文章编号:1000-5404(2006)18-1873-03

论著

紫杉醇联合肿瘤坏死因子α诱导腺样囊性癌细胞凋亡的体外研究

董 青[1],杨湲波[2],王 琳[1],吴文慧[1],白宇宏[1],梁永强[1] ([1]华北煤炭医学院口腔系,[2]唐山市工人医院口腔科,唐山 063000)

提 要:目的 探讨人肿瘤坏死因子-α(TNF-α)联合紫杉醇对人腺样囊性癌细胞系SACC-83的抑制增殖作用、作用机制以及与细胞凋亡的关系,为化疗与生物治疗联合应用治疗腺样囊性癌提供实验依据。**方法** 将人腺样囊性癌细胞系SACC-83和对照组原代培养鼠肺成纤维细胞根据不同药物浓度分为9组,药物作用72 h。MTT法检测细胞增殖抑制率;流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期改变;观察凋亡细胞形态变化。**结果** 联合用药组的细胞增殖抑制率显著高于单独用药组($P<0.05$)。L929细胞各组的细胞增殖抑制率显著低于SACC-83细胞($P<0.05$)。**结论** TNF-α联合紫杉醇对SACC-83细胞增殖的抑制作用以及诱导凋亡具有协同作用。

关键词:紫杉醇;肿瘤坏死因子α;腺样囊性癌;凋亡
中图法分类号:R282.71;R73-36;R730.261 **文献标识码**:A

Apoptosis of salivary adenoid cystic carcinoma cells induced by TNF-α and paclitaxel

DONG Qing[1], YANG Yuan-bo[2], WANG Lin[1], WU Wen-hui[1], BAI Yu-hong[1], LIANG Yong-qiang[1] ([1]Department of Stomatology, North China Coal Medical College, [2]Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To explore the apoptosis mechanism of salivary adenoid cystic carcinoma cells (SACC-83) induced by recombinant human tumor necrosis factor-α(rhTNF-α) and paclitaxel. **Methods** The SACC-83 cells were treated with rhTNF-α alone, paclitaxel alone, or combination at different doses for 72 h. Primary cultured neonatal mice spleen fibroblast cells (L929 cells) served as control. The inhibitory ratio of cell proliferation was detected by MTT. The percentage of apoptotic cells and cell cycle distribution were detected by flow cytometry. The cell morphological change of apoptosis was observed. **Results** The inhibition ratio of cell proliferation was significant higher single drugs groups than in either single drug groups ($P<0.05$). The inhibitory ratio of cell proliferation of every group of L929 cell was significant lower than that of SACC-83 cell ($P<0.05$). **Conclusion** TNF-α is synergetic with paclitaxel in inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis in SACC-83 cells.

Key words: paclitaxel; tumor necrosis factorα; adenoid cystic carcinoma; apoptosis

紫杉醇(paclitaxel)是从紫杉(红豆杉)的树皮中提取的一种化合物,是近年来研究开发出的一类化学结构新颖、作用机制独特的新型抗肿瘤药[1]。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)是一种具有多种生物学功能的细胞因子,具有抗肿瘤的特性。腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma,SACC)是涎腺肿瘤中发病率较高的的恶性肿瘤,易侵犯神经,早期肺转移。为了克服化疗药物与细胞因子在抗肿瘤作用中各自的不足,在本研究中,我们通过体外实验,探讨TNF-α联合紫杉醇对腺样囊性癌细胞的抑制增殖作用、作用机制以及与细胞凋亡的关系,以期为化疗与生物治疗联合应用治疗腺样囊性癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品

重组人肿瘤坏死因子-α(rhTNF-α),北京宝赛生物公司产品,紫杉醇为海口制药厂产品。

1.2 实验材料

人涎腺腺样囊性癌细胞系(SACC-83):由北京大学口腔医学院外科实验室提供。新生鼠肺成纤维细胞(L929)取自新生鼠肺组织,原代培养获得。

1.3 实验动物

新生BALB/c乳鼠8只,体质量1.8~2.1 g,由华北煤炭医

作者简介:董 青(1974-),女,河北省邯郸市人,硕士,讲师,主要从事口腔组织病理学方面的研究。电话:(0315)3725038,E-mail:dq514@163.com

收稿日期:2005-07-25;修回日期:2006-06-08

学院实验动物中心提供。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 SACC-83 常规贴壁培养。原代培养 L929：取新生乳鼠的新鲜肺组织，用含双抗的 D-Hanks 液冲洗，剪碎，37 ℃ 0.25% 胰蛋白酶消化 15 min，离心，弃上清，加入培养液，充分吹打，37 ℃恒温培养。

