维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)04－0452－03

奥沙利铂对 K562 细胞体外生长的影响

陈 姝[1], 汤为学[2], 娄世锋[1]

(1. 重庆医科大学第二临床学院血液科,重庆 400010;2. 重庆医科大学病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察奥沙利铂对人白血病 K562 细胞的作用。方法:检测奥沙利铂对 K562 细胞作用的时间效应和剂量效应,在电镜下观察奥沙利铂作用后细胞形态变化;用流式细胞仪分析细胞周期的改变。结果:随着作用时间及药物浓度的增加,奥沙利铂对 K562 细胞的增殖抑制作用就越明显。0.016mmol/L 奥沙利铂作用 72h,K562 细胞生长抑制率达 85%,形态学及流式细胞仪分析显示 G_2/M 期阻滞和细胞凋亡。结论:奥沙利铂诱发的人白血病细胞的凋亡与细胞分裂期阻滞密切相关。

【关键词】奥沙利铂;白血病;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－10－21

Growth－inhibiting effects of oxaliplatin on K562 cells in vitro

CHEN Shu, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of oxaliplatin on human leukemia K562 cell and its mechanism. *Methods*: The leukemia cell growth was measured by MTT－microculture tetrazolium assay. Cell－cycle kinetics and apoptosis were analyzed by flow cytometry and microscopic examination. *Results*: Oxaliplatin inhibited the leukemia cell growth in concentration－ and time－dependent manners. Marked cells accumulated in G_2/M phase. The rate of cell growth inhibition was 85% after intervention in 0.016 mmol/L oxaliplatin for 72 hours. The cells showed G_2/M arrest and apoptosis. *Conclusion*: Oxaliplatin suppresses the growth of K562 cells in vitro by causing cell－cycle arrest, and cell apoptosis. The mechanisms of oxaliplatin provide theoretical guidance for clinical treatment.

【Key words】Oxaliplatin; Leukemia; Apoptosis

奥沙利铂(oxaliplatin)是第三代铂类化合物,抗瘤谱与顺铂不同,相互间无交叉耐药性。近年来临床前体内外试验证实了奥沙利铂对多种人类肿瘤具有抗瘤活性,特别是对部分原发性或获得性顺铂耐药肿瘤有效。目前大多数临床研究表明,奥沙利铂对晚期大肠癌、卵巢癌有较好疗效;对非小细胞肺癌、头颈部肿瘤也有效[1~4]。该药无明显肾毒性,耳毒性极微,血液学毒性较轻[5,6]。但有关奥沙利铂对人白血病的作用及其机制的研究,国内报道甚少。本实验通过观察奥沙利铂对人白血病 K562 细胞的作用,探讨其抗癌作用的机理。

1 材料与方法

1.1 药物

奥沙利铂由江苏恒瑞医药有限公司提供,分子量为 397.29。使用时用 0.9% 氯化钠注射液稀释至所需的药物浓度。

1.2 细胞

K562 细胞株由重庆医科大学病理生理教研室提供。用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640(Gibco,美国)培养液,在 37℃,5%CO_2 条件下培养。

1.3 MTT 试验[7]

取对数生长期 K562 细胞(5×10^4/ml),接种于 96 孔板内,200μl/孔。每孔加入奥沙利铂 20μl,使终浓度分别为 0.004、0.008、0.016、0.032、0.064mmol/L。每种浓度设 8 个平行孔。另设阴性对照组。37℃、5%CO_2 分别培养 24h、48h、72h,离心,弃上清,加无血清 RPMI 1640 200μl 及 5mg/ml MTT(Fluka)20μl,继续培养 4h 后,离心,吸去上清,加入 DMSO200μl/孔,振荡 5min 后,用自动酶标读数仪(Bio－Rad2550 型,美国),波长 570nm,测定 A 值。

根据下列公式计算奥沙利铂对 K562 细胞的抑制率。

作者介绍:陈 姝(1965－),女,讲师,
主要研究方向:白血病与淋巴瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{肿瘤细胞阴性对照组平均 A 值}}$$

1.4 流式细胞仪分析

根据 MTT 试验结果，计算出奥沙利铂的中效浓度为 0.002mmol/L。取对数生长期 K562 细胞分别加入两个 100ml 培养瓶中，使每瓶细胞数为 5×10^5/10ml，1 瓶为阴性对照，另 1 瓶加入奥沙利铂后最终浓度为 1/2 中效浓度，即 0.001mmol/L，培养 72h。收集细胞，PBS 洗涤 2 次，70% 冰乙醇固定，碘化丙啶(PI)染色 30min。用 FACS Calibur 流式细胞仪(B.D,美国)作流式细胞分析，汞激发波长为 488nm，并用 Modfit LT2.0 软件分析细胞周期分布。

