

· 论 著 ·

氯喹增敏地塞米松或辐射对多发性骨髓瘤细胞的杀伤作用

付 慧¹, 陶玉龙², 倪 敏³, 李冬洁³, 沈甫明^{1,3} (1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 3. 同济大学附属上海第十人民医院药学部, 上海 200072)

[摘要] 目的 研究氯喹(chloroquine, CQ), 及 CQ 是否增敏化疗药物地塞米松(dexamethasone, DEX)或辐射对多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞的杀伤作用, 并探讨其可能机制。方法 用细胞活性检测试剂盒(cell counting kit-8, cck8)检测 CQ 单药, 以及 CQ 联用 DEX 对 U266 细胞增殖的影响, 运用中效原理软件评估两药相互作用; cck8 及流式细胞术分别检测 CQ 处理条件下辐射对 U266 细胞增殖和凋亡作用的改变; Western blot 检测 CQ 合用 DEX, 以及 CQ 联合辐射对 U266 细胞内 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白表达变化。结果 CQ 及 DEX 对 U266 细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖性, 且 CQ (3.9 $\mu\text{mol/L}$)能够增强 DEX (125 $\mu\text{mol/L}$)对 U266 细胞的杀伤作用, 并增加 DEX 降低细胞内抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平; 不同辐射剂量(5~25 Gy)对 U266 细胞的生长抑制作用并无差异; CQ (1.0 $\mu\text{mol/L}$)可以增加辐射对 U266 细胞的敏感性, 诱导细胞凋亡。结论 CQ 能够增敏 DEX 或辐射对 U266 细胞的杀伤作用, CQ 增敏 DEX 的作用机制可能与抑制 Bcl-2 蛋白表达相关。

[关键词] 氯喹; 地塞米松; 辐射; 多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞; 增敏

[中图分类号] R96; R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)03-0210-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.005

Sensitized cytotoxic effects of dexamethasone or radiation on multiple myeloma cells by chloroquine

FU Hui¹, TAO Yulong², NI Min³, LI Dongjie³, SHEN Fuming^{1,3} (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and possible mechanism of combination use of chloroquine (CQ) with either dexamethasone (DEX) or radiation on multiple myeloma (MM) cell line U266. **Methods** Cell viability of U266 treated with CQ alone, or CQ combined with either DEX or radiation was measured by cell counting kit-8 (cck8). CalcuSyn method was used to assess effect of drugs interaction. Cell viability and apoptosis of U266 pre-treated with CQ were also measured by cck8 and flow cytometry after radiation. Expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in U266 cells treated by CQ combined with DEX or radiation was determined by Western blot analysis. **Results** Either CQ or DEX displayed a dose dependent cell proliferation inhibitory effect on U266 cells. Cytotoxic effect of DEX (125 $\mu\text{mol/L}$) on U266 cells was enhanced and expression of Bcl-2 protein in U266 cells was decreased by combining with CQ (3.9 $\mu\text{mol/L}$). U266 cells were sensitized to radiation and cell death was induced by CQ (1.0 $\mu\text{mol/L}$). **Conclusion** CQ could sensitize cytotoxic effect of DEX or radiation on U266 cells, and the former was possibly related to down-regulation of Bcl-2 protein.

[Key words] chloroquine; dexamethasone; radiation; multiple myeloma cell line U266; sensitization

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种以骨髓中浆细胞恶性克隆性增殖和异常积累为特征的, 位列血液系统肿瘤发病率第二位的不可治愈

的恶性肿瘤^[1]。复发与难治是 MM 临床治疗面临的主要挑战, 寻找新的治疗手段或联合用药方案具有十分重要的意义。目前, 放疗与化疗是治疗 MM 的主要手段, 糖皮质激素衍生物地塞米松(dexamethasone, DEX)是 MM 化疗方案中的常用药物^[2]。氯喹(chloroquine, CQ)是一个经典的抗疟药, “老药新用”是目前新药研发的一个重要方向^[3]。近年来的研究显示, CQ 具有抗肿瘤的作用^[4, 5]。Tang

[基金项目] 国家重大新药创制(2011ZXJ09201-012)

