

## 硼替佐米对多发性骨髓瘤干细胞的作用研究

朱原辛,李天宇,王 婧,周 新

(南京医科大学附属无锡市人民医院血液科,江苏 无锡 214023)

**[摘要]** 目的:探讨硼替佐米对多发性骨髓瘤干细胞的作用。方法:本实验采用人多发性骨髓瘤细胞系 KMS-11 及 OCI-MY5 常规体外培养,随机设定空白组和硼替佐米干预处理后的实验组,通过流式细胞仪利用肿瘤干细胞外排 Hoechst33342 染料的特性来分析比较侧群细胞的比例。结果:硼替佐米作用后侧群细胞比例明显上升( $P < 0.05$ )。结论:硼替佐米主要的作用靶点是非侧群细胞,为硼替佐米的序贯治疗提供了客观依据。

**[关键词]** 多发性骨髓瘤;肿瘤干细胞;侧群细胞;硼替佐米

**[中图分类号]** Q2-33

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)02-182-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130208

## Effects of bortezomib on multiple myeloma stem cells

Zhu Yuanxin, Li Tianyu, Wang Jing, Zhou Xin

(Department of Hematology, Wuxi People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of bortezomib on multiple myeloma stem cells. **Methods:** In this study, we cultured human multiple myeloma cell lines KMS-11 and the OCI-MY5 *in vitro* and set the control group and experimental group of bortezomib treatment. To analyze the proportion of side population cells by using flow cytometry and the mechanism of cancer stem cells efflux Hoechst 33342. **Results:** After treatment, we found that side population cells were significantly increased. **Conclusion:** The results indicate that the target of bortezomib is non-side population cells and providing an objective basis for the sequential therapy of bortezomib.

**[Key words]** multiple myeloma; cancer stem cells; side population cells; bortezomib

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 182-185]

1977 年 Hamburger 肿瘤干细胞概念的提出<sup>[1]</sup>, 为新的肿瘤形成机制的研究拉开了序幕。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是一种具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞。CSCs 的发现彻底颠覆了传统认为的肿瘤是由体细胞突变而成, 每个肿瘤细胞都可以无限制地生长的观念。目前, 在许多实体瘤和非实体瘤中已经发现 CSCs<sup>[2-4]</sup>。

侧群细胞(side population cells, 简称 SP 细胞)最早是利用 Hoechst 染料进行造血干细胞分离时发现的一群特殊细胞<sup>[5]</sup>, 它具有类似干细胞的自我更新和多向分化潜能的特点, 并具有特殊的表型或者生物学特性而较易分离。目前可以通过流式细胞术分选 SP 细胞的方法来进行大多数 CSCs 的研究。目前维拉帕米及利血平是公认的可以防止 SP 细胞外排 Hoechst 染料的药物。通过流式细胞术进行的 SP

细胞分离法是目前研究 CSCs 最可行的方法之一, 选定流式细胞仪上显示 Hoechst 染料染色偏弱的部分, 或经过维拉帕米或利血平处理后, 该选定区域细胞比例明显减少, 通过这两个指标可以认定筛选出的细胞是 SP 细胞<sup>[6-7]</sup>。而筛选出的 SP 细胞在许多实体瘤和血液肿瘤特别是多发性骨髓瘤中, 都被证实具有 CSCs 的特征<sup>[2-4, 7]</sup>。

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种浆细胞克隆性恶性增殖性疾病, 其在骨髓中的表达和其生成的免疫球蛋白是 MM 产生临床表现的主要机制。传统的化疗药物可以抑制肿瘤的形成速度, 但是不能有效控制肿瘤的再生。目前, MM 干细胞已经被许多研究证实, 并且通过流式细胞术筛选出的 SP 细胞具有明显的干细胞特性<sup>[6-8]</sup>。MM 肿瘤干细胞的发现, 可以很好地解释肿瘤的再生和耐药, 这为

MM 的相关研究提出了很好的方向。

蛋白酶体抑制剂硼替佐米(bortezomib)作为一种新型的靶向性药物,其主要机制是通过抑制经典的核因子(NF)- $\kappa$ B 通路来抗 MM 细胞<sup>[9]</sup>,目前已经应用于临床,并已证实可以有效缓解疾病<sup>[10-12]</sup>。但是许多权威机构提倡硼替佐米的序贯治疗,这与肿瘤的复发有很大相关。目前硼替佐米对于 MM 干细胞作用的研究还未展开。本研究旨在探索硼替佐米是否能成为清除 MM 干细胞的药物,这可以作为硼替佐米序贯治疗的一个客观依据。

## 1 材料与方法

### 1 材料

人多发性骨髓瘤 KMS-11 和 OCI-MY5 细胞系购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养基 IMDM 购于美国 Thermo 公司。胎牛血清购于美国 Gibco 公司。Hoechst33342、维拉帕米(verapamil)、PI 均购于美国 Sigma 公司。硼替佐米(商品名万珂)由美国 Millennium 公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

