

溶瘤腺病毒 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 对骨髓瘤细胞的生长抑制效应

肖睿娟, 张越峰, 潘素晶, 王毅刚

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究, 杭州 310018)

摘要: 研究利用携带 Mn-SOD 的溶瘤腺病毒 Ad-E1A- Δ E1B55Kd-Mn-SOD (ZD55-Mn-SOD)联合小分子化合物雷公藤内酯醇(Triptolide, TPL)对骨髓瘤细胞株 RPMI8226、U266 生长的体外抑制效应,希望找到解决化疗药物在临床使用中所出现的疗效低及毒副作用大的方法。采用 CCK-8 比色分析方法表明 100 MOI ZD55-Mn-SOD 与 TPL(2 ng/mL、4 ng/mL)联合处理后,RPMI 8226 及 U266 的细胞存活率均显著低于单用 ZD55-Mn-SOD 或 TPL ($P<0.05$);用结晶紫染色法定性分析了 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 对两种骨髓瘤细胞的杀伤作用;最后 Hoechst33342 染色法观察细胞凋亡也显示联合应用 ZD55-Mn-SOD 与 TPL 处理组的细胞凋亡现象比二者单独使用均要显著。本研究初步证实 ZD55-Mn-SOD 与 TPL 联合具有协同作用,能有效地在体外抑制骨髓瘤细胞 RPMI 8226 和 U 266 的生长。

关键词: ZD55-Mn-SOD; TPL; 骨髓瘤细胞; 抑制效应

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A

0 引言

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种起源于 B 淋巴细胞的浆细胞异常增生的恶性肿瘤,由于病程中出现的免疫抑制、贫血、肾功能衰竭等常引起很高的死亡率^[1]。MM 发病率较高,易复发,目前仍是不可治愈的疾病。化疗和蛋白酶体抑制剂等小分子物质是治疗骨髓瘤的主要方法。雷公藤内酯醇(Triptolide, TPL)是从中药雷公藤中提取的小分子化合物,近年来研究发现 TPL 具有广谱抗肿瘤作用,是新一代的抗肿瘤药物。TPL 药理作用广泛,抗癌活性明显,但其毒副作用也较大。有研究发现 TPL 的有效剂量与中毒剂量的范围相对较窄,治疗指数相对偏低,这一缺陷限制了其体内抗肿瘤效果的发挥^[2]。

锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)是存在于需氧细胞线粒体中的一种抗氧化酶,能清除自由基,维持细胞内的氧化还原平衡。许多研究已证明 Mn-SOD

是一种具有肿瘤抑制活性的抗氧化剂,将其 DNA 转染进入肺癌、胰腺癌等诸多细胞均有明显的抑制肿瘤生长作用^[3-4]。

经改造的溶瘤腺病毒载体 ZD55 (Ad-E1A- Δ E1B55Kd)由于缺少了在正常细胞和组织中复制必需的基因,因此具有能特异性地在肿瘤细胞中复制,在正常细胞中不能复制的特点,从而杀死肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性。利用刘新垣院士提出的靶向基因-病毒疗法^[5-6]再将抗癌基因插入到腺病毒载体 ZD55-gene 系统后构建成的溶瘤腺病毒能更显著增加肿瘤抑制能力,从而为癌症治疗带来希望,本研究用 ZD55-Mn-SOD 即是其中一例。

然而目前这种靶向基因-病毒治疗还只是肿瘤常规疗法的辅助手段,近期研究发现其与某些药物的抗肿瘤机制截然不同,二者在某些方面还存在互补性,联合应用可有助于肿瘤治疗。本研究即是基于此点,将溶瘤腺病毒 ZD55-Mn-SOD 与 TPL 联合作用于骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 及 U266,以期达

收稿日期: 2011-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800093);浙江省自然科学基金资助项目(Y2090935);浙江理工大学科研启动基金(1016845-Y, 1016834-Y)

作者简介: 肖睿娟(1988-),女,河南周口人,硕士研究生,主要从事肿瘤的靶向基因-病毒治疗的研究。

通讯作者: 王毅刚,电子邮箱:wangyigang43@163.com

到更显著抑制肿瘤细胞生长的目的,为靶向基因-病毒联合药物治疗的新策略提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂

