论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0606-04

奥沙利铂抗人结肠癌细胞株HT29增殖及其机制的研究

向 征[1],张才全[1],汤为学[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院普通外科,重庆市普通外科学重点实验室,[2]基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 观察抗肿瘤药物奥沙利铂对人结肠癌细胞株HT29体外增殖的影响,初步探讨其作用机制。**方法** 采用人结肠癌细胞株HT29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作用;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的情况;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HT29细胞的增殖有抑制作用而且呈剂量和时间依赖性。奥沙利铂作用72 h后,电镜可见凋亡细胞及凋亡小体;流式细胞仪检测发现细胞阻滞于G_2/M期,G_0/G_1、S期细胞减少及出现凋亡峰;免疫细胞化学显示Bax和Fas表达增强,CyclinB$_1$、Bcl-2、PCNA表达减弱。**结论** 奥沙利铂对HT29结肠癌细胞的增殖有抑制作用,其作用机制与细胞周期阻滞及诱导细胞凋亡有关。

关键词:奥沙利铂;结肠癌;增殖;细胞周期;凋亡
中图法分类号:R73-36;R735.35;R979.1 **文献标识码**:A

Mechanism of suppression on proliferation of human colon carcinoma cell line HT29 by oxaliplatin

XIANG Zheng[1], ZHANG Cai-quan[1], TANG Wei-xue[2] ([1]Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Key Laboratory of General Surgery, [2]Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effects of oxaliplatin on proliferation in human colon carcinoma cell lines HT29 *in vitro* and investigate the mechanism. **Methods** The inhibition of proliferation in HT29 cell was estimated by MTT test. Morphologic changes were observed under electron microscope. Distribution of cell cycle and apoptosis was analyzed by 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 HT29 cells and the inhibition depended on the exposure dose and time. When treated with oxaliplatin for 72 h, apoptotic cells and apoptotic body could be found under the transmission electronic microscope. The analysis of cell cycle indicated that oxaliplatin blocked cells at G_2/M phases and cells of G_0/G_1 and S phase reduced. The expression of Fas and Bax was up-regulated; Bcl-2, CyclinB$_1$, and PCNA down-regulated. **Conclusion** Oxaliplatin could inhibit proliferation of the colon carcinoma cell lines HT29. The mechanism of inhibited proliferation is related to the induced apoptosis and the blocked cells.

Key words: oxaliplatin; colon carcinoma; proliferation; cell cycle; apoptosis

结肠癌是消化道的常见肿瘤之一,术后化疗是结肠癌治疗的一个重要步骤,对患者生存期的延长和生活质量的改善,有重要的作用,但目前化疗药物的有效率均较低[1]。寻找疗效好、副作用少的化疗药物,是临床的要求所在。奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)是第3代铂类化合物,本实验以其为研究对象,观察其对人结肠癌细胞株HT29体外增殖的影响,初步探讨其作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HT29细胞株由本校病理学教研室提供。奥沙利铂由江苏恒瑞医药股份有限公司生产;小牛血清、RPMI1640培养液和胰酶(Hyclone公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(上海华舜生物工程有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(重庆医药股份有限公司化玻分公司);Cyclin B$_1$、Bcl-2、Bax、Fas、PCNA、S-P试剂盒、DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。透射电子显微

作者简介:向 征(1968-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基础和临床方面的研究。电话:(023)89011014,E-mail:xzly@medmail.com.cn
通讯作者:张才全,电话:(023)89013259,E-mail:zhangyu0323@21cn.com.
收稿日期:2006-12-04;修回日期:2007-01-04

镜为 Hitachi-600 型(日本)、全自动酶标读数仪为 Bio-Rad 2550 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　用 MTT 比色法[2]检测奥沙利铂对 HT29 细胞的抑制增殖作用　　选取对数生长期的 HT29 细胞，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。每天取 1 块 96 孔板加 MTT(5 mg/ml) 20 μl，继续培养 4 h 后在自动酶标读数仪上以 570 μm 波长测定各孔及光密度值[D(570)]。根据下列公式计算奥沙利铂对 HT29 细胞的抑制率：

