

高三尖杉酯碱联合三氧化二砷诱导人多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞株凋亡的实验研究

周秀杰^{1,2} 周郁鸿¹ 陈小会³ 钱文斌⁴

摘要 **目的** 通过体外实验阐述高三尖杉酯碱(HHT)单药及联合亚砷酸(ATO)用药对人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 作用及其机制。**方法** 应用四甲基偶氮唑(MTT)比色法,检测 HHT、ATO 单药及两者联合用药对人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 增殖的影响,Hoechst 染色法检测细胞凋亡形态学变化,流式细胞仪检测细胞早期凋亡比率。Western blot 检测药物处理后凋亡关键蛋白(Caspase-3、9 及 PARP)、Bcl-2 家族蛋白(Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xl)及 AKT 蛋白的表达。**结果** HHT、ATO 单药可显著抑制 RPMI 8226 细胞的增殖,其作用呈时间及浓度依赖($P < 0.05$),且两药联合具有协同作用($CI < 1$)。HHT、ATO 单药可诱导 RPMI 8226 细胞凋亡且呈浓度依赖,出现细胞凋亡形态学改变及早期凋亡比率增高,两药联合可加强诱导凋亡作用。HHT 可呈浓度依赖性激活 Caspase-3、PARP 表达;HHT(40 ng/mL)与 ATO (8.5 $\mu\text{mol/L}$)联合用药可显著激活 Caspase-3、9,下调抗凋亡蛋白 Mcl-1 及 Bcl-xl 的表达,呈时间依赖性降低 AKT 磷酸化水平。**结论** HHT、ATO 单药或联合用药可诱导 RPMI 8226 细胞凋亡,其机制可能和激活 Caspase 通路、调节 Bcl-2 家族蛋白表达、抑制 AKT 磷酸化等有关。

关键词 多发性骨髓瘤;高三尖杉酯碱;三氧化二砷;细胞凋亡

Homoharringtonine Combined Arsenic Trioxide Induced Apoptosis in Human Multiple Myeloma Cell Line RPMI 8226: an Experimental Research ZHOU Xiu-jie^{1,2}, ZHOU Yu-hong¹, CHEN Xiao-hui³, and QIAN Wen-bin⁴ 1 Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou (310053), China; 2 Department of Hematology, Haining Municipal People's Hospital, Zhejiang (314400), China; 3 Department of Hematology, Second People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou (310053), China; 4 Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou (310003), China

ABSTRACT **Objective** To clarify the effects and mechanisms of homoharringtonine (HHT) monomer therapy or combination therapy with arsenic trioxide (ATO) on human multiple myeloma (MM) cell line RPMI 8226 in *in vitro* researches. **Methods** Effects of HHT, ATO, and HHT combined ATO on the growth of MM cell line RPMI 8226 were detected using MTT assay. The morphological changes of cell apoptosis were detected by Hoechst staining. The early apoptosis rate was detected using flow cytometry. Expressions of Caspase-3, Caspase-9, poly-ADP-ribose polymerase (PARP), Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xl, and AKT protein were detected by Western blot. **Results** HHT and ATO inhibited the proliferation of RPMI 8226 cell line in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$). Synergistic effects was shown in the combination group ($CI < 1$). HHT and ATO induced the apoptosis of RPMI 8226 in a dose-dependent manner with typical morphological changes of apoptosis and higher early stage apoptosis rate. The enhancement in apoptotic induction was seen when two agents were combined. HHT activated expressions of Caspase-3 and PARP in a dose dependent manner at 24 h. HHT at 40 ng/mL and ATO at 8.5 $\mu\text{mol/L}$ could significantly activate expressions of Caspase-3 and Caspase-9, and down-regulate expressions of anti-apoptotic proteins Bcl-xl and Mcl-1. In

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30871099);杭州市卫生科技计划资助项目(No. 2011A016)

作者单位:1.浙江中医药大学第一附属医院血液科(杭州 310053);2.浙江省海宁市人民医院血液科(浙江海宁市 314400);3.浙江省杭州市第二人民医院血液科(杭州 310015);4.浙江大学第一附属医院血液科(杭州 310003)

通讯作者:周郁鸿, Tel:0571-86620325, E-mail:zyhblood@163.com

addition, the combination therapy of HHT at 40 ng/mL and ATO at 8.5 $\mu\text{mol/L}$ inhibited phosphorylation of AKT in a time-dependent manner. Conclusion HHT, ATO, and combination therapy of HHT and ATO induced the apoptosis of RPMI 8226 cell line possibly through activating Caspase pathways, regulating expressions of Bcl-2 families, and inhibiting phosphorylation of AKT.

