

·论著·

奈达铂联合吉西他滨阻滞非霍奇金淋巴瘤细胞周期 促进细胞凋亡的作用研究

李云霞¹, 赵 玲², 赵明利¹, 吕东津¹, 郝 舒¹, 吴 娜¹, 周文鼎¹

(昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院内三科¹, 微创介入科², 云南 昆明 650118)

摘要:目的 利用两种非霍奇金淋巴瘤细胞株探究奈达铂(Nedaplatin)和吉西他滨(Gemcitabine)抑制细胞增殖的作用机制。方法 取 MINO 和 SU-DHL-4 非霍奇金淋巴瘤细胞株, 分别设对照组、奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组, 对照组无药物处理, 3 个实验组的细胞分别用吉西他滨、奈达铂和奈达铂+吉西他滨处理, 采用 MTT 实验比较各组细胞活力、流式细胞术检测各组细胞周期阻滞和细胞凋亡情况、免疫荧光检测各组细胞周期蛋白依赖激酶 CDK1 和 CDK4 的表达情况。结果 奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组均抑制两种 NHL 细胞株的增殖, 其中奈达铂+吉西他滨组抑制效果最显著; 与对照组相比, 3 个实验组发生细胞周期阻滞, 更多的细胞处于 S 期, 其中奈达铂+吉西他滨组处于 S 期细胞比例最高; 3 个实验组可以诱导两种 NHL 细胞进入早期凋亡和晚期凋亡; 免疫荧光结果显示, 3 个实验组 CDK1 和 CDK4 的表达低于对照组, 且奈达铂+吉西他滨组降低 CDK1 和 CDK4 表达的幅度最大。结论 吉西他滨和奈达铂可通过下调细胞周期蛋白依赖激酶 CDK1 和 CDK4 的表达, 引起细胞周期阻滞, 从而诱导非霍奇金淋巴瘤细胞凋亡, 最终抑制细胞增殖, 发挥杀伤肿瘤的作用。

关键词: 奈达铂; 吉西他滨; 非霍奇金淋巴瘤; 细胞周期; 凋亡

中图分类号: R733.1

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.08.015

文章编号: 1006-1959(2022)08-0061-06

Effect of Nedaplatin Combined with Gemcitabine on Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Non-Hodgkin Lymphoma

LI Yun-xia¹, ZHAO Ling², ZHAO Ming-li¹, LYU Dong-jin¹, HAO Shu¹, WU Na¹, ZHOU Wen-ding¹

(The Third Department of Internal Medicine¹, Department of Minimally Invasive Intervention², the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650118, Yunnan, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory mechanism of Nedaplatin and Gemcitabine on cell proliferation by using two non-Hodgkin lymphoma cell lines. **Methods** MINO and SU-DHL-4 non-Hodgkin lymphoma cell lines were selected and divided into control group, Nedaplatin group, Gemcitabine group and Nedaplatin+Gemcitabine group. The control group was not treated with drugs. The cells in the three experimental groups were treated with Gemcitabine, Nedaplatin and Nedaplatin+Gemcitabine, respectively. MTT assay was used to compare the cell viability of each group, flow cytometry was used to detect cell cycle arrest and apoptosis, and immunofluorescence was used to detect the expression of cyclin-dependent kinase CDK1 and CDK4. **Results** Nedaplatin group, Gemcitabine group and Nedaplatin+Gemcitabine group all inhibited the proliferation of two NHL cell lines, and the inhibitory effect of Nedaplatin+Gemcitabine group was the most obvious. Compared with the control group, cell cycle arrest occurred in the three experimental groups, and more cells were in S phase, and the proportion of cells in S phase in Nedaplatin+Gemcitabine group was the highest. The three experimental groups could induce the early and late apoptosis of two NHL cells; immunofluorescence results showed that the expression of CDK1 and CDK4 in the three experimental groups were lower than that in the control group, and the Nedaplatin+Gemcitabine group decreased the expression of CDK1 and CDK4 most. **Conclusion** Gemcitabine and nedaplatin can induce cell cycle arrest by down-regulating the expression of cyclin-dependent kinases CDK1 and CDK4, thereby inducing apoptosis of non-Hodgkin lymphoma cells, and ultimately inhibiting cell proliferation.

