

去甲斑蝥素增强马法兰抗骨髓瘤作用机制研究

吕鸿雁¹, 郝京生², 胡晓东², 孟建波¹, 杜恒飞¹, 张金巧^{1*}

1. 河北医科大学第三医院 血液科, 河北 石家庄 050051

2. 石家庄肾病医院 肿瘤免疫治疗研究中心, 河北 石家庄 050051

摘要: **目的** 研究去甲斑蝥素联合马法兰对多发性骨髓瘤细胞增殖与凋亡的影响及其作用机制。**方法** 去甲斑蝥素单独或联合马法兰给药后, MTT 法观察对人多发性骨髓瘤细胞 U266 株生长的抑制作用, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blotting 检测核因子- κ B P65 (NF- κ B P65)、NF- κ B 抑制因子 I κ B α 、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、survivin、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。制备多发性骨髓瘤小鼠模型, 观察去甲斑蝥素及其与马法兰联合给药对肿瘤生长的抑制作用。**结果** 去甲斑蝥素能增强马法兰的细胞毒和诱导细胞凋亡作用。与马法兰单独给药组比较, 联合给药组使 U266 细胞核 NF- κ B P65 和胞浆 p-I κ B α 的表达量分别由 1.13 ± 0.08 、 0.83 ± 0.08 降至 0.26 ± 0.02 、 0.090 ± 0.002 ; 马法兰对 I κ B α 的表达无影响, 但去甲斑蝥素能促进 I κ B α 的表达, 二者合用能显著促进胞浆 I κ B α 的表达; 与马法兰单独给药组比较, 联合给药组 survivin 和 Bcl-2 的表达量分别由 1.03 ± 0.10 、 0.72 ± 0.05 降至 0.52 ± 0.04 、 0.06 ± 0.01 , 而 Bax 由 0.29 ± 0.03 升至 0.75 ± 0.06 。体内实验也证实去甲斑蝥素能增强马法兰的抗肿瘤作用。**结论** 去甲斑蝥素通过抑制 NF- κ B/p-I κ B α 途径, 调节下游信号分子 survivin、Bcl-2 和 Bax 的表达, 增强马法兰的抗骨髓瘤作用。

关键词: 去甲斑蝥素; 马法兰; 多发性骨髓瘤; 药物协同作用; 核因子- κ B

中图分类号: R969.2; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0203-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.017

Study on effects and mechanisms of norcantharidin potentializing anti-myeloma of melphalan

LV Hong-yan¹, HAO Jing-sheng², HU Xiao-dong², MENG Jian-bo¹, DU Heng-fei¹, ZHANG Jin-qiao¹

1. Department of Hematology, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

2. Research Center for Cancer Immunotherapy, Shijiazhuang Kidney Disease Hospital, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of norcantharidin (NCTD) combined with melphalan (Mel) on proliferation and apoptosis of multiple myeloma (MM) cells. **Methods** Human MM cell line U266 cells were treated with NCTD alone or in combination with Mel. MTT and Annexin V/PI flow cytometry were used to determine the rates of cell viability and apoptosis. The protein expression of nuclear factor- κ B P65 (NF- κ B P65), NF- κ B P65 inhibitor I κ B α , phosphorylated I κ B α (p-I κ B α), survivin, Bcl-2, and Bax was determined by Western blotting. The model of mice with MM was established, and the inhibition of combination of NCTD and Mel on tumor growth was observed. **Results** NCTD potentiated the cytotoxicity and pro-apoptotic effects induced by Mel. Compared with the group treated with Mel alone, the expression levels of NF- κ B P65 in U266 nucleus and p-I κ B α in cytoplasm in NCTD and Mel combination group decreased from 1.13 ± 0.08 and 0.83 ± 0.08 to 0.26 ± 0.02 and 0.090 ± 0.002 , respectively. Mel showed no effect on I κ B α expression, but NCTD could enhance its expression, and the combination of NCTD and Mel could obviously enhance the expression. The expression of survivin and Bcl-2 decreased from 1.03 ± 0.10 and 0.72 ± 0.05 to 0.52 ± 0.04 and 0.06 ± 0.01 , while the expression of Bax increased from 0.29 ± 0.03 to 0.75 ± 0.06 respectively. *In vivo* results also demonstrated that NCTD could increase the antitumor effects of Mel. **Conclusion** The results suggest that NCTD could potentialize the anti-MM effects through inhibiting NF- κ B/p-I κ B α signal pathway and regulating the expression of survivin, Bcl-2, and Bax.

