

鬼臼乙叉甙对肺癌 A549 细胞生长特性及 Fas/FasL 表达的影响

徐 梅¹ 李红艳¹ 徐 波¹ 耿传营¹ 向 青^{1,2}

摘要 目的: 研究 Vp16 对人肺腺癌 A549 细胞生长特性及 Fas/FasL 表达的影响。**方法:** 用 MTT 法检测细胞增殖特性, FCM 观察细胞周期及凋亡, RT-PCR 测定 mRNA 表达的变化。**结果:** Vp16 以时间和剂量依赖方式作用于 A549 细胞的增殖; 不同浓度的 Vp16 作用 A549 细胞, 使其阻断在不同的细胞周期, 且均能明显下调 FasL 的 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 而对 Fas mRNA 的表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。**结论:** Vp16 直接作用 A549 细胞主要引起细胞坏死, Vp16 可能通过下调 FasL 的 mRNA 的表达, 防止肿瘤细胞免疫逃逸, 该结果为临床合理联合用药提供了实验依据。

关键词 肺癌; 鬼臼乙叉甙; Fas/FasL 系统; 免疫逃逸; 细胞凋亡

中图分类号: R49, R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2006)-01-0237-03

Effects of Vp16 on the growth characteristics and Fas/FasL expression on human carcinoma A549 cells/XU Mei, LI Hongyan, XU Bo, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(3): 237-239

Abstract Objective: To investigate the effects of Vp16 on the growth characteristics and Fas/FasL expression of A549 cells. **Method:** The growth rate, cell growth cycle and apoptosis were detected by MTT assay and FCM analysis respectively. The gene expression was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Vp16 inhibited the cell proliferation more effectively as dose and time increased. The cell cycle was arrested in dose-dependent manner, and FasL mRNA expression was dramatically decreased ($P < 0.05$), meanwhile Fas mRNA expression was not significantly different ($P > 0.05$) compared with the control. **Conclusion:** Vp16 can mainly induce necrosis of human lung carcinoma A549 cells and prevent the immune escape of tumor cell by retarding FasL mRNA expression, which is valuable in selecting anti-cancer drugs in clinic therapy.

Author's address Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029

Key words lung carcinoma; VP16; Fas/FasL system; immune escape; apoptosis

肺癌是常见的恶性肿瘤, 其发病率、死亡率在我国居前列。化疗是治疗肺癌的重要手段之一, 设计合理的化疗方案须深入了解化疗药的作用机制, 鬼臼乙叉甙(或足叶乙叉甙, Boposide, Vp16)是临床上用于肺癌的一线药物。近年来有很多关于 Vp16 抑制肿瘤细胞增殖, 诱导凋亡的研究^[1], Fas/FasL 是凋亡的调控基因, 但 Vp16 下调肺癌细胞 FasL 的表达却未见报道。有文献报道: 有些肿瘤细胞是正常细胞凋亡丧失所致, 而非细胞过度增殖所致^[2]; Fas/FasL 途径调控失常, 引起细胞凋亡抑制, 在肿瘤细胞逃避免疫监控中起重要作用^[3]。本研究用不同剂量的 Vp16 作用于人肺腺癌 A549 细胞, 观察 Vp16 对其生长特性、细胞周期及 Fas/FasL 表达的影响, 探索 Vp16 是否通过 Fas/FasL 表达调控诱导肿瘤细胞的凋亡、坏死或防止肿瘤细胞免疫逃逸, 以期临床合理联合用药, 协同抗癌提供实验依据。为肺癌恢复期小剂量化疗药的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞 A549 由中国医学科学院基础医学研究所提供; RNA 提取试剂盒购自 Pharmacia 公司; MTT、Vp16 为 Sigma 产品。PCR 引物由上海生工生物公司合成:

Fas 引物 A: 5'-CGGACCCAGAATACCAAGTG-3';

B: 5'-TGATGCCAATTACGAAGCAG-3',

扩增片段长度为 513bp;

FasL 引物 A: 5'-TGGCCTTGTGATCAATGAAA-3';

