

奥沙利铂对人宫颈癌 HeLa 细胞株的体外作用

吕 瑞, 高英敏

(兰州大学第一医院妇产科, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 【目的】研究奥沙利铂对人宫颈癌 HeLa 细胞株的生长抑制作用及对 Caspase-3 活性的影响。【方法】用人宫颈癌 HeLa 细胞株经奥沙利铂处理后, MTT 法测定细胞生长抑制率, 透射电镜观察细胞形态学变化, 流式细胞仪和原位末端标记技术法(TUNEL)检测细胞凋亡率, 比色法检测 Caspase-3 活性变化, 并利用 AC-DEVD-CHO 进行 Caspase-3 抑制试验。【结果】奥沙利铂 (4~64 $\mu\text{mol/L}$) 在体外能以时间和剂量依赖的方式对宫颈癌 HeLa 细胞产生细胞毒作用并诱导其凋亡, 奥沙利铂作用细胞株 48 h 后, 细胞呈现典型的凋亡细胞的形态特征; 并能增加 HeLa 细胞的 Caspase-3 活性, AC-DEVD-乙醛(AC-DEVD-CHO)可有效抑制奥沙利铂诱导的 HeLa 细胞凋亡。【结论】奥沙利铂在体外能抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, Caspase-3 活化参与了奥沙利铂诱导 HeLa 细胞的凋亡过程。

关键词: 宫颈癌; 奥沙利铂; 生长抑制; Caspase-3

中图分类号: R969.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0485-05

Effect of Oxaliplatin on Human Cervical Cancer HeLa Cells In Vitro

LU Rui, GAO Ying-min

(Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: 【Objective】 To study the effect of oxaliplatin on growth inhibition and caspase-3 activity on human cervical cancer HeLa cells. 【Methods】 Human cervical carcinoma HeLa cells were treated with oxaliplatin. Cell growth rate was determined with MTT assay; cell morphologic changes were examined under electron microscopy. Flow cytometry and TUNEL was used to examine cell apoptosis rate. Activities of caspase-3 were determined by chromometry, and its inhibition was test by AC-DEVD-CHO. 【Results】 Oxaliplatin (4-64 $\mu\text{mol/L}$) induced cytotoxicity and apoptosis to human cervical carcinoma HeLa cells in vitro is time-dependent and dose-dependent. The typical apoptotic morphological features appeared in the cells treated with oxaliplatin for 48 hours; Caspase-3 activity was up-regulated in oxaliplatin-induced apoptotic cells. The oxaliplatin induced HeLa cell apoptosis was efficiently inhibited by AC-DEVD-CHO. 【Conclusion】 Oxaliplatin can inhibit HeLa cell growth of cervical carcinoma and induce apoptosis in vitro. Caspase3 activation may be involved in oxaliplatin-induced apoptosis of HeLa cells.

Key words: cervical carcinoma; oxaliplatin; cell growth; caspase-3

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):485-489]

奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)是第 3 代铂类化合物, 其化学名为左旋反式二氨环己烷草酸铂。因为与顺铂作用机制有重要区别^[1], 对各种顺铂耐药的肿瘤细胞株无交叉耐药, 而且该药无明显肾毒性, 耳毒性极微, 血液学毒性较轻, 神经系统毒性主要为剂量依赖性的自限性外周神经病变^[2,3], 故近年来不但用于对顺铂耐药的多种人类癌症的二线

治疗^[4,5], 而且临床上已经有代替顺铂作为一线治疗的使用^[6,7]。体内外试验及临床试验已证实了奥沙利铂对晚期大肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等有较好疗效^[8], 但有关奥沙利铂对宫颈癌的作用及其机制的研究, 国内外报道甚少。本实验通过研究奥沙利铂对宫颈癌 HeLa 细胞株的生长抑制作用及对 Caspase-3 活性的影响, 旨在

收稿日期: 2007-03-25

作者简介: 吕 瑞 (1969-) 女, 甘肃静宁人, 硕士研究生, 主治医师, E-mail: lwjw@126.com, 现在甘肃省肿瘤医院工作; 高英敏, 通讯作者, 主任医师, 研究生导师。