抑制率 = 1 − 实验组平均 D(570)值/细胞对照组平均 D(570)值

1.2.2　绘制生长曲线观察奥沙利铂作用后 HT29 细胞增殖情况　　取对数生长期的 HT29 细胞(5×10^4/ml) 20 ml 接种于 200 ml 培养瓶中，实验设对照组及实验组(奥沙利铂终浓度为 16 μmol/L)，于 37℃、5% CO_2 条件下分别培养 72 h，收集二组细胞并制备成浓度为 5×10^4/ml 的细胞悬液，分别接种于 8 块 96 孔培养板中，每孔 200 μl，每组各设 8 个平行孔，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 0～7 d，每天取 1 块 96 孔板在自动酶标读数仪上以 570 nm 波长测定各孔光密度值[D(570)]，然后绘制 2 组细胞的生长曲线。

1.2.3　透视电镜观察奥沙利铂作用后 HT29 细胞形态的改变　　细胞处理同上，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 72 h，收集细胞后 4% 戊二醛固定 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。

1.2.4　流式细胞仪分析奥沙利铂作用后 HT29 细胞周期分布的改变　　细胞处理同上，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 72 h，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 Modift LT 2.0 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。

1.2.5　免疫组织化学法检测奥沙利铂作用后 HT29 细胞相关蛋白表达的改变　　取对数生长期的 HT29 细胞，以 5×10^4/ml 浓度接种于装有预先处理过的盖玻片的 24 孔板中，每孔 1 ml，实验设对照组及实验组(奥沙利铂终浓度为 16 μmol/L)于 37℃、5% CO_2 条件下培养。72 h 后取出贴有细胞的盖玻片，按照 S-P 试剂盒说明进行操作染色，检测 Fas、Bcl-2、Bax、CyclinB_1、PCNA 蛋白表达。结果分析采用北航 CM-2000B 生物医学图像分析软件系统进行图像分析，对照组和实验组在 200 倍镜下选定空白区定标及具有代表性的 5 个视野，测定其光密度值进行计算，获得所选视野的平均光密度值，该光密度值代表肿瘤细胞中各种待测蛋白表达水平高低。

1.3　统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS 10.0 统计软件进行多组比较方差分析，两样本均数比较采用成组 t 检验；计数资料比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　奥沙利铂对 HT29 细胞的抑制增殖作用

MTT 法检测显示不同浓度的奥沙利铂对 HT29 细胞均有抑制作用，从表 1 可以看出，随着药物浓度及时间的增加，奥沙利铂对 HT29 细胞的抑制率也增加，呈现出剂量、时间依赖性($P<0.01$，$r=0.998\ 0$)。

表 1　MTT 法检测奥沙利铂对 HT29 细胞增殖的抑制率($\bar{x}\pm s$)

奥沙利铂浓度	24 h	48 h	72 h
16 μmol/L	0.282 6±0.011 0	0.466 7±0.007 8	0.594 6±0.004 1
32 μmol/L	0.386 7±0.011 4	0.512 4±0.002 1	0.697 0±0.004 5
64 μmol/L	0.462 6±0.004 9	0.594 8±0.009 7	0.749 2±0.003 7
128 μmol/L	0.560 5±0.008 3	0.749 5±0.006 9	0.829 4±0.004 6
256 μmol/L	0.678 3±0.006 6	0.882 4±0.005 6	0.907 7±0.004 3