1.4.2 MTT 法 将处于对数增殖期的密度为 4×10^4/ml 的 SACC-83 细胞与 L929 细胞分别接种于 96 孔板中，每孔 200 μl，37 ℃静止过夜。分组：于 96 孔板中加药，共分 9 个组，每组设 6 个复孔，加药剂量如下。另设无细胞空白组，仅加入培养液作为对照组。①对照组：加入不含药物的培养液；②T 组：rhTNF-α 终浓度为 150 U/ml；③T′组：rhTNF-α 终浓度为：1 500 U/ml；④P 组：紫杉醇的终浓度为 10% 血浆峰值浓度[2]（0.365 μg/ml）；⑤P′组：紫杉醇的终浓度为血浆峰值浓度（0.365 μg/ml）；⑥T + P 组：含有终浓度 rhTNF-α 150 U/ml 和紫杉醇 10% 血浆峰值浓度；⑦T + P′组：含有终浓度 rhTNF-α 150 U/ml 和紫杉醇血浆峰值浓度；⑧T′ + P 组：含有终浓度 rhTNF-α 1 500 U/ml 和紫杉醇 10% 血浆峰值浓度；⑨T′ + P′组：含有终浓度 rhTNF-α1 500 U/ml 和紫杉醇血浆峰值浓度。

培养 72 h 后，每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液20 μl，放 37℃培养 4 h。弃上清，每孔加入 DMSO 100 μl，振荡10 min，使结晶物充分溶解。放入酶联免疫检测仪中，在波长 570 nm 测定各孔的光吸收值[D(570)]。各孔的 D(570) 值以无细胞空白组的 D(570) 值调零。

计算细胞增殖抑制率 =[1 − 加药组 D(570) 值/对照组 D(570) 值] × 100%，实验重复 3 次。

1.4.3 光镜观察 将处对数生长期的 SACC-83 细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔板中，放孵育箱中培养 24 h，细胞爬片后加药，分组及加药剂量同前。培养 72 h 后，取出盖玻片，常规苏木精染色，于光镜下观察细胞核形态改变。

1.4.4 流式细胞仪定量分析 分别将处对数生长期的 SACC-83 细胞与 L929 细胞接种于培养瓶中，放孵育箱中培养 24 h，分组及加药剂量同前，每组均设 4 个培养瓶做重复实验。培养 72 h 后，消化并收集细胞，冷 70% 乙醇固定，4 ℃保存过夜，离心去乙醇，加入溴化乙啶 1 ml，4 ℃染色 30 min，在 Epics-XLII 型流式细胞仪上作定量检测，激发波长为 488 nm。用 Mu-.ticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期拟合分析。

1.5 统计学分析

全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 9.0 统计学软件进行方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 细胞的形态学特征

2.1.1 SACC-83 细胞系的形态学特征 SACC-83 细胞单层生长，胞体较大，呈上皮样多角形镶嵌状排列，可见较多核分裂像（图 1）。加入 TNF-α 72 h 后，SACC-83 细胞形态发生变化，细胞大多呈梭形或细长形，类似于成纤维细胞，形态相对规则，核质比例减小。细胞堆集生长现象减少，大多散在生长，呈放射状、漩涡状分布，多边形镶嵌样生长状态逐渐消失（图 2）。

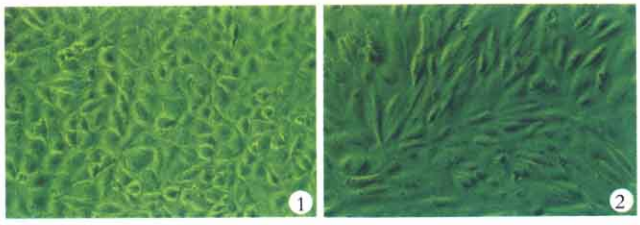


图 1 SACC-83 细胞的形态学特征 （LM × 200）

图 2 TNF-α 诱导 SACC-83 细胞分化的形态学特征 （倒置显微镜 × 200）

2.1.2 L929 细胞的形态学特征 细胞贴壁生长，呈漩涡状分布。细胞体呈梭形，细胞质向外伸出 2 ~ 3 个长短不同的突起。

2.2 MTT 法

联合用药组的细胞增殖抑制率显著高于单独用药组（$P < 0.05$）。L929 细胞各组的细胞增殖抑制率显著低于 SACC-83 细胞（$P < 0.05$）。见表 1。

