

## 硼替佐米联合氟达拉滨对淋巴瘤细胞系 HUT-78 的体外杀伤效应

章馨允 王华庆 钱正子 张会来 周世勇 赵静 王平

**摘要** 目的:探讨硼替佐米(Bortezomib, PS-341, BTZ)联合氟达拉滨(Fludarabine, FLU)不同给药顺序对于T细胞淋巴瘤细胞HUT-78增殖和凋亡的影响。方法:MTT法测定BTZ、FLU单药作用于HUT-78细胞系的 $IC_{50}$ 。流式细胞术检测BTZ、FLU单药对HUT-78细胞周期分布的影响,以及两者不同顺序给药时细胞凋亡的情况。Western blot检测不同给药顺序作用于HUT-78细胞后cleaved caspase-3的表达情况。结果:BTZ、FLU单药作用于HUT-78细胞24 h的 $IC_{50}$ 分别是 $(53.84 \pm 9.31) \text{ nmol/L}$ 和 $(2.54 \pm 0.33) \text{ mmol/L}$ 。细胞周期分析显示BTZ主要使细胞停滞在S期,而FLU主要使细胞停滞在 $G_0 \sim G_1$ 期;而在细胞凋亡方面BTZ→FLU组促使细胞凋亡的作用与同时给药及FLU→BTZ组相比最为显著( $P < 0.01$ )。同样,Western blot结果显示BTZ→FLU组cleaved caspase-3表达水平最高( $P < 0.01$ )。结论:BTZ与FLU联合使用可有效抑制HUT-78细胞的生长,先用BTZ再用FLU的给药顺序的促凋亡作用最强,该用药顺序可为临床用药所借鉴。

**关键词** T细胞淋巴瘤 硼替佐米 氟达拉滨 用药顺序 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.22.019

### Cytotoxic Effects of Bortezomib Combined with Fludarabine in T-cell Lymphoma Cell Line HUT-78 In Vitro

Xinyun ZHANG, Huaqing WANG, Zhengzi QIAN, Huilai ZHANG, Shiyong ZHOU, Jing ZHAO, Ping WANG

Correspondence to: Huaqing WANG; E-mail: huaqingw@163.com

Department of Lymphoma, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment, Sino-US Center for Lymphoma and Leukemia, Tianjin 300060 China

**Abstract Objective:** To evaluate the schedule-dependent effect of bortezomib (BTZ) combined with fludarabine (FLU) on the cell proliferation and apoptosis of the HUT-78 cell line. **Methods:** The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of BTZ and FLU was estimated by 3-(4,5-deimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Flow cytometry was used to analyze the effects of BTZ or FLU alone on the cell cycle, as well as the rate of apoptosis when they were combined in different sequences. The protein level of cleaved caspase-3 in HUT-78 cells was determined by Western blot. **Results:** The  $IC_{50}$  of BTZ or FLU alone for HUT-78 cell were  $53.84 \text{ nmol/L} \pm 9.31 \text{ nmol/L}$  and  $2.54 \text{ mmol/L} \pm 0.33 \text{ mmol/L}$ , respectively, at 24 h. BTZ promoted cell cycle arrest at the S phase, whereas FLU blocked cells at the  $G_0 - G_1$  phase. In cell apoptosis, the rate of the BTZ→FLU group was higher than those of other groups ( $P < 0.01$ ). Western blot showed that compared with the concurrent group and the FLU→BTZ group, the protein level of cleaved caspase-3 was highest in the BTZ→FLU group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** BTZ combined with FLU, especially BTZ followed by FLU, induces a higher apoptosis rate in the HUT-78 cell line. This sequential usage of BTZ and FLU is available as a clinical therapy.

