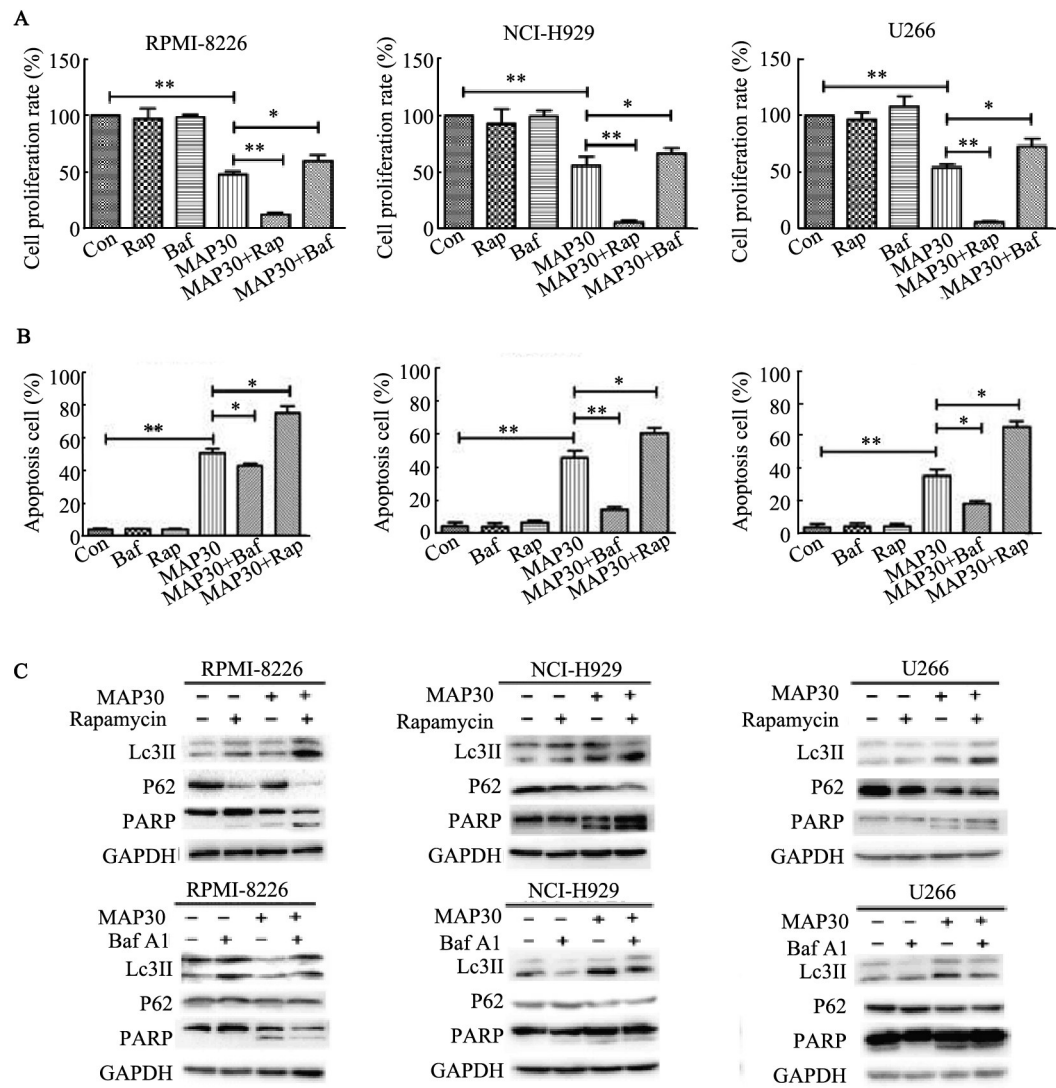
3 讨论

多发性骨髓瘤是一种难治的血液系统肿瘤, 其主要表现为分泌大量的单克隆免疫球蛋白并累及身体其他系统和器官^[15]。随着蛋白酶体抑制剂和免疫调节剂等新药的使用, 以及自体干细胞移植技术和支持治疗的改善, 在过去的几年时间里, 骨髓瘤患者的总体生存率得到显著提高^[3], 但是伴随着骨髓瘤克隆演化、耐药性的产生, 寻找一种新型的治疗方法非常必要。

