青蒿琥酯联合来那度胺对多发性骨髓瘤耐药细胞株的作用*

欧瑞明，周长华，谭友平，刘爽，钟启，张青，杜苑苑，郑丽玲，刘志，黄竞

广东省第二人民医院血液科(广东广州 510317)

【摘要】 目的 探讨青蒿琥酯联合来那度胺对多发性骨髓瘤耐药(MM.1R)细胞株增殖的影响并分析其作用机制。方法 实验设4组，空白对照组只加RPMI 1640培养液、来那度胺组加20 μmol/L来那度胺、青蒿琥酯组加25 μg/mL青蒿琥酯、来那度胺联合青蒿琥酯组加20 μmol/L来那度胺浓度和25 μg/mL青蒿琥酯浓度，终体积为200 μL，分别对MM.1R细胞株处理24和48 h，MTT法检测细胞增殖；Western blot检测来那度胺联合青蒿琥酯处理24和48 h，MM.1R细胞株NF-κB P65蛋白，Bcl-2家族抗凋亡蛋白Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad，多药耐药基因MDR1蛋白表达产物P-gp的表达水平。结果 来那度胺、青蒿琥酯、来那度胺联合青蒿琥酯处理24和48 h，各组抑制率分别为15.16%、28.28%、45.98%和17.19%、34.53%、65.16%，与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$)，来那度胺联合青蒿琥酯组抑制率高于单药处理组($P<0.05$)，两药联合有良好的协同效应，两药联合处理48 h抑制率高于24 h，抑制效应呈时间依赖性；来那度胺联合青蒿琥酯处理24和48 h，MM.1R细胞株P-gp、NF-κB P65、Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad表达量均低于对照组($P<0.05$)，两药联合处理48 h，MM.1R细胞株NF-κB P65、Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad蛋白表达量低于24 h($P<0.05$)，表现出时间依赖性。结论 青蒿琥酯、来那度胺可抑制耐药MM细胞增殖，两药联合有协同效应，时间依赖性下调NF-κB P65蛋白、Bcl-2家族抗凋亡蛋白Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad的表达，降低P-gp表达水平可能为其逆转肿瘤细胞耐药的作用机制。

【关键词】 青蒿琥酯；来那度胺；骨髓瘤；耐药

DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.20170309.001

The study on combination effect of artesunate and lenalidomide on the treatment of bortezomib-resistant multiple myeloma cell line.

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

【Abstract】 **Objective** To investigate the combination effect of artesunate and lenalidomide on the proliferation of bortezomib-resistant multiple myeloma cell line MM.1R, and its molecular mechanism. **Methods** MM.1R cells were cultured in RPMI 1640 and treated with DMSO (control group), lenalidomide (20 μmol/L), artesunate (25 μg/mL), or lenalidomide (20 μmol/L) plus artesunate (25 μg/mL), separately. After 24 or 48 h, the cell proliferation rates were assessed by MTT assay, and the NF-κB (P65), Bcl-xl, Mcl-1, p-Bad, and P-gp protein levels were measured by Western blot. **Results** The inhibitory rate of cell proliferation was 15.16% by lenalidomide for 24 h, 28.28% by lenalidomide for 48 h, 45.98% by artesunate for 24 h, 17.19% by artesunate for 24 h, 34.53% by lenalidomide plus artesunate for 24 h, or 65.16% by lenalidomide plus artesunate for 48 h ($P<0.05$). NF-κB (P65), Bcl-xl, Mcl-1, p-Bad, and P-gp proteins were down-regulated by lenalidomide plus artesunate treatment in a time-dependent manner. **Conclusion** Both artesunate and lenalidomide inhibit MM.1R cell proliferation. Combination of artesunate with lenalidomide can enlarge this effect through down-regulating NF-κB (P65), Bcl-xl, Mcl-1, p-Bad, and P-gp.

【Key words】 artesunate; lenalidomide; multiple myeloma; drug-assistant

虽然近10年来随着硼替佐米、来那度胺等新药以及自体造血干细胞移植的应用，目前多发性骨髓瘤(multiple myeloma，MM)患者的缓解率及生存期得到较大程度的提高，但由于骨髓瘤细胞容易产生耐药，绝大多数患者最终都会进入难治或复发阶段，MM目前仍被认为是无法治愈的疾病，如何克服肿瘤细胞耐药，提高复发/难治性MM的疗效，仍是临床亟待解决的问题。研究表明，青蒿琥酯(artesunate，ART)能够抑制MM细胞的增殖并诱导其凋亡，与传统化疗药物不存在交叉耐药，且能增加MM细胞对化疗药物的敏感性，逆转MM多药耐药[1]。而来那度胺作为MM治疗的新型药物，具有独特的抗肿瘤、免疫调节等多重作用，常用于复发/难治性

