

格列卫联合亚砷酸对骨髓瘤细胞作用机制的研究

高志林 张芝娟 马梁明

【摘要】 目的 研究亚砷酸(As_2O_3)、STI571联用对多发性骨髓瘤(MM)细胞周期及其调节蛋白表达的影响,为 As_2O_3 和STI571联合应用于临床提供理论依据。方法 用MTT法检测细胞生长抑制率;Western blot方法检测二者对细胞周期负性调控因子P16蛋白的表达情况;用流式细胞仪对干预72 h的SP2/0细胞进一步进行细胞周期分析,以明确该蛋白所影响的细胞周期调控点。结果 在 As_2O_3 和(或)STI571作用下SP2/0细胞生长受抑伴随活力下降,Western blot方法检测出P16蛋白表达呈时间剂量依赖关系,流式细胞仪DNA含量分析发现 As_2O_3 、STI571使SP2/0细胞主要阻滞于G1期,未出现凋亡峰。结论 As_2O_3 和STI571均有抑制SP2/0细胞增殖和上调细胞周期抑制蛋白P16的表达,两药联用效果更佳。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 细胞周期; P16蛋白; STI571; 亚砷酸

Effects of STI571 in combination with As_2O_3 on proliferation of the multiple myeloma cell Gao Zhilin, Zhang Zhijuan, Ma Liangming. Department of Hematology, Shanxi Diyi Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Taiyuan 030032, China

Corresponding author: Ma Liangming, Email: 1094693800@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of STI571 in combination with As_2O_3 on proliferation and expression of cyclin dependent kinase inhibitors (CDKIs) of the SP2/0 cells and provide theoretical basis for clinical application. **Methods** Cell proliferation was detected by MTT methods; Western blot technique was used to detect the expression of cyclin dependent kinase inhibitors (P16 protein) in SP2/0 cell; the DNA content of MM cell line SP2/0 was analysed by flow cytometry after exposure to As_2O_3 and/or STI571. **Results** The proliferation of SP2/0 cells was inhibited and the viability of SP2/0 was decreased after exposure to As_2O_3 and /or STI571. Western blot result showed the expression of P16 protein has significant difference in the different density and different time of As_2O_3 and/or STI571 groups in the SP2/0 cell. DNA flow cytometry analysis showed that As_2O_3 and /or STI571 induced most of SP2/0 cells arrest at G1 phase and decrease significantly in S phase. **Conclusion** One of the pharmacological mechanisms of STI571 combination with As_2O_3 is to activate or upregulate the expression of protein P16 and consequently affect cell proliferation cycle.

【Key words】 Multiple myeloma; Cell cycle; P16 protein; STI571; As_2O_3

多发性骨髓瘤是迄今为止仍然无法治愈的一种浆细胞的血液系统恶性肿瘤,近年来随着一些新药物及干细胞移植技术提高,使得骨髓瘤患者在临床治疗上取得明显的疗效,但仍然有一部分患者会复发、耐药,如何克服耐药、复发患者如何治疗成

为目前的治疗难题。近年随着学者们对肿瘤发生、发展和转归的分子机制的进一步研究,靶位治疗已成为继手术、放疗和化疗之后的新途径,代表着肿瘤治疗模式的革命。而亚砷酸(As_2O_3)与STI571作为靶位治疗的典型代表,在白血病的治疗中取得了可喜的成就,但在骨髓瘤研究中尚属试验阶段,本实验旨在探讨STI571联合 As_2O_3 对小鼠骨髓瘤细胞株(SP2/0)的作用疗效及其可能机制,以期为临床应用提供理论依据。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.08.016

作者单位: 030032 太原,山西医学科学院山西大医院血液科(高志林、马梁明);山西省晋中市卫生学校(张芝娟)

通讯作者: 马梁明, Email: 1094693800@qq.com

材料和方法

一、材料

1. 细胞系: SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞系购自湖南远泰生物技术有限公司

2. 主要试剂: As_2O_3 购自哈尔滨依达药业公司, 以PBS配制成1.0 mmol/L的储存液, 4 °C保存, 临用时用DMEM培养液(Gibco/BRL公司)稀释至工作浓度。STI571购自瑞士Novartis制药公司, 用三蒸水配制成浓度为5.0 mmol/L的储存液, 过滤除菌, 分装后于-20 °C保存。MTT购自Sigma公司, 以PBS配置, 过滤除菌, 4 °C避光保存。BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物试剂有限公司。小鼠抗小鼠P16蛋白IgG 2a单抗为Santa Cruz公司产品。聚合过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(二抗)、低分子量蛋白Marker、DAB显色剂均购自武汉博士德公司。

