

XK469和阿霉素对 H460 细胞生长的影响及其机制

凌朝辉¹, 杜华², 袁长青¹, 马树东³, 郑莉¹, 丁振华¹ (第一军医大学¹防原教研室,²教务处,³南方医院肿瘤科, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 探讨 XK469 和阿霉素对 H460 细胞的抑制作用及其机制。方法 采用 MTT 比色法观察不同浓度 XK469、XN472 和阿霉素对 H460 细胞生长的影响, 采用流式细胞术观察药物作用下细胞周期的变化, 采用 Western blotting 检测药物作用后 H460 细胞内 cdc2 和 phos-cdc2 的表达水平。结果 不同浓度 XK469、阿霉素可明显抑制 H460 细胞的生长, 导致 H460 细胞发生 G2/M 期阻滞, 胞内 phos-cdc2 表达明显增高。20 μg/ml 以上浓度 XN472 作用 24 h 可抑制 H460 细胞生长, 但是到 120 h 时抑制作用消失。结论 XK469 和阿霉素通过使 H460 细胞内 phos-cdc2 水平增高导致其 G2/M 期阻滞从而抑制其增殖生长, 7-氯结构对 XK469 的抗肿瘤效应有重要的意义。

关键词: XK469/投药和剂量; 阿霉素/投药和剂量; 细胞周期/药物作用

中图分类号: R977 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588 2004 07-0775-04

Effect of XK469 and adriamycin on the growth of H460 cells *in vitro* and its mechanism

LING Zhao-hui¹, DU Hua², YUAN Chang-qing¹, MA Shu-dong³, ZHENG Li¹, DING Zhen-hua¹

Department of Radiation Medicine¹, Department of Teaching Affairs², Department of Oncology, Nanfang Hospital³, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of XK469 on the *in vitro* growth of H460 cells and its mechanism. **Methods** The survival curves of H460 cells treated with XK469, XN472 and adriamycin, respectively, were obtained by MTT analysis, and the effect of XK469 and adriamycin on the cell cycle of H460 cells examined by flow cytometry. Western blotting was adopted for detecting the expression of cdc2 and phos-cdc2 induced by XK469 and adriamycin. **Results** Different concentrations of XK469 and adriamycin could significantly inhibit the growth of H460 cells, induce their G2/M phase arrest, and increase phos-cdc2 expression; XN472 had a lesser effect on the growth of H460 cells. **Conclusion** XK469 can increase phos-cdc2 expression and induce G2/M phase cell cycle arrest of H460 cells, resulting in inhibition of H460 cell growth. The inhibitory effect of XK469 on H460 cell growth is attributed to the chlorine in the 7-position of its structure.

Key words: XK469/administration & dosage; adriamycin/administration & dosage; cell cycle/drug effect

2-[4-(7-氯-2-氢氧喹啉基)苯氧基]丙酸尿(简称 XK469)是一种合成的喹啉含氧苯基丙酸尿派生物,作为一种拓扑异构酶 II β 抑制剂对鼠类肿瘤有广泛的拮抗作用,在国外已经进入一期临床研究^[1]; 2-[4-(6-氯-2-氢氧喹啉基)苯氧基]丙酸尿钠(简称 XN472)则是 XK469 的结构类似物;阿霉素(ADM)是一种拓扑异构酶 II α 抑制剂。

本研究通过细胞生长抑制试验,流式细胞术和 Western blot 免疫印迹方法观察并比较了上述三种药物对 H460 细胞的抑制作用并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期: 2004-02-11

基金项目: 广东省科技三项资助项目 2003C30105)

Supported by Scientific Research Projects of Guangdong Province (2003C30105)

作者简介: 凌朝辉,女,第一军医大学在读硕士研究生,电话: 020-61640114-89131

通讯作者: 丁振华,男,博士生导师,教授,电话: 020-61648315, E-mail: dingzh@fimmu.com

1.1.1 药品与试剂 RPMI 1640 培养基(Gibco); MTT、Rnase A、PI (Sigma); 小牛血清(杭州四季青生物工程公司); DMSO (香港 FARCO 公司); Triton X-100 (北京中预卫科生物工程部)。