经方差分析结果，为不同时相点之间及药物浓度之间的方差分析结果，$P<0.01$，$r=0.998\ 0$

2.2　奥沙利铂作用后 HT29 细胞增殖情况

根据连续 0～7 d MTT 测试结果，绘制生长曲线(图 1)，可见实验组的 HT29 细胞增殖比对照组明显降低($P<0.01$)。

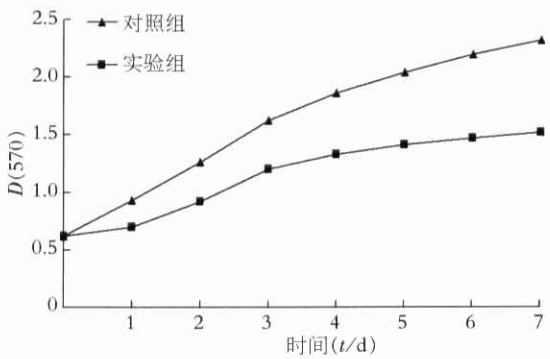


图 1　对照组、实验组 HT29 细胞的生长曲线

2.3　奥沙利铂作用后 HT29 细胞形态的改变

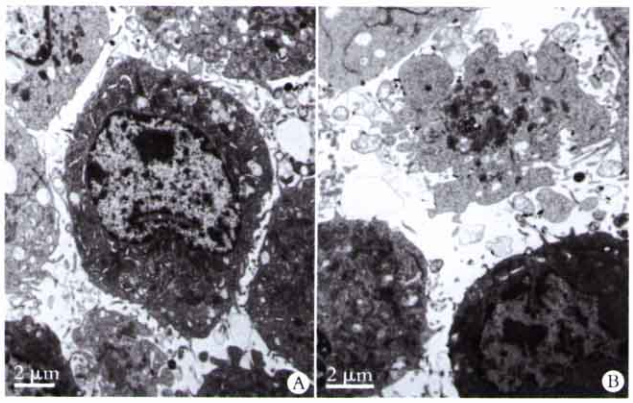
透视电镜下可见对照组 HT29 细胞体积较大，核浆比例增大，核形态不规则，核内染色质丰富，细胞质内可见少许内质网及线粒体，细胞表面有较多微绒毛(图 2A)；实验组 HT29 细胞皱缩，胞质电子密度增高，染色质聚集于核膜周围，呈团块状；细胞核碎裂，细胞边缘胞质突起呈大泡状，并从细胞主体上脱离，形成典型的凋亡小体(图 2B)。

2.4　奥沙利铂作用后 HT29 细胞周期分布的改变

流式细胞仪检测结果显示 HT29 细胞明显被阻滞于 G_2/M 期，G_0/G_1、S 期细胞减少，并出现细胞凋亡的现象(表 2)。

表 2　奥沙利铂对 HT29 细胞周期分布及凋亡的影响

组别	G_0/G_1	S	G_2/M	凋亡
对照组	63.64	32.21	4.15	0
实验组	38.23	28.26	33.52	4.39



A：对照组（×6 000）；B：实验组（×7 000）

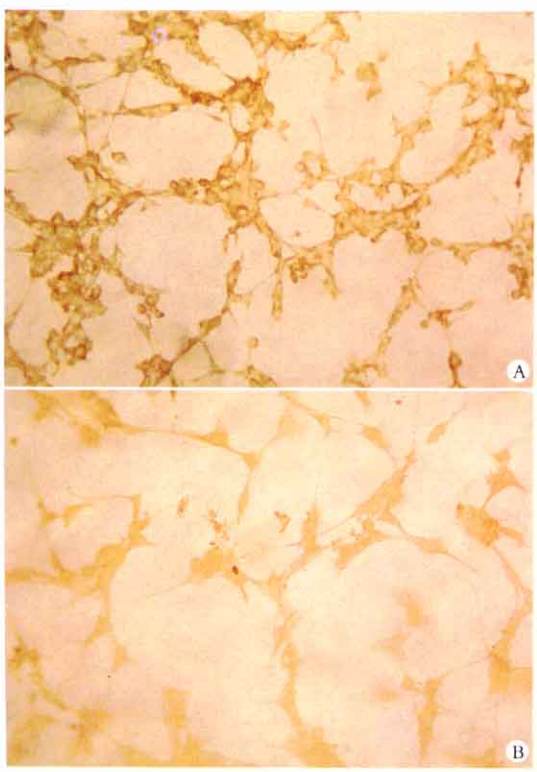
图2 HT29细胞的电镜观察

2.5 奥沙利铂作用后HT29细胞相关蛋白表达的改变

奥沙利铂作用HT29细胞72 h后，免疫细胞化学结果采用北航生物医学图像分析软件进行分析，表明Bax和Fas平均光密度值增强（$P<0.01$），$CyclinB_1$、Bcl-2、PCNA平均光密度值减弱（$P<0.01$）（表3，图3）。

表3 奥沙利铂对HT29细胞相关蛋白表达的平均光密度值影响（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Fas	Bcl-2	Bax	Cyclin B_1	PCNA
对照组	0.044 0±0.005 5	0.152 0±0.008 4	0.048 0±0.004 5	0.146 0±0.011 4	0.108 0±0.013 0
实验组	0.074 0±0.011 4	0.044 0±0.011 4	0.134 0±0.008 9	0.078 0±0.004 5	0.052 5±0.005 0
t	9.375 0	29.189 2	21.500 0	17.894 7	11.200 0
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01