1.5 电镜观察

取对数生长期 K562 细胞分别加入 2 个 100ml 培养瓶中，使每瓶细胞数为 5×10^5/10ml。1 瓶为阴性对照，另 1 瓶加入奥沙利铂后最终浓度为 0.001mmol/L，培养 72h，收集细胞，PBS 洗涤 2 次。2.5% 戊二醛固定 2～4h 后用 PBS 洗涤 2 次，继用 2% 四氧化锇固定，脱水、包埋、切片，染色按常规处理，透射电镜观察摄片。

2 结 果

2.1 MTT 测定结果

表 1 不同浓度奥沙利铂作用不同时间对 K562 细胞抑制率的影响

药物浓度 (mmol/L)	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064
24h	0.2131	0.2629	0.3337	0.3968	0.5473
48h	0.2168	0.2960	0.4148	0.6770	0.7459
72h	0.6061	0.7281	0.8505	0.8989	0.9107

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 K562 细胞的抑制作用就越明显。根据中效原理[8]方程式 $fa/fu=(D/D_m)^m$，两边取对数后 $\log fa/fu = m\log D - m\log D_m$，设 $b=m$，$a=-m\log D_m$，$Y=\log fa/fu$，$X=\log D$，$Y=bX-a$，其中 fa 为药物作用效应，即抑制率；$fu=1-fa$，D 为药物浓度，m 为斜率，D_m 为中效浓度，即 0.5 效应时的药物浓度。计算出奥沙利铂作用 72h 的中效浓度 D_m 为 0.002mmol/L。

2.2 细胞周期分布

表 2 奥沙利铂处理 K562 细胞 72h 的 DNA 含量分析(%)

周期	G_0/G_1	S	G_2/M	Sub/G_1(apoptosis)
对照	41.78	45.93	12.29	0
实验	29.93	18.08	52.00	5.12

奥沙利铂处理细胞 72h，细胞被明显阻滞在 G_2/M 期，占 52%，G_0/G_1 期、S 期明显减少。亚二倍体峰(Sub/G_1)表示 DNA 降解，又称细胞凋亡峰，在 72h，Sub/G_1 期细胞占 5.12%(见图 1、图 2)。

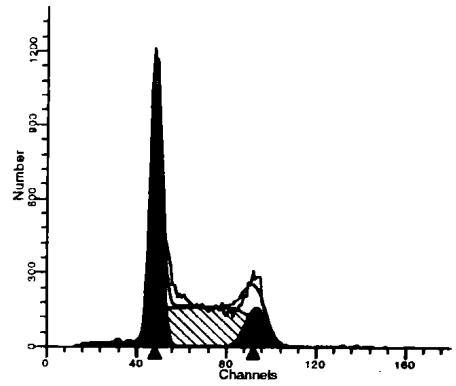


图 1 K562 细胞流式细胞分析(未用奥沙利铂处理)

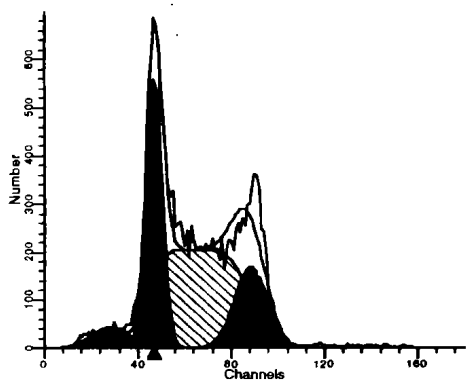


图 2 K562 细胞流式细胞分析(0.016mmol/L 奥沙利铂处理 72h)



图 3 未经奥沙利铂处理的 K562 细胞(×8000)



图 4 奥沙利铂作用 72h 的 K562 细胞(×8000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 电镜观察结果

电镜观察显示未经处理的 K562 细胞呈幼稚状态,核大、圆,胞质内有大量的核蛋白体,其它的细胞器(线粒体、内质网等)较少。见图 3。奥沙利铂作用后细胞核物质固缩,碎裂成多块,胞质电子密度较高,有大小不等的空泡形成,此为凋亡细胞。见图 4。