KEYWORDS multiple myeloma; homoharringtonine; arsenic trioxide; apoptosis

高三尖杉酯碱(HHT)系从我国三尖杉属植物粗榧的树皮中提取的生物碱,国内首先将其用于白血病的治疗。本课题在前期研究中已经报道了HHT在体外能诱导多发性骨髓瘤细胞株和患者原代肿瘤细胞凋亡;其半数抑制率(IC_{50})与髓系白血病细胞株相当,提示HHT在治疗多发性骨髓瘤(MM)中的潜在价值^[1]。砒霜又名白砒,是砒石经升华而成的精制品,味辛酸性热,有毒,入脾、肺、肝经,功能祛痰、截疟、杀虫、蚀疮、祛腐。后人曾将其用于风湿性疾病、哮喘、痔疮^[2],为减轻毒副反应,近年来我国医学科学家不断努力成功提取砒霜的有效成分砷剂而制成的静脉制剂称为三氧化二砷或亚砷酸(ATO)。为了克服肿瘤细胞耐药的问题,联合用药作用于多个特异性靶点是近年来主要解决方案,成功的例子是ATO联合维甲酸(ATRA)治疗急性早幼粒细胞白血病能显著降低微小残留、减少复发^[3]。为此我们对HHT联合ATO对MM的抗肿瘤机制进行了实验研究,现报告如下。

材料与方 法

1 细胞株及细胞培养 RPMI 8226 细胞(人多发性骨髓瘤细胞株,浙江大学第一附属医院血液研究所惠赠)接种于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 天换液 1 次,取对数生长期细胞为实验对象。

2 药物 HHT:1 mg:1 mL,北京协和药厂,实验时用生理盐水稀释成 0、10、20、40、80 ng/mL; ATO:5 mg:5 mL,哈尔滨伊达药业有限公司,实验时用生理盐水稀释成 0、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 试剂及仪器 PBS(杭州吉诺生物医药技术有限公司);RPMI 1640 培养、胎牛血清(美国 Gibco 公司);MTT、DMSO(美国 Sigma 公司);Annexin-V/FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 CALTAG 公司);Hochest33258 染料(美国 BD 公司);Tris、预染蛋白质分子量标志 SM-0671、甘氨酸(上海 Sangon 公司);聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)、半胱氨酸蛋白酶-3、9(Caspase-3、9)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)、白血病基因-2(Bcl-2)、B 细胞淋

巴瘤-extra large (Bcl-xl)、髓样细胞白血病-1(Mcl-1)单(多)克隆抗体(均为美国 Cell signal 公司产品);辣根过氧化物酶连接的抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶连接的抗兔 IgG(中国联科公司);Western blot 试剂盒(美国 KPL 公司);细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);超净工作台(美国 Forma Scientific Inc 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);酶标仪、水平电泳槽、低温离心机(德国 Heraeus 公司)、垂直电泳装置、转膜装置、超声波细胞粉碎机(JY92-ZD)、MP4 + ChemidocXRS 型蛋白印记检测系统(均为美国 Bio-Rad 公司产品)。

4 方 法

4.1 HHT、ATO 单药或联合用药抑制 RPMI 8226 细胞增殖 采用四甲基偶氮唑(MTT)法取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个细胞/mL 接种于 96 孔培养板,取不加药物细胞悬液为空白对照组,单药组 HHT 终浓度分别为 10、20、40、80 ng/mL, ATO 终浓度分别为 1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$;联合用药组药物终浓度分别为 HHT(10 ng/mL) + ATO(1 $\mu\text{mol/L}$)、HHT(20 ng/mL) + ATO(2 $\mu\text{mol/L}$)、HHT(40 ng/mL) + ATO(4 $\mu\text{mol/L}$),每孔总体积 200 μL ,培育 24、48 h 后,行 MTT 检测,洗涤后各孔加入二甲基亚砷(DMSO)0.2 mL/孔,充分吹打,在酶标仪 570 nm 波长读取吸光度值(OD 值),复孔 3 个,取平均值。增殖抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{阴性对照组 OD 值}) / (\text{空白对照组 OD 值} - \text{阴性对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。根据中效原理(Chou-Talalay 联合指数法),应用中效方程式 $\text{fa}/\text{fu} = (\text{D}/\text{Dm})^m$ 来计算及判断两种药物之间的相互作用^[4]。