腺病毒 ZD55-Mn-SOD 由本实验室构建并完成。TPL 购自 Sigma 公司。细胞培养用 RPMI 1640 粉及胎牛血清(FBS),为美国 Gibco 公司产品。CCK-8 为碧云天公司产品。双蒸水自制,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 人骨髓瘤细胞株及培养条件

人骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 及 U266 均购自中科院上海细胞库。细胞培养在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中,在 37℃,5%CO₂ 条件下恒温培养,每 2~3 d 传代 1 次。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测各处理组对细胞杀伤能力

分别取对数生长期的两种骨髓瘤细胞,新鲜培养液洗涤后重悬于含体积分数 5%FBS 的 RPMI 1640 培养液中,调整浓度至 1×10⁵ 个/mL,以每孔 0.1 mL 细胞悬液接种于 96 孔板中,加入不同浓度梯度的 TPL、ZD55-Mn-SOD 及二者联合处理组,对照组(加细胞不加药物处理)和调零组(只加培养液)以无血清 RPMI 1640 补足,分别处理 24、48、72、96 h 后,每孔加入 CCK-8 10 μL,继续培养 90 min 后用酶联检测仪测定 450 nm 处光吸收值,按公式计算细胞存活率:

细胞存活率=(药物孔 A 值-调零孔 A 值)/(对照孔 A 值-调零孔 A 值)×100%

1.2.2 结晶紫染色

取对数生长期的两种骨髓瘤细胞,新鲜培养液洗涤后重悬于含体积分数 5%FBS 的 RPMI 1640 培养液中,调整浓度至 2×10⁵ 个/mL,每孔 0.5 mL 细胞悬液接种于 24 孔板中,以不同浓度梯度的 ZD55-Mn-SOD 和 TPL 单独及联合处理细胞。37℃,5%CO₂ 恒温培养箱培养,96 h 之后,吸去培养液,每孔加入 0.3 mL 结晶紫染色液(2%结晶紫于 20%甲醇溶液)染色 20 min,在净水中将多余的染色液轻轻洗净,烘干,拍照,染色程度与细胞活性呈正比。

1.2.3 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

取对数生长期的两种骨髓瘤细胞,新鲜培养液洗涤后重悬于含体积分数 5%FBS 的 RPMI 1640 培养液中,调整浓度至 2×10⁵ 个/mL,每孔 2mL 细胞悬液

接种于 6 孔板中,以 100MOI 的病毒、2 ng/mL 的 TPL 以及 100MOI 的病毒、4 ng/mL 的 TPL 单独及联合处理细胞,37℃,5%CO₂ 条件下培养 48 h 后,加入 1 mg/mL 的 Hoechst33342 染料 5 μL 至每个孔中,37℃染色 30 min 后,荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.3 统计学分析

数据分析使用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析,同时利用 Excel 2003 进行分析作图,数据结果用“平均数±标准差”表示。结果采用 *t* 检验,*P*<0.05 表示差异显著,*P*<0.01 表示差异性极显著。

2 结果

2.1 TPL 单独使用对骨髓瘤细胞株增殖的影响

通过 CCK-8 法检测不同浓度 TPL 对骨髓瘤细胞的抑制作用,结果如图 1 所示,TPL 对骨髓瘤细胞株的抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性,8 ng/mL TPL 作用 96 h 后 RPMI 8226 和 U266 的细胞存活率分别为(51.98±0.78)%和(44.83±0.27)%,TPL 对 U 266 的敏感性略高于 RPMI 8226。

