

硼替佐米联合毛喉素诱导硼替佐米耐药骨髓瘤细胞凋亡的实验研究

王莹莹, 钟瑶, 俞夜花, 唐勇, 杭海芳, 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: 硼替佐米作为蛋白酶体抑制剂已成为新诊断和复发多发性骨髓瘤患者临床治疗的主要药物, 但仍有部分患者对硼替佐米产生耐药而影响其长期生存。近年来研究发现, 提高细胞内环腺苷酸浓度可以诱导骨髓瘤细胞凋亡并延缓其生长, 成为骨髓瘤治疗新途径。该研究通过观察硼替佐米联合腺苷酸环化酶激动剂毛喉素(forskolin)对硼替佐米耐药骨髓瘤细胞的作用, 探究克服骨髓瘤耐药的可能途径及其机制。**方法:** 以硼替佐米耐药骨髓瘤细胞株H929-R和原代细胞为模型, 通过观察细胞生长、形态、凋亡相关基因的改变来研究硼替佐米、毛喉素单独或联合处理对硼替佐米耐药细胞增殖及凋亡的影响; 并应用Rh123/PI双染法检测药物处理前后细胞内线粒体跨膜电位的变化; 同时采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测线粒体凋亡相关基因转录水平及抗凋亡基因Bcl-2和Mcl-1的蛋白水平的改变。**结果:** 硼替佐米(20 nmol/L)与毛喉素(50 nmol/L)能够协同诱导硼替佐米耐药细胞凋亡。进一步研究发现, 毛喉素可协同硼替佐米促使耐药细胞内线粒体跨膜电位下降并下调其Bcl-2和Mcl-1蛋白的表达。**结论:** 毛喉素联合硼替佐米能够诱导硼替佐米耐药骨髓瘤细胞凋亡。

[关键词] 毛喉素; 硼替佐米; 骨髓瘤细胞; 凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.09.010

中图分类号: R733.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)09-0784-06

Experimental study on forskolin combined with bortezomib inducing apoptosis in bortezomib-resistant multiple myeloma cells WANG Yingying, ZHONG Yao, YU Yehua, TANG Yong, HANG Haifang, ZHU Qi (Department of Hematology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

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

[Abstract] Background and purpose: Although bortezomib has become one of the major therapeutic agents against newly diagnosed or relapsed multiple myeloma (MM), there are some patients who become resistant to bortezomib and then relapse, emerging as a major obstacle to long-term survival of MM patients. It has been found that elevation of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels could induce cell cycle arrest and apoptosis in MM cells, which has become an interesting approach to MM therapy. This study aimed to investigate possible effects of forskolin combined with bortezomib on bortezomib-resistant myeloma cells and further explore its mechanisms. **Methods:** The bortezomib-resistant MM cell lines H929-R and primary cells from patients who do not respond to bortezomib were used as *in vitro* models. The influences of bortezomib and/or forskolin on MM cells were evaluated through cellular morphology, changes of cell distribution and apoptotic rate. Meanwhile, flow cytometry analysis was used to detect mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and the expression levels of apoptosis regulators in these cells before and after the treatment were detected by Western blot. **Results:** Bortezomib (20 nmol/L) synergized with forskolin (50 nmol/L) to induce apoptosis of H929-R cells and bortezomib-resistant primary cells. In addition, bortezomib synergized with forskolin to induce collapse of mitochondrial transmembrane and facilitate the degradation of anti-apoptosis proteins including Bcl-2 and Mcl-1. **Conclusion:** Bortezomib could synergize with forskolin to induce apoptosis in bortezomib-resistant MM cells.

[Key words] Forskolin; Bortezomib; Multiple myeloma cell; Apoptosis

硼替佐米治疗多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)已成为标准一线方案,使得MM患者缓解率较以往有明显提高。但由于硼替佐米耐药情况不可避免的发生,相当数量MM患者缓解后复发,成为MM患者长期生存主要障碍之一^[1]。因此,寻找针对硼替佐米耐药MM患者治疗方法有其重要意义。近年来,体外和动物模型研究都发现一些使细胞内环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)浓度增高的药物可以诱导MM细胞增殖阻滞和凋亡,但单一cAMP通路调节剂存在所需药物剂量大且易导致不良反应等问题^[2]。为了寻找克服硼替佐米耐药以及增强cAMP通路调节剂作用效应的可能途径,我们以硼替佐米耐药的MM细胞株H929-R和原代细胞为模型,观察硼替佐米、腺苷酸环化酶激动剂毛喉素(forskolin)单独和联合处理对这些细胞的影响并探究其可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 制剂