B: 5'-CCTCCATTTGTCTGGCTCAT-3',

扩增片段长度为 505bp;

β -actin 引物 A: 5'-ATCATGTTTGAGACCTCAACACC-3',

B: 5'-CATGCTGCCGCCAGACAG-3',

扩增片段长度为 552bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将对数生长期的人肺腺癌细胞

1 中日友好医院临床医学研究所生化室, 100029

2 通讯作者: 向青(中日友好医院临床医学研究所生化室, 100029)

作者简介: 徐梅, 女, 副主任技师

收稿日期: 2005-07-13

A549 胰酶消化后,加入 Vp16,终浓度分别为 0(对照组)、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/ml}$,用含 5%的胎牛血清 1640 培养基接种于 96 孔细胞培养板,每个浓度平行 6 孔,600 个细胞/200 μl ·孔⁻¹;接种于 6 孔板,每个浓度平行 3 孔,10⁵ 个细胞·3ml⁻¹·孔⁻¹,37℃,5% CO₂ 培养 3—6d 做以下实验。

1.2.2 细胞生长曲线:连续 6d 在 96 孔板的待测孔内加入 20 μl MTT(5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$),继续培养 4h,弃培养液,加入 150 μl 的 DMSO,用酶标仪测定 492nm 吸光度值,计算细胞抑制率。

抑制率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)÷对照组 OD 值×100%。

1.2.3 观察细胞凋亡及细胞周期:分别收集 6 孔板内培养 72h 的各组细胞,70%乙醇固定,PI 染色,流式细胞仪检测。

1.2.4 Fas/FasL mRNA 的 RT-PCR 半定量:收集加药 72h 的 6 孔板各组细胞,按 Trizol Reagent 试剂盒说明书提取 RNA 进行逆转录。取逆转录产物 cDNA 分别进行 Fas、FasL、 β -actin 的 PCR 扩增,(94℃,30s;94℃,45s;55℃,45s;72℃,60s,循环 30 次),取 PCR 产物 5 μl ,2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外投射分析仪观察并拍照,重复三批。用 NIH Scion Image 软件分析,计算 Fas/ β -actin, FasL/ β -actin 比值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件对实验数据进行分析,进行 *t* 检验,取 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 生长抑制

浓度 0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/ml}$ 的 Vp16 对肺腺癌 A549 细胞的抑制率第 3 天分别为 0、0、8%、24%、40%;第 4 天为 0、0、34%、40%、51%;第 5 天为 0、15%、47%、59%、73%;第 6 天为 4%、33%、62%、70%、80%。

2.2 细胞周期与凋亡

用 0.01 $\mu\text{g/ml}$ Vp16 处理的细胞周期与对照组比较差异无显著性意义;Vp16 浓度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 时,G1 期细胞增多,S 期细胞减少;Vp16 浓度 1 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞阻断在 G2/M 期;Vp16 浓度 10 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞阻断在 S 期;Vp16 浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞阻断在 G1 期。Vp16 为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞凋亡增加(表 1)。

2.3 RT-PCR 半定量结果

0.01—100 $\mu\text{g/ml}$ Vp16 均能明显下调 FasL 的 mRNA 的表达(各组与对照组相比均 $P<0.05$),见图 1,而对 Fas 的 mRNA 的表达差异无显著性意义(*t* 值

分别为 0.3930、0.2656、0.4757、0.2557、0.8459,各组与对照组相比 $P>0.05$)(图 2)。

表 1 Vp16 对 A549 细胞周期的影响

VP16 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	G1(%)	S(%)	G2+M(%)	凋亡细胞数(%)
0(对照组)	65.00±1.081	26.40±0.493	8.57±0.907	0.987±0.5163
0.01	64.83±1.006	25.90±0.436	9.23±0.723	0.753±0.2853
0.1	80.33±1.960 ^①	12.6±1.845 ^①	7.03±3.170	1.253±0.0802
1	7.33±0.929 ^①	6.23±0.709 ^①	86.66±1.877 ^①	1.060±0.2100
10	55.57±15.350 ^①	44.4±15.350 ^①	0	3.690±0.8425 ^①
100	95.83±0.800 ^①	5.17±1.810 ^①	0.5±0.450 ^①	1.506±0.2402

