论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0368-04

奥沙利铂长循环脂质体对人结直肠癌SW480细胞凋亡影响

杨 闯[1,2],刘海忠[3],傅仲学[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院普通外科[1];621000 四川 绵阳,绵阳市第三人民医院肝胆外科[2];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[3])

【摘要】 目的 探讨奥沙利铂长循环脂质体对人结直肠癌SW480细胞的凋亡作用。**方法** 采用荧光标记的长循环脂质体,奥沙利铂长循环脂质体和游离奥沙利铂分别处理人结直肠癌SW480细胞,流式细胞仪、荧光显微镜检测细胞对脂质体的摄取;MTT分析载药脂质体对细胞增殖影响;透射电镜观察细胞超微结构变化;流式细胞仪及TUNEL检测细胞凋亡;Western blot分析actived-caspase-3(P17)的表达。**结果** 脂质体被细胞摄取,2 h的荧光强度为(197.72±8.92),24 h的荧光强度为(641.74±44.46);2.6 mmol/L的奥沙利铂长循环脂质体(含28 mg/L奥沙利铂)对细胞的活性影响及凋亡诱导作用大于28 mg/L游离奥沙利铂($P<0.01$);actived-caspase-3蛋白的表达随细胞凋亡增加而上调($P<0.01$)。**结论** 奥沙利铂长循环脂质体对人结直肠癌SW480细胞有显著凋亡诱导作用。

【关键词】 脂质体;奥沙利铂;结直肠肿瘤;凋亡

【中图法分类号】 R730.23;R735.35;R979.12 **【文献标志码】** A

Oxaliplatin long-circulating liposomes improves apoptosis of human colorectal cancer SW480 cells

Yang Chuang[1,2], Liu Haizhong[3], Fu Zhongxue[1] ([1]Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Mianyang Third People's Hospital, Mianyang, Sichuan Province, 621000; [3]Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of oxaliplatin long-circulating liposomes (PEG-liposomal L-oHP) on the apoptosis of human colorectal cancer SW480 cells. **Methods** Colorectal cancer SW480 cells were treated with fluorescent labeled PEG-liposomes, PEG-liposomal L-oHP and free L-oHP, respectively. Cellular uptake of fluorescent-labeled PEG-liposomes were detected by flow cyometry (FCM) and fluorscence microscopy. The cells proliferation were analyzed by MTT assay. Cellular ultrastructure was observed with transmission electron microscopy (TEM). Cell apoptosis was detected by FCM and TUNEL. Expression of activated-caspase-3 (P17) was analyzed with Western blotting. **Results** When cellular uptake of liposomes at 2 h, the average fluorescence intensity was 197.72±8.92, and at 24 h, the intensity was 641.74±44.46. PEG-liposomal L-oHP of 2.6 mmol/L (containing 28 mg/L L-oHP) induced a stronger apoptotic response than 28 mg/L free L-oHP ($P<0.01$). The protein expression of P17 was up-regulated with apoptosis being enhanced ($P<0.01$). **Conclusion** PEG-liposomal L-oHP exerts an obvious effect in inducing apoptosis of human colorectal cancer SW480 cells.

【Key words】 liposomes; oxaliplatin; colorectal neoplams; apoptosis

Supported by the Science Research Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-12). Corresponding author: Fu Zhongxue, Tel: 86-23-89012522, E-mail: fzx990521@sina.com

脂质体是具有磷脂双层结构的脂质微囊,其与生物膜有较大的相似性与组织相溶性,通过聚乙二醇2000-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺修饰的脂质体(长循环脂质体,PEG-liposome)能避免被网状内皮系统吞噬,其延长了循环时间,更易于被细胞、组织吸收[1-3]。因此,以长循环脂质体为载体包载细胞毒性药物可克服其对正常组织与病理部位的非选择性及毒副作用的缺

【基金项目】 重庆市卫生局科研基金(2009-2-12)

【通信作者】 傅仲学,电话:(023)89012522,E-mail:fzx990521@sina.com

点[4]。结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是全球的第三大常见肿瘤,奥沙利铂(L-OHP)主要用于治疗晚期结直肠癌[5-6]。有关奥沙利铂长循环脂质体对人结直肠癌细胞凋亡作用尚不清楚。本实验拟制备奥沙利铂长循环脂质体,并用其处理人结直肠癌SW480细胞,检测其对细胞活性及凋亡影响,旨在为结直肠癌的靶向治疗奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

