



· 论 著 ·

三氧化二砷联合环腺苷酸拟似物诱导骨髓瘤细胞凋亡的实验研究

杭海芳, 王莹莹, 唐 勇, 庄 衍, 励菁菁, 朱 琦

上海交通大学医学院附属第九人民医院血液内科, 上海 200011

[摘要] 背景与目的: 近年来随着新型药物和免疫疗法的成功应用, 多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 患者的缓解率、缓解深度和无病生存率较以往显著提高, 然而仍有相当一部分MM患者属于复发/难治性病例。我们的前期研究发现, 环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 拟似物和三氧化二砷 (arsenic trioxide, As_2O_3) 可以抑制MM细胞增殖并诱导其凋亡, 成为MM治疗的新途径。该研究进一步探究 As_2O_3 单独和联合环腺苷酸拟似物8-对氯苯硫基环腺苷酸 [8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, 8-CPT-cAMP] 对MM细胞的影响及可能作用机制。**方法:** 以不同浓度 As_2O_3 和8-CPT-cAMP单独和联合处理MM细胞系U266细胞, 采用细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测其增殖, 应用药物联合指数 (combination index, CI) 分析两药是否存在协同效应, 同时采用流式细胞术检测细胞周期和凋亡率, 进一步利用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞凋亡相关蛋白caspase-3和Bcl-2表达的变化。**结果:** U266细胞经 As_2O_3 和8-CPT-cAMP单独或联合处理72和120 h后, 联合用药组细胞增殖抑制率分别为 (18.01±0.13)%和 (28.01±0.14)%, 明显高于单独用药组 [As_2O_3 组为 (11.35±0.01)%和 (16.01±0.14)%, 8-CPT-cAMP组为 (12.26±0.30)%和 (15.43±0.23)%, P 均<0.05]; 但两药联合处理U266细胞的CI值均大于1。联合用药组72和120 h后U266细胞凋亡率分别达到 (22.26±0.13)%和 (31.03±0.14)%, 显著高于单药组 [As_2O_3 组为 (10.06±0.01)%和 (12.35±0.14)%, 8-CPT-cAMP组为 (13.26±0.30)%和 (18.76±0.23)%, P 均<0.05]。同时联合用药组U266细胞内caspase-3蛋白剪切活化和Bcl-2表达下降。**结论:** As_2O_3 联合8-CPT-cAMP对MM细胞凋亡诱导效应强于单药, 但无协同效应。

[关键词] 三氧化二砷; 环腺苷酸; 多发性骨髓瘤; 凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.03.002

中图分类号: R733.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)03-0166-05

Experimental study on cAMP analogue combined with arsenic trioxide inducing apoptosis in multiple myeloma cells HANG Haifang, WANG Yingying, TANG Yong, ZHUANG Yan, LI Jingjing, ZHU Qi (Department of Hematology, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Correspondence to: ZHU Qi E-mail: zhuqi70@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** With the application of novel agents and immune therapeutic strategies, treatment outcomes of multiple myeloma (MM) patients have dramatically improved including not only rates and depth of response, but also progression-free survival. However, a considerable number of patients become relapsed/refractory cases. Studies revealed that the treatment with cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or arsenic trioxide (As_2O_3) might be a promising strategy for MM therapy. The present study aimed to explore the possible effects of cAMP analogue 8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-CPT-cAMP) combined with As_2O_3 on MM cells and its potential mechanisms. **Methods:** The MM cell line U266 cells were treated with different concentrations of As_2O_3 and 8-CPT-cAMP. The proliferation of U266 cells was evaluated through cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The synergistic manner of the two agents was determined by calculation of combination index (CI). Meanwhile, flow cytometry was used to analyze the changes of cell cycle distribution and apoptotic rate. Furthermore, Western blot assay was applied to detect expression levels of apoptosis modulator caspase-3 and Bcl-2. **Results:** After treatment with As_2O_3

