

青蒿琥酯对硼替佐米耐药骨髓瘤 细胞株的耐药逆转作用及机制

欧瑞明^{*}, 谭友平, 周长华, 刘爽, 张青, 钟启, 杜苑苑, 郑丽玲, 刘志, 黄竞
(广东省第二人民医院, 广州 510317)

[摘要] **目的:**探讨青蒿琥酯对硼替佐米耐药骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞株的增殖抑制作用,并探讨其逆转骨髓瘤细胞耐药的作用机制。**方法:**采用硼替佐米浓度梯度递增法,以人MM细胞株NCI-H929为亲本,建立硼替佐米耐药的NCI-H929细胞株NCI-H929BR。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测青蒿琥酯对NCI-H929BR的增殖抑制及对硼替佐米的耐药逆转作用;流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测核转录因子- κ B p65(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)蛋白,磷酸化核转录因子- κ B p65(phospho-nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p-p65)蛋白, P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp), B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白以及Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)的表达变化。**结果:**采用浓度梯度递增法成功建立了硼替佐米耐药的NCI-H929细胞株NCI-H929BR,其耐药倍数为20.2倍。青蒿琥酯对NCI-H929BR有明显的增殖抑制作用,抑制效应呈浓度依赖性;硼替佐米($50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)单药对NCI-H929BR无明显增殖抑制作用,青蒿琥酯($12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)单药的抑制率为(23.53 ± 2.21)% ($P < 0.05$),两药联合的抑制率为(60.71 ± 3.43)% ($P < 0.01$);青蒿琥酯处理后,NCI-H929BR的凋亡率上升, NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp, Bcl-2表达下降, Bax表达上升,呈浓度依赖性。**结论:**青蒿琥酯可抑制NCI-H929BR的增殖,促进细胞凋亡,逆转其对硼替佐米的耐药性,下调NF- κ B p65, p-p65, P-gp以及Bcl-2的表达,上调Bax的表达可能为其逆转肿瘤细胞耐药的作用机制。

[关键词] 青蒿琥酯; 硼替佐米; 骨髓瘤; 耐药; 核转录因子- κ B p65; P糖蛋白; B细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2相关X蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0139-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090139

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0911.016.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 9:11

Drug Resistance Reversal Effect of Artesunate on Bortezomib-resistant Multiple Myeloma Cell Line and Its Molecular Mechanism

OU Rui-ming^{*}, TAN You-ping, ZHOU Chang-hua, LIU Shuang, ZHANG Qing,
ZHONG Qi, DU Yuan-yuan, ZHENG Li-ling, LIU Zhi, HUANG Jing
(Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Artesunate on suppressing the proliferation of Bortezomib-resistant multiple myeloma (MM) cell line and to explore its molecular mechanism on reversal of drug resistance. **Method:** Human MM cell line NCI-H929 was treated with Bortezomib in a dose-dependent manner to establish Bortezomib-resistant cell line NCI-H929BR. The inhibitory role of Artesunate on NCI-H929BR and its reversal effect against Bortezomib-resistance were determined by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Cell apoptosis was determined by flow cytometry, and the protein expression levels of nuclear

[收稿日期] 20160811(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81400168);广东省中医药局科研课题项目(20131104);广东省医学科研基金项目(A2013128);广东省第二人民医院人才引进基金项目(Y2014-002)

[通讯作者] ^{*} 欧瑞明, 硕士, 副主任医师, 从事血液系统恶性肿瘤研究, Tel:020-89168092, E-mail: ouruiming@126.com

factor- κ B p65 (NF- κ B p65), phospho-nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p-p65), P-glycoprotein (P-gp), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) protein and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by Western blot assay. **Result:** Bortezomib-resistance index of NCI-H929BR was 20.2 times. Artesunate treatment had significant inhibitory effect on the proliferation of NCI-H929BR and the inhibitory effect was in a concentration-dependent manner. Bortezomib ($50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) alone had less effect on NCI-H929BR proliferation, while the inhibition rate of artesunate ($12.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) alone was $(23.53 \pm 2.21)\%$ ($P < 0.05$); Bortezomib combined with artesunate treatment had greater inhibitory effect $(60.71 \pm 3.43)\%$ ($P < 0.01$). Artesunate treatment increased NCI-H929BR apoptosis, down-regulated NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp and Bcl-2 expression levels, and up-regulated Bax expression level in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** Artesunate could inhibit NCI-H929BR proliferation, promote apoptosis and reverse Bortezomib-resistance, and its mechanism may be associated with down-regulating expression levels of NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp, Bcl-2 and up-regulating expression level of Bax.