胆固醇(批号009052212346)、卵磷脂(批号009051500062)、奥沙利铂(批号09512)、1640培养基购于美国Sigma公司,10%胎牛血清购于美国HyClone公司,聚乙二醇2000-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000)购于美国Avanti公司,细胞膜绿色荧光探针[$DIOC_{18}$(3),3,3'dioctadecyl oxacar- bocyanine perchlorate, Dio]购于威格拉斯生物技术有限公司,actived-caspase-3(P17)抗体购于美国Bioword公司,anti-β-actin购于美国Abgab公司,ECL发光试剂盒购于美国Millipore公司,TUNEL试剂盒购于美国罗氏公司。Amicon ultra-4离心超滤管(uFC810008 MVC100 kD),聚碳酸酯膜(100 nm)购于美国Millipore公司。

1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪(SY-8100,北京北分瑞利分析仪器有限责任公司),旋转蒸发仪(RE-2000B,上海亚荣),荧光显微镜(Leica,德国),透射电镜(Hitachi H-7650,日本),流式细胞仪(FACSV antage SE,美国BD公司),超声细胞破碎仪(Bandelin UW3100,德国),真空冷冻干燥机(Christ ALPHA1-2,德国)。

1.3 奥沙利铂长循环脂质体及荧光标记长循环脂质体的制备

参照Abu-Lila等[7]脂质体制备方法,采用逆向蒸发法制备奥沙利铂长循环脂质体。脂质体反复过100 nm聚碳酸酯膜控制脂质体粒径,通过超滤管超滤作用除去游离奥沙利铂,所得载药脂质体平均粒径为151.56 nm,平均电位为-23.68 mV,平均包封率为0.43。将2 μmol/L Dio加入到脂质物中制备荧光标记的长循环脂质体。

1.4 细胞培养及细胞摄入荧光标记的脂质体

人结直肠癌SW480细胞株由重庆医科大学生命科学院提供。SW480细胞(5×10^4/孔)接种于6孔板中(含有体积分数为0.10的胎牛血清的RPMI1640培养液),细胞在37℃含有体积分数为0.05的CO_2实验条件下常规培养。细胞于指数生长期时加入1 ml含Dio标记的脂质体(2 mmol/L)的培养基,分别孵育0、2、4、6、8、12、24 h,PBS洗涤细胞2次后收集细胞,PBS制成400 μl细胞悬液(>1×10^6/ml),流式细胞仪分析细胞摄入Dio标记的脂质体量(激发波长488 nm)。SW480细胞(2×10^3)接种于载玻片上孵育24 h,换液后加入含Dio标记的脂质体(2 mmol/L)的培养基500 μl孵育后,多聚甲醛固定细胞10 min,PBS洗涤细胞后用PI(1∶1 000)染核,荧光显微镜检测脂质体入胞情况。

1.5 MTT检测奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞增殖影响

取对数生长期的细胞,接种于96孔板(5×10^3,200 μl/孔)。奥沙利铂及奥沙利铂长循环脂质体设由高至低不同浓度组(以只加培养基为空白对照),每孔设5个平行孔,置37℃条件下培养24 h。实验终止前4 h移除培养基并用PBS洗涤2次,每孔加入180 μl培养基及20 μl MTT再培养4 h,弃去培养液加入150 μl DMSO振荡10 min,待结晶溶解后在酶联检测仪上检测570 nm波长下每孔的光密度值[$D(570)$],计算IC_{50}值。然后以奥沙利铂的1/2 IC_{50}值为工作浓度决定奥沙利铂长循环脂质体的给药浓度。按上述方法细胞接种于96孔板孵育24 h后,加入工作浓度的奥沙利铂及奥沙利铂长循环脂质体分别作用4、8、12、24、48 h(只加培养基为空白对照),MTT分析各组药物在不同时间点对细胞的生长抑制。

1.6 透射电镜观察奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞超微结构的影响

细胞接种于6孔板,分别给予28 mg/L的奥沙利铂、2.6 mmol/L的奥沙利铂长循环脂质体(含28 mg/L的奥沙利铂)处理12 h,收集各组细胞,常规制作电镜标本,透射电镜观察拍照。