Key words: Nedaplatin; Gemcitabine; Non-Hodgkin lymphoma; Cell cycle; Apoptosis

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)是由肿瘤细胞引起的恶性免疫系统疾病,主要表现为淋巴结病或实体瘤^[1,2]。其分类复杂,世界卫生组织(WHO)已列出了 50 多种不同的亚型的组织分类^[3]。长期以来,非霍奇金淋巴瘤的标准一线化疗方案为 CHOP 方案,即环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+泼尼松龙^[4,5]。然而在一线治疗后,有半数以上

患者会转化为复发难治性非霍奇金淋巴瘤,预后较差。针对这类患者的化疗方案不统一,尚无标准治疗方案^[6,7]。有研究报道^[8-10],铂类化疗药物和吉西他滨可用于非霍奇金淋巴瘤二线及以上的治疗。有研究比较顺铂、吉西他滨和地塞米松联合治疗复发难治性非霍奇金淋巴瘤的效果,结果发现患者实现了较好的临床应答并且安全耐受性良好^[11]。奈达铂是新一代的铂类抗肿瘤药物,与顺铂相比,具有更强的细胞毒作用,已在部分国家批准用于多种癌症的治疗^[12]。因此,奈达铂有望成为非霍奇金淋巴瘤化疗的药物选择之一。本研究拟探索新型铂类化疗药物奈达铂和吉西他滨联用抑制非霍奇金淋巴瘤细胞的作用机制,以期为临床治疗复发难治性非霍奇金淋巴瘤以及改善患者预后提供参考。

基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资
金项目[编号:2018FE001(-253)]

作者简介:李云霞(1970.6-),女,云南宜良县人,硕士,主任医师,主
要从事血液系统、消化道恶性肿瘤及乳腺恶性肿瘤的治疗工作

通讯作者:赵玲(1966.1-),女,云南昆明人,本科,主任医师,主要
从事肿瘤化疗及肿瘤的综合治疗工作

1 材料与方法

1.1 实验材料 MINO 和 SU-DHL-4 非霍奇金淋巴瘤细胞株购自中国科学院细胞库,使用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清,100 μ ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),在含 5%CO₂ 的细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 下培养。PBS 粉末(索莱宝)完全溶解于 2000 ml 蒸馏水中,混匀后,调整 pH 值在 7.2~7.4,备用。细胞周期和细胞凋亡检测试剂盒购自 ThermoFisher。FITC 标记的 CDK1 和 CDK4 抗体购自 Abcam。

1.2 方法

1.2.1 MTT 细胞活力实验 在 96 孔板中分别接种两种 NHL 细胞,密度达到 5000 细胞每孔,3 个实验组分别加入 4、2、1、0.5 和 0.25 nM 的吉西他滨和奈达铂以及二者的混合物,另外没有药物处理的细胞作为对照组。培养 72 h 后,吸去培养液,每孔加入 100 μ l 的 0.5 mg/ml 的 MTT 在培养箱中孵育 4 h。然后弃液体并在每孔加入 100 μ l 的 DMSO,待结晶全部溶解,用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度值。每个浓度进行 3 次平行重复实验。

1.2.2 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期和细胞凋亡 两种 NHL 细胞株接种在 6 孔板中,以 20 万细胞/孔的密度接种,3 个实验组的细胞分别用 1 nM 吉西他滨、奈达铂和奈达铂+吉西他滨处理 72 h, PBS 清洗 3 次之后,使用细胞周期试剂盒进行标记,通过表征每个细胞的 DNA 含量并用碘化丙啶(PI)染色进行分析。细胞凋亡实验则在含有 5 μ l 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的膜联蛋白 V 和 5 μ g/ml 的 PI 的 100 μ l 钙结合缓冲液中对 1×10^5 个完整细胞进行双重染

