

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.001

• 基础研究 •

力达霉素联合硼替佐米的抗骨髓瘤作用及对MAPKs表达的影响



甄永占¹, 纪春梅², 郝晓方¹, 赵毓芳¹, 章广玲¹, 吕翠平¹

Lidamycin Enhances Sensitivity of Multiple Myeloma to Bortezomid by Modulating Expression of Mitogen-activated Protein Kinases

ZHEN Yongzhan¹, JI Chunmei², HAO Xiaofang¹, ZHAO Yufang¹, ZHANG Guangling¹, LV Cuiping¹

1. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical, Hebei United University, Tangshan 063000, China; 2. Department of Respiratory, Xiehe Hospital

Abstract: Objective To investigate the effect of lidamycin (LDM) combined with bortezomid (BZM) against multiple myeloma and the activative role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in cell death after the combination treatment. **Methods** By selecting the appropriate concentrations of drugs and pathway inhibitors, cell proliferation was detected by MTS. The expression of JNK, p38 MAPK and ERK were detected by Western blot. **Results** LDM synergistically enhanced BZM-induced proliferation inhibition against human myeloma U266 cells. JNK, the expression of p38 MARK and ERK were activated by LDM. The activation of JNK and p38 MAPK were remarkably increased while ERK activation was decreased by the combined LDM and BZM. The inhibitors of JNK, p38 MAPK and MEK had no significant effect on cell proliferation. JNK inhibitor (SP600125) or p38 MAPK inhibitor (SB203580) could reverse LDM plus BZM induced growth inhibition, conversely. MEK inhibitor (U0126) could synergistically enhance LDM plus BZM induced growth inhibition in U266 cells. **Conclusion** LDM greatly enhanced the sensitivity of multiple myeloma to BZM by further increasing the activation of JNK and p38 MAPK and decreasing the activation of ERK in U266 cells.

Key words: Lidamycin; Bortezomid; Multiple myeloma; Combination therapy; Mitogen-activated protein kinases(MAPKs)

摘 要: 目的 研究力达霉素(lidamycin, LDM)联合硼替佐米(bortezomib, BZM)的抗骨髓瘤作用及对丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)的影响, 并探讨MAPKs在两药联合抗骨髓瘤中的作用。 **方法** 选取适当的药物浓度和通路抑制剂浓度, MTS法检测细胞增殖情况; Western blot 检测相关蛋白及蛋白磷酸化水平。 **结果** BZM能增强LDM对骨髓瘤细胞的增殖抑制作用, LDM激活c-Jun氨基末端激酶(c-Jun NH2-terminal kinase, JNK)、p38 MAPK的表达和细胞外信号调节激酶(Extracellular signal regulated rotein kinase, ERK), 两药联合后可使JNK和p38 MAPK的激活显著增强, 而ERK的激活显著下降。JNK抑制剂(SP600125)、p38抑制剂(SB203580)和MEK抑制剂(U0126) 3种抑制剂单独作用对细胞的增殖抑制作用均不明显, 但SP600125或SB203580分别与LDM联合BZM合用后均降低了两药联合对细胞的增殖抑制作用, 而U0126与LDM联合BZM合用后提高了两药联合对细胞的增殖抑制作用。 **结论** LDM通过进一步激活JNK、p38 MAPK和降低ERK的激活来增强BZM抗骨髓瘤敏感度。

关键词: 力达霉素; 硼替佐米; 多发性骨髓瘤; 联合用药; 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R733.3 文献标识码: A

0 引言

目前多发性骨髓瘤仍然难以治愈。在硼替佐米(bortezomid, BZM)等新药出现之前, 中位生存期仅3年。但BZM不能根治多发性骨髓瘤, 且随着其临床应用范围的扩大和时间的推移, 部分患者对BZM产生了耐药反应, 因此人们寻找新的抗多发性骨髓瘤药物, 或者以BZM为基础的联合治

