基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1479-03

脂质体阿霉素对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株增殖与凋亡作用的研究

邓 碧[1],叶 琳[2],王 驰[3],陈鸿雁[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016;3. 重庆医科大学药学院,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究脂质体阿霉素对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株增殖抑制和凋亡作用的影响。方法:本研究以人鼻咽癌 HNE-1 细胞株为研究对象,以游离阿霉素为对照,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定脂质体阿霉素对 HNE-1 的细胞毒作用;分别采用倒置显微镜和 TUNEL 法检测脂质体阿霉素作用于 HNE-1 细胞后细胞凋亡的形态学变化和细胞凋亡率。结果:脂质体阿霉素对 HNE-1 细胞的 IC_{50} 是游离阿霉素的 1/3 倍;与游离阿霉素组相比较,倒置显微镜观察脂质体阿霉素组,发现该实验组细胞出现细胞凋亡形态学变化;脂质体阿霉素和游离阿霉素分别作用于 HNE-1 细胞的凋亡指数分别为 11.27% ± 0.33%、43.57% ± 3.14%。结论:本实验研究显示,与游离阿霉素相比较,脂质体阿霉素对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株具有较好的体外增殖抑制作用,能够诱导 HNE-1 细胞凋亡。

【关键词】脂质体;阿霉素;HNE-1;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R739.62 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-12

Effect of liposome adriamycin on proliferation and apoptosis of HNE-1 cell line

DENG Bi, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the effects of liposome adriamycin and free adriamycin on the cell proliferation and apoptosis of HNE-1 cell line. *Methods*: MTT reduction assay was used to investigate the effects of liposome adriamycin and free adriamycinon on the proliferation of HNE-1 cell line. Inverted microscope was used to observe the cell morphology variation. Flow cytometry (FCM) was used to detecet the apoptosis rate of HNE-1 cell. *Results*: The IC50 of HNE-1 cell line by free adriamycin was 300% compared to that by liposome adriamycin. After treated with liposome adriamycin, typical apoptosis morphological character appeared on HNE-1 cell line. After treated with liposome adriamycin and free adriamycin respectively, the apoptosis rates of HNE-1 were: 11.27% ± 0.33% and 43.57% ± 3.14% respectively. *Conclusion*: The rate of the cell proliferation by liposome adriamycin was larger than that by free adriamycin, and the rate of the HNE-1 cell line apoptosis by liposome adriamycin on was larger than that by free adriamycin.

【Key words】Liposomes; Adriamycin; HNE-1; Apoptosis

阿霉素(Adriamycin, ADM)是临床常用的蒽环类抗肿瘤药物,具有抗瘤谱广、疗效好等优点,然而该药毒副作用大,易引起心脏损害、骨髓抑制等不良反应,故临床应用受到限制。脂质体作为包载抗癌药物的载体具有较多的优点,研究发现[1]脂质体包载阿霉素后,能显著降低抗肿瘤药物的毒性,保留和提高药物的疗效,有广泛的应用前景。但脂质体阿霉素在头颈肿瘤中的研究较少。本实验以游离阿霉素作对照,研究脂质体阿霉素对人鼻咽癌 HNE-1 细胞的增殖抑制及其对细胞凋亡作用的影响,为临床的进一步研究提供一些实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和培养条件 HNE-1 细胞株(购自上海中科院细胞所)。

1.1.2 试剂和仪器 RPIM1640 购于 Gibco 公司,新生牛血清购自杭州四季清公司,四甲基偶氮唑盐(MTT),二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司,游离 ADM(深圳万乐有限公司),

作者简介:邓 碧(1983-),女,硕士,研究方向:头颈肿瘤研究。

通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。

脂质体阿霉素(重庆医科大学药学系王驰副教授惠赠)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HNE-1 细胞在含 10%的新生牛血清的 RPMI1640 中种植,37℃,5%CO_2 饱和湿度温度培养箱中生长,0.25%胰酶消化,传代。