4.2 细胞凋亡形态学检测 采用 Hoechst 观察药物作用后细胞形态,以空白对照、HHT(40 ng/mL)、ATO(8.5 $\mu\text{mol/L}$)、HHT(40 ng/mL) + ATO(8.5 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 RPMI 8226 细胞 24 h 后,收集细胞,经过离心、固定、洗涤使细胞均匀分布载玻片上,均匀滴上 0.5 mL Hoechst 33258 染色液,显微镜下观察并拍照。

4.3 细胞早期凋亡率检测 采用流式细胞分析技术观察细胞早期凋亡比率,参照 Annexin V-PI 细胞

凋亡检测试剂盒说明书操作。RPMI 8226 细胞以 5×10^5 /mL 接种于培养瓶中,每瓶细胞悬液 5 mL,分别加入实验浓度 HHT (20 ng/mL)、ATO (2 μ mol/L)、HHT (20 ng/mL) + ATO (2 μ mol/L) 和 HHT (40 ng/mL)、ATO (4 μ mol/L)、HHT(40 ng/mL) + ATO (4 μ mol/L),同时设空白对照组,24 h 后收获细胞,每个浓度收集 1×10^6 个细胞,冷 PBS 洗涤 2 次,1 000 r/min 离心,4 $^{\circ}$ C 5 min,弃上清。将细胞重悬于 1 mL $1 \times$ Binding buffer,取 100 μ L 细胞置于流式细胞仪专用试管中,加 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,加入 300 μ L $1 \times$ Binding buffer,立即用流式细胞仪检测。

4.4 细胞凋亡相关蛋白检测 采用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白,HHT 10、20、40、80 ng/mL 作用 24 h 后检测 Caspase-3、PARP 变化,同时设空白对照组。经药物作用后,收集 1×10^7 个 RPMI 8226 细胞,离心,弃上清,用预冷 PBS 洗涤 2 次,吸弃上清,细胞收集于 EP 管中,置 -20 $^{\circ}$ C 冻存 4 h。加细胞裂解液 50 ~ 120 μ L,反复吹打均匀,置冰上,用超声波细胞粉碎机处理(160 w,持续 5 s,间隔 5 s,共 5 次),剪切 DNA,至溶液不再黏稠。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 10 min,吸取上清液,BCA 法蛋白质浓度法测定后,按比例加入上样缓冲液,沸水中煮 5 min 后,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。采用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度,取 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,加样,起始电压为 60 V,当染料进入分离胶后,提高电压到 120 V,直至溴酚蓝达分离胶底部,停止电泳,转至 PVDF 膜。置牛奶封闭液中摇床封闭 2 h。从封闭液中取出 PVDF 膜,根据凋亡蛋白分子量对照 MARKER 剪膜,右下角剪角标记,分别放入洁净密闭小方盒中,立即加入一抗溶液,4 $^{\circ}$ C 过夜。用 $1 \times$ TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。PVDF 膜置于二抗溶液中,摇床平缓摇动 2 h。用 $1 \times$ TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。参照 ECL 试剂盒操作说明书,进行 ECL 反应。然后拍摄分析。以相同方法检测 HHT (40 ng/mL)、ATO (8.5 μ mol/L)、HHT (40 ng/mL) + ATO (8.5 μ mol/L) 作用 24 h 后 Caspase-3、9、AKT、p-AKT、Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xl 蛋白表达;HHT (40 ng/mL) + ATO (8.5 μ mol/L) 分别作用 6、12、24 h 后 AKT、p-AKT 表达。

4.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计处理软件分析数据,常规进行方差齐性检验、正态性检验,计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若方差具有齐性,多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐则

采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。流式检测细胞凋亡结果采用 Cellquest 1.2 分析软件分析。药物协同效应采用 Calcosyn 软件分析,联合指数 (CI) > 1 则药物具有拮抗作用,CI = 1 药物无协同亦无拮抗作用,CI < 1 药物具有协同作用。

结 果

1 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞株的生长抑制作用比较(表 1) HHT 及 ATO 对 RPMI 8226 细胞株具有生长抑制作用,两药均随着药物浓度增加而生长抑制作用增强($P < 0.05$),同时亦随着作用时间延长抑制率增加($P < 0.05$),故两药抑制 RPMI 8226 细胞增殖均呈时间及浓度依赖。联合用药组较相应单药组的生长抑制作用显著增加($P < 0.05$),且其抑制增殖作用随作用时间延长而增加($P < 0.05$),且两药作用具有协同作用(CI < 1)。

