

DOCK1 通过 AMPK/mTOR 通路对多发性骨髓瘤细胞增殖、凋亡和自噬的调控机制研究

李 丹, 张忠山, 李洵婷, 曹苏娟 (湘南学院附属医院肿瘤科, 湖南郴州 423000)

摘要: 目的 探讨胞质分裂作用因子1 (dedicator of cytokinesis 1, DOCK1) 在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 中的表达及其对癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响及相关机制。方法 选取 MM 患者骨髓组织及人 MM 细胞株 U266 和 RPMI 8266 进行研究, 采用实时荧光定量 PCR (real time-quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测 MM 骨髓组织及细胞中 DOCK1 相对表达; 构建敲低 DOCK1 表达细胞系, 采用 CCK-8 法和流式细胞术检测 DOCK1 对 MM 细胞增殖与凋亡的影响; Western blot 实验检测细胞增殖相关蛋白 (c-Myc, cyclin D1)、凋亡相关蛋白 (Bax, Bcl-2)、自噬相关蛋白 (LC3-II/LC3-I, P62) 及 AMPK/mTOR 通路相关蛋白的表达水平。结果 LV-DOCK1-shRNA2 组的 U266 和 RPMI 8266 细胞增殖率在 24, 48 和 72h 均显著低于空白对照组和阴性对照组, 差异均有统计学意义 ($F_{U266}=21.130 \sim 100.108$, $F_{RPMI8266}=35.067 \sim 95.677$, 均 $P<0.001$)。LV-DOCK1-shRNA2 组的 U266 和 RPMI 8266 细胞增殖相关蛋白 c-Myc, cyclin D1 表达水平均显著低于阴性对照组和空白对照组 ($F_{U266}=56.061, 71.584$; $F_{RPMI8266}=93.248, 62.146$, 均 $P<0.001$)。LV-DOCK1-shRNA2 组的 U266, RPMI 8266 细胞 24h, 48h 凋亡率显著高于阴性对照组和空白对照组 ($F_{U266}=77.051, 61.533$; $F_{RPMI8266}=60.868, 68.306$, 均 $P<0.001$)。与空白对照组和阴性对照组比较, LV-DOCK1-shRNA2 组 U266 和 RPMI 8266 细胞凋亡相关蛋白 Bax 表达水平明显升高, Bcl-2 表达水平明显降低 ($F_{U266}=92.588, 21.940$; $F_{RPMI8266}=82.736, 14.511$, 均 $P<0.05$)。自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 表达水平明显升高, P62 表达水平明显降低 ($F_{U266}=147.1, 26.342$; $F_{RPMI8266}=173.300, 31.477$, 均 $P<0.05$)。LV-DOCK1-shRNA2 组 U266, RPMI 8266 细胞 AMPK/mTOR 通路相关蛋白 p-AMPK 表达水平明显高于阴性对照组和空白对照组 ($F_{U266}=40.542, F_{RPMI8266}=40.892$, 均 $P<0.05$)。p-mTOR 表达水平明显低于阴性对照组和空白对照组 ($F_{U266}=38.707, F_{RPMI8266}=43.002$, 均 $P<0.05$)。在 LV-DOCK1-shRNA2 组再次转染 DOCK1 过表达质粒使其表达恢复后, p-AMPK 和 p-mTOR 表达水平也被逆转得到恢复。结论 DOCK1 在多发性骨髓瘤细胞中具有促癌作用, 其机制可能与通过抑制 AMPK/mTOR 通路, 抑制多发性骨髓瘤细胞的凋亡和自噬有关。

关键词: 多发性骨髓瘤; 胞质分裂作用因子; AMPK/mTOR 通路; 增殖; 凋亡; 自噬

中图分类号: R733.3; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 03-062-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.013

Regulation Mechanism of DOCK1 on Proliferation, Apoptosis and Autophagy of Multiple Myeloma Cells Through AMPK/mTOR Pathway

LI Dan, ZHANG Zhong-shan, LI Xun-ting, CAO Su-juan

(Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Xiangnan College, Hunan Chenzhou 423000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of dedicator of cytokinesis 1 (DOCK1) in multiple myeloma (MM) and its effects on proliferation, apoptosis and autophagy of cancer cells and related mechanisms. **Methods** Bone marrow tissue of MM patients and human MM cell line U266 and RPMI 8266 were selected for the study. Real time-quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the relative expression of DOCK1 in MM bone marrow tissues and cells. Knockdown DOCK1 expression cell lines were constructed, and the effects of DOCK1 on MM cell proliferation and apoptosis were detected by CCK-8 method and flow cytometry. Western blot assay was used to detect the expression levels of proliferation-related proteins (C-MYC, cyclin D1), apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2), autophagy related proteins (LC3-II/LC3-I, P62) and AMPK/mTOR pathway related proteins. **Results** The proliferation rates of U266 and RPMI8266 cells in LV-DOCK1-shRNA2 group were significantly lower than those in blank control group and negative control group at 24, 48 and 72h, the differences were statistically significant ($F_{U266}=21.130 \sim 100.108$, $F_{RPMI8266}=35.067 \sim 95.677$, all $P < 0.001$). The expression levels of proliferation-related proteins C-myc and Cyclin D1 in LV-DOCK1-shRNA2 group were significantly lower than those in negative control group and blank control group ($F_{U266}=56.061, 71.584$, $F_{RPMI8266}=93.248, 62.146$, all $P < 0.001$). Apoptosis rates of