* 国家自然科学基金资助项目(编号：81400168)，广东省医学科研基金立项项目(编号：A2013128)，广东省中医药局建设中医药强省科研课题(编号：20131104)，广东省第二人民医院引进人才科研启动基金(编号：YY2014-002)

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

MM 的治疗，来那度胺以及青蒿琥酯两药联合有可能产生良好的抗肿瘤协同效应，逆转骨髓瘤细胞的耐药性。目前国内外对青蒿琥酯逆转 MM 细胞耐药的研究多着眼于联合传统化疗药物方面[2-3]，而青蒿琥酯联合来那度胺对耐药 MM 的作用及其机制研究方面尚未见报道，2013 年 6 月至 2014 年 6 月，我们就青蒿琥酯联合来那度胺对地塞米松耐药 MM 细胞株增殖的影响及其作用机制进行研究，以期为复发/难治性 MM 的治疗提供一高效、低毒的联合治疗新方案，提高复发难治性 MM 的疗效。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞系　地塞米松耐药(MM.1R) MM 细胞株(ATCC 细胞库)。

1.1.2　主要试剂　RPMI 1640、胎牛血清(GIBCO 公司)，四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司)，NF-κB P65、Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad、P-gp 抗体(Santa Cruz 公司)，青蒿琥酯(桂林南药股份有限公司，批号 H10930195)，来那度胺(大连美仑生物有限公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液，在 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养，3～4 d 换液传代 1 次。

1.2.2　MTT 法检测细胞增殖　取对数生长期的 MM.1R 细胞胰酶消化，调整细胞悬浮液浓度为 $5\times10^4\cdot mL^{-1}$，每孔 100 μL 接种于 96 孔板孵育 24 h 后分组加药。实验设 4 组，空白对照组只加 RPMI 1640 培养液、来那度胺组加 20 μmol/L 来那度胺、青蒿琥酯组加 25 μg/mL 青蒿琥酯、来那度胺联合青蒿琥酯组加 20 μmol/L 来那度胺浓度和 25 μg/mL 青蒿琥酯浓度，终体积为 200 μL，每组设置 5 个复孔，分别培养 24 和 48 h 后，加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL，继续培养 4 h，去除上清液，加入 DMSO 150 μL，振荡 10 min，酶标仪测定 570 nm 波长下的吸光度值(*OD*)，抑制率(%) =(1 - 实验组 *OD*/对照组 *OD*) ×100%。

1.2.3　蛋白免疫印迹试验(Western blot)　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，一抗(NF-κB P65、Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad、P-gp、GAPDH 抗体) 4℃ 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，加入相应的二抗室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次，ECL 显影，Image J 软件计算各条带灰度值。将目的蛋白与内参照蛋白 GAPDH 灰度值之比作为目的蛋白的相对表达量，进行统计学分析。

1.3　统计学方法　计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 15.0 统计软件，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，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

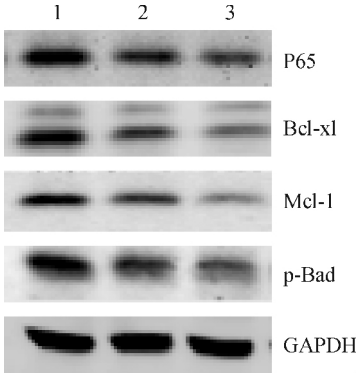
2.1　药物对 MM.1R 的增殖抑制作用　来那度胺、青蒿琥酯、来那度胺+青蒿琥酯分别处理 24 和 48 h 后，各组抑制率分别为 15.16%、28.28%、45.98% 和 17.19%、34.53%、65.16%，与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$)；来那度胺联合青蒿琥酯组抑制率高于单药处理组($P<0.05$)，两药联合有良好的协同效应；两药联合处理 48 h 抑制率高于 24 h 组($P<0.05$)，抑制效应呈时间依赖性，见表 1。

表 1　药物对 MM.1R 的增殖抑制作用　$\bar{x}\pm s$

组别	24 h	48 h
空白对照组	0	0
来那度胺组	15.16±1.91*	17.19±2.09*
青蒿琥酯组	28.28±1.94*	34.53±3.65*
来那度胺+青蒿琥酯组	45.98±2.67**△▲	65.16±3.04**△▲#

与空白对照组比较* $P<0.05$；** $P<0.01$；△与来那度胺组比较 $P<0.05$；▲与青蒿琥酯组比较 $P<0.05$；#与处理 24 h 比较 $P<0.05$

2.2　药物对 NF-κB P65 蛋白，Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad 表达的影响　青蒿琥酯联合来那度胺处理 24 和 48 h 后，MM.1R 细胞株的 NF-κB P65 蛋白，Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Bcl-xl、Mcl-1、p-Bad 表达量低于对照组($P<0.05$，$P<0.01$)，两药联合处理 48 h 蛋白表达量低于 24 h 组($P<0.05$)，表现出时间依赖性，见图 1、表 2。