色,在黑暗中孵育 15 min,然后通过流式细胞术(FACS)进行分析。

1.2.3 免疫荧光检测细胞周期蛋白依赖激酶 CDK1 和 CDK4 的表达 两种 NHL 细胞株接种在玻璃底培养皿中,以 50 万细胞/孔的密度接种。3 个实验组的细胞分别用 1 nM 吉西他滨、奈达铂和奈达铂+吉西他滨处理 72 h,弃培养液,用 PBS 清洗 3 次,加入 4%多聚甲醛溶液室温固定 15 min,重复 PBS 清洗过程。用 0.1%Triton X-100 处理 5 min 后再次清洗。使用 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭细胞在培养箱中孵育 1 h 后,分别使用 FITC 标记的 CDK1 和 CDK4 抗体进行标记,继续在培养箱中孵育 1 h,用 TBST 清洗 3 次之后在荧光显微镜下进行检测。绿色荧光强度代表 CDK1 和 CDK4 的表达量,比较奈达铂组、吉西他滨组、奈达铂+吉西他滨组和对照组的荧光强度。

1.3 统计学分析 实验数据的分析处理采用 Graph-pad Prism 7.0 进行,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行非配对 Students't 检验;计数资料以[n(%)]表示,行 χ^2 检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组细胞活力比较 奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组均抑制两种 NHL 细胞株的增殖,其中奈达铂+吉西他滨组抑制效果最显著,且随着药物等比稀释浓度逐渐降低,细胞活力的抑制率也逐渐降低;另外,奈达铂组和吉西他滨组的抑制率在 SU-DHL-4 细胞株相较于 MINO 中更低,见图 1。

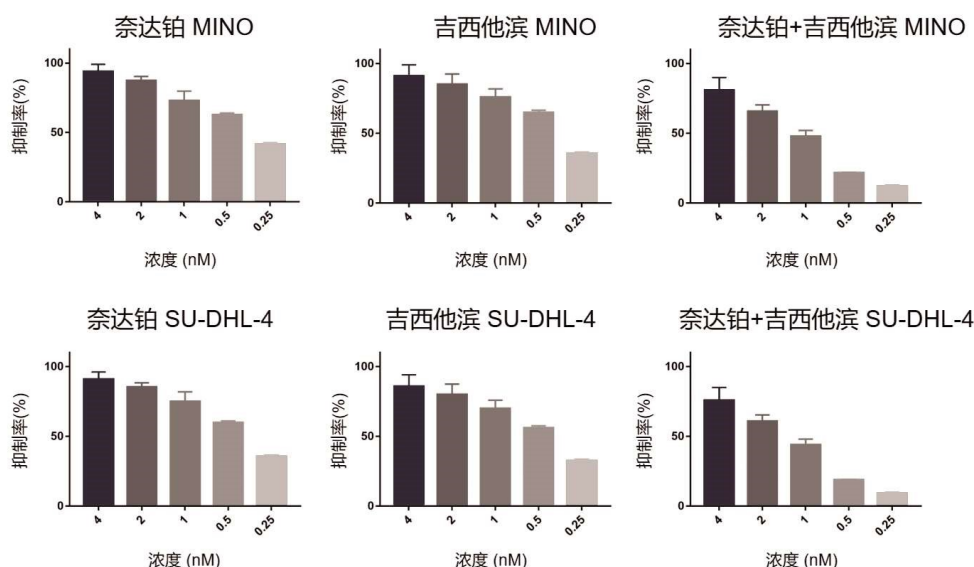


图1 不同药物及浓度对 MINO 和 SU-DHL-4 非霍奇金淋巴瘤细胞增殖的抑制作用

2.2 奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组细胞凋亡比较 图 2 和图 3 分别显示奈达铂组、吉西他滨组及奈达铂+吉西他滨组在 SU-DHL-4 及 MINO 细胞中诱导凋亡的情况。4 个象限分别代表细胞的不同状态,其中左下角表示正常细胞群,左上角是坏死的细胞群,右上角是早期凋亡细胞群而右下角为晚期凋亡细胞群。在未使用化疗药物处理的对照组

中,大多数细胞群落入左下角象限。在 SU-DHL-4 细胞中,吉西他滨组 10%左右的细胞出现早期凋亡,约 20%的细胞发生坏死。而奈达铂组和奈达铂+吉西他滨组细胞主要发生晚期凋亡。在 MINO 细胞中,奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组细胞均发生早期和晚期凋亡。