细胞用含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基培养,置于 37℃含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中,待细胞生长达 70%~80%时离心传代。

#### 1.2.2 不同条件的硼替佐米药物干预

调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml,接种于 24 孔板中,放置于 37℃含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育,作为实验组。本实验采取的浓度梯度为 0、5、10 nmol/L,采取的时间梯度为 0、6、12 h(0 h 即加入药物后直接进行下面的实验步骤)。干预后用作分析不同条件的硼替佐米对 SP 细胞比例的影响,并选择一个最佳条件作为本实验的主要药物干预条件。

#### 1.2.3 细胞染色及 SP 细胞的比例测定

将样本分为空白组、对照组及实验组。空白组即不采用任何药物干预,对照组加入维拉帕米干预,实验组即采用 1.2.2 节中干预后的细胞。各组统一采取以下实验步骤:①收集细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml,悬浮于培养基。②各组分别加入 Hoechst33342,使其终浓度为 5  $\mu$ g/ml,吹打混匀。对照组于此步骤中加入 ABC 转运蛋白阻滞剂维拉帕米(终浓度为 50  $\mu$ mol/L)。③将 3 组细胞一起水浴 90 min,隔 15 min 摇晃细胞,防止细胞沉淀。④4℃,800 r/min 离心 5 min,弃上清,用预冷的 PBS 洗涤 1 次后重新悬浮于 2%胎牛血清的 PBS 溶液。

⑤加 PI(10  $\mu$ g/ml)排除死细胞对实验的影响。⑥立即上机(FACSVantage DIVA,美国 Becton Dickison 公司)进行 SP 细胞检测。激发波长 357 nm,采集波长为 430 nm(蓝光)和 650 nm(红光)。测定硼替佐米干预后(实验组)及未经任何处理(空白组)的细胞的 SP 比例,进行比较。实验重复 3 次,每次试验 3 个复管。

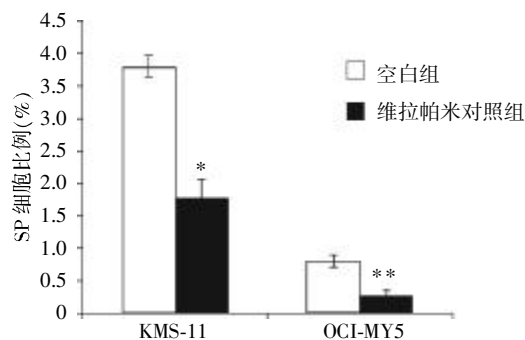
### 1.3 统计学方法

数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件进行非参数 Kruskal-Wallis 检验,组间两两比较采用秩变换分析。 $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 多发性骨髓瘤 SP 细胞的比例

通过 SP 细胞能够外排 Hoechst33342 的特性检测人多发性骨髓瘤细胞中 SP 细胞的比例,该比例可以代表细胞群中干细胞的水平。研究表明在 KMS-11 及 OCI-MY5 细胞系中,SP 细胞比例如图 1 所示。在加入维拉帕米(50  $\mu$ mol/L)的对照组中,SP 细胞的比例明显降低(图 1、2, $P < 0.05$ , $n=9$ )。