毛喉素购自美国Sigma公司,以二甲基亚砜(DMSO)配制成浓度为50 mmol/L的储存液;50 nmol/L硼替佐米购自美国Sigma公司,以0.9%NaCl溶液配制。

1.2 细胞培养与细胞形态学观察

MM硼替佐米耐药细胞株H929-R由上海交通大学医学院病理与病理生理学教研室提供。将 2×10^5 个/mL的上述细胞接种于含10%胎牛血清、100 μ g/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和2 mmol/mL谷氨酰胺的RPMI-1640培养液(美国Sigma公司)中,常规条件下培养(37 $^{\circ}$ C, CO₂体积分数为5%, 95%湿度)48 h后抽取部分细胞进行涂片,瑞氏蓝染色,光镜下观察细胞形态,并以Image-Pro Plus软件拍摄图像。

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

取对数生长期的H929-R细胞,按 5×10^4 个/mL密度接种于96孔板,每孔100 μ L。实验组分别单独及联合用50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米处理H929-R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 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%、饱和湿度培养箱中,培养48、72 h后每孔分别加入10 μ L 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。按公式:细胞增殖抑制率(%)=(1- $D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}$) $\times 100\%$ 进行计算。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期、凋亡率和线粒体跨膜电位

1.4.1 细胞周期检测

分别收集上述单独及联合用50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米处理的细胞,经PBS洗涤后加入75%乙醇,-20 $^{\circ}$ C固定过夜;加入1 \times PBS 10 mL混匀,800 \times g离心5 min,离心半径为8.5 cm,洗涤2次,分别加入100 mg/mL Rnase 37 $^{\circ}$ C温育30 min;采用100 μ g/mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色后行流式细胞仪检测。所有数据由美国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PBS洗涤后加入1 mL结合缓冲液,漂洗细胞1次。依次加入100 μ L结合缓冲液及3 μ L Annexin-V/FITC,重悬混匀,避光温育15 min,再加入3 μ L PI,避光温育3 min;每管加入结合缓冲液350 μ L,1 h内进行流式细胞仪检测。

1.4.3 线粒体跨膜电位检测

将对照及各组H929-R细胞以1 mL培养液重悬。按照线粒体凋亡检测试剂盒(购自美国Biovision公司)说明,分别加入10 μ g/mL线粒体凋亡检测试剂罗丹明(Rh123),并于37 $^{\circ}$ C饱和湿度的培养箱中温育30 min,800 \times g离心5 min,离心半径8.5 cm,去除上清液,PBS洗涤1次。以250 μ g/mL PI染色,流式细胞仪检测,Rh123/PI荧光强度即为线粒体跨膜电位。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测细胞凋亡相关基因mRNA表达

以 4×10^5 个/mL密度接种H929-R细胞于6孔

板。实验组分别单独及联合用50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米, 对照组加入0.5%DMSO, 每孔设复孔2个; 置37 °C饱和湿度培养箱中培养72 h收集细胞, 抽提细胞总RNA反转录, 进行PCR扩增; PCR循环参数为: 95 °C变性5 s, 60 °C退火, 延伸40 s, 共40个循环。检测细胞*caspase-3*、*caspase-9*、*Bcl-2*和*Mcl-1*基因的表达(各基因上下游引物见表1), $\Delta Ct = Ct_{\text{各组的值}} - Ct_{\text{GAPDH值}}$, 以 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 方法计算基因表达量。

1.6 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H929-R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SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 常规转膜; 室温5%脱脂牛奶封闭1 h, 加入相应一抗(包括*Bcl-2*和*Mcl-1*), 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反应1 h, 显影扫描保存。所用抗体均购自美国Santa Cruz公司。MM患者骨髓单个核细胞分选及CD138+细胞分选均按文献[4]报道的方式进行。

1.7 统计学处理

采用SPSS 11.0软件包对数据进行统计分析。成组设计*t*检验法比较各组间差异。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 毛喉素和硼替佐米联合对H929-R生长的影响