Key words: norcantharidin; melphalan; multiple myeloma; drug synergism; nuclear factor- κ B

收稿日期: 2012-04-21

基金项目: 河北省中医药管理局资助项目 (2007136)

作者简介: 吕鸿雁 (1974—), 女, 河北人, 主治医师, 硕士研究生, 研究方向为多发性骨髓瘤的基础与临床。E-mail: hongyan74@163.com

*通信作者 张金巧 Tel: 13313012865 E-mail: zhjq72@163.com

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是源于浆细胞的血液系统恶性肿瘤, 多见于 60 岁以上人群。马法兰 (melphalan, Mel) 是治疗多发性骨髓瘤的主要药物, 但其主要副作用是干细胞损伤引起的骨髓抑制和肾脏损害。虽然大剂量马法兰联合干细胞移植进一步改善了患者的预后, 然而大部分患者最终产生耐药, 耐药机制与诱导核因子- κ B (NF- κ B) 活化有关^[1]。因此寻找高效、低毒的抗骨髓瘤药物具有重要的临床意义。

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是由斑蝥素除去 1, 2 位甲基而得, 结构改变后其毒副作用明显降低而抗肿瘤活性增强, 对肝癌、乳腺癌、结肠癌等具有良好的抗肿瘤作用^[2]。前期研究发现, 去甲斑蝥素有显著的抗骨髓瘤作用, 并能增强阿霉素的抗骨髓瘤作用, 其机制与抑制骨髓瘤细胞 NF- κ B 的表达和血管生成、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡等有关^[3-6]。因此推测去甲斑蝥素与马法兰有协同抗肿瘤作用。本实验研究去甲斑蝥素联合马法兰体外对多发性骨髓瘤细胞增殖与凋亡的影响及其作用机制, 并制备多发性骨髓瘤小鼠模型, 观察去甲斑蝥素及其与马法兰联合给药对肿瘤生长的抑制作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

去甲斑蝥素 (质量分数 >99%), Sigma 公司; 马法兰 (100 mg/支), Calbiochem 公司。MTT, Sigma 公司; 兔抗人 NF- κ B p65、磷酸化 NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65)、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、I κ B 激酶 α (IKK α) 单抗, Cell Signal 公司; 兔抗人 survivin、Bcl-2、Bax、 β -actin、LaminB 单抗, Santa Cruz 公司; Annexin-V-PI 凋亡检测试剂盒, 北京创根胜泰生物科技有限公司。PBS, 自行配制, 高压灭菌, 4 °C 保存。

1.2 细胞与动物

人多发性骨髓瘤细胞株 U266, 由北京大学第一医院血液学实验室馈赠, 常规培养于含 10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养液中。雄性 BALB/C nu/nu 小鼠, SPF 级, 购自中国协和医科大学肿瘤研究所, 合格证号 0225645。

1.3 仪器

MCO175 型 CO₂ 培养箱, 日本三洋公司; 2020D 数码凝胶成像系统, BINTA 公司; 半干电转印仪, 美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖及联合给药效果的确定

参照文献方法^[5], 实验分为对照组, 去甲斑蝥素 2.5、5、10 μ mol/L 组 (溶于 PBS 中), 马法兰 5、10、20 μ mol/L 组; 去甲斑蝥素 (2.5、5、10 μ mol/L) 与马法兰 (5、10、20 μ mol/L) 以 1:2 比例联合给药组。细胞加药后培养 72 h, MTT 法检测细胞增殖抑制率。

去甲斑蝥素和马法兰联合给药效果的确定采用 Chou^[7]的等效应曲线法, 采用 CalcuSyn v 2.0 药物合用指数分析软件计算两种药物的联合系数 (CI), 若 CI < 1, 两药间的作用为协同, 若 CI = 1, 两药间的作用为相加, 若 CI > 1, 两药间的作用为拮抗。根据两种药物的浓度效应曲线构建 3 条等效线, 3 条曲线包围的区域为效应相加区。当两药合用的观察值落在相加区的左下方时, 表明两药具有协同作用; 落在相加区时, 表明两药具有相加作用; 落在相加区右上方时, 表明两药具有拮抗作用。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