基金项目: 国家自然科学基金 (81870156)。

通信作者: 朱 琦 E-mail: zhuqi70@hotmail.com

and/or 8-CPT-cAMP for 72 and 120 h, the growth inhibition rates of U266 cells in combination groups reached (18.01±0.13)% and (28.01±0.14)%, which were significantly higher than those in As₂O₃ or 8-CPT-cAMP alone group [As₂O₃ group: (11.35±0.01)% and (16.01±0.14)%; 8-CPT-cAMP group: (12.26±0.30)% and (15.43±0.23)%; $P<0.05$]. The CI value of As₂O₃ combined with 8-CPT-cAMP was higher than one in U266 cells. The apoptotic rates of U266 cells in combination groups were (22.26±0.13)% and (31.03±0.14)%, which were significantly higher than those in As₂O₃ or 8-CPT-cAMP alone group [As₂O₃ group: (10.06±0.01)% and (12.35±0.14)%; 8-CPT-cAMP group: (13.26±0.30)% and (18.76±0.23)%; $P<0.05$]. It was also shown that As₂O₃ combined with 8-CPT-cAMP induced degradation of caspase-3 and down-regulated expression of Bcl-2 in U266 cells. **Conclusion:** The effect of As₂O₃ combined with 8-CPT-cAMP on induction of apoptosis in MM cells was stronger than that of single drug, but there was no synergistic effect.

[Key words] Arsenic trioxide; Cyclic adenosine monophosphate; Multiple myeloma; Apoptosis

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是浆细胞恶性克隆增殖性疾病, 近年来随着分子靶向药物及造血干细胞移植等细胞免疫疗法成功应用于MM治疗, MM患者的缓解率和无病生存率较以往显著提高, 然而仍有相当一部分患者在缓解后复发并对多种药物产生耐药, 属于复发/难治性病例。因此, 寻找MM新型药物治疗模式有其必要性和重要的临床意义。已有研究显示, 三氧化二砷 (arsenic trioxide, As₂O₃) 可以通过调节细胞内多条信号通路介导MM细胞增殖阻滞和凋亡, 但As₂O₃单药的临床疗效有限^[1]。我们的前期研究发现, 提高细胞内环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 浓度不仅可以诱导MM细胞凋亡, 而且能够增强MM常用临床药物 (如硼替佐米) 的凋亡诱导效应^[2]。鉴于此, 本研究以MM细胞株U266细胞为模型, 探讨As₂O₃单独和联合cAMP拟似物8-对氯苯硫基环腺苷酸 [8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, 8-CPT-cAMP] 处理对MM细胞的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

As₂O₃ (由上海血液学研究所惠赠) 用PBS配制成5 mmol/L储存液。8-CPT-cAMP (购自美国Abcam公司) 溶于水中配制成浓度为50 mmol/L的储存液。

1.2 细胞培养与细胞形态学观察

MM细胞株U266细胞由上海交通大学医学院病理生理学教研室提供。将 2×10^5 个/mL U266细胞接种于含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素、

100 μg/mL链霉素和2 mmol/mL谷氨酰胺的RPMI-1640培养基 (购自美国Sigma公司) 中, 常规条件下培养 (37 °C、CO₂体积分数为5%、95%湿度) 48 h后抽取部分细胞用Shandon Cytospin 4细胞离心涂片机 (购自美国Thermo Fisher Scientific公司) 进行涂片, 瑞氏蓝染色, 在光学显微镜下观察其细胞形态, 并以Image-Pro Plus软件拍摄图像。