1.1.2 细胞系及培养条件 人非小细胞肺癌细胞系 H460 细胞(美国韦恩州立大学 karmanos 癌症研究所 Dr. Wu GS 馈赠) 用含 10% 的新生牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 37℃、饱和湿度、5% 体积比二氧化碳条件下培养, 每 2~3 d 换液传代。

1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤细胞生长抑制试验 将对数生长期细胞以 5000/孔接种于 96 孔培养板中, 总体积 200 μl, 24 h 后分为对照组和处理组, 对照组加入 200 μl RPMI 1640 培养基, 处理组分别加入不同浓度的阿霉素、XK469 和 XN472, 每组设置 4 孔重复, 37℃、5%CO₂ 培养 7 d。每 24 h 取一批样本加入 MTT 液 (5 mg/ml) 8 μl, 培养 4 h 后, 吸出孔内培养液, 加入 DMSO 150 μl/孔, 室温下振荡 10 min, 酶标仪检测各孔 D₅₇₀ 值, 绘制细胞生长曲线。

1.2.2 流式细胞仪分析细胞周期 将对数生长期的

H460细胞用胰酶消化后制成 2×10^6 个/L 浓度的细胞悬液,接种于培养皿中,贴壁培养 24 h 后更换为含有不同浓度 XK469、XN472 和阿霉素培养液,分别于 4、8、12、24、48 h 收集细胞,碘化丙锭染色后,用流式细胞仪对 DNA 进行定量分析,再结合计算机软件推算各组细胞周期分布。

1.2.3 免疫印迹分析 phos-cdc2 蛋白和 cyclinB1 蛋白的表达 分别提取不同浓度 XK469、XN472 和阿霉素作用 24 h 的 H460 细胞胞质蛋白,按 lowry 比色法,以 BSA 为标准蛋白绘制标准蛋白曲线,测定样品蛋白浓度。取各组不同组分蛋白样品总蛋白 40 μg ,经 10%SDS-PAGE 电泳后电转膜,封闭,加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜,TTBS 漂洗 20 min \times 3 次,加入二抗常温振荡 4 h,TTBS 漂洗 20 min \times 3 次,加入混匀 ECL 显色液作用 5 min,曝光,显影定影。

2 结果

2.1 XK469、XN472 和阿霉素对 H460 细胞生长的影响

MTT 结果显示,不同浓度 XK469、阿霉素作用 H460 细胞后细胞存活率下降,说明 XK469 和阿霉素可抑制 H460 细胞生长,XK469 的抑制作用有剂量依赖性,药物剂量越大细胞存活率越低;阿霉素对 H460 细胞的抑制作用呈明显的时间 - 剂量依赖性,H460 细胞的存活率随阿霉素剂量的增加、作用时间的延长而降低;20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上 XN472 作用 H460 细胞 24 h 后,H460 细胞的存活率下降,但是 XN472 作用 120 h 后,H460 细胞的存活率同对照组相比基本没有影响(表 1、2、3)。

2.2 XK469、阿霉素对 H460 细胞周期的影响

不同浓度的 XK469、阿霉素作用于 H460 细胞,流式细胞术显示 H460 细胞发生明显的 G2/M 期阻滞,提示两种药物抑制 H460 细胞生长是通过导致其 G2/M 期阻滞产生的,两种药物对 H460 的 G2/M 期阻滞没有明显差别(图 1)。

2.3 XK469 和阿霉素对 H460 细胞 cdc2 和 phos-cdc2 蛋白表达水平的影响

表 1 不同浓度 XK469 作用后 H460 细胞的存活率

Tab.1 Survival probability of H460 cells treated with different concentrations of XK469

XK469 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Time	
	24 h	120 h
0	100%	100%
10	34.04%	90.30%
20	25.00%	73.60%
40	18.90%	45.15%
80	14.36%	40.83%
120	11.43%	10.03%

表 2 不同浓度 XN472 作用后 H460 细胞的存活率

Tab.2 Survival probability of H460 cells treated with different concentrations of XN472