**Keywords** T-cell lymphoma; Bortezomib; Fludarabine; Schedule-dependent; Apoptosis

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)根据细胞来源可分为B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤两大类型。与欧美国家相比,我国T细胞淋巴瘤的发病率相对较高,约占NHL的30%以上<sup>[1]</sup>。与B细胞淋巴瘤相比,大部分T细胞淋巴瘤的侵袭程度更高,5年生存率仅10%~30%<sup>[2]</sup>,且常规对B细胞淋巴瘤有效的一线化疗方案效果不佳。近年来靶向药物的研究不断进展,特别是硼替佐米对多种血液及实体肿瘤具有抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>,为T细胞淋巴瘤的治疗开辟了一

条新的思路。

蛋白酶体抑制剂硼替佐咪作为一种新型靶向治疗药物,可特异性地抑制26S蛋白酶体复合物,多项研究显示,BTZ单独应用或与其他化疗药物联合使用均可有效地促进肿瘤细胞凋亡,逆转化疗耐药,增强化疗敏感性<sup>[4]</sup>。氟达拉滨是对淋巴细胞恶性肿瘤高度有效的抗代谢类化疗药物,是一种嘌呤类似物,可通过有效整合入淋巴细胞的DNA从而抑制DNA的合成<sup>[5]</sup>。FLU对B细胞淋巴瘤具有显著疗效,但对于

T细胞的疗效国内外均鲜有报道。

本研究旨在探讨BTZ与FLU联合应用对T细胞淋巴瘤细胞系HUT-78增殖与凋亡的影响,以及探讨联合使用的最佳给药顺序,为T细胞淋巴瘤的综合治疗提供基础理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药物和试剂

RPMI1640购自美国Hyclone公司,胎牛血清为GIBCO公司产品。四甲基偶氮唑(MTT)、碘化丙啶(PI)、二甲基亚砜(DMSO)均购自索莱宝公司。BTZ(西安杨森公司惠赠)用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释为浓度为1 mg/mL的贮存液;FLU(拜耳医药保健有限公司惠赠)溶于PBS中,稀释为3 mg/mL的贮存液,均放置于-20℃保存。Annexin-V/PI凋亡检测试剂盒购自美国BD公司; $\beta$ -actin抗体购于美国Santa Cruz公司;cleaved caspase-3抗体购于美国Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 细胞培养

HUT-78(皮肤T细胞淋巴瘤)细胞株为本实验室自存。使用含有10%热灭活胎牛血清的RPMI 1640培养液在5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养、传代,取对数生长期的细胞用于实验。

### 1.3 MTT法检测细胞增殖活性

取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^4$ /mL,按200  $\mu$ L/孔体积接种在96孔板上,每孔加入不同浓度的BTZ(0~400 nmol/L)和FLU(0~20 mmol/L),每个浓度设3个复孔,培养24h、48h,后每孔加入MTT工作液(5 mg/mL)20  $\mu$ L,继续培养4 h,1 500 RPM离心10 min,弃上清,每孔加入200  $\mu$ L DMSO,震荡混匀。用酶标仪测定570 nm波长下的吸光度(A)值。细胞抑制率=1-(加药组A值-空白对照组A值)/(正常对照组A值-空白对照组A值) $\times 100\%$ ,根据以上公式,计算IC<sub>50</sub>值,且实验重复3次。

### 1.4 细胞周期

调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ /mL接种于6孔板中,每孔体积2 mL,分为BTZ(25、50、100 nmol/L)组、FLU(1、2、4 mmol/L)组及空白对照组培养24 h后,收集细胞,用冷PBS冲洗2遍后,用500  $\mu$ L PBS重悬细胞,固定于70%预冷酒精中,4℃过夜。固定后细胞用冷PBS冲洗1遍后重悬,加入含有0.1 mg/mL RNase A的PI溶液(50  $\mu$ g/mL),室温孵育半小时,后上机检测DNA含量,应用ModFit Diva软件分析细胞周期分布情况。实验重复3次。