1.2.2 脂质体 ADM 和游离 ADM 对 HNE-1 细胞的体外抑制试验 取对数生长期的细胞常规消化后,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,后分别加入不同终浓度的脂质体 ADM 和游离 ADM,每组设 4 复孔,在 37℃,5%CO_2 条件下培养 72 h 后,每孔加入 MTT 继续培养,4 h 后加入DMSO,以 570 nm 波长检测每孔吸光度(A)值,按照公式计算细胞抑制率(fa)和存活率(fu):采用中效浓度公式,用回归方程式分别求出脂质体 ADM 和游离 ADM 对 HNE-1 细胞的 IC50 。

$fa=(1-A_{实验}/A_{对照})\times100\%$

$fu=(A_{实验}/A_{对照})\times100\%$

$fa/fu=(D/Dm)m$(D 表示药物浓度,Dm 表示中效浓度)

1.2.3 细胞形态学观察 取对数生长期人鼻咽癌 HNE-1 细胞常规消化后,以每瓶 1×10^6 个细胞接种于 3 个培养瓶中。实验分别设置 3 组:阴性对照组、游离 ADM 组,脂质体 ADM 组,其中游离 ADM 组和脂质体 ADM 组分别以 1 μg/ml 的终浓度与 HNE-1 细胞共同培养,培养 24 h 后分别取出 3 个培养瓶于光学显微镜下观察 3 组实验细胞的形态学变化。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞经常规消化后,以每孔 5×10^3 个细胞接种于预先放有载波片的 24 孔板中进行细胞爬片,HNE-1 细胞分别设置空白对照和游离 ADM、脂质体 ADM 处理 3 组,其中游离 ADM 组和脂质体 ADM 组均采用 0.03 μg/ml 的终浓度与 HEP-1 细胞培养。在 37℃,5%CO_2 条件下培养 72 h 后,严格按照 TUNEL 剂的明方法进行检测,细胞核染成棕黄色或棕褐色为凋亡细胞,凋亡细胞半量分析,每张片子计数 5 个高倍视野细胞核数及凋亡细胞核数,取均值,并计算出凋亡率,最后相差显微镜采集并用 IPP5.0 软件进行分析。

凋亡率 = 凋亡阳性的细胞核数/总计数的细胞核 × 100%。

1.2.5 统计学方法 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学用 t 检验方法,以 $P\leq0.05$ 为统计学有差异,采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 脂质体 ADM 和游离 ADM 对 HNE-1 细胞的体外抑制试验

空白脂质体对 HNE-1 细胞的毒性作用较小(细胞抑制率小于 10%),可忽略其对细胞的毒性作用(预实验得出)。

脂质体 ADM 与游离 ADM 对 HNE-1 细胞增殖抑制作用见表 1。通过公式计算出:游离阿霉素对 HNE-1 的 IC_{50} 为 0.14 μg/ml; 脂质体阿霉素对 HNE-1 的 IC_{50} 为 0.04 μg/ml; 脂质体阿霉素的 IC_{50} 是游离阿霉素的 1/3 倍。

2.2 细胞形态学观察

通过光学显微镜下观察 3 组细胞的形态发现,空白对照组细胞胞膜完整,胞核大、圆,核仁色深,清晰可见;游离阿霉素组,活细胞数量减少,少部分细胞体积明显缩小,细胞核缩小;脂质体阿霉素组,活细胞数量大量减少,大部分细胞体积明显缩小,细胞浆内较多空泡生成,凋亡细胞膜完整,可有突起,凋亡小体为数个圆形小体围绕在细胞周围,见图 1。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡率

脂质体阿霉素和游离阿霉素分别作用于 HNE-1 细胞的凋亡率分别为 11.27% ± 0.33%、43.57% ± 3.14%。脂质体阿霉素组的凋亡率比游离阿霉素增加了 32%,是游离阿霉素的 3.9 倍,见图 2。