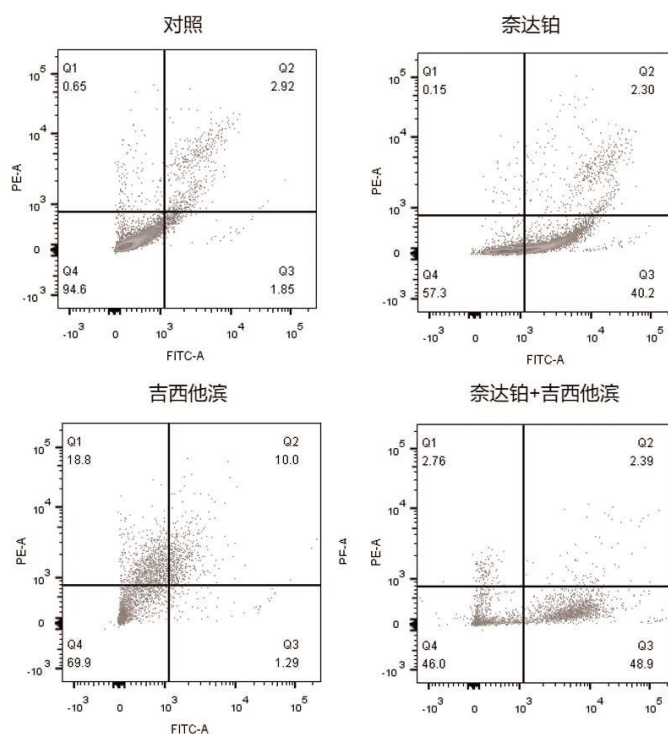


图 2 奈达铂和吉西他滨对 SU-DHL-4 细胞凋亡的诱导作用

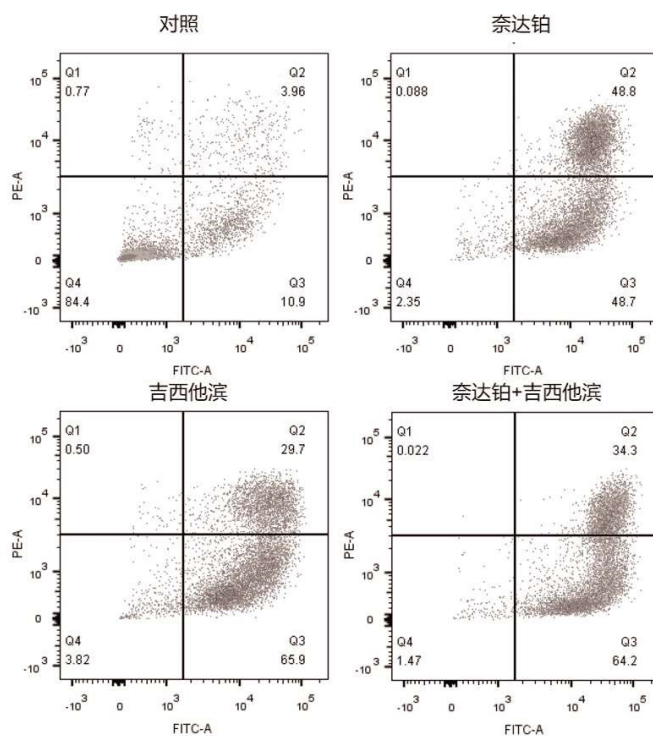


图 3 奈达铂和吉西他滨对 MINO 细胞凋亡的诱导作用

2.3 奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组细胞周期阻滞比较 由图 4 和图 5 可知,对照组的肿瘤细胞一半左右处于 G₁ 期。在 SU-DHL-4 细胞中,奈达铂组 44.5% 的细胞处于 S 期,吉西他滨组 42.2% 的细胞处于 S 期,奈达铂+吉西他滨组有 52.3% 的细胞处于 S 期。在 MINO 细胞中也得到类似的结果,奈达铂组、吉西他滨组以及奈达铂+吉西他滨组的细胞处于 S 期的比例增加,其中吉西他滨组的 S 期比例最高,达到 50.9%。