收稿日期: 2013-03-21; 修回日期: 2013-04-29
基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2012401030)
作者单位: 1. 063000河北唐山, 河北联合大学基础医学院组织学与胚胎学教研室; 2. 河北唐山协和医院呼吸内科
作者简介: 甄永占(1970-), 女, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤分子药理学研究

疗方案等,以进一步提高多发性骨髓瘤患者的生存率和治愈率^[1-2]。力达霉素(lidamycin, LDM)是大分子肽类抗肿瘤抗生素, LDM具有较强的抗肿瘤活性^[3-7],前期结果证实其具有抗多发性骨髓瘤作用。我们经过前期实验^[7]的摸索,选取了适当的LDM、BZM和通路抑制剂浓度,本实验拟研究LDM联合BZM抗骨髓瘤作用,为今后两药联合在多发性骨髓治疗中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠骨髓瘤细胞U266由本室传代保存。用含10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI 1640培养液(Gibco),于37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,2 d传代1次,实验用细胞为对数生长期细胞。力达霉素由中国医学科学院医药生物技术研究所以甄永苏院士惠赠。主要实验材料还有:蛋白定量试剂盒(BCATM protein assay kit)(皮尔斯,美国伊利诺伊州);宽范围蛋白预染 Marker(新英格兰生物公司,美国马萨诸塞州);蛋白质印迹发光液和PVDF膜(密理博公司,美国马萨诸塞州);Actin抗体(sc-1616)(圣克鲁斯公司,美国马萨诸塞州);HRP 标记的羊抗兔、兔抗羊、羊抗小鼠 IgG 抗体(北京中杉金桥有限责任公司,中国北京);MAPK家族成员抗体试剂盒、磷酸化MAPK家族成员抗体试剂盒(细胞信号技术公司,美国马萨诸塞州);JNK抑制剂SP600125、p38 MAPK抑制剂SB203580和MEK抑制剂U0126(默克公司,中国北京)。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖活性检测 MTS 法测定细胞存活率,MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]是MTT的一种新型类似物,化学名为3-(4,5-二甲基噻唑-2-磺)-5-(3-羧甲基氧苯基)-2-(4-磺苯基)-2氢四唑内盐,简称MTS。原理是MTS在 PMS (phenazine methosulfate) 存在的情况下可被活细胞内的脱氢酶类还原,转化成液态可溶的产物,而死细胞无此功能,该水溶物可用酶标仪在波长490 nm 处检测,测定在490 nm 波长处的吸光度值,该值可间接反映活细胞的数量和活性。取对数生长期的细胞,轻轻吹打分散成细胞悬液,计数后以1×10⁴个/孔的密度接种细胞于96孔细胞培养板中,2 h 后加入不同浓度的药物处理48 h,每组至少3个平行孔。每孔加入20 μl

MTS和PMS混合液(按说明书配制:每2 ml MTS溶液中加入100 μl PMS,现用现配),37℃继续培养1~4 h,用酶标仪(Thermo Labsystems, Multiskan MK3)于490 nm处测定每个孔的吸收度(*A*₄₉₀)值。实验设无药对照孔和无细胞对照孔各3孔,按下面公式计算细胞的存活率:细胞存活率=(加药组*A*₄₉₀值-空白组*A*₄₉₀值)/(对照组*A*₄₉₀值-空白组*A*₄₉₀值)×100%。实验重复3次。为了研究JNK、p38 MAPK和ERK的激活在LDM联合BZM抑制U266细胞增殖中的作用,分别用相应的抑制剂(SP600125、SB203580和U0126)预处理U266细胞2 h,再加入LDM (0.5 nmol/L)和BZM(10 nmol/L)继续作用48 h后,用MTS法检测细胞增殖抑制状况。