硼替佐米耐药骨髓瘤细胞株H929-R经50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米单独或联合处理48 h后, 形态学观察显示: 同单药组相比, 联合处理组细胞出现核固缩、碎裂等典型凋亡形态学改变。Annexin-V/PI双染法检测细胞凋亡也显示: 细胞在联合处理组凋亡率明显增加, 并呈时间依赖性。72 h后, 联合处理组细胞几乎全部凋亡。联合处理组细胞凋亡率和硼替佐米组差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

2.2 毛喉素和硼替佐米联合对H929-R细胞周期和线粒体跨膜电位的影响

经50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米单独或联合处理H929-R 48 h后, 与单药组相比, 联合处理组细胞明显阻滞在细胞周期的静止期(G_0 期)和DNA合成前期(G_1 期), 相应地, DNA合成期(S期)细胞减少, 但DNA合成后期(G_2 期)和分裂期(M期)细胞无明显改变。20 nmol/L硼替佐米单独处理后的细胞周期分布则未见明显变化。Rh123是一种亲脂性阳离子荧光染料, 可发射绿色荧光被线粒体吸收, 其吸收量与 $\Delta \Psi_m$ 呈正比。H929-R细胞经PI和Rh123双染后分为

表1 RT-PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences of RT-PCR

Gene	Forward sequence (5' -3')	Reverse sequence (5' -3')
<i>caspase-3</i>	ACTGGACTGTGGACTTGAG	GAAACAATACATGGAATCTG
<i>caspase-9</i>	CGAACTAACAG GCAAGCAGC	CCAAATCCTCCAGAACCAA
<i>Bcl-2</i>	ACGACTTCTCCGCCGCTA	ACCCACCCGAACTCAAAGAAG
<i>Mcl-1</i>	GGGCAGGATTGTGACTCTCATT	GATGCAGCTTTCTTGTTTATGG

表2 毛喉素(50 nmol/L)单独及联合硼替佐米(20 nmol/L)对H929-R生长的影响

Tab. 2 Effect of forskolin alone or combined with bortezomib on the survival of bortezomib resistance myeloma cell lines H929R

Group	Sample/n	Apoptosis/%	
		48 h	72 h
Control	6	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.6
Forskolin	6	25.8 ± 1.4	32.3 ± 0.4
Bortezomib	6	20.7 ± 3.9	30.4 ± 1.9
Forskolin+bortezomib	6	59.3 ± 10.3*	82.6 ± 5.7*

H929-R cells were treated with forskolin alone or in combinatiton with bortezomib for 48 and 72 h; *: $P < 0.05$ relative to untreated cells

PI-Rh123^{high}、PI-Rh123^{low}和PI+Rh123^{low}共3个亚群，分别代表正常细胞($\Delta\psi_m$ 正常，膜完整)、凋亡细胞($\Delta\psi_m$ 崩溃，膜尚完整)和死亡细胞($\Delta\psi_m$ 崩溃，膜破坏)。H929-R经50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米单独或联合处理后，联合处理组的PI-Rh123^{low}染色细胞相比硼替佐米单药组明显增多($P<0.05$ ，表3)。

2.3 毛喉素和硼替佐米联合对H929-R细胞内凋亡调控因子mRNA表达的影响

H929-R细胞分别经50 nmol/L毛喉素和20 nmol/L硼替佐米单独或联合处理48 h后，联合处理组细胞内Bcl-2和Mcl-1的mRNA水平相比单药组明显下降($P<0.05$)，而caspase-3及caspase-9 mRNA表达则明显升高($P<0.05$ ，表4)。

2.4 毛喉素单独及联合硼替佐米对硼替佐米耐药骨髓瘤细胞内线粒体相关蛋白表达的影响

H929-R细胞经50 nmol/L毛喉素单独或联合20 nmol/L硼替佐米处理后，细胞内线粒体相关的抗凋亡蛋白Bcl-2及Mcl-1的蛋白表达水平显

著下降(图1)。而硼替佐米单药对该细胞内的上述调控蛋白表达无明显影响。

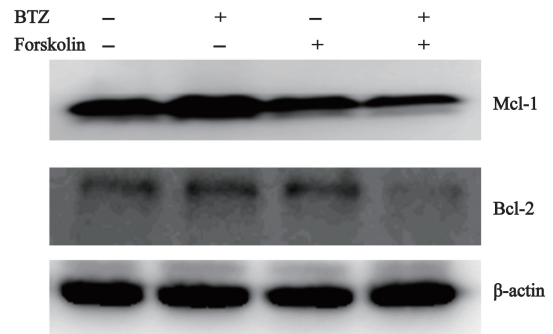


图1 Western blot检测毛喉素联合硼替佐米对H929-R细胞内Bcl-2及Mcl-1蛋白表达的影响

Fig. 1 The expression of Mcl-1 and Bcl-2 protein in H929-R cells treated with forskolin alone or in combination with bortezomib for 48 h was tested by Western blot

