维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)06－0745－04

奥沙利铂诱导人肝癌细胞株 HepG2 凋亡及其机制探讨

张　燕[1]，左国庆[1]，汤为学[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院消化内科，重庆　400010；2.重庆医科大学病理生理教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：研究奥沙利铂对人肝癌细胞株 HepG2 生长抑制及诱导凋亡的作用并探讨其诱导凋亡的作用机制。方法：应用 MTT 法检测奥沙利铂对 HepG2 细胞生长的抑制作用；电镜观察细胞的形态改变；流式细胞仪分析细胞周期的分布和凋亡的情况；免疫组织化学法检测突变型 p53，Bcl－2，Bax，Fas 等凋亡相关基因蛋白的表达。结果：奥沙利铂对 HepG2 有明显的抑制作用，细胞阻滞于 S 期和 G_2/M 期，G_0/G_1 期细胞减少，作用 72h 出现凋亡峰，电镜可以找到凋亡小体，免疫组织化学表明 Bax 表达增强，突变型 p53、Bcl－2 表达减弱，Fas 表达无差异。结论：奥沙利铂具有抑制肝癌细胞株 HepG2 增殖及诱导凋亡作用，其机制与促凋亡相关基因表达增强和抗凋亡相关基因表达减弱有关。

【关键词】奥沙利铂；肝细胞癌；细胞周期；凋亡

【中国图书分类法分类号】R329.2＋8　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－03－05

Study on apoptosis of human hepatoma cell line HepG2 induced by oxaliplatin

ZHANG Yan, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of oxaliplatin on the proliferation and apoptosis of human hepatoma cell line HepG2 and to investigate its mechanism. *Methods*: The inhibition of HepG2 cell proliferation was estimated by MTT. Morphologic changes under electron microscope were observed. Alteration of cell cycle and apoptosis were analyzed using flow cytometry. The expression of apoptosis－associated genes mutant type p53, Bcl－2, Bax and Fas were detected with immunohistochemical technique. *Results*: Oxaliplatin could apparently inhibit the growth of HepG2 cells. Cell cycle analysis indicated that oxaliplatin blocked cells in S and G_2/M phase and the apoptosis emerged when treated with oxaliplatin for 72 hours. Under transmission electron microscope, apoptotic body could be found. The expression of genes Bax was up－regulated, the expression of genes mutant type p53, Bcl－2 was down－regulated, while the expression of Fas was not changed. *Conclusion*: Oxaliplatin can inhibit the proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells. The apoptosis is related to the up－regulation apoptotic genes and down－regulation of anti－apoptotic genes.

【Key words】Oxaliplatin; Hepatocellular carcinoma; Cell cycle; Apoptosis

奥沙利铂(Oxaliplatin，L－OHP)是第三代铂类化合物，其化学名为左旋反式二氨环己烷草酸铂，国际通用名为草酸铂。临床前研究表明该药对人和鼠多种肿瘤细胞均有抑制作用，且对各种顺铂耐药的肿瘤细胞株无交叉耐药。大量临床资料表明，治疗多种类型肿瘤时无论单用或联合应用都有较高的疗效，耐受性好而且毒副作用小，化疗指数高，安全范围广。但奥沙利铂在体内外对人肝肿瘤的研究国内外少有报道，因此本研究通过抗肿瘤药物奥沙利铂对人肝癌细胞株 HepG2 体外增殖的影响，为奥沙利铂应用于肝细胞癌的临床治疗提供理论依据。

作者介绍：张　燕(1975－　)，女，住院医师，硕士，主要研究方向：肝脏疾病。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株

HepG2 细胞株，由重庆医科大学第二临床学院肝炎研究所提供，在含 10% 小牛血清的 RPMI－1640 培养液中于 37℃，5%CO_2 条件下培养。

1.1.2　主要试剂

奥沙利铂由江苏恒瑞医药股份有限公司生产，分子量为 397.29，使用时用 5% 葡萄糖注射液稀释至所需的药物浓度。RPMI－1640 培养基和胰酶均为 GIBCO 公司生产。新生小牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司生产。四甲基偶氮唑盐(MTT)由上海华舜生物工程有限公司生产。

维普资讯 http://www.cqvip.com

突变型 p53、Bcl－2、Bax、Fas 购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.3 仪器