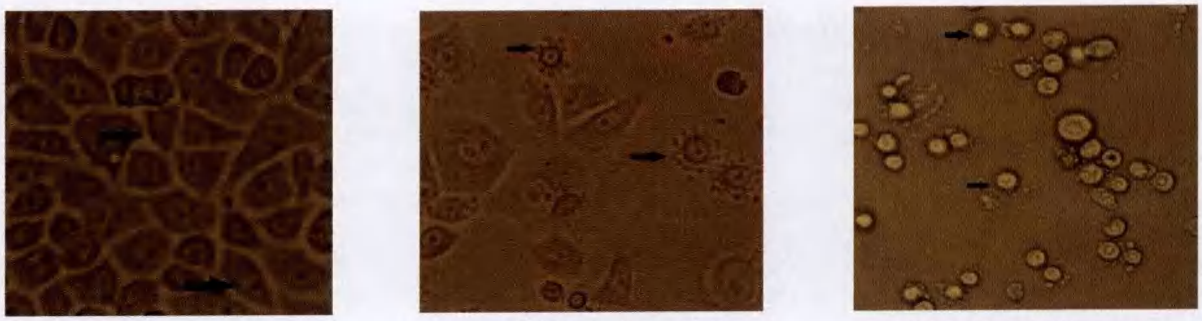
3 讨 论

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma,NPC)[2]是我国南方常见的头颈部恶性肿瘤之一,早期患者采用放射治疗常能取得较好的治疗效果,中晚期患者的治疗方案以化疗为主。但目前临床使用的抗肿瘤化学治疗药物毒副作用大,临床应用受到限制。如何降低抗肿瘤药物的毒副作用,成为人们急需解决的主要问题。

阿霉素是临床常用的蒽环类抗肿瘤药物,但该药毒副作用大,临床应用受到限制。脂质体阿霉素是一种抗癌药物的新剂型。研究显示[3]:脂质体阿霉素能显著降低抗抗肿瘤药物的毒性,保留和提高抗

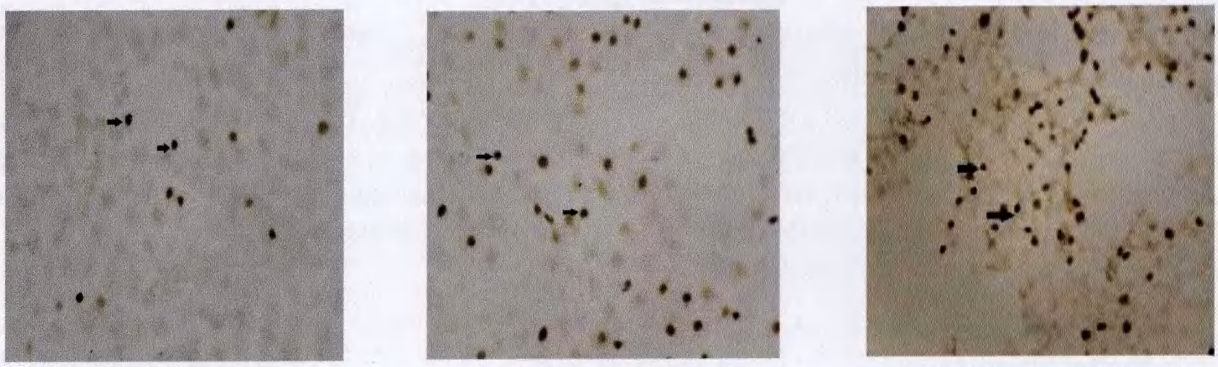
表 1 脂质体 ADM 与游离 ADM 对 HEN-1 细胞增殖抑制作用的影响

组别	药物浓度(μg/ml)	吸光度(A)值	抑制率(%)	IC_{50}(μg/ml)
游离 ADM	2.000	0.14 ± 0.01	87	0.14
	0.400	0.21 ± 0.03	69	
	0.080	0.55 ± 0.02	43	
	0.016	0.88 ± 0.07	21	
脂质体 ADM 0.14	2.000	0.12 ± 0.03	92	0.04
	0.400	0.24 ± 0.04	82	
	0.080	0.37 ± 0.01	76	
	0.016	0.93 ± 0.03	34	