为其在宫颈癌的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

奥沙利铂由江苏恒瑞医药股份有限公司生产(No:06967),用前以无血清培养液配制。HeLa 细胞株由兰州军区总医院中心实验室保存。MTT 为 Sigma 公司产品,用 PBS 配成 5 mg/mL。RPMI-1640 培养液为 GIBCO 产品。胎牛血清:杭州四季青生物制品厂产品。原位末端转移酶标记法 (TUNEL) 试剂盒(武汉博士德公司), EPICS XL 型流式细胞仪(Beckman Coulter 公司), Caspase-3 试剂盒购自凯基生物工程公司。Caspase-3 阻断剂 AC-DEVD-CHO 购自 PharMingen 公司。

1.2 细胞培养

将 HeLa 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中(内含谷氨酰胺及 100 万 U/L 青霉素和链霉素),置 37℃、体积分数 5%CO₂ 饱和湿度下培养,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 MTT 实验

采用 MTT 比色法,取对数生长期 HeLa 细胞(5×10^5 / mL),24 h 待大部分贴壁后分别加入不同浓度的奥沙利铂(2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L、64 μmol/L、128 μmol/L、256 μmol/L),继续培养 24 h、48 h 和 72 h,细胞对照组每孔加入 20 μL 培养液;空白对照组在铺孔时不加细胞悬液,只加 200 μL 培养液。每个浓度各设 3 个平行孔,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中分别培养后,加入 5 mg/mL MTT 20 μL,继续温育 4 h 后吸弃上清,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL,振荡 10 min 后,用自动酶标读数仪在波长 490 nm 处测定各孔 A 值。实验重复 3 次,取 3 次实验结果的平均值作为实验结果。按下列公式计算肿瘤细胞增殖抑制率:肿瘤细胞增殖抑制率=(对照组吸光度 A 均值 - 实验组吸光度 A 均值/对照组吸光度 A 均值) × 100%。

1.4 电子显微镜观察细胞形态

取对数生长期 HeLa 细胞分别加入 2 个 100 mL 培养瓶中,使每瓶细胞数为 1×10^6 个。1 瓶为阴性对照,另 1 瓶加入奥沙利铂后最终浓度 32 μmol/L,于 37℃、体积分数 5%CO₂ 条件下培养 48 h,调整

经胰蛋白酶消化后的细胞浓度至 10^6 /mL,加入 20 g/L 戊二醛固定后,由电镜室按常规制备标本,在透射电镜下观察细胞形态并摄片。

1.5 原位末端标记技术(TUNEL)检测细胞凋亡

分组:对照组,草酸铂作用组(8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L、64 μmol/L),每孔设 4 个复孔。把 1×10^6 /mL 的 HeLa 细胞分别接种于 24 孔板中,同时每个孔中放置载玻片后,于 37℃、5%CO₂ 下培养,爬片 24 h,按分组加药,加药结束后在 48 h 捞片。自然干燥后用 40 g/L 多聚甲醛固定,进行 TUNEL 染色。TUNEL 染色步骤按 TUNEL 原位凋亡检测试剂盒说明书进行。光镜下观察凋亡细胞呈棕黄色,阴性细胞呈蓝色。光镜下计算凋亡指数(apoptosis index, AI)。AI = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 1×10^6 个 HeLa 细胞接种于 6 孔培养板,24 h 待大部分贴壁后,分别加入 2 种不同浓度的奥沙利铂,使其终浓度分别为 8 μmol/L、32 μmol/L,同时设对照组,各组设 3 个复孔。继续培养 24 h 后获取细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,加入 70%冷乙醇固定后重新收集细胞,PBS 洗去固定液,加入 RNA 酶反应过夜,与碘化丙啶(PI)染液混匀后,上流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.7 比色法检测 Caspase-3 活性