透射电子显微镜为 Hitachi－600 型(日本),全自动酶标读数仪为 Bio－Rad2550 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 奥沙利铂对 HepG2 细胞的作用效应 应用 MTT 比色法[1],选取对数生长期的 HepG2 细胞,用 0.1% 胰蛋白酶消化,加入含 10% 小牛血清的 RPMI－1640 培养液制备成浓度为 5×10^4/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200μl。实验设试剂对照组,肿瘤细胞对照组及五个实验组(加入 20μl/孔奥沙利铂,使其终浓度分别为 16μmol/L、32μmol/L、64μmol/L、128μmol/L、256μmol/L),每组设 8 个平行孔,于 37℃,5% CO_2 条件下分别培养 24、48、72h。取出离心、吸除各孔原液,加 200μl/孔 RPMI－1640 培养液及 20μl/孔 MTT 液,于 37℃,5% CO_2 条件下继续培养。4h 后离心、吸出各孔原液,加 DMSO200μl/孔,在自动酶标读数仪上以 570nm 波长测定各孔 OD 值。根据下列公式计算奥沙利铂对 HepG2 细胞的抑制率:

抑制率(f_a) = (1 － 实验组平均 OD 值/细胞对照组平均 OD 值) × 100%

按中效方程式计算出中效浓度(IC_{50})[2]:

$f_a/f_u = (D/D_m)^m$

f_a 为抑制率,f_u(存活率) = 1 － f_a,D 为药物浓度,D_m 为中效浓度即抑制率为 0.5 时所需药物浓度,m 为斜率。

1.2.2 奥沙利铂作用后 HepG2 细胞形态的改变 电镜观察,取对数生长期的 HepG2 细胞分别加入两个 100ml 培养瓶中,使每瓶细胞数为 1×10^6 个,一瓶为阴性对照,另一瓶加入 1/2 中效浓度的奥沙利铂 2ml,于 37℃,5% CO_2 条件下培养 72h,0.1% 胰蛋白酶消化,收集所有细胞,加入 PBS 洗涤,离心后,吸尽上清液,缓慢加入 4% 戊二醛,固定细胞 2h。用 PBS 冲洗后,1% 锇酸固定 1h 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。

1.2.3 奥沙利铂作用后 HepG2 细胞周期的改变 采用流式细胞仪分析方法,实验细胞处理同电镜,收集细胞后加入 70% 乙醇(4℃ 预冷)固定,碘化丙啶(PI)染色 30min。用 FACScan Becton Dickinson 流式细胞仪作流式细胞分析,汞激发波长为 488nm,并用 Modfit LT 2.0 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。

1.2.4 奥沙利铂作用后 HepG2 细胞凋亡相关基因蛋白表达的改变 采用免疫组织化学法,取对数生长期的 HepG2 细胞用 0.1% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,以 5×10^4/ml 浓度接种于装有盖玻片的 24 孔板中,每孔 1ml,处理组加入 1/2 中效浓度的奥沙利铂 100μl/孔,于 37℃,5% CO_2 条件下培养。72h 后取出贴有细胞的盖玻片,用 PBS 冲洗 3 次,95% 的乙醇固定 30min,按照 SP 试剂盒说明进行操作,PBS 代替一抗作为阴性对照,DAB 染色,苏木素复染,中性树胶封片。结果分析:排除爬片边缘细胞,10×10 低倍镜下随机选取 10 个细胞均匀分布的视野,10×20 中倍镜下每个视野随机选 50 个细胞。按着色强弱分为 4 个等级:无着色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。按公式 HSCORE = $\sum$Pi(i + 1)(i = 0、1、2、3;Pi 表示评分为 i 的比例)计算 HSCORE 得分[3]。

1.3 统计学处理

统计分析使用 SPSS 10.0 软件包。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数比较采用成组 t 检验,不同处理组率的比较采用 χ^2 检验,显著性水平以 $P<0.05$ 判断。

2 结 果

2.1 奥沙利铂对 HepG2 细胞的作用效应(见表 1)

MTT 法检测发现不同浓度的奥沙利铂对 HepG2 细胞均有抑制作用,从表 1 可以看出:随着作用时间及药物浓度的增加,奥沙利铂对 HepG2 细胞的抑制作用就越明显,72h 抑制率最高达 88%。

同一浓度不同时间各组之间均有显著性差异 $F=396.377$,$P<0.001$;同一时间不同浓度各组之间也有显著性差异,$F=32.894$,$P<0.001$。

利用中效方程式求出中效浓度为 0.3 μmol/L。

2.2 奥沙利铂作用后 HepG2 细胞形态的改变

电镜观察:未处理组 HepG2 细胞体积较大,核浆比例亦大。核形态不规则,核内染色质丰富,核仁明显,部分可见多个核仁。胞浆内可见少许内质网及线粒体。细胞表面有较多微绒毛(图 1)。药物处理后,HepG2 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;细胞边缘胞质突起呈大泡状,并从细胞主体上脱离,有的内含染色质团块,形成典型的凋亡小体(图 2)。