自噬作为一种高度保守的由应激诱导的能量代谢过程^[16], 通常认为自噬在饥饿时通过降解回收细胞

质内物质和细胞器而得以存活, 其对于细胞是一种保护机制。但是近年研究发现, 自噬在肿瘤中发挥着—把双刃剑的作用。有证据^[17]显示, 自噬在转化细胞中升高且有益于肿瘤的维持和进展。另一方面, 也有证据^[18]表明, 过度自噬可以作为肿瘤的抑制机制。多发性骨髓瘤产生的大量蛋白引起蛋白应激, 通过泛素蛋白酶体系统分解折叠蛋白反应和自噬来

消化过多的蛋白。显而易见, 在骨髓瘤细胞中自噬通过清除细胞内聚集的蛋白发挥保护性的作用。而在最近的研究中, 有学者^[19]认为, 失去调节的自噬可导致多发性骨髓瘤细胞自体破坏, 但如何通过调节自噬达到抗肿瘤和改善疾病的进展仍然需要更深层次的探究。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: MAP30 combined with Rap reduces the increment rate of RPMI-8226, H929 and U266 cells by CCK-8; B: MAP30 combined with Rap increases apoptotic rate of RPMI-8226, H929 and U266 cells by flow cytometry; C: Effects of MAP30 combined with Rap on the expressions of apoptotic protein PARP, autophagic protein P62 and LC3II in myeloma RPMI-8226, H929 and U266 cells by Wb

图3 MAP30 诱导骨髓瘤细胞的凋亡和自噬

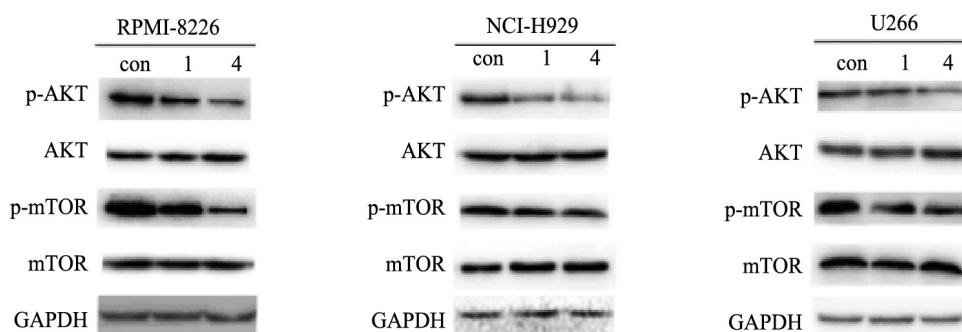
Fig.3 MAP30 induced apoptosis and autophagy of myeloma cells

MAP30 作为一种提取自苦瓜种子中的蛋白^[8], 来源广泛, 价格相对便宜。在既往的研究^[10-11]中, 已经发现其对直肠癌、肝癌、肺癌细胞有杀伤和促凋亡作用, 但是 MAP30 对骨髓瘤的作用未曾涉及到。本研究首先探讨了 MAP30 影响骨髓瘤细胞 RPMI-8226、

NCI-H929 和 U266 的增殖活性。CCK-8 法检测不同浓度 (0~10 $\mu\text{mol/L}$) 的 MAP30 作用骨髓瘤细胞后, 在不同时间点 (24, 48, 72 h) 检测发现, MAP30 对骨髓瘤细胞增殖有抑制作用, 且其抑制细胞增殖呈时间和剂量依赖关系, 证实 MAP30 对细胞增殖有影响。