基金项目: 湖南省科技计划一般项目 (2019SK3151)。

作者简介: 李丹 (1987-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 血液肿瘤方向, E-mail: xueqing37@163.com。

通讯作者: 曹苏娟 (1978-), 女, 本科, 硕士, 主任医师, 研究方向: 肿瘤化疗。

U266 and RPMI8266 cells in LV-DOCK1-shRNA2 group were significantly higher than those in negative control group and blank control group at 24h and 48h ($F_{U266}=77.051, 61.533, F_{RPMI8266}=60.868, 68.306$, all $P < 0.001$). Compared with blank control group and negative control group, the expression level of apoptosis-related protein Bax in U266 and RPMI 8266 cells in LV-DOCK1-shRNA2 group was significantly increased, and the expression level of Bcl-2 was significantly decreased ($F_{U266}=92.588, 21.940$, respectively. $F_{RPMI8266}=82.736, 14.511$, all $P < 0.05$). The expression level of autophagy related protein LC3-II/LC3-I was significantly increased, and the expression level of P62 was significantly decreased ($F_{U266}=147.178, 26.342$, $F_{RPMI8266}=173.300, 31.477$, all $P < 0.05$). The expression level of AMPK/mTOR pathway related protein p-AMPK in U266 and RPMI8266 cells in LV-DOCK1-shRNA2 group was significantly higher than that in negative control group and blank control group ($F_{U266}=40.542, F_{RPMI8266}=40.892$, all $P < 0.05$). The expression level of p-mTOR was significantly lower than that of negative control group and blank control group ($F_{U266}=38.707, F_{RPMI8266}=43.002$, all $P < 0.05$). In the LV-DOCK1-shRNA2 group, the expression of DOCK1-overexpressed plasmid was recovered by transfection, and the expression levels of P-AMPK and P-MTOR were also reversed and recovered. **Conclusion** DOCK1 has a carcinogenic effect in multiple myeloma cells, and the mechanism may be related to inhibiting apoptosis and autophagy of multiple myeloma cells by inhibiting AMPK/mTOR pathway.

Keywords: multiple myeloma; DOCK1; AMPK/mTOR pathway; proliferation; apoptosis; autophagy

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 起源于骨髓造血组织, 是浆细胞过度增生所致的恶性肿瘤, 多发于 40 ~ 60 岁中年男性^[1-2]。了解 MM 发病机制和分子改变对改善患者生存质量具有重要意义。近年研究发现, 胞质分裂作用因子 1 (dedicator of cytokinesis 1, DOCK1) 在乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中表现出的促癌基因属性, 能够促进肿瘤细胞生长、侵袭、转移等生物学过程, 且与部分实体瘤患者不良预后相关^[3-5]。另研究还发现, DOCK1 可抑制白血病 SKM-1 细胞生长、诱导细胞凋亡, 在骨髓增生异常综合征向急性髓系白血病的转化中扮演促进作用^[6]。PAN 等^[7] 研究报道, 依诺肝素通过抑制 DOCK1 表达及波形蛋白磷酸化和 Akt 激活, 可使非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感度增加, 提示 DOCK1 可能是一个新的肿瘤治疗靶标。因此探究 DOCK1 在 MM 中的作用及机制可为 MM 的临床治疗提供新的方向。腺苷酸活化蛋白激酶 (5'-AMP activated protein kinase, AMPK) / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路和氧化应激在肿瘤生长、凋亡等过程中发挥重要作用^[8]。研究发现, MM 细胞株存在 AMPK 的磷酸化激活, 在紫杉醇治疗前使用 AMPK 抑制剂 Compound C 进行预处理可诱导 MM 细胞凋亡^[9]。基于既往研究报道 DOCK1 的癌基因属性, 本研究观察了 DOCK1 在 MM 中的表达及其对癌细胞增殖、凋亡及自噬的作用, 并探讨了 DOCK1 是否可通过调控 AMPK/mTOR 通路参与调节 MM 细胞的增殖、凋亡和自噬, 以期 MM 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人多发性骨髓瘤细胞株 U266, RPMI 8266 及人正常骨髓细胞 MNC 均购自中国

科学院细胞库, 接种于含 10g/dl 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37℃, 5ml/dl CO₂ 恒温细胞培养箱中培养, 每隔 24 ~ 48 h 更换培养基 1 次, 待细胞生长至对数生长期时进行后续实验。另选取本院收治的多发性骨髓瘤患者及同期行骨髓穿刺并明确骨髓功能无异常的非血液病健康患者骨髓组织, 各 20 例, 检测骨髓组织中 DOCK1 表达情况。

