论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1236-04

奥沙利铂抗人肝癌细胞株QGY增殖及其机制的研究

何 松[1],左国庆[1],张 燕[1],汤为学[2] (重庆医科大学:[1]附属第二医院消化内科,重庆 400010,[2]病理生理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 观察抗肿瘤药物奥沙利铂对人肝癌细胞株QGY体外增殖的影响并探讨其机制,为其能否应用于肝癌的临床治疗提供理论依据。**方法** 采用人肝癌细胞株QGY作为研究对象,MTT法检测不同浓度和作用时间的奥沙利铂对细胞增殖的抑制效应;光镜及透射电镜观察细胞形态和超微结构的改变;流式细胞仪分析细胞周期的分布及凋亡;免疫细胞化学法检测细胞周期蛋白及凋亡相关基因蛋白的表达。**结果** 奥沙利铂对QGY细胞的增殖均有抑制作用而且呈时间和剂量依赖性。光镜观察发现细胞体积缩小,变圆,胞浆浓缩,核固缩深染,呈现凋亡早期的形态学改变。电镜可见凋亡细胞及凋亡小体。流式细胞仪检测到细胞阻滞于细胞周期的S期和G_2/M期,G_0/G_1期细胞减少及凋亡峰。奥沙利铂作用72 h后,免疫细胞化学表明cyclin A、Bax表达增强,突变型P53蛋白(MTP53)、Bcl-2、Myc表达减弱,Fas表达无差异。**结论** 奥沙利铂对QGY肝癌细胞的增殖都有一定的抑制作用,阻滞细胞周期于S期及G_2/M期,它通过上调Bax的表达,下调MTP53、Bcl-2、Myc的表达而诱导细胞凋亡,该药可能不是通过Fas途径诱导细胞凋亡。

关键词:奥沙利铂;肝癌;增殖
中图法分类号:R73-36;R735.7;R979.1 **文献标识码**:A

Mechanism of supression on proliferation of human hepatoma cell line QGY by oxaliplatin

HE Song[1], ZUO Guo-qing[1], ZHANG Yan[1], TANG Wei-xue[2] ([1]Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing 400010; [2]Department of Pathophysiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effects of oxaliplatin on proliferation in human hepatoma cell lines QGY *in vitro* and investigate the mechanism. To provide the theory foundation whether it can be used for the chemotherapy of hepatocellular carcinoma. **Methods** The inhibition of proliferation in QGY cell was estimated by MTT-test. Morphologic changes were observed under light microscope and electronic microscope. Distribution of cell cycle and apoptosis was analyzed using flow cytometry. The expression of cell cycle protein and apoptosis-associated gene protein was detected with immunohistochemical technique. **Results** Oxaliplatin could inhibit the proliferation of QGY cells and the inhibition depended on the exposure time and dose. The cells showed morphologic changes at the early stage of apoptosis under the light microscope: the shrunk and round cells, condensed cytoplasma and pycnosis nucleus. Apoptotic cells and apoptotic body could be found under the transmission electronic microscope. The analysis of cell cycle indicated that oxaliplatin blocked cells at S and G_2/M phases and the cells of G_0/G_1 phase reduced. When treated with oxaliplatin for 72 h, the expression of cyclin A and Bax were up-regulated, mutant type P53, Bcl-2 and Myc down-regulated, and Fas was not changed. **Conclusion** Oxaliplatin could inhibit proliferation of the hepatoma cell lines. Cell cycle blocked at S and G_2/M phase. The apoptosis were related to the up-regulation of Bax and down-regulation of mutant type P53, Bcl-2 and Myc. It could not induce apoptosis through the Fas approach.