2.4 奈达铂组、吉西他滨组和奈达铂+吉西他滨组细胞周期蛋白依赖激酶 CDK1 和 CDK4 的表达比较 图 6 和图 7 分别显示对照组和 3 个实验组的两种 NHL 细胞的 CDK1 和 CDK4 表达情况,荧光强度越强代表蛋白表达越多。对照组两个细胞株的 CDK1 和 CDK4 的表达水平均最高,奈达铂组和吉西他滨组的 CDK1 和 CDK4 表达降低,奈达铂+吉西他滨组的 CDK1 和 CDK4 的表达量最低,几乎不显示绿色荧光。

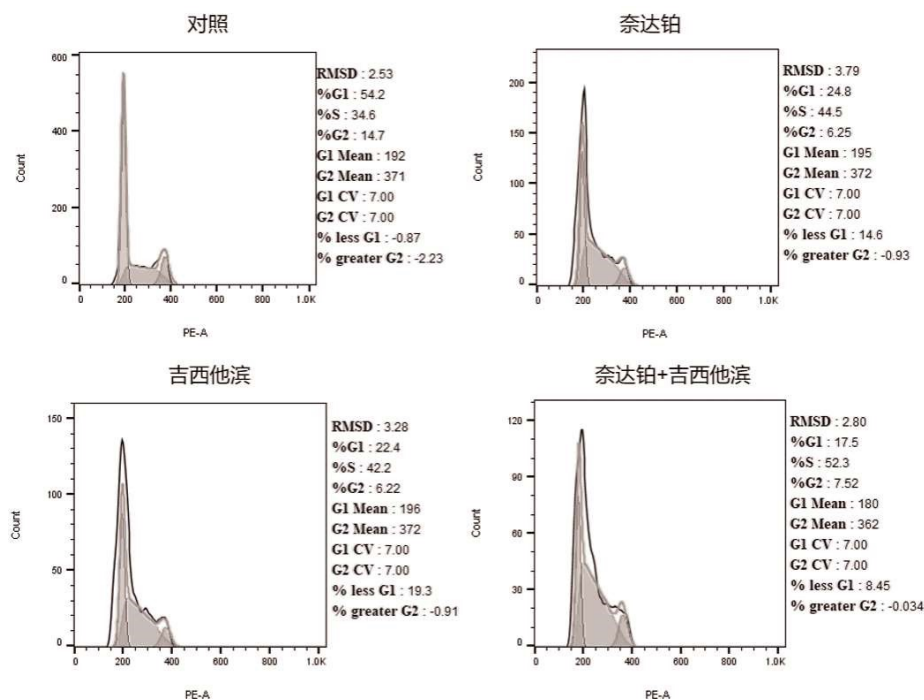


图 4 奈达铂和吉西他滨对 SU-DHL-4 细胞周期的作用

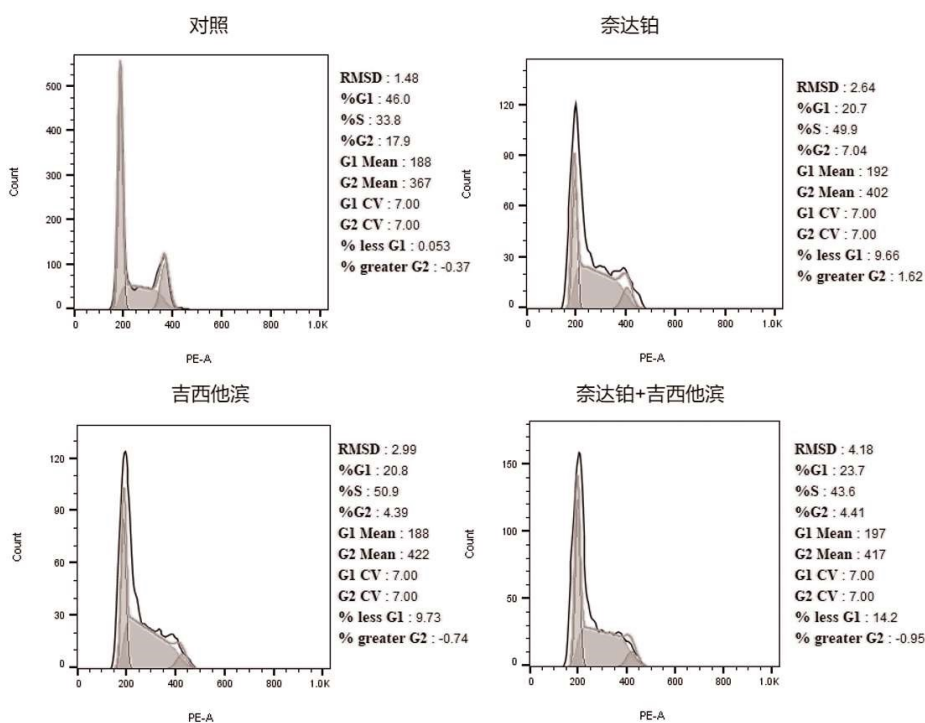


图 5 奈达铂和吉西他滨对 MINO 细胞周期的作用

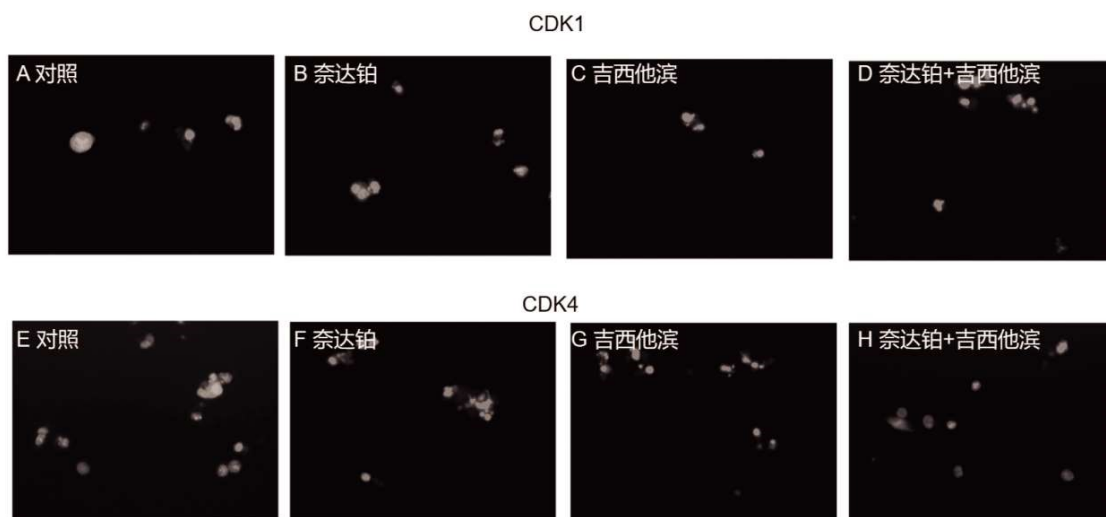


图 6 奈达铂和吉西他滨调节 MINO 细胞 CDK1 和 CDK4 表达

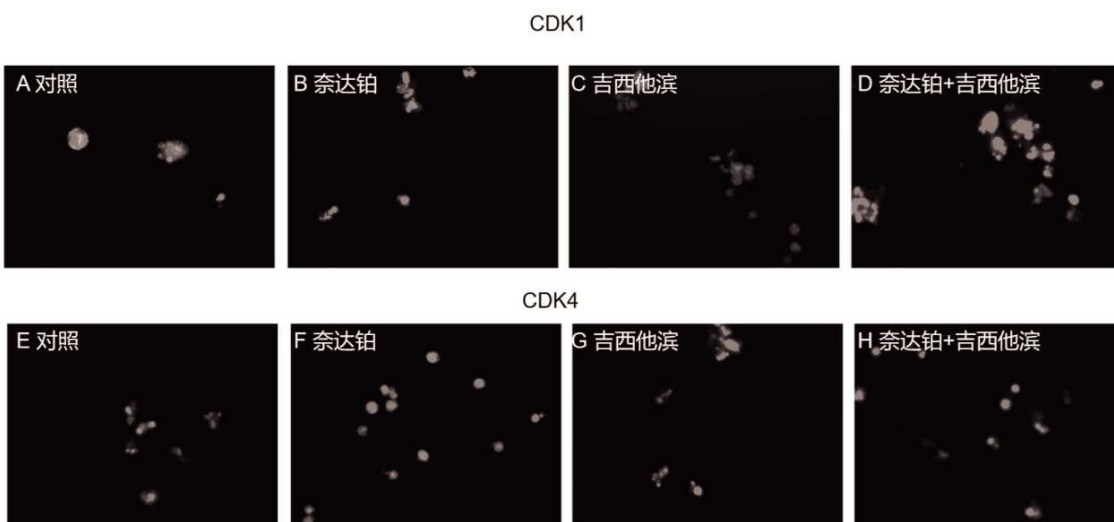


图 7 奈达铂和吉西他滨调节 SU-DHL-4 细胞 CDK1 和 CDK4 表达

3 讨论