3 讨 论

同顺铂相似,奥沙利铂的主要作用机制是通过 DNA-复合体的形成来介导的。当铂化合物进入细胞时,所形成的链内复合体能阻止 DNA 复制和转录,引起细胞毒损伤。另外,链内交叉联结复合体和 DNA-蛋白质交叉联结复合体也能引起细胞损伤。由于奥沙利铂复合体和顺铂复合体在靶分子和作用机制方面有一些重要区别,从而导致不同的抗瘤谱。与顺铂相比,奥沙利铂能更有效抑制 DNA 合成,具有更强的细胞毒作用。因此奥沙利铂能够诱发 DNA 一级和次级损伤,引起人类肿瘤细胞凋亡[9]。

本实验表明,奥沙利铂对人白血病 K562 细胞生长有明显的抑制作用,并有时间和剂量依赖关系,其作用机制主要表现在 G_2/M 期阻滞和一定数量的细胞凋亡。这使奥沙利铂应用于血液肿瘤治疗具有理论依据,并可指导该药的联合应用。例如处于分裂期细胞比其他期细胞对化疗更为敏感,因此使用奥沙利铂联合治疗可使患者获得更好的治疗效果。

在化疗前进行体外抗癌药物敏感性测试,通过中效方程式,计算出中效浓度,定量分析抗癌药物单用时的最佳剂量以及合用时药物之间的协同、相加或拮抗作用,可以为临床抗癌药物联合应用方案的设计提供参考,从而为个体的白血病患者筛选出比较敏感的联合用药方案,达到增加疗效,减少不良反应的目的。

传统的金属铂类化合物抗肿瘤药,如顺铂进入人体后多积聚于肝、肾、膀胱,造成明显肾损害,血液非蛋白氮升高及胃肠道反应等毒性,从而限制了临床使用剂量的提高。因此,奥沙利铂的问世,扩大了铂类化合物抗肿瘤药的应用范围,单一或联合治疗多种类型肿瘤已显示出良好的应用前景。奥沙利铂单药使用引起骨髓抑制少见。Extra 等[10]进行了大规模Ⅰ期临床研究,44 例进展期大肠癌病人共实施了 116 周期奥沙利铂化疗,大多数病人以前接受过化疗。结果表明,血液系统毒性中等,血小板减少与药剂量密切相关。当奥沙利铂<90mg/m^2 时,无血小板下降,接受 135~150mg/m^2 者发生率为 13%,175~200mg/m^2 者 28.5%,血小板下降程度低于 WHO 制定的Ⅱ度血小板毒性标准。与血小板相似,中性粒细胞下降程度为Ⅰ、Ⅱ度,红细胞数变化不明显。Levi 等[11]和 de Gramont 等[12]观察了应用奥沙利铂和 5-FU、亚叶酸(FA)联合化疗的血液系统毒性,Ⅲ、Ⅳ度血液毒性发生率 39%,症状容易控制,其余为轻度骨髓抑制。进一步临床观察表明,血液系统毒性主要是由 5-FU 引起,随 5-FU 剂量增加血液毒性呈正相关,因此可以通过降低 5-FU 剂量减少血液系统毒性的发生。

目前大多数奥沙利铂临床试验仍集中于结直肠癌,特别是与 5-氟尿嘧啶(5-FU)/四氢叶酸(FA)联合治疗初治和对 5-FU/FA 耐药的晚期结直肠癌患者显示满意的临床疗效。但对其他类型肿瘤包括白血病、淋巴瘤的临床疗效及基础研究的资料还很少,有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Leuvi F, Zidani R, Misset JL. Randomised multicenter trial of chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer[J]. Lancet, 1997; 350(9079): 681-686.

[2] 孙 燕,管忠震,金懋林,等.奥沙利铂单药或与氟尿嘧啶-甲酰四氢叶酸钙联合应用治疗晚期大肠癌Ⅱ期临床试验报告[J].癌症,1999;18(3):237-240.

[3] Raymond E, Buquet-Fagot C, Djelloul S, et al. Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers[J]. Anticancer Drugs, 1997; 8(9): 876-885.

[4] Monnet I, Brienza S, Hugret F, et al. Phase Ⅱ study of oxaliplatin in poor-prognosis non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Eur J Cancer, 1998; 34(7): 1124-1127.

[5] Raymond E, Feivre M, Waynarowski JM, et al. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity[J]. Sem in Oncol, 1998; 25(2, suppl 5): 4-12.

[6] Extra JM, Marty M, Brienza S, et al. Pharmacokinetics and safety profile on oxaliplatin[J]. Sem in Oncol, 1998; 25(2, suppl 5): 13-22.