Key words: Oxaliplatin; hepatocellular carcinoma; proliferation

奥沙利铂(Oxaliplatin, L-OHP)是第3代铂类化合物,其化学名为左旋反式二氨环己烷草酸铂,国际通用名为草酸铂。临床前期研究表明该药对人和鼠多种肿瘤细胞均有抑制作用,且对各种顺铂耐药的肿瘤细胞株无交叉耐药。大量临床资料表明,奥沙利铂治疗多种类型肿瘤时无论单用或联合应用都有较高的疗效,

基金项目:重庆市卫生局医学科研资助重点项目(2001)
Supported by the Key Program for Sci & Tech Research of Public Health Bureau of Chongqing (2001)
作者简介:何 松(1965-),男,海南省琼中县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝癌的基础和临床方面的研究。电话:(023)63784311,E-mail: hedoctor65@sina.com
收稿日期:2004-06-10;修回日期:2005-04-28

耐受性好而且毒副作用小,化疗指数高,安全范围广。但奥沙利铂在体内外对人肝肿瘤的研究国内外少有报道,因此本研究通过抗肿瘤药物奥沙利铂对人肝癌细胞株 QGY 体外增殖的影响,为奥沙利铂应用于肝细胞癌的临床治疗提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株　　QGY 细胞株,由重庆医科大学附属第二医院肝炎研究所提供,在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中于 37 ℃,5% CO_2 条件下培养。

1.1.2　主要试剂　　奥沙利铂由江苏恒瑞医药股份有限公司生产,分子量为 397.29,使用时用 5% 葡萄糖注射液稀释至所需的药物浓度。RPMI1640 培养基和胰酶均为 GIBCO 公司生产。新生小牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司生产。四甲基偶氮唑盐(MTT)由上海华舜生物工程有限公司生产。突变型 p53、Bcl-2、Bax、Fas 购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.3　仪器　　透射电子显微镜为 Hitachi-600 型(日本),全自动酶标读数仪为 Bio-Rad2550 型(美国),流式细胞仪为 FACScan Becton Dickinson(美国),倒置显微镜为 OLYMPUS(日本)。

1.2　方法

1.2.1　奥沙利铂对 QGY 细胞的作用效应　　应用 MTT 比色法[1],选取对数生长期的 QGY 细胞,用 0.1% 胰蛋白酶消化,加入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液制备成浓度为 5×10^4/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl。实验设试剂对照组,肿瘤细胞对照组及 5 个实验组(加入 20 μl/孔奥沙利铂,使其终浓度分别为 16、32、64、128、256 μmol/L),每组设 8 个平行孔,于 37 ℃,5% CO_2 条件下分别培养 24、48、72 h。取出离心、吸除各孔原液,加 200 μl/孔 RPMI1640 培养液及 20 μl/孔 MTT 液,于 37 ℃,5% CO_2 条件下继续培养。4 h 后离心、吸出各孔原液,加 DMSO 200 μl/孔,在自动酶标读数仪上以 570 nm 波长测定各孔 D(570)值。根据下列公式计算奥沙利铂对 QGY 细胞的抑制率:

抑制率(f_a) = [1 − 实验组平均 D(570)值/细胞对照组平均 D(570)值] × 100%

按中效方程式计算出中效浓度(IC_{50})[2]: $f_a/f_u = (D/D_m)^m$

f_a 为抑制率,f_u(存活率) = 1 − f_a,D 为药物浓度,D_m 为中效浓度即抑制率为 0.5 时所需药物浓度,m 为斜率。

1.2.2　奥沙利铂作用后 QGY 细胞形态的改变　　电镜观察,取对数生长期的 QGY 细胞分别加入两个 100 ml 培养瓶中,使每瓶细胞数为 1×10^6 个,一瓶为阴性对照,另一瓶加入 1/2 中效浓度的奥沙利铂 2 ml,于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 72 h,0.1% 胰蛋白酶消化,收集所有细胞,加入 PBS 洗涤,离心后,吸尽上清液,缓慢加入 4% 戊二醛,固定细胞 2 h。用 PBS 冲洗后,1% 锇酸固定 1 h 再用丙酮梯度脱水,618 环氧树脂包埋,超薄切片做成铜网。经醋酸铀、枸橼酸铅染色后,透射电镜观察、拍照。

1.2.3　奥沙利铂作用后 QGY 细胞周期的改变　　采用流式细胞仪分析方法,实验细胞处理同电镜,收集细胞后加入 70% 乙醇(4 ℃预冷)固定,碘化丙啶(PI)染色 30 min。用 FACScan Becton Dickinson 流式细胞仪作流式细胞分析,汞激发波长为 488 nm,并用 Modfit LT2.0 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。