A：对照组；B：实验组

图3 HT29细胞的免疫组化结果（S-P×200）

3 讨论

奥沙利铂是一种含有1,2-二氨环己烷（DACH）基团的新铂类化疗药物，它克服了Ⅰ、Ⅱ代铂类的主要毒性，与第二代铂类药物顺铂（Cisplatin）耐药的肿瘤株无交叉耐药[3]，作为一种具有良好应用前景的抗癌药物日益引起人们的重视。本实验采用MTT法以奥沙利铂5种浓度分别作用于HT29细胞24、48、72 h后，发现随着奥沙利铂浓度的增加和作用时间的延长，其抑制率逐渐增加，显示这种抑制作用具有一定的剂量和时间依赖性；从绘制生长曲线上显示用16 μmol/L奥沙利铂作用72 h后的细胞增殖情况明显低于对照组细胞。说明奥沙利铂对HT29细胞有明显增殖抑制作用，与文献[4]报道一致。

近年研究认为肿瘤是一种细胞周期性疾病，细胞周期失控，细胞无限增殖，最终导致细胞恶性转化和肿瘤形成[5,6]，抗肿瘤药物可通过阻滞细胞周期来发挥治疗作用。本实验的流式细胞仪分析细胞周期分布，显示16 μmol/L奥沙利铂作用72 h后使细胞的G_2/M值明显增加，G_0/G_1、S值减少，细胞有丝分裂被阻滞，影响细胞生长，从而抑制细胞增殖。G_2/M期细胞存在有丝分裂促进因子（MPF）促进细胞有丝分裂，MPF由催化亚单位（细胞周期依赖性激酶CDK）和调节亚单位（细胞周期素B_1即$CyclinB_1$）组成，其中CDK水平比较恒定，MPF激活取决于$CyclinB_1$的量。激活的MPF可使丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）磷酸化而被活化，活化的MAPK产生一系列生化反应，稳定有丝分裂状态[7,8]。当$CyclinB_1$量减少时，MPF不能被激活，因而MAPK不能被活化，有丝分裂不能进行，细胞被阻滞于G_2/M期。本实验免疫细胞化学法显示实验组$CyclinB_1$表达明显低于对照组，提示奥沙利铂有降低HT29细胞的$CyclinB_1$作用，此作用是合成受到抑制还是泛素蛋白酶活性增加有待进一步研究。增殖细胞核抗原（PCNA）也是一种细胞周期相关蛋白，但它不与CDK结合，它作为DNA聚合酶的附属蛋白促进DNA聚合、延伸DNA[9]。本实验免疫细胞化学法显示实验组PCNA表达明显低于对照组，提示奥沙利铂也能干扰HT29细胞DNA复制，细胞增殖被抑制。

细胞凋亡是由多基因调控的主动死亡过程，目前研究证实凋亡异常与肿瘤发生发展有关，抗肿瘤药物则可通过诱导细胞凋亡来发挥治疗作用。透射电镜观察到16 μmol/L奥沙利铂作用72 h后有凋亡细胞及凋亡小体，流式细胞仪分析出现凋亡峰。Fas属于肿瘤坏死因子受体（也称死亡受体）家族，是细胞膜上的糖基化穿膜蛋白，在细胞凋亡过程中发挥着传递细胞

凋亡信号作用[10]。细胞表面表达的Fas与FasL交联后,形成能传达信号的活性三聚体(死亡结构域DD),Fas与死亡结构域相关蛋白(FADD)形成二聚体,将凋亡信号传导至凋亡蛋白酶caspase-8,进而引起一系列酶联反应,激发下游caspase-3、6、7,最终导致细胞凋亡。本实验免疫细胞化学法显示实验组Fas表达明显高于对照组,增强细胞凋亡信号传导,诱导细胞凋亡。Bcl-2属膜蛋白,主要存在于线粒体内膜、细胞膜内表面、内质网膜、溶酶体膜、核膜等处。Bcl-2具有恢复线粒体内膜的跨膜电位和关闭线粒体膜通透性转换孔的作用,可使线粒体膜通透性降低,阻止凋亡启动因子释放,切断细胞凋亡级联反应中关键环节,如抑制促进凋亡的蛋白Bax的毒性作用、抑制caspase激活、维持细胞能钙的稳定等,具有很强的抗凋亡作用;Bax主要促进细胞凋亡。当Bcl-2过表达时,与Bax形成异二聚体抑制细胞凋亡;相反,Bax过表达时,Bax形成同源二聚体促进细胞凋亡。Bcl-2和Bax对细胞凋亡的调控不仅取决于自身表达水平高低,还与两者的比例有关,当Bcl-2/Bax比例减少时,细胞趋于凋亡。本实验免疫细胞化学法显示,实验组Bcl-2表达明显低于对照组、Bax表达明显高于对照组,细胞凋亡增加。奥沙利铂引起HT29细胞凋亡可能与Fas、Bax表达增加,Bcl-2表达减少有关,是通过死亡受体途径及线粒体途径引起细胞凋亡,从而抑制细胞增殖。