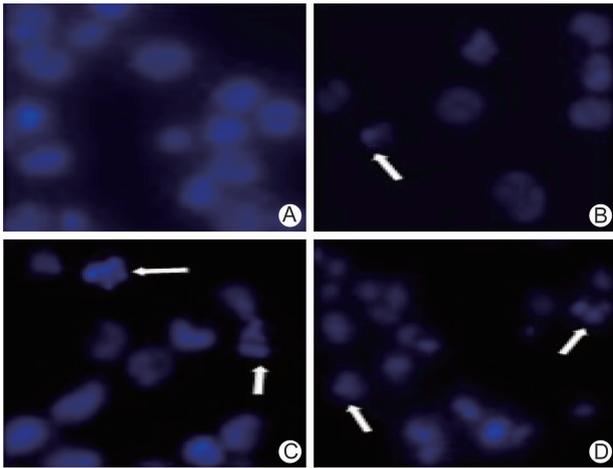
表 1 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞株的生长抑制作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	抑制率(%)	
		24 h	48 h
HHT	10 ng/mL	20.21 \pm 1.93 * Δ	36.54 \pm 2.47 * Δ Δ
	20 ng/mL	26.23 \pm 1.94 * Δ	44.72 \pm 3.61 * Δ Δ
	40 ng/mL	36.92 \pm 3.08 * Δ	58.61 \pm 3.87 * Δ Δ
	80 ng/mL	53.11 \pm 2.09 * Δ	73.42 \pm 3.09 * Δ Δ
ATO	1 μ mol/L	7.71 \pm 1.52 * Δ	17.51 \pm 1.09 * Δ Δ
	2 μ mol/L	13.02 \pm 1.38 * Δ	26.50 \pm 1.78 * Δ Δ
	4 μ mol/L	18.55 \pm 1.86 * Δ	33.81 \pm 2.87 * Δ Δ
	8 μ mol/L	36.21 \pm 2.58 * Δ	44.76 \pm 3.89 * Δ Δ
HHT + ATO	10 ng/mL + 1 μ mol/L	32.59 \pm 1.23 *	39.81 \pm 1.43 * Δ
	20 ng/mL + 2 μ mol/L	50.05 \pm 2.07 *	53.65 \pm 2.04 * Δ
	40 ng/mL + 4 μ mol/L	59.21 \pm 2.67 *	68.88 \pm 2.56 * Δ
对照	0	0	0

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 HHT + ATO 组比较, $\Delta P < 0.05$;与本组同浓度 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$

2 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞凋亡形态学变化比较(图 1) 经 HHT、ATO 单药及联合用药组分别作用于 RPMI 8226 细胞株 24 h 后,可见明显凋亡细胞形态特征,即细胞核浓集及凋亡小体出现,且联合用药组凋亡细胞较 HHT、ATO 单药组多。

3 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞早期凋亡率影响比较(表 2,图 2) HHT、ATO 单药及两药联用均可诱导 RPMI 8226 细胞凋亡,其中 HHT、ATO 单药作用后早期凋亡率均随着药物浓度增加而增加($P < 0.05$),且两药联用组与 HHT、ATO 单药组比较,诱导早期凋亡作用显著增强($P < 0.05$)。