(下转第 458 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

到 30%，并且 pIRES2 - EGFP 空载体和重组载体 pIRES2 - BMP_2 - EGFP 二者的转染效率上没有明显的差异，该实验重复了 3 次，结果均一致。(图 4a、4b、4c)

2.4 pIRES2 - BMP_2 - EGFP 重组体在 293 - T 细胞中 mRNA 的表达水平(图 5)

RT - PCR 结果显示，转染 pIRES2 - BMP_2 - EGFP 质粒的 293 - T 细胞中 BMP_2 mRNA 表达水平远高于相应转染 pIRES2 - EGFP 空载质粒组和未转染任何质粒组(图 5)。

3 讨 论

质粒 pIRES - EGFP 为双顺反子真核表达载体，在其多克隆位点和 EGFP 编码区基因之间设计有核糖体进入位点(IRES)，此位点引导真核细胞 mRNA40S 亚基的募集，用于转录后修饰的 SV40mRNA 早期 PolyA 信号肽与 EGFP 相隔约 150 个碱基，确保克隆入多克隆位点的外源基因与 EGFP 编码基因共同转录；而翻译出来的 EGFP 与目的蛋白各具独立的空间结构和生理活性，而不是融合蛋白。所以，IRES 作为一种生物技术工具，在基因治疗中的直接作用就是从一条多顺反子 mRNA 翻译几个目的蛋白[3]，并允许两个目的基因同时并且同水平表达[2]。同时，从本实验结果可以看出，IRES 载体上携带上目的基因并不影响载体的转染效率。

骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)属于转化生长因子 β 超家族，它能在非骨组织中诱导新骨形成，其中 BMP_2 被认为是活性最强的诱导成骨因子[4]。但是由于目前得到足够、有活性的 BMP_2 蛋白仍有难度，并且全身应用 BMP 蛋白可能对身体其他器官产生副作用或诱发免疫反应。解决的方法可以选择局部基因治疗，直接将携带有 BMP_2 基因的表达载体导入身体特定的部位，使其在局部表达有活性的蛋白而发挥治疗作用，所以，如何选择一个易于检测且不影响目的基因表达的载体就显得尤为重要。

本实验构建了 pIRES2 - BMP_2 - EGFP 真核表达载体，并利用 GFP 作为标记基因，从而可以实时监测 BMP 基因在体内的表达和蛋白定位，为进一步研究 BMP_2 在体内的定位及与其它细胞因子的相互作用提供一个有用的工具载体。

参 考 文 献

[1] Sachs AB. Cell cycle - dependent translation initiation: IRES elements prevail[J]. Cell, 2000; 10: 243 - 245.

[2] Wagstaff MJD, Lilley CE. Gene transfer using a disabled herpes vires vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression in vitro and in vivo[J]. Gen Ther, 1998; 5: 1566 - 1570.

[3] Pinstaff JK, Chappell SA. Imemal initiation of translation of five dendriticallylocalized neuronal mRNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001; 98: 2770 - 2775.

[4] Zhou W, Edelman GM. Transcript leader regions of two Saccharomyces cerervisiae mRNAs comain internal. ribosome emry sites that function in living cells[J]. Proc Natl Sci USA, 2001; 98: 1531 - 1536.

[5] Kin YK, Lee SH. Long - range RNA - RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core - coding sequences of hepatitis C vires modulates the IRES - dependent translation [J]. RNA, 2003; 9(5): 599 - 606.

[6] Riley KH, Lane JM, Urist MR. Bone morphogenetic protein 2 biology and applicantion[J]. Clin Orthop, 1996; (324): 39 - 46.

(上接 454 页)

[7] 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.

[8] 何 松，陈 姝，汤为学，等. 利用中效原理观察苦参素、氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 QGY 的相互作用[J]. 中华肝脏病杂志，2002; 10(2): 160.

[9] Faivre S, Woynarowski JM. Oxaliplatin effects on DNA integrity and apoptosis induction in human tumor cells[J]. Proc Am Assoc Cancer Res, 1998; 39: 158a.

[10] Extra JM, Espie M, Calvo F, et al. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1990; 25(4): 299 - 303.

[11] Levi F, Misset JL, Brienza S, et al. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5 - fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer[J]. Cancer, 1992; 69(4): 893 - 900.

[12] de Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, et al. Oxaliplatin with high - dose leucovorin and 5 - fluorouracil 48 - hour continuous infusion in pre - treated metastatic colorectal cancer [J]. Eur J Cancer, 1997; 33(2): 214 - 219.