1.2 仪器与试剂 胎牛血清, RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司); Trizol 试剂, Lipfetamine2000 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录盒 (日本 Takara 公司); CCK-8 试剂盒, Annexin V/PI 凋亡试剂盒 (中国贝博生物); RIPA 裂解液, PMSF 蛋白酶抑制剂, BCA 蛋白质测定试剂盒, SDS-PAGE 凝胶速配试剂盒 (碧云天生物科技公司); GAPDH 单克隆抗体, Bax 单克隆抗体, Bcl-2 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); c-Myc 单克隆抗体, cyclin D1 单克隆抗体, LC3II 单克隆抗体, P62 单克隆抗体, AMPK/p-AMPK 单克隆抗体及 mTOR/p-mTOR 单克隆抗体 (美国 CST 公司); DOCK1 沉默慢病毒 (LV-DOCK1-shRNA), 阴性对照慢病毒 (LV-NC) 及重组人 DOCK1 过表达质粒 hDOCK1-pCXN2-Flag (上海吉凯生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染: 取对数生长期待测细胞, 以 50 μ l/孔接种于 24 孔板, 分别加入 3 个 LV-DOCK1-shRNA, LV-NC 慢病毒及重组人 DOCK1 过表达质粒 hDOCK1-pCXN2-Flag, 室温静置 15 min 后加入 500 μ l 新鲜培养基, 孵育 24 h, 离心弃上清, 加入 500 μ l 新鲜培养基继续培养; 于病毒感染第 6 天, 加入 0.3 μ g/ml 嘌呤霉素, 连续培养 72 h, 换成不含嘌呤霉素的新鲜培养基培养 2 天; 在倒置荧光显微镜下观察转染多发性骨髓瘤细胞荧光强

度,当转染率>70%,细胞可用于后续实验,选取LV-DOCK1-shRNA转染效率最显著的一组进行后续研究。实验分组:主要设为空白对照组, LV-DOCK1-shRNA转染组, LV-NC(阴性对照组)及LV-DOCK1-shRNA+DOCK1过表达(hDOCK1组)共转染组。

1.3.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测DOCK1 mRNA相对表达:按照Trizol试剂说明书提取细胞总RNA,使用逆转录试剂盒合成cDNA,引物由上海生工生物科技有限公司设计合成,DOCK1引物序列为Forward:5'-GGATGACCTGGA GAAGGAG-3', Reverse:5'-CGCAGGGGACTTA TCGT-3'; GAPDH引物序列为Forward:5'-ACGG ATTTGGTCGTATTGG-3', Reverse:5'-TCCCCGTT CTCAGCCTTG-3'。配置20 μ l PCR反应体系,反应条件为95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 循环40次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$, Ct 值的含义是:每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖活性:取对数生长期细胞,离心后重悬细胞沉淀,以 5×10^4 个/ml的细胞密度接种于96孔板,每孔50 μ l细胞悬液,分别培养24, 48, 72 h时,每孔加入10 μ l CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C继续培养2 h,使用酶标仪检测450 nm处各孔吸光度值(A值)。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡:收集各组待测细胞,低速离心5 min,用PBS洗涤细胞2次,加入缓冲液收集细胞悬液,洗涤混匀后,取200 μ l细胞悬液至流式细胞管,按试剂盒说明书中建议的试剂体系用量依次加入5 μ l Annexin V-FITC及5 μ l PI后轻轻混匀,在室温下避光孵育15 min,采用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.3.5 Western blot检测相关蛋白表达:收集待测细胞,加入适量的RIPA裂解缓冲液,离心后提取细胞内总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度。用10 g/dl SDS-PAGE上样缓冲液电泳分离所有蛋白,转移至PVDF膜上,室温下摇床封闭1 h,分别加入增殖

相关蛋白c-Myc, cyclin D1; 凋亡相关蛋白Bax, Bcl-2; 自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I, P62及AMPK/mTOR通路相关蛋白AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR和内参GAPDH孵育过夜。用TBST清洗5次后,在室温下用二抗孵育1 h。然后再次用TBST清洗膜3次后采用电化学发光法(ECL)显色,观察目标蛋白灰色条带。

1.4 统计学分析 采用SPSS 20.0处理数据,计量资料结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验;癌组织及癌旁正常组织中表达差异比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MM组织及细胞中DOCK1相对表达 RT-qPCR检测显示,MM细胞U266, RPMI 8266中DOCK1相对表达分别为 9.84 ± 2.56 和 8.67 ± 2.42 ,明显高于人正常骨髓细胞MNC 1.32 ± 0.56 ,差异有统计学意义($F=15.088, P < 0.05$);同时检测发现,MM患者骨髓组织中DOCK1相对表达(0.57 ± 0.16)也明显高于健康患者(2.84 ± 0.73),差异有统计学意义($t=13.458, P < 0.001$)。表明DOCK1在多发性骨髓瘤中显著高表达。