1：对照组；2：青蒿琥酯联合来那度胺处理 24 h；3：青蒿琥酯联合来那度胺处理 48 h

图 1　NF-κB P65、Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的表达

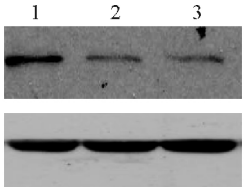
(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 药物对 MM.1R 的 NF－κB P65、Bcl－2 家族抗凋亡蛋白表达的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	P65	Bcl－xl	Mcl－1	p－Bad
空白对照组	0.82 ±0.11	0.76 ±0.06	0.35 ±0.03	0.92 ±0.08
来那度胺＋青蒿琥酯处理 24 h	0.55 ±0.07*	0.48 ±0.04*	0.26 ±0.04*	0.64 ±0.05*
来那度胺＋青蒿琥酯处理 48 h	0.37 ±0.08**△	0.21 ±0.03**△	0.10 ±0.02**△	0.27 ±0.03**△

与空白对照组比较* $P<0.05$，** $P<0.01$；△与来那度胺＋青蒿琥酯处理 24 h 组比较 $P<0.05$

2.3 药物对多药耐药基因 MDR1 的蛋白表达产物 P－gp 表达水平的影响 青蒿琥酯联合来那度胺处理 24 和 48 h 后，MM.1R 细胞株 P－gp 的表达水平量依次为 0.31 ±0.02 和 0.28 ±0.03，低于对照组（0.78 ±0.09），差异有统计意义（$P<0.01$），见图 2。



1：对照组；2：青蒿琥酯联合来那度胺处理 24 h；3：青蒿琥酯联合来那度胺处理 48 h

图 2 P－gp 蛋白的表达

3 讨论

MM 发病率约占血液系统恶性肿瘤的 10%，在血液系统肿瘤的发病率中仅次于白血病和淋巴瘤。随着我国进入老龄化社会，MM 的发病率已呈明显上升趋势。由于治疗过程中耐药克隆的筛选而出现的药物抵抗，绝大多数患者都会进入复发或难治阶段，复发/难治性 MM 患者中位生存期短，目前尚无有效的治疗手段。虽然来那度胺和硼替佐米等新药与传统化疗药物相互联合取得了一定成效，但 MM 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，患者难以负担。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。

我国中医药文化博大精深，中医药中有大量有效的抗肿瘤药物。其中青蒿琥酯防治肿瘤的研究引起极大关注，研究表明，青蒿琥酯对多种实体肿瘤细胞如肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌等多种肿瘤均具有良好的抗癌活性，而且对正常组织细胞的毒性很低，与传统化疗药物不存在交叉耐药，而且能增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，逆转肿瘤细胞的多耐药性[1]。研究发现，青蒿琥酯能够抑制 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[1]。来那度胺作为 MM 治疗的新型药物，与青蒿琥酯具有相似的抗肿瘤作用，如下调 NF－κB 的活性诱导肿瘤细胞凋亡，免疫调节，抑制肿瘤血管生成等，两者联合有可能产生良好的协同抗肿瘤效应。Liu 等[4]的研究证实，两药联合对肺癌细胞等实体瘤细胞有显著的抗肿瘤协同效应，青蒿琥酯单药对肺癌细胞株的生长抑制率为 20%，而来那度胺为 10%，如两者联合抑制率则高达 60%。本研究结果与 Liu 等[4]的研究相似，青蒿琥酯和来那度胺单药对 MM.1R 细胞株均具有一定的增殖抑制作用，而青蒿琥酯与来那度胺联合用药，肿瘤细胞增殖抑制率较单药明显升高，两药联合有良好的协同效应，能克服 MM 细胞的耐药性。

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多个方面，其中最主要的耐药机制是 NF－κB 通路的活化，通过激活 IKK 来活化 NF－κB，使受 NF－κB 调控的基因如 MDR1、Bcl－2 家族抗凋亡蛋白表达增加[1,3]。研究表明，NF－κB 持续活化在 MM 的发病过程中占有举足轻重的作用，NF－κB 的持续活化可以促进 MM 细胞增生，介导 IL－6 的分泌和黏附分子的表达，上调 Bcl－2 家族抗凋亡蛋白，抑制死亡受体途径，促进血管新生等促使 MM 恶性增生，抵抗凋亡，并与 MM 细胞多药耐药的发生密切相关[5]。P－gp 介导的多药耐药途径是肿瘤细胞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。MDR1 启动区域的第 1 个外显子包含 1 个纯化的 NF－κB 结合序列（5′－CCTYTCGGGG－3′），MDR1 作为 NF－κB 的下游因子，能够被 NF－κB 激活，使得基因转录增加，P－gp 合成增加[5]。李世辉等[6-8]的研究发现，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 SP2/0 骨髓瘤细胞 NF－κB p65 以及 p170 耐药蛋白表达水平，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[9]。研究证实，Bcl－2 家族成员亦参与 MM 细胞的多药耐药作用[10]，Bcl－2 家族由抗凋亡蛋白（Bcl－2、Bcl－xl、Mcl－1 等）和促凋亡蛋白（Bax、Bak、Bad 等）组成，其抗凋亡蛋白