A. 空白对照组(×400)　B. 游离 ADM 组(×400)　C. 脂质体 ADM 组(×400)

图 1　细胞凋亡形态学观察



A. 空白对照(SP×200)　B. 游离 ADM 组(SP×200)　C . 脂质体 ADM 组(SP×200)

图 2　TUNEL 法检测细胞凋亡率

肿瘤药物的疗效。Michieli 等[4]报道了相同浓度的脂质体阿霉素对体外细胞的增殖抑制作用是游离阿霉素的 4~5 倍;有临床研究[5-7]已将脂质体阿霉素作为复发或耐药的乳腺癌、卵巢癌的一线或二线化疗药物。

本实验以游离阿霉素作对照,检测脂质体阿霉素对人鼻咽癌 HNE-1 细胞的增殖抑制及其对细胞凋亡作用的影响。结果显示:

脂质体阿霉素对 HNE-1 细胞的 IC_{50} 是游离阿霉素的 1/3 倍;说明脂质体阿霉素可减少鼻咽癌 HNE-1 细胞内抗肿瘤药物用量,提高药物的效价。

与游离阿霉素组相比较,光镜观察发现脂质体阿霉素组细胞出现较明显的细胞凋亡形态学变化,说明脂质体阿霉素能够较好的诱导 HNE-1 细胞的凋亡。

通过 TUNEL 法检测发现,脂质体阿霉素和游离阿霉素作用于 HNE-1 细胞的凋亡率分别为 11.27%±0.33%、43.57%±3.14%。脂质体阿霉素组的凋亡率比游离阿霉素增加了 32%,是游离阿霉素的 3.9 倍。该结果提示,与游离 ADM 相比,在相同浓度的作用下,脂质体 ADM 能明显增加 HNE-1 细胞的凋亡率。综上所述,通过本实验可以推测脂质体阿霉素相较游离阿霉素对人鼻咽癌 HNE-1 细胞具有较好的体外增殖抑制作用,能够显著诱导 HNE-1 细胞凋亡、为临床的进一步研究提供一些实验室依据。

参 考 文 献

[1] 周平红,秦新裕.脂质体阿霉素及其靶向治疗研究进展[J].中国临床医学,2002,8(4):331-333.

[2] 沈　娜,张潜英,余晓燕,等.siRNA 抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞株 HPV16-E6 的表达和细胞增殖[J].重庆医科大学学报,2008,33(8):927-930.

[3] 范　健,黄懋魁.脂质体载药提高阿霉素抗肿瘤活性的初步实验研究[J].癌症,1994,13(3):214-216.

[4] Michieli M,Damiani D,Ermacora A,et al.Liposome-encap sulated dox-orubicin for PGP-related multidrug resistance[J]. Br J Haematol,1999,106:92-99.

[5] Overmloyer B,Silverman P,Holder L W,et al.Pegylated liposomal doxorubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for patients with metastatic or recurrent breast cancer[J]. Clin Breast Cancer,2005,6(2):150-157.

[6] Perez-Lopez M E,Curiel T,Gomez J G,et al.Role of pegylated liposomal doxorubicin(Caelyx) in the treatment of relapsing ovarian cancer [J].Anticancer Drugs,2007,18(5):611-617.

[7] Andreopoulou E,Gaiotti D,Kim E,et al.Pegylated liposomal doxo rubicin HCL(PLD;Caelyx/Doxil(R)):Experience with long-term maint enance in respon- ding patients with recurrent epithelial ovarian cancer[J]. Ann Oncol,2007,18(4):716-721.

(责任编辑:冉明会)