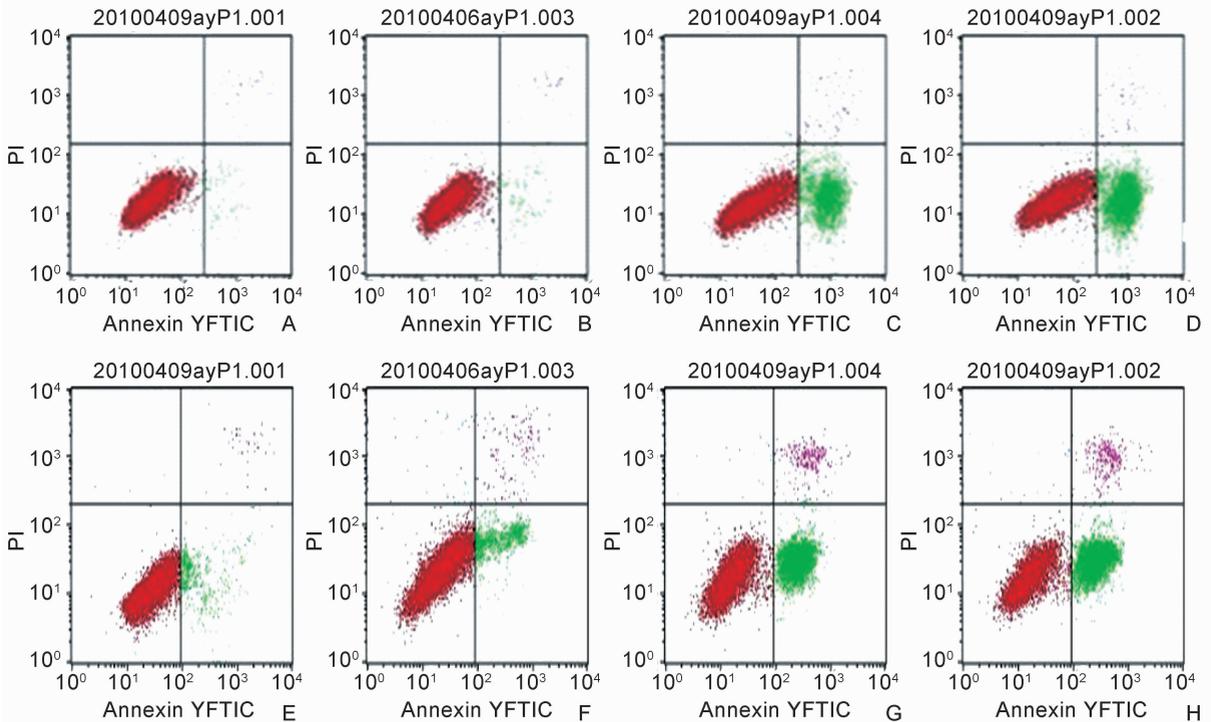


注: A 为对照组; B 为 HHT (40 ng/mL) 组; C 为 ATO (8.5 μmol/L) 组; D 为 HHT(40 ng/mL) + ATO (8.5 μmol/L) 组

图 1 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞凋亡形态学变化的影响(Hoechst 染色, ×100)

4 HHT 单药及联合 ATO 对 RPMI 8226 细胞诱导相关蛋白的影响

4.1 不同浓度 HHT 对 RPMI 8226 细胞 Caspase-3、PARP 蛋白表达的影响(图 3) 经不同浓度 HHT 处理 RPMI 8226 细胞 24 h 后, 激活 Caspase-3、PARP 表达, 而且激活 PARP 随着药物浓度的增加而表达上升, 而总 Caspase-3 变化不明显,



注: A 为对照 1 组; B 为 HHT (20 ng/mL) 组; C 为 ATO (2 μmol/L) 组; D 为 HHT (20 ng/mL) + ATO (2 μmol/L) 组; E 为对照 2 组; F 为 HHT (40 ng/mL) 组; G 为 ATO (4 μmol/L) 组; H 为 HHT (40 ng/mL) + ATO (4 μmol/L) 组

图 2 HHT、ATO 单药及联合用药组对 RPMI 8226 细胞早期凋亡图

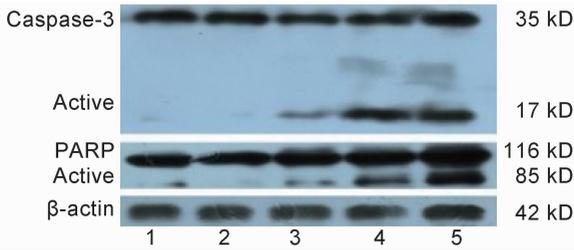
表 2 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞早期凋亡率影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	凋亡率 (%)
HHT	20 ng/mL	15.1 ± 1.4 * [△]
	40 ng/mL	25.7 ± 2.0 * [△]
ATO	2 μmol/L	3.0 ± 1.5 * [△]
	4 μmol/L	8.1 ± 2.7 * [△]
HHT + ATO	20 ng/mL + 2 μmol/L	23.6 ± 2.7 *
	40 ng/mL + 4 μmol/L	33.3 ± 2.6 *
对照	0	2.32 ± 1.2

