

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)02-0154-03

金喜素对原代培养的人食管癌细胞的抗癌作用

姜涛 程庆书, 张涛 李小飞 朱以芳 (第四军医大学唐都医院胸外科 陕西 西安 710038)

Anti-tumor effects of Topotecan on primary cultured human esophagus cancer cells

JIANG Tao, CHENG Qing-Shu, ZHANG Tao, LI Xiao-Fei, ZHU Yi-Fang

Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To study the effect of Topotecan on the proliferation and apoptosis of primary cultured esophagus cancer cells and its possible mechanism. **METHODS:** Primary cultured esophagus cells were treated with topotecan of different concentrations for 48 h. MTT assay was used to detect the viability of cells. Morphological changes of apoptotic cells were studied by acridine orange staining and the apoptotic rates were detected by flow cytometer. Caspase-3 activity was measured by colorimetric assay. **RESULTS:** After treatment with topotecan for 48 h, the cell proliferation was significantly inhibited in a dose-dependent manner. Typical morphological changes of apoptotic cells could be detected by acridine orange staining in cells treated with topotecan with an apoptotic rate of (33.4 ± 6.8)% but few apoptotic cells could be detected in cells without topotecan incubation. Topotecan markedly increased the caspase-3 activity of esophagus cancer cells after treatment for 48 h. **CONCLUSION:** Topotecan can inhibit the proliferation of primary cultured esophagus cancer cells and induce apoptosis through the activation of caspase-3.

【Keywords】 topotecan; esophageal neoplasms; cells, cultured; cell division; apoptosis; caspase-3

【摘要】目的:研究金喜素(Topotecan)对体外原代培养的人食管癌细胞增殖与凋亡作用的影响及可能的机制。方法:原代培养人食管癌细胞,MTT法检测金喜素对食管癌细胞增殖作用的影响,吖啶橙染色观察凋亡细胞形态学变化,流式细胞仪定量检测金喜素处理细胞后细胞凋亡情况,底物裂解法检测金喜素对食管癌细胞半胱天冬酶-3(caspase-3)活性的影响。结果:金喜素处理细胞48 h后,可明显抑制癌细胞增殖,

并呈浓度依赖性。金喜素处理的食管癌细胞经吖啶橙染色可检测到大量凋亡细胞,流式细胞仪检测其凋亡率为(33.4 ± 6.8)%,而未经金喜素处理组几乎未检测到凋亡细胞,金喜素处理食管癌细胞后其Caspase-3活性较未处理组显著增高。结论:金喜素可抑制体外原代培养的食管癌细胞增殖,并通过促进Caspase-3活性而诱导细胞凋亡。

【关键词】 托泊替坎;食管肿瘤;细胞培养;细胞分裂;脱噬作用; caspase-3

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A

0 引言

金喜素即9-二甲基氨基-10-羟基喜树碱,是近年来临床上用于治疗晚期肺癌的新型化疗药物,它能抑制拓扑异构酶I(TOPO I)的活性,使DNA断裂而发挥独特的抗癌作用^[1]。已有研究表明金喜素对肺癌、乳腺癌、卵巢癌等均有治疗作用,但目前关于其对食管癌的治疗方面报道较少,其抗食管癌的作用及机制尚未明确。由于肿瘤细胞原代培养基本保留了原有肿瘤组织的生物学特性,本实验采用原代培养的人食管癌细胞,观察金喜素对其增殖与凋亡作用的影响,并观察了金喜素处理细胞后半胱天冬酶-3(Caspase-3)的活性变化,以初步探讨金喜素抗癌作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 取食管癌患者手术切除新鲜标本,患者术前未行化疗或放疗,经病理证实为食管鳞癌。RPMI 1640培养基、胎牛血清(Gibco公司);金喜素为美国史克必成公司产品。MTT和吖啶橙(美国Sigma公司)。Annexin V凋亡检测试剂盒(Biovision公司)。Caspase-3检测试剂盒(Clontech公司)。

