

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.17.007

精氨酸缺乏对硼替佐米治疗多发性骨髓瘤的作用研究 *

夏文¹ 薛丽¹ 徐文龙¹ 王凯² 梁红艳^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院检验科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨精氨酸缺乏对硼替佐米(Bortezomib, BTZ) 治疗多发性骨髓瘤细胞的影响。**方法:**通过 CCK8 筛选 BTZ 对骨髓瘤细胞株(H929 和 RPMI 8226)治疗的最适药物浓度,比较在缺乏和富含精氨酸的两种培养基中的细胞增殖情况;通过使用 PI 染料标记细胞检测不同试验组细胞周期的分布,以及使用 Annexin V/7AAD 凋亡试剂盒检测 BTZ 对不同试验组细胞凋亡的影响。**结果:**BTZ 降低了骨髓瘤细胞的存活率,并通过将细胞周期阻滞于 G2/M、S 期,抑制骨髓瘤细胞的增殖。缺乏精氨酸使细胞周期阻滞于 S 期,也抑制了骨髓瘤细胞的增殖。BTZ 作用于缺乏精氨酸组的骨髓瘤细胞后,细胞凋亡百分比明显低于富含精氨酸组(H929 细胞由约 40%降至 13.6%,RPMI8226 凋亡百分比分别 7.13%和 19.27%)。**结论:**缺乏精氨酸和给予 BTZ 均阻滞细胞周期,抑制骨髓瘤细胞增殖;同时缺乏精氨酸降低了 BTZ 诱导骨髓瘤细胞的凋亡作用。

关键词:多发性骨髓瘤;精氨酸;硼替佐米;增殖

中图分类号:R-33;R733.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)17-3232-05

Effect of Arginine Deficiency on Myeloma Cell Treated by Bortezomib*

XIA Wen¹, XUE Li¹, XU Wen-long¹, WANG Ka², LIANG Hong-yan^{1Δ}

(1 Department of Clinical Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Medical Imaging, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of arginine deficiency on multiple myeloma cells treated by bortezomib (BTZ).

Methods: In this study, CCK8 was used to screen the optimal drug concentration of BTZ in the treatment of myeloma cell lines (H929 and RPMI 8226). Cell proliferation was compared in the two media lacking and rich in arginine. PI dye-labeled cells were used to detect cell cycle distribution in different experimental groups, and Annexin V/7AAD apoptosis kit was used to detect the effect of BTZ on apoptosis in different experimental groups. **Results:** Bortezomib reduced the survival rate of myeloma cells and inhibited the proliferation of myeloma cells by blocking the cell cycle at G2/M and S phases. Lack of arginine blocked the cell cycle in the S phase and also inhibited the proliferation of myeloma cells. After BTZ was applied to the myeloma cells of group lacking the arginine, the percentage of apoptosis was significantly lower than that in the arginine-rich group (13.6% and 40% in H929, 7.13% and 19.27% in RPMI8226). **Conclusion:** BTZ and the deficiency of arginine can block cell cycle and inhibit the proliferation of myeloma cells, and the lack of arginine reduce the apoptosis of myeloma cells induced by BTZ.

Key words: Multiple myeloma; Arginine; Bortezomib; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R733.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)17-3232-05

前言

多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)是一种以浆细胞持续增殖为特征的恶性肿瘤^[1],由于恶性浆细胞浸润于骨髓,迅速增殖积累了大量受损或错误折叠蛋白质,因此对蛋白酶体的降解功能极为依赖^[2]。硼替佐米(Bortezomib, BTZ)是哺乳动物中 26S 蛋白酶体糜蛋白酶样活性的可逆抑制剂,常用于多发性骨髓瘤患者的治疗^[3]。通过干扰体内肿瘤细胞特定氨基酸代谢可显著影响肿瘤细胞的增殖和凋亡。作为体内的一种非必需氨基酸,精氨酸对多种肿瘤细胞的增殖活性有影响,但其机制并未

完全清晰^[4-7]。本研究通过在缺乏和富含精氨酸的条件下培养多发性骨髓瘤细胞,并给予 BTZ 治疗,检测细胞活性、细胞周期和凋亡的变化,探讨缺乏精氨酸对 BTZ 治疗多发性骨髓瘤的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

H929 和 RPMI8226 细胞株系本实验室保存。培养条件:含 10% 的灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基(Gibco),置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱培养,隔日半量换液,存活细胞

