

CPT联合美法仑对人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 细胞增殖的影响及其机制

安泽峰 葛晓燕 杨林花 张耀方 任方刚 陈秀花 覃艳红

山西医科大学第二医院血液科,太原 030001

通信作者:葛晓燕,Email:gxy4788@163.com

基金项目:出血性疾病和白血病诊疗山西省科技创新重点团队项目(201605D131044-05)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.017

Effect of CPT combined with melphalan on proliferation of human multiple myeloma cells RPMI8226 and its mechanism

An Zefeng, Ge Xiaoyan, Yang Linhua, Zhang Yaofang, Ren Fanggang, Chen Xiuhua, Tan Yanhong

Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Ge Xiaoyan, Email: gxy4788@163.com

随着蛋白酶体抑制剂和免疫调节剂的问世,多发性骨髓瘤(MM)患者的疗效明显改善,但仍有部分患者由于药物耐受性差或耐药而导致复发,当患者对蛋白酶体抑制剂和免疫调节剂耐药后其中位总生存期仅为9~13个月^[1-3],因此亟需新的药物或方案来延长MM患者的生存期。重组变构人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(circularly permuted TNF-related apoptosis inducing ligand, CPT)是我国自主研发的新型抗肿瘤药物,其稳定性、溶解性、生物活性均强于野生型肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)。在多项针对复发/难治性MM的Ⅱ期临床试验中均表现出较好的疗效^[4-6],目前已进入Ⅲ期临床试验。本研究中我们初步探讨CPT联合美法仑(Mel)对人MM细胞株RPMI8226细胞增殖的影响及其可能机制。

材料与方 法

1. 细胞株与细胞培养:人MM细胞株RPMI8226细胞由北京沙东生物技术有限公司提供,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱内培养,2~3d换液1次,取对数生长期的细胞用于后续实验。

2. 试剂与仪器:RPMI8226培养液、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗为美国Gibco公司产品;CCK-8试剂为日本同仁公司产品;Annexin V-FITC/PI双染流式试剂购自南京凯基生物公司;TRIszol、PrimerScript RT Master 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq TM[®]为日本TaKaRa公司产品;PCR引物购自上海生工生物工程技术有限公司;CPT冻干粉由北京沙东生物技术有限公司馈赠;Mel为美国MCE公司产品;7300实时荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品,FC500流式细胞仪为美国Beckman公司产品。

3. 细胞增殖活性检测:取对数生长期的RPMI8226细胞,调整细胞密度为 1.5×10^4 /ml,接种于96孔培养板中,分别加入7种不同终浓度的CPT(0.122、0.488、1.953、7.813、31.250、125.000、500.000 ng/ml)、7种不同终浓度Mel(6.674、8.899、11.865、15.820、21.094、28.125、37.500 μg/ml),培养24h和48h,培养结束前4h加入10 μl CCK-8试剂,置于37℃、5%的CO₂培养箱中培养4h,培养结束后上酶标仪检测吸光度值,绘制细胞生长曲线,计算细胞增殖抑制率。

4. 计算联合用药指数(combination index, CI):选择抑制率为50%时(IC₅₀)的CPT与Mel的7个浓度梯度联合作用于RPMI8226细胞24h,计算联合用药后的细胞增殖抑制率。选择IC₅₀的Mel与CPT的7个浓度梯度联合作用于RPMI8226细胞24h,计算联合用药后的细胞抑制率。用CompuSyn软件评价联合用药后细胞的抑制率与CI的关系^[7],判断药物间的相互作用:CI<1,判定为两药具有协同作用;CI=1,判定为两药具有叠加作用;CI>1,则两药具有拮抗作用。以上实验每组细胞重复3次。

5. 细胞凋亡检测:根据CompuSyn软件计算结果取CI最小时的CPT浓度和Mel浓度进行细胞凋亡率检测。取对数生长期RPMI8226细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,接种于24孔培养板中,设置空白组、CPT组、Mel组、CPT+Mel组,放置在37℃、5%CO₂的培养箱内培养0、2、4、6h。培养完成后收集各组细胞,使用PBS离心洗涤后弃上清,并加入10 μl Annexin V-FITC结合液和10 μl PI染色液混匀。室温下避光放置15 min,上流式细胞仪检测。每组实验重复3次。

6. RQ-PCR法检测各基因mRNA的表达荧光定量:取CI最小时的CPT浓度和Mel浓度进行细胞凋亡通路上的相关基因表达检测。取对数生长期RPMI8226细胞,调整细胞密

4. CPT联合Mel对RPMI8226细胞凋亡通路上相关基因表达的影响:选最适浓度,利用RQ-PCR法检测单药处理后及两药联合处理后凋亡通路上相关基因的表达。结果表明,CPT可使细胞内DR4、DR5、Bax基因的表达增强,同时下调Mcl-1基因的表达;Mel可使细胞内TP53、DR5和Bim基因的表达增强,同时抑制Bcl-2和Mcl-1基因的表达。两药联合作用6 h后TP53、DR4、DR5、Bim和Bax基因的相对表达量与单药组相比显著增高,同时Bcl-2和Mcl-1基因的相对表达较单药组显著降低(表4)。