本研究使用 MINO 和 SU-DHL-4 两种非霍奇金淋巴瘤细胞株,通过 MTT 实验证实奈达铂和吉西他滨可以抑制两种 NHL 细胞株增殖,并且随着药物浓度增加,抑制增殖率也随之增加。两种药物联合使用相较于单一药物抑制细胞增殖效果更加明显。在此基础上,两种药物也可以阻滞细胞周期,使更多比例的细胞发生 G₂-M 期阻滞。吉西他滨和奈达铂可以诱导 NHL 细胞进入早期凋亡和晚期凋亡,而联合组的晚期凋亡比例进一步提高,提示联合用药可以进一步增强肿瘤细胞的凋亡。奈达铂和吉西他滨诱导细胞周期阻滞通过下调 CDK1 和 CDK4 的表达,免疫荧光结果显示,奈达铂联合吉西他滨降低 CDK1 和 CDK4 表达幅度最显著。

吉西他滨具有细胞周期特异性,主要杀死正在经历 DNA 合成(S 期)的细胞,也可以抑制进展细胞通过 G₁/S 间期。吉西他滨通过其两种活性代谢物抑

制 DNA 复制和合成的多种作用机制发挥其细胞毒作用^[13]。吉西他滨在治疗各类 NHL 中进行了广泛的尝试^[14-16]。研究显示^[17],在胰腺癌中,吉西他滨可以抑制肿瘤细胞增殖和引起 S 期细胞周期阻滞,从而诱导细胞凋亡。本研究中,细胞周期实验显示吉西他滨诱导非霍奇金淋巴瘤细胞发生细胞周期阻滞,对照组细胞占比最高的处于 G₁ 期,而吉西他滨和奈达铂处理后细胞周期最高占比由 G₁ 期转化为 S 期,这提示大部分细胞处于 DNA 合成期,而吉西他滨正好作用于这一时期的细胞,发挥抑制肿瘤的作用。