[**Key words**] artesunate; bortezomib; multiple myeloma; drug resistance; nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65); P-glycoprotein (P-gp); B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2); Bcl-2 associated X protein (Bax)

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是中老年人常见的血液系统恶性肿瘤, 目前含硼替佐米的治疗方案已成为多发性骨髓瘤的一线治疗选择, 使 MM 患者的缓解率及生存期得到较大程度的提高, 明显改善了 MM 的预后^[1]。虽然硼替佐米临床疗效显著, 但在临床的实际应用中, 仍有 20% ~ 30% MM 患者初始即对硼替佐米原发耐药, 初始治疗有效的患者, 随着药物的反复应用, 大多数患者也会发生对硼替佐米产生继发性耐药, 最终导致疾病出现进展, 绝大多数 MM 患者都会进入复发或难治阶段, 使得其治疗遇到了新的难题^[2]。虽然联合来那度胺等新药和传统化疗在克服 MM 耐药方面有一定成效, 但患者多为中老年, 联合用药可能存在副作用加大而不能耐受等问题, 而且新药的联合应用往往费用高昂, 增加患者经济负担。因此寻找高效、低毒、廉价的联合用药方案有着重要的临床意义。

目前国内外关于硼替佐米的耐药机制研究甚少, 其耐药机制尚不明确。前期研究提示硼替佐米耐药可能与核转录因子- κ B (NF- κ B) 的活化、热休克蛋白 (heat shock protein, HSP), Bcl 蛋白家族中 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 等抗凋亡蛋白的过表达、抗氧化剂水平增高等有关^[3-4]。研究表明, 我国的中医药青蒿琥酯 (Artesunate, ART) 能够抑制 MM 细胞的增殖并诱导其凋亡, 并通过抑制骨髓血管新生, 逆转骨髓瘤细胞多药耐药等多种机制, 抑制 MM 的发生、发展^[5]。研究发现, 青蒿琥酯对 SP2/0 骨髓瘤细胞有明显的增殖抑制及凋亡促进作用, 青蒿琥酯作用后, SP2/0 胞浆中大鼠 NF- κ B 抑制蛋白 α (IKB α) 蛋白水平增加, 细胞核 NF- κ B p65 显著减少且活性

降低^[6-8], 体内研究显示, 青蒿琥酯对 SP2/0 小鼠移植瘤亦有一定的抑制作用, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 青蒿琥酯的抑瘤率分别为 17.8%, 36.5% 和 48.0%^[6]。研究还发现, 青蒿琥酯可以降低骨髓瘤细胞 HSP 的转录和翻译后水平^[5], 下调 Bcl-2 及上调促凋亡蛋白 Bax 表达水平^[9]。由此可见, 青蒿琥酯对硼替佐米相关耐药机制均有一定作用, 推测其对硼替佐米耐药 MM 细胞亦可能具有逆转效应。目前国内外对青蒿琥酯逆转 MM 细胞耐药的研究多着眼于传统化疗药物方面, 而对 MM 的治疗新药硼替佐米的耐药逆转机制研究方面报道甚少, 本研究首先参照朱蓉等^[10]方法建立硼替佐米耐药的人多发性骨髓瘤细胞株, 观察青蒿琥酯的增殖抑制作用并探讨其逆转骨髓瘤细胞耐药的可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞系 人 MM 细胞株 NCI-H929 购自 American Type Culture Collection (ATCC)。

1.2 药品与试剂 RPMI 1640, 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 11875-093, 10099-141); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 碧云天生物公司, 批号 C0009); 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司, 批号 D2650); Bcl-2, Bax, NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 sc-7382, sc-23959, sc-8008, sc-166748, sc-365062)。P 糖蛋白 (P-gp) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 ab170904); 二抗为 goat anti-mouse 免疫球蛋白 (Ig)G₁, goat anti-rabbit IgG₁ (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 sc-395763, sc-45090); 注射用青蒿琥酯 (桂林南药股份有限公司, 批号

H10930195); 注射用硼替佐米(西安杨森制药有限公司, 批号 J20050042); Annexin V/碘化丙啶(PI)(康为世纪公司, 批号 cw-2575-50)。