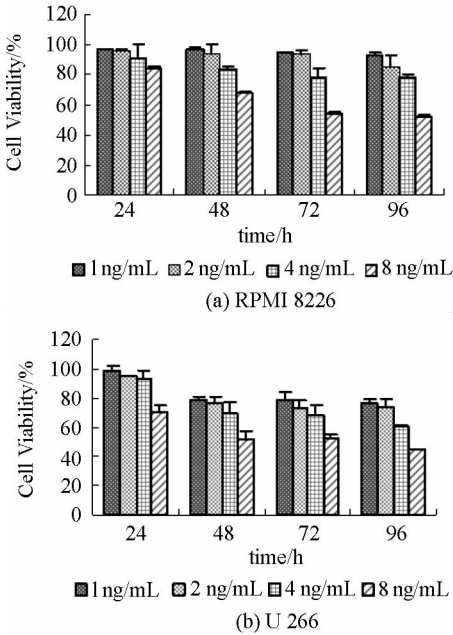


图 1 TPL 单独使用对骨髓细胞株增殖的影响

2.2 溶瘤腺病毒 ZD55-Mn-SOD 对骨髓瘤细胞株增殖的影响

以不同 MOI 的溶瘤腺病毒 ZD55-Mn-SOD 分别感染细胞,不同时间后检测其对骨髓瘤细胞株存活率的影响,结果如图 2 所示。ZD55-Mn-SOD 对骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 与 U266 的抑制作用存在剂量依赖性与时间依赖性,400 MOI 病毒作用 96 h 后细胞存活率分别为(42.98±9.3)%、(42.30

±7.05)%,说明 ZD55-Mn-SOD 对骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 与 U266 有较强的杀伤作用。

2.3 TPL 与 ZD55-Mn-SOD 联合使用对骨髓瘤细胞株增殖的影响

为确定 ZD55-Mn-SOD 与 TPL 联合对骨髓瘤细胞有无协同诱导作用,以 100MOI 和 200MOI 的 ZD55-Mn-SOD 病毒分别与 2 ng/mL、4 ng/mL TPL 单独及联合作用两株骨髓瘤细胞,不同时间后检测其对骨髓瘤细胞增殖的影响。结果如表 1 和表 2 所示。表 1、表 2 可见,200MOI ZD55-Mn-SOD 与 TPL 联合使用并不比单独的腺病毒组效果好,二者不表现协同作用;而 100MOI ZD55-Mn-SOD 与 2 ng/mL 和 4 ng/mL TPL 联合使用 96 h 后细胞存活率分别为 RPMI 8226 的(57.17±1.65)%、(45.72±4.17)%和 U 266 的(42.29±5.78)%、(36.87±0.16)%,显著低于单用 100MOI 病毒组的(61.98±5.28)%、(75.38±0.45)%($P<0.05$),以及 2 ng/mL TPL 组的(86.08±6.82)%、(73.55±5.76)%($P<0.01$),和 4 ng/mL TPL 组的(77.97±2.19)%、(60.25±1.74)%($P<0.05$),甚至低于 U 266 单独使用 400MOI 病毒时的(42.30±7.05)%,说明二者存在协同作用,且效果显著。

