论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1254-04

5-氟尿嘧啶诱导肾癌细胞凋亡对 Fas/FasL 途径依赖性的研究

吴国英,李黔生,聂志林,李彦锋,靳风烁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨 Fas/FasL 凋亡途径在 5-氟尿嘧啶(5-FU)诱导的肾癌细胞凋亡中的作用。**方法** 运用 Western blot 及 TUNEL、MTT 技术,检测肾癌细胞株 786-0 在化疗药物 5-FU 作用下 Fas、FasL 的表达变化,分析 5-FU、抗 Fas 单抗 CH11、中和性抗 FasL 单抗 NOK-2 对癌细胞凋亡与增殖活性的影响。**结果** Fas、FasL 蛋白产物在 786-0 中均有表达,不同浓度 5-FU 作用后,中等剂量 5-FU 70 μg/ml 作用肾癌细胞株 48 h 时 Fas、FasL 的表达最显著;786-0 在化疗药物 5-FU 作用下,细胞增殖活性显著降低,细胞凋亡指数显著增加;抗 Fas 单抗 CH11 作用于 786-0 后,细胞凋亡指数显著增加,增殖活性显著降低;CH11 与 5-FU 共同作用于 786-0 细胞可显著抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡;抗 FasL 单抗 NOK-2 阻断 786-0 FasL 与 Fas 相互作用后,细胞的凋亡指数及增殖活性均无显著变化。**结论** 5-FU 诱导肾癌细胞凋亡可能不依赖于 Fas/FasL 凋亡途径。

关键词:肾癌;耐药;5-氟尿嘧啶;Fas/FasL;凋亡
中图法分类号:R73-361;R730.23;R737.11 **文献标识码**:A

Dependence of 5-Fluorouracil inducing cell apoptosis of renal cell carcinoma on Fas/FasL pathway

WU Guo-ying, LI Qian-sheng, NIE Zhi-lin, LI Yan-feng, JIN Feng-shuo (Department of Urology, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the roles of Fas/FasL pathway in apoptosis of renal cell carcinoma (RCC) cells induced by 5-Fluorouracil (5-FU). Methods The effects of drug 5-FU in regulating the expressions of Fas and FasL in RCC cell line 786-0 and the effects of 5-FU, anti-Fas monoclonal antibody, CH11, and neutralizing anti-FasL monoclonal antibody NOK-2 on the apoptosis and proliferative activity of RCC cell line 786-0 were studied by Western blot, TUNEL, and MTT techniques. Results Expression of the protein products of Fas and FasL was found in human RCC cell line 786-0. The expressions of Fas and FasL peaked at 48 h after action of 5-FU at the concentration of 70 g/ml on RCC cells. Action of 5-FU on RCC 786-0 caused a decrease in cell proliferative activity and an increase of apoptotic cells. Action of anti-Fas monoclonal antibody CH11 on 786-0 increased apoptotic cells but decreased the proliferative activity. Combined action of CH11 and 5-FU on 786-0 could significantly inhibit the cell proliferation and induce cell apoptosis. No difference in apoptotic index and proliferative activity was found after blockage of the interaction between FasL and Fas by anti-FasL monoclonal antibody NOK-2. Conclusion 5-FU may induce apoptosis of RCC cells, which may not be dependent on Fas/FasL pathway.

Key words: renal cancer; multidrug resistance; 5-Fluorouracil; Fas/FasL; apoptosis

肿瘤细胞对化疗药物的耐药性是肿瘤化疗中的棘手问题,多药耐药(multidrug resistance, MDR)是造成肿瘤化疗失败的主要原因[1]。肾癌对化疗和放疗均不敏感,如何提高肾癌的治疗疗效仍没有理想的治疗方法,肿瘤细胞对凋亡的耐受是 MDR 的一个新机制,但其具体作用机制还知之甚少[2]。Fas/FasL 作为细胞凋亡信号传递的重要环节,其与肾癌细胞耐药性的研究目前报道甚少。本研究通过多种实验手段检测了肾癌细胞在化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)作用下 Fas、FasL 的表达变化,分析多种刺激对癌细胞凋亡与增殖活性的影响,初步探讨了该途径在肾癌耐药中的作用,以期为克服肾癌耐药提供新的策略。