实验分为对照组、去甲斑蝥素 (5 μ mol/L) 组、马法兰 (10 μ mol/L) 组、去甲斑蝥素 5 μ mol/L + 马法兰 10 μ mol/L 联合给药组 (简称联合给药组), 细胞加药后培养 24 h, 按照 Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明操作, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.3 Western blotting 检测蛋白表达

分组与给药同“2.2”项。细胞培养 24 h 后收集细胞, 加入预冷的细胞裂解液, Bradford 法分离、测定蛋白, 用 10% 聚丙烯酰胺电泳分离蛋白, 转移至 PVDF 膜, 加入适当稀释的一抗, 4 °C 孵育过夜, 以 β -actin 作内参照。加入适当稀释的二抗, 用 ECL 发光法检测目的条带的表达。结果以目的蛋白和 β -actin 或 Lamin B 的比值表示。

2.4 体内抗多发性骨髓瘤实验

BALB/C nu/nu 小鼠左侧背部皮内接种 2×10^6 U266 细胞, 待肿瘤体积长至 100 mm³ 时, 将小鼠随机分为 4 组, 每组 5 只。对照组 ip 给予生理盐水 0.4 mL, 每周 3 次; 去甲斑蝥素组 ip 去甲斑蝥素 20 mg/kg, 每周 3 次; 马法兰组 ip 马法兰 3 mg/kg, 每周 1 次; 联合给药组 ip 去甲斑蝥素 20 mg/kg, 每周 3 次, ip 马法兰 3 mg/kg, 每周 1 次, 各组均连续给药 4 周。每周测肿瘤体积 (V) 1 次, 实验结束时计算抑瘤率。

$$V = 2/3\pi r^3 \quad (r \text{ 为肿瘤长宽高的均值})$$

$$\text{抑瘤率} = 1 - \text{给药组平均瘤体积} / \text{对照组平均瘤体积}$$

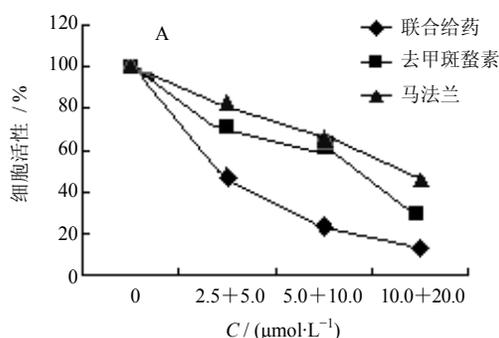
2.5 统计学分析

各实验均独立重复3次,采用SPSS 16.0统计软件处理,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,两两比较采用LSD。

3 结果

3.1 对U266细胞增殖的影响

去甲斑蝥素和马法兰均以浓度相关方式抑制



U266细胞的生长,二者联合给药后抑制作用进一步增强。去甲斑蝥素2.5 μmol/L+马法兰5 μmol/L、5 μmol/L+10 μmol/L、10 μmol/L+20 μmol/L的CI值分别为0.52、0.26、0.23。等效应线图法分析发现,联合给药组的ED₅₀、ED₇₅、ED₉₀值均处于在相加区的左下方,提示去甲斑蝥素与马法兰联合给药为协同作用。结果见图1。

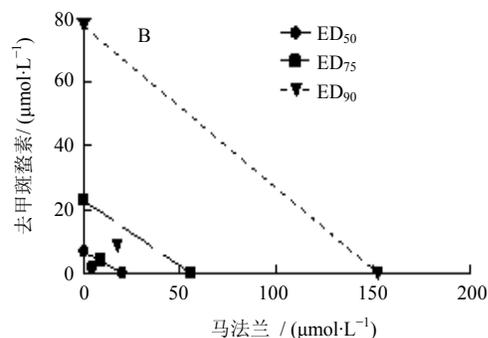


图1 去甲斑蝥素对马法兰抗骨髓瘤细胞增殖作用的影响量效曲线(A)和协同作用效应(B)曲线($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Dose-effect (A) and synergism (B) curves of NCTD on Mel anti-myeloma proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 对U266细胞凋亡的影响