1.3 仪器 SW-CJ-1FD 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 3111 型 CO₂ 培养箱, CR3i 型冷冻多功能离心机(美国 Thermo 公司); 525BR027843 型电泳槽, 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); FACSCaliber 型流式细胞仪(美国 BD 公司); TSE24086V 型超低温冰箱(美国赛默飞世尔公司); EVOS fl 型荧光倒置显微镜(美国 Life 公司); SynergyHT 型多功能微孔板检测仪(美国 Biotek 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 3~4 d 换液传代 1 次。

2.2 硼替佐米耐药细胞株的建立 取对数生长期 NCI-H929 细胞株, 调整密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 接种于 6 孔板, 加入含硼替佐米(终浓度为 10 nmol · L⁻¹)的 RPMI1640 培养基, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 1 周 2 次换液至细胞生长恢复正常, 再加入 10 nmol · L⁻¹ 的硼替佐米, 3 次后提高浓度至 20 nmol · L⁻¹。按此方式逐步增加浓度至 200 nmol · L⁻¹, 培养 8 个月, 获得硼替佐米耐药的 NCI-H929 细胞株(NCI-H929 bortezomib resistant, NCI-H929BR)。

2.3 MTT 法检测细胞活力 调整对数生长期的 NCI-H929 和 NCI-H929BR 细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 于 96 孔板每孔加入细胞悬液 50 μL; 将硼替佐米用新鲜完全培养基分别稀释至 1, 10, 50, 100, 500, 1 000 nmol · L⁻¹, 每个浓度设 3 个复孔, 空白组为只加药物的培养基。37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入 5 g · L⁻¹ MTT 10 μL, 继续 37 °C 孵育 4 h 后, 每孔加入 DMSO 150 μL, 37 °C 摇床上震荡过夜, 然后在酶标仪 570 nm 波长处读取吸光度 A。细胞存活率 = (A_{加药细胞} - A_{空白}) / (A_{不加药细胞} - A_{空白}) × 100%, 以存活率为 Y 轴, 浓度对数值(以 10 为底)为 X 轴, 利用 Excel 线性回归方程计算该细胞系的半数抑制浓度(IC₅₀)。耐药倍数 = 耐药细胞 IC₅₀ / 亲本细胞 IC₅₀。并根据结果, 选择硼替佐米对 NCI-H929BR 的低毒浓度(药物作用后细胞存活率 > 85% 的药物浓度, 该浓度下细胞对药物耐药), 进行后续青蒿琥酯逆转 NCI-H929BR 对硼替佐米耐药性的分析。

2.4 MTT 法检测青蒿琥酯对 NCI-H929BR 的增殖

取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 孵育 24 h 后, 以不同质量浓度青蒿琥酯(25, 50 mg · L⁻¹)处理 48 h, 空白组只加 RPMI-1640 培养液, 加 MTT 工作液, 置 CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 吸去上清, 加入 DMSO, 0.2 mL/孔, 在酶标仪 570 nm 波长处读取 A, 计算细胞抑制率。抑制率 = (1 - A_{药物组} / A_{空白组}) × 100%。

2.5 MTT 法检测青蒿琥酯逆转 NCI-H929BR 对低毒浓度硼替佐米的耐药性 取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 孵育 24 h 后, 分别以低毒浓度硼替佐米^[11], 选择近细胞抑制率 < 20% 时所对应的浓度(IC₂₀)青蒿琥酯(预实验提示 12.5 mg · L⁻¹青蒿琥酯对 NCI-H929BR 的抑制率接近 20%), 低毒浓度硼替佐米联合近 IC₂₀ 浓度青蒿琥酯处理 24 h, 空白组只加 RPMI-1640 培养液, 酶标仪 570 nm 波长下测定 A, 计算细胞抑制率。