2.5 毛喉素联合硼替佐米对硼替佐米耐药原代细胞的影响

收集和分选硼替佐米耐药MM患者的原代细胞内CD138⁺细胞，经50 nmol/L毛喉素单独或联合20 nmol/L硼替佐米处理48 h后，CD138⁺原代

表3 毛喉素(50 nmol/L)单独及联合硼替佐米(20 nmol/L)对H929-R细胞周期和线粒体跨膜电位的影响

Tab. 3 Sensitivity of bortezomib resistance MM cell lines to combination of forskolin (50 nmol/L) and bortezomib (20 nmol/L)

Group	Sample/n	Cell cycle			PI-Rh123 ^{low}
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
Control	6	32.0 ± 1.2	36.8 ± 0.8	31.6 ± 1.40	2.06 ± 1.34
Forskolin	6	42.6 ± 0.6	25.6 ± 2.3	31.8 ± 0.45	40.20 ± 0.69
Bortezomib	6	30.10 ± 1.3	32.5 ± 2.1	37.4 ± 2.04	25.06 ± 0.86
Forskolin +bortezomib	6	58.9 ± 1.6*	10.5 ± 1.6*	30.6 ± 1.05*	85.0 ± 1.45*

H929-R cells were treated with forskolin alone or in combination with bortezomib for 48 h; *: $P<0.05$ relative to untreated cells

表4 毛喉素(50 nmol/L)单独及联合硼替佐米(20 nmol/L)对H929-R细胞内凋亡调控因子mRNA表达的影响

Tab. 4 Reactivation of gene expression by forskolin combined with bortezomib treatment in bortezomib resistance myeloma cell lines H929-R

Group	Sample/n	Gene expression			
		Caspase-9	Caspase-3	Bcl-2	Mcl-1
Control	6	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Forskolin	6	1.43±0.36	1.63±0.56	0.62±0.21	0.53±0.25
Bortezomib	6	1.06±0.65	1.26±0.48	1.03±0.05	1.20±0.06
Forskolin+bortezomib	6	2.05±0.85*	2.12±0.54*	0.42±0.04*	0.37±0.08*

H929-R cells were treated with forskolin alone or in combination with bortezomib for 48 h; *: $P<0.05$ relative to untreated cells

细胞的凋亡率在联合处理组明显增加, 而硼替佐米单药对该耐药患者的CD138⁺细胞无明显影响。联合处理组的CD138⁺细胞凋亡率与硼替佐米单药组差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。

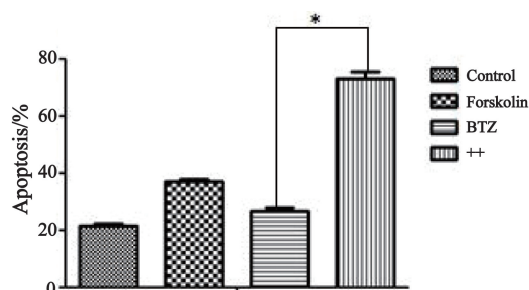


图2 毛喉素联合硼替佐米对骨髓瘤原代细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of forskolin alone or combined with bortezomib on the survival of primary MM cells

*: $P < 0.05$, as compared with each other

3 讨 论

研究显示, cAMP信号通路与包括MM在内的多种恶性淋巴细胞异常增殖和凋亡受抑密切相关, 调变该通路可以改变恶性淋巴细胞生物学行为^[4]。我们的前期研究发现, cAMP拟似物8-CPT-cAMP通过调变MM细胞内凋亡相关蛋白(如Bcl-2和Bax等)而诱导MM细胞增殖阻滞和凋亡, 但所需剂量较高而且作用时间较长^[9], 提示单一cAMP通路调节剂对MM细胞作用有限。