1.2.4　奥沙利铂作用后 QGY 细胞凋亡相关基因蛋白表达的改变　　采用免疫组织化学法,取对数生长期的 QGY 细胞用 0.1% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,以 5×10^4/ml 浓度接种于装有盖玻片的 24 孔板中,每孔 1 ml,处理组加入 1/2 中效浓度的奥沙利铂 100 μl/孔,于 37 ℃,5% CO_2 条件下培养。72 h 后取出贴有细胞的盖玻片,用 PBS 冲洗 3 次,95% 的乙醇固定 30 min,按照 S-P 试剂盒说明进行操作,PBS 代替一抗作为阴性对照,DAB 染色,苏木精复染,中性树胶封片。结果分析:排除爬片边缘细胞,10 × 10 低倍镜下随机选取 10 个细胞均匀分布的视野,10 × 20 中倍镜下每个视野随机选 50 个细胞。按着色强弱分为 4 个等级:无着色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。按公式 HSCORE = $\sum$Pi(i + 1)(i = 0 或 1 或 2 或 3;Pi 表示评分为 i 的比例)计算 HSCORE 得分[3]。

1.3　统计学处理

用 SPSS 10.0 软件包进行多组比较方差分析。两样本均数比较采用成组 t 检验,不同处理组率的比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　奥沙利铂对 QGY 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测不同浓度的奥沙利铂作用人肝癌细胞株不同时间,对细胞增殖的抑制作用如表 1 所示。结果表明:奥沙利铂对肝癌细胞株 QGY 的增殖有明显的抑制作用。抑制率随着药物浓度的增加而增加,有剂量依赖关系;随着作用时间的延长而增加,有时间依赖关系。到一定程度浓度,随着奥沙利铂浓度的增加,抑制率增加不再明显,呈现平台效应。

根据 MTT 结果及中效方程式计算奥沙利铂的中效浓度(IC_{50}),作用 QGY 细胞 72 h 的中效浓度为 10 μmol/L。

表 1　MTT 法检测奥沙利铂对 QGY 细胞增殖的抑制率($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The inhibition rate of proliferation in QGY cells treated with oxaliplatin by MTT-test($\bar{x}\pm s$)

Oxaliplatin concentration	24 h	48 h	72 h	F	P
16 μmol/L	0.189 9 ± 0.056 1	0.390 3 ± 0.013 5	0.557 9 ± 0.032 1		
32 μmol/L	0.213 6 ± 0.038 4	0.607 3 ± 0.061 9	0.687 2 ± 0.028 0		
64 μmol/L	0.275 5 ± 0.075 2	0.743 7 ± 0.016 4	0.758 0 ± 0.017 8	349.179	< 0.01
128 μmol/L	0.605 9 ± 0.017 5	0.817 8 ± 0.041 4	0.845 9 ± 0.020 8		
256 μmol/L	0.715 3 ± 0.004 9	0.844 0 ± 0.035 6	0.861 2 ± 0.031 4		

2.2　奥沙利铂作用后 QGY 细胞形态的改变

HE 染色后进行光镜观察,可见 QGY 细胞形态出现了明显的改变,对照组细胞呈梭形或星形,形态饱满,胞浆较丰富,嗜伊红,细胞核大,异型性明显。细胞经 1/2 中效浓度的奥沙利铂处理后,出现细胞体积缩小、细胞间连接减少,胞浆浓缩,核固缩深染,呈现凋亡早期的形态学改变。

2.3　奥沙利铂作用后 QGY 细胞超微结构的改变

对照组 QGY 电镜观察细胞膜完整,细胞体积大,表面可见微绒毛;细胞核大,表面畸形,核仁明显,可见有多个核仁,常染色质均匀;胞浆内可见核糖体及线粒体(图 1)。药物处理后,QGY 细胞皱缩,胞浆浓缩、碎裂,形成含有胞质的凋亡小体,此特征符合典型的细胞凋亡形态学变化(图 2)。