[作者简介] 付 慧, 硕士研究生. E-mail: 4474097fh@sina.cn

[通讯作者] 沈甫明, 博士, 教授, 博士生导师. 研究方向: 心血管病学. Tel: (021)66307668; E-mail: fumingshen@126.com

等^[6]研究表明 CQ 能够增加吉非替尼对非小细胞肺癌的细胞毒性; Han 等^[7]发现 CQ 可以增加乳腺癌细胞的放射敏感性。故本实验主要研究 CQ 是否能增强化疗药物 DEX 或辐射对 MM 细胞株 U266 细胞的杀伤作用,并对其机制进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 公司),离心机 (Eppendorf 公司),倒置显微镜 (Leica 公司),酶标仪 (Thermo 公司),流式细胞仪 (BD 公司),Odyssey 红外荧光扫描仪 (Licor 公司)。

1.1.2 细胞与主要试剂 MM 细胞株 U266 细胞由上海市长征医院血液科惠赠,于含 1% 双抗 (青霉素与链霉素)及 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养,选用对数生长期细胞进行实验。双抗 (上海博光生物公司),胎牛血清 (Gibco 公司),RPMI1640 培养基 (Hyclone 公司)。CQ 及 DEX (Sigma 公司)。细胞活性检测试剂盒 (cell counting kit-8, cck8, 日本同仁公司),Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (BD 公司),Tublin 抗体 (碧云天公司),Bcl-2 抗体 (Affinity 公司),荧光二抗 (抗兔及抗鼠, Licor 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 cck8 法检测 CQ 和 DEX 单药及联合应用对 U266 细胞增殖的影响 将 5×10^5 个/ml 的 U266 细胞接种于 96 孔板中,每孔总体积为 100 μ l,分别加入 CQ (终浓度为 1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9、2.0、1.0 μ mol/L)及 DEX (终浓度为 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9、2.0 μ mol/L),并选择 CQ (125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9 μ mol/L)与 DEX (125 μ mol/L)联合处理。药物作用 24 h 后,每孔中加入 cck8 试剂 10 μ l,在 450 nm 处检测其吸光度,并计算细胞增殖率 (%) 及抑制率 (%)。采用 Graphpad Prism 5.0 软件来计算单药半数抑制浓度 IC₅₀,运用中效原理软件 (CalcuSyn 软件)求出两药联用指数 (combination index, CI)。当 CI > 1 时,表示两药合用达到某一作用时所需药物的剂量大于单独给药时所需药物的剂量,提示两药具有拮抗效应;当 CI = 1 时,提示两药是单纯的相加作用;当 CI < 1 时,提示两药具有协同效应。

1.2.2 cck8 法检测不同剂量的辐射对 U266 细胞的杀伤作用 在不同辐射剂量下 (0、5、10、15、20、25 Gy)辐照细胞,辐照 24 h 后加入 cck8 试剂,检测吸光度,计算细胞增殖率 (%) 及抑制率 (%)。

1.2.3 cck8 法检测 CQ 对辐射后 U266 细胞增殖的影响 实验分组为:对照组 (Con),单纯给药组 (CQ: 1 μ mol/L),辐射组 (Rad: 5 Gy)及辐射+药物处理组 (RC: Rad+CQ)。其中,Con 组细胞用含 10% FBS 的 1640 培养基处理,CQ 组用 1 μ mol/L 的 CQ 处理 U266 细胞 24 h;Rad 组为含 10% FBS 的 1640 培养基处理 U266 细胞 24 h 后,给予 5 Gy ⁶⁰Co- γ 线照射;RC 组为用 1 μ mol/L 的 CQ 处理 U266 细胞 24 h 后,在 5 Gy 剂量下进行辐照。所有细胞均在辐照结束 24 h 后,加入 cck8,检测吸光度。

1.2.4 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡 将 5×10^5 个/ml 的 U266 细胞接种于 6 孔板中,每孔总体积为 2 ml,实验分组同“1.2.3”。收集细胞,1 500 r/min 离心 5 min;加入 PBS 洗 1 遍,离心。小心地吸出 PBS 后,加入含 6 μ l Annexin V 的 300 μ l 缓冲液重悬细胞团,避光,室温预染 5 min,随后加入 6 μ l 的 PI,流式细胞术检测分析细胞凋亡情况。