1.2.2 Western blot分析 收集不同药物作用48 h及未加药处理的U266细胞,用预冷的1×PBS洗3遍,加入新鲜配制的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 1% NP-40; 150 mmol/L NaCl; 1 mmol/L Na₃VO₄; 1 mmol/L NaF, 临用时加入3种蛋白酶抑制剂:1% 抑蛋白酶肽、10 g/L 亮抑酶肽; 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟)100 μl,细胞与裂解液充分混合,冰浴20 min。于4℃,13 000 mmol/L 离心15 min,收集上清液于新的微量离心管中,按照BCA法测定蛋白含量。取各样品等量总蛋白30 μg加入0.25倍体积的5×上样缓冲液,煮沸变性5 min后,在10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)胶上进行电泳。然后转移到硝酸纤维素膜上,1% BSA封闭1 h,一抗4℃孵育过夜后,加相应二抗孵育2 h,膜上滴加化学发光增强剂(SC-2048,美国Santa Cruz 生物公司),按照试剂说明进行操作,通过凝胶成像系统拍照保存结果。

1.3 统计学方法

计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS13.0统计软件进行单因素方差分析比较各组间的差异,采用 *t* 检验进行两组之间比较,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTS检测LDM联合BZM对U266细胞增殖的影响

LDM联合BZM作用U266细胞48 h后,能显著抑制细胞的增殖,与LDM和BZM单药比较差异有统计学意义,见图1。

2.2 Western blot检测LDM联合BZM对MAPKs表

达的影响

0.5 nmol/L 的LDM作用U266细胞48 h后，可激活磷酸化的JNK、p38 MAPK和ERK的表达，LDM与BZM（5 nmol/L）联合用药后，可使JNK和p38 MAPK的激活显著增强，而ERK的激活显著下降，见图2。

2.3 MTS检测LDM联合BZM合用SP600125对U266细胞增殖的影响

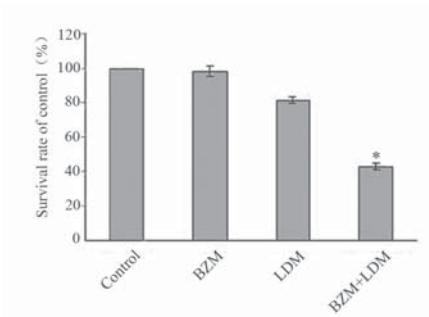
BZM（5 nmol/L）联合LDM（0.5 nmol/L）作用U266细胞48 h后，能显著抑制细胞的增殖，与LDM和BZM单药比较差异有统计学意义，但联合用药合用JNK抑制剂SP600125后，降低了对细胞的增殖抑制作用，与联合用药比较差异有统计学意义，见图3。

2.4 MTS检测LDM联合BZM合用SB203580对U266细胞增殖的影响

BZM（5 nmol/L）联合LDM（0.5 nmol/L）作用U266细胞48 h后，能显著抑制细胞的增殖，与LDM和BZM单药比较有显著性差异，但联合用药合用p38 MAPK抑制剂SB203580后，降低了对细胞的增殖抑制作用，与联合用药比较差异有统计学意义，见图4。

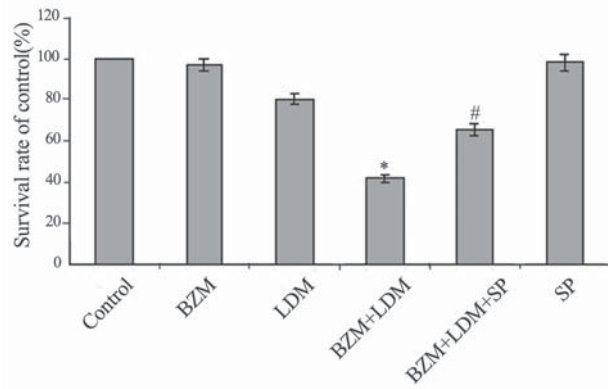
2.5 MTS检测LDM联合BZM合用U0126对U266细胞增殖的影响

BZM（5 nmol/L）联合LDM（0.5 nmol/L）作用U266细胞48 h后，能显著抑制细胞的增殖，与LDM和BZM单药比较差异有统计学意义，但合用MEK抑制剂U0126后，增强了对细胞的增殖抑制作用，与联合用药比较差异有统计学意义，见图5。