### 1.5 细胞凋亡分析

收集6孔板中(细胞密度同细胞周期实验)空白对照组及联合用药处理的HUT-78细胞。实验分为6

组。分别为:1)空白对照组:加入等量PBS,培养24 h;2)BTZ组:单药BTZ 25 nmol/L,培养24 h;3)FLU组:单药FLU 2 mmol/L,培养24 h;4)BTZ+FLU组:BTZ 25 nmol/L和FLU 2 mmol/L同时给药,培养24 h;5)BTZ $\rightarrow$ FLU组:先用BTZ 25 nmol/L培养24 h,用PBS将细胞冲洗3遍后,再用FLU 2 mmol/L培养24 h;6)FLU $\rightarrow$ BTZ组:先用FLU 2 mmol/L培养24 h,用PBS将细胞冲洗3遍后,再用BTZ 25 nmol/L培养24 h。细胞收集后用PBS冲洗3遍,加100  $\mu$ L binding缓冲液重悬细胞后,加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC混匀,再加入5  $\mu$ L PI混匀,避光,室温孵育15 min,反应结束时再加入400  $\mu$ L binding缓冲液,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复3遍。

### 1.6 Western blot检测cleaved caspase-3表达情况

测定联合用药时,不同顺序给药后cleaved caspase-3蛋白表达情况。收集各处理组及空白对照组细胞,裂解细胞提取蛋白,根据BCA法测定蛋白质浓度,取 $\beta$ -actin水平作为等量蛋白质上样对照,10% SDS PAGE胶电泳分离蛋白质,转至PVDF膜,脱脂奶封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,0.05% TBST溶液洗膜,二抗室温孵育1 h,0.05% TBST溶液洗膜,后加入ECL反应体系曝光显像。

### 1.7 统计学处理

用SPSS 17.0统计分析软件进行统计学处理,各项实验重复3次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数比较采用ANOVA方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FLU、BTZ作用于HUT-78细胞系的IC<sub>50</sub>

FLU作用于HUT-78细胞24 h、48 h的IC<sub>50</sub>分别是:(2.54 $\pm$ 0.33) mmol/L和(0.75 $\pm$ 0.06) mmol/L;BTZ的IC<sub>50</sub>分别是:(53.84 $\pm$ 9.31) nmol/L和(46.63 $\pm$ 4.61) nmol/L。如表1所示,FLU、BTZ作用于HUT-78细胞系,随着药物浓度的增加,抑制细胞增殖的作用增强( $P < 0.01$ );同时,随着作用时间的延长,抑制作用加强( $P < 0.01$ ),说明这两种药物的抑制作用既存在浓度依赖性,又存在时间依赖性。

### 2.2 FLU、BTZ单药作用于HUT-78细胞系对细胞周期影响

HUT-78细胞经FLU(1、2、4 mmol/L)和BTZ(25、50、100 nmol/L)单药处理24 h后,FLU可促使细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期( $P < 0.01$ ),而BTZ主要将细胞抑制于S期( $P < 0.01$ ),且均为时间依赖性(图1)。

### 2.3 FLU、BTZ联合用药对HUT-78细胞凋亡的影响

FLU(2 mmol/L)、BTZ(25 nmol/L)单药及两药联合作用于HUT-78细胞,采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,空白对照组、BTZ组、FLU组、BTZ+FLU组、

FLU→BTZ组、BTZ→FLU组凋亡率分别为(6.23±1.44)%、(28.47±1.40)%、(24.17±3.42)%、(40.07±2.48)%、(43.47±2.25)%、(58.97±1.51)%。可见

BTZ→FLU组引起细胞凋亡的作用较其他联合用药组合更为明显( $P<0.01$ )。

表1 FLU、BTZ单药对HUT-78细胞的抑制率 %

Table 1 Single drug inhibition rate of FLU or BTZ in HUT-78 cells (%)

FLU(nmol/L)	24 h	48 h	BTZ(nmol/L)	24 h	48 h
0.3	12.77 ± 2.17	21.35 ± 2.78	6.25	6.63 ± 2.36	7.85 ± 0.89
0.6	31.31 ± 2.82	47.46 ± 2.58	12.5	23.87 ± 3.71	36.62 ± 1.58
1.25	48.00 ± 3.75	71.95 ± 1.45	25	44.85 ± 1.66	50.11 ± 1.66
2.5	56.77 ± 3.40	77.41 ± 1.98	50	60.89 ± 3.14	62.8 ± 25.15
5	65.45 ± 2.61	81.64 ± 1.43	100	63.86 ± 1.78	67.74 ± 1.49
10	68.29 ± 2.72	84.77 ± 1.39	200	68.26 ± 1.78	71.66 ± 2.11
20	73.27 ± 2.28	86.81 ± 2.12	400	71.91 ± 1.66	76.63 ± 3.15