1.2.5 Western blot 测定 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达 辐射后 CQ 对 Bcl-2 蛋白表达的影响的实验分组同“1.2.3”;CQ 与 DEX 联用对 Bcl-2 蛋白表达的影响的实验分组为:对照组 (Con),CQ 组 (3.9 μ mol/L),DEX 组 (125 μ mol/L),CQ + DEX 组 (CQ 3.9 μ mol/L + DEX 125 μ mol/L)。

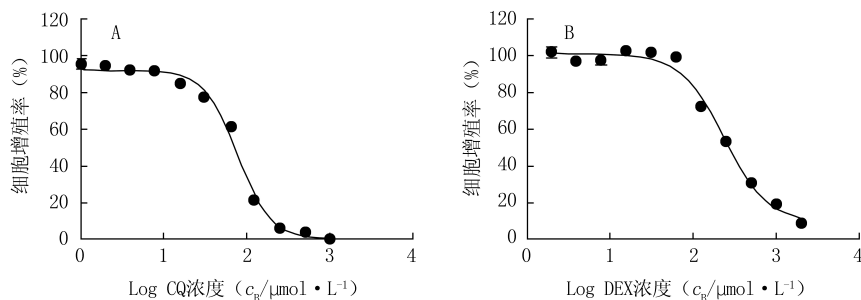
U266 细胞经不同处理后,提蛋白。选用 12% 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,并用湿转法将蛋白转移至膜上,封闭 2 h 后,加入一抗 (Bcl-2, 1:1 000 配制,来源兔;Tublin, 1:5 000 配制,来源小鼠),4 $^{\circ}$ C 过夜;用相应种属来源的荧光二抗,室温孵育 40 min。使用 Odyssey 扫描仪扫描,Quantity One 软件对蛋白条带进行光密度值分析。

1.2.6 统计分析 数据均用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。选用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CQ 及 DEX 对 U266 细胞增殖的抑制作用 从图 1 可见,CQ 及 DEX 对 U266 细胞的增殖抑制作用均呈浓度依赖性。CQ 及 DEX 对 U266 细胞的 IC₅₀ 分别为 $(77.9 \pm 5.8) \mu$ mol/L 及 $(237.1 \pm 30.3) \mu$ mol/L。

2.2 CQ 增敏 DEX 对 U266 细胞的杀伤作用 当 CQ:DEX 为 1:32~1:8 时,联用指数 < 1,说明两药协同杀伤 U266 细胞;当 CQ:DEX 为 1:4~

图1 CQ(A)及DEX(B)对U266细胞增殖的抑制作用($n=3$)

1:1时,联用指数 ≥ 1 ,两药联用表现为拮抗或相加作用(表1)。值得注意的是,CQ在 $3.9 \mu\text{mol/L}$ 和 $7.8 \mu\text{mol/L}$ 时,对U266细胞的抑制率分别为 $(8.1 \pm 0.4)\%$ 和 $(8.5 \pm 0.3)\%$ (表2);DEX($125 \mu\text{mol/L}$)对U266细胞的抑制率为 $(27.4 \pm 2.0)\%$ (表2);但当CQ与DEX合用时,抑制率分别增加到 $(34.9 \pm 2.6)\%$ 及 $(44.5 \pm 0.4)\%$ (表1),且联用指数分别为0.567及0.543,均 < 1 ,两药表现为协同杀伤作用。由于此协同作用中CQ对U266细胞增殖的抑制作用比DEX小很多,DEX发挥主要杀伤作用,我们将这一现象表述为CQ增敏DEX对U266细胞的杀伤作用。

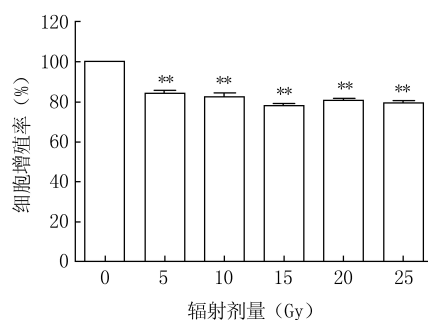
表1 DEX与CQ联用对U266细胞的抑制率及联用指数($n=3$)