吉西他滨联合铂类化疗药物也是经典的治疗方案选择。有研究比较了吉西他滨联合顺铂与吉西他滨联合奥沙利铂治疗 NHL 的临床疗效,结果表明两个方案的临床有效性相当,但联合奥沙利铂具有更小的副作用和更好的安全耐受性^[18,19]。部分临床研究也探索了奈达铂在 NHL 中的使用。研究表明^[20],替莫唑胺、奈达铂和长春新碱联合使用治疗原发性中枢神经系统淋

巴瘤具有一定的潜力和安全性。Wang H等^[21]研究显示奈达铂处理耐药细胞后凋亡率明显增加,G₂期细胞数也明显增多。本研究探索了奈达铂在 NHL 中的机制研究,从细胞周期相关的通路验证了奈达铂可以抑制细胞周期相关蛋白的表达,诱导细胞凋亡。另外,奈达铂+吉西他滨组的研究结果也显示在 NHL 中奈达铂和吉西他滨具有协同作用,提示两种药物联合治疗 NHL 可能会取得更好的效果。

综上所述,本研究从机制层面证实吉西他滨和奈达铂通过下调细胞周期蛋白依赖激酶 CDK1 和 CDK4 的表达,引起细胞周期阻滞,从而诱导非霍奇金淋巴瘤细胞凋亡,最终抑制细胞增殖,发挥杀伤肿瘤的作用。此外,吉西他滨联合奈达铂的效果优于两者单一药物。

参考文献:

- [1] Hanel W, Epperla N. Evolving therapeutic landscape in follicular lymphoma: a look at emerging and investigational therapies [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 104.
- [2] Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(9): 842-858.
- [3] Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(6): 443-459.
- [4] Lavacchi D, Landini I, Perrone G, et al. Pharmacogenetics in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: Still an unmet challenge [J]. *Pharmacol Ther*, 2021(24): 107924.
- [5] Hawkes EA, Opat S, Hertzberg M. Caution in Expanding the Use of Abbreviated R-CHOP to Poor-Risk Limited-Stage DLBCL [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(35): 4221-4222.
- [6] Bowzyk AI, Naeeb A, Ajithkumar T, Behan S, et al. Non-Hodgkin lymphoma [J]. *BMJ*, 2018(362): k3204.
- [7] Metzger ML, Mauz-Körholz C. Epidemiology, outcome, targeted agents and immunotherapy in adolescent and young adult non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2019, 185(6): 1142-1157.
- [8] Mi M, Zhang C, Liu Z, et al. Gemcitabine, cisplatin, and dexamethasone and ifosfamide, carboplatin, and etoposide regimens have similar efficacy as salvage treatment for relapsed/refractory aggressive lymphoma: A retrospectively comparative study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(49): e23412.
- [9] Batgi H, Basci S, Dal MS. Gemcitabine, dexamethasone and cisplatin (GDP) is an effective and well-tolerated mobilization regimen for relapsed and refractory lymphoma: a single center experience [J]. *Turk J Med Sci*, 2021, 51(2): 685-692.
- [10] Batgi H, Merdin A, Dal MS, et al. The effect of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin chemotherapy in relapsed/refractory NHL and HL patients: A single center experience [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2020, 26(8): 1857-1863.
- [11] Yamasaki S, Kada A, Nagai H, et al. Phase II Trial Using Romidepsin after Gemcitabine, Dexamethasone, and Cisplatin Therapy in Elderly Transplant-Ineligible Patients with Relapsed/Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma: Study Protocol [J]. *Acta Med Okayama*, 2019, 73(5): 469-474.
- [12] Tang LQ, Chen DP, Guo L, et al. Concurrent chemoradiotherapy with nedaplatin versus cisplatin in stage II-IVB nasopharyngeal carcinoma: an open-label, non-inferiority, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(4): 461-473.
- [13] Zhang B, Zhou F, Hong J, et al. Intravesical gemcitabine for non-muscle invasive bladder cancer [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 6(6): CD009294.
- [14] Li H, Cui R, Ji M, et al. CUDC-101 enhances the chemosensitivity of gemcitabine-treated lymphoma cells [J]. *Leuk Res*, 2021(106): 106575.
- [15] Balzarotti M, Magagnoli M, Canales MA, et al. A phase Ib, open-label, dose-escalation trial of the anti-CD37 monoclonal antibody, BI 836826, in combination with gemcitabine and oxaliplatin in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(4): 1028-1035.
- [16] Qi F, Chen B, Wang J, et al. Upfront radiation is essential for high-risk early-stage extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: comparison of two sequential treatment modalities combining radiotherapy and GDP (gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin) in the modern era [J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60(11): 2679-2688.
- [17] Namima D, Fujihara S, Iwama H, et al. The Effect of Gemcitabine on Cell Cycle Arrest and microRNA Signatures in Pancreatic Cancer Cells [J]. *In Vivo*, 2020, 34(6): 3195-3203.
- [18] Zhang XX, Wang BR, Tao WG, et al. Comparison of the efficacy and impact of GEMOX and GDP in the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma [J]. *J BUON*, 2020, 25(2): 1042-1049.
- [19] Zhang R, Lyu C, Lu W, et al. Synergistic effect of programmed death-1 inhibitor and programmed death-1 ligand-1 inhibitor combined with chemotherapeutic drugs on DLBCL cell lines in vitro and in vivo [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(9): 2800-2812.
- [20] Wang Y, Liu BY, Xu DZ, et al. Phase II trial of temozolomide plus concurrent whole-brain radiation followed by TNV regimen as adjuvant therapy for patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma [J]. *Neurol India*, 2013, 61(3): 260-264.
- [21] Wang H, Zhu XL, Huang J, et al. Nedaplatin sensitization of cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4): 2566-2572.

收稿日期: 2021-07-21; 修回日期: 2021-08-05

编辑/成森