讨 论

Wiley等^[8]于1995年首次报道并证实TRAIL/APO2L为肿瘤坏死因子超家族成员之一,通过对TRAIL功能的研究发现该配体可独立于P53诱导的凋亡途径而诱导多种肿瘤细胞的凋亡。

对于不适合自体造血干细胞移植的患者、老年患者的维持治疗以及自体造血干细胞移植患者大剂量清髓方案中Mel仍为不可替代的关键药物。BH3-only家族中两成员Bim和Bad因可以促进Bax、Bak等死亡效应分子的活化被认为是细胞凋亡通路中重要的启动因子;Mcl-1为Bcl-2家族中重要的抗凋亡分子,在正常状态下,Mcl-1与Bim呈结合状态,有研究表明,Mel作用于MM细胞可使细胞内Mcl-1/Bim复合体减少,使细胞内Bim蛋白表达增加,并下调Mcl-1的表达,从而诱导MM细胞凋亡^[9-10]。TP53基因是目前发现的与人类肿瘤发病相关性最大的抑癌基因之一,在细胞应对各种应激中有着重要作用。当Mel作用于细胞后,细胞生长分化受阻,当大量细胞受损超过TP53修复功能负荷后便启动细胞凋亡机制。TP53表达的增加可以激活Bax、apaf-1、puma等促凋亡基因来激活内源性凋亡途径;对于外源性凋亡途径,TP53可以诱导DR5和Fas等基因的表达来促进细胞凋亡^[11-12]。

本实验首次将CPT同Mel联合作用于RPMI8226细胞,

并对两药联合的作用机制进行初步探讨。结果表明CPT和Mel均可抑制RPMI8226细胞增殖,并且两药在较低浓度联合作用时可产生协同效应,但在高浓度联合作用时则表现为拮抗效应,可能是由于两药在单药高浓度作用时均已经表现出很高的抑制率,因此两药联合使用后并未表现出明显的协同效应。后通过流式细胞术证实CPT联合Mel协同抑制细胞增殖的机制主要为诱导细胞凋亡。

最后,利用RQ-PCR法对凋亡通路上的相关基因进行检测,证实两药联合后可通过内源性凋亡通路和外源性凋亡通路协同促进细胞凋亡。经外源性凋亡通路协同促进细胞凋亡可能的机制为:RPMI8226细胞经CPT处理后,因CPT可与DR4/5结合,故可使DR4/5基因表达增加,二者结合后可通过活化与外源性凋亡通路相关的FADD-caspase8途径诱导细胞凋亡;RPMI8226细胞经Mel处理后TP53基因表达增加,TP53激活后也可促进DR5的表达,结果与文献报道一致^[12]。经内源性凋亡通路协同促进细胞凋亡可能的机制为:CPT与DR4/5结合后可活化胞膜内caspase-8,后者可活化Bid成tBid,tBid可促使Bax、Bim基因表达增加,并转位至线粒体膜后使线粒体膜通透性增加,进而激活caspase-9引起细胞凋亡;CPT还可因抑制抗凋亡家族成员Mcl-1、Bcl-2的表达而促进细胞的凋亡;RPMI8226细胞经Mel处理后,细胞内Mcl-1/Bim复合体减少,从而使促凋亡基因Bim表达增加,抗凋亡基因Mcl-1表达下调,结果与文献报道一致^[9]。

综上所述,本研究为CPT联合Mel应用于MM患者的治疗提供新的理论依据,但仍需动物实验及长期的临床试验来验证其疗效。

志谢:感谢北京沙东生物技术有限公司对本实验所涉及的技术支持及器材馈赠

参 考 文 献

[1] Chen C, Siegel D, Gutierrez M, et al. Safety and efficacy of selinexor in relapsed or refractory multiple myeloma and Waldenstrom macroglobulinemia [J]. Blood, 2018, 131 (8):855- 863.