2.6 Annexin V/PI 染色测定细胞凋亡 取对数生长期 NCI-H929BR 细胞, 调整密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 接种于 12 孔培养板中, 每孔各加入细胞悬液 2 mL, 加入青蒿琥酯工作液(质量浓度 50 mg · L⁻¹)处理 24 h, 调整待测细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 取细胞悬液 1 mL, 400 × g, 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 加入预冷磷酸盐缓冲液(PBS) 1 mL, 轻轻震荡使细胞悬浮, 400 × g, 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 重复 2 次, 将细胞用 Binding Buffer 200 μL 重悬, 加入 Annexin V FITC 10 μL 和 PI 5 μL, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 加入 Binding Buffer 300 μL, 立即用流式细胞仪进行检测。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 收集、裂解细胞, 提取总蛋白, Bradford 法测定蛋白含量, 各组取蛋白 40 μg, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, Bcl-2, Bax, NF-κB p65, NF-κB p-p65, P-gp, GAPDH 抗体(1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 洗膜 3 次, 加入相应的二抗(1:1 000) 室温孵育 2 h, 洗膜 3 次, ECL 显影, Image J 软件计算各条带灰度值。以目的蛋白/GAPDH 表示蛋白相对表达量。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 成组设计两组间均数比较采用 t 检验, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 亲本 NCI-H929 细胞和 NCI-H929BR 细胞对硼替佐米 IC₅₀ 的影响 将不同浓度的硼替佐米 (1 ~ 1 000 nmol · L⁻¹) 分别处理亲本 NCI-H929 和 NCI-H929B 细胞系 24 h, 检测药物处理后细胞的存活率, 利用 Excel 线性回归方程计算硼替佐米对亲本 NCI-H929 和 NCI-H929B 细胞系 24 h 的 IC₅₀, 分别为 13.4, 269.8 nmol · L⁻¹, 耐药倍数为 20.2 倍。随着硼替佐米浓度的升高, NCI-H929, NCI-H929BR 细胞存活率逐渐降低。见表 1。

表 1 硼替佐米作用 24 h 后对 NCI-H929 和 NCI-H929B 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of bortezomib on survival rate of NCI-H929 and NCI-H929B after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞	浓度/nmol · L ⁻¹	细胞存活率/%
NCI-H929	1	87.51 ± 1.32
	10	59.36 ± 0.54
	50	17.12 ± 0.61
	100	8.62 ± 0.87
	500	4.39 ± 0.18
	1 000	1.27 ± 0.36
NCI-H929BR	1	94.99 ± 1.38
	10	90.98 ± 0.55
	50	85.67 ± 0.21
	100	83.52 ± 0.90
	500	51.62 ± 1.41
	1 000	21.96 ± 0.78

3.2 青蒿琥酯对 NCI-H929BR 增殖的影响 青蒿琥酯对 NCI-H929BR 有明显的增殖抑制作用, 与空白组比较, 25, 50 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组的抑制率明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 25 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组比较, 50 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组的抑制率明显升高 ($P < 0.05$), 其抑制效应呈浓度依赖性。见表 2。

表 2 青蒿琥酯处理 48 h 后对 NCI-H929B 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of artesunate on inhibition rate of NCI-H929B after 48 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg · L ⁻¹	抑制率/%
空白	-	-
青蒿琥酯	25	37.5 ± 3.1 ¹⁾
	50	66.5 ± 2.6 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 25 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 青蒿琥酯逆转 NCI-H929BR 对硼替佐米的耐药性 50 nmol · L⁻¹ 硼替佐米处理 24 h, NCI-H929BR 的存活率为 (85.67 ± 0.21)%, 选择此浓度硼替佐米作为低毒浓度联合近 IC₂₀ 浓度青蒿琥酯 (12.5 mg · L⁻¹), 观察两药的协同作用。硼替佐米单药处理后 NCI-H929BR 的抑制率与空白组比较无显著性差异, 提示 NCI-H929BR 对该浓度硼替佐米耐药; 与空白组比较, 青蒿琥酯单药组, 硼替佐米联合青蒿琥酯组抑制率明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与青蒿琥酯单药组比较, 硼替佐米联合青蒿琥酯组的抑制率亦显著升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 硼替佐米、青蒿琥酯、硼替佐米联合青蒿琥酯处理后 24 h 对 NCI-H929B 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of bortezomib, artesunate and their combination on inhibition rate of NCI-H929B after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	抑制率/%
空白	-	-
硼替佐米	50 nmol · L ⁻¹	9.06 ± 1.47
青蒿琥酯	12.5 mg · L ⁻¹	23.53 ± 2.21 ¹⁾
硼替佐米联合青蒿琥酯	50 nmol · L ⁻¹ + 12.5 mg · L ⁻¹	60.71 ± 3.43 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 12.5 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.4 青蒿琥酯对 NCI-H929BR 诱导凋亡作用的影响 与空白组比较, 50 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯处理 24 h, 早期凋亡细胞 (Annexin V 阳性, PI 阴性), 晚期凋亡细胞 (Annexin V 阳性, PI 阳性) 均明显升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 青蒿琥酯处理 24 h 后对 NCI-H929BR 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Cell apoptosis rate of NCI-H929BR after artesunate treatment for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg · L ⁻¹	早期凋亡	晚期凋亡
空白	-	2.32 ± 1.02	1.93 ± 0.69
青蒿琥酯	50	13.1 ± 1.53 ¹⁾	10.26 ± 2.42 ¹⁾