* 基金项目:哈尔滨医科大学附属第四医院优秀青年项目(HYDSYYXQN202005)

作者简介:夏文(1994-),硕士研究生,研究方向:临床分子诊断学,E-mail: xiawen2020155@163.com,电话:18845879087

Δ 通讯作者:梁红艳,博士,硕士生导师,主任医师,E-mail: aileenliang2005@163.com

(收稿日期:2021-02-23 接受日期:2021-03-18)

百分率(台盼蓝染色法)>95%用于实验。R-1780 培养液(给予补充 RPMI1640 培养基所缺乏的亮氨酸和赖氨酸,使其仅缺乏精氨酸)购于赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,RPMI1640 购于 Gibco 公司。PI 和细胞凋亡试剂盒购于 BD 有限公司。CCK8 试剂购于碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK8 法检测细胞生长活性 实验用 96 孔板,分别设置空白组、阴性对照组、不同浓度硼替佐米组,每组设 3 个复孔,每组每孔加入 90 μ L 细胞悬液,细胞密度为 5×10^4 个/mL,随后分别加入 PBS 液、RPMI1640 或 R1780 培养基、硼替佐米(5、10、20、40 nmol/L),各组总体积为 100 μ L,然后放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 0 h、24 h、48 h、72 h,取出相应的培养板,加入 CCK8 试剂 10 μ L,混匀后放入细胞培养箱。培养 1 h 后,取出培养板,用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(OD 值),测得的 OD 值表示细胞的相对活性,计算 IC₅₀。

1.2.2 流式细胞术检测骨髓瘤细胞的细胞周期 使用 12 孔板培养细胞。根据培养液分为 R1780 组和 RPMI1640 组试验组,培养细胞密度为 1×10^6 个/mL。依据 IC₅₀ 选择 BTZ 的作用浓度为 20 nmol/L。培养至 24 h 时,取出 12 孔板,离心去上清,用 PBS 液洗细胞两次,加入到流式细胞管中,固定,加入 RNA 酶,PI 染料避光静置 30 min,上机检测。

1.2.3 流式细胞术检测骨髓瘤细胞的细胞凋亡 使用 12 孔板培养细胞。根据培养液分为 R1780 组和 RPMI1640 组试验组,培养细胞密度为 1×10^6 个/mL。依据 IC₅₀ 选择 BTZ 的作用浓度为 20 nmol/L。两种细胞实验分组:R1780+BTZ 和 RPMI1640+BTZ。细胞培养至 24 h 时,取出 12 孔板,离心去上清,用 PBS 液洗细胞两次,加入到流式细胞管,分别加入 Annexin V 5 μ L 和 7AAD 10 μ L,充分混匀避光静置 15 min,上机检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 和 GraphPad Prism 7 软件进行统计学分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 BTZ 的最适药物浓度筛选

将细胞培养至对数生长期后,用 0(对照组)、5、10、20、40 nmol/L 的 BTZ 处理 H929、RPMI 8226 细胞 24 h,用 CCK8 检测两种骨髓瘤细胞的存活率,并且用 GraphPad Prism 7 分析计算 IC₅₀。选择稍低于 IC₅₀ 的浓度作为本实验的药物浓度,我们选择 20 nmol/L。由图 1 可以得出,增加 BTZ 的作用浓度,细胞存活率逐渐降低。