为了进一步验证MAP30是否通过调控骨髓瘤细胞的凋亡或者自噬来抑制增殖,MAP30(0~4 $\mu\text{mol/L}$)分别作用骨髓瘤细胞24、48 h后,行Annexin V/PI流式细胞术进行检测,结果显示,MAP30可促进骨髓瘤RPMI-8226、H929、U266细胞的凋亡。同时,对MAP30作用48 h的细胞提取蛋白后行Wb检测,结果发现,MAP30作用后骨髓瘤细胞PARP裂解增多,提示MAP30促进骨髓瘤细胞凋亡,从而杀伤骨髓瘤细胞。目前已有研究^[16]证实,MAP30可通过诱导自噬发挥抗肿瘤作用,因此本研究进一步观察了MAP30对骨髓瘤细胞自噬水平的影响。将不同浓度(0~4 $\mu\text{mol/L}$)的MAP30作用于RPMI-8226、H929、U266细胞株48 h后,Wb检测结果显示,随MAP30浓度增加,自噬相关蛋白P62表达水平明显降低,LC3II表达明显增加,此结果提示在MAP30抑制骨髓瘤细胞增殖、促进细胞凋亡这一过程中,自噬相关蛋白表达水平发生变化,说明可能有部分细胞发生了自噬。目前

有研究^[20]认为,凋亡和自噬并不是两个相互独立的过程,两者可协同发挥抗肿瘤的作用。已有文献^[15]报道,在神经酰胺治疗乳腺癌和结肠癌中均发现凋亡与自噬的同时上调。因此本研究将继续探寻MAP30抗肿瘤作用中凋亡和自噬之间的关系,使用自噬激动剂Rap及自噬抑制剂Baf,分别通过促进和抑制自噬来观察细胞的变化从而探讨MAP30是否也通过诱导细胞自噬来发挥抗肿瘤的作用。本研究结果显示,MAP30+Rap相较单用MAP30或Rap后,对细胞增殖的抑制程度增加,PARP表达水平增加,细胞凋亡增加,P62表达水平降低,LC3II表达水平增加,细胞自噬增加。相反,MAP30+Raf后较单用MAP30对细胞增殖的抑制程度降低,PARP表达水平降低,细胞凋亡减少,P62表达水平增加,LC3II表达水平降低,细胞自噬减少。表明MAP30能抑制骨髓瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,诱导细胞自噬,其中凋亡和自噬共同发挥杀伤肿瘤作用。



1: MAP30 1 $\mu\text{mol/L}$ group; 4: MAP30 4 $\mu\text{mol/L}$ group

图4 AKT/mTOR通路中MAP30对骨髓瘤细胞自噬和凋亡的影响

Fig.4 Effect of MAP30 on autophagy and apoptosis of multiple myeloma cells in Akt/mTOR pathway

有文献^[21-22]报道,氯喹啉通过mTOR信号通路诱导了白血病和骨髓瘤细胞的自噬和凋亡,且AKT/mTOR通路对于细胞正常的能量代谢、细胞增殖以及细胞的生存和凋亡都起到关键性作用。因此,本研究将初步探讨MAP30促进自噬和凋亡与AKT/mTOR通路的关系。将(0~4 $\mu\text{mol/L}$)的MAP30作用骨髓瘤细胞株48 h后,Wb检测结果显示p-AKT及p-mTOR水平明显降低。说明MAP30有可能通过AKT/mTOR通路来促进骨髓瘤细胞凋亡,诱导细胞自噬。

综上所述,本研究发现苦瓜蛋白MAP30能抑制骨髓瘤细胞增殖、促进凋亡、诱导自噬,且自噬协同凋亡共同发挥抗骨髓瘤细胞作用,其机制可能通过AKT/mTOR通路来调节骨髓瘤细胞的自噬和凋亡。因此,苦瓜蛋白MAP30有望成为一种针对多发性骨髓瘤新的治疗药物。

[参考文献]