3.5 青蒿琥酯对 NCI-H929BR 细胞 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 青蒿琥酯处理 24 h, 与空白组比较, NCI-H929BR 细胞 Bcl-2 蛋白表达明显下降, Bax 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$); 与 25 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组比较, 50 mg · L⁻¹ 青蒿琥酯组的 Bcl-2 蛋白表达明显下降, Bax 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$)。见图 1。

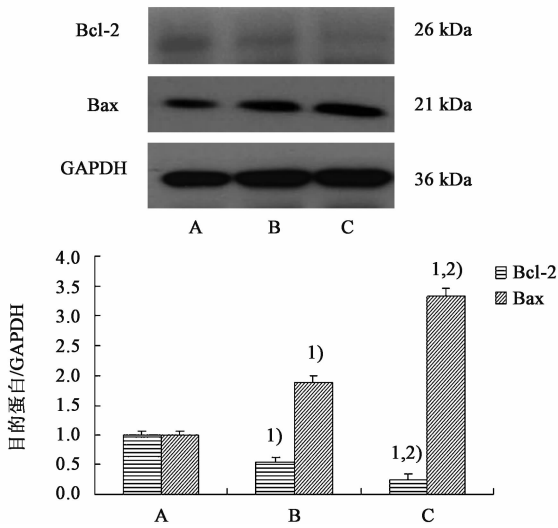


图 1 青蒿琥酯处理 24 h 后对 NCI-H929B 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of artesunate on expression of Bcl-2 family protein of NCI-H929B after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 青蒿琥酯对 NCI-H929BR 的 NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp 蛋白表达的影响青蒿琥酯处理 24 h, 与空白组比较, NCI-H929BR, NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp 蛋白表达量均明显降低 ($P < 0.05$); 与 25 mg·L⁻¹青蒿琥酯组比较, 50 mg·L⁻¹青蒿琥酯组 NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

4 讨论

硼替佐米在多发性骨髓瘤治疗中具有重要地位, 研究其产生耐药的机制以及发掘能逆转其耐药性的药物有着重要的临床意义。本研究首先采用硼替佐米浓度梯度递增法, 以人 MM 细胞株 NCI-H929 为亲本, 成功建立了硼替佐米耐药的 NCI-H929 细胞株 NCI-H929BR, 其耐药倍数为 20.2 倍, 属高度耐药的耐药细胞株模型。实验结果显示, 青蒿琥酯对 NCI-H929BR 有明显的增殖抑制作用, 抑制效应呈浓度依赖性, 表明青蒿琥酯与硼替佐米不存在交叉耐药性。NCI-H929BR 对低毒浓度的硼替佐米耐药, 而联合近 IC₂₀ 青蒿琥酯后, 对 NCI-H929BR 的抑制率明显上升, 提示低剂量的青蒿琥酯与硼替佐米联合使用, 使耐药细胞恢复对硼替佐米的敏感性, 逆转其耐药性, 两药联合具有良好的抗肿瘤协同效应。通常药物 IC₂₀ 为无明显细胞毒作用的剂量, 逆转耐药实验一般选择 IC₂₀ 进行。体外研究表明, 青蒿琥酯对正常人外周血单个核细胞的 IC₅₀