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成员和促凋亡蛋白成员之间协同作用，共同决定细胞是否进入凋亡程序。大量实验研究证实，化疗药物可以上调 MM 细胞 Bcl－2 表达，引起获得性耐药，下调 Bcl－2 可以降低凋亡阈值，促进 MM 细胞凋亡或实现耐药逆转[10]。而 Derenne 等[11]利用反义寡核苷酸(ASO)探讨 Bcl－2、Bcl－xl、Mcl－1 蛋白对 MM 细胞株及原代 MM 细胞凋亡的影响，发现 Mcl－1 ASO 诱导的细胞凋亡较另外两种更有效，认为 Mcl－1 才是 MM 细胞生存的关键因素。Holien 等[12]的研究亦发现，青蒿琥酯对 INA－6 骨髓瘤细胞株有明显的增殖抑制及诱导凋亡作用，能降低 INA－6 细胞 Bcl－xl、Mcl－1 蛋白的表达水平，但未能检测到 Bcl－2 在 INA－6 细胞中的表达。除了抗凋亡蛋白之外，促凋亡蛋白也在肿瘤存活中起到重要，其中 Bad 作为一种新发现的 Bcl－2 家族促凋亡蛋白，目前被认为是连接细胞内多种生长因子信号途径与线粒体凋亡途径之间的重要因子，其活性形式即未磷酸化 Bad 能与 Bcl－2 或者 Bcl－xl 结合形成异二聚体，抑制 Bcl－2 和 Bcl－xl 的抗凋亡效应，促进细胞凋亡。而磷酸化后的 Bad(p－Bad)则与分子伴侣 14－3－3 蛋白结合失去其促凋亡活性，导致细胞增殖，此外，p－Bad 还可以通过提高线粒体释放细胞色素 C 的阈值抑制细胞凋亡[13]。本研究结果显示，青蒿琥酯与来那度胺联合用药，能降低耐药骨髓瘤细胞的 P－gp 表达水平，NF－κB P65 蛋白，Bcl－2 家族抗凋亡蛋白 Bcl－xl、Mcl－1、p－Bad 表达量亦低于对照组。

综上所述，本研究首次发现青蒿琥酯联合来那度胺，对耐药骨髓瘤细胞有明显的增殖抑制作用，两药联合有良好的协同效应，抑制 NF－κB 的活化并下调 Bcl－2 家族抗凋亡蛋白 Bcl－xl、Mcl－1、p－Bad 的表达，降低 P－gp 表达水平可能为其抗肿瘤以及克服肿瘤细胞耐药的作用机制，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。

参考文献

[1] 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.

[2] 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.

[3] Ren Y，Yu J，Kinghorn AD. Development of Anticancer Agents from Plant－Derived Sesquiterpene Lactones[J]. Curr Med Chem，2016，23(23)：2397－2420.

[4] Liu WM，Gravett AM，Dalgleish AG. The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies[J]. Int J Cancer，2011，128(6)：1471－1480.

[5] 韦中玲，汪兴洪. NF－κB 在多发性骨髓瘤的研究进展[J]. 医学研究杂志，2007，36(11)：98－101.

[6] 李世辉，潘崚，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.

[7] 李世辉，潘崚，薛芳，等. 青蒿琥酯对骨髓瘤细胞 SP2/0 的作用观察机制的初步探讨[J]. 中华肿瘤杂志，2008，30(1)：16－20.

[8] Li S，Xue F，Cheng Z，et al. Effect of artesunate on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of SP2/0 myeloma cells through affecting NFκB p65[J]. Int J Hematol，2009，90(4)：513－521.

[9] 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.

[10] 徐晓度，季鸥. bcl－2 家族调控的细胞死亡与恶性淋巴增殖性疾病[J]. 白血病·淋巴瘤，2012，21(4)：252－255.

[11] Derenne S，Monia B，Dean NM，et al. Antisense strategy shows that Mcl－1 rather than Bcl－2 or Bcl－x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells[J]. Blood，2002，100(1)：194－199.

[12] Holien T，Olsen OE，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.

[13] 贾炜. Bcl－2 家族研究进展[J]. 当代医学，2012，18(3)：26－28.

(收稿日期：2016－06－12　编辑：林培德)

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net