CQ浓度 ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	DEX浓度 ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CQ与 DEX混 合浓度比	细胞 抑制率 (%)	联用 指数	联用 效果
3.9	125	1:32	34.9 ± 2.6	0.567	协同
7.8	125	1:16	44.5 ± 0.4	0.543	协同
15.6	125	1:8	46.1 ± 1.6	0.744	协同
31.3	125	1:4	52.0 ± 2.4	0.984	相加
62.5	125	1:2	47.2 ± 0.9	2.024	拮抗
125	125	1:1	80.1 ± 1.4	1.038	相加

表2 CQ与DEX单药对U266细胞的影响($n=3$)

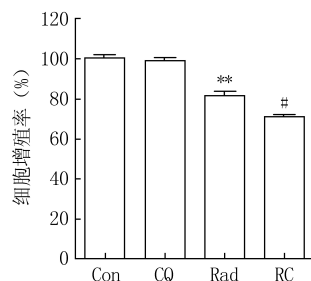
药物名称	浓度 ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑制率 (%)
CQ	3.9	8.1 ± 0.4
	7.8	8.5 ± 0.3
DEX	125	27.4 ± 2.0

2.3 不同辐射剂量对U266细胞增殖的影响 如图2所示,与对照组(0 Gy)相比,U266细胞在不同的辐射剂量(5、10、15、20、25 Gy)下,细胞增殖率下降,但差异不明显,为80%左右,无统计学意义。故选用5 Gy的辐射剂量进行后续实验。

图2 不同辐射剂量对U266细胞活力的影响($n=3$)** $P < 0.01$,与对照组(0 Gy)比较

2.4 CQ增强辐射对U266细胞的敏感性

2.4.1 CQ降低辐射后U266细胞的增殖 与对照组相比,辐射能够显著降低U266细胞增殖 $[(80.3 \pm 3.5)\% \text{ vs } (100.0 \pm 2.9)\%, P < 0.01]$ 。当CQ($1 \mu\text{mol/L}$)预处理U266细胞后再辐射,能够显著增强辐射对U266细胞增殖的抑制作用 $[(69.4 \pm 1.0)\% \text{ vs } (80.3 \pm 3.5)\%, P < 0.05]$ 。

图3 CQ增强辐射对U266细胞的增殖抑制作用($n=3$)注:浓度或放射线剂量,CQ $1 \mu\text{mol/L}$;Rad 5 Gy;RC 5 Gy+ $1 \mu\text{mol/L}$ 。** $P < 0.01$,与Con组比较;# $P < 0.05$,与Rad组比较

2.4.2 CQ增加辐射后U266细胞凋亡率 辐射能够显著诱导U266细胞凋亡 $[(13.2 \pm 0.6)\% \text{ vs } (5.8 \pm 1.1)\%, P < 0.01]$ 。当CQ($1 \mu\text{mol/L}$)预处理后再辐射,能够明显增强辐射对U266细胞的促凋亡作用 $[(18.4 \pm 0.7)\% \text{ vs } (13.2 \pm 0.6)\%, P < 0.01]$ 。

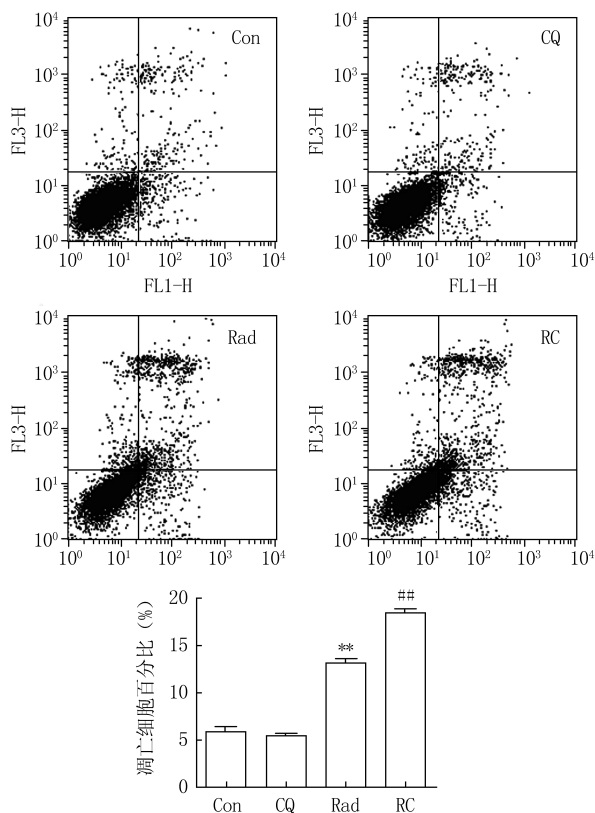


图4 CQ增加辐射后U266细胞凋亡率(n=3)