对照组、去甲斑蝥素(5 μmol/L)组、马法兰、(10 μmol/L)组、联合给药(5 μmol/L+10 μmol/L)组细胞凋亡率分别为(3.1±0.3)%、(12.7±1.5)%、(15.4±3.1)%、(44.67±5.1)%,联合给药组的细胞凋亡率显著高于其他各组($P < 0.05$),提示去甲斑蝥素能增强马法兰诱导细胞凋亡的作用。

3.3 对U266细胞NF-κB信号通路的影响

去甲斑蝥素能抑制胞核NF-κB P65蛋白的表达,而马法兰促进U266胞核NF-κB P65蛋白的表达;二者联合给药后,与马法兰组比较,NF-κB P65蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。去甲斑蝥素、马法兰及两药合用对胞浆NF-κB P65蛋白表达均无影响。去甲斑蝥素抑制胞浆p-IκBα蛋白的表达,而马法兰能促进p-IκBα蛋白表达;二者联合给药后,与马法兰组比较,p-IκBα蛋白表达显著降低($P <$

0.05)。马法兰10 μmol/L对胞浆IκBα蛋白表达无影响,而去甲斑蝥素能促进IκBα的表达;二者合用,显著促进IκBα表达,与马法兰组相比差异显著($P < 0.05$)。结果见表1和图2。

3.4 对U266细胞survivin、Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

去甲斑蝥素和马法兰均能抑制survivin、Bcl-2表达,二者联合给药后,与马法兰组相比,survivin和Bcl-2的表达显著降低($P < 0.05$),而Bax表达显著升高($P < 0.05$)。结果见图3和表2。

3.5 对多发性骨髓移植瘤小鼠肿瘤生长的影响

体内实验显示,去甲斑蝥素20 mg/kg和马法兰3 mg/kg均能抑制小鼠多发性骨髓移植瘤的生长,二者联合给药后抑制作用进一步加强,三者的抑瘤率依次为41.1%、34.7%、71.8%,表明去甲斑蝥素与马法兰联合给药具有协同抗肿瘤作用。结果见图4。

表1 去甲斑蝥素与马法兰联合给药对U266细胞NF-κB信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of NCTD and Mel combination on protein expression of NF-κB signal pathway in U266 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / (μmol·L ⁻¹)	胞核 NF-κB P65	胞浆 NF-κB P65	IκBα	p-IκBα
对照		0.73 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.04
马法兰	10	1.13 ± 0.08*	0.41 ± 0.05	0.53 ± 0.05	0.83 ± 0.08*
去甲斑蝥素	5	0.50 ± 0.05*	0.46 ± 0.04	1.05 ± 0.06*	0.16 ± 0.01*
马法兰+去甲斑蝥素	10+5	0.26 ± 0.02*#	0.35 ± 0.03	1.23 ± 0.09*#	0.09 ± 0.00*#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与马法兰组比较: # $P < 0.05$, 下表、图同
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs Mel group, same as below