1.3 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的U266细胞, 按 5×10^4 个/mL接种于96孔板, 每孔100 μL。实验组分别单独及联合用0.50、1.00 μmol/L As₂O₃和200 μmol/L 8-CPT-cAMP处理U266细胞。同时设溶剂对照组和空白对照组, 每组3个复孔。置于37 °C、CO₂体积分数为5%饱和湿度培养箱中, 培养72和120 h后每孔分别加入10 μL CCK-8溶液 (购自日本同仁化学研究所), 混匀, 继续培养4 h, 酶标仪振荡, 以空白对照孔调零, 测450 nm处各孔吸光度 (D) 值。细胞生长抑制率 (%) = $(1 - D_{\text{实验组}} / D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 进行计算。应用Chou-Talalay中效分析法, 由CompuSyn软件计算出各处理组细胞效应分数 (fraction affected, Fa, 即药物处理后细胞生长抑制率) 相应的药物联合指数 (combination index, CI), 并绘制Fa-CI曲线, 当CI<1, 表示两药有协同作用; CI=1, 表示两药有叠加作用; CI>1, 表示两药为拮抗作用。

1.4 流式细胞术检测细胞周期和凋亡率

1.4.1 细胞周期检测

分别收集上述单独及联合用0.50、1.00 μmol/L As₂O₃和200 μmol/L 8-CPT-cAMP处理的U266细胞, PBS洗涤后加入75%乙醇溶液, -20 °C固

定过夜; 加入1×PBS 10 mL混匀, 2 500 r/min离心5 min (离心半径为8.5 cm), 洗涤2次, 分别加入100 mg/mL核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 37 °C温育30 min; 采用100 μg/mL碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色后采用流式细胞术检测。所有数据用美国Beckman Coulter公司的Multicycle软件收集、存储和分析。

1.4.2 细胞凋亡率检测

根据Annexin-V/FITC凋亡检测试剂盒 (购自美国BD公司) 说明, 将不同处理组细胞以PBS洗涤后加入1 mL结合缓冲液, 漂洗细胞1次。依次加入100 μL结合缓冲液及3 μL Annexin-V/FITC, 重悬混匀, 避光温育15 min, 再加入3 μL PI, 避光温育3 min, 每管加入结合缓冲液400 μL, 1 h内进行流式细胞术检测。

1.5 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞凋亡相关蛋白表达

在PBS洗涤后的各组U266细胞中加入细胞裂解液提取总蛋白, 经考马斯亮蓝定量后, 取各组等量总蛋白进行十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 常规转膜; 膜经室温5%脱脂牛奶封闭1 h, 加入相应一抗 (包括Bcl-2和caspase-3), 4 °C过夜; 经含0.1%Tween-20的PBS充分洗涤后与相应稀释度的二抗室温下反应1 h, 应用ECL试剂盒 (购自英国Amersham Pharmacia Biotech公司) 显影扫描保存。所用抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.6 统计学处理

采用SPSS 16.0软件包进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验方差齐性, 两组均数间比较采用独立样本 t 检验, 多组均数间比较采用单因素方差 (ANOVA) 分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 As₂O₃和8-CPT-cAMP单独及联合对U266细胞生长的影响

MM细胞株U266细胞经1.00 μmol/L As₂O₃和200 μmol/L 8-CPT-cAMP单独及联合处理72和120 h后, 联合用药组所诱导的细胞生长抑制率分别达到 (18.01±0.13)%和 (28.01±0.14)%, 明显高于单独用药组 [As₂O₃单药组细胞生长抑制率为 (11.35±0.01)%和 (16.01±0.14)%, 8-CPT-cAMP单药组细胞生长抑制率为 (12.26±0.30)%和 (15.43±0.23)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表1)。但不同浓度As₂O₃ (0.25、0.50和1.00 μmol/L) 单独及联合8-CPT-cAMP (200、300和400 μmol/L) 处理U266细胞后生长抑制率和相应药物浓度应用CompuSyn软件分析, 结果显示, 两药联合处理U266细胞的CI值均>1 (表2和图1)。形态学观察显示, 单药组及联合处理组细胞均出现细胞体积缩小、细胞质浓缩、核固缩和碎裂等典型凋亡形态学改变, 单药组及联合用药组处理后细胞形态无显著变化 (图2)。

表1 As₂O₃单独及联合8-CPT-cAMP对U266细胞生长的影响

Tab. 1 Effect of As₂O₃ alone or combined with 8-CPT-cAMP on the survival of U266 cells