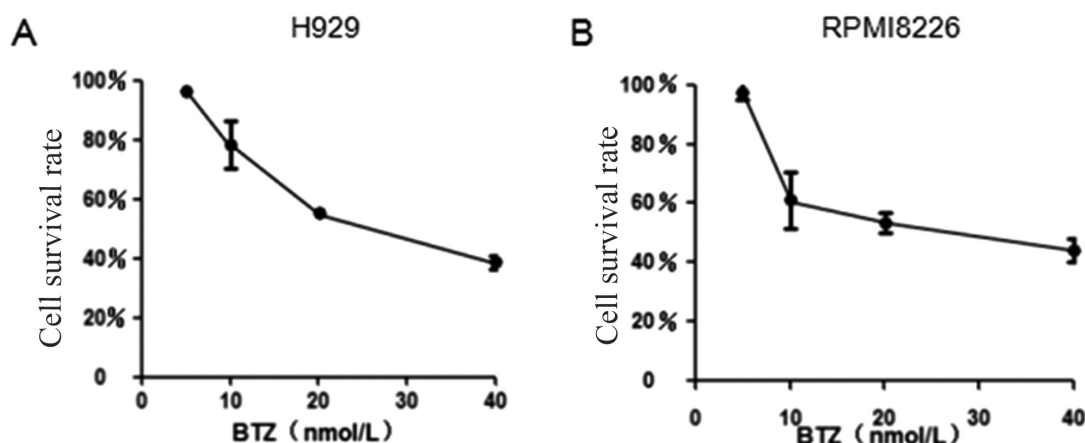


图 1 不同浓度 BTZ 处理骨髓瘤细胞 24 h 的细胞存活率。(A)BTZ 降低了 H929 的存活率;(B)BTZ 降低了 RPMI8226 的存活率。

Fig.1 Cell survival rate of myeloma cells treated with BTZ at different concentrations for 24 h. (A) BTZ reduces the survival rate of H929. (B) BTZ reduces the survival rate of RPMI8226.

2.2 精氨酸缺乏阻滞细胞周期抑制骨髓瘤细胞增殖

通过 CCK-8 方法检测精氨酸对骨髓瘤细胞增殖情况的影响,取 H929 和 RPMI8226 细胞,用 R1780 和 RPMI1640 培养液处理 0 h、24 h、48 h、72 h,分别于相应的时间点,取出培养板加入 CCK-8 试剂孵育 1h,通过酶标仪检测细胞吸光度并分析结果。结果如图 2-1,在两种细胞系中,RPMI1640 组细胞的增殖速率均大于 R1780 组,表明缺乏精氨酸抑制了骨髓瘤细胞的增殖,在 H929 细胞尤为明显。为探讨缺乏精氨酸如何影响骨髓瘤细胞的增殖,我们检测了骨髓瘤细胞的细胞周期。将 H929、RPMI8226 细胞用 R1780 和 RPMI1640 培养液处理 24 h,结果如图 2-2 和表 1,缺乏精氨酸将两种骨髓瘤细胞的细胞周期阻滞于 S 期。说明缺乏精氨酸通过阻滞细胞周期起到了抑制骨髓瘤细胞增殖的作用。

2.3 BTZ 对骨髓瘤细胞周期的影响

实验数据表明,精氨酸缺乏阻滞了细胞周期,抑制了骨髓瘤细胞的增殖。为了检测 BTZ 对骨髓瘤细胞周期的影响,我们将实验组分为:R1780、R1780+BTZ (20 nmol/L)、RPMI1640、RPMI1640+BTZ (20 nmol/L)。如图 3 和表 1 在 RPMI8226 细胞中,BTZ 明显将细胞周期阻滞于 G2/M 期和 S 期。在 H929 细胞中,BTZ 明显将周期阻滞于 S 期,较单独精氨酸剥夺更加明显。

2.4 精氨酸缺乏对 BTZ 治疗后 MM 细胞凋亡的影响

用 BTZ 分别处理 R1780 和 RPMI1640 培养条件下的 H929 和 RPMI8226 两种骨髓瘤细胞 24 h,通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果如图 4,R1780+BTZ 组和 RPMI1640+BTZ 组的 H929 细胞凋亡百分比分别是 13.63% 和 40.81% (**** $P < 0.0001$),RPMI8226 凋亡百分比分别是 7.13% 和 19.27%

(**** $P<0.0001$)。可以看出 R1780 组的细胞凋亡百分比明显低于 RPMI1640 组的凋亡百分比,说明精氨酸缺乏限制了 BTZ 的抗骨髓瘤作用。

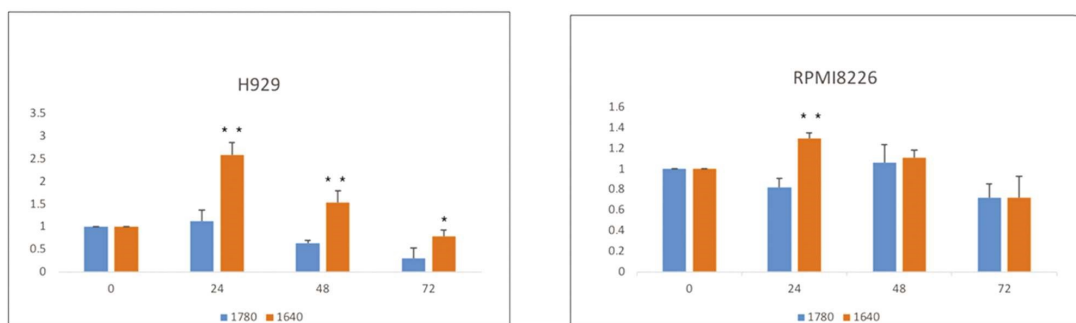


图 2-1 精氨酸剥夺对骨髓瘤细胞增殖的影响

R1780 组中的 H929 或 RPMI8226 细胞的增殖率明显低于 RPMI1640 组的细胞增殖率。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