注:浓度或放射线剂量,CQ .1 μmol/L;
Rad .5 Gy;RC .5 Gy+1 μmol/L.

** P<0.01,与Con组比较;## P<0.01,与Rad组比较

可见,辐射能够降低U266细胞活力并促进其凋亡;CQ预处理U266细胞后再辐射,可增强辐射对细胞的杀伤作用。提示,CQ可以增强辐射对U266细胞的敏感性。

2.5 CQ对U266细胞Bcl-2蛋白表达的影响

U266细胞经CQ(3.9 μmol/L)处理后,Bcl-2蛋白水平无明显变化[(0.95±0.14) vs (1±0.06)];DEX(125 μmol/L)处理后可以降低U266细胞内Bcl-2的表达[(0.65±0.10) vs (1±0.06), P<0.01];当两药合用后,Bcl-2蛋白水平表达显著下降[(0.40±0.07) vs (0.65±0.10), P<0.05,图5A]。提示CQ增敏DEX对U266细胞的杀伤作用与Bcl-2抗凋亡蛋白的下调有关。但是,CQ预处理U266细胞再辐射后检测Bcl-2的表达,其差异无统计学意义(图5B)。

3 讨论

MM约占血液系统肿瘤的10%^[8]及恶性肿瘤的1%~2%^[9],且发病率呈逐年上升的趋势。关于

MM的治疗,国内主要参照《中国多发性骨髓瘤治疗指南(2013版)》,针对有症状的MM患者,多会采取放疗、化疗、骨髓移植、支持治疗等综合性治疗。其中,化疗是最常规的治疗手段。

在MM的经典化疗方案中,糖皮质激素类DEX作为细胞凋亡诱导剂是一种重要的组成药物^[10]。单用DEX时虽可诱导MM细胞凋亡,但凋亡率不高。如果加大DEX的剂量,又会引起一系列不良反应,使患者难以维持治疗。目前在治疗肿瘤时,联合用药已成为一种趋势。因此,寻找合适的联合用药方案治疗MM是一个新方向。氯喹是一个经典的抗疟药,有报道称,联用CQ可明显增强替莫唑胺对神经胶质瘤细胞的杀伤作用^[11]。故本实验首先将CQ与DEX单用及联用,来检测它们对MM细胞株U266细胞作用的变化,并根据Chou和Tallay发明的CalcuSyn软件^[12]得到CQ与DEX的联用指数。结果表明:两种药物对U266细胞的增殖抑制作用均呈浓度依赖性,一定浓度范围内两药联用后,对U266细胞表现为协同杀伤的作用。

放疗是MM治疗的另一种重要手段。袁晓丽等^[13]研究发现,CQ对食管癌细胞具有放疗增敏作用。发现在一定辐射剂量(5~25 Gy)范围内,辐射对U266细胞的抑制率约为20%,不同的辐射剂量之间的差异无统计学意义。我们选用低剂量辐射(5 Gy)进行后续实验,发现CQ在1 μmol/L时对U266细胞几乎无影响(抑制率<5%)。但是用CQ预处理U266细胞后再辐射,与单纯辐射组相比,预处理组细胞活力明显下降,凋亡率显著升高。结果表明,CQ能够增强辐射对U266细胞的敏感性。

Bcl-2是抗凋亡家族的一员,是细胞凋亡通路中线粒体途径的关键调节分子,主要作用于线粒体外膜^[14]。Bcl-2蛋白家族主要由抗凋亡与促凋亡蛋白组成,而Bcl-2蛋白是其中一种十分重要的抗凋亡蛋白^[15]。尽管单用CQ对Bcl-2的表达几乎无影响,CQ与DEX联用后可以显著增强DEX降低Bcl-2的表达作用。提示CQ增敏DEX对U266细胞的杀伤作用,可能与下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达有关。