表 1 SACC-83 细胞与 L929 细胞各组 MTT 结果

组别	SACC-83		L929[b]	
	D(570)	抑制率%	D(570)	抑制率%
对照组	0.604 ± 0.067	0.00	0.441 ± 0.122	0.00
T 组	0.462 ± 0.056	23.54	0.445 ± 0.028	-0.98
T′组	0.469 ± 0.051	22.41	0.476 ± 0.042	-8.06
P 组	0.354 ± 0.042	41.42	0.364 ± 0.075	17.44
P′组	0.313 ± 0.037	48.26	0.322 ± 0.068	26.83
T + P 组	0.268 ± 0.078	55.68[a]	0.423 ± 0.035	3.90
T + P′组	0.255 ± 0.076	57.86[a]	0.347 ± 0.052	21.26
T′ + P 组	0.271 ± 0.103	55.19[a]	0.443 ± 0.052	-0.61
T′ + P′组	0.225 ± 0.069	62.72[a]	0.348 ± 0.037	20.96

a：$P < 0.05$，与单独用药组比较；b：$P < 0.05$，与 SACC-83 比较

2.3 光镜下观察

肿瘤细胞圆形、多边形，细胞核圆形，居中，核分裂象易见。实验组中可见部分 SACC-83 细胞及细胞核体积缩小，染色质浓缩或边集，成块状或新月状，细胞质固缩（图 3）。对照组的 SACC-83 细胞成片排列，细胞质及核染色质均匀，未见凋亡细胞（图 4）。

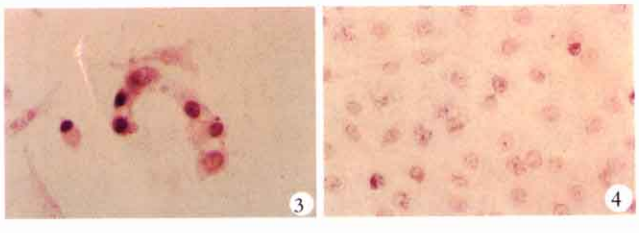


图 3 实验组 SACC-83 细胞光镜观察 （HE × 400）

图 4 对照组 SACC-83 细胞的光镜观察 （HE × 200）

2.4 流式细胞仪分析

凋亡率：检测 SACC-83 细胞各加药组均有凋亡峰形成，其

中 T + P′组与 T′ + P′组的细胞凋亡率高于其他实验组（$P < 0.05$）。L929 细胞各组无凋亡峰形成，各组凋亡率均低于 SACC-83 细胞各组（$P < 0.05$）；细胞周期改变：SACC-83 和 L929 细胞加入紫杉醇的实验组 G_2M 期细胞数目较对照组和 T 组、T′组发生了明显的增多（$P < 0.05$）。见表 2。

表 2　SACC-83 细胞与 L929[b] 细胞各组流式细胞术结果

组别	凋亡率（%，$\bar{x} \pm s$）	
	SACC-83	L929[b]
对照组	3.90 ± 0.40	0.83 ± 0.08
T 组	2.25 ± 0.45	0.43 ± 0.09
T′组	2.63 ± 0.48	2.51 ± 0.45
P 组	12.17 ± 1.92	3.03 ± 1.02
P′组	16.12 ± 2.03	1.57 ± 0.85
T + P 组	15.60 ± 2.20	1.38 ± 0.63
T + P′组	21.63 ± 2.11[a]	2.45 ± 1.08
T′ + P 组	16.43 ± 1.98	2.06 ± 0.52
T′ + P′组	25.25 ± 4.35[a]	2.44 ± 1.85

a：$P < 0.05$，与 SACC-83 其他组比较；b：$P < 0.05$，与 SACC-83 比较

3　讨论

rhTNF-α 可诱导涎腺腺样囊性癌细胞凋亡[3]，体外、内实验均证实了紫杉醇不仅对腺样囊性癌有较强抗癌作用，而且有很好的抗癌特异性[4]。本实验显示 TNF-α 可以抑制 SACC-83 细胞增殖，除可诱导 SACC-83 细胞发生凋亡以外，还对 SACC-83 细胞具有诱导分化作用，加入 TNF-α 72 h 后，SACC-83 细胞形态发生变化，细胞大多呈梭形或细长形，类似于成纤维细胞，形态相对规则，核质比例减小。细胞堆集现象减少，大多散在生长，呈漩涡状分布，多边形镶嵌样生长状态逐渐消失，显示了癌细胞向终末分化，已具备一些成熟细胞的特征。T 组和 T′组凋亡率低于对照组，可能是由于 SACC-83 细胞在 TNF-α 诱导下，肿瘤细胞的一些异常标志发生修正和变异，开始向正常细胞分化，因而细胞的增殖率和凋亡率都有所降低。