1.7 流式细胞仪检测奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞凋亡影响

细胞接种于6孔板,按上述方法给予处理。消化并收集各组细胞,PBS悬重,加入5 μl Annexin V-FITC及10 μl PI染色液,轻轻混匀,避光孵育10 min,进行流式细胞仪检测。

1.8 TUNEL法检测奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞凋亡影响

细胞接种于灭菌载玻片上制备细胞爬片,按上述方法给予处理。用新制备的4%多聚甲醛溶液室温固定,阻断剂室温孵育,通透液在冰浴中孵育2 min,然后滴加50 μl的Tunel反应混合溶液孵育1 h,再加入50 μl转化剂-POD,孵育30 min,DAB显色并在光镜下分析结果。

1.9 Western blot检测actived-caspase-3蛋白的表达

收集细胞,用细胞裂解液裂解并抽提蛋白,Breadford法测定蛋白浓度。各取50 μg蛋白上样到15%的SDS-PAGE凝胶电泳,并将蛋白转到PVDF膜上,蛋白印迹点用actived-caspase-3、anti-β-actin抗体孵育过夜(4℃),用辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育1 h,滴加ECL发光试剂,Bio-Rad系统成像。

1.10 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件,组间比较用Student's t检验。

2 结果

2.1 细胞摄入荧光标记脂质体

流式细胞仪结果显示,Dio标记的脂质体与细胞共育2 h,脂质体便被细胞摄取,其平均荧光强度值为(197.72±8.92),

随作用时间的延长平均荧光强度值增加,24 h为(641.74 ± 44.4)。脂质体与细胞作用24 h,荧光显微镜下可观察到细胞内有大量脂质体富集,呈不均匀分布,以核周显著。Dio标记的PEG-脂质体呈绿色荧光,PI标记细胞核呈红色(图1)。

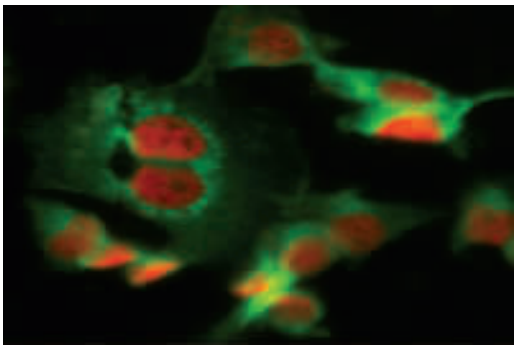
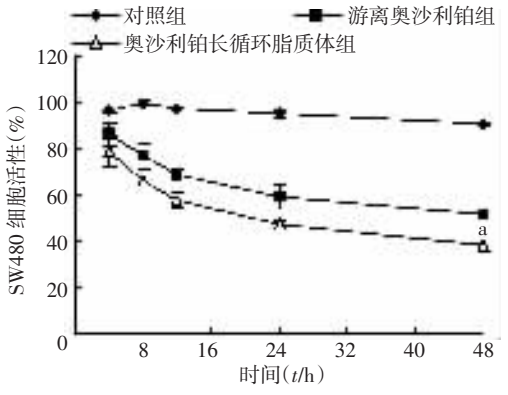


图1 细胞摄入荧光脂质体的荧光显微镜观察
(免疫双标染色 ×400)

2.2 奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞活性影响

不同浓度的奥沙利铂、奥沙利铂长循环脂质体分别作用于细胞后,MTT分析其IC_{50}值分别是56.74 mg/L、4.01 mmol/L。28 mg/L的奥沙利铂以及2.6 mmol/L的奥沙利铂长循环脂质体作用细胞后,细胞生存活性随时间的增加而下降,而奥沙利铂长循环脂质体对细胞的毒性作用明显大于奥沙利铂,组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见图2。

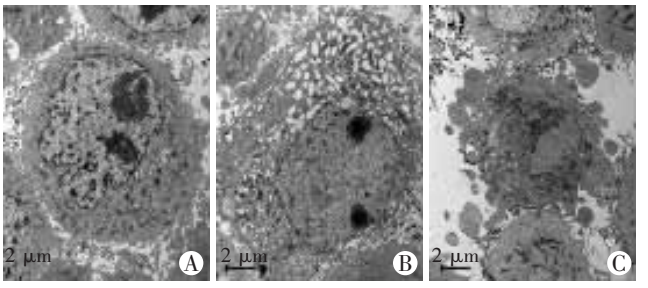


a:$P<0.01$,与游离奥沙利铂组比较

图2 人结直肠癌SW480细胞活性分析

2.3 奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞超微结构的影响

正常对照组SW480细胞体积较大,细胞膜完整,核内染色质丰富,核仁明显,细胞器完整(图3A);细胞经奥沙利铂(28 mg/L)处理后,可见细胞内脂滴增多,核有固缩现象,细胞器肿胀,凋亡少许,可见早期凋亡(图3B);细胞经奥沙利铂长循环脂质体(含28 mg/L奥沙利铂)处理后,细胞皱缩,胞体缩小,细胞质脱落,细胞器崩解,空泡形成,染色质凝集,可见典型凋亡小体(图3C)。