①与对照组相比 $P<0.05$

图 2 Vp16 对 A549FasL mRNA 表达的影响

M:Marker; 1—6:vp16 浓度 0(对照组)、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$;与对照组相比各组均 $P<0.05$

图 3 vp16 对 A549Fas mRNA 表达的影响

M:Marker; 1—6:Vp16 浓度 0(对照组)、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 与对照组相比各组均 $P>0.05$

3 讨论

肿瘤发生是机体自稳态破坏,正常调控机制丧失、细胞异常过度增生,逃避免疫监控的结果^[4]。肿瘤的特性之一是细胞周期异常,其治疗的中心环节是干扰细胞周期,使肿瘤细胞增殖速度减慢,导致其坏死或凋亡。Vp16 是一种半合成的鬼臼毒的苷类化合

物,与 DNA 拓扑异构酶 II 及 DNA 行成稳定的三元结合,引起 DNA 断裂。它在细胞内产生的自由基与其细胞毒有关,对细胞类型缺乏选择性。本研究结果发现:随着 Vp16 浓度增加,作用时间延长,对肺腺癌 A549 细胞的抑制率明显递增;不同浓度的 Vp16 作用 A549 细胞,使其阻断在不同的细胞周期。与对照组相比浓度 10 μ g/ml 的 Vp16 作用于 A549 细胞,凋亡率有差异,但变化范围小。推测:Vp16 直接作用 A549 细胞主要不是引起细胞凋亡,而是引起细胞坏死。Vp16 可能直接抑制拓扑异构酶 II,使线粒体氧化磷酸化受阻、ATP 耗尽和活性氧(ROS)增加等使细胞坏死^[9]。

肿瘤细胞的发生发展不仅同肿瘤细胞异常增殖、分化及停滞有关,而且同细胞凋亡基因变化有关。Vp16 可直接杀伤肿瘤细胞,也可以通过诱导细胞凋亡而杀伤肿瘤细胞^[6]。Fas 与 FasL 及相关调控因子组成 Fas 系统在传递细胞凋亡信号,发挥免疫监控中起重要作用。已有的研究表明:在许多肿瘤细胞膜表面存在 Fas/FasL 表达^[2],91%的小细胞肺癌的 FasL 表达高于正常肺组织^[7],分化低的肺癌患者 Fas 表达下调明显,FasL 表达上调明显;当肿瘤细胞 Fas 的水平下调至低于 Fas/FasL 途径诱导凋亡的阈值时,肿瘤细胞凋亡受到抑制,当肿瘤细胞表面 FasL 表达使 Fas 升高的激活的淋巴细胞凋亡增加时,肿瘤细胞逃逸^[8]。近有的研究表明:肿瘤不仅是通过 Fas 的低表达被动性逃避机体的免疫监控,还通过 FasL 表达主动杀伤与之接触的活性免疫细胞^[9],表达 FasL 的肿瘤细胞能诱导侵入肿瘤组织表达 Fas 的淋巴细胞凋亡^[10]。本文中,用 Vp16(0.01–100) μ g/ml 处理过的 A549 细胞的 Fas mRNA 的表达与对照组相比没有显著性差异,但是 FasL mRNA 的表达显著下调。推测:Vp16 直接作用于肺腺癌 A549 细胞不是通过上调 Fas 的表达,增加 A549 细胞的凋亡,而是通过下调 FasL 表达,防止诱导 Fas 敏感的淋巴细胞发生凋亡,消除或减弱肿瘤对机体活性淋巴细胞的杀伤作用,从而使机体对肿瘤杀伤的免疫潜能被激活,防止了 A549 细胞逃避免疫监控,进而达到治疗肿瘤的目的。