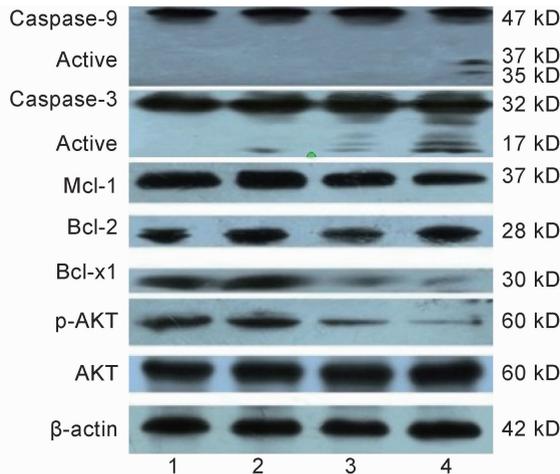
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 HHT + ATO 组同浓度比较, [△] $P < 0.05$

提示 HHT 可通过 Caspase 依赖途径诱导 RPMI 8226 细胞株凋亡。

4.2 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞凋亡相关蛋白表达影响(图 4) HHT、ATO 单药对 Caspase-3、9 的表达影响不明显, 两药联合可显著激活 Caspase-3、9; Bcl-2 家族中 Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xl 均为抗凋亡蛋白, 单药作用时 ATO 可显著下调 Bcl-xl 表达, 而联合用药时则 Mcl-1 及 Bcl-xl 的表达显著下降, 而 Bcl-2 的表达不受药物的影响; ATO 可显著下调 p-AKT 水平, 且联合 HHT 后该作用增强, 而两药对总 AKT 水平无明显影响。因此, HHT 联合 ATO 诱导 RPMI 8226 细胞凋亡可能和激活 Caspase 途径、下调 Mcl-1 及 Bcl-xl 表达、降低 AKT 的磷酸化有关。



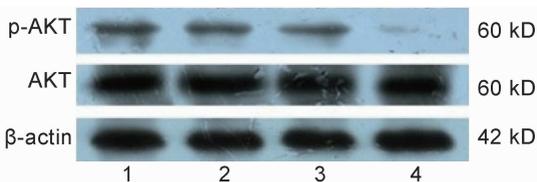
注:1~5 为 HHT (0、10、20、40、80 ng/mL) 组
图 3 不同浓度 HHT 作用于 RPMI 8226 细胞
 Caspase-3、PARP 蛋白表达电泳图



注:1 为对照组;2 为 HHT (40 ng/mL) 组;3 为 ATO (8.5 μmol/L) 组;4 为 HHT (40 ng/mL) + ATO (8.5 μmol/L) 组
图 4 HHT、ATO 单药及联合用药对 RPMI 8226 细胞凋亡相关蛋白表达电泳图

4.3 HHT 联合 ATO 对 RPMI 8226 细胞 AKT 蛋白表达的影响 (图 5)

HHT + ATO 联合用药作用于 RPMI 8226 细胞 6、12、24 h 后,随着药物作用时间的延长,p-AKT 蛋白的表达明显下降;而 AKT 表达没有变化,提示两药联合可明显抑制 p-AKT 蛋白的表达,且在 24 h 内呈时间依赖性。



注:1~4 分别为 HHT(40 ng/mL) + ATO(8.5 μmol/L) 组 0、6、12、24 h

图 5 HHT + ATO 联合用药对 RPMI 8226 细胞 AKT 的蛋白表达电泳图

讨 论

MM 是源于终末分化的 B 淋巴细胞的恶性肿瘤,

以骨髓中大量的浆细胞克隆增生为显著特征^[5]。尽管临床上应用了大量的烷化剂、蛋白酶体抑制剂和干细胞移植等治疗可以延长无病生存期和总生存期,但患者最终疾病复发,原发或获得性耐药是其中的主要原因,故克服骨髓瘤细胞的耐药和开发低毒、高效的药物是 MM 治疗研究的重要方向。

HHT 系从我国三尖杉属植物粗榧的树皮中提取的生物碱,国内首先将其用于白血病的治疗^[6]。为了克服肿瘤耐药问题,联合用药作用于多个特异性靶点是近来主要解决方案,目前成功的例子是 ATO 联合维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病能显著降低微小残留瘤、减少复发^[7]。ATO 在体外能抑制骨髓瘤细胞的增殖,诱导骨髓瘤细胞的凋亡^[8],因此我们研究体外 HHT 联合 ATO 对 MM 的抗肿瘤作用及分子机制。本研究显示 HHT 单药或联合 ATO 可抑制 RPMI 8226 细胞的增殖,其机制与诱导 RPMI 8226 细胞凋亡有关。