2.2 DOCK1转染效果验证 见表1。RT-qPCR检测显示,转染LV-DOCK1-shRNA2组和LV-DOCK1-shRNA3组U266细胞中DOCK1 mRNA和蛋白表达水平均较空白对照组明显降低,其中LV-DOCK1-shRNA2组降低最为显著,差异有统计学意义($t_{\text{mRNA}}=8.499, 6.455; t_{\text{蛋白}}=9.712, 6.475$, 均 $P < 0.05$); LV-DOCK1-shRNA1组和阴性对照组U266细胞中DOCK1 mRNA和蛋白表达与空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。RPMI 8266细胞中DOCK1 mRNA水平和蛋白表达水平变化与U266细胞一致,以转染LV-DOCK1-shRNA2组降低最为显著($t_{\text{mRNA}}=8.312, 6.672; t_{\text{蛋白}}=10.114, 8.141$, 均 $P < 0.05$)。表明敲低DOCK1表达转染成功,后续实验中选择LV-DOCK1-shRNA2进行研究。

表1 DOCK1在U266, RPMI 8266细胞中的表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	表达水平	空白对照组	阴性对照组	LV-DOCK1-shRNA1组	LV-DOCK1-shRNA2组	LV-DOCK1-shRNA3组	F	P
U266	mRNA	1.01 ± 0.10	1.26 ± 0.19	1.23 ± 0.19	0.22 ± 0.05	0.41 ± 0.09	53.572	< 0.001
	蛋白	1.00 ± 0.10	1.22 ± 0.15	1.20 ± 0.14	0.16 ± 0.02	0.44 ± 0.06	61.198	< 0.001
RPMI 8266	mRNA	0.98 ± 0.09	1.16 ± 0.15	1.13 ± 0.16	0.22 ± 0.04	0.37 ± 0.07	47.146	< 0.001
	蛋白	1.02 ± 0.11	1.25 ± 0.13	1.23 ± 0.13	0.20 ± 0.03	0.36 ± 0.05	75.204	< 0.001

2.3 敲低DOCK1抑制细胞的增殖能力 见表2。CCK-8法检测显示, LV-DOCK1-shRNA2组的U266, RPMI 8266细胞增殖率在24, 48和72 h均显著低于

空白对照组($t_{\text{U266}}=11.840, 5.466, 5.360; t_{\text{RPMI 8266}}=10.788, 6.802, 6.617$, 均 $P < 0.05$)和阴性对照组,差异均有统计学意义(补充 t 值),阴性对

照组和空白对照组比较差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）。见表3。Western blot 检测结果显示，LV-DOCK1-shRNA2 组的 U266, RPMI 8266 细胞增殖相关蛋白 c-Myc, cyclin D1 表达水平也显著低

于空白对照组，差异均有统计学意义（ $t_{U266}=8.212, 10.271$ ； $t_{RPMI\ 8266\ 细胞}=11.676, 8.135$ ，均 $P < 0.05$ ）和阴性对照组（补充 t 值），阴性对照组和空白对照组差异亦无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）。

表 2 低 DOCK1 对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	时间 (h)	空白对照组	阴性对照组	LV-DOCK1-shRNA2 组	F	P
U266	24	0.71 ± 0.05	0.74 ± 0.06	0.26 ± 0.02	100.108	< 0.001
	48	1.13 ± 0.10	1.21 ± 0.13	0.68 ± 0.06	24.089	< 0.001
	72	1.45 ± 0.12	1.50 ± 0.14	0.92 ± 0.10	21.130	0.002
RPMI 8266	24	0.65 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.24 ± 0.02	95.677	< 0.001
	48	1.18 ± 0.10	1.30 ± 0.13	0.62 ± 0.06	38.872	< 0.001
	72	1.51 ± 0.12	1.62 ± 0.14	0.87 ± 0.09	35.067	< 0.001

表 3 敲低 DOCK1 对细胞中增殖相关蛋白 c-Myc, cyclin D1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	蛋白	空白对照组	阴性对照组	LV-DOCK1shRNA2 组	F	P
U266	c-Myc	1.00 ± 0.09	1.16 ± 0.18	0.22 ± 0.01*	56.061	< 0.001
	cyclin D1	1.01 ± 0.10	1.05 ± 0.10	0.31 ± 0.03*	71.584	< 0.001
RPMI 8266	c-Myc	1.04 ± 0.11	1.06 ± 0.09	0.25 ± 0.02*	93.248	< 0.001
	cyclin D1	1.02 ± 0.10	1.21 ± 0.12	0.41 ± 0.03*	62.146	< 0.001

2.4 敲低 DOCK1 促进细胞的凋亡和自噬 见表 4。流式细胞术检测显示，LV-DOCK1-shRNA2 组的 U266, RPMI 8266 细胞凋亡率 24, 48h 均显著高于空白对照组，差异均有统计学意义（ $t_{U266}=11.020, 9.815$ ； $t_{RPMI8266}=9.814, 10.346$ ，均 $P < 0.05$ ）和阴性对照组（补充 t 值），阴性对照组和空白对照组比较差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）。见表 5。Western blot 检测显示，与空白对照组和阴性对照组比较，LV-DOCK1-shRNA2