了解 Vp16 对 Fas 系统的影响对肺癌的治疗具有指导意义,抑制肿瘤组织表达 FasL 或强化 Fas 的表达可能成为治疗肺癌的有效方法^[11]。0.01 μ g/ml 到 100 μ g/ml 的 Vp16 均能下调 FasL 的表达且无显著性差异,这表明应用低于正常剂量的 Vp16 并非取其对肿瘤的直接杀伤作用,而是通过抑制肿瘤组织的 FasL 的表达,增强机体的免疫功能,防止肿瘤细

胞的免疫逃避,同时低于正常剂量的 Vp16 减轻了化疗药的毒副作用,与免疫制剂联合应用能起到减毒增效的作用^[12],减轻了化疗患者的痛苦,提高了康复患者的生存质量^[13]。

4 结论

Vp16 以依赖于时间和剂量的方式作用于肺腺癌 A549 细胞的增殖,主要引起细胞坏死。不同浓度的 Vp16 作用于 A549 细胞,使其阻断在不同的细胞周期,提示:在临床选择作用于不同细胞周期的化疗药联合应用时,Vp16 药物剂量不仅与抑瘤率有关,与细胞周期同样相关;不同剂量 Vp16 均引起 A549 细胞的 FasL 下调,提示:低于正常剂量的 Vp16,在减轻化疗药物对人体毒副作用的同时,同样可以保护机体的免疫系统,起到减毒增效的作用。Fas/FasL 可成为基因治疗或免疫治疗的新靶点。

参考文献

- [1] 周军民,曹建国,廖瑞芳,等.鬼臼乙叉甙对人结肠癌细胞的增殖和凋亡的影响[J].癌症,2000,19(4):328–330.
- [2] Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, et al. Co-expression of Fas (APO -1,CD95)/Fas ligand by Be Wo and NJG choriocarcinoma cell lines [J]. Gynecol Oncol, 2003, 91 (1): 101–111.
- [3] Bernstorff WV, Spamjaard RA, Chan AK, et al. Pancreatic cancer cells can immune surveillance via nonfunctional Fas (Apo1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand[J].Surgery,1999,125(1):73–84.
- [4] Sejima T, Itoyama T, Miyagawa I. Alteration of apoptotic regulatory molecules expression during carcinogenesis and tumor progression of renal cell carcinoma [J].Int J Urol, 2003,10(9): 476–484.
- [5] 韩锐,陈晓光,周龙恩,等.抗肿瘤药物的分子药理学.见:周宏颖主编.分子药理学 [M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1999.144–160.
- [6] Shimizu M, Kondo M, Ito Y, et al. Soluble Fas and Fas ligand provide new information on metastasis and response to chemotherapy in SCLC patients[J]. Cancer Detect Prev, 2005,29 (2):175–180.
- [7] Dong Xilin,Dong Lei,Li Xiuxia,et al.The expression and clinical significance of fas and fasl in lung cancer[J]. J Med University, 2003,17(3):122–128.
- [8] Cho D, Song H, Kim YM, et al. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates[J]. Cancer Res, 2000,60(10):2703–2709.
- [9] Li JH, Rosen D, Sondel P, et al. Immune privilege and FasL: two ways to inactivate effector cytotoxic T lymphocytes by FasL expressing cells[J].Immunology,2002,105(3): 267–277.
- [10] Ken-Lchiro Seino, Nobuhiko Kayagaki,Ko Oku-Mura. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand [J]. Nature Medicine, 1998,3:165–170.
- [11] Meng Y, Kang S, So J,et al. Translocation of Fas by LPA prevents ovarian cancer cells from anti-Fas-induced apoptosis [J]. Gynecol Oncol,2005,96(2):462–469.
- [12] Zagazdzon R, Golab J. Immunomodulation by anticancer chemotherapy: more is not always better(review) [J]. Int J Oncol,2001,18(2):417–424.
- [13] 张丽辉,黄带发,唐建华.紫杉醇合并放疗对老年晚期非小细胞肺癌患者近期生存质量的影响[J].中国康复医学杂志,2002,17 (5):300–301.