取对数生长期的细胞(2×10^5 /mL),试验组加入不同浓度的奥沙利铂,对照组不加药,培养 24 h、48 h、72 h 后收集细胞, PBS 洗涤,冷的 lysis buffer 悬浮细胞,置冰上 20 min,4℃, $11\ 000 \times g$ 离心 3 min,测定上清液蛋白浓度,吸取 50 μL 含 50~200 μg 蛋白的细胞裂解液上清,加入 50 μL reaction buffer,再加入 5 μL caspase-3 Substrate,并于 37℃避光孵育 4 h,用酶标仪(405 nm)测定吸光度,与对照组进行比较观察 caspase-3 活化程度。

1.8 Caspase-3 抑制试验

HeLa 细胞浓度调整为 2×10^5 /mL,先加入抑制剂 AC-DEVD-CHO 40 μL (0.1 μg/μL),在 37℃、5%CO₂ 孵箱中孵育 2 h 后,加入奥沙利铂(终浓度 16 μmol/L),再孵育 72 h 后,分别检测细胞凋亡率及 Caspase-3 活性。测定结果与未加抑制剂的相应结果进行比较。每组设 4 个复孔。

1.9 统计学处理

统计分析使用 SPSS10.0 软件包。统计学采用

单因素方差分析、独立样本 t 检验、SPEARMAN 秩相关检验, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 显著性水平以 $P < 0.05$ 判断。

2 结果

2.1 奥沙利铂对 HeLa 细胞生长的抑制作用

4 $\mu\text{mol/L}$ 以下的奥沙利铂对 HeLa 细胞无生长抑制作用, 各时间点浓度加大到 64 $\mu\text{mol/L}$ 后处于平台期, 4-64 $\mu\text{mol/L}$ 随着奥沙利铂剂量的增加和作用时间的延长, 其对 HeLa 细胞的抑制率也明显增加(图 1)。

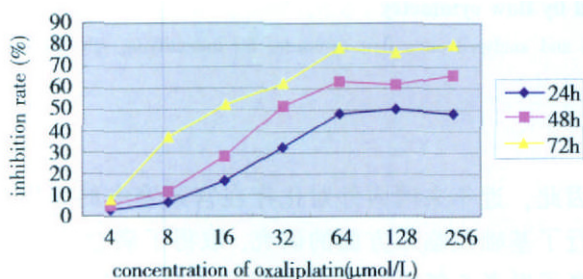


图 1 奥沙利铂对 HeLa 细胞生长的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of oxaliplatin on HeLa cells growth

2.2 显微镜观察细胞形态

电镜下见未处理组 HeLa 细胞表面有较多微绒毛, 细胞核大而圆, 染色质分散, 核仁明显。32 $\mu\text{mol/L}$ 药物处理 48 h 后, 较多 HeLa 细胞皱缩, 体积变小, 胞质电子密度增高, 有较多大小不等的空泡形成; 染色质聚集于核膜周围, 核固缩, 有的碎裂成多块(图 2)。

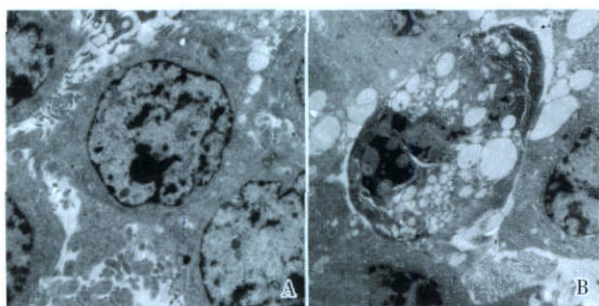


图 2 奥沙利铂作用后电镜下细胞凋亡的形态表现

Fig.2 The morphological change of HeLa cell by Oxaliplatin under electronic microscope

A: control; B: 32 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin group. The apoptosis of HeLa cell under the electronic microscope. The fragmentary chromatin concentrates around the film and the nucleolus disappears.