- [1] SMITH D, YONG K. Multiple myeloma[J/OL]. BMJ, 2013, 346: 3863[2019-01-11]. <https://www.bmj.com/content/346/bmj.f3863>. DOI:10.1136/bmj.f3863.
- [2] KYLE R A, RAJKUMAR S V. Multiple myeloma[J]. N Engl J Med, 2004, 351(18): 1860-1873. DOI:10.1056/NEJMra041875.
- [3] COOPER D L. Treatment of relapsed multiple myeloma[J]. N Engl J Med, 2015, 372(18): 1774-1777. DOI:10.1056/NEJMc1501348.
- [4] ZENG W, WANG X, XU P, et al. Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro[J]. Theranostics, 2015, 5(6): 559-562. DOI: 10.7150/thno.11548.
- [5] BOYA P, REGGIORI F, CODOGNO P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7): 713-720. DOI:10.1038/ncb2788.
- [6] DORIA A, GATTO M, PUNZI L. Autophagy in human health and disease[J]. N Engl J Med, 2013, 368(19):1845-1851. DOI:10.1056/NEJMc1303158.

- [7] JOHANSEN T, LAMARK T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins[J]. *Autophagy*, 2011, 7(3): 279-296. DOI: 10.4161/autophagy.7.3.14072.
- [8] BOURINBAIAR A S, LEE-HUANG S. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219(3): 923-929. DOI:10.4161/autophagy.7.3.14072.
- [9] WANG Y X, JACOB J, WINGFIELD P T, et al. Anti-HIV and anti-tumor protein MAP30, a 30 KD single-strand type-I RIP, shares similar secondary structure and beta-sheet topology with the a chain of ricin, a type-II RIP[J]. *Protein Sci*, 2000, 9(1): 138-144. DOI: 10.1110/ps.9.1.138.
- [10] FANG E F, ZHANG C Z, WONG J H, et al. The MAP30 protein from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2012, 324(1): 66-74. DOI:10.1016/j.canlet.2012.05.005.
- [11] HLIN H, ZHI G Z, CONG H H, et al. Expression of momordica charantia MAP30 and its antitumor effect on bladder cancer cells [J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2016, 68(3): 275-281.
- [12] QIAN S, SUN L, LI J, et al. MAP30 inhibits autophagy through enhancing acetyltransferase P300 and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3705-3713. DOI: 10.3892/or.2016.4705.
- [13] FAN G, YU J, ASARE P F, et al. Danshensu alleviates cardiac ischaemia/reperfusion injury by inhibiting autophagy and apoptosis via activation of mTOR signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(10): 1908-1919. DOI:10.1111/jcmm.12883.
- [14] LI J, ZHOU J, ZHANG D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance autophagy via PI3K/AKT signalling to reduce the severity of ischaemia/reperfusion-induced lung injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(10): 2341-2351. DOI:10.1111/jcmm.12638.
- [15] PALUMBO A, ANDERSON K. Multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(11): 1046-1060. DOI:10.1056/NEJMra1011442.
- [16] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42. DOI:10.1016/j.cell.2007.12.018.
- [17] WHITE E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(6): 401-410. DOI: 10.1038/nrc3262.
- [18] ARONSON L I, DAVIES F E. DangER: protein overload. Targeting protein degradation to treat myeloma[J]. *Haematologica*, 2012, 97(8): 1119-1130. DOI:10.3324/haematol.2012.064923.
- [19] ELGENDY M, SHERIDAN C, BRUMATTI G, et al. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival[J]. *Mol Cell*, 2011, 42(1): 23-35. DOI:10.1016/j.molcel.2011.02.009.
- [20] PATTINGRE S, BAUVY C, CARPENTIER S, et al. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 2719-2728. DOI: 10.1074/jbc.M805920200.
- [21] 赵家义, 韩一平. PI3K-AKT-mTOR 信号通路抑制剂与肿瘤免疫治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(12): 1424-1430. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.015.
- [22] CAO B, LI J, ZHOU X, et al. Clioquinol induces pro-death autophagy in leukemia and myeloma cells by disrupting the mTOR signalling pathway[J/OL]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5749[2019-01-11]. <https://www.nature.com/articles/srep05749>. DOI:10.1038/srep05749.

[收稿日期] 2018-12-15

[修回日期] 2019-02-11

[本文编辑] 王映红