综上所述,CQ能够增敏DEX或辐射对U266细胞的杀伤作用,CQ增敏DEX的作用机制可能与抑制Bcl-2表达相关。这为CQ联合化疗或放疗用于MM的治疗提供了实验依据。

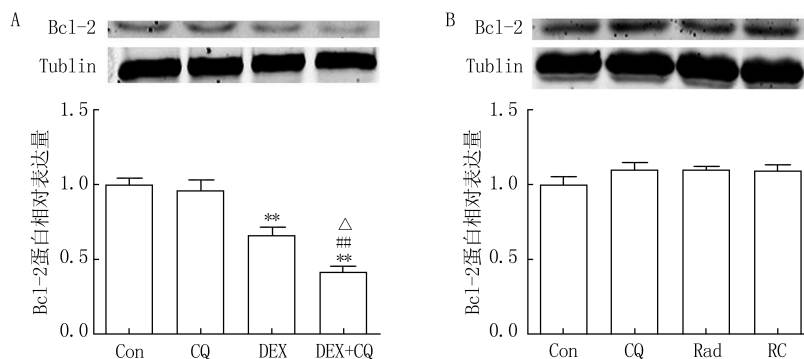


图5 CQ预处理后DEX(A)或辐射(B)所致的U266细胞中Bcl-2表达的改变($n=5$)

注:各组浓度或放射线剂量, A: CQ .3.9 $\mu\text{mol/L}$; DEX .125 $\mu\text{mol/L}$;

DEX+CQ .125 $\mu\text{mol/L}$ +3.9 $\mu\text{mol/L}$; B: CQ .1 $\mu\text{mol/L}$; Rad .5 Gy; RC .5 Gy+1 $\mu\text{mol/L}$.

** $P<0.01$,与Con组比较;## $P<0.01$,与CQ组比较;[△] $P<0.05$,与DEX组比较

【参考文献】

- [1] Feng W, Fu Y, Zhang Y, *et al.* Establishment of stable multiple myeloma cell line with overexpressed PDCD5 and its proapoptosis mechanism[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 10635-10643.
- [2] Dong H, Carlton ME, Lerner A, *et al.* Effect of cAMP signaling on expression of glucocorticoid receptor, Bim and Bad in glucocorticoid-sensitive and resistant leukemic and multiple myeloma cells[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6:230.
- [3] Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625:220-233.
- [4] Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraie O, *et al.* The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137:538-545.
- [5] Hu T, Li P, Luo Z, *et al.* Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo[J]. *Oncol Rep*, 2015, 35:43-49.
- [6] Tang MC, Wu MY, Hwang MH, *et al.* Chloroquine enhances gefitinib cytotoxicity in gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0119135.
- [7] Han MW, Lee JC, Choi JY, *et al.* Autophagy inhibition can overcome radioresistance in breast cancer cells through suppression of TAK1 activation[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34: 1449-1455.
- [8] Ghafouri-Fard S, Seifi-Alan M, Shamsi R, *et al.* Immunotherapy in multiple myeloma using cancer-testis antigens[J]. *Iran J Cancer Prev*, 2015, 8:e3755.
- [9] Lambert KE, Huang H, Mythreye K, *et al.* The type III transforming growth factor-beta receptor inhibits proliferation, migration, and adhesion in human myeloma cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22:1463-1472.
- [10] 刘竞,李昕,桂嵘,等. 程序化细胞死亡分子-5蛋白对地塞米松诱导的多发性骨髓瘤细胞凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30:1972-1974.
- [11] Lee SW, Kim HK, Lee NH, *et al.* The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells[J]. *Cancer Lett*, 2015, 360:195-204.
- [12] Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70:440-446.
- [13] 袁晓丽,李涛,黄建鸣,等. 氯喹对食管癌细胞系放射增敏的实验研究[J]. *中国放射医学与防护杂志*, 2014, 34:823-826.
- [14] MS Ola MN, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351:41-58.
- [15] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, *et al.* Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802:92-99.

[收稿日期] 2016-03-09 [修回日期] 2016-04-14

[本文编辑] 顾文华