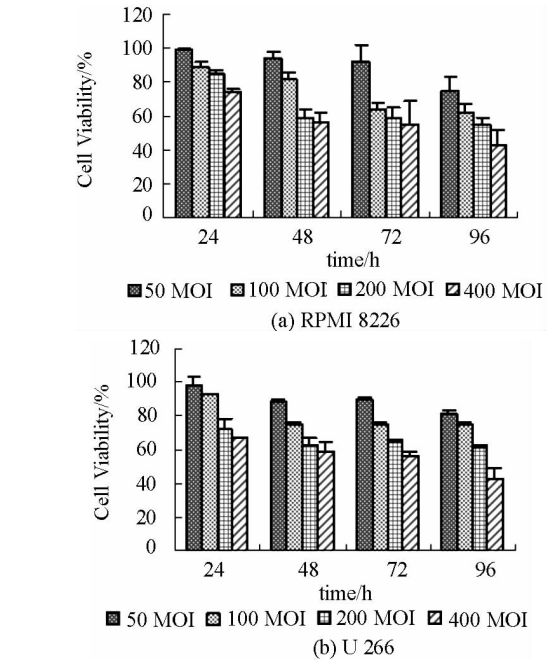


图2 ZD55-Mn-SOD单独使用对骨髓瘤细胞株增殖的影响

表1 TPL 与 ZD55-Mn-SOD 联合使用对 RPMI 8226 增殖的影响

处理组	不同时间细胞存活率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
ZD55-Mn-SOD 100MOI	88.73±3.43	82.00±3.82	64.49±3.10	61.98±5.28
ZD55-Mn-SOD 200MOI	85.09±1.71	59.17±4.88	59.44±5.69	55.46±3.78
TPL 2 ng/mL	95.66±1.84	94.33±5.52	93.95±1.75	86.08±6.82
TPL 4 ng/mL	91.04±8.84	83.66±1.77	78.46±5.73	7.97±2.19
ZD55-Mn-SOD 100MOI+TPL 2	88.32±5.51	76.73±3.57	59.70±1.99	57.17±1.65
ZD55-Mn-SOD 200MOI+TPL 2	93.22±1.07	65.78±8.67	59.30±3.31	67.80±1.42
ZD55-Mn-SOD 100MOI+TPL 4	85.93±3.20	67.87±2.65	55.24±3.06*	45.72±4.17**
ZD55-Mn-SOD 200MOI+TPL 4	79.27±2.31	60.30±1.53	54.53±0.06	60.23±5.82

注: * $P<0.05$, ZD55-Mn-SOD+TPL vs ZD55-Mn-SOD(100 MOI) or TPL(4 ng/mL)
** $P<0.01$, ZD55-Mn-SOD+TPL vs ZD55-Mn-SOD(100 MOI) or TPL(2 ng/mL or 4 ng/mL)

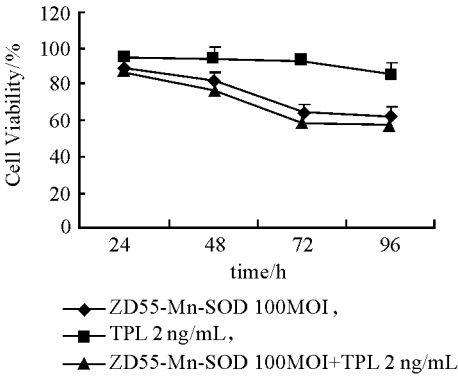
表2 TPL 与 ZD55-Mn-SOD 联合使用对 U266 增殖的影响

处理组	不同时间细胞存活率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
ZD55-Mn-SOD 100MOI	92.43±0.41	75.15±0.99	75.55±0.61	75.38±0.45
ZD55-Mn-SOD 200MOI	72.15±5.92	62.43±4.52	55.10±0.12	51.93±0.36
TPL 2 ng/mL	94.79±1.05	76.20±4.62	72.84±5.31	73.55±5.76
TPL 4 ng/mL	93.40±4.81	70.02±7.58	68.48±6.70	60.25±1.74
ZD55-Mn-SOD 100MOI+TPL 2	81.77±4.08	58.49±1.58	53.90±1.82*	42.29±5.78**
ZD55-Mn-SOD 200MOI+TPL 2	83.47±1.41	64.48±3.88	60.33±0.42	57.44±6.15
ZD55-Mn-SOD 100MOI+TPL 4	79.38±4.65	57.59±5.07	49.15±0.73*	36.87±0.16**
ZD55-Mn-SOD 200MOI+TPL 4	75.30±5.63	61.20±6.89	59.52±1.35	56.15±2.80

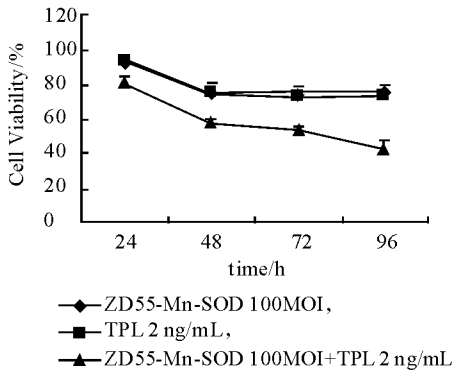
注: * $P<0.05$, ZD55-Mn-SOD+TPL vs ZD55-Mn-SOD(100 MOI) or TPL(4 ng/mL)
** $P<0.01$, ZD55-Mn-SOD+TPL vs ZD55-Mn-SOD(100 MOI) or TPL(2 ng/mL or 4 ng/mL)