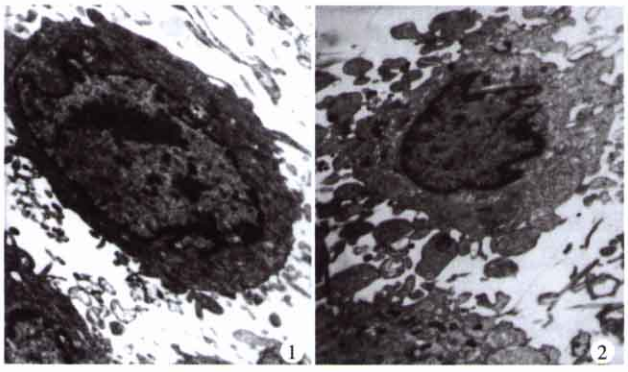


图1 未作药物处理的QGY细胞，核大，畸形，表面可见微绒毛（TEM×8 000）

Fig 1 Untreated QGY cells with large irregular nucleus and microvillus （TEM×8 000）

图2 奥沙利铂作用QGY细胞72 h后，形成凋亡小体 （TEM×8 000）

Fig 2 Apoptotic body formed after treated with oxaliplatin for 72 h （TEM×8 000）

2.4 奥沙利铂作用后对QGY细胞周期分布及凋亡的影响

QGY细胞经1/2中效浓度的奥沙利铂处理24、48、72 h后，收集各组细胞，采用PI染色，用流式细胞仪检测细胞凋亡并进行细胞周期分析，结果如表2所示。

表2 奥沙利铂对QGY细胞周期分布及凋亡的影响（%）

Tab 2 Effects of oxaliplatin on cell cycle and apoptosis in QGY cell line（%）

Cell circle	Control groups			Oxaliplatin treated group		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
G_0/G_1	67.66	63.67	68.57	36.40	6.39	5.04
S	26.56	28.33	26.78	60.19	76.94	74.67
G_2/M	5.78	8.00	4.65	3.41	16.68	20.29
Apoptosis	0	0	0	7.32	8.28	10.40

经χ^2检验，各细胞周期$P<0.01$。不同时间未用药组和药物处理组的凋亡峰$P<0.01$。

奥沙利铂作用QGY细胞24 h，细胞周期被阻滞于S期，G_0/G_1期细胞减少。48 h及72 h均被阻滞于S期和G_2/M期，但以S期为主，该期比例达到74.67%。奥沙利铂处理QGY细胞24、48、72 h后，其凋亡率分别为7.32%，8.28%，10.40%，呈现时间依赖性。

2.5 奥沙利铂作用后QGY细胞周期蛋白及凋亡相关基因蛋白表达的改变

用免疫细胞化学法检测细胞周期相关蛋白Cyclin A和凋亡有关的蛋白MTP53、Bcl-2、Bax、Myc、Fas。Cyclin A定位在胞核中；MTP53阳性表达见于胞核（图3、4）；Bcl-2、Bax及Fas定位在胞浆中；Myc的阳性表达可见于胞浆和胞核。QGY细胞在奥沙利铂作用72 h后，免疫细胞化学表明Cyclin A、Bax表达增强（$P<0.01$），MTP53、Bcl-2及Myc表达减弱（$P<0.01$），Fas表达无明显差异（$P>0.05$）（表3）。

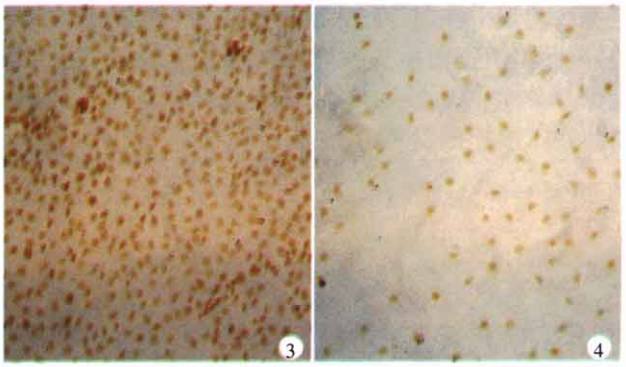


图3 对照组QGY细胞中MTP53强阳性表达 （S-P×200）

Fig 3 Strong positive expression of mutant type protein 53 in control group of QGY cells （S-P×200）