硼替佐米作为蛋白酶体抑制剂已成功应用于MM的临床治疗, 其主要通过调变MM细胞内NF- κ B途径和抑制MM细胞内蛋白酶体活性诱导MM细胞凋亡^[5]。尽管硼替佐米为基础的联合化疗方案显示良好的临床反应率, 但是仍然有相当一部分MM患者缓解后短期内复发并对硼替佐米发生耐药, 部分MM患者无法耐受其不良反应^[6], 说明硼替佐米治疗MM也有其局限性。进一步研究显示, NF- κ B信号通路、细胞凋亡途径、热休克蛋白(heat shock protein, HSP)以及部分原癌基因的表达异常与硼替佐米耐药密切相关。因此, 进一步探究硼替佐米作用机制, 特别是其耐药机制是当前研究热点

之一^[7]。

鉴于此, 本研究采用内源性提高细胞内cAMP的腺苷酸环化酶激动剂毛喉素与硼替佐米联合处理硼替佐米耐药骨髓瘤细胞株H929-R, 观察通过内源性提高细胞内cAMP水平对克服硼替佐米耐药的影响。结果提示, 毛喉素联合硼替佐米可抑制H929-R细胞生长, 促使细胞停滞在G₀/G₁期。同时, 经两药联合处理48 h的H929-R细胞呈现典型凋亡的形态学改变, Annexin-V/PI双染法检测细胞凋亡显示, 细胞在联合处理组凋亡率明显增加。

研究发现, 提高MM细胞株U266和INA6细胞内cAMP水平能够诱导细胞内线粒体跨膜电位下降及其下游caspase-9、caspase-3和PARP的活化, 提示激活MM细胞内cAMP信号通路可能通过经典线粒体凋亡途径来诱导MM细胞凋亡^[8]。本实验同样发现, 毛喉素联合硼替佐米可以诱使H929-R细胞线粒体跨膜电位改变。另外, RTFQ-PCR检测结果显示, 联合处理后, H929-R细胞内线粒体凋亡相关基因caspase-9及caspase-3的转录水平明显增高, 而抗凋亡基因Bcl-2和Mcl-1的转录水平则显著降低, 并且Western blot检测结果也显示, Bcl-2和Mcl-1的蛋白水平同样在联合处理组明显下降。这提示毛喉素联合硼替佐米可能通过介导线粒体凋亡途径及下调抗凋亡家族蛋白Bcl-2和Mcl-1来诱导耐药细胞株凋亡, 但其具体作用机制有待深入研究。本实验在硼替佐米耐药患者的原代细胞中进行验证, 发现毛喉素联合硼替佐米可明显诱导硼替佐米耐药原代细胞的凋亡。

综上所述, 毛喉素通过提高细胞内cAMP含量介导线粒体凋亡途径和下调耐药细胞内抗凋亡蛋白Bcl-2和Mcl-1来克服硼替佐米耐药效应, 这为制定治疗硼替佐米耐药骨髓瘤的新型联合化疗方案提供了实验及理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] RÖLLIG C, KNOP S, BORNHÄUSER M. Multiple myeloma [J]. Lancet, 2015, 385(9983): 2197-2208.
- [2] LEFKIMMIATIS K, ZACCOLO M. cAMP signaling in subcellular compartments [J]. Pharmacol Ther, 2014,

- 143(3): 295-304.
- [3] JAGANATHAN S, MALEK E, VALLABHAPURAPU S, et al. Bortezomib induces AMPK-dependent autophagosome formation uncoupled from apoptosis in drug resistant cells [J] . *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12358-12370.
- [4] FOLLIN-ARBELET V, MISUND K, HALLAN NADERI E, et al. The natural compound forskolin synergizes with dexamethasone to induce cell death in myeloma cells via BIM [J] . *Sci Rep*, 2015, 5: 13001. doi: 10.1038/srep13001.
- [5] FORMOSA R, VASSALLO J. cAMP signalling in the normal and tumorigenic pituitary gland [J] . *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 392(1-2): 37-50.
- [6] KAPOOR P, RAMAKRISHAN V, RAJKUMA S V. Bortezomib combination therapy in multiple myeloma [J] . *Semin Hematol*, 2012, 49(3): 228-242.
- [7] MARKOVINA S, CALLANDER N S, O' CONNOR S L, et al. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF-kappaB activity in myeloma cells [J] . *Mol Cancer*, 2010, 9: 176. doi: 10.1186/1476-4598-9-176.
- [8] NIKESITCH N, LING S C. Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance [J] . *J Clin Pathol*, 2016, 69(2): 97-101.
- [9] 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.

(收稿日期: 2016-02-11 修回日期: 2016-05-22)