Fig. 2-1 Effects of arginine deficiency on myeloma cell proliferation.

The cell proliferation rate in the R1780 group was significantly lower than that in the RPMI1640 group, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

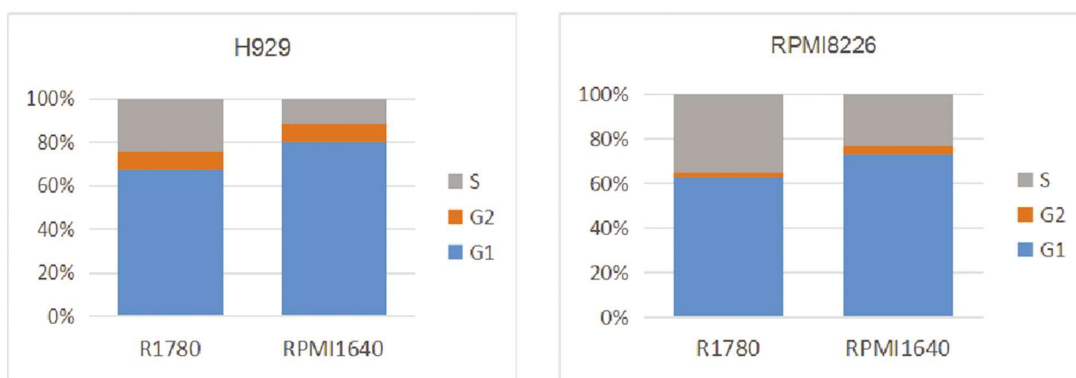


图 2-2 精氨酸剥夺对骨髓瘤细胞周期的影响。将 H929 和 RPMI8226 用 R1780 和 RPMI1640 培养 24 h 后,R1780 培养的 H929 或 RPMI8226 细胞周期均阻滞于 S 期。

Fig.2-2 Effects of arginine deficiency on cell cycle in myeloma cells. After H929 and RPMI8226 were cultured for 24 hours with R1780 and RPMI1640, both cells cultured in R1780 were arrested in the S phase

表 1 精氨酸剥夺以及 BTZ 作用于骨髓瘤细胞 24 h 后细胞周期的变化

Table1 Effect of arginine deficiency and BTZ on cell cycle in myeloma cells

Groups	The change of cell cycle(%)		
	G0/G1	S	G2/M
H929+R1780	67.3± 4.62	24.3± 3.12*	8.4± 1.21
H929+ RPMI1640	79.9± 5.12	11.2± 1.54	8.92± 1.34
RPMI8226+R1780	51.1± 4.35	46.1± 3.66*	2.85± 0.43
RPMI8226+ RPMI1640	68.9± 4.78	30.1± 4.12	0.9± 0.08
H929+R1780+BTZ	19.7± 2.12	80.3± 6.24 ^Δ	0.02±0.001
H929+ RPMI1640+BTZ	20.3± 3.44	76.3± 4.68 ^Δ	3.4± 0.46
RPMI8226+R1780+BTZ	18.5± 1.98	59.8± 4.70 ^Δ	21.7± 4.15 ^Δ
RPMI8226+ RPMI1640+BTZ	11.3± 1.68	68.6± 4.92 ^Δ	20.1± 2.63 ^Δ

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. $*P<0.05$, R1780 compare with RPMI1640. $^{\Delta} P<0.05$, compared with No BTZ treated groups in the same medium.