2.3 TUNEL 染色检测 HeLa 细胞凋亡结果

不同浓度的奥沙利铂作用 48 h 后, 计数凋亡细胞。细胞核染为棕黄色者为凋亡阳性细胞, 细胞核染为蓝色者为阴性细胞, 奥沙利铂组较阴性对照组阳性细胞数明显增多, 且随着浓度的增加, 阳性细胞数也随之增加。0、8、16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞凋亡率 (%) 分别为 1.1 ± 1.2 、 7.4 ± 1.1 、 14.2 ± 2.4 、 22.5 ± 2.1 、 25.4 ± 6.3 , 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 4 组浓度差异均有显著意义 (P 均 = 0.000, 图 3)。

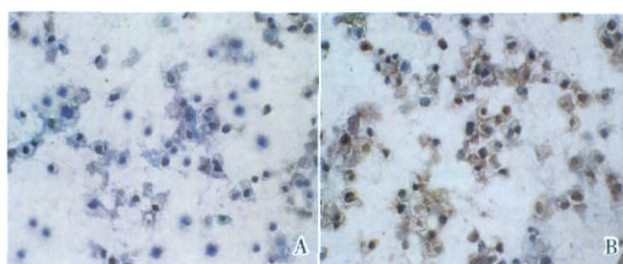


图 3 奥沙利铂诱导 HeLa 细胞凋亡的作用

Fig.3 Apoptosis of HeLa cell induced by oxaliplatin

A: negative control group; B: 64 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin group, positive cells of apoptosis is that nucleus is dyed for brown (TUNEL \times 400)

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡结果

HeLa 细胞经奥沙利铂 (8 $\mu\text{mol/L}$ 、32 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 后, G1 期前出现亚二倍体峰即凋亡峰, 明显高于对照组。细胞凋亡率对照组为 $1.2\% \pm 0.1\%$, 8 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂组为 $6.30\% \pm 2.61\%$, 32 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂组为 $19.2\% \pm 3.1\%$, 两用药组与对照组凋亡率比较, 差异均有统计学意义, t 值分别为 22.43, 45.21 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 奥沙利铂对 HeLa 细胞 caspase-3 活性的影响

不同浓度的奥沙利铂 (8 $\mu\text{mol/L}$ 、16 $\mu\text{mol/L}$ 、32 $\mu\text{mol/L}$ 、64 $\mu\text{mol/L}$) 作用 HeLa 细胞株 24 h、48 h 和 72 h 后, 随着奥沙利铂浓度的增加和作用时间的延长, caspase-3 活性逐渐增强(表 2)。在作用时间为 24 h 时, 采用 SPEARMAN 秩相关检验, 奥沙利铂浓度与 caspase-3 活性相关系数 $r=0.691$ 、 $P=0.003$; 在浓度为 16 $\mu\text{mol/L}$ 时, 作用时间与 caspase-3 活性相关系数 $r=0.824$ 、 $P=0.000$ 。说明奥沙利铂对 HeLa 细胞的 caspase-3 活性的影响可能具时间和浓度依赖性。

