

[文章编号] 1000-1182(2008)04-0362-03

维生素E琥珀酸酯诱导舌鳞癌Tca8113 细胞凋亡的研究

曹选平¹, 王树斌¹, 周弘¹, 吴豪阳¹, 张彦喜¹, 刘学军¹, 张松涛²

(1.郑州大学口腔医院 口腔颌面外科, 河南 郑州 450052;

2.四川大学华西口腔医院 头颈肿瘤外科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨维生素E琥珀酸酯(VES)对人舌鳞癌Tca8113细胞的凋亡诱导作用及其可能的分子机制。方法 四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测VES对舌鳞癌Tca8113细胞的抑制作用;应用流式细胞仪分析不同质量浓度VES处理后舌鳞癌细胞的凋亡率;Fas中和抗体进行阻断实验;以细胞免疫化学法和流式细胞仪检测VES处理后肿瘤细胞Fas蛋白水平和细胞表面Fas表达的变化。结果 不同质量浓度的VES处理后,舌鳞癌细胞的生长受到明显的抑制,肿瘤细胞的凋亡率显著上升,呈现时间依赖性和剂量依赖性;Fas中和抗体进行阻断后,细胞凋亡率显著下降;VES处理后细胞Fas蛋白表达增强;流式细胞仪检测细胞表面Fas平均荧光强度也显著升高。结论 VES对舌鳞癌细胞具有凋亡诱导作用,其作用机制与肿瘤细胞表面Fas蛋白表达的上调有关。

[关键词] 维生素E琥珀酸酯; Tca8113细胞; 凋亡; Fas蛋白

[中图分类号] R739.86 **[文献标识码]** A

The study of apoptosis induction effect of vitamin E succinate on Tca8113 human tongue cancer cells CAO Xuan-ping¹, WANG Shu-bin¹, ZHOU Hong¹, WU Hao-yang¹, ZHANG Yan-xi¹, LIU Xue-jun¹, ZHANG Song-tao². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Dept. of Head and Neck Tumor Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate the apoptosis induction effect of vitamin E succinate(VES) on Tca8113 cells and its possible mechanisms. Methods The proliferative activity of Tca8113 was assessed by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. After Tca8113 cells were treated with different concentrations of VES, apoptotic rates were analyzed by flow cytometry(FCM). Fas monoclonal antibody was used for the blocking test. Fas expression was detected by immunocytochemistry(SABC assay) and FCM. Results VES demonstrated a significant growth inhibitory effect and apoptosis induced effect on the Tca8113 cells in a dose- and time- dependent manner. Fas neutralizing antibody can block the apoptosis induced by VES. After the administration of VES, the expression of Fas protein increased and the kytoplasm staining enhanced. Proteinum quantitative analysis showed that the mean fluorescence intensity increased. Conclusion VES can induce apoptosis in human tongue cancer cells, and the up-regulation of the cell surface Fas protein may play an important role in the process.

[Key words] vitamin E succinate; Tca8113 cell; apoptosis; Fas protein

对于舌鳞癌一般多采用综合治疗以尽量保存舌的形态与功能,化疗在维持器官功能上的完整性、提高患者的远期生存率和生存质量方面具有积极作用。因此,寻找新型低毒高效的化疗药物对舌癌综合治疗具有重要的意义。维生素E琥珀酸酯(vitamin E succinate, VES)是天然维生素E的衍生物,能够

抑制多种肿瘤细胞的生长,且对正常细胞的生长无毒性及抑制作用^[1],这种选择性抑制作用使之在肿瘤化学治疗方面具有广阔前景。本研究旨在检测VES对舌癌Tca8113细胞的生长抑制和凋亡诱导作用,并分析其对凋亡诱导分子Fas蛋白的调控作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium,

[收稿日期] 2008-03-19; [修回日期] 2008-06-01

[基金项目] 河南省科技创新人才工程基金资助项目(2002109)

[作者简介] 曹选平(1963-),男,河南人,教授,博士

[通讯作者] 曹选平, Tel: 13837101180

MTT)、碘化丙锭(propidium iodide, PI)、VES (Sigma公司, 美国), Fas中和性抗体(Coulter & Immunotech公司, 美国), FITC标记鼠抗人Fas单抗(Oncogene公司, 美国), 兔抗人Fas多克隆抗体试剂盒(武汉博士德公司)。VES采用无水乙醇溶解, 配制成20 mg/mL的储备液, 4℃避光保存, 备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 人舌鳞癌Tca8113细胞株由郑州大学公共卫生学院冻存。在含10%小牛血清RPMI-1640培养液中, 青霉素质量浓度为100 μg/mL, 链霉素质量浓度为100 μg/mL, 饱和湿度、37℃、5%CO₂的条件下培养, 1~2 d换液1次。取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 MTT法测定细胞增殖活性 将舌鳞癌Tca8113细胞以每毫升2×10⁴个接种于96孔板, 每孔200 μL, 每组设6个复孔。接种细胞24 h后更换含等量、不同浓度VES(分别为5、10、20 μg/mL)的RPMI-1640培养基, 分别作用24、48、72、96 h; 空白对照组用等体积RPMI-1640替代VES。每个浓度组均设6个平行对照。培养结束前4 h每孔加20 μL(5 mg/mL)MTT继续培养4 h, 培养结束时弃去培养基, 每孔加150 μL二甲基亚砷液, 振荡10 min后于自动酶标仪上进行比色, 测定光密度值(A), 测定波长为492 nm。计算药物对舌鳞癌细胞的增殖抑制率。抑制率(%)=(对照组平均A值-实验组平均A值)/对照组平均A值×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将人舌鳞癌Tca8113细胞约1.2×10⁵个接种于培养瓶中, 分别以10、20 μg/mL VES处理24、48 h后收集细胞, 并离心弃去培养液制成单细胞悬液, 70%冰乙醇固定后加入PI, 4℃黑暗处静置30 min后上机检测细胞凋亡率。每个标本分析适量细胞, 用随机所附软件对测量值进行分析。