2.3 奥沙利铂作用后 HepG2 细胞周期的改变(见表 2)

奥沙利铂作用 HepG2 细胞 24h,细胞被阻滞在 S 期;48h 为 S 期和 G_2/M 期;72h 则被阻滞于 S 期,G_0/G_1 期细胞减少。亚二倍体峰(Sub－G_1)表示 DNA 降解,又称细胞凋亡峰,在 72h 达到 7.93%,具有时间依赖性。

经 χ^2 检验,各细胞周期 $P<0.01$,24h 及 48h 的凋亡峰 $P>0.05$,72h 的凋亡峰 $P<0.01$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 MTT 法检测奥沙利铂对 HepG2 细胞增殖的抑制作用(抑制率,$\bar{x} \pm s$)

组别	24h	48h	72h
16uML－OH 组	0.2785±0.0082	0.6131±0.0049	0.7521±0.0179
32uML－OH 组	0.3499±0.0055	0.6713±0.0358	0.7595±0.0302
64uML－OH 组	0.4683±0.0509	0.7100±0.0464	0.8244±0.0375
128uML－OH 组	0.5151±0.0513	0.7327±0.0486	0.8353±0.0400
256uML－OH 组	0.5631±0.0397	0.7662±0.0499	0.8551±0.0403

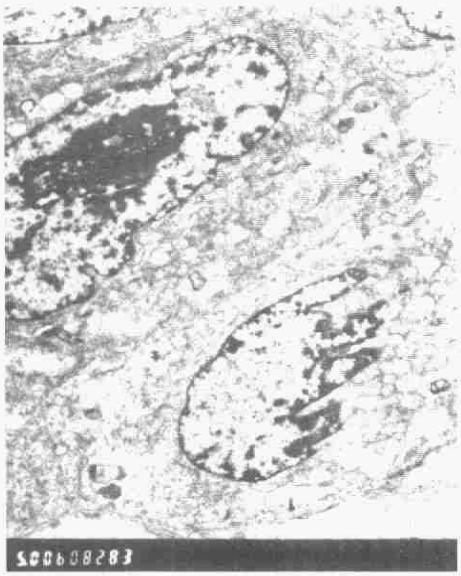


图 1 未处理组 HepG2 细胞×5000



图 2 加药组 HepG2 细胞×5000

表 2 奥沙利铂对 HepG2 细胞周期分布及凋亡的影响

周期分析	正常细胞组			药物处理组		
(%)	24h	48h	72h	24h	48h	72h
G_0/G_1	57.25	63.61	69.80	51.76	53.17	60.76
S	31.18	28.87	22.25	37.14	33.50	30.32
G_2/M	11.57	7.52	7.95	11.10	13.33	8.92
Apoptosis	3.80	5.69	0.00	3.43	5.17	7.93

表 3 奥沙利铂对 HepG2 细胞凋亡相关基因蛋白表达的影响(HSCORE 得分)

指标	样本数	对照组	加药组	t 值	P 值
p53	20	2.767±0.002	2.589±0.006	8.567	<0.01
Bcl－2	20	2.811±0.007	2.719±0.002	4.171	<0.01
Bax	20	2.365±0.128	2.708±0.003	8.183	<0.01
Fas	20	2.720±0.001	2.725±0.002	0.665	>0.05

2.4 奥沙利铂作用后 HepG2 细胞凋亡相关基因蛋白表达的改变(见表 3)

奥沙利铂作用 HepG2 细胞 72h 后,免疫细胞化学表明 Bax 表达增强,突变型 p53、Bcl－2 表达减弱,Fas 表达无明显差异。

3 讨 论

大量体外研究已证明,许多抗癌药物的抗肿瘤作用不是杀伤肿瘤细胞而是诱导肿瘤细胞凋亡或两种形式并存。由于药物杀伤肿瘤细胞可导致细胞坏死,产生严重的炎症反应,因此,诱导肿瘤细胞凋亡也成为了现代抗肿瘤药物治疗的新策略。奥沙利铂(Oxaliplatin,L－OHP)作为第三代铂类化合物,与其它铂类药物相似,其作用机制主要是使肿瘤细胞内 DNA 形成链间和链内交联,从而中断 DNA 合成,最终产生细胞毒和抗肿瘤活性。对于其是否能诱导人肝癌细胞凋亡,国内外尚未见报道。