2.6 Caspase-3 抑制试验结果

16 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂加入抑制剂 AC-DEVD-

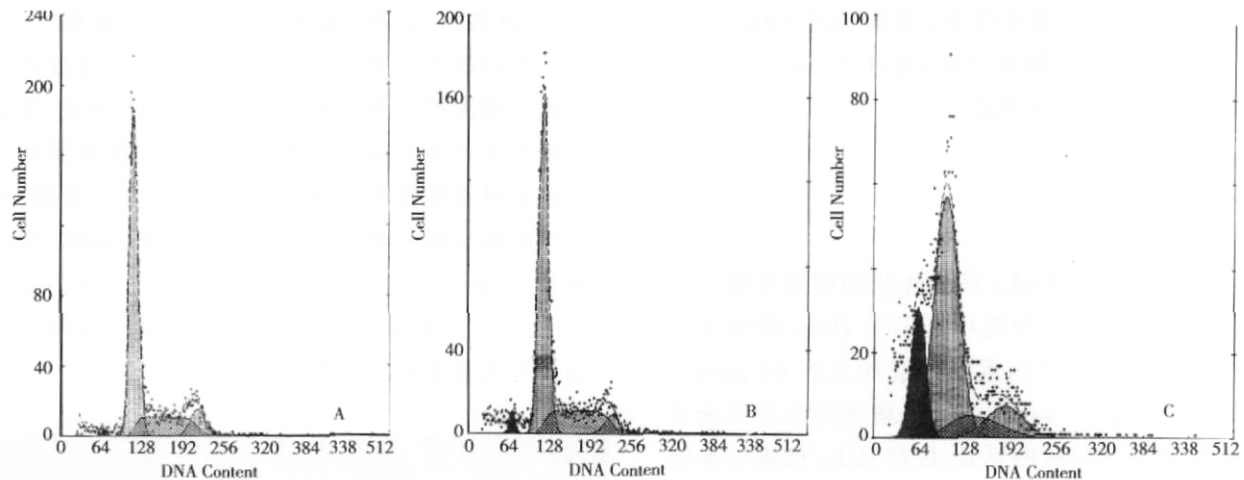


图 4 流式细胞仪检测细胞凋亡

Fig.4 Cell apoptosis detected by flow cytometry

1×10^6 cells were treated with oxaliplatin stained with propidium iodide and analyzed on a flow cytometer for indentifying sub-G1 peak representing apoptotic cells.

A: control; B: 8 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin group; C: 32 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin group

CHO组 Caspase-3 活性及细胞凋亡指数分别为 0.136 ± 0.024 和 13.2 ± 1.4 , 而未加抑制剂组分别为 0.248 ± 0.016 和 21.6 ± 2.3 , 两组 Caspase-3 活性相比较 t 值为 2.539, $P < 0.05$; 两组细胞凋亡指数相比较 t 值为 26.900, $P < 0.01$, 均有统计学差异。

表 2 不同浓度的奥沙利铂对 HeLa 细胞 caspase-3 活性的作用

Table 2 Caspase-3 activity changing of HeLa cell line after treatment with different concentrations oxaliplatin ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

	24 h	48 h	72 h
Control	0.098 ± 0.022	0.106 ± 0.024	0.112 ± 0.018
8 $\mu\text{mol/L}$	0.093 ± 0.012	0.138 ± 0.016	0.149 ± 0.018
16 $\mu\text{mol/L}$	0.104 ± 0.015	0.158 ± 0.026	0.248 ± 0.016
32 $\mu\text{mol/L}$	0.147 ± 0.024	0.218 ± 0.017	0.395 ± 0.024
64 $\mu\text{mol/L}$	0.221 ± 0.021	0.386 ± 0.028	0.587 ± 0.022
F	3.445	9.000	43.370
P	0.032	0.009	0.000

3 讨论

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤, 是引起妇女癌症相关死亡的重要原因, 且发病率近年呈逐年上升趋势和年轻化。过去认为宫颈癌属于化疗药物不敏感肿瘤, 仅在晚期及复发的患者中将化疗作为综合治疗的一部分。大量临床实践已经证明, 局部治疗手段不能控制肿瘤周围肉眼看不见的微小转移灶以及可能存在的全身亚临床转移。

因此, 近年来国内外对化疗在宫颈癌中的应用进行了基础及临床方面的研究, 取得了满意效果, 提高了患者 5 年生存率, 从而确定了化疗在宫颈癌治疗中的地位, 意识到化疗在延长患者的生命和改善生活质量方面起着重要的作用并提出了新辅助化疗的概念, 且术前辅助化疗越来越受到重视^[9]。

铂类药物是目前宫颈癌新辅助化疗的主要用药, 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。奥沙利铂为顺铂类衍生物, 可克服顺铂的不足之处, 对各种顺铂耐药的肿瘤细胞株无交叉耐药, 而且该药无明显肾毒性, 耳毒性极微, 血液学毒性较轻, 神经系统毒性主要为剂量依赖性的自限性外周神经病变, 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, 能够诱发 DNA 一级和次级损伤, 引起人类肿瘤细胞凋亡^[1]。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, 临床上已经有代替顺铂作为一线治疗的使用。