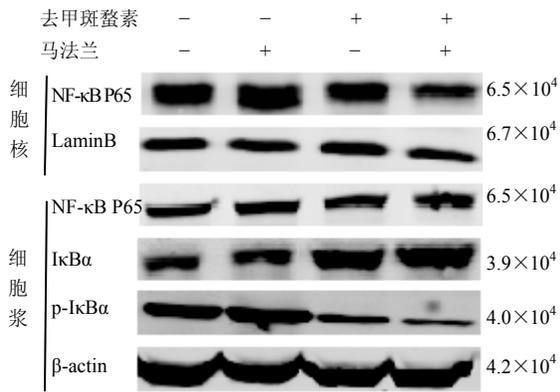


图 2 去甲斑蝥素与马法兰联合给药对 NF-κB 信号通路的影响

Fig. 2 Effect of NCTD and Mel combination on NF-κB signal pathway

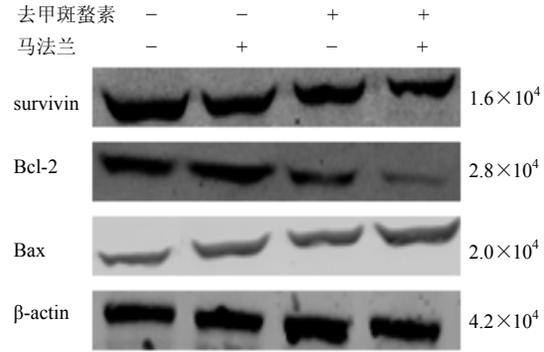


图 3 去甲斑蝥素与马法兰联合给药对 survivin、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of NCTD and Mel combination on protein expression of survivin, Bcl-2, and Bax

表 2 去甲斑蝥素与马法兰联合给药对 U266 细胞 survivin、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of NCTD and Mel combination on protein expression of survivin, Bcl-2, and Bax in U266 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	survivin	Bcl-2	Bax
对照		1.60 ± 0.12	1.03 ± 0.07	0.14 ± 0.01
马法兰	10	1.03 ± 0.10*	0.72 ± 0.05*	0.29 ± 0.03*
去甲斑蝥素	5	0.92 ± 0.06*	0.16 ± 0.01*	0.38 ± 0.02*
马法兰+去甲斑蝥素	10+5	0.52 ± 0.04#	0.06 ± 0.01#	0.75 ± 0.06#

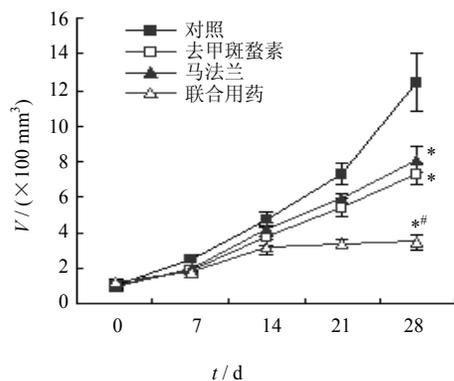


图 4 去甲斑蝥素与马法兰联合给药对小鼠移植瘤肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of NCTD and Mel combination on growth of xenograft tumors in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

沙利度胺、雷利度胺、硼替佐米等新药的应用和造血干细胞移植，很大程度上改善了多发性骨髓瘤的预后，但多发性骨髓瘤目前仍是一种不可治愈的疾病。马法兰虽有价格低廉、用药方便、患者依从性好、早期可获得较好的疗效等优点，但易发生

耐药。去甲斑蝥素已成功地用于肝癌、乳腺癌、结肠癌等肿瘤的治疗，笔者前期研究也证实去甲斑蝥素在体内外对骨髓瘤细胞增殖均有抑制作用，并能增强阿霉素的抗骨髓瘤作用。本实验发现去甲斑蝥素在体内外均能增强马法兰的抗肿瘤作用，两药有协同作用。

NF-κB 在多发性骨髓瘤细胞增殖、存活以及耐药等方面起重要作用，是多发性骨髓瘤治疗的重要靶点和骨髓瘤细胞耐药的机制之一^[8-10]。NF-κB 调节细胞周期蛋白 CyclinD1、IL-6 以及基质细胞黏附分子等的表达，同时多发性骨髓瘤患者体内调控 NF-κB 活化的基因，如 TRAF2、TRAF3、CYLD、NIK 等存在变异，导致 NF-κB 持续激活。硼替佐米、沙利度胺的作用机制均与抑制 NF-κB 有关，对马法兰的耐药机制也与诱导 NF-κB 活化有关^[6]。本实验结果也显示马法兰组细胞核 NF-κB P65 的表达高于对照组；而去甲斑蝥素可以抑制 NF-κB 的活性，与马法兰联合给药后，能抑制马法兰诱导的 NF-κB 活化，这可能是两药联合应用的机制之一。