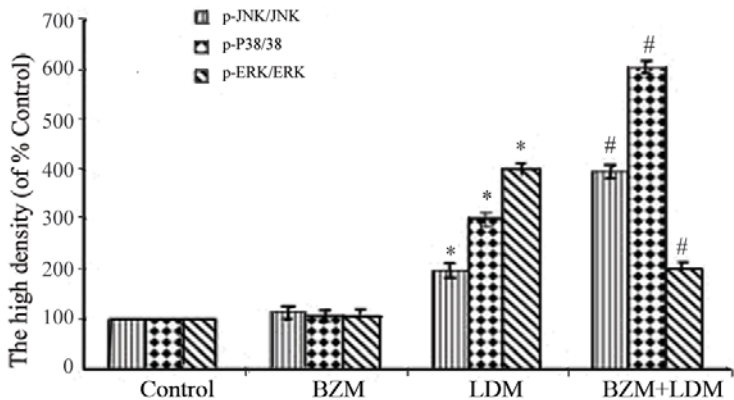
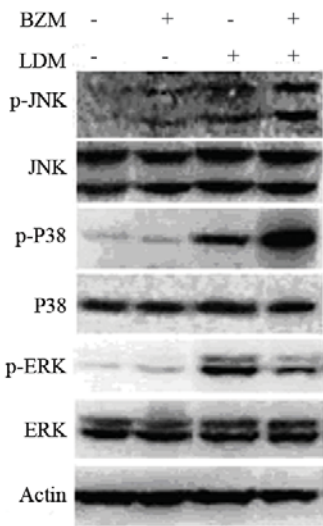
Each point represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), *: $P<0.05$, the combination versus LDM or BZM;BZM:bortezomib;LDM:lidamycin

图1 LDM联合BZM对U266细胞增殖的影响
Figure1 Proliferation inhibition of U266 cells by BZM (5 nmol/L), LDM (0.5 nmol/L) and the combination



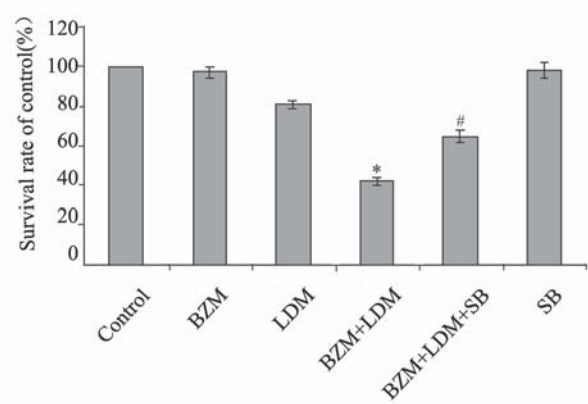
SP:SP600125; each point represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), *: the combination vs. LDM or BZM, $P<0.05$; #: the combination plus inhibitor SP600125 vs. the combination, $P<0.05$

图3 BZM、LDM联合用药及合用SP600125对U266细胞增殖的影响
Figure3 Anti-proliferation of U266 cells by BZM, LDM, the combination, and the combination plus SP600125



Each point represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), *: $P<0.05$, LDM vs. control; #: $P<0.05$, the combination vs. LDM

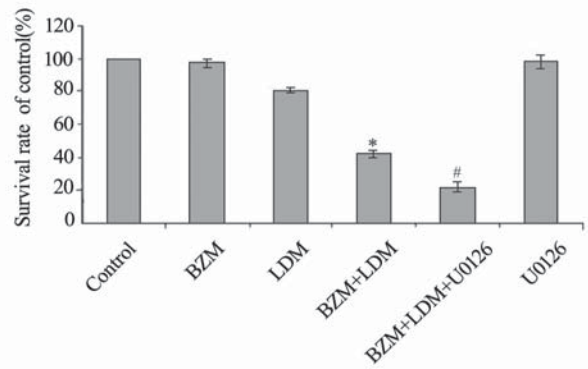
图2 Western blot检测LDM联合BZM对U266细胞MAPKs表达的影响
Figure2 The effects of LDM combined with BZM on MAPKs expression in U266 cells detected by Western blot