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。对宫颈癌放疗前的辅助化疗, 尤其需要寻找诱导肿

瘤细胞凋亡的药物,因为药物杀伤肿瘤细胞导致细胞坏死、缺氧,而缺氧可以降低肿瘤细胞对放疗的敏感性。对于奥沙利铂是否能诱导人宫颈癌细胞凋亡,国内外报道甚少。

本实验表明,4~64 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂对宫颈癌 HeLa 细胞生长有明显的抑制作用,并且呈时间和剂量依赖性;原位末端标记技术(TUNEL)检测显示奥沙利铂在一定浓度可诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡且呈剂量依赖性,流式细胞仪可检测到细胞凋亡峰,电镜下部分细胞呈现典型凋亡特征,证明了一定浓度的奥沙利铂可诱导 HeLa 细胞凋亡。

Caspases 活性的变化是细胞凋亡的重要调节机制,目前认为 Caspases 是一切凋亡信号传导的共同通路,正常情况下,Caspases 在细胞内以无活性的酶原形式存在,当凋亡过程被启动后凋亡信号可传导至 Caspases 酶原,使其部分肽链发生水解,形成具有活性的 Caspases,然后各种 Caspases 如同凝血过程一样产生“瀑布式”层层激活,最终导致细胞发生凋亡,目前已发现在人体内的 Caspases 共有 14 种,其中起核心作用的是 Caspase-3^[10-12]。监测 Caspase-3 是否被激活可以帮助判断奥沙利铂诱导 HeLa 细胞凋亡是否与 Caspase-3 活化有关。

本实验证明,奥沙利铂在一定浓度可诱导 HeLa 细胞凋亡,Caspase-3 活性测定发现细胞凋亡过程中确有 Caspase-3 的激活,其活性强度亦呈剂量时间依赖性增高。抑制试验发现 Caspase-3 活性与凋亡细胞百分率均下降,证明 Caspase-3 参与了奥沙利铂作用 HeLa 细胞的凋亡过程。另外还发现抑制试验对细胞凋亡仅是部分抑制,未加 AC-DEVD-CHO 组细胞凋亡指数为 21.6 ± 2.3 ,加入抑制剂组细胞凋亡指数为 13.2 ± 1.4 ,是由于细胞凋亡受多基因网络的调节,还存在着不依赖于 Caspase-3 激活的凋亡途径,因此对奥沙利铂诱导宫颈癌细胞凋亡的机制尚需深入的研究。

参考文献:

- [1] RAYMOND E, FAIVRE S, CHANEY S, et al. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(3): 227-235.
- [2] PASETTO L M, D'ANDRE M R, ROSSI E, et al. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why?[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 59(2): 159-168.
- [3] CASSIDY J, MISSET J L. Oxaliplatin-related side effect: Characteristics and management [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(5 Suppl 5): 11-20.
- [4] 王琳,秦叔逵,钱军,等.奥沙利铂联合氟尿嘧啶类药物二线治疗晚期胃癌的临床研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2005, 13(3): 361-362.
- [5] MCKEAGE M J. New-generation platinum drugs in the treatment of cisplatin-resistant cancers [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005, 14(8): 1033-1046.
- [6] LORDICK F, LORENZEN S, STOLLFUSS J, et al. Phase II study of weekly oxaliplatin plus infusional fluorouracil and folinic acid (FUFOX regimen) as first-line treatment in metastatic gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(2): 190-194.
- [7] 周彩存,张捷,徐瑛,等.奥沙利铂联合长春瑞滨一线治疗不可手术的非小细胞肺癌[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2005, 10(5): 481-485.
- [8] BELANI C P. Recent updates in the clinical use of platinum compounds for the treatment of lung, breast, and genitourinary tumors and myeloma [J]. *Semin Oncol*, 2004, 31(6 Suppl 14): 25-33.
- [9] 李晓利,李力.宫颈癌治疗模式进展[J]. *国外医学:肿瘤学分册*, 2004, 31(5): 380-383.
- [10] FAN T J, HAN L H, CONG R S, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(11): 719-727.
- [11] 曹开源,毛晓鹏,丘少鹏,等.大蒜素诱导人膀胱癌细胞株 BIU87 细胞凋亡的研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(4): 432-434, 438.
- [12] 薛红漫,罗招凡,孟哲,等. HA14-1 诱导不同 Bcl-2 表达水平的白血病细胞凋亡[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(2): 172-175.

(编辑 张恩健)