1.2.4 阻断实验 为检测Fas蛋白在VES诱导舌鳞癌细胞凋亡过程中的作用, 采用Fas中和性抗体行阻断实验。使用20 μg/mL VES处理的同时加入0.5 μg/mL Fas中和性抗体共同作用48 h, 收集细胞, 采用流式细胞仪分析细胞凋亡率的变化。

1.2.5 免疫细胞化学法检测Fas的表达 载玻片经10%的多聚赖氨酸作防脱片处理, 20 μg/mL VES处理细胞48 h后丙酮固定细胞爬片, 1:100稀释的兔抗人Fas多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗孵育40 min, 最后按照ABC试剂盒说明染色。结果判定为Fas阳性细胞胞浆染色黄色或棕黄色, 阴性细胞不着色或着色很浅。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞表面Fas蛋白表达 参照

步骤1.2.3, 收集处理后的细胞, 离心去除培养液, PBS洗涤, 加入FITC标记的兔抗人Fas单抗免疫染色, FITC标记的兔IgG1同型抗体为对照, 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测Fas蛋白的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

1.3 统计学分析

运用SAS 8.2统计软件对数据进行卡方检验、重复测量方差分析和析因方差分析组间差异。

2 结果

2.1 VES抑制Tca8113细胞的增殖活性

VES对Tca8113细胞生长抑制率的影响见表1。不同浓度和不同作用时间的VES对Tca8113细胞的生长均具有抑制作用, 经重复测量方差分析, 5 μg/mL VES组在作用24、48 h时与对照组相比, 差异无统计学意义(P值分别为0.076、0.071), 其余各组与对照组相比, 差异均有统计学意义(P<0.001)。

表1 VES对Tca8113细胞生长抑制率的影响(%, $\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Growth inhibition of Tca8113 cells induced by VES(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	细胞抑制率			
	24 h	48 h	72 h	96 h
5 μg/mL VES组	6.09 ± 3.00	5.82 ± 2.37	7.27 ± 6.67	9.06 ± 2.22
10 μg/mL VES组	10.20 ± 6.70	23.82 ± 6.07	44.61 ± 3.34	66.00 ± 3.06
20 μg/mL VES组	24.38 ± 6.56	42.18 ± 9.06	63.52 ± 3.57	85.28 ± 1.26

2.2 VES对Tca8113细胞凋亡率的影响

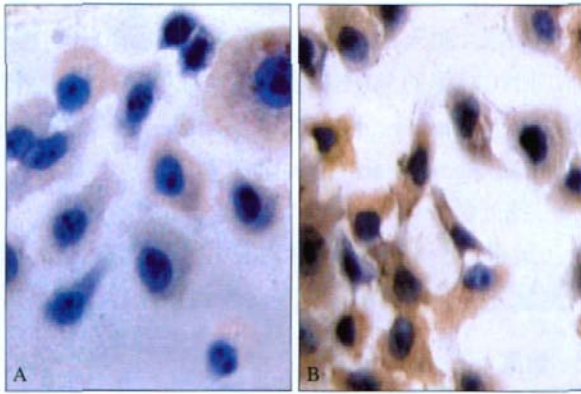
Tca8113细胞培养24、48 h自然凋亡率分别为1.41%和2.34%, 10 μg/mL VES作用于Tca8113细胞24、48 h后, 细胞的凋亡率分别上升至10.14%、18.19%; 20 μg/mL VES作用于Tca8113细胞24、48 h后, 细胞的凋亡率分别上升至23.79%、32.41%。不同浓度和不同作用时间的处理组与对照组相比, 差异均有统计学意义(P<0.01)。其中20 μg/mL VES作用于细胞48 h后, 流式图上出现典型的细胞凋亡峰。

2.3 阻断实验

将0.5 μg/mL Fas中和性抗体与20 μg/mL VES共同作用于舌癌细胞48 h后, 细胞的凋亡率降至7.65%, 与未经中和性抗体处理的细胞相比(32.41%), 差异有统计学意义(P<0.01)。