Group	Sample number <i>n</i>	Growth inhibition rate				Cell apoptotic rate	
		72 h		120 h		72 h	120 h
		(% , $\bar{x} \pm s$)					
Control	3	5.65 ± 0.15	8.98 ± 0.01	5.51 ± 0.06	8.98 ± 0.01		
As ₂ O ₃	3	11.35 ± 0.01	16.01 ± 0.14	10.06 ± 0.01	12.35 ± 0.14		
8-CPT-cAMP	3	12.26 ± 0.30	15.43 ± 0.23	13.26 ± 0.30	18.76 ± 0.23		
As ₂ O ₃ +8-CPT-cAMP	3	18.01 ± 0.13	28.01 ± 0.14	22.26 ± 0.13	31.03 ± 0.14		

表2 As₂O₃联合8-CPT-cAMP对U266细胞增殖的抑制效应

Tab. 2 Inhibitory effects of As₂O₃ combined with 8-CPT-cAMP on the proliferation of U266 cells

8-CPT-cAMP c_B /(μmol·L ⁻¹)	As ₂ O ₃ c_B /(μmol·L ⁻¹)	Fa	CI
200	0.25	0.136 65	1.471 89
300	0.50	0.265 57	1.113 13
400	1.00	0.288 27	1.356 65

Fa: Fraction affected; CI: Combination index

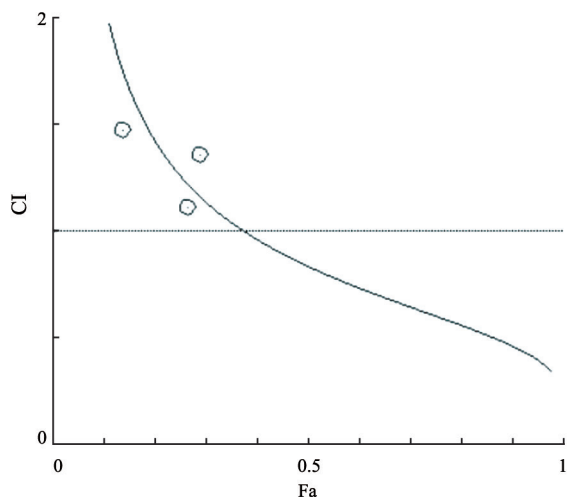


图1 As_2O_3 联合8-CPT-cAMP抑制U266细胞增殖的协同效应曲线

Fig. 1 The Fa-CI plot of As_2O_3 combined with 8-CPT-cAMP on the proliferation of U266 cells

Fa: Fraction affected; CI: Combination index

2.2 As_2O_3 和8-CPT-cAMP对U266细胞凋亡率的影响

Annexin-V/PI双染法流式细胞术检测细胞凋亡率的结果显示，U266细胞经 $1.00 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 和 $200 \mu\text{mol/L}$ 8-CPT-cAMP单药及联合处理72和120 h后， As_2O_3 单药组细胞凋亡率为 $(10.06 \pm 0.01)\%$ 和 $(12.35 \pm 0.14)\%$ ，8-CPT-cAMP单药组细胞凋亡率为 $(13.26 \pm 0.30)\%$ 和 $(18.76 \pm 0.23)\%$ ，联合用药组细胞凋亡率分别达到 $(22.26 \pm 0.13)\%$ 和 $(31.03 \pm 0.14)\%$ ，显著高于单药组($P < 0.05$ ，表1)。