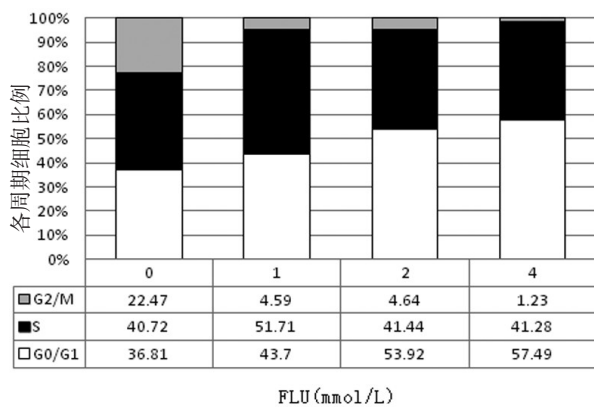
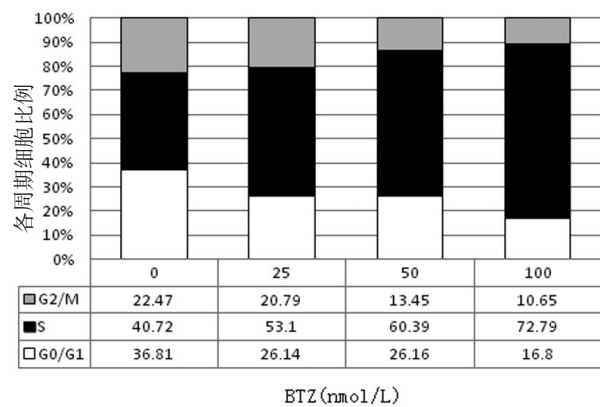


图1 FLU、BTZ单药对HUT-78细胞细胞周期的阻滞作用

Figure 1 Cell cycle arrest induced by BTZ or FLU alone in HUT-78



## 2.4 BTZ联合FLU不同给药顺序对cleaved Caspase-3蛋白表达的影响

联合用药三组中cleaved Caspase-3表达较空白对照组均有所升高,其中BTZ→FLU组cleaved Caspase-3的表达水平最高(图2)。

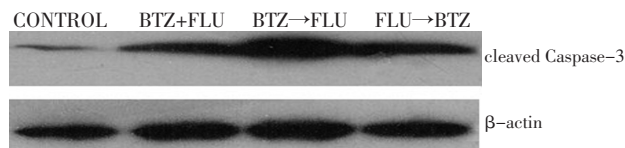


图2 不同给药顺序对cleaved Caspase-3蛋白表达的影响

Figure 2 Cleaved caspase-3 protein expression in different sequences

## 3 讨论

随着生物医学技术的发展,近年来临床上涌现出大量靶向药物,BTZ是其中的一个亮点。Pahler等利用BTZ联合FLU对慢性淋巴细胞白血病细胞系进行体外实验,结果表明BTZ、FLU单独或联合使用都有较强的促凋亡作用,且联合用药高于单药的作用<sup>[6]</sup>。

本实验旨在研究新型靶向药物与化疗联合,即BTZ联合FLU,对于HUT-78细胞的体外杀伤效应,试图为T细胞淋巴瘤的临床治疗提供一条新思路。Weigert等<sup>[7]</sup>,将BTZ与阿糖胞苷(cytarabine)联合作用于套细胞淋巴瘤,结果阿糖胞苷序贯BTZ的协同作用优于其他给药方法。

采用MTT法检测HUT-78细胞经BTZ和FLU单药处理24 h的IC<sub>50</sub>值,选取BTZ 25 nmol/L与FLU 2 mmol/L进行细胞周期分析,结果显示BTZ单药可使HUT-78细胞阻滞于S期,而FLU使细胞阻滞在G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub>期;细胞凋亡检测示,两药联合时BTZ→FLU组细胞凋亡率最高,原因可能与这两种药物作用于不同的细胞周期有关。先加或同时加入FLU组细胞,大多阻滞在G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub>期,相对处于S期的细胞减少,这样就使得其对BTZ的敏感性有所下降,从而影响了BTZ促凋亡的作用。而先加入BTZ组的细胞大多被抑制在S期,并不影响G<sub>1</sub>~G<sub>0</sub>期细胞的数量,因此保证了FLU的药效发挥,这可能是BTZ→FLU组凋亡作用最显著的原