本研究采用了多种方法观察了奥沙利铂对 HepG2 细胞体外增殖的影响,发现不同浓度的奥沙利铂对 HepG2 细胞均有明显的抑制作用并且呈时间和剂量依赖性;流式细胞仪显示,细胞阻滞于 S 期和 G_2/M 期细胞增加,G_0/G_1 期细胞减少,出现凋亡峰;电镜可以找到凋亡小体,证明了一定浓度的奥沙利铂可诱导 HepG2 细胞凋亡。

细胞凋亡区别于细胞坏死的重要标志之一就是受基因调控,肿瘤的发生通常被认为是细胞原癌基因的激活和抑癌基因的失活,从而扰乱了细胞正常的增殖与分化及正常的凋亡调控,从而导致肿瘤的

维普资讯 http://www.cqvip.com

形成。

p53 基因是最重要的细胞凋亡调控基因之一。大量研究表明 p53 基因突变在肝癌的发生发展中起重要作用,对凋亡的影响可能是其机制之一,目前认为可能与 p53 基因突变失去了对细胞增殖的监视功能,使突变细胞自我破坏的正常通道被阻断,诱导细胞凋亡的能力下降有关。本研究发现,经奥沙利铂作用 72h 后,HepG2 细胞的突变型 p53 基因表达减弱。

Bcl-2 是最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因,定位于 18 号染色体,在淋巴瘤中易位到 14 号染色体的免疫球蛋白重链基因的控制之下,而呈过高表达,这并不影响细胞增殖和加速细胞分裂,而是通过延长肿瘤细胞生存,阻止细胞凋亡的发生[4]。Bcl-2 的基因上游有 p53 蛋白结合位点的元件而抑制 p53 基因表达。换言之,p53 蛋白作为反式转录因子,可抑制 Bcl-2 基因表达[5]。Bax 基因为 Bcl-2 家族中的一员,与 Bcl-2 家族其它成员的氨基酸同源表现在高度保守的 BH1 和 BH2 结构域[6]。Bcl-2 家族通常以二聚体的形式发挥作用,Bax 和 Bcl-xs 能拮抗 Bcl-2 或 Bcl-xl 的抗凋亡作用,当 Bcl-2 或 Bcl-xl 过量时,细胞免遭凋亡;反之,当 Bax 同源二聚体占优势时,细胞易于在诱导剂的作用下发生凋亡[7]。本研究结果显示 Bcl-2 基因加药组较对照组表达减弱,Bax 基因表达增强,表明奥沙利铂诱导 HepG2 细胞凋亡的作用与 Bax 的表达增加,抑制 Bcl-2 的表达,从而改变 Bcl-2/Bax 比例有关。

Fas/FasL 途径是目前发现细胞凋亡的两条死亡信号转导途径之一,Fas 主要通过相应配基或抗 Fas 抗体来引发凋亡。现已证明一些药物诱导肿瘤细胞的 Fas 表达,是药物杀伤癌细胞的机制之一,如顺铂、阿霉素等使 Fas 上调并可能克服癌细胞的耐药性[8]。本研究中奥沙利铂作用前后 Fas 表达无明显差异,提示奥沙利铂诱导 HepG2 细胞凋亡的作用与 Fas 无关。

综上所述,奥沙利铂具有一定的诱导肝癌细胞凋亡的作用,上调促凋亡基因 Bax 和下调凋亡抑制基因突变型 p53、Bcl-2 的表达可能是其诱导凋亡的分子机理,但该药不能通过 Fas/FasL 途径诱导肝癌细胞凋亡,其具体机制还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effects relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors[J]. Adv Enzyme Regul, 1984;22(1):27-30.

[3] Harrington DJ, lessey BA, Raiv, et al. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis[J]. J pathol, 1999;187(2):242-248.

[4] 彭黎明,王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 人民卫生出版社,2000;2-9.

[5] 宫璀璀,吴景兰,王红梅. 8-Br-cAMP 和 ^{60}Co 照射诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡及相关基因表达的研究[J]. 解放军高等专科学校学报,1999;27(3):1-3.

[6] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993;7(4):609-619.

[7] 杨连军,王文亮,司晓辉. 乙醇诱导的肝癌细胞 HCC-9204 凋亡及其与 Bax 和 Bcl-2 蛋白的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2001;17(4):315-317.

[8] 司维柯,陈 安,李 鹏,等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系 HepG2 凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报,2001;23(7):816-820.