图4 奥沙利铂作用72 h后QGY细胞中MTP53弱阳性表达 （S-P×200）

Fig 4 Weak positive expression of mutant type protein 53 in oxaliplatin treatment group for 72 h （S-P×200）

表3 奥沙利铂对QGY细胞周期蛋白及凋亡相关基因蛋白表达的影响（HSCORE）（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 The expression of cell cycle protein and apoptosis-associated gene protein in QGY cell line treated with oxaliplatin （HSCORE）（$\bar{x}\pm s$）

Antibody	Sample	Control	Oxaliplatin treatment	t	P
Cyclin A	20	2.820±0.020	2.935±0.019	9.356	<0.01
MTP53	20	2.771±0.009	2.502±0.007	10.60	<0.01
Bcl-2	20	2.787±0.005	2.669±0.005	5.255	<0.01
Bax	20	2.367±0.102	2.726±0.005	15.31	<0.01
Myc	20	2.675±0.007	2.520±0.008	4.729	<0.01
Fas	20	2.686±0.011	2.675±0.029	1.200	>0.05

3 讨论

大量体外研究已证明，有许多抗癌药物的抗肿瘤作用不是杀伤肿瘤细胞而是诱导肿瘤细胞凋亡或两种形式并存。由于药物杀伤肿瘤细胞可导致细胞坏死，产生严重的炎症反应，因此，诱导肿瘤细胞凋亡也成为现代抗肿瘤药物治疗的新策略。奥沙利铂作为第3代铂类化合物，与其它铂类药物相似，其作用机制主要是使肿瘤细胞内DNA形成链间和链内交联，从而中断DNA合成，最终产生细胞毒和抗肿瘤活性。对于其是否能诱导人肝癌细胞凋亡，国内外尚少见报道。

本研究采用了4种方法观察了奥沙利铂对QGY细胞体外增殖的影响，发现不同浓度的奥沙利铂对QGY细胞均有明显的抑制作用并且呈时间和剂量依赖性；流式细胞仪显示，细胞阻滞于S期和G_2/M期细胞增加，G_0/G_1期细胞减少，出现凋亡峰；电镜可以找到凋亡小体，证明了一定浓度的奥沙利铂可诱导QGY

细胞凋亡。

细胞凋亡区别于细胞坏死的重要标志之一就是受基因调控，肿瘤的发生通常被认为是细胞原癌基因的激活和抑癌基因的失活，从而扰乱了细胞正常的增殖与分化及正常的凋亡调控，从而导致肿瘤的形成。

p53 基因是最重要的细胞凋亡调控基因之一。大量研究表明 p53 基因突变在肝癌的发生发展中起重要作用，对凋亡的影响可能是其机制之一。目前认为可能与 p53 基因突变失去了对细胞增殖的监视功能，使突变细胞自我破坏的正常通道被阻断，诱导细胞凋亡的能力下降有关。本研究表明，经奥沙利铂作用 72 h 后，QGY 细胞的突变型 p53 基因表达减弱。

Bcl-2 是最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因，定位于 18 号染色体，在淋巴瘤中易位到 14 号染色体的免疫球蛋白重链基因的控制之下呈过高表达，这并不影响细胞增殖和加速细胞分裂，而是通过延长肿瘤细胞生存，阻止细胞凋亡的发生。Bcl-2 的基因上游有 p53 蛋白结合位点的元件而抑制 p53 基因表达。换言之，p53 蛋白作为反式转录因子，可抑制 Bcl-2 基因表达[4]。Bax 基因为 Bcl-2 家族中的一员，与 Bcl-2 家族其它成员的氨基酸同源表现在高度保守的 BH1 和 BH2 结构域。Bcl-2 家族通常以二聚体的形式发挥作用，Bax 和 Bcl-xs 能拮抗 Bcl-2 或 Bcl-xl 的抗凋亡作用，当 Bcl-2 或 Bcl-xl 过量时，细胞免遭凋亡；反之，当 Bax 同源二聚体占优势时，细胞易于在诱导剂的作用下发生凋亡[5]。本研究结果显示 Bcl-2 基因加药组较对照组表达减弱，Bax 基因表达增强，表明奥沙利铂诱导 QGY 细胞凋亡的作用与 Bax 的表达增加，抑制 Bcl-2 的表达，从而改变 Bcl-2/Bax 比例有关。