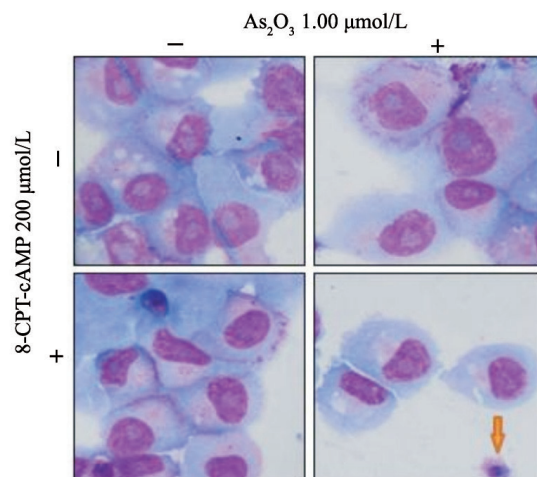


图2 As_2O_3 和8-CPT-cAMP单独及联合处理U266细胞后形态学变化

Fig. 2 Effects of As_2O_3 alone and combined with 8-CPT-cAMP on the morphologic changes of U266 cells

2.3 As_2O_3 和8-CPT-cAMP对U266细胞内凋亡调控蛋白表达的影响

用 As_2O_3 和8-CPT-cAMP单独及联合处理U266细胞72 h后，Western blot检测细胞内caspase-3和Bcl-2蛋白的表达情况。结果显示， As_2O_3 单药及联合8-CPT-cAMP可以使细胞内caspase-3蛋白发生剪切活化，同时下调Bcl-2蛋白表达水平，其中联合用药组caspase-3蛋白剪切活化和Bcl-2蛋白表达下调更为明显，而8-CPT-cAMP单药对细胞内caspase-3和Bcl-2表达均无明显影响(图3)。

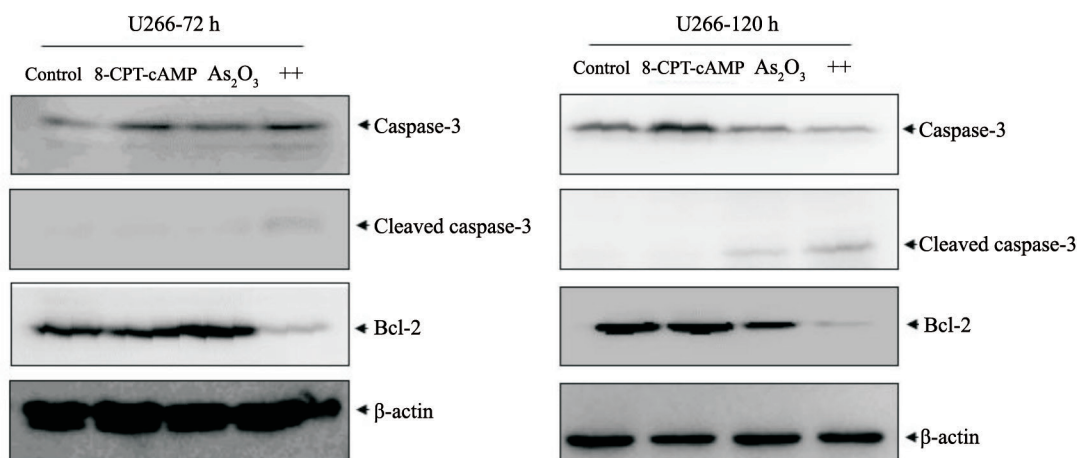


图3 As_2O_3 和8-CPT-cAMP对U266细胞内凋亡调控蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of As_2O_3 and 8-CPT-cAMP on the expression of apoptosis modulator in U266 cells

3 讨 论

MM作为高度异质性浆细胞肿瘤, 由于肿瘤细胞克隆演变导致疾病复发并产生对现有治疗方案的耐药^[3], 积极探究新型有效药物和作用模式成为进一步提高MM临床疗效和改善其预后的主要途径。我们的前期研究发现, As₂O₃和cAMP拟似物8-CPT-cAMP通过调节MM细胞内多个信号调控分子(如SOCS-1、Bcl-2和Bax等)诱导其增殖阻滞和凋亡, 但同时也发现As₂O₃和8-CPT-cAMP单药作用有限及所需剂量较高等问题^[4-5]。有鉴于此, 本研究采用As₂O₃与8-CPT-cAMP联合处理MM细胞株U266细胞, 观察两药联合对MM细胞生物学行为的影响。