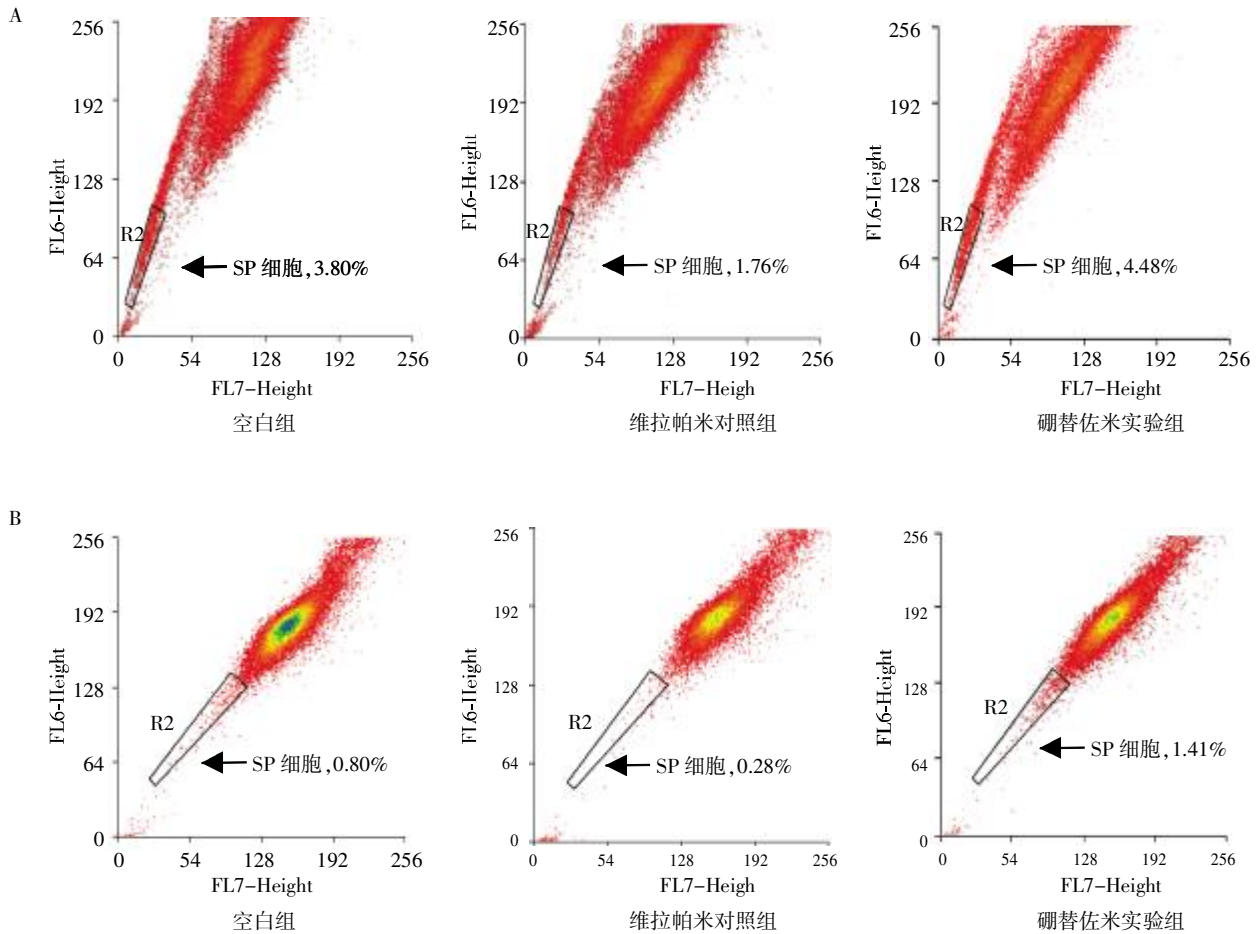
与空白组比较,\* $P = 2.47E-7$ , $n=9$ ;\*\* $P = 1.26E-8$ , $n=9$ 。

图 1 两种细胞系中 SP 细胞的比例

Figure 1 The percentage of SP cell in two cell lines

### 2.2 硼替佐米对 SP 细胞的作用

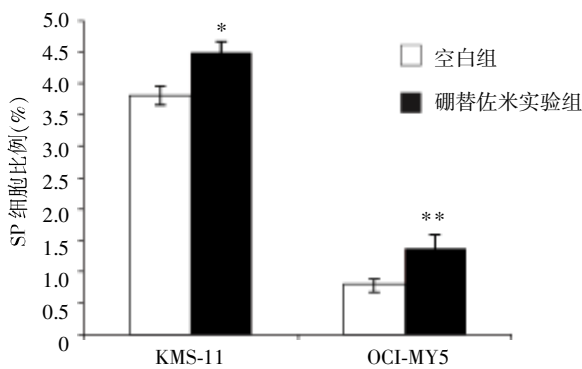
实验发现,硼替佐米终浓度 5 nmol/L 处理 0 h 时,经 PI 染色后流式细胞仪上显示细胞活力好,活力较好的细胞比例  $> 80\%$ ,而处理时间超过 0 h 时或浓度超过 5 nmol/L 时,细胞活力较差,对结果影响较大。因此我们采取终浓度 5 nmol/L,与维拉帕米相同的作用时间,作用后实验组 KMS-11 及 OCI-MY5 的 SP 细胞比例分别为  $(4.50 \pm 0.16)\%$  及  $(1.36 \pm 0.23)\%$ (图 2、3)。比不用硼替佐米处理(空白组)的值明显增高,差异有统计学意义,提示硼替佐米主要作用于肿瘤的主群细胞(main population cells,简称 MP 细胞)而非 SP 细胞。



A:KMS-11 细胞系;B:OCI-MY5 细胞系。

图 2 两种细胞系中 SP 细胞的比例流式图

Figure 2 The flow cytometric dot plots of SP cell in two cell lines



与空白组比较, \* $P = 4.44E-6, n=9$ ; \*\* $P = 2.81E-5, n=9$ 。

图 3 硼替佐米作用后两种细胞系中 SP 细胞比例

Figure 3 The percentage of SP cells in two cells of Bortezomib treatment

### 3 讨论

肿瘤细胞的异质性、不同的分化能力以及部分具有自我更新的潜质,共同引导出一个新的肿瘤干细胞的概念。根据这个理论,肿瘤干细胞具有干细

胞的特性,包括分化为成熟的肿瘤细胞及自我更新的能力。目前临床上大部分患者即使接受充分的临床治疗也不能完全治愈,表明可能存在一些细胞对大部分药物耐药。这也提示了肿瘤干细胞的存在。