作者简介:吴国英,男,河南省平顶山市人,博士,副主任医师,主要从事肾癌耐药机制方面的研究,发表论文 20 篇。现在解放军第 152 中心医院泌尿外科工作。电话:(0375)3843080,E-mail: wuguoying8526@sina.com
通信作者:靳风烁,电话:(023)68757946,E-mail:jinfs5505@163.com
收稿日期:2009-02-12;修回日期:2009-03-16

1　材料与方法

1.1　一般资料

肾透明细胞癌细胞株 786-0 由中科院上海细胞生物研究所提供;5-氟尿嘧啶(5-FU)购自上海海普药业;抗 Fas IgM 单抗(CH11)购于深圳晶美生物工程有限公司;鼠抗人 Fas、FasL 单克隆抗体、抗 FasL 单克隆抗体(NOK-2)购自 Pharmingen 公司;TUNEL 原位凋亡试剂盒购自宝灵曼公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司。

1.2　细胞系培养及制备

在 37℃,饱和湿度,5% CO_2 条件下,以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液进行细胞培养和传代。当细胞呈对数生长期时,用于实验。用 0.25% 胰蛋白酶消化培养单层细胞,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中,将培养板移入 CO_2 孵箱中常规培养。

1.3　药物处理

根据临床相关血清有效药物浓度(70 μg/ml),分别加入含不同浓度的 5-FU(7、70、700 μg/ml)的新鲜培养液,对照为不含 5-FU 的培养液,以此为 0 时相点,分别收集 24、48、72 h 的细胞制备细胞总蛋白。

1.4　刺激实验

待细胞培养至孔底约 80% 时,分别加入含 5-FU(70 μg/ml)、抗 Fas 单抗 CH11(0.5 μg/ml)、5-FU(70 μg/ml)+抗 Fas 单抗 CH11(0.5 μg/ml)、5-FU(70 μg/ml)+中和性抗 FasL 单抗 NOK-2(10 μg/ml)的 RPMI1640 培养液,培养 48 h。为阻断 Fas/FasL 途径,5-FU+中和性抗 FasL 单抗 NOK-2 组在加入 5-FU 之前先加入 NOK-2 10 μg/ml,37 ℃孵育 1 h。对照组以 RPMI1640 培养液培养。

1.5　Western blot 分析

按前述收集细胞以冷 PBS 清洗 2 次,以裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-Hcl(pH 8.0),120 mmol/L NaCl,0.2 mmol/L EDTA,1 mmol/LPMSF 和 1% NP-40]制备细胞总蛋白,取150 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,通过电转移法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素滤膜上,氨基黑染色 30 s,10% 乙酸脱色。加入封闭缓冲液室温振荡 1 h,将膜放入溶有鼠抗人 Fas/FasL 蛋白单克隆抗体(1∶1 000 稀释)的新鲜配制封闭液 4 ℃下振荡 2 h,漂洗后滴加羊抗鼠 IgG(1∶2 000),漂洗后行增强化学发光。

1.6　MTT 检测细胞增殖活性

每孔加 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,37 ℃,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,使结晶充分溶解。比色:选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光密度值[D(490)],记录结果。以 A 值代表细胞增殖活性。

1.7　TUNEL 法原位检测细胞凋亡

采用 TUNEL 染色结合光镜形态学原位检测 786-0 凋亡细胞,石蜡切片常规脱蜡、水化,原位末端标记根据试剂盒说明书进行操作,最后进行 DAB 显色,中性树胶封片。