XK472 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Time	
	24 h	120 h
0	100%	100%
10	100%	98.66%
20	100%	98.93%
40	90.93%	97.92%
80	76.27%	99.53%
120	44.80%	98.40%

表 3 不同浓度阿霉素作用后 H460 细胞的存活率

Tab.3 Survival probability of H460 cells treated with different concentrations of ADM

ADM ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Time	
	24 h	120 h
0	100%	100%
0.05	89.00%	51.70%
0.1	85.51%	49.80%
0.2	68.81%	36.76%
0.3	60.85%	15.20%
120	57.81%	9.76%

cdc2 蛋白是调节细胞 G2/M 期的关键蛋白,它和 cyclinB 结合形成 cyclinB-cdc2 复合体,即 M 期促进因子,调节 G2/M 期转换。如果 cdc2 蛋白磷酸化,则细胞发生 G2/M 期阻滞,反之,细胞进入有丝分裂期。由于 XK469 和阿霉素导致 H460 细胞发生 G2/M 期的阻滞,因此观察了这两种药物作用后 H460 细胞内 cdc2 和 phos-cdc2 蛋白的表达水平,结果显示: XK469 和阿霉素作用于 H460 细胞后,phos-cdc2 水平较 XN472 组明显升高(图 2)。

3 讨论

大多数生物体内的 DNA 分子是以超螺旋状态存在的,但是对于 DNA 的复制和转录,必须首先做好超螺旋的解旋,此过程不发生碱基组成或顺序的任何改变。

拓扑异构酶是生物体在进化过程中产生的用于调节 DNA 超螺旋状态和解旋状态相互转换的酶,分为 I 型和 II 型: I 型主要催化瞬时单链的断裂和连接; II 型在 DNA 主链上产生双链断裂^[1],除了能完成所有 I 型的功能外,还能在 DNA 复制完成后使相互交联的姐妹染色单体分开,参与 DNA 复制、转录、重组、染色体的组织等过程。肿瘤细胞中拓扑异构酶 II 的含量及活性远远高于正常体细胞,因此拓扑异构酶 II 抑制剂已成为抗肿瘤药的重要作用靶点^[2]。

拓扑异构酶 II 抑制剂分为拓扑异构酶 II α 抑制剂和拓扑异构酶 II β 抑制剂,目前临床上的拓扑异构酶 II 抑制剂的最大问题是选择性差及肿瘤细胞产生的耐药性,但鉴于大多数拓扑异构酶 II 抑制剂均作用

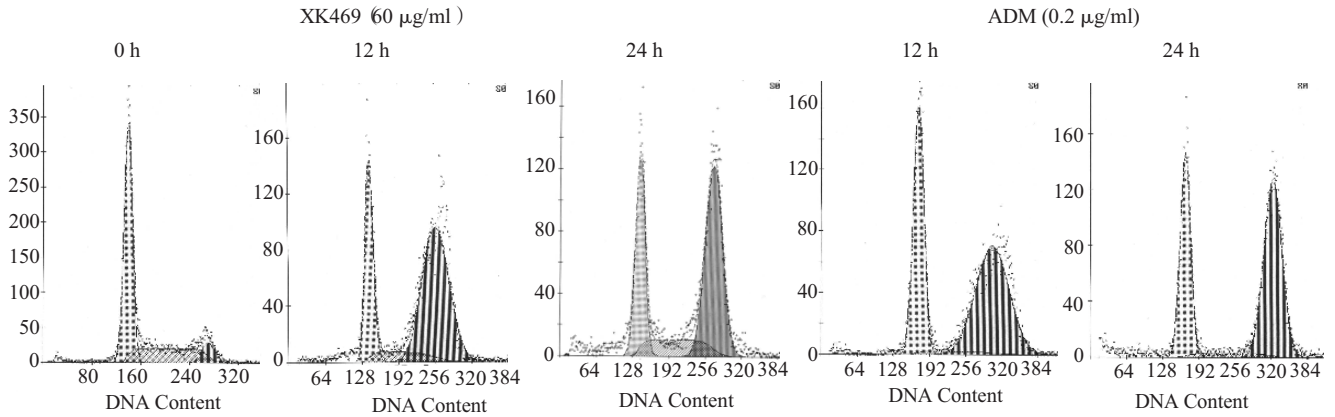


图 1 流式细胞术检测 XK469 和阿霉素作用 H460 后细胞周期的改变

Fig.1 Changes in H460 cell cycle after treatment with XK469 and ADM analyzed by flow cytometry