本研究显示, As₂O₃与8-CPT-cAMP单药均可以抑制U266细胞生长并诱导其凋亡, 这与已有的相关研究结果一致^[6-7]。但两药联合对U266细胞增殖阻滞和凋亡诱导效应明显高于单独用药组, 差异有统计学意义, 同时应用CompuSyn软件分析, 结果显示, 两药联合的CI值>1, 说明As₂O₃与8-CPT-cAMP在抑制U266细胞增殖过程中协同效应并不明显。此外, 单药和两药联合处理72 h后的U266细胞形态呈现核固缩和凋亡小体等典型凋亡表现, 单药组和联合用药组细胞形态也无明显变化。Western blot对凋亡相关蛋白的检测结果也进一步显示, 联合用药组U266细胞内caspase-3蛋白剪切活化和Bcl-2表达下调, 与As₂O₃和8-CPT-cAMP单药组比较有明显差异。上述结果提示, 8-CPT-cAMP能够增强As₂O₃诱导MM细胞凋亡, 但协同效应不明显。

经典细胞凋亡主要包括线粒体途径和死亡受体途径, 两条途径最终都是通过激活caspases诱导凋亡, 其中caspase-3是凋亡过程中重要的终末剪切酶。Bcl-2作为一种抗凋亡蛋白, 与线粒体凋亡途径密切相关^[8]。本实验发现, As₂O₃单药或联合8-CPT-cAMP能够诱导U266细胞内Bcl-2表达下调和caspase-3剪切活化, 提示As₂O₃单药或联

合8-CPT-cAMP可能是通过细胞内线粒体途径诱导细胞凋亡。前期研究也显示, As₂O₃和8-CPT-cAMP均可以改变MM细胞线粒体跨膜电位而通过线粒体途径诱导其凋亡^[2, 9], 但二者合用协同效应不明显是否与线粒体作用位点叠加甚至拮抗有关, 有待进一步深入研究。

综上所述, As₂O₃联合8-CPT-cAMP可能通过线粒体途径促使MM细胞增殖阻滞和凋亡。8-CPT-cAMP可以增强As₂O₃凋亡诱导效应, 但协同效应不明显, 有必要进一步筛选更为有效的新型组合。

[参 考 文 献]

- [1] HE X, YANG K, CHEN P, et al. Arsenic trioxide-based therapy in relapsed/refractory multiple myeloma patients: a meta-analysis and systematic review [J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 1593-1599.
- [2] WANG Y, TANG Y, HANG H, et al. cAMP induces cell apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(1): 16-29.
- [3] ROBAK P, DROZDZ I, SZEMRAJ J, et al. Drug resistance in multiple myeloma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 70: 199-208.
- [4] 王鸣明, 胡钧培, 邹丽芳, 等. 三氧化二砷诱导骨髓瘤细胞SOCS-1基因去甲基化及其对P-STAT3蛋白表达的影响 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(8): 633-636.
- [5] 杭海芳, 王莹莹, 朱琦. 环腺苷酸拟似物8-CPT-cAMP诱导骨髓瘤细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24(10): 755-760.
- [6] FOLLIN-ARBELET V, TORGERSEN M L, NADERI E H, et al. Death of multiple myeloma cells induced by cAMP-signaling involves downregulation of Mcl-1 via the JAK/STAT pathway [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(2): 323-331.
- [7] ELMARI A Y, NIU C, LI W, et al. Effects of arsenic trioxide alone and in combination with bortezomib in multiple myeloma RPMI 8266 cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(11): 6469-6473.
- [8] GIMENEZ-CASSINA A, DANIAL N N. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(4): 165-175.
- [9] BAYSAN A, YEL L, GOLLAPUDI S, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis via the mitochondrial pathway by upregulating the expression of Bax and Bim in human B cells [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(2): 313-318.

(收稿日期: 2018-11-08 修回日期: 2019-01-02)