A:正常对照组;B:游离奥沙利铂组;C:奥沙利铂长循环脂质体组

图3 透射电镜观察SW480细胞凋亡

2.4 流式细胞仪检测奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞凋亡影响

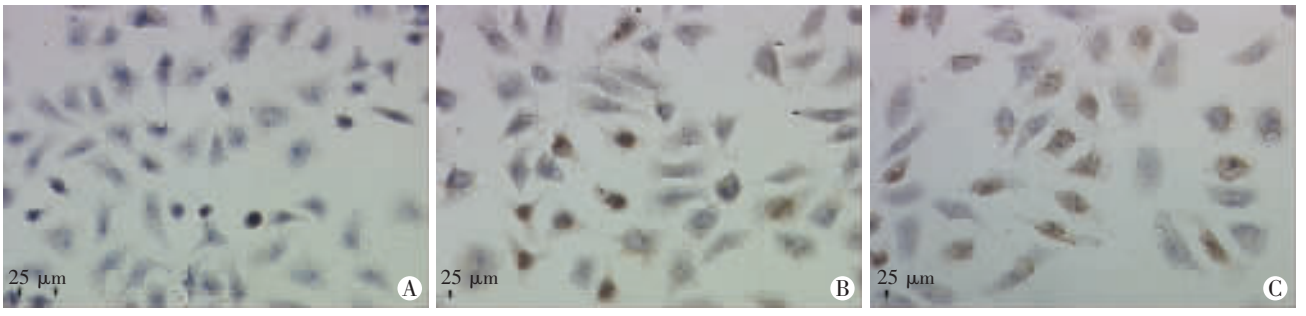
流式细胞仪结果显示,在含奥沙利铂相同的剂量下,奥沙利铂长循环脂质体能显著诱导SW480细胞凋亡,其凋亡发生率为(0.23 ± 0.03)%,游离奥沙利铂及正常对照组的凋亡率分别为(0.17 ± 0.01)%、(0.04 ± 0.004)%,组间比较差异有显著性($P<0.01$)。

2.5 TUNEL法检测奥沙利铂长循环脂质体对SW480细胞凋亡影响

TUNEL结果显示凋亡细胞的变化趋势与流式细胞仪检测结果类似(图4)。

2.6 Western blot检测actived-caspase-3蛋白的表达

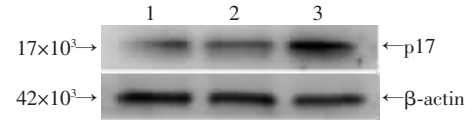
为进一步评估奥沙利铂长循环脂质体对细胞凋亡影响,从蛋白水平检测actived-caspase-3的表达。结果显示,随细胞凋亡增加,活化的caspase片段增加,蛋白表达上调(图5)。actived-



A:正常对照组;B:游离奥沙利铂组;C:奥沙利铂长循环脂质体组

图4 TUNEL染色检测SW480细胞凋亡 (×400)

caspase-3 的相对蛋白表达在奥沙利铂长循环脂质体组，游离奥沙利铂组分别是（1.48 ± 0.22）、（4.88 ± 0.78），组间比较差异有显著性（$P < 0.01$）。



1：正常对照组；2：游离奥沙利铂组；3：奥沙利铂长循环脂质体组

图 5　actived-caspase-3（P17）蛋白的表达

3　讨论

聚乙二醇 2000-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺修饰的脂质体能增加与癌细胞的亲和力。通过荧光标记方法，实验中观察到肿瘤细胞对长循环脂质体的主动摄入及脂质体对细胞的亲和倾向性。随时间延长，脂质体在胞内的聚集增加，这与 Goren 等[8]研究结果相似。细胞对脂质体的吞饮经历了从胞外到细胞质再到核内的过程。