2.4 ZD55-Mn-SOD 与 TPL 的协同诱导作用对骨髓瘤细胞株增殖的影响

为了检测溶瘤腺病毒 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 对骨髓瘤细胞生长状态的影响,检测 100MOI 病毒分别与 2 ng/mL、4 ng/mL TPL 单独和联合作用于骨髓瘤细胞不同时间后细胞增殖能力的改变。结果如图 3 和图 4 所示。图 3、图 4 可见,加入病毒和药物 96 h 后,联合治疗组的细胞存活率均低于单病毒组和单药物组,说明病毒联 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 治疗骨髓瘤细胞达到了效果。

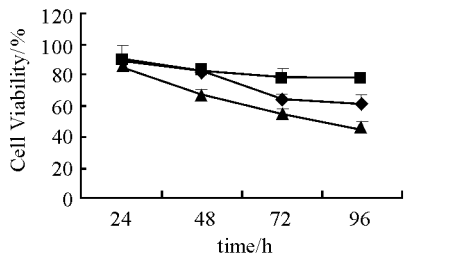


(a) RPMI 8226

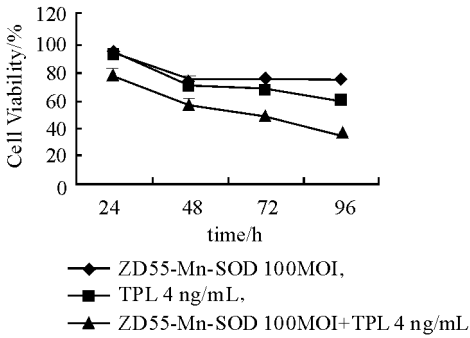


(b) U266

图 3 100MOI ZD55-Mn-SOD 与 2 ng/mL TPL 联合使用对骨髓瘤细胞增殖的影响



(a) RPMI 8226



(b) U266

图 4 100MOI ZD55-Mn-SOD 与 4 ng/mL TPL

联合使用对骨髓瘤细胞增殖的影响

2.5 结晶紫染色观察 ZD55-Mn-SOD 与 TPL 联合使用对两种骨髓瘤细胞的杀伤效率

为了更直观地观察比较 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 使用时对骨髓瘤细胞的杀伤效果,用结晶紫染色观察不同处理组细胞增殖能力的改变。结果如图 5 所示。图 5 可见,单独的病毒或 TPL 对骨髓瘤细胞的抑制作用存在剂量依赖性,而用 100MOI 的病毒分别与 2 ng/mL 和 4 ng/mL 的 TPL 联合使用对两种骨髓瘤细胞的杀伤能力均高于单独的病毒和药处理孔,甚至高于单病毒 400MOI 孔及单药物 8 ng/mL 孔,进一步证明病毒与药联合能更好的抑制肿瘤生长。

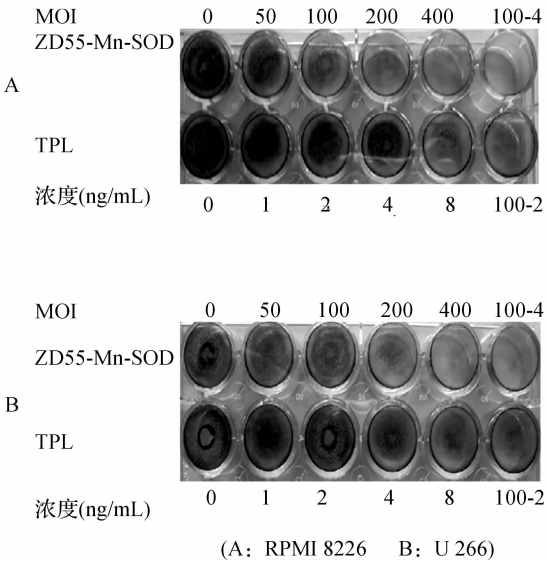


图 5 结晶紫染色观察不同处理组对两种骨髓瘤细胞的杀伤作用

2.6 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

为进一步检测病毒及药物处理细胞后细胞核的形态学变化以及凋亡情况,用 Hoechst33342 染色法在荧光显微镜下观察各处理组的细胞形态变化。

由于发生凋亡的细胞其细胞核染色质会发生明显凝集、固缩,并伴有核碎裂及凋亡小体出现,荧光显微镜下观察呈现染色质浓缩及核片段化等现象。Hoechst33342染色后呈现明显的亮蓝色,结果如图6所示,PBS处理的对照组细胞基本上没有细胞凋亡;单独 TPL 或 ZD55-Mn-SOD 处理组中只有很少细胞发生凋亡;而 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 处理组中细胞凋亡最明显,数量最多,说明病毒与药物联合能有效诱导骨髓瘤细胞发生凋亡,效果很显著。