1.8　统计学分析

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 软件进行 Student's t 检验。

2　结果

2.1　肾癌细胞 786-0 在化疗药物 5-FU 作用下 Fas、FasL 表达的变化

Western blot 证明,在正常情况下,肾癌细胞 786-0 Fas、FasL 蛋白均为阳性,本实验条件下,Fas 蛋白表达量均略低于 FasL 蛋白的表达量(表 1、2,图 1)。786-0 细胞在不同浓度 5-FU 作用后,于不同时相点检测,可以看出,与对照组相比 5-FU 对 Fas、FasL 都具有上调作用;3 个浓度及 3 个时相点中,以中等剂量的 5-FU 70 μg/ml 于 48 h 对肾癌细胞株 786-0 Fas、FasL 上调作用最明显(表 1、2,图 1)。

表 1　肾癌细胞 786-0 在不同浓度 5-FU 刺激后不同时间 Fas 蛋白表达的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	5-FU 浓度(μg/ml)		
	7	70	700
对照组	11 884±1 116	11 884±1 116	11 884±1 116
24 h	15 521±1 956[a]	18 637±749[b]	24 568±2 220[b]
48 h	19 630±375[b]	26 608±2 448[b]	20 734±970[b]
72 h	23 079±1 364[b]	24 221±1 360[b]	16 412±693[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

表 2　肾癌细胞 786-0 在不同浓度 5-FU 刺激后不同时间 FasL 蛋白表达的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	5-FU 浓度(μg/ml)		
	7	70	700
对照组	13 226±1 087	13 226±1 087	13 226±1 087
24 h	17 423±2 212[a]	21 519±840[a]	25 426±786[a]
48 h	20 307±1 282[a]	28 390±1 151[a]	21 576±694[a]
72 h	24 500±892[a]	25 693±347[a]	16 412±1 141[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

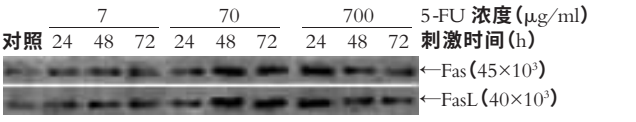


图 1　不同剂量 5-FU 刺激 786-0 细胞不同时间 Fas、FasL 蛋白 Western blot 检测结果

2.2　肾癌细胞 786-0 在化疗药物 5-FU 作用下,细胞凋亡与细胞增殖活性的变化

为检测化疗药物 5-FU 是否可诱导 786-0 细胞凋亡,以 70 μg/ml 5-FU 作用肾癌细胞 786-0 48 h,检测细胞凋亡指数和细胞增殖活性。TUNEL 检测可见诱导 786-0 细胞凋亡指数显著升高,与对照组相比有显著性差异($P<0.01$);MTT 检测细胞增殖活性显著降低,与对照组相比有显著性差异($P<0.01$),表 3,图 2、3。

2.3　通过 Fas 途径介导肾癌细胞 786-0 凋亡的检测

为验证 786-0 细胞中 Fas 途径介导肿瘤细胞凋亡的存在,应用抗 Fas 单克隆抗体 CH11 作用于 786-0 细胞 48 h,TUNEL 与 MTT 检测结果如下:激动剂 CH11 作用于 786-0 细胞后,细胞凋亡指数有显著增加,细胞增殖活性显著降低,与对照组相

比均有显著性差异($P<0.01$,表3)。说明 Fas/FasL 系统在786-0 细胞中是存在的,功能是完整的。同时为明确化疗药物5-FU 上调的 Fas 表达能否通过 CH11 与之结合诱导凋亡,化疗药物 5-FU 与 CH11 共同作用于 786-0 细胞后,细胞凋亡指数显著增加,细胞增殖活性显著降低,与单独药物或单独 CH11 刺激组相比均有显著性差异($P<0.01$,表3,图4)。