细胞凋亡可分为 Caspase 依赖的和非 Caspase 依赖的凋亡,其中 Caspase 依赖的凋亡占据了主要位置,Caspase 家族是细胞凋亡过程中的关键元件,它的激活与超常表达均引起细胞凋亡,因此称死亡蛋白酶,它们通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡,包括死亡受体途径、线粒体途径、内质网途径最终激活 Caspase 致细胞凋亡^[9]。PARP 是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶。主要存在于细胞核内,少量存在于细胞浆内它具有保持染色体结构完整、参与复制和转录 DNA 的功能,在维持基因组稳定和细胞死亡过程中发挥重要作用,其由半胱氨酸蛋白酶激活的分子事件,是细胞凋亡的一个早期分子标志^[10-11]。本研究发现 HHT、ATO 及两药联合均可诱导 RPMI 8226 细胞株凋亡,其机制主要和激活 Caspase 途径有关,且两药在抑制 RPMI 8226 细胞增殖及诱导凋亡方面具有协同作用。

AKT 信号通路可通过影响其下游多种效应分子的活化状态进而调节细胞的增殖和分化及蛋白质的合成与存活^[12]。本研究发现,与空白对照组相比,两药联合组 p-AKT 表达明显下降,并且两药联合在 24 h 内 p-AKT 下调呈时间依赖。因此 HHT 联合 ATO 可能通过下调 P13K/AKT 通路的活性,从而控制 RPMI 8226 细胞的增殖,促进其凋亡。

Bcl-2 家族有众多成员,其中如 Bcl-2、Mcl-1、Bcl-x1 有抗凋亡作用,Bax、Bak、Bad、Bim 等有促凋亡的作用^[13-14]。有研究表明 Bcl-x1、Mcl-1 与骨髓瘤细胞的存活密切相关^[15-16],本研究以 HHT、ATO 及

两者联合后作用于 RPMI 8226 细胞后可见 Bcl-xl、Mcl-1 联合用药组明显下调,而对 Bcl-2 的表达无明显影响,由此推测 HHT 联合 ATO 可能通过调节 Bcl-2 家族蛋白的表达进而促进细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] Lou YJ, Qian WB, Jin J. Homoharringtonine induces apoptosis and growth arrest in human myeloma cell [J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48 (7): 1400 - 1406.
- [2] Chen SJ, Zhou GB, Zhang XW, et al. From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117 (24): 6425 - 6437.
- [3] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2505 - 2515.
- [4] Meng HT, Li L, Liu H, et al. Homoharringtonine acts synergistically with SG235-TRAIL, a conditionally replicating adenovirus, in human leukemia cell lines [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30 (11): 1529 - 1536.
- [5] Dolloff NG, Talamo G. Targeted therapy of multiple myeloma [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 779: 197 - 221.
- [6] Zhou DC, Zittoun R, Marie JP. Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy [J]. *Bull Cancer*, 1995, 82 (12): 987 - 995.
- [7] Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, et al. All-transretinoic acid/ATO combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5328 - 5335.
- [8] 俞庆宏,战榕,黄豪博.三氧化二砷对骨髓瘤细胞系 U266 抑制增殖及诱导凋亡的机制研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(5): 982 - 985.
- [9] 刘善浩,张岱云,汪兴洪. Caspase-3 蛋白在多发骨髓瘤中的表达及临床意义 [J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3(5): 30 - 31.
- [10] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495 - 516.
- [11] He J, Whitacre CM, Xue LY, et al. Protease activation and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(5): 940 - 946.
- [12] Ronald W, Matheny JR, Martin LA. Current perspectives on Akt activation and actions [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234(11): 1264 - 1270.
- [13] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (4): 1126 - 1132.
- [14] Sanket J, Antony WB, Phillip JR, et al. Dynamin inhibitors induce Caspase-mediated apoptosis following cytokinesis failure in human cancer cells and this is blocked by Bcl-2 over-expression [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 78.
- [15] Gomez-Bougie P, Oliver L, Le Gouill S, et al. Melphalan induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (54): 8076 - 8079.
- [16] Wuilleme-Toumi S, Robillard N, Gomez P, et al. Mcl-1 is over-expressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival [J]. *Leukemia*, 2005, 19(7): 1248 - 1252.

(收稿:2012-05-14 修回:2013-04-07)