SB:SB203580; each point represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), *: the combination vs. LDM or BZM, $P<0.05$; #: the combination plus inhibitor vs. the combination, $P<0.05$

图4 BZM、LDM联合用药及合用SB203580对U266细胞增殖的影响

Figure4 Anti-proliferation of U266 cells by LDM, BZM, the combination, and the combination plus SB203580



Each point represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), *: the combination vs. LDM or BZM, $P<0.05$; #: the combination plus inhibitor vs. the combination, $P<0.05$

图5 BZM、LDM联合用药及合用U0126对U266细胞增殖的影响

Figure5 Anti-proliferation of U266 cells by LDM, BZM, the combination, and the combination plus U0126

3 讨论

力达霉素属于烯二炔类抗生素，它可诱导DNA单、双链的断裂。大量研究表明，力达霉素具有较强的抗肿瘤活性^[3-7]。前期结果显示，LDM通过激活JNK和p38 MAPK抑制骨髓瘤细胞增殖，而LDM作用后ERK的激活有利于细胞生存^[7]。硼替佐米是首个用于临床的蛋白酶体抑制剂，2003年5月，美国食品药品监督管理局（FDA）批准硼替佐米用于多发性骨髓瘤患者。

本实验结果显示BZM能增强LDM的抗骨髓瘤作用，LDM激活MAPK家族的三个主要成员：c-Jun氨基末端激酶(c-Jun NH2-terminal kinase, JNK)、p38 MAPK的表达和细胞外信号调节激酶

(extracellular signal regulated rotein kinase, ERK)，这一结果和我们前期研究结果吻合，两药联合后可使JNK和p38 MAPK的激活显著增强，而ERK的激活显著下降。分别应用JNK抑制剂(SP600125)、p38抑制剂(SB203580)和MEK抑制剂(U0126)与LDM联合BZM合用，观察对细胞增殖的影响。结果显示单独的3种抑制剂对细胞的增殖抑制作用均不明显，但SP600125或SB203580分别与LDM联合BZM合用后均降低了两药联合对细胞的增殖抑制作用，而U0126与LDM联合BZM合用后提高了两药联合对细胞的增殖抑制作用。

MAPK属于丝/苏氨酸蛋白激酶，广泛存在于哺乳动物细胞的胞质中，参与调节细胞生长、发育、分裂、死亡以及细胞间的功能等一系列生命活动^[8-9]。研究表明MAPK家族中的这三个主要成员：JNK、p38 MAPK和ERK均既有抗增殖、促凋亡作用又有促增殖、抗凋亡作用^[10-13]，这取决于细胞的类型、死亡刺激的性质及活化的持续时间和其他信号通路的活性。

MAPK信号转导通路是一个复杂的网络系统，在哺乳类细胞中各个MAPK信号通路之间通过复杂的机制既可相互区别，又可相互调节，既有自身的独立性，相互间又有千丝万缕的联系。JNK、p38 MAPK和ERK三条通路，或是在上游蛋白激酶，或是在下游作用底物处，总是有其通路的交汇。这种复杂的、多联系的网络系统是确保细胞反应精确性和准确性的关键，细胞对外界刺激的反应是综合了各个信号通路之间的激活和（或）抑制效应而产生的。

综上所述，BZM能增强LDM的抗骨髓瘤作用，这种增强作用是通过进一步激活JNK、p38 MAPK和降低ERK的激活来实现的。本实验为LDM联合BZM抗多发性骨髓瘤的体内实验和临床试验研究提供了理论依据。

参考文献:

[1] Zeng Z, Zheng L, Lin J, *et al.* Successful bortezomib treatment in combination with dexamethasone and thalidomide for previously untreated epidural plasmacytoma[J]. *Oncol Lett*,2012,3(3):557-9.