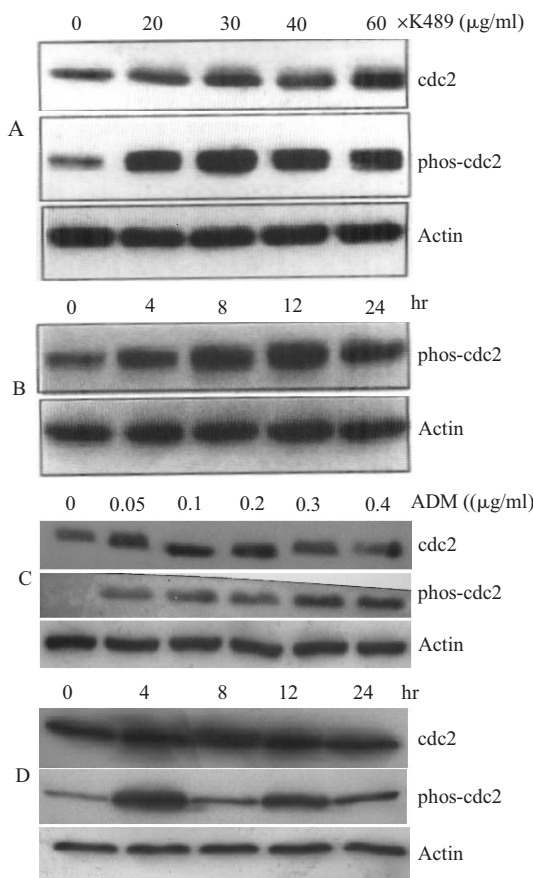


图 2 XK469 和阿霉素作用后 H460 细胞内 cdc2 和 phos-cdc2 蛋白的表达

Fig.2 Expression of cdc2 and phos-cdc2 proteins in

H460 cells treated with XK469 and ADM

A, B: treated with XK469; C, D: treated with ADM

于拓扑异构酶 II α 而对 II β 无效,因此寻找作用于拓扑异构酶 II β 的抗肿瘤药物成为新药研究的方向^[5]。

XK469 是一种新的抗肿瘤药,文献报道它对鼠类实体肿瘤具有广泛的细胞毒性^[6],为拓扑异构酶 II β 抑制剂^[5]。H460 是人类非小细胞肺癌细胞,本研究发现 XK469 在体外可以明显抑制 H460 细胞的生

长,主要通过引起 H460 细胞 G2/M 期阻滞,胞内 cdc2 蛋白和 phos-cdc2 升高而抑制细胞生长。XN472 作为 XK469 的结构类似物,与 XK469 的不同主要是氯取代物位置的不同,已有文献报道它对鼠白血病细胞 L1210 作用不明显^[6],本实验显示 XN472 对 H460 细胞只有一过性的抑制作用,再次证明 7 位氯对于 XK469 的抗肿瘤作用有着重要的意义^[7]。阿霉素作为拓扑异构酶 II α 抑制剂同样可以抑制 H460 细胞的生长,导致 G2/M 期的阻滞,引起 phos-cdc2 的升高,这与 XK469 的作用机制是一致的。

Cdc2 是 G2/M 期转换过程中的关键蛋白,cdc2-cyclin B 复合体就是 M 期促进因子 (M-phase promoting factor, MPF)^[8]。MPF 在 S 期和 G2 开始积聚,但处于失活状态,在 G2 后期,Nmi1/Cdr1 激酶磷酸化并失活 Wee1/Mik1,同时 cdc25c 磷酸酶使 cdc2T14/Y15 去磷酸化,从而活化 cdc2,细胞进入 M 期。G2 后期细胞内如果没有去磷酸化的 cdc2,则细胞发生 G2/M 期阻滞。另外 DNA 损伤引起 ATM 激酶活化,导致 chk1 和 chk2 磷酸化,chk1 和 chk2 的活化导致 cdc25c 在 S-216 磷酸化,促使 cdc25c 与 14-3-3 蛋白相结合并停留在胞质中。因而 cdc25c 不能活化 cdc2,导致细胞发生 G2 期阻滞。DNA 损伤激活 P53,诱导 14-3-3 σ 和 P21 表达,也使细胞阻滞在 G2 期。XK469 导致 H460 细胞 G2/M 期阻滞,具体通过上述哪些途径仍有待进一步的研究。