3. 主要仪器: 电泳仪、半干转移仪均购自美国Hoefer Scientific Instruments; 流式细胞仪购自ESP(coulter, U.S.A); 酶标仪购自日本BIO-RAD。

二、方法

1. 细胞培养: (1) 将细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中, 在5% CO_2 、37 °C恒温及饱和湿度条件培养箱中培养, 待细胞生长至80%融合时进行传代。(2) 将受试对象分为9个组: 对照组、1.0 $\mu mol/L$ As_2O_3 组、2.0 $\mu mol/L$ As_2O_3 组、10.0 $\mu mol/L$ STI571 组、25.0 $\mu mol/L$ STI571 组及联合用药组(As_2O_3 +STI571) 1.0 $\mu mol/L$ +10.0 $\mu mol/L$ 、1.0 $\mu mol/L$ +25.0 $\mu mol/L$ 、2.0 $\mu mol/L$ +10.0 $\mu mol/L$ 、2.0 $\mu mol/L$ +25.0 $\mu mol/L$; 作用时间分三个水平: 24、48 和 72 h。

2. 细胞生长抑制状况: 取药物处理后的细胞, 经MTT法检测生长增殖活力。细胞生长抑制率=(1-实验组平均吸光度/细胞对照组平均吸光度)×100%。

3. Western blot检测P16蛋白: 培养细胞用PBS离心洗涤, SDS凝胶加样缓冲液裂解细胞, 收集细胞总蛋白, BCA法定量后经SDS-PAGE, 电转膜, 免疫抗体反应, 最后DAB显色, 具体步骤按文献操作。以正常培养细胞作为对照。

4. 流式细胞仪周期分析: 收集经过不同药物浓度处理72 h的SP2/0细胞, 碘化丙啶(PI)标记, 避光孵育至少30 min后上机, 将样品加入流式细胞仪的样品室, 以激发波长488 nm测定, 死细胞着染呈红色荧光, 用随机软件Multicycle进行分析。正

常培养细胞作为对照。

三、统计学分析

数据用SPSS 10.0软件处理, MTT、P16蛋白表达应用三因素析因设计方差分析, 细胞周期用两因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、细胞生长抑制情况

在不同时间点生长抑制率有统计学差异($P<0.05$), 其中以72 h为抑制高峰。各单药组亦呈浓度效应关系, 联合组抑制作用明显优于单药组($P<0.05$)。两药物与时间有交互作用, 其中以 As_2O_3 1.0 $\mu mol/L$ 联合STI571 25.0 $\mu mol/L$ 作用72 h抑制率最高($P<0.05$) (表1)。

二、STI571、 As_2O_3 诱导P16蛋白重新表达

SP2/0细胞在不同浓度的 As_2O_3 、STI571中分别培养24、48和72 h后进行Western blot。结果显示, 未经药物处理的标本无P16蛋白带, As_2O_3 、STI571单药组作用24 h后未见明显条带, 48 h呈弱阳性条带, 72 h后变为强阳性。联合用药组P16蛋白表达量较单药组明显增多, 说明两药联合具有协同作用(图1~3)。

三、STI571、 As_2O_3 对SP2/0细胞周期的影响

As_2O_3 、STI571作用SP2/0细胞72 h后进行流式细胞仪DNA含量分析, 结果显示SP2/0细胞周期主要由G1期和S期组成, G2/M期细胞所占比例很少。 As_2O_3 、STI571单药组对SP2/0细胞周期的作用主要表现为随剂量的增大, G1期细胞所占比例增加, S期细胞的比例减少, 未出现凋亡峰($P<0.05$)。 As_2O_3 +STI571组G1期细胞所占比例明显高于 As_2O_3 、STI571单药组, 且以 As_2O_3 1.0 $\mu mol/L$ 和STI571 25.0 $\mu mol/L$ 联合应用时作用最显著, G1期细胞所占比例达70%, S期细胞所占比例减少到30% (表2)。

讨论

细胞的正常生长依赖于细胞周期中各种调节因子的平衡调控。参与细胞周期调控的主要因子有细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)和CDK抑制蛋白(CDKIs)。其中CyclinD基因在细胞周期的调节中有重要作用, CyclinD和CDK4联合作用使细胞通过细胞周期的G1期进入S期, 是B细胞增殖的重要因子, 与骨髓瘤的发生关