表3 肾癌细胞株在不同因素处理后细胞凋亡率与增殖活性的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)	细胞增殖活性[D(490)]
对照组	3.25±0.38	0.91±0.02
5-FU 组	13.0±1.59[a]	0.61±0.03[a]
CH11 组	8.6±0.74[a]	0.7±0.01[a]
5-FU+CH11 组	22.50±2.53[b]	0.52±0.04[b]
5-FU+NOK-2 组	12.19±1.67	0.64±0.02

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.01$,与5-FU 组比较

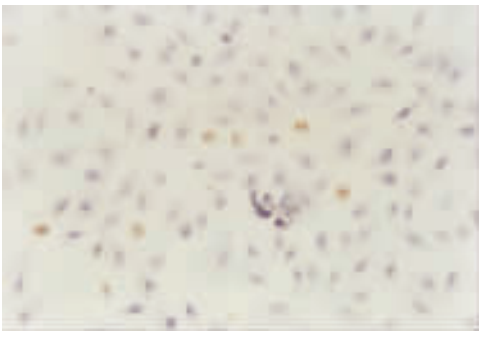


图2 TUNEL 法检测正常 786-0 细胞的凋亡情况 (×200)

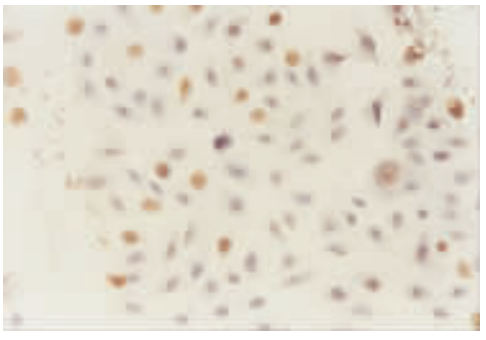


图3 TUNEL 法检测 5-FU 作用于 786-0 细胞的凋亡情况 (×200)

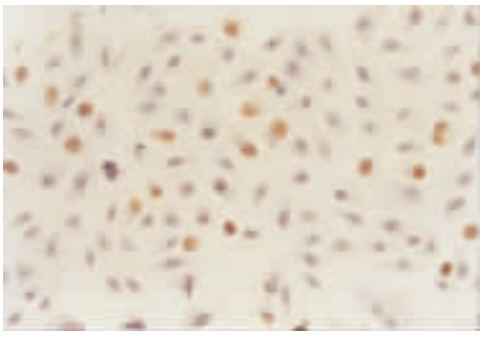


图4 TUNEL 法检测 5-FU+CH11 作用于 786-0 细胞的凋亡情况 (×200)

2.4 阻断 Fas/FasL 途径后肾癌细胞 786-0 凋亡与细胞增殖活性的变化

为检测化疗药物 5-FU 是否通过 Fas、FasL 表达升高,从而启动 Fas/FasL 途径诱导细胞凋亡数增加,用中和性抗 FasL 单克隆抗体 NOK-2 封闭 786-0 FasL,再予 5-FU 刺激肿瘤细胞,从而阻断了 Fas、FasL 相互作用,TUNEL 与 MTT 检测结果如下:阻断 Fas/FasL 途径后,化疗药物 5-FU 诱导 786-0 细胞凋亡指数与细胞增殖活性均无显著改变,与单纯药物刺激组相比均无显著性差异($P>0.05$,表3)。中和性抗 FasL 单抗 NOK-2 不能阻断 5-FU 所诱导的细胞凋亡。

3 讨论

肾癌是最容易产生耐药的肿瘤之一,这与肾癌细胞的生物学特性与多药耐药有关[3]。肿瘤细胞对凋亡的耐受是肿瘤耐药的一个新机制,在细胞凋亡与肿瘤耐药的研究中,最引人注目的是能诱导死亡信号的 Fas 及其配体 FasL(Fas Ligand)与参与其信号途径调控的许多细胞内外因子共同组成的 Fas 系统,Fas 与 FasL 的相互作用是介导细胞凋亡的主要途径之一。