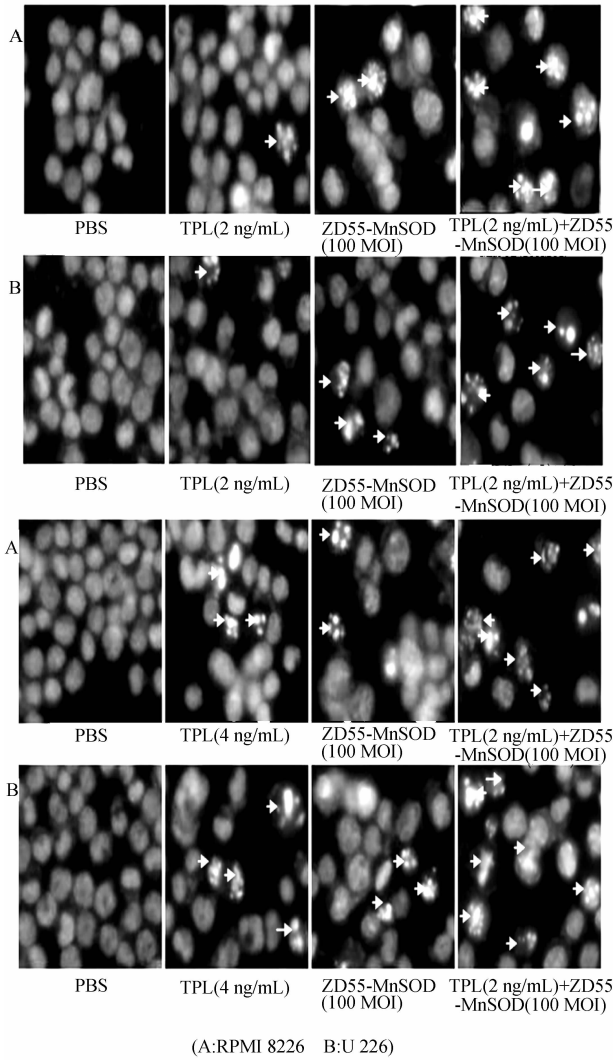


图6 Hoechst33342染色观察细胞凋亡

3 讨论

目前对 MM 最常规的治疗方法依然是传统的放化疗,但由于 MM 临床及并发症多种多样,患者对药物的敏感性差异很大,患者多产生耐受,副作用也大,因此利用传统方法治疗 MM 面临很大的困难。近年来随着对 MM 发病机制的深入研究,人们开始尝试一些新药和新的策略,以期在提高 MM 疗

效的同时最大程度地减少对正常细胞的损害。靶向基因-病毒疗法即是一种理想的治疗模式,溶瘤腺病毒作为一种能治疗肿瘤的可增殖病毒具有诸多优点而被广泛应用^[7-8]。然而对于造血系统的恶性肿瘤,溶瘤腺病毒的应用相对较少,原因在于这类肿瘤细胞表面缺少柯萨奇腺病毒受体(CAR)和 α_v 整合素,导致这些细胞对腺病毒的侵染不敏感而产生抗性^[9-10],因为 CAR 和 α_v 整合素是细胞表面的初级腺病毒受体,它们数量的多少代表着腺病毒对此种细胞的感染能力,是决定腺病毒感染效率的关键^[11-12]。故本研究中 ZD55-Mn-SOD 对两株骨髓瘤细胞的感染能力相对实体瘤要弱许多,要达到既定效果就需加大病毒感染复数,而由于腺病毒本身会对细胞产生一定的伤害,太高的病毒感染复数也增加了治疗的风险。TPL 作为一种新型的抗肿瘤药物,也因其中毒剂量与有效剂量相对较窄而限制了其应用。近年来一些新型的病毒联合药物相继被研发并逐渐向临床过渡,为解决单独使用药物或病毒治疗肿瘤疗效低、副作用大的难题提供了新的研究方向。本研究将二者联合应用,结果显示,既能降低各自的剂量又能达到较好的抗肿瘤效果,证明低剂量下二者具有一定的协同作用。本实验初步确定了二者联合使用时起协同作用的有效剂量为病毒 100MOI 联合 TPL 2 ng/mL 或 4 ng/mL。超过此剂量则无表现协同作用,可能原因是高剂量的 TPL 会影响病毒的复制,而病毒剂量过大也会干扰药物发挥作用的某些机制,推测在低剂量下二者仍可具有一定的协同作用。然而 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 使用达到最佳协同作用的合适剂量及具体机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Schwartz R N, Vozniak M. Current and emerging treatments for multiple myeloma[J]. J Manag Care Pharm, 2008, 14(7): 12-18.