3 讨论

多发性骨髓瘤(MM)是以骨髓中浆细胞聚集为主要特征的一种恶性肿瘤,占血液系统肿瘤的 10%至 15%^[9]。临床应用蛋白酶抑制剂(Pis)治疗多发性骨髓瘤已有近 20 年的时间。

其中,作为一种可逆的 Pis,BTZ 通过抑制骨髓瘤细胞蛋白酶的活性展示出良好的抗肿瘤活性^[9,10]。我们通过 CCK8 方法确定了在 H929 和 RPMI8226 两种骨髓瘤细胞,使用 BTZ 的作用浓度,选用稍低于 IC50 的 20 nmol/L 的浓度进行后续的实验。

近年来,对肿瘤细胞氨基酸代谢的研究为肿瘤微环境中代

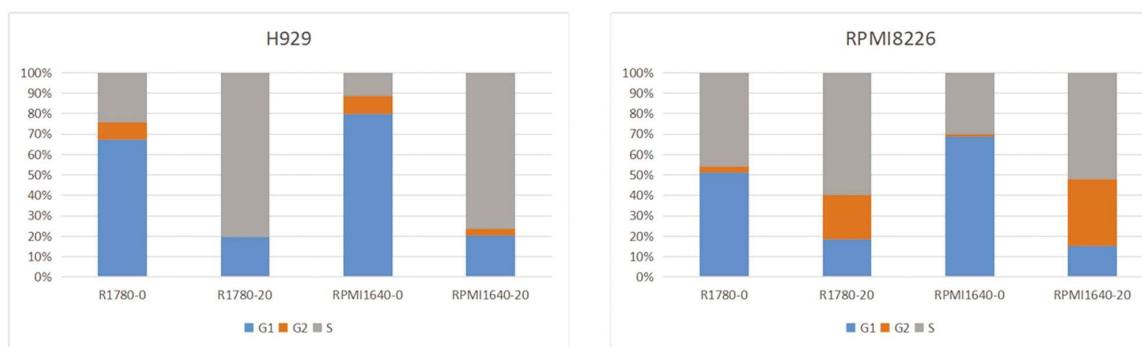


图3 BTZ对骨髓瘤细胞周期的影响。

注:用 0、20 nmol/L 的 BTZ 处理 R1780 和 RPMI1640 培养的骨髓瘤细胞 24 h, BTZ 将 RPMI8226 的细胞周期阻滞于 G2/M、S 期,将 H929 的细胞周期阻滞于 S 期;随 BTZ 浓度升高,阻滞作用更加明显。

Fig.3 Effect of BTZ on myeloma cell cycle.

Note: Myeloma cells cultured from R1780 and RPMI1640 were treated with BTZ at 0 and 20 nmol/L for 24 hours. BTZ blocked the cell cycle of RPMI8226 in G2/M and S phases, and blocked the cell cycle of H929 in S phase. BTZ concentration increased, the blocking effect was more obvious.