组的 U266, RPMI 8266 细胞凋亡相关蛋白 Bax 表达水平明显升高，Bcl-2 表达水平明显降低（ $t_{U266}=11.616, 5.587$ ； $t_{RPMI\ 8266}=10.717, 4.236$ ，均 $P < 0.05$ ）；自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 表达水平明显升高，P62 表达水平明显降低，差异均有统计学意义（ $t_{U266}=14.697, 6.340$ ； $t_{RPMI\ 8266}=15.940, 6.701$ ，均 $P < 0.05$ ）。阴性对照组和空白对照组比较差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）。

表 4 敲低 DOCK1 对细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	时间 (h)	空白对照组	阴性对照组	LV-DOCK1-shRNA2 组	F	P
U266	24	4.78 ± 0.62	5.52 ± 0.85	19.35 ± 2.60*	77.051	< 0.001
	48	5.01 ± 0.64	5.88 ± 0.89	24.87 ± 4.15*	61.533	< 0.001
RPMI 8266	24	4.26 ± 0.59	4.98 ± 0.62	17.32 ± 2.69*	60.868	< 0.001
	48	4.57 ± 0.60	5.38 ± 0.71	22.61 ± 3.58*	68.306	< 0.001

2.5 DOCK1 对 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 见表 6。Western blot 检测显示，与空白对照组和阴性对照组相比，LV-DOCK1-shRNA2 组的 U266, RPMI 8266 细胞中 AMPK/mTOR 通路相关蛋白 p-AMPK 表达水平明显升高（ $t_{U266}=9.804, t_{RPMI\ 8266\ 细胞}=9.749$ ，均 $P < 0.05$ ），p-mTOR 表达水平明显降低（ $t_{U266}=9.468, t_{RPMI\ 8266\ 细胞}=9.959$ ，均 $P < 0.05$ ），AMPK 和 mTOR 表达无显著变化；阴性对照组和空白对照组比较差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ），提示 DOCK1 参与 MM 发生可能与其调控 AMPK/mTOR 通路有关。与 LV-DOCK1-shRNA2+ hDOCK1 组比较，LV-DOCK1-shRNA2 组

的 U266, RPMI 8266 细胞中 AMPK/mTOR 通路相关蛋白 p-AMPK 表达水平明显升高（ $t_{U266}=7.749, t_{RPMI\ 8266\ 细胞}=6.927$ ，均 $P < 0.05$ ），p-mTOR 表达水平明显降低（ $t_{U266}=7.674, t_{RPMI\ 8266\ 细胞}=7.215$ ，均 $P < 0.05$ ）。为验证 DOCK1 是否真能调控 AMPK/mTOR 通路发挥作用，研究在 U266, RPMI 8266 细胞的 LV-DOCK1-shRNA2 组中转染重组人 hDOCK1-pCXN2-Flag 质粒使 DOCK1 表达恢复，发现 p-AMPK 和 p-mTOR 表达水平也被逆转得到恢复，见表 6。证实 DOCK1 确实可调控 AMPK/mTOR 通路来影响多发性骨髓瘤的发生。

表5 敲低 DOCK1 对细胞凋亡、自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	蛋白	空白对照组	阴性对照组	LV-DOCK1-shRNA2 组	F	P
U266	Bax	0.72 ± 0.06	0.67 ± 0.06	2.48 ± 0.31	92.588	< 0.001
	Bcl-2	1.37 ± 0.14	1.40 ± 0.15	0.79 ± 0.08	21.940	0.002
	LC3-II/LC3-I	0.98 ± 0.09	0.91 ± 0.09	4.22 ± 0.45	147.178	< 0.001
	P62	2.59 ± 0.42	2.56 ± 0.39	0.84 ± 0.12	26.342	0.001
RPMI 8266	Bax	0.80 ± 0.09	0.66 ± 0.08	2.67 ± 0.35	82.736	< 0.001
	Bcl-2	1.19 ± 0.20	1.30 ± 0.22	0.58 ± 0.07	14.511	0.005
	LC3-II/LC3-I	0.94 ± 0.10	0.87 ± 0.09	4.04 ± 0.39*	173.300	< 0.001
	P62	2.28 ± 0.32	2.35 ± 0.31	0.85 ± 0.08*	31.477	< 0.001

表6 DOCK1 对 AMPK/mTOR 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	蛋白	空白对照组	阴性对照组	LV-DOCK1-shRNA2 组	LV-DOCK1-shRNA2+ hDOCK1 组	F	P
U266	p-AMPK	1.00 ± 0.12	1.14 ± 0.11	2.67 ± 0.30	1.35 ± 0.24	40.542	<0.001
	AMPK	1.02 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.04 ± 0.12	1.03 ± 0.11	0.079	0.970
	p-mTOR	1.26 ± 0.17	1.20 ± 0.15	0.31 ± 0.03	1.08 ± 0.09	38.707	<0.001
	mTOR	1.03 ± 0.11	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.10	1.02 ± 0.08	0.027	0.993
RPMI 8266	p-AMPK	1.01 ± 0.09	1.08 ± 0.10	2.91 ± 0.37	1.56 ± 0.27	40.892	<0.001
	AMPK	1.04 ± 0.13	1.10 ± 0.12	1.13 ± 0.15	1.11 ± 0.14	0.245	0.862
	p-mTOR	1.34 ± 0.15	1.31 ± 0.14	0.36 ± 0.04	1.07 ± 0.12	43.002	<0.001
	mTOR	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.12	0.96 ± 0.09	0.99 ± 0.08	0.144	0.931