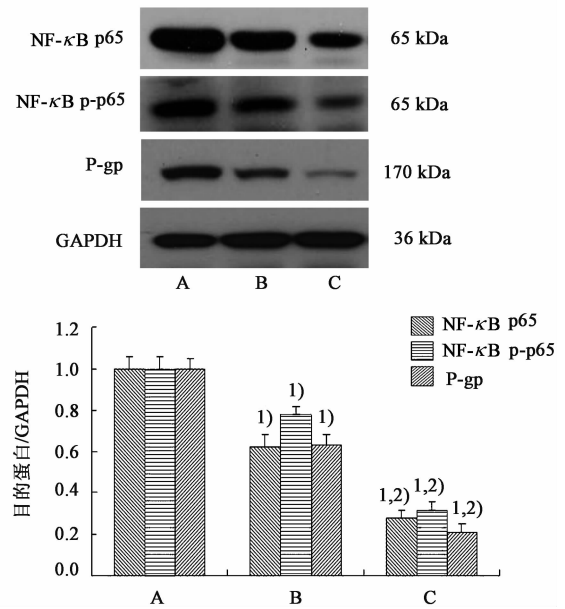


图 2 青蒿琥酯处理 24 h 后对 NCI-H929B 细胞 NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of artesunate on expression of NF- κ B p65, NF- κ B p-p65 and P-gp protein of NCI-H929B after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超过 100 mg·L⁻¹ [12], 本研究选择的青蒿琥酯最高质量浓度为 50 mg·L⁻¹, 远低于 IC₅₀, 因此可以认为所选择的浓度是安全有效的。

MM 细胞的耐药机制复杂, 且耐药多表现为多耐药反应 (MDR), 目前认为主要与多药耐药基因 (MDR1) 的过度表达、凋亡调控基因介导机制等有关, 其中最主要的耐药机制是 NF- κ B 通路的活化, 使得受 NF- κ B 调控的下游基因如 MDR1, Bcl-2 表达增加 [13]。P-gp 介导的多药耐药途径是最为经典的耐药机制, 由 MDR1 编码的 P-gp 是一种跨膜蛋白, 具有能量依赖性外排泵功能, 能够降低细胞内药物浓度, 从而产生多药耐药。Iijima 等 [14] 对蛋白酶体抑制剂 TP-110 耐药的 RPMI 8226 细胞株的研究发现, 耐药细胞株 MDR1 的表达明显升高, Buda 等 [15] 对硼替佐米治疗后复发耐药的的患者进行耐药基因检测, 患者的骨髓瘤细胞中也检测到 MDR1 的高表达。ZHOu 等 [16] 研究显示, MM 细胞中 Nek2 的高表达会上调 P-gp 等多药耐药相关蛋白的表达, 导致 MM 细胞对硼替佐米产生耐药, 并且与 MM 患者的疗效及复发密切相关。相关研究发现, 青蒿琥酯对 SP2/0 骨髓瘤细胞有明显的增殖抑制及诱导凋亡作用, 能降低 NF- κ B p65 以及 p170 耐药蛋白表达水平 [6-8], 进一步的研究还发现, 青蒿琥酯能下调耐药蛋白 P-gp 的表达, 逆转对阿霉素、米托蒽醌、依托泊

苷和甲氨蝶呤等多药耐药的 MM 细胞株的耐药性^[11]。除此之外, Bcl-2 也在 MM 细胞耐药中起重要作用, 某些化疗药物可以上调 MM 细胞株 Bcl-2 的表达, 引起获得性耐药^[17], 对多发性骨髓瘤患者 MM 原代细胞研究中亦发现, 耐药组 MM 细胞 Bcl-2 水平明显高于非耐药组^[18]。Bcl-2 家族在细胞凋亡调控中有重要的作用, Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最主要的抑制凋亡和促进凋亡蛋白。在多数肿瘤中, Bcl-2 表达水平升高, 而 Bax 表达下降。上调 Bcl-2 或下调 Bax 能抑制多种因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡, 而下调 Bcl-2 或上调 Bax 则能促进多种肿瘤细胞凋亡^[19]。Holien 等^[20]研究发现, 青蒿琥酯能明显抑制 MM 细胞的增殖并诱导其凋亡, 青蒿琥酯作用后, MM 细胞 Bcl-2 表达水平明显下调, Bax 表达水平上调。本研究结果亦显示, 青蒿琥酯处理后, 硼替佐米耐药骨髓瘤细胞的 NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp 及 Bcl-2 的表达降低, Bax 表达上升, 其抗肿瘤以及逆转肿瘤细胞耐药的机制可能与其抑制 NF- κ B 的活化, 进一步下调 MDR1 蛋白表达产物 P-gp 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 上调促凋亡蛋白 Bax 的表达有关。