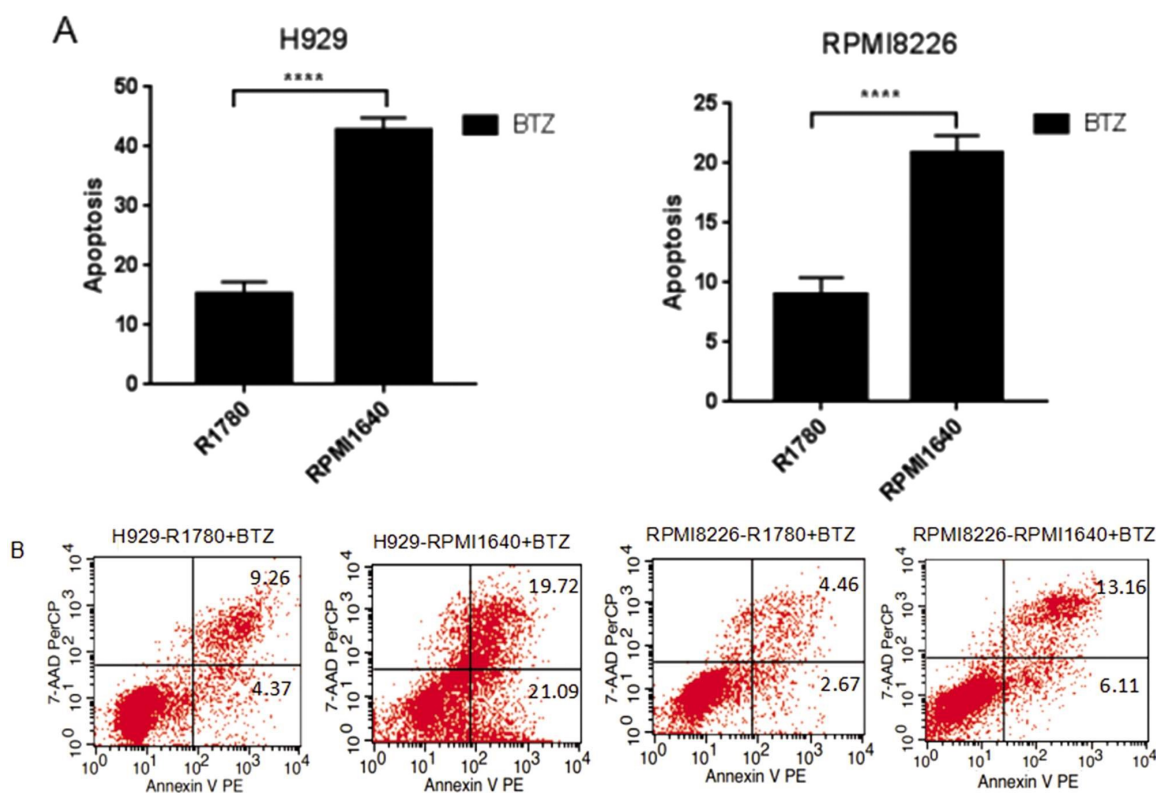


图4 不同培养条件下给予 BTZ 对 MM 细胞凋亡的影响。20 nmol/L BTZ 处理用 R1780 和 RPMI1640 培养的 H929 和 RPMI8226 细胞 24 h,检测细胞凋亡。

Fig. 4 Effect of BTZ on apoptosis of myeloma cells in different medium. 20 nmol/L of BTZ was used to treat H929 and RPMI8226 cells cultured with R1780 and RPMI1640 for 24 hours, and then detected apoptosis.

谢调控的潜在影响提供了重要的依据。各种临床实验中已经探讨了针对色氨酸、精氨酸和(或)谷氨酰胺代谢的抑制剂的设计和使用,可单独使用或与抗肿瘤药物联合使用^[1]。精氨酸是一种在合成蛋白质、核苷酸、肌酸等过程中所需的高度通用的氨基酸^[2]。通常情况下,精氨酸可以经尿素循环中的瓜氨酸转化而来,是人体正常细胞的必需氨基酸。但对某些不能合成精氨酸的肿瘤细胞,外源性供给是至关重要的^[3]。这类肿瘤由于缺乏生成内源性精氨酸的主要调节酶-精氨琥珀酸合成酶(ASS),所以对细胞外供给的精氨酸极度依赖,从而被称为精氨酸营养缺陷型肿瘤^[14-16]。目前,通过干扰肿瘤细胞的代谢过程

来抑制其发生发展的靶向代谢疗法,被认为是当今极有希望改善恶性肿瘤化疗效果的战略。因此,精氨酸剥夺疗法已成为治疗部分肿瘤的一个值得期待的新领域^[7]。该疗法正是利用肿瘤细胞与正常细胞对营养要求的差异,通过阻断精氨酸供应起到抑制肿瘤细胞生长的功效。大量报道指出在一些肿瘤细胞使用精氨酸剥夺的方法可以增加细胞的凋亡^[18-20]。在我们的实验中我们将两种骨髓瘤细胞,在 R1780 和 RPMI1640 两种精氨酸含量不同的环境中培养。分别于培养 0、24 h、48 h、72 h 加入 CCK8 试剂,用酶标仪检测各实验组的吸光度,分析数据后得到了如图 2 反映细胞增殖情况的统计图。可以总结出,精氨酸

缺乏时极大的限制了骨髓瘤细胞的生长和增殖。随着培养时间延长,在两种培养液中,骨髓瘤细胞的增殖均呈现减缓的趋势,R1780 组尤为明显,可能为骨髓瘤细胞在增殖过程中对培养液中的精氨酸或其他营养成分的消耗所致。进一步检测细胞周期的实验发现,使用 R1780 培养基培养骨髓瘤细胞 24h 后,细胞明显阻滞在 S 期。可见缺乏精氨酸阻滞了骨髓瘤细胞的细胞周期,抑制了骨髓瘤细胞的增殖。这种对增殖的抑制作用,也限制了精氨酸缺乏对 MM 的治疗效果。