表3 CPT联合美法仑(Mel)作用不同时间细胞凋亡率的比较(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	2 h	4 h	6 h	P值
对照组	2.0±1.4	5.2±2.2	6.1±1.5	9.2±1.5	< 0.001 ^a
Mel	6.7±2.1	20.1±1.3	22.5±2.4	28.2±2.0	< 0.001 ^a
CPT	22.2±2.0	23.4±1.7	28.2±3.3	37.4±1.4	< 0.001 ^a
CPT+Mel	19.4±1.2	21.6±2.3	32.5±3.2	48.6±1.6	

注:P值为作用6 h条件下各组与CPT+Mel组比较。实验重复3次

表4 CPT联合美法仑(Mel)作用6 h后各基因相对表达量的比较(与对照组的比值)

组别	TP53	DR5	Bax	DR4	Bim	Mcl-1	Bcl-2
Mel	1.984 ^a	72.105 ^a	0.208 ^a	1 804.220 ^a	47.532 ^a	0.762 ^a	0.781 ^a
CPT	0.690 ^a	132.712 ^a	1.268 ^b	8 492.549 ^b	57.051 ^a	0.579 ^a	0.167 ^a
CPT+Mel	5.005	5135.23	2.050	9 155.29	114.554	0.008	0.016

注:与CPT+Mel组比较,^a P < 0.001, ^b P < 0.05

- DOI: 10.1182/blood-2017-08-797886.
- [2] Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015,12(5):286-295. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.239.
- [3] Kumar SK, Dimopoulos MA, Kastritis E, et al. Natural history of relapsed myeloma, refractory to immunomodulatory drugs and proteasome inhibitors: a multicenter IMWG study [J]. Leukemia, 2017, 31(11): 2443-2448. DOI: 10.1038/leu.2017.138.
- [4] Leng Y, Qiu L, Hou J, et al. Phase II open-label study of recombinant circularly permuted TRAIL as a single-agent treatment for relapsed or refractory multiple myeloma [J]. Chin J Cancer, 2016, 35(1):86. DOI: 10.1186/s40880-016-0140-0.
- [5] Geng C, Hou J, Zhao Y, et al. A multicenter, open-label phase II study of recombinant CPT (Circularly Permuted TRAIL) plus thalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma [J]. Am J Hematol, 2014, 89(11):1037-1042. DOI: 10.1002/ajh.23822.
- [6] Leng Y, Hou J, Jin J, et al. Circularly permuted TRAIL plus thalidomide and dexamethasone versus thalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma: a phase 2 study [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 79(6): 1141-1149. DOI: 10.1007/s00280-017-3310-0
- [7] Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. Cancer Res, 2010,70(2):440-446. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- [8] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. Immunity, 1995, 3(6): 673-682.
- [9] Gomez-Bougie P, Oliver L, Le Gouill S, et al. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex [J]. Oncogene, 2005, 24(54): 8076-8079.
- [10] Gkatzamanidou M, Sfrikakis PP, Kyrtopoulos SA, et al. Chromatin structure, transcriptional activity and DNA repair efficiency affect the outcome of chemotherapy in multiple myeloma [J]. Br J Cancer, 2014,111(7):1293-1304. DOI: 10.1038/bjc.2014.410.
- [11] Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, et al. TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(12): 2034-2038.
- [12] Holley AK, St Clair DK. Watching the watcher: regulation of p53 by mitochondria [J]. Future Oncol, 2009, 5(1): 117-130.

(收稿日期:2018-08-06)

(本文编辑:王叶青)

《中华血液学杂志》第九届编辑委员会委员名单

顾问 曹雪涛 陈赛娟 阮长耿

名誉总编辑 王建祥

总编辑 黄晓军

副总编辑 胡豫 马军 邵宗鸿 沈志祥 吴德沛 肖志坚 张凤奎

编辑委员(按汉语拼音排序) 艾辉胜 秘营昌 常英军 陈虎 陈方平 陈芳源 陈国安 陈国强
 陈洁平 陈苏宁 陈协群 陈元仲 程涛 董文革 方美云 冯建明 付蓉 高春记
 高子芬 韩明哲 侯健 侯明 胡豫 胡灯明 胡建达 黄河 黄慧强 黄晓军
 纪春岩 江明 江倩 金洁 克晓燕 赖永榕 李娟 李薇 李晓 李艳
 李建勇 李军民 李扬秋 李玉明 梁爱斌 刘红 刘林 刘霆 刘代红 刘开彦
 刘启发 刘卓刚 罗建民 马军 牛挺 裴雪涛 彭军 邱录贵 任汉云 邵宗鸿
 沈志祥 石远凯 宋永平 孙自敏 王椿 王敏 王欣 王季石 王健民 王景文
 王学锋 魏旭东 吴德沛 肖志坚 徐卫 徐开林 杨林花 杨仁池 于力 张梅
 张曦 张凤奎 张广森 张连生 张晓辉 赵洪国 赵维莅 赵永强 郑以州 周晋
 周道斌 周剑峰 朱军 竺晓凡

通讯编委(按汉语拼音排序) 白海 常春康 崔久嵬 杜欣 冯四洲 韩冰 韩艳秋 胡炯
 贾永前 姜尔烈 李剑 刘兵 刘澎 钱文斌 邱林 汝昆 施均 宋玉琴
 孙春艳 唐晓文 佟红艳 王迎 王昱 王宏伟 魏辉 吴彤 肖扬 许兰平
 俞文娟 张磊 张翼鹭 郑国光 庄俊玲