在 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 阿霉素作用下,H460 细胞内 phos-cdc2 水平随时间呈波浪形的变化,这一点是有异于 XK469 的,但是我们后来的实验证明:这种差异并非是由于两者分属于不同的拓扑异构酶 II 抑制剂亚型所导致的(数据另文发表)。至于拓扑异构酶 II α 和拓扑异构酶 II β 抑制剂抗肿瘤作用的异同仍有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 毛晓青, 陈钧辉. 拓扑异构酶抑制剂——一种新型的抗肿瘤药物 [J]. 中国生化药物杂志(Chin J Biochem Pharmac), 2000, 21(1): 46-8.

[2] 蒙凌华, 张永炜, 丁健. 以 DNA 拓扑异构酶 II 为靶点的抗癌药物 [J]. 中国新药杂志(Chin J New Drug), 2002, 11(9): 675-83.

[3] 徐璐, 姚明辉. 肿瘤化疗的一些新进展 [J]. 国外医药·合成药、生化药、制剂分册 (World Pharmacy), 2000, 21(4): 195-9.

[4] Corbett TH, LoRusso P, Demchick L, et al. Preclinical antitumor efficacy of analogs of XK469: sodium-(2-[4-(7-chloro-2-quinoxalinyloxy)phenoxy]propionate) [J]. Invest New Drug, 1998, 16(2): 129-39.

[5] Gao H, Huang KC, Yamasaki EF. XK469, a selective topoisomerase II beta poison [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(21): 12168-73.

[6] Kessel D, Horwitz JP. Pro-apoptotic interactions between XK469 and the peripheral benzodiazepine receptor [J]. Cancer Lett, 2001, 168(2): 141-4.

[7] Hazeldine ST, Polin L, Kushner J, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of analogues of the antitumor agent, 2-(4-[(7-chloro-2-quinoxalinyloxy)phenoxy]propionic acid (XK469) [J]. Med Chem, 2001, 44(11): 1758-76.

[8] Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, et al. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction [J]. EMBO J, 2000, 19(6): 1378-88.

房角后退性青光眼 1 例报告

Angle recession glaucoma: report of one case

张庆华, 黄发明 (第一军医大学南方医院眼科, 广东 广州 510515)

关键词: 房角后退; 青光眼

中图分类号: R775.3 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588 (2004) 07-0778-01

1 临床资料

患者男, 23 岁, 因左眼被拳击伤后视物不清并眼痛入院。入院检查: 全身无其他处损伤, 视力右 1.0、左 0.1, 左眼结膜混合性充血, 角膜清, 色素性 KP (+), 前房积血 2 mm, 虹膜纹理尚清, 瞳孔固定, 直径 5 mm。入院后按前房积血治疗, 2 d 后积血吸收, 视力 1.0, 眼压 21.40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)。出院。1 月后因左眼痛伴同侧头痛再次入院, 检查: 视力右 1.0、左 0.08, 左眼睫状充血, 前房深, 房水闪光 (+), 瞳孔直径 5 mm, 眼压 50.62 mmHg, 给予甘露醇、醋氨酰胺、地塞米松等治疗, 2 d 后眼压 34.52 mmHg。房角检查: 全周房角均为宽角, 虹膜根部后陷, 睫状体带增宽, 色素沉积于小梁网, 诊断为房角后退性青光眼。使用减少房水生成的药物降低眼压, 入院后第 8 天眼压 26.56 mmHg, 双眼视力均为 1.0, 行左眼小梁切除术, 第 12 天痊愈出院。随访 6 个月, 眼压保持稳定, 无复发。