1.2 方法

1.2.1 人食管癌细胞原代培养 取手术切除的新鲜肿瘤组织,迅速移入含适量双抗液(内含青霉素100 000 U/L、链霉素100 mg/L)的Hank's液中洗涤2次,去除其表面的凝血块以及肿瘤周围坏死组织及非肿瘤组织等,然后移至含RPMI 1640培养液的无菌平皿内用眼科剪剪碎肿瘤组织,加入2.5 g/L胰蛋白酶消化15 min,200目不锈钢滤网过滤制成肿瘤单细胞

收稿日期 2004-05-25; 修回日期 2004-08-17

作者简介 姜涛(1965-)男(汉族),吉林省德惠市人,博士,副主任医师。Tel. (029) 83377737 Email. jted@sohu.com

悬液,离心(1000 r/min,10 min)后弃上清液加 Hank's 液洗 2 次,离心(1000 r/min,10 min),加入适量含 150 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液制成单个细胞悬液,台盼蓝染色,活细胞计数,细胞存活率达 90% 以上,按试验需要调节细胞浓度,接种于培养板中。

1.2.2 MTT 实验 调整细胞浓度为 4×10^7 /L,加入 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 4 h 后,加入不同浓度的金喜素(20 mg/L,40 mg/L 和 80 mg/L),同时设空白对照(不含肿瘤细胞)调零及对照组(含肿瘤细胞但不加金喜素),继续培养 48 h,离心后吸弃上清,每孔加入 MTT(5 g/L)20 μ L,继续培养 4 h 后,每孔加入 DM-SO100 μ L,振荡 15 min 后室温静置,酶标仪 570 nm 处读取 A 值。肿瘤细胞抑制率 = 实验组 A 值/对照组 A 值 \times 100%。

1.2.3 吖啶橙(AO)染色 将细胞接种于多聚赖氨酸(体积比 1:10)处理过的玻片上,以 80 mg/L 金喜素处理细胞 48 h,取未处理组(对照组)和处理组细胞爬片,以 950 mL/L 乙醇固定 15 min,10 mL/L 乙酸作用 30 s, 2×10^{-4} mol/L AO 染液染色 1 min,0.1 mol/L CaCl₂ 处理 2 min,PBS 封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测食管癌细胞凋亡 在细胞凋亡早期,由于细胞膜失去对称性,使磷脂丝氨酸(PS)从胞膜的内侧暴露于胞膜外。Annexin V-FITC 是一种标记有荧光素的钙依赖性磷脂结合蛋白,PS 有很强的亲和力,可特异地与 PS 结合,但细胞仍保持膜的完整性,可更加灵敏地检测出早期凋亡细胞,并计算出凋亡阳性细胞百分率。以 800 mg/L 金喜素处理细胞 48 h,收集未处理组(对照组)和处理组细胞,调节细胞密度为 1×10^6 /L,加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ L,4 $^{\circ}$ C 避光染色 10 min,染色后立即上机检测。

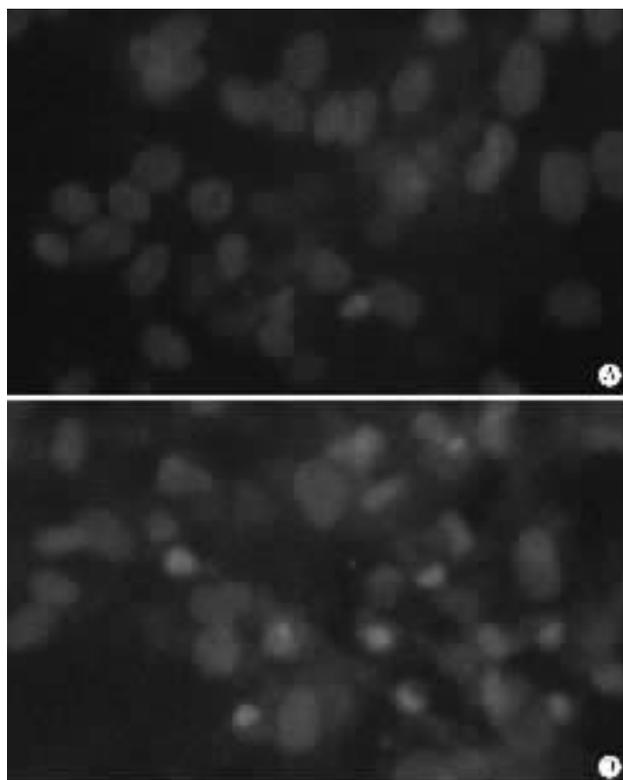
1.2.5 caspase-3 活性检测 取上述两组细胞各 5 例制备单细胞悬液,倒置显微镜下计数细胞,每组取细胞数约为 2×10^6 ,400 g 离心 10 min,弃上清,加入 50 μ L 预冷的细胞溶解缓冲液中,冰浴 10 min,低温高速离心后吸取上清,加入 caspase-3 底物 DEVD-pNA5 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1 h,于紫外分光光度计测 405 nm 波长处样品吸光度值。酶的相对活性用处理组与正常组的吸光度值之比表示,设正常组的活性为 1。