恶性肿瘤中的许多细胞有广泛的 Fas 抗原表达,但与相应的细胞比较,肿瘤细胞显示异常低下的 Fas 抗原表达或完全不表达。有研究者分析了6种泌尿系肿瘤细胞(包括肾癌细胞),对照为正常肾间质成纤维细胞,发现泌尿系肿瘤细胞与正常细胞均广泛表达 Fas,但肿瘤细胞的表达情况明显低于正常细胞[4]。化疗药物能够上调肿瘤细胞 Fas 的表达,并认为这是化疗药物杀伤肿瘤细胞的机制之一[5]。化疗药物对 FasL 表达的调节,最早是在白血病的化疗中显示治疗剂量的细胞毒性药物能强烈诱导肿瘤细胞 FasL 的表达。我们的研究发现,786-0 细胞在 5-FU 作用下,可以上调 Fas、FasL 表达,低、中剂量呈时间-剂量依赖关系,高剂量于 24 h Fas、FasL 开始升高,随时间延长两者表达量逐渐下降,其原因可能是高浓度的 5-FU 细胞毒作用致细胞坏死的结果,有研究表明小剂量化疗引起细胞凋亡,大剂量引起坏死[6]。

我们的研究表明,应用抗 Fas 单克隆抗体 CH11 作用于 786-0 细胞后,细胞凋亡指数有显著增加,增殖活性显著降低,与对照组相比均有显著性差异;同时化疗药物 5-FU 与 CH11 共同作用于 786-0 细胞后,细胞凋亡指数显著增加,增殖活性显著降低,与单独药物或单独 CH11 刺激组相比均有显著性差异,说明细胞恶性转化后,尽管 Fas/FasL 系统受到调控,但其主要成分并未丢失,Fas 介导的凋亡途径在 786-0 细胞中是存在的,功能是完整的。

各种化疗药物的作用机制主要通过造成 DNA 损伤并诱导细胞凋亡,但其具体作用机制还知之甚少。近年来的研究发现,诱导肿瘤细胞凋亡可能是不同化疗药物殊途同归的结果[7,8]。有研究发现化疗药物 5-FU 以 DNA 为靶点诱导肿瘤细胞凋亡。我们的研究也

表明,肾癌细胞 786-0 在化疗药物 5-FU 作用下,与不加药物组相比,细胞凋亡数显著升高,增殖活性显著降低。

研究表明,化疗药物刺激肝癌细胞后,通过 Fas/FasL 介导的细胞凋亡的增加,其作用可以被抑制性抗 Fas 抗体所阻断,说明抗癌药物在诱导肿瘤细胞凋亡的过程中,Fas/FasL 途径起着重要作用[9]。我们的研究结果显示,肾癌细胞株 786-0 中存在完整的 Fas 介导的凋亡途径,化疗药物 5-FU 在诱导细胞凋亡的同时,上调了 Fas、FasL 的表达;以中和性抗 FasL 单可隆抗体 NOK-2 封闭 786-0 FasL,从而阻断了 Fas、FasL 相互作用后,与未阻断前比较 5-FU 诱导 786-0 细胞凋亡指数与增殖活性均无明显改变,提示肾癌细胞在 5-FU 作用下的凋亡过程可能并非依赖于 Fas/FasL 途径,对其深入研究可能对克服肾癌耐药提供新的启示。

参考文献:

[1] Lehnert M. Multidrug resistance in human cancer[J]. J Neurooncol, 1994, 22(3):239 - 243.
[2] Debatin K M, Krammer P H. Death receptors in the chemotherapy and cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2950 - 2966.
[3] Landman J, Olweny E, Sundaram C P, *et al*. Prospective comparison of the immunological and stress response following laparoscopic and open surgery for localized renal cell carcinoma[J]. J Urol, 2004, 171(4): 1456 - 1460.
[4] 李宏军,俞莉章,郭应禄, 等. Fas 在6 种泌尿生殖系统肿瘤细胞系中的表达[J]. 癌症,2002,21(5):456 - 459.
[5] 祝 瑾,贾莜琴,程 宏. 5-FU 诱导白血病细胞凋亡的分子机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(8):586 - 588.
[6] Yoshida Y, Goto K, Kawahara K, *et al*. A phase I study of continuous administration of 5-fluorouracil/cisplatin in advanced uterine cervical cancer[J]. Anticancer Res, 2003, 22(6B):3473 - 3476.
[7] Werner M, Eger K, Jurgen-Steinfelder H. Comparison of the rapid pro-apoptotic effect of trans-beta-nitrostyrenes with delayed apoptosis induced by the standard agent 5-fluorouracil in colon cancer cells[J]. Apoptosis, 2007, 12(1):235 - 246.
[8] Correale P, Cusi M G, Del-Vecchio M T, *et al*. Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro[J]. J Immunol, 2005, 175(2):820 - 828.
[9] Nakamura M, Nagano H, Sakon M, *et al*. Role of the Fas/FasL pathway in combination therapy with interferon-alpha and fluorouracil against hepatocellular carcinoma in vitro[J]. J Hepatol, 2007, 46(1): 77 - 78.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2009)13-1257-01

个案与短篇

腹腔镜阑尾切除术 98 例临床分析

郝勇凯 (新疆维吾尔自治区农一师阿拉尔医院普外科,新疆 阿克苏 843300)

阑尾炎是外科最常见的急腹症之一,传统的治疗方法是开腹阑尾切除术。随着腹腔镜技术的不断进步和普及,腹腔镜阑尾切除术(Laparoscopic appendectomy, LA)被较多的医师和患者接受[1]。本科从 2006 - 2008 年累计行腹腔镜阑尾切除术 98 例,临床效果良好,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

腹腔镜组:本组 98 例行腹腔镜阑尾切除手术,其中男性 47 例,女性 51 例。年龄 12 ~ 63 岁,平均 45 岁。急性单纯性阑尾炎 11 例,化脓性阑尾炎 73 例,坏疽穿孔性阑尾炎 8 例,慢性阑尾炎急性发作 6 例。术后阑尾病变均经病理学检查证实。

开腹组:另外选择 2003 - 2005 年开腹阑尾切除术的病例 100 例进行统计学比较,其在年龄、性别及阑尾炎类型方面与腹腔镜组无统计学差异($P > 0.05$)。

作者简介:郝勇凯,男, 甘肃省武威市人,主治医师,主要从事普外科方面的研究。电话:(0997)4610174, E-mail:437546364@qq.com

收稿日期:2009-04-01;修回日期:2009-04-30

1.2 方法

采用“三孔法”手术,以脐上缘或下缘为镜头孔,如有腹部手术史,避开切口 3 ~ 5 cm,或开放式 trocar 置入。检查到阑尾的大致位置后,于反麦氏点处作小切口,置入 5 mm trocar。分离钳进入腹腔,分离或掀开大网膜。见到阑尾后,判断在腔镜下完成该手术可能性较大,再在麦氏点上方约平脐处作切口,置入 10 mm trocar。自主操作孔内吸净腹腔及盆腔脓性渗液,分离阑尾周围粘连并顺结肠带找到阑尾,提起阑尾用电剪分离周围粘连,沿阑尾系膜用双极电凝分离并用剪刀切断至阑尾根部,用套扎器(强生公司生产)结扎阑尾根部二道,并用自制套扎远端以防阑尾腔内脓液流入腹腔,切断阑尾并电灼阑尾黏膜,根部不包埋。阑尾直径 < 1.0 cm 者,可将阑尾直接从脐孔 trocar 中提出;直径 > 1.0 cm 者装入自制标本袋后提出。切口均以生理盐水冲洗,2 个 10 mm 切口用可吸收线缝合筋膜和皮肤,5 mm 切口可不缝合,以敷贴拉合。阑尾穿孔者放置引流。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检

(下转 1267 页)