硼替佐米是人工合成的二肽硼酸盐类似物, 其抗骨髓瘤的主要作用机制是可逆性抑制 26S 蛋白酶体的糜蛋白酶活性, 阻止泛素标记蛋白的降解, 影响多种细胞内信号级联反应。蛋白酶体受到抑制后, 细胞 NF- κ B 的抑制因子 I κ B 不再通过蛋白酶体被大量降解, I κ B 与 NF- κ B 结合使 NF- κ B 处于失活状态, 进而减少 IL-6 的分泌, 抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 生长信号, 降低 Bcl-2 等抗凋亡蛋白水平, 最终诱导细胞发生凋亡^[21]。本研究结果显示, 青蒿琥酯对硼替佐米高度耐药的 NCI-H929BR 仍有明显抑制 NF- κ B 活化的作用。除了抑制 NF- κ B 通路活化之外, 青蒿琥酯的抗骨髓瘤作用还有多种机制参与, 如诱导自由基的产生及氧化应激、诱导肿瘤细胞周期阻滞、抑制 MM 血管新生等多个方面^[5], 其中诱导自由基的产生及氧化应激方面尤其值得重视。青蒿素类药物中都含有独特的过氧桥结构, 在细胞内二价铁离子的催化作用下, 青蒿素类药物中的过氧桥发生裂解, 产生大量以青蒿素碳原子为中心的自由基和活性氧 (ROS), 这种独特的作用机制可能是其杀伤具有耐药性的脑型疟和肿瘤细胞的作用基础^[22-23]。肿瘤细胞有很强的分裂增生能力, 需要大量的二价铁离子作为合成去氧核糖的原料, 故肿瘤细胞内二价铁离子水平高于正常细胞, 且肿瘤

细胞表面转铁蛋白受体的含量也显著高于正常细胞, 从而使青蒿素类药物的抗肿瘤作用表现出对多种肿瘤细胞均具有良好的抗肿瘤活性, 与传统化疗药物不存在交叉耐药, 而且对正常组织细胞的毒性很低的特点。Papanikolaou 等^[24]研究证实, 青蒿琥酯对硼替佐米原发及药物诱导的继发耐药 MM 细胞株均有明显的增殖抑制作用, 其抑制效应在硼替佐米敏感的亲本细胞株和药物诱导耐药细胞株中并无差异, 进一步研究发现, 青蒿琥酯能通过增加细胞内 ROS 的产生, 促进线粒体膜间蛋白凋亡诱导因子 (AIF) 及核酸内切酶 G (EndoG) 释放及核转位, 明显拮抗其诱导凋亡效应, 提示青蒿琥酯通过 ROS 诱导的细胞凋亡可能是其逆转 MM 细胞耐药的重要作用机制。本研究中的 NCI-H929BR 是参照朱蓉等^[10]建立的硼替佐米耐药细胞株, 对硼替佐米耐药骨髓瘤细胞株 NCI-H929B 的差异表达蛋白的飞行时间质谱分析中发现, 与亲本 NCI-H929 比较, NCI-H929B 细胞中有 11 个蛋白点表达明显上调, 其中序列覆盖率最高的差异蛋白点主要有热休克蛋白 27 (HSP27) 和帕金森病蛋白 7 (PARK7/DJ-1), 目前有研究报 HSP27, DJ-1 可能与硼替佐米的耐药存在相关性, 而其他蛋白则罕有报道。自由基等氧化损伤是引起细胞凋亡的常见及重要诱因之一, 而 HSP27 和 DJ-1 均具有通过抗氧化应激起到保护线粒体功能、抑制细胞凋亡的作用^[25-26], 提示青蒿琥酯有可能通过其独特诱导自由基的产生及氧化应激拮抗 HSP27 和 DJ-1 的抗氧化作用, 从而逆转 HSP27 和 DJ-1 诱导的硼替佐米耐药性。

综上所述, 本研究发现青蒿琥酯可下调硼替佐米耐药 MM 细胞株的 NF- κ B p65, NF- κ B p-p65, P-gp 以及 Bcl-2 的表达, 上调 Bax 的表达, 逆转其对硼替佐米的耐药性, 但其具体的作用靶点以及对细胞凋亡相关信号通路的影响仍有待进一步研究。ART 作为传统抗疟药青蒿素的衍生物之一, 广泛用于各种恶性疟疾, 尤其多药耐药的难治性疟疾的治疗, 其价格低廉且毒性很低, 是一种理想的抗肿瘤药物增敏剂, 值得进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] Mahindra A, Laubach J, Rajee N, et al. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9 (3): 135-143.
- [2] Moreau P, Richardson P G, Cavo M, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later [J]. Blood, 2012, 120(5): 947-959.