3 讨论

DOCKs 家族是一类具有鸟嘌呤核苷酸交换因子活性的蛋白家族,共包含 11 个家族成员^[10]。其中 DOCK1 异常是多种免疫缺陷疾病的重要原因,既往研究报道 DOCK1 基因的异常表达与某些肿瘤的发病机制、治疗和预后相关^[11-12],DOCK1 过表达可促进多种实体瘤的生长、转移、侵袭等。除了在实体瘤中的促癌作用,有研究发现,DOCK1 的过表达可导致急性髓系白血病的不良预后,其可能与干细胞特性、细胞增殖、迁移和趋化相关^[13]。但目前 DOCK1 对 MM 的作用未曾涉及到。本研究首先探讨了 DOCK1 对 MM 细胞增殖活性的影响,发现敲低 DOCK1 表达显著抑制了 MM 细胞的增殖,促进了细胞凋亡,提示 DOCK1 在 MM 中扮演促癌基因角色。

自噬是一种高度保守的由应激诱导的能量代谢过程,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,对细胞是一种保护机制^[14]。但近年来研究发现,细胞自噬在肿瘤发生发展中发挥既促进、又抑制的双重作用,一方面自噬可以作为一种防御机制,防止胞质内受损细胞器和代谢产物的堆积,保护受损的肿瘤细胞;另一方面,当细胞过度自噬时可作为肿瘤的抑制机制,与凋亡共同促进细胞死亡^[15-16]。因此如何通过调节自噬达到抗肿瘤

的目的仍需要更深层次的研究。LC3 是检测自噬活性最为常用的标志蛋白,研究表明在自噬过程中 LC3-I 会转化为 LC3-II,LC3-II 表达量与发生自噬的程度呈正比^[17]。自噬上游表达增强或者下游降解阻断,都会导致 P62 的聚集,最终 P62 会纳入成熟的自噬体内,并在自噬体内降解,表明 P62 表达水平与自噬负相关,通常 P62 的水平与 LC3-II/LC3-I 的大小结合起来作为评价自噬水平的高低^[18]。而本研究检测结果显示,敲低 DOCK1 表达明显促进了 MM 细胞自噬相关蛋白 LC3-II 的表达,而抑制了 P62 表达水平,提示 DOCK1 低表达可诱导 MM 细胞的自噬。

相关文献报道^[19],二甲双胍通过靶向 AMPK/mTORC1 和 mTORC2 通路可诱导骨髓瘤细胞自噬和 G0/G1 期细胞周期阻滞。AMPK/mTOR 通路在细胞增殖、代谢、凋亡、基因转录和细胞迁移中等发挥关键作用,AMPK 在多种肿瘤中起到抑癌作用,激活 AMPK 可抑制 mTOR 磷酸化,发挥抗肿瘤效应^[20]。本研究探究发现,敲低 DOCK1 表达后 AMPK/mTOR 通路相关蛋白 p-AMPK 表达水平明显升高,p-mTOR 表达水平明显降低;再次转染恢复 DOCK1 表达后,AMPK 和 mTOR 磷酸化水平被逆转,提示 DOCK1 可能通过调控 AMPK/mTOR 通路,进而调节 MM 细胞的增殖、凋亡和自

噬,参与MM的发生发展。然肿瘤发生机制复杂,DOCK1调控AMPK/mTOR通路影响MM发生的机制还需更进一步的研究去探究证实。

综上所述,DOCK1高表达可促进MM细胞增殖,抑制细胞的凋亡和自噬,其可能通过调控AMPK/mTOR信号通路参与了MM的发生发展,DOCK1有望成为治疗MM的潜在靶点。

参考文献:

- [1] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)[J].中华内科杂志,2020,59(5):341-346.
Chinese Hematology Association, Chinese Society of Hematology, Chinese Myeloma Committee-Chinese Hematology Association. The guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma in China(2020 revision)[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2020, 59(5):341-346.
- [2] 徐海燕,陆学东.多发性骨髓瘤早期实验诊断相关新兴生物标志物的最新研究进展[J].现代检验医学杂志,2021,36(5):180-183.
XU Haiyan, LU Xuedong. Recent research progress of novel biomarkers for early experimental diagnosis of multiple myeloma [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021,36(5):180-183.
- [3] LIANG Yueyang, WANG Shushu, ZHANG Yi. Downregulation of Dock1 and Elmo1 suppresses the migration and invasion of triple-negative breast cancer epithelial cells through the RhoA/Rac1 pathway [J]. Oncology Letters, 2018, 16(3): 3481-3488.
- [4] SUN Xujuan, LIU Shuqing, WANG Jinxia, et al. Annexin A5 regulates hepatocarcinoma malignancy via CRK1/II-DOCK180-RAC1 integrin and MEK-ERK pathways[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(6): 637.
- [5] FERRARI M G, GANAIE A A, SHABENAH A, et al. Identifying and treating ROBO1^{ve}/DOCK1^{ve} prostate cancer: An aggressive cancer subtype prevalent in African American patients[J]. The Prostate, 2020, 80(13): 1045-1057.
- [6] ZHANG Gaoqi, ZHANG Jilei, YANG Xinrui, et al. High expression of dedicator of cytokinesis 1 adversely influences the prognosis of acute myeloid leukemia patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Cancer Management and Research, 2019, 11: 3053-3060.
- [7] PAN Yan, LI Xin, DUAN Jianhui, et al. Enoxaparin sensitizes human non-small-cell lung carcinomas to gefitinib by inhibiting DOCK1 expression, vimentin phosphorylation, and Akt activation[J]. Molecular Pharmacology, 2015, 87(3): 378-390.
- [8] 王振,胡峻铮,范卫民.脂联素通过AMPK/mTOR通路抑制H₂O₂诱导的大鼠髓核细胞凋亡及细胞外基质退变[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(7):928-933,961.
WANG Zhen, HU Junzheng, FAN Weimin. Adiponectin inhibits H₂O₂-induced apoptosis and extracellular matrix degradation in rat nucleus pulposus cells through AMPK/mTOR pathway [J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences), 2018, 38(7): 928-933, 961.
- [9] MEI Huiling, XIANG Yu, MEI Heng, et al. Pterostilbene inhibits nutrient metabolism and induces apoptosis through AMPK activation in multiple myeloma cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(5): 2676-2688.
- [10] 蒙星烨,肖晶莹,谭哲伦,等.细胞质分裂付出蛋白1在肿瘤发生发展中的作用[J].生理科学进展,2019,50(5):343-347.
MENG Xingye, XIAO Jingying, TAN Zhelun, et al. The role of cytokinesis donor protein 1 in tumorigenesis and development[J]. Progress in Physiological Sciences, 2019, 50(5): 343-347.
- [11] TOMINO T, TAJIRI H, TATSUGUCHI T, et al. DOCK1 inhibition suppresses cancer cell invasion and macropinocytosis induced by self-activating Rac1(P29S) mutation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 497(1): 298-304.
- [12] LI Wenjing, XIONG Xiahui, ABDALLA A, et al. HGF-induced formation of the MET-AXL-ELMO2-DOCK180 complex promotes RAC1 activation, receptor clustering, and cancer cell migration and invasion[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(40): 15397-15418.
- [13] YANG Xiaoyu, WANG Yan, PANG Sulei, et al. LINC00665 promotes the progression of acute myeloid leukemia by regulating the miR-4458/DOCK1 pathway[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 5009.
- [14] 田向东,夏雨人,周德俊,等.自噬在肿瘤细胞休眠中作用及相关机制研究进展[J].中国实用外科杂志,2022,42(3):331-336.
TIAN Xiangdong, XIA Yuren, ZHOU Dejun, et al. Role of autophagy in tumor cell dormancy and underlying mechanism [J]. Chin J Practical Surgery, 2022, 42(3): 331-336.
- [15] MOWERS E E, SHARIFI M N, MACLEOD K F. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis[J]. The FEBS Journal, 2018, 285(10): 1751-1766.
- [16] SUI Tianqi, WANG Xiaoyang, LI Lili, et al. GOLM1 suppresses autophagy-mediated anti-tumor immunity in hepatocellular carcinoma[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 335.
- [17] 魏砚明,任晋宏,栾智华,等.多种细胞自噬调节剂对自噬标记物LC3 II及p62表达的影响[J].中国药科大学学报,2018,49(3):341-347.
WEI Yanming, REN Jinhong, LUAN Zhihua, et al. Effects of various autophagy modulators on the expression of autophagic markers LC3 II and p62 [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2018, 49(3): 341-347.
- [18] 李志元,张欣.细胞自噬研究方法的比较与分析[J].生物学杂志,2018,35(4):1-6.
LI Zhiyuan, ZHANG Xin. Comparison and analysis of methods in autophagy research [J]. Journal of Biology, 2018, 35(4): 1-6.