表1 SP2/O MTT 的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	株数	24 h	48 h	72 h
空白对照	9	0.520 3±0.016 4	0.569 7±0.029 5	0.540 7±0.189 0
As ₂ O ₃ 1.0 μmol/L	9	0.479 7±0.002 0	0.440 3±0.012 9	0.399 7±0.010 6
As ₂ O ₃ 2.0 μmol/L	9	0.427 7±0.009 0	0.434 7±0.016 5	0.369 7±0.020 7
STI571 10.0 μmol/L	9	0.487 3±0.010 0	0.479 3±0.003 5	0.433 3±0.010 2
STI571 25.0 μmol/L	9	0.411 6±0.002 4	0.418 6±0.002 1	0.404 6±0.001 5
As ₂ O ₃ 1.0 μmol/L+STI571 10.0 μmol/L	9	0.392 3±0.001 4	0.371 6±0.000 4	0.347 6±0.002 3
As ₂ O ₃ 1.0 μmol/L+STI571 25.0 μmol/L	9	0.391 3±0.001 8	0.426 3±0.001 7	0.343 6±0.003 0
As ₂ O ₃ 2.0 μmol/L+STI571 10.0 μmol/L	9	0.363 6±0.001 5	0.338 0±0.002 0	0.281 3±0.001 1
As ₂ O ₃ 2.0 μmol/L+STI571 25.0 μmol/L	9	0.380 6±0.004 0	0.365 3±0.001 7	0.369 6±0.002 1

表2 As₂O₃、STI571 作用 SP2/O 细胞 72 h 后细胞周期分布 (% , $\bar{x} \pm s$)

分类	Control	As ₂ O ₃		STI571		As ₂ O ₃ +STI571			
		1.0 μmol/L	2.0 μmol/L	10.0 μmol/L	25.0 μmol/L	1.0 μmol/L+10.0 μmol/L	1.0 μmol/L+25.0 μmol/L	2.0 μmol/L+10.0 μmol/L	2.0 μmol/L+25.0 μmol/L
G0/G1 期	40.6±0.7	47.5±1.1	51.3±1.7	45.9±0.88	49.5±1.02	57.5±1.46	70.0±2.01	61.4±1.67	60.8±1.81
S 期	59.4±0.7	52.5±1.1	48.7±1.7	54.1±0.88	50.5±1.02	42.5±1.46	30.0±2.01	38.6±1.67	39.2±1.81

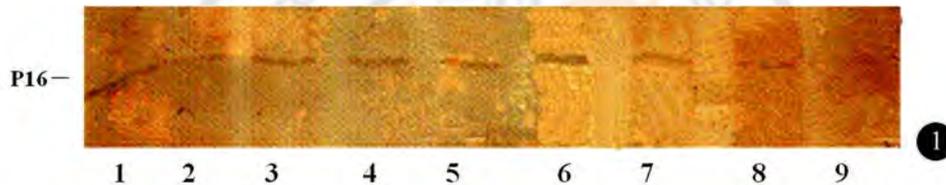


图1 各实验组处理24 h后SP2/O细胞P16表达情况。1: As₂O₃ (1.0 μmol/L) ; 2: As₂O₃ (2.0 μmol/L) ; 3: As₂O₃ (1.0 μmol/L) + STI571 (10 μmol/L) ; 4: As₂O₃ (2.0 μmol/L) + STI571 (10 μmol/L) ; 5: As₂O₃ (1.0 μmol/L) + STI571 (25 μmol/L) ; 6: STI571 (10 μmol/L) ; 7: STI571 (25 μmol/L) ; 8: As₂O₃ (2.0 μmol/L) + STI571 (25 μmol/L) ; 9: control



图2 各实验组处理48 h后SP2/O细胞P16表达情况。1: As₂O₃ (1.0 μmol/L) ; 2: As₂O₃ (2.0 μmol/L) ; 3: As₂O₃ (1.0 μmol/L) + STI571 (10 μmol/L) ; 4: As₂O₃ (2.0 μmol/L) + STI571 (10 μmol/L) ; 5: As₂O₃ (1.0 μmol/L) + STI571 (25 μmol/L) ; 6: STI571 (10 μmol/L) ; 7: STI571 (25 μmol/L) ; 8: As₂O₃ (2.0 μmol/L) + STI571 (25 μmol/L) ; 9: control

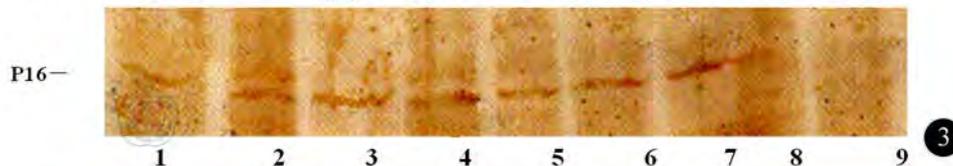


图3 各实验组处理72 h后SP2/O细胞P16表达情况。1: As₂O₃ (1.0 μmol/L) ; 2: As₂O₃ (2.0 μmol/L) ; 3: As₂O₃ (1.0 μmol/L) + STI571 (10 μmol/L) ; 4: As₂O₃ (2.0 μmol/L) + STI571 (10 μmol/L) ; 5: As₂O₃ (1.0 μmol/L) + STI571 (25 μmol/L) ; 6: STI571 (10 μmol/L) ; 7: STI571 (25 μmol/L) ; 8: As₂O₃ (2.0 μmol/L) + STI571 (25 μmol/L) ; 9: control