本实验中紫杉醇与 TNF-α 联合应用于 SACC-83 细胞 72 h 后，MTT 检测示联合用药组的细胞增殖抑制率高于单独用药组，流式细胞术检测到联合用药作用后的 SACC-83 细胞形成了明显的凋亡峰，细胞凋亡率亦高于单独用药组。说明紫杉醇联合 TNF-α 对 SACC-83 细胞增殖的抑制作用以及诱导凋亡都具有协同作用。本研究为化疗与生物治疗联合应用治疗腺样囊性癌提供实验依据。

推测紫杉醇联合 TNF-α 对 SACC-83 细胞具有协同作用的机制可能是：①当 TNF-α 与紫杉醇联合应用时，紫杉醇使抗凋亡蛋白 bcl-2 磷酸化，克服 SACC-83 细胞对凋亡的抵抗，从而提高细胞凋亡率。②已知 bcl-2 蛋白可与同家族的 bax 蛋白结合成异二聚体，从而削弱后者的促凋亡作用[5]。研究表明在紫杉醇处理过的 MCF-7 细胞中，高度磷酸化的 bcl-2 所结合的 bax 减少了 50% 以上，而游离 bax 则增多，提示 bcl- 2 磷酸化可能使它与促凋亡分子 bax 的结合力下降，从而解除了对后者的抑制作用[6]，促进了细胞凋亡的发生。③紫杉醇使细胞发生 G_2/M 期阻滞，启动了另一条 p53 非依赖性快速启动的凋亡途径，使进入凋亡程序的细胞数目增多，使细胞凋亡率升高。④Seong 等[7]认为 TNF-α 本身不诱导肿瘤细胞凋亡，但可提高卵巢癌细胞对紫杉醇诱导凋亡的敏感性，从而实现其抗肿瘤效应。TNF-α 在诱导 SACC-83 细胞凋亡的同时，是否也增强了 SACC-83 对紫杉醇诱导凋亡的敏感性，还有待进一步证实。

本实验中，选用鼠肺成纤维细胞 L929 细胞作为正常增殖细胞对照，以判断紫杉醇对 SACC-83 细胞抗癌作用的选择性。MTT 法结果表明无论 TNF-α、紫杉醇或二者联合应用，对 L929 细胞的增殖抑制率都低于 SACC-83 的细胞增殖抑制率，流式细胞术结果表明 L929 细胞在药物作用 72 h 后，发生凋亡的细胞很少，不能形成明显的“凋亡峰”，各组间凋亡率比较没有显著性差异（$P > 0.05$），说明紫杉醇与 TNF-α 可以选择性的杀伤 SACC-83 细胞，而对正常的组织细胞的细胞毒作用较小。

参考文献：

[1] 袁金辉，郭立霞，王兴旺，等. 紫杉醇的最新研究进展[J]. 中国药理学通报，2000，17(2)：135 - 139.

[2] 韩　锐. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1991：278 - 280.

[3] 殷海珊，王　洁，董福生，等. 重组人肿瘤坏死因子与维甲酸诱导涎腺腺样囊性癌细胞凋亡的实验研究[J]. 现代口腔医学杂志，2002，16(6)：485 - 488.

[4] 林李嵩，林国础，陈万涛，等. 紫杉醇对腺样囊性癌抗瘤作用及对细胞周期的影响[J]. 中华口腔医学杂志，2001，36(6)：416.

[5] BOISE L H，GONZALEZ-GARCIA M，POSTEMA C E，*et al*. bcl-x，a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death[J]. Cell，1993，74(4)：597 - 608.

[6] SRIVASTAVA R K，SRIVASTAVA A R，KORSMEYER S J，*et al*. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase[J]. Mol Cell Biol，1998，18(6)：3509 - 3517.

[7] SEONG J，MILROSS C G，HUNTER N R，*et al*. Potentiation of anti-tumor efficacy of paclitaxel by recombinant tumor necrosis factor-alpha [J]. Anticancer Drugs，1997，8(1)：80 - 87.

（编辑　龙　亮）