小分子的活性药物被修饰的脂质体包封后，使其具有较高的被细胞内吞的特性，易被肿瘤细胞摄取，而有定向释放的功能[9-10]。本实验 MTT 结果提示 2.6 mmol/L的奥沙利铂长循环脂质体对 SW480 细胞的毒性作用明显强于 28 mg/L 的游离奥沙利铂，分析其可能与胞内高药浓度环境有关。为验证奥沙利铂长循环脂质体对细胞的凋亡影响，我们分别通过透射电镜、流式细胞仪及 TUNEL 方法检测细胞凋亡，结果表明了在相同药物剂量下，奥沙利铂长循环脂质体对 SW480 细胞的凋亡作用明显大于游离的奥沙利铂。这可能与药物本生的毒性作用以及脂质体对细胞生物活性改变有关。细胞凋亡是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程，是多分子信号共同参与调节的结果，而 caspase-3 的活化是凋亡的终结[11]。caspase-3 一旦被激活，细胞凋亡的发生将不可逆转[12]。为进一步表明奥沙利铂长循环脂质体对细胞凋亡影响，实验通过检测 caspase-3 蛋白的表达，从分子水平评估细胞凋亡变化。研究发现经奥沙利铂长循环脂质体处理后的细胞，其 actived-caspase-3 蛋白水平的表达显著高于游离奥沙利铂及空白对照组，提示促凋亡蛋白水平的表达是随细胞凋亡增加而上调。以上反应出奥沙利铂长循环脂质体对人结直肠癌 SW480 细胞凋亡影响显著高于游离奥沙利铂。

奥沙利铂通过对 DNA 损伤而诱导细胞的凋亡，在增加治疗剂量的同时必然增加了药物对机体的毒副效应。但载药脂质体被细胞吞饮后在胞内释放药物，提高了肿瘤细胞内有效药物浓度，同时减缓了细胞对药物的外泵。本实验目前研究了长循环脂质体包载奥沙利铂对人结直肠癌肿瘤细胞的双重效应，提示经修饰的脂质体包载小剂量的药物比游离药物更易达到抗瘤效果。但其对实体肿瘤的抗瘤效应等方面的研究正在进行中。

参考文献：

[1] Hong M, Zhu S, Jiang Y, *et al*. Efficient tumor targeting of hydroxycamptothecin loaded PEGylated niosomes modified with transferrin[J]. J Control Release, 2009, 133(2): 96-102.

[2] Lammers T, Hennink W E, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice[J]. Br J Cancer, 2008, 99(3): 392-397.

[3] 陈姝，娄世锋，张颖，等. GM-CSF 偶联米托蒽醌脂质体的制备及体外抑瘤作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：925-928.

[4] Pasetto L M, D'Andrea M R, Rossi E, *et al*. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why?[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 59(2): 159-168.

[5] Nobili S, Checcacci D, Filippelli F, *et al*. Bimonthly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional 5-fluorouracil/folinic acid in patients with metastatic colorectal cancer pretreated with irinotecan- or oxaliplatin-based chemotherapy[J]. J Chemother, 2008, 20(5): 622-631.

[6] 韩萍，秦红. 国产奥沙利铂联合氟尿嘧啶及亚叶酸钙治疗晚期大肠癌疗效观察[J]. 第三军医大学学报，2006，28(9)：879.

[7] Abu-Lila A, Suzuki T, Doi Y, *et al*. Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model[J]. J Control Release, 2009, 134(1): 18-25.

[8] Goren D, Horowitz A T, Tzemach D, *et al*. Nuclear delivery of doxorubicin *via* folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(5): 1949-1957.

[9] 李小丹，赵敏，赵媛，等. 两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜的体内外缓释研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(10)：1043-1046.

[10] 邓碧，叶琳，王驰，等. 5-氟尿嘧啶核苷前药脂质体对人喉癌 HEP-2 细胞株增殖与凋亡作用的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(17)：1679-1681.

[11] Lin M L, Lu Y C, Chung J G, *et al*. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells *via* caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway[J]. Cancer Lett, 2010, 291(1): 46-58.

[12] 汪欣，杨军，许波，等. Survivin 基因沉默对腺样囊性癌细胞生长和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(11)：1053-1056.

（收稿 2010-10-14 修回 2010-11-01）

（编辑　王小宴）