静止细胞中 NF-κB 和其抑制性因子 IκBα 以无活性的形式存在。胞浆中的 IκBα 与 NF-κB 结合后

使 NF- κ B 无法进入核内, 转录功能受抑制。当细胞受活化刺激后, I κ B α 末端的丝氨酸残基发生磷酸化和泛素化, 复合物解离, 释放出游离的 NF- κ B 得以进入细胞核, 启动转录调控。本实验结果显示, 去甲斑蝥素和马法兰联合给药组胞核 NF- κ B P65 和胞浆 p-I κ B α 蛋白表达低于对照组和马法兰组, 而胞浆 I κ B α 蛋白水平高于对照组和马法兰组, 表明去甲斑蝥素通过抑制马法兰诱导的 I κ B α 的磷酸化, 促进胞浆 I κ B α 表达, 进而抑制马法兰引起的 NF- κ B P65 胞核内转化, 抑制 NF- κ B P65 活化。

Bcl-2 多分布在增殖细胞, 其过度表达可抑制细胞凋亡; 而 Bax 则倾向分布在终末分化细胞, 其过度表达可促进细胞凋亡^[11]; Survivin 是凋亡相关蛋白家族中作用最强的一个, 具有促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用^[12]。上述因子均与多发性骨髓瘤的耐药及细胞凋亡减少有关^[13-14], 它们的表达均受 NF- κ B 调控。本研究发去甲斑蝥素与马法兰联合给药后进一步抑制 survivin 和 Bcl-2 的表达, 促进 Bax 的表达, 提示去甲斑蝥素通过调节 NF- κ B 下游信号分子 survivin、Bcl-2、Bax 的表达而增强细胞对马法兰的化疗敏感性。

总之, 去甲斑蝥素可以增强马法兰的敏感性, 其作用机制与下调马法兰引起的 NF- κ B 活化及调节 NF- κ B 下游的信号分子 survivin、Bcl-2、Bax 等的表达有关。这为开展去甲斑蝥素单独或联合其他药物治疗难治性或复发多发性骨髓瘤的临床研究提供了实验依据。

参考文献

- [1] Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, et al. Alkylating agents induce activation of NF κ B in multiple myeloma cells [J]. *Leuk Res*, 2008, 32(7): 1144-1147.
- [2] Huang Y, Liu Q, Liu K, et al. Suppression of growth of highly-metastatic human breast cancer cells by norcantharidin and its mechanisms of action [J]. *Cytotechnology*, 2009, 59(3): 201-208.
- [3] 杜恒飞, 于路佳, 郝京生, 等. 去甲斑蝥素对多发性骨

髓瘤细胞周期和血管内皮细胞生长因子的影响 [J]. *山东医药*, 2012, 52(1): 22-24.

- [4] 宋晓宁, 杜恒飞, 于路佳, 等. 去甲斑蝥素通过 NF- κ B/I κ B α 途径增强阿霉素的抗骨髓瘤效应 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(12): 809-813.
- [5] 张金巧, 戴晓丽, 蒙艳凤, 等. 去甲斑蝥素对人多发性骨髓瘤细胞株 U266 生长调控的影响及其机制的研究 [J]. *河北医科大学学报*, 2010, 31(8): 896-897.
- [6] 杜恒飞, 于路佳, 蒙艳凤, 等. 去甲斑蝥素抗骨髓瘤作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2479-2483.
- [7] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 621-681.
- [8] Hideshima T, Bergsagel P L, Kuehl W M, et al. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications [J]. *Blood*, 2004, 104(3): 607-618.
- [9] Keats J J, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(2): 131-144.
- [10] Sung B, Kunnumakkara A B, Sethi G, et al. Curcumin circumvents chemoresistance in vitro and potentiates the effect of thalidomide and bortezomib against human multiple myeloma in nude mice model [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(4): 959-970.
- [11] Thees S, Hubbard G B, Winckler J, et al. Specific alteration of the Bax/Bcl2 ratio and cytochrome c without execution of apoptosis in the hippocampus of aged baboons [J]. *Restor Neurol Neurosc*, 2005, 23(1): 1-9.
- [12] Li F, Ling X. Survivin study: An update of "What is the next wave?" [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(3): 476-486.
- [13] Romagnoli M, Séveno C, Wuillème-Toumi S, et al. The imbalance between Survivin and Bim mediates tumor growth and correlates with poor survival in patients with multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2009, 145(2): 180-189.
- [14] Romagnoli M, Trichet V, David C, et al. Significant impact of survivin on myeloma cell growth [J]. *Leukemia*, 2007, 21(5): 1070-1078.