总之,通过实验证实奥沙利铂能抑制HT29细胞增殖,这种作用可能通过阻滞细胞周期及诱导细胞凋亡共同作用而引起的。

参考文献:

[1] Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, *et al*. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer[J]. N Eng J Med, 2004, 350(23): 2343-2351.
[2] 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.
[3] Voland C, Bord A, Peleraux A, *et al*. Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not Cisplatin in human colon cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(9): 2149-2157.
[4] Fujie Y, Yamamoto H, Ngan C Y, *et al*. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells[J]. Jpn J Clin Oncol, 2005, 35(8): 453-463.
[5] Rew D A, Wilson G D. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance, Part Ⅱ: clinical data[J]. Eur J Surg Oncol, 2000, 26(4): 405-417.
[6] 杨连君, 曹雪涛, 于益芝. 细胞周期蛋白及其与肿瘤等疾病的关系[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 223-225.
[7] 张 雷, 张才全. Cyclin B_1与肿瘤发生发展[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(18): 1676-1678.
[8] 陈主初. 病理生理学(供七年制临床医学等专业用)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 53-59.
[9] TsurimotoT. PCNA, a multifunction ring on DNA[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1443(1-2): 110-116.
[10] Osaki M, Kase S, Kodani I, *et al*. Expression of Fas and FAs ligand in human gastric adenomas and intestinal-type carcinomas: correlation with proliferation and apoptosis[J]. Gastric Cancer, 2001, 4(4): 198-205.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2007)07-0609-01

个案与短篇

半肢骨骺发育异常1例

杨 宇[1],李 平[1],焦 震[2],杨 君[1],廖荣信[3] (1湖南中医学院第一附属医院放射科,长沙 410007;2第三军医大学西南医院全军消化内科中心,400038 重庆;3长沙市中心医院放射科,长沙 410007)

1 临床资料

患者,女性,10岁,右膝畸形,活动受限5年加重8月于2003年2月8日前来就诊。体查:脊柱无侧弯后突畸形,无压痛,右膝肿大,局部压痛,右膝关节明显外展畸形,呈X型腿,右膝关节活动可听及弹响。抽屉试验及侧向应力试验(-),研磨试验(+)。右踝关节内侧压痛,活动可。三大常规及生化检查无特殊。同年3月手术,2005年复查复发。

作者简介:杨 宇(1977-),男,湖南省长沙市人,医师,助教,主要从事影像诊断和教学方面的研究。电话:0731-85600745,E-mail:yk513@163.com

收稿日期:2005-05-08;修回日期:2006-06-07

2 影像资料

右膝关节呈外展,右膝股骨内外侧髁及胫骨平台偏后方可见骨质呈膨胀性生长尤以股骨内侧髁为甚,其内密度不均,内可见小囊样变,边缘不规则,靠近关节面可见其边缘毛糙,周围软组织肿胀,邻近骨质未见骨膜反应。右踝关节内踝骨骺亦有上述变,其关节间隙正常。X线及CT诊断:半肢骨骺发育异常。术中所见:依次切开皮肤,皮下组织及肌肉,关节囊可见股骨内髁,胫骨平台内侧,后侧骨骺呈结节状异常增生,表面有软骨膜覆盖,色灰白至灰蓝,大小不等,胫骨平台轻度塌陷,半月板挤向外侧。切除半月板,骨刀切除增生的软骨及部分内髁并送检。病理送检:骨及软骨组织呈肿瘤性增生。

(下转616页)