统计学处理:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS11.0 软件进行方差分析及 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 金喜素对食管癌细胞增殖的影响 金喜素 20 mg/L,40 mg/L 和 80 mg/L 处理细胞 48 h 后,细胞存活率分别为(88.3 \pm 9.2)%、(76.4 \pm 8.5)% 和 (61.9 \pm 9.7)% ,各组间有显著差异性($n = 9$, $P < 0.01$) ,随着金喜素浓度的增高,细胞存活率显著下降。

2.2 吖啶橙(AO)染色凋亡细胞形态学特征 AO 染色后荧光显微镜下观察 DNA 呈黄绿色,正常细胞核表现为黄绿色荧光深浅不一的结构样特征,凋亡细胞核染色质固缩,体积缩小,表现为黄绿色强荧光染色。金喜素处理组可检测到大量典型的凋亡细胞,而未处理组仅偶见凋亡细胞(Fig 1)。



A : Normal group ; B : Topotecan treatment group.

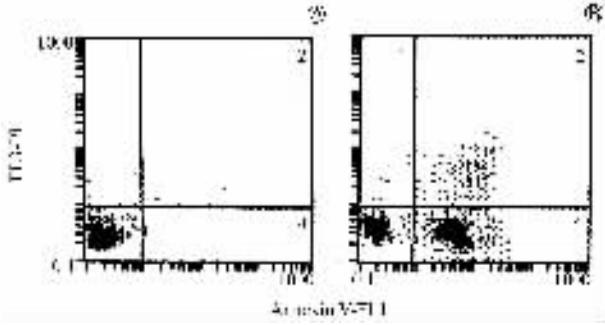
Fig 1 Typical apoptotic morphological features of esophagus cancer cells induced by topotecan by acridine orange staining $\times 200$

图 1 吖啶橙(AO)染色观察食管癌凋亡细胞形态学特征

2.3 金喜素对食管癌细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示(Fig 2) 3 区为正常细胞分布,4 区为凋亡细胞分布,对照组细胞集中在 3 区,在 4 区无分布,金喜素处理细胞后在 4 区出现大量细胞,其凋亡率为(33.4 \pm 6.8)%。

2.4 金喜素对食管癌细胞 caspase-3 活性的影响 金喜素处理细胞后其 caspase-3 活性较对照组显著增

高, 设对照细胞活性为 1, 金喜素处理组 caspase-3 活性为对照组的 (4.9 ± 0.7) 倍。



A: Normal group; B: Topotecan treatment group.

Fig 2 Topotecan induced apoptosis of esophagus cancer cells detected by flow cytometer

图 2 流式细胞仪检测金喜素诱导的食管癌细胞凋亡

3 讨论

喜树碱是从植物喜树树皮中提取出来的 1 种五环生物碱。其抗肿瘤活性与抑制拓扑异构酶 I 的作用有关, TOPO I 在 DNA 的复制转录和重组中均起重要的作用, 喜树碱类化合物能抑制 TOPO I 的活性, 使 DNA 单链断裂, 抑制 DNA 复制, 发挥独特的抗癌作用^[2]。其中金喜素作为喜树碱衍生物已在临床上多种肿瘤化疗中显示了较好的抗肿瘤活性。目前食管癌治疗以手术切除为主, 并与放疗、化疗及其他疗法相结合, 即所谓的综合疗法, 其中化疗在综合治疗中的作用和地位日趋明显。但目前大多数实体肿瘤的化疗效果并不理想, 而且多数抗肿瘤药物的毒副作用较大。因此开发高效抗肿瘤药物并进行准确快速的药敏试验对提高化疗效果非常重要。