2.4 VES对Tca8113细胞Fas蛋白表达的影响

20 μg/mL VES作用于Tca8113细胞48 h后, 采用免疫细胞化学染色, 显微镜下观察可见细胞呈明显的黄棕色细胞轮廓以及细胞浆出现清晰的棕黄色, 对照组细胞浆着色很浅, 胞浆呈现轻度的浅黄色(图1)。



A: 对照组; B: 20 µg/mL VES组

图1 VES处理前后Tca8113细胞的Fas蛋白表达 SABC ×200
Fig 1 Immunocytochemistry of Fas protein after cultivated with VES and without VES SABC ×200

2.5 VES对Tca8113细胞表面Fas蛋白表达的影响

细胞培养24、48 h后, 对照组Tca8113细胞表面Fas蛋白平均荧光强度分别为12、12.5。10 µg/mL VES作用于Tca8113细胞24、48 h后, Tca8113细胞表面Fas蛋白平均荧光强度分别升高至14.0、20.7; 20 µg/mL VES作用于Tca8113细胞24、48 h后, Tca8113细胞表面Fas蛋白平均荧光强度分别升高至20.7、27.1。

3 讨论

VES是-生育酚的衍生物, 由琥珀酸与-生育酚酯化而成。目前的研究表明, VES能够抑制多种细胞系起源的肿瘤细胞的增殖。VES可选择性地诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制生长, 而对正常细胞却未表现出毒副作用, 这些研究提示, VES可作为一种潜在的肿瘤化学预防/治疗剂^[2]。本实验研究表明VES对舌鳞癌Tca8113细胞的生长有抑制作用, 并且这种抑制作用呈现出显著的时间-效应和剂量-效应关系。流式细胞仪分析细胞凋亡率显示, VES对舌鳞癌Tca8113细胞具有较强的凋亡诱导作用, VES对舌鳞癌细胞的凋亡诱导作用也呈现出明显的剂量-效应和时间-效应关系。本实验结果提示VES是一种有效的舌鳞癌细胞生长抑制剂。

研究发现, Fas/FasL凋亡信号途径的激活在VES诱导肿瘤细胞凋亡过程中起到重要作用, VES能促进Fas蛋白的合成, 上调细胞膜表面Fas表达^[3-4]。也有研究表明, VES能将Fas不敏感细胞系胞浆中的Fas转移到细胞表面, 从而将Fas不敏感细胞系转变为Fas敏感型细胞^[5]。徐昕昀等^[6]通过动物实验发现,

VES能够抑制荷乳腺癌裸鼠的生长, 采用FCM检测发现, 肿瘤组织及肿瘤表面Fas蛋白的表达均显著增强。这些研究提示: Fas/FasL凋亡诱导途径的激活可能是VES诱导肿瘤细胞凋亡的主要机制。本实验采用免疫细胞化学技术显示VES处理后细胞Fas蛋白表达水平升高, 采用间接免疫荧光联合流式细胞仪技术检测显示: 药物处理后, 细胞表面Fas蛋白表达明显提高, 而细胞凋亡主要由细胞表面的Fas分子介导; 应用Fas中和性抗体后, VES诱导的舌癌细胞的凋亡被明显阻断。综合本实验研究结果, VES对舌癌细胞的生长抑制作用与其对细胞的凋亡诱导作用密切相关, 细胞表面的凋亡诱导分子Fas表达的上调在其中起到重要作用。

目前的研究表明, VES诱导肿瘤细胞的凋亡是一个涉及多种机制和多种信号途径的复杂过程。本实验在加入Fas中和抗体后, VES对细胞的凋亡诱导作用并未被完全阻断, 提示其他机制在此过程中也发挥一定的作用, 因此, 对于各种途径之间的相互关系以及它们之间是否相互影响还有待于深入的研究。

[参考文献]

- [1] Neuzil J, Weber T, Gellert N, et al. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate[J]. Br J Cancer, 2001, 84(1): 87-89.
- [2] Neuzil J. Vitamin E succinate and cancer treatment: A vitamin E prototype for selective antitumour activity[J]. Br J Cancer, 2003, 89(10): 1822-1826.
- [3] Turley JM, Fu T, Ruscetti FW, et al. Vitamin E succinate induces Fas-mediated apoptosis in estrogen receptor-negative human breast cancer cells[J]. Cancer Res, 1997, 57(5): 881-890.
- [4] Wu K, Zhao L, Li Y, et al. Effects of vitamin E succinate on the expression of Fas and PCNA proteins in human gastric carcinoma cells and its clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(7): 945-949.
- [5] Yu W, Israel K, Liao QY, et al. Vitamin E succinate(VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: Role for Mr 43 000 Fas in VES-triggered apoptosis[J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 953-961.
- [6] 徐昕昀, 张伟, 张军初, 等. 维生素E琥珀酸酯上调Fas表达诱导乳腺癌Bcap-37细胞凋亡的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(8): 1010-1011.
XU Xin-yun, ZHANG Wei, ZHANG Jun-chu, et al. In vivo experiment of the effect of vitamin E succinate on expression of Fas and apoptosis induction in Bcap-37 breast cancer cells[J]. Chin J Exp Surg, 2006, 23(8): 1010-1011.

(本文编辑 王 晴)