- [19] WANG Yan, XU Wenbin, YAN Zixun, et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018, 37(1): 63.
- [20] XIAO Feng, OUYANG Binshen, ZOU Jue, et al. Trim14 promotes autophagy and chemotherapy resistance of gastric cancer cells by regulating AMPK/mTOR pathway[J]. Drug Development Research, 2020, 81(5): 544-550.
- 收稿日期: 2021-10-12
修回日期: 2022-05-13
-
- (上接第46页)
- WU Chunxiao, GU Kai, WANG Chunfang, et al. Incidence of female breast cancer in Shanghai: current evidence and a comparative retrospective study [J]. Journal of Surgery Concepts & Practice, 2019, 24 (5): 421-427.
- [8] 陈倩欣, 张怡心, 李科, 等. 广州市2008-2017年全人群女性乳腺癌特征及其与预后的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1831-1835.
- CHEN Qianxin, ZHANG Yixin, LI Ke, et al. Characteristics and prognosis of female breast cancer in Guangzhou, 2008~2017[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2020, 41 (11): 1831-1835.
- [9] 钱俊华, 王莹莹, 杨艳蕾, 等. 江苏省海门市1999-2016年成年女性乳腺癌发病及死亡趋势分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24 (2): 189-193, 209.
- QIAN Junhua, WANG Yingying, YANG Yanlei, et al. Analysis on incidence and death trend of breast cancer in adult women from 1999 to 2016 in Haimen, Jiangsu Province [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2020, 24 (2): 189-193, 209.
- [10] 樊弘, 周礼平, 蒙荣钦. 彩色多普勒超声成像在乳腺癌诊断及化疗效果评估中的意义[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34 (3): 497-499, 503.
- FAN Hong, ZHOU Liping, MENG Rongqin. Significance of color Doppler ultrasonography in breast cancer diagnosis and chemotherapy evaluation [J]. The Practical Journal of Cancer, 2019, 34 (3): 497-499, 503.
- [11] 杨红波, 杜志权, 马立岩, 等. 动态增强MRI与乳腺DR钼靶对致密型乳腺T1及Tis期乳腺癌诊断的价值分析[J]. 中国CT和MRI杂志, 2021, 135 (1): 101-103.
- YANG Hongbo, DU Zhiquan, MA Liyan, et al. Value of dynamic enhanced MRI and breast DR mammography in the diagnosis of dense breast cancer in T1 and Tis phases [J]. Chinese Journal of CT and MRI, 2021, 135 (1): 101-103.
- [12] MUKHERJEE S, SEN S, ADHIKARY S, et al. A novel role of tumor suppressor ZMYND8 in inducing differentiation of breast cancer cells through its dual-histone binding function[J]. Journal of Biosciences, 2020, 45(1): 2. PMID:31965980.
- [13] GUO Ling, ZHU Ye, LI Liandi, et al. Breast cancer cell-derived exosomal miR-20a-5p promotes the proliferation and differentiation of osteoclasts by targeting SRCIN1[J]. Cancer Medicine, 2019, 8(12): 5687-5701.
- [14] YU Bowen, YUAN BO, KIYOMI A, et al. Differentiation induction of human breast cancer cells by arsenite in combination with tetrandrine[J]. American Journal of Translational Research, 2019, 11(12): 7310-7323.
- [15] 周琪, 刘昊, 都一鸣, 等. MiR-195通过下调IGF-1R的表达抑制胶质母细胞瘤的增殖和迁移[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19 (20): 3807-3811.
- ZHOU Qi, LIU Hao, DU Yiming, et al. MiR-195 inhibits the proliferation and migration of glioblastoma through down-regulation the expression of IGF-1R[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2019, 19 (20): 3807-3811.
- [16] 李丹娟, 陈玮, 周兴平, 等. 绝经后乳腺癌与血清性激素及胰岛素样生长因子的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35 (23): 4456-4458.
- LI Danjuan, CHEN Wei, ZHOU Xingping, et al. Correlation between serum levels of sex hormones and insulin-like growth factors in postmenopausal women with breast cancer [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2020, 35 (23): 4456-4458.
- [17] 刘晓伟, 张宏. 胰岛素样生长因子1受体在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. 内蒙古医科大学学报, 2019, 41(4): 368-369, 373.
- LIU Xiaowei, ZHANG Hong. Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in breast cancer and its significance [J]. Journal of Inner Mongolia Medical University, 2019, 41 (4): 368-369, 373.
- [18] 王宏, 王庚, 田文玲. miR-126靶向胰岛素样生长因子1受体抑制胃癌增殖与侵袭的机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41 (7): 508-515.
- WANG Hong, WANG Geng, TIAN Wenling. MiR-126 inhibits the proliferation and invasion of gastric cancer by downregulation of IGF-1R [J]. Chinese Journal of Oncology, 2019, 41 (7): 508-515.
- [19] 张瑞敏, 芦晓, 晏妮. 宫颈癌患者血清胰岛素样生长因子1, 基质金属蛋白酶9的水平及临床意义[J]. 癌症进展, 2019, 17 (18): 2204-2206, 2226.
- ZHANG Ruimin, LU Xiao, YAN Ni. Serum levels of insulin-like growth factor 1 and matrix metalloproteinase 9 in patients with cervical cancer and their clinical significance [J]. Oncology Progress, 2019, 17 (18): 2204-2206, 2226.
- [20] 谭生权, 张碧涛, 孙建华. 血清胰岛素样生长因子1与E-钙黏蛋白在胃癌患者中的表达及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33 (5): 467-470.
- TAN Shengquan, ZHANG Bitao, SUN Jianhua. Expressions and clinical significances of insulin-like growth factor 1 and E-cadherin in gastric cancer [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2019, 33 (5): 467-470.
- 收稿日期: 2021-06-15
修回日期: 2021-10-14