我们采用 MTT 法观察金喜素对食管癌细胞增殖的抑制作用, 结果显示金喜素处理细胞 48 h 后, 可明显抑制癌细胞增殖, 并呈浓度依赖性。由于不同实体肿瘤细胞的部位、生物学特性不同, 不同药物的作用机制、药效也不同, 实验采用肿瘤细胞原代培养即从

供体获得肿瘤组织后的首次培养, 其优点是基本上保留了体内肿瘤细胞的生物学性状。因此, 细胞实验所得结果可供临床用药参考。

肿瘤细胞是由于细胞程序性生长分化被阻断而过度增殖的细胞, 肿瘤的生成是细胞增殖和凋亡失衡的结果, 凋亡与肿瘤的发生、发展和转归有密切的关系^[3]。多种抗癌药可引起一个共同的肿瘤细胞死亡模式即凋亡。因此, 研究抗癌药促进凋亡的作用及其机制, 将可能为克服肿瘤细胞抗药性, 提高化疗药物的选择性开拓新的思路。本实验在体外观察了金喜素对食管癌细胞凋亡作用的影响, 结果表明金喜素可有效地诱导食管癌细胞凋亡。细胞凋亡受多种机制调节和制约, 凋亡发生机制中最关键的环节之一是 Caspase 的激活, Caspase 为半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶, 简称为半胱天冬酶, 其中 Caspase-3 是最重要的凋亡执行者之一^[4], 在凋亡的执行阶段, 负责对全部或部分关键性蛋白的酶切, caspase-3 一旦被激活, 细胞凋亡的发生将不可逆转。已有研究证明, Caspase-3 的激活是凋亡发生不可逆转的一步。我们观察到金喜素处理细胞后, 可明显促进 caspase-3 活性, 进而有效地诱导了食管癌细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] Homesley HD, Hall DJ, Martin DA, et al. A dose-escalating study of weekly bolus topotecan in previously treated ovarian cancer patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2001; 83(2): 394-399.
- [2] Warmann SW, Fuchs J, Wilkens L, et al. Successful therapy of subcutaneously growing human hepatoblastoma xenografts with topotecan [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2001; 37(5): 449-454.
- [3] Engelmann I, Bauer G. How can tumor cells escape intercellular induction of apoptosis? [J]. *Anticancer Res*, 2000; 20(4): 2297-2306.
- [4] Kirsch DG, Doseff A, Chau BN. Caspase-3-dependent cleavage of cytochrome C [J]. *J Biol Chem*, 1999; 274(30): 21155-21161.

编辑 王小仲

· 期刊文摘 · 重组人骨形态发生蛋白诱导气管软骨再生的剂量效应

[李小飞, 张涛, 程庆书, 刘锴, 卢强, 汪健. 中华实验外科杂志 2004 21(3): 351-352]

目的: 观察重组人骨形态发生蛋白(rhBMP)-2 诱导犬自体原位气管移植段软骨再生过程中的剂量效应。方法: 4 组小鼠气管移植段各环间软组织中植入 rhBMP-2 胶原缓释系统, 其 rhBMP-2 含量分别为 1, 2.5 和 10 mg。将移植段气管原位移植 4 wk 后观察标本大体和组织学改变, 并将测得的新生软骨面积进行比较。结果: rhBMP-2 植入组移植段环间均有不同程度的软骨再生, 随植入物中 rhBMP-2 含量的增加, 新生软骨面积分别为: (1768.1 ± 449.0) (2364.1 ± 444.3) (3000.7 ± 488.3) (3188.3 ± 388.3) pixel。4 组新生软骨面积差异有显著性 ($F = 5.246, P < 0.01$)。结论: rhBMP-2 诱导气管移植段软骨再生的作用具有剂量效应。