MM 作为一种 B 细胞来源的恶性肿瘤,目前还不能治愈,最终导致患者死亡,而大量药物杀灭肿瘤细胞后,肿瘤仍可复发,提示肿瘤的一种新的耐药机制。研究人员在体内研究小鼠骨髓瘤细胞克隆原生长能力时发现,0.10%~0.25%细胞可以形成脾集落并可以移植到第 2 只小鼠体内再次形成集落。在琼脂集落培养中,MM 患者的骨髓标本中有不到 1%的细胞可以形成新的肿瘤集落,这些证据都提示了肿瘤干细胞的存在。

目前可以采取两种方法鉴别及分离肿瘤干细胞。一是流式细胞仪分选,这种方法利用干细胞可以外排 Hoechst33342 染料从而不容易染色的特性,通过流式细胞仪来分离这部分细胞<sup>[5]</sup>。分离的

这部分细胞称为 SP 细胞。前期已有学者在体内体外实验中证实这些细胞具有干细胞的特性<sup>[6-8]</sup>,而 MP 细胞没有明显的干细胞特性<sup>[7]</sup>。二是免疫磁珠法。利用肿瘤干细胞表面特异性的标志物,如白血病细胞系中 CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>细胞,脑和结肠肿瘤中的 CD133<sup>+</sup>细胞,以及乳癌中的 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>/Lin<sup>neg</sup> 细胞<sup>[13-16]</sup>。在此前的关于 MM 干细胞的表面标志物的研究中,表明 MM 干细胞的表型可能是 CD138<sup>-</sup><sup>[6]</sup>。

LAC 分选的 SP 细胞与 MP 细胞相比,具有以下特点:①SP 细胞比 MP 细胞在体外有更强的存活能力和增殖能力;②SP 细胞继续培养能分化并繁殖出 MP 细胞,但 MP 细胞无法分化为 SP 细胞;③SP 细胞的生长能力明显高于 MP 细胞。因此,SP 细胞具有显著的干细胞特性,并能在小鼠体内分化成瘤,具有 MM 干细胞的表型及特征,被许多学者认为是一种干细胞<sup>[6-8]</sup>。

硼替佐米作为一种新型的蛋白酶体抑制剂,目前广泛应用于临床,并已证实其疗效显著<sup>[11]</sup>,初次应用可以很快出现肿瘤缓解。但是应用硼替佐米后,大多数患者仍可复发,提示 MM 具有对硼替佐米耐药的新机制。目前,最新的 MM 治疗指南建议应用硼替佐米序贯治疗。

本实验采取 LAC 流式细胞仪鉴别 SP 细胞,通过硼替佐米干预细胞,观察硼替佐米对 SP 细胞比例的影响。结果表明,硼替佐米干预后 SP 细胞的比例增多。可以推论硼替佐米主要的作用靶点为非 SP 细胞,这可能是临床上硼替佐米治疗后 MM 易复发的原因,并为硼替佐米的序贯治疗提供了客观依据。

#### [参考文献]

[1] Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. Science, 1997, 197(4302): 461-463  
[2] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties[J]. Hepatology, 2006, 44(1): 240-251  
[3] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system[J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 506-513  
[4] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and

circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. Hepatology, 2008, 47(3): 919-928  
[5] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*[J]. Exp Med, 1996, 183(4): 1797-1806  
[6] Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance [J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 190-197  
[7] Jakubikova J, Adamia S, Kost-Alimova M, et al. Lenalidomide targets clonogenic side population on multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications [J]. Blood, 2011, 117(17): 4409-4419  
[8] Basak GW, Carrier E. The search for multiple myeloma stem cells: the long and winding road [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(5): 587-594  
[9] Chari A, Mazumder A, Jagannath S. Pro-teasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma [J]. Biologics, 2010, 4: 273-287  
[10] Chanan-Khan AA, Kaufman JL, Mehta J, et al. Activity and safety of bortezomib in multiple myeloma patients with advanced renal failure: a multicenter retrospective study [J]. Blood, 2007, 109(6): 2604-2606  
[11] Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, et al. The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation *in vitro* and *in vivo* in multiple myeloma patients [J]. Blood, 2007, 110(1): 334-338  
[12] Argyrlou AA, Iconomou G, Kalofonos HP. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature [J]. Blood, 2008, 112(5): 1593-1599  
[13] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115  
[14] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737  
[15] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110  
[16] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7): 3983-3988

[收稿日期] 2012-09-21