[2] Leiba M, Jakubikova J, Klippel S, *et al.*. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents[J]. *Br J Haematol*, 2012,157(6):718-31

[3] Zhen YS, Xue YC, Shao RG. Antitumor activity of the new enediyne antibiotic C1027[J]. *Zhongguo Kang Sheng Su Za Zhi*,1994,19(2):164-8.[甄永苏, 薛玉川, 邵荣光. 烯二炔类新抗生素C1027的抗肿瘤作用研究[J]. *中国抗生素杂志*,

1994,19(2):164-8.]

[4] Zhong GS, Guo XF, Zhang SH, *et al.* Optimization of the assembly efficiency for lidamycin chromophore bound to its apoprotein: a case study using orthogonal array[J]. Biomed Environ Sci, 2011,24(6):602-7.

[5] Zhang Q, Liu XJ, Hu L, *et al.* Factor VII light chain-targeted lidamycin targets tissue factor-overexpressing tumor cells for cancer therapy[J]. Int J Mol Med,2012,29(3):409-15.

[6] Zhen HY, He QH, Zhen YZ, *et al.* Inhibition of mouse embryonic carcinoma cell growth by lidamycin through down-regulation of embryonic stem cell-like genes Oct4, Sox2 and Myc[J]. Invest New Drugs,2011,29(6):1188-97.

[7] Zhen YZ, Lin YJ, Shang BY, *et al.* Eneidyne lidamycin induces apoptosis in human multiple myeloma cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase[J]. Int J Hematol,2009,90(1):44-51.

[8] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions[J]. Endocr Rev,2001,22(2):153-83.

[9] Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development[J]. Protein Cell,2010,1(3):218-26.

[10] Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis[J]. IUBMB Life,2006,58(11):621-31.

[11] Wen J, Cheng HY, Feng Y, *et al.* p38 MAPK inhibition enhancing ATO-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells[J]. Br J Haematol,2008,140(2):169-80.

[12] Zhang B,Wang X,Cai F,*et al.* Antitumor properties of salinomycin on cisplatin-resistant human ovarian cancer cells in vitro and in vivo: involvement of p38 MAPK activation[J]. Oncol Rep,2013,29(4):1371-8.

[13] Guo R,Lin J,Xu W, *et al.* Hydrogen sulfide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibition of the p38 MAPK pathway in H9c2 cells [J]. Int J Mol Med,2013, 31(3):644-50.

[编辑: 安 凤; 校对: 刘红武]

· 消息会讯 ·

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于1973年，是我国第一本独立的全国性肿瘤专业学术刊物。由国家卫生和计划生育委员会主管，中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是北大中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、英国《全球健康》(Global Health)及国内所有大型数据库收录。

杂志主要报道肿瘤基础研究及临床诊疗方面的新理论、新成果、新技术、新经验、新进展。以肿瘤临床、科研工作者为主要读者对象。

主要栏目有专家论坛、专题研究、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、综述、技术交流、短篇论著、研究简报、病例报道、消息会讯等。

2008年杂志建成自己的独立网站(<http://www.zlfzyj.com>), 2009年开始文章的DOI中文注册工作, 随之杂志的所有编辑出版工作转移到网络平台, 作者投稿查稿、专家审稿工作均通过网络完成, 读者亦可通过网站免费阅读和下载本刊文章。

2014年,我们将组织更多优秀的专题研究回馈广大读者,希望朋友们能一如既往地给予本刊以热忱的关注,将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展;订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤事业取得的进步。

邮发代号: 38-70; 国外代号: MO6482
定价: 15.00 元/册; 出版周期: 月刊
中国标准连续出版物号: ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R; CODEN ZFYHAB
投稿网站: <http://www.zlfzyj.com>; E-mail: zlfzyjzz@vip.163.com
电话/传真: 027-87670126
通信地址: 430079 武汉市洪山区卓刀泉南路116号《肿瘤防治研究》编辑部