系密切^[1]。CDKI为细胞周期抑制蛋白, P16属于其中一员, 可与CyclinD竞争结合CDK4, 使细胞周期停滞在G1期。所以一旦P16基因发生突变或缺失, 解除了对CDK4、CyclinD复合物的抑制, G1关卡出现异常, 细胞就进入无调控的增殖周期。近年研究发现MM中P15和P16由于甲基化而表达缺失, 可能是其发病重要原因之一^[2]。所以设法使这些失活的负性调节因子重新表达或上调表达对治疗MM有重要意义。

As₂O₃作为一种广谱的抗肿瘤药物, 主要用于初治和复发的急性早幼粒细胞白血病的治疗。近年国外学者报道As₂O₃用于治疗MM取得一定疗效, 但具体机制尚不清楚, 部分研究提示其可能通过Notch信号通路发挥移植瘤细胞增殖的作用, 而国内文献报道As₂O₃可以诱导MM抑癌基因(P15/P16)重新表达^[3-4]。我们的实验也支持上述观点, 并发现As₂O₃主要使MM SP2/0细胞阻滞于G0/G1期, S期细胞比例较对照组减少。

STI571是一种酪氨酸激酶抑制剂, 目前临床主要应用于治疗bcr-abl融合基因阳性CML及ALL^[5-6]。最近Holtz等^[7]在慢性粒细胞白血病研究中发现STI571并未影响胞内MAPK、PI3K/Akt等信号转导途径, 而是通过干预肿瘤细胞的增殖周期来发挥抗肿瘤作用。我们的研究表明, STI571抑制MM细胞增殖与凋亡无关, 其可能的机制是上调细胞周期抑制蛋白P16的表达, 使SP2/0细胞周期停滞在G0/G1期, 不能进行完整的有丝分裂。

但是随着STI571在临床上的应用, 耐药现象逐渐增多。由于STI571需要持续用药才能维持药效, 出现耐药性将严重影响治疗, 为了克服耐药和复发问题, 进一步提高疗效, 协同治疗已成为肿瘤综合治疗的最主要办法^[8]。鉴于此, 本实验又将不同浓度的As₂O₃ (1.0 μmol/L、2.0 μmol/L) 与STI571 (10.0 μmol/L、25.0 μmol/L) 分别组合, 观察对

SP2/0细胞的影响, 其结果表明As₂O₃联合STI571组较各单药组抑制作用明显提高, 表明两药物间存在着协同作用。

综上所述, STI571联合As₂O₃抑制SP2/0细胞增殖的可能机制是: 二者共同激活或上调P16蛋白的表达, 与CyclinD竞争结合CDK4, 导致一系列的底物保持持续的去磷酸化高活性, 使SP2/0细胞周期停滞在G1期, 从而抑制肿瘤细胞的增殖。故STI571联用As₂O₃有望成为MM靶位治疗的新典范。

参 考 文 献

- [1] Michalides R. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(8): 555-560.
- [2] 黎金庆, 李渊, 石永进, 等. 三氧化二砷诱导 U266 细胞 P16 基因重新表达[J]. 癌症, 2004, 23(6): 626-630.
- [3] Bahlis NJ, McCafferty GJ, Jordan MI, et al. Feasibility and Correlates of arsenic trioxide Combined with ascorbic acid-mediated depletion of intra cellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(12): 3658-3668.
- [4] Hu J, Huang X, Hong X, et al. Arsenic trioxide inhibits the proliferation of myeloma cell line through notch signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 25.
- [5] Frolov A, Chahwan S, Ochs M, et al. Response markers and the molecular mechanisms of action of Gleevec in gastrointestinal stromal tumors[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(8): 699-709.
- [6] Ottmann OG, Wassmann B, Pfeifer H, et al. Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL)[J]. Cancer, 2007, 109(10): 2068-2076.
- [7] Holtz MS, Slovak ML, Zhang F, et al. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation[J]. Blood, 2002, 99(10): 3792-3800.
- [8] Tipping AJ, Mahon FX, Lagarde V, et al. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells[J]. Blood, 2001, 98: 3864-3867.

(收稿日期: 2013-11-19)

(本文编辑: 梁雷)