硼替佐米作用的靶标蛋白酶体是降解胞内蛋白质的主要方式^[21]。为了验证精氨酸剥夺对 BTZ 治疗骨髓瘤的影响,我们使用流式细胞仪检测了 BTZ 处理 24h 的 R1780 和 RPMI1640 组中骨髓瘤细胞的周期和凋亡情况。结果显示在精氨酸缺乏的培养条件下不仅阻滞了细胞周期,而且抑制了细胞的凋亡。Daniela Belloni 等人^[22]发现,处于静止期的细胞暴露于硼替佐米 10 h 后,其凋亡程度可忽略不计。驱动细胞由静止状态转变为活跃增殖后,观察到了大量被膜连蛋白 V 染色的细胞,说明硼替佐米对分裂增殖的细胞更加敏感。这也解释了精氨酸剥夺抑制了细胞增殖,反而降低了 BTZ 诱导的细胞凋亡。

综上所述,我们发现在 H929 和 RPMI8226 两种骨髓瘤细胞,剥夺精氨酸阻滞其细胞周期,抑制其细胞增殖;当联合给予 BTZ 引起细胞周期的进一步阻滞和细胞凋亡水平的降低。说明精氨酸剥夺疗法在联合其他药物使用时有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Teru Hideshima, Constantine Mitsiades, Giovanni Tonon, et al. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets[J]. Nature Reviews, 2007, 7(8): 585
- [2] Holstein SA, McCarthy PL. Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience [J]. Drugs, 2017, 77(5): 505-520
- [3] Guerrero-Garcia TA, Gandolfi S, Laubach JP, et al. The Power of Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma [J]. Expert Rev Proteom, 2018, 15(12): 1033-1052
- [4] De Santo C, Serafini P, Marigo I, et al. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(11): 4185-4190
- [5] Brenner T, Fleming TH, Rosenhagen C, et al. L-arginine and asymmetric dimethylarginine are early predictors for survival in septic patients with acute liver failure[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012(10): 210454
- [6] De Santo C, Salio M, Masri SH, et al. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans[J]. J Clin Invest, 2008, 118(12): 4036-4048
- [7] F Mussai, S Egan, Joseph Higginbotham-Jones, et al. Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target[J]. Blood, 2015, 125(15): 2386-2396
- [8] D Osafehinti, K Zivari. Case of Stroke from Cerebral Vasculitis following Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone Therapy in a Patient with Relapsing Multiple Myeloma [J]. Case reports in hematology 2019, 2019(11): 5180424
- [9] Adams, Julian. The proteasome: a suitable antineoplastic target[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(5): 349-360
- [10] Farrell ML, R. RM. Soluble and Cell-Cell-Mediated Drivers of Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma [J]. Front Endocrinol, 2018, 9(5): 218
- [11] Elitsa Ananieva. Targeting amino acid metabolism in cancer growth and anti-tumor immune response [J]. World J Biol Chem, 2015, 6(4): 281-289
- [12] Szlosarek PW. Arginine deprivation and autophagic cell death in cancer[J]. P Natl Acad Sci USA, 2014, 111(39): 14015-14016
- [13] Xu S, Lam S, Cheng PN, et al. Recombinant human arginase induces apoptosis through oxidative stress and cell cycle arrest in small cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(11): 3471-3482
- [14] Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, et al. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle [J]. Eur J Biochem, 2003, 270(9): 1887-1899
- [15] Wheatley DN, Campbell E. Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 3. Deficient utilisation of citrulline by malignant cells[J]. Br J Cancer, 2003, 89(3): 573-576
- [16] Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, et al. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation [J]. Cancer, 2004, 100(4): 826-833
- [17] Jahani M, Noroznezhad F, Mansouri K. Arginine: Challenges and opportunities of this two-faced molecule in cancer therapy [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102(6): 594-601
- [18] Huang CC, Tsai ST, Kuo CC, et al. Arginine deprivation as a new treatment strategy for head and neck cancer [J]. Oral Oncol, 2012, 48(12): 1227-1235
- [19] Feun L, You M, Wu CJ, et al. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(11): 1049-1057
- [20] Lind DS. Arginine and cancer [J]. J Nutr, 2004, 134(10): 2837S-2841S
- [21] Nau K, Lewis W, Nau KC. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment[J]. Am Fam Physician, 2008, 78(7): 853-859
- [22] Belloni D, Veschini L, Foglieni C. Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells[J]. Exp Cell Res, 2009, 316(6): 1010-1018