Fas/FasL 途径是目前发现细胞凋亡的两条死亡信号转导途径之一，Fas 主要通过相应配基或抗 Fas 抗体来引发凋亡。现已证明一些药物诱导肿瘤细胞的 Fas 表达，是药物杀伤癌细胞的机制之一，如顺铂、阿霉素等使 Fas 上调并可能克服癌细胞的耐药性。本研究中奥沙利铂作用前后 Fas 表达无明显差异，提示奥沙利铂诱导 QGY 细胞凋亡的作用与 Fas 无关。

综上所述，奥沙利铂具有一定的诱导肝癌细胞凋亡的作用，上调促凋亡基因 Bax、和下调凋亡抑制基因突变型 p53、Bcl-2 的表达可能是其诱导凋亡的分子机制，但该药不能通过 Fas /FasL 途径诱导肝癌细胞凋亡，其具体机制还有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] 汤为学，骆云鹏，王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报，1992，17(2)：103－108.

[2] Chou T C，Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships：the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors[J]. Adv Enzyme Regul，1984，22(1)：27－30.

[3] Harrington D J，lessey B A，Rai V. *et al*. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis[J]. J Pathol，1999，187(2)：242－248.

[4] 彭黎明，王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2000. 2－9.

[5] 杨连军，王文亮，司晓辉. 乙醇诱导的肝癌细胞 HCC-9204 凋亡及其与 Bax 和 Bcl-2 蛋白的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2001，17(4)：315－317.

（编辑　薛国文）

（上接 1235 页）

定期清理鼻腔，患者鼻-鼻窦粘膜逐渐恢复正常，术后 1 年术腔无干痂及异常分泌物，患者无鼻塞等不适。

鼻呼吸影面积测量结果：对照组鼻呼吸影面积（S）值是（14.37 ± 2.85）cm^2；手术组术前、术后 3 个月、术后 1 年 S 值分别是（13.92 ± 3.28）cm^2、（12.59 ± 2.91）cm^2 和（14.28 ± 3.15）cm^2。对照组、手术组术前、术后 S 值相比均无显著性差异（$P > 0.05$）。

3　讨论

1990 年，Kennedy 首创内镜下经鼻眶减压术。该技术的操作关键是在内镜下经鼻切除筛窦外侧壁和部分眶底骨壁，使眶内容向开放的筛窦及上颌窦内疝入。眶内容物疝入到鼻-鼻窦腔，鼻腔的形态及体积会产生一定的改变。鼻阻力是鼻通气功能的重要标志，应用冷镜法测量鼻通气功能，可客观地测出鼻阻塞程度的定量近似数值，操作方便、简单，测试时不改变鼻内解剖形态、不影响正常生理功能，结果有重复性，数据稳妥可靠。

影响鼻阻力的最主要因素是鼻腔最小横截面积，其主要位于鼻瓣区。内镜下眶减压术对鼻瓣区结构几乎无影响，故对鼻腔通气功能的影响小，本研究资料显示，术后早期患者均有一定程度的鼻塞，是因为正常情况下人们对鼻阻力的感知不仅需要气流通过鼻腔，而且需要正常鼻腔粘膜对通过气流的正常感觉。术后早期再生的鼻粘膜感觉迟钝，鼻-鼻窦腔粘膜术后反应亦可碍鼻腔对气流的感觉，影响检测结果。

关键词：鼻通气功能；眼疾病；减压术

中图法分类号：R765.041　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 张龙城，蒋仁晶，门小光，等. 鼻内镜下经鼻眶减压术治疗甲状腺机能障碍性眶病[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，2002，37(6)：447－449.

[3] 许世发，杨大俊，许德珠，等. 正常人和几种常见鼻病鼻通气功能的测定[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，1990，4(1)：18－20.

（编辑　王　红）