2 讨论

眼部钝性冲击伤后房角后退患者, 7%~16.7%发生房角后退性青光眼^[1,2]。钝击动量由眼内液传导至眼内各组织。由于眼前段解剖生理特点, 前房角后退是眼前段常见的并发症, 表现为虹膜根部受力后退 (亦有巩膜根部离断者)、前房变深、睫状体在巩膜的附着后移、房角劈裂、房角镜下见睫状体带增宽、睫状体与巩膜间出现劈裂。本例病人的最大特征即是房角增宽。本病钝击伤后因前房积血、小梁网水肿等引起的早期高眼压经治疗恢复后, 经历数周、数月甚至数年后常常再次发生高眼压, 其机制为: 伤后睫状肌环形纤维及纵形纤维撕裂, 环形肌纤维及色素膜小梁自巩膜突分离, 导致睫状肌对小梁的牵引紧张作用下降, 小梁网张力下降, Schlemm 管闭合, 同时发生小梁组织变性 (硬化和透明样变), 这两者均可使房水外流阻力增大, 导致眼压升高。据此机制, 眼压升高程度与房角后退范围和撕裂程度有关。也有作者认为房角后退性青光眼患

者实际上是一组具有原发性开角型青光眼易感因素的群体^[3]。本病经过类似原发性开角性青光眼, 进展缓慢, 病程长者视力视野有不同程度受累, 主要体征有眼压升高、前房深、房角宽、睫状体带常比小梁网宽。此病诊断并不困难, 诊断内容主要是: 有眼部钝伤前房积血史, 眼压缓慢升高, 眼底及视野改变, 房角镜下睫状体带变宽, 周边前房加深, 虹膜未卷后移 (原附着处虹膜组织残留)^[4]。但临床常因伤后前房出血、角巩膜缘裂伤等改变而忽视房角检查, 极少由初次眼压升高而作出房角后退性青光眼的诊断。在治疗中随着高血压的恢复, 视力也能基本恢复, 因此房角检查始终未作为必要检查项目。作出本诊断者常为二次就诊, 间隔时间长者, 可发生视力、视野不同程度受累。本例患者因时间较短, 尚未出现视力、视野的改变。为防误诊, 我们认为对眼球钝伤后患者, 特别是有前房出血者, 在积血吸收、视力能恢复后应常规作房角检查。关于检查次数, 应连续多次进行^[5]。本病治疗主要有降眼压、保护视神经。药物治疗主要以减少房水生成为主, 局部点眼液选用噻吗心安。激光小梁成形术的成功率低, 手术治疗以选用外引流术式为主。

参考文献:

[1] Blanton FM. Secondary glaucoma due to angle recession [J]. Arch Ophthalmol, 1964, 72(1): 39.

[2] 周文炳, 叶天才. 钝伤性房角后退与继发性开角型青光眼 [J]. 中华眼科杂志 (Chin J Ophthalmol), 1986, 22(3): 156.

[3] 彭寿雄, 周文炳, 彭大伟, 等. 迟发性房角后退性青光眼眼压升高机理的探讨 [J]. 中国实用眼科杂志, 1996, 14(5): 269-71.

Peng SX, Zhou WB, Peng DW, et al. Discussion: The theory of ther-ouintraocular hypertension in secondary angle recession glaucoma [J]. Chin J Pract Ophthalmol, 1996, 14(5): 269-71.

[4] 张小平, 曲道飞, 张丽琼, 等. 钝伤性房角后退继发青光眼 [J]. 中国实用眼科杂志 (Chin J Pract Ophthalmol), 2003, 21(3): 189.

[5] 张德秀, 沈凤梅, 宋哲. 挫伤性房角后退和房角退缩性青光眼的临床研究 [J]. 眼科, 2001, 10(6): 327-9.

Zhang DX, Shen FM, Song Z. Clinic study of traumatic angle recession and angle recession glaucoma [J]. Ophthalmol Chin, 2001, 10(6): 327-9.

(责任编辑: 黄开颜)

收稿日期: 2003-12-10

作者简介: 张庆华 (1973-), 2003 年硕士毕业于第一军医大学, 医师, E-mail: zqh20018@sohu.com