[2] 王恒邦, 许建华, 温彩霞, 等. 雷公藤内酯醇体内外抗肿瘤作用[J]. 福建医科大学学报, 2007, 41(4): 304-307.

[3] Kinnula V L, Crapo J D. Superoxide dismutase in the lung and human lung diseases [J]. Am J Rispir Crit Care Med, 2001, 67(12): 1600-1609.

[4] Hur G C, Cho S J, Kim C H, et al. Manganese superoxide dismutase expression correlates with chemosensitivity in human gastric cancer cell lines [J]. Clin Cancer Res, 2003, 15(4): 5768-5775.

[5] Liu X Y. A new anticancer strategy—Gene-Virotherapy

Therapy of cancer[J]. Chinese J Cancer Biother, 2001, 8(1): 1.

[6] Zhang Z L, Zou W G, Luo C X, et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy[J]. Cell Res , 2003, 13(6): 481-489.

[7] Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, et al. Toxicity evaluation of replication- competent herpes simplex virus(ICP 34. 5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma [J]. Gene Ther, 2000, 7(10): 859-866.

[8] Markert J M, Medlock M D, Rabkin S D, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial[J]. Gene Ther, 2000, 7(10): 867-874.

[9] Mentel R, Dopping G, Wegner U, et al. Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes[J]. J Med Virol, 1997, 51(3): 252-257.

[10] Rebel V I, Hartnett S, Denham J, et al. Maturation and lineage-specific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells[J]. Stem cells, 2000, 18(3): 176-182.

[11] Douglas J T, Kim M, Sumerel L A, et al. Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors[J]. Cancer Res , 2001, 61(3): 813-817.

[12] Wickham T J, Mathias P, Cheresch D A, et al. Interins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment[J]. Cell, 1993, 73(2): 309-319.

The Growth Inhibiting Effect to Multiple Myeloma Cells by Oncolytic Adenovirus ZD55-Mn-SOD Combined with TPL

XIAO Rui-juan , ZHANG Yue-feng , PAN Su-jing , WANG Yi-gang
(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Zhejiang Sci-Tech University,
Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this study, the growth inhibiting effect to multiple myeloma(MM) cell lines RPMI 8226 and U 266 is investigated by combined utilization oncolytic adenovirus Ad. E1A- Δ E1B55Kd-Mn-SOD (ZD55-Mn-SOD) with small molecular compounds Triptolide(TPL) in vitro, in order to find a solution to the clinical use of chemotherapeutic drugs with low efficacy and high toxicity. The results show that when treated with 100 MOI ZD55-Mn-SOD and TPL (2 ng/mL, 4 ng/mL), the cell viability of RPMI 8226 and U 266 is markedly lower than either single treatment with ZD55-Mn-SOD and TPL by CCK-8 kit ($P<0.05$); Crystal Violet staining qualitative assay demonstrates that the growth inhibition of two MM cell lines treated with the combination ZD55-Mn-SOD and TPL; Hoechst 33342 staining method also confirms that the apoptosis of two MM cell lines treated with ZD55-Mn-SOD and TPL is stronger than either single treatment. Lastly, the study primarily comfirms that combining utilize ZD55-Mn-SOD and TPL has synergistic reaction, which can inhibit the growth of MM cell lines RPMI 8226 and U 266 efficiently in vitro.

Key words: ZD55-Mn-SOD; TPL; multiple myeloma cell lines; growth inhibiting effect
(责任编辑: 许惠儿)