因之一。

细胞凋亡是机体生长发育、细胞分化和病理状态中细胞自主性死亡的过程。Caspase介导的信号途径是细胞凋亡最主要的途径,其直接参与了凋亡早期启动和凋亡信号的传递<sup>[8]</sup>。这个途径的中心环节是Caspase-3的水解激活,活化的Caspase-3(即cleaved Caspase-3)是细胞凋亡的执行人,诱导细胞最终的凋亡<sup>[9]</sup>。本实验通过Western blot方法检测不同给药顺序作用后,cleaved Caspase-3的表达情况。结果显示BTZ→FLU组cleaved Caspase-3的表达水平最高( $P<0.05$ ),进一步从蛋白水平证实了BTZ→FLU组促凋亡的作用高于其他组合。

综上所述,本研究发现BTZ→FLU组促T细胞淋巴瘤细胞凋亡的作用最明显,结果提示,当靶向和化疗联合使用时,可能存在用药顺序的问题。

#### 参考文献

- 1 Reiser M, Josting A, Soltani M, et al. T-cell non-Hodgkin's lymphoma in adults: Clinicopathological characteristics, response to treatment and prognostic factors[J]. *Leuk Lymphoma*, 2002, 43: 805-811.
- 2 Coiffier B, Brousse N, Peuchmaur M, et al. "Peripheral T-cell lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. The GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes Agressives)[J]. *Ann Oncol*, 1990, 1(1):45-50.
- 3 Tsapakidis K, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, et al. Bortezomib reverses the proliferative and antiapoptotic effect of neuropeptides on prostate cancer cells[J]. *Int J Urol*, 2012, 19(6):565-574.

- 4 Hutter G, Ricken M, Pastore A, et al. The proteasome inhibitor bortezomib targets cell cycle and apoptosis and acts synergistically in a sequence-dependent way with chemotherapeutic agents in mantle cell lymphoma. *Ann Hematol*[J]. 2012, 91(6):847-856.
- 5 Liu XJ, Guo Y, Fan Y, et al. Oral fludarabine in combination with doxorubicin and dexamethasone as first-line therapy for nodal peripheral T-cell lymphomas: early results of a prospective multicenter study[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012,69(2):387-395.
- 6 Pahler JC, Ruiz S, Niemer I, et al., Effects of the proteasome inhibitor, bortezomib, on apoptosis in isolated lymphocytes obtained from patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12):4570-4571.
- 7 Weigert O, Pastore A, Ricken M, et al., Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2007,21(3):524-528.
- 8 Khan MA, Gahlot S, Majumdar S. Oxidative Stress Induced by Curcumin Promotes the Death of Cutaneous T-cell Lymphoma (HuT-78) by Disrupting the Function of Several Molecular Targets [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(9):1873-1883.
- 9 Shimizu K, Takahama S, Endo Y, et al. Stress-inducible caspase substrate TRB3 promotes nuclear translocation of procaspase-3[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42721.

(2012-08-15收稿)

(2012-10-03修回)

(本文编辑:郑莉)

(上接第1764页)

- (11): 241.
- 7 Dennler S, André J, Verrecchia F, et al. Cloning of the human GLI2 Promoter: transcriptional activation by transforming growth factor-beta via SMAD3/beta-catenin cooperation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(46):31523-31531.
- 8 Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma [J]. *Science*, 2009, 326(5952):572-574.
- 9 Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T, et al. Hedgehog signaling drives

cellular survival in human colon carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3):1092-1102.

- 10 Pan D, Li Y, Li Z, et al. Gli inhibitor GANT61 causes apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with rapamycin[J]. *Leuk Res*, 2012, 36(6):742-748.

(2012-07-13收稿)

(2012-10-18修回)

(本文编辑:张佺)