- [3] McConkey D J, ZHU K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer[J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(45):164-179.
- [4] Kale A J, Moore B S. The molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance [J]. J Med Chem, 2012, 55(23):10317-10327.
- [5] 成志勇, 杨晓阳, 魏玉涛, 等. 青蒿琥酯抗骨髓瘤作用机制研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 4(3):326-328.
- [6] 李世辉, 潘峻, 薛芳, 等. 青蒿琥酯对骨髓瘤细胞 SP2/0 的作用观察及其机制的初步探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(1):16-20.
- [7] LI S, XUE F, CHENG Z, et al. Effect of artesunate on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of SP2/0 myeloma cells through affecting NF- κ B p65 [J]. Int J Hematol, 2009, 90(4):513-521.
- [8] 李世辉, 潘峻, 薛芳, 等. 青蒿琥酯对 SP2/0 骨髓瘤细胞的强效增殖抑制及促凋亡作用[J]. 中成药, 2007, 29(3):434-435.
- [9] Efferth T, Briehl M M, Tome M E. Role of antioxidant genes for the activity of artesunate against tumor cells [J]. Int J Oncol, 2003, 23(4):1231-1235.
- [10] 朱蓉, 奚昊, 李勇华, 等. 硼替佐米耐药骨髓瘤细胞株的建立及其差异表达蛋白的飞行时间质谱分析[J]. 浙江大学学报, 2009, 38(5):445-452.
- [11] 符祥俊, 姚红霞, 林丽娥, 等. 青蒿琥酯逆转多发性骨髓瘤细胞株多药耐药的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(9):1075-1078.
- [12] Copple I M, Mercer A E, Firman J, et al. Examination of the cytotoxic and embryotoxic potential and underlying mechanisms of next-generation synthetic trioxolane and tetraoxane antimalarials [J]. Mol Med, 2012, 18(7):1045-1055.
- [13] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells [J]. Oncogene, 2003, 22(1):90-97.
- [14] Iijima M, Momose I, Ikeda D. Increased ABCB1 expression in TP-110-resistant RPMI 8226 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(9):1913-1919.
- [15] Buda G, Martino A, Maggini V, et al. MDR-1 C3435T polymorphism indicates a different outcome in advanced multiple myeloma [J]. Acta Haematol, 2009, 122(1):42-45.
- [16] ZHOU W, YANG Y, XIA J, et al. NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers [J]. Cancer Cell, 2013, 23(1):48-62.
- [17] TU Y, XU F H, LIU J, et al. Upregulated expression of bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide [J]. Blood, 1996, 88(5):1805-1812.
- [18] 吴佳学, 董立. 多发性骨髓瘤 MDR1 与 Bcl-2 基因的表达及临床研究 [J]. 医学检验与临床, 2011, 22(6):9-10.
- [19] 杨连君, 曹雪涛, 于益芝. Bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3):232-234.
- [20] Holien T, Olsen O E, Misund K, et al. Lymphoma and myeloma cells are highly sensitive to growth arrest and apoptosis induced by artesunate [J]. Eur J Haematol, 2013, 91(4):339-346.
- [21] Mujtaba T, DOU Q P. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib [J]. Discov Med, 2011, 12(67):471-480.
- [22] 母佩, 张厚德, 杜冀晖. 活性氧在青蒿素及其衍生物抗肿瘤作用机制中的研究进展 [J]. 当代医学, 2013, 19(16):13-15.
- [23] 孙志明. 黄花蒿中青蒿素抗癌作用研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2010, 12(11):1933-1934.
- [24] Papanikolaou X, Johnson S, Garg T, et al. Artesunate overcomes drug resistance in multiple myeloma by inducing mitochondrial stress and non-caspase apoptosis [J]. Oncotarget, 2014, 5(12):4118-4128.
- [25] Kahle P J, Waak J, Gasser T. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(10):1354-1361.
- [26] Samali A, Robertson J D, Peterson E, et al. Hsp 27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli [J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6(1):49-58.

[责任编辑 张丰丰]