

紫杉醇对黑素瘤细胞 A375 体外抑制作用

曹永倩 王法刚 冯永强 李 强 王一兵*

[摘要] 目的: 确定紫杉醇在体外对 A375 细胞凋亡的影响。方法: 不同浓度紫杉醇分别作用 A375 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后, 用 MTT 法测定对细胞生长的抑制, 流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡的变化, Western blot 检测生存素(Survivin)的表达。结果: 紫杉醇呈剂量和时间依赖性抑制细胞增殖, 但高浓度组(1000 nmol/L)与低浓度组(100 nmol/L)在促进细胞凋亡及周期阻滞方面均无明显差异($P > 0.05$)。不同浓度紫杉醇作用细胞 24 h 后, Survivin 表达逐渐升高, 48 h 后其表达逐渐减弱, 至 72 h 与对照组相比无显著性差异。结论: 紫杉醇对 A375 细胞的生长抑制作用在一定浓度范围内呈浓度时间依赖性, 抑制 Survivin 的表达是紫杉醇诱导细胞凋亡的途径之一。Survivin 的表达与瘤细胞对紫杉醇产生抗药性有关。

[关键词] 紫杉醇; 恶性黑素瘤; 生存素

Inhibiting effects of taxol on malignant melanoma A375 cells in vitro

Cao Yongqian, Wang Fagang, Feng Yongqiang, et al. Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Provincial Hospital, Shandong University, Jinan, 250021

[Abstract] **Objective:** To determine the effects of apoptosis induced by taxol on melanoma A375 cells. **Methods:** A375 cells were treated with taxol in different concentrations for different time. MTT method was used to assay inhibition of cell proliferation, and the change of cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. Protein expression of survivin was detected by Western blot. **Results:** Taxol inhibited the proliferation of A375 cells in a dose-dependent and time-dependent manner, but low concentration of taxol (100 nmol/L) inhibited the cell growth and induced the cell cycle arrest as effectively as high concentration (1000 nmol/L) did ($P > 0.05$). The level of survivin was significantly higher than that in controls after A375 cells were exposed to taxol for 24 h. After 48 h, the level of survivin decreased and there was no significant difference when compared with controls at 72 h. **Conclusion:** The inhibition of cell growth by taxol on melanoma A375 cells is dose-dependent and time-dependent. The inhibition of survivin expression is one of pathway by which taxol induces apoptosis. The drug resistance of A375 cells to taxol may be related to the expression of survivin gene.

[Key words] taxol; malignant melanoma; survivin

恶性黑素瘤(MM)是一种恶性程度极高、临床预后较差的恶性肿瘤,而且其对化疗药物敏感性低且易产生耐药。肿瘤细胞对凋亡的抵抗性可降低细胞对化疗药物的敏感性,凋亡及其调节因子是决定恶性黑素瘤耐药的重要机制。Survivin 是 Ambrosini¹发现的一种凋亡抑制基因,因可延长细胞的生存又名“存活素或生存素”,是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中最具有临床研究意义的分子。Survivin 主要表达于肿瘤组织内,在分化成熟的正常组织中未见表达,被认为是肿瘤发生、发展及预后的重要

指标。²紫杉醇是从紫杉(红豆杉)的树皮中提取的一种化合物,是目前临床上治疗卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤的一线用药,但用于恶性黑素瘤治疗的报道国内很少。其抗癌机制与抑制微管解聚,抑制有丝分裂,促使细胞周期停滞,促进细胞凋亡等有关。³Survivin 作为一种能同微管结合的蛋白,参与调控细胞凋亡和细胞周期。本文研究了紫杉醇对恶性黑素瘤细胞凋亡的影响及与 Survivin 表达的关系。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养 人黑素瘤细胞株 A375 细胞购于中国医学科学院皮肤病研究所。以含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,在 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养; 0.25% 胰酶隔日消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)编号:2007AA021802

山东省科技攻关计划,编号:2007GC2000204

作者单位:山东大学附属省立医院烧伤整形美容外科,济南,250021

*通信作者

1.2 药物和试剂 紫杉醇(泰素, taxol)购于美国 Bristol - Myers Squibb 公司, 储存液为 6 mg/mL, 避光室温保存, 实验时以 DMEM/F12 培养基稀释至所需浓度。Annexin V - FITC 凋亡检测试剂盒购于北京晶美生物工程有限公司; Survivin 兔抗人多克隆抗体购于 Abcam 公司, Actin 抗体购于 Santa Cruz 公司, 辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 试验(噻唑蓝比色分析法) A375 细胞经胰酶消化后计数, 接种于 96 孔板, 每孔细胞 5×10^3 。分设对照组和不同浓度药物组(10、50、100、1000 nmol/L), 每组设 8 复孔, 分别培养 24 h、48 h; 于培养时间结束前 4 h 每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L, 继续孵育 4 h, 弃上清每孔加入 200 μ L 二甲基亚砜(DMSO)终止, 然后再振荡 15 min, 于酶标仪 490 nm 波长处检测吸光度 OD 值。以对照组细胞活力为 100%, 按公式计算不同浓度紫杉醇对 A375 细胞增殖的抑制率。细胞抑制率(%) = (1 - 药物组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

1.2.2 Western blot(蛋白免疫印迹试验)将 A375 细胞消化后, 接种于大培养皿中, 按不同浓度药物加药, 分别于 24、48 h 取样本离心收集细胞, 加入细胞裂解液, 冰上放置 20 min, 20 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 提取细胞内总蛋白, 灌制 10% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳, 转膜, 5% 脱脂奶封闭, 加入 1:5000 稀释兔抗人 Survivin 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 漂洗后加入辣根酶羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 漂洗后加入显影剂, 上机利用 Laser - 4000 化学发光仪显影系统显像。

1.2.3 流式细胞仪(FCM)分析细胞凋亡及细胞周期的变化 按不同时间及不同浓度组收集细胞 PBS 洗涤后加 100 μ L Binding Buffer, 5 μ L Annexin V - FITC 和 10 μ L PI, 混匀避光室温反应 15 min, 再加 500 μ L Binding Buffer 后在双变量流式细胞仪进行检测细胞凋亡率, 检测细胞周期时细胞洗涤后加入 80 μ L 打孔剂、550 μ L PI 混匀 4 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后上机检测。

1.2.4 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 率的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态学改变 倒置显微镜下观察: 对照组细胞为扁平的多角形, 细胞间排列紧密, 互相衔接, 具有上皮样细胞形态(图 1)。经紫杉醇处理 24 h 后, 细胞排列松散、细胞体积缩小, 悬浮的单个细胞增多, 随作用时间延长及药物浓度增高, 悬浮的单个细胞逐渐增多, 部分细胞皱缩, 胞质内出现颗粒状物质, 并可见坏死细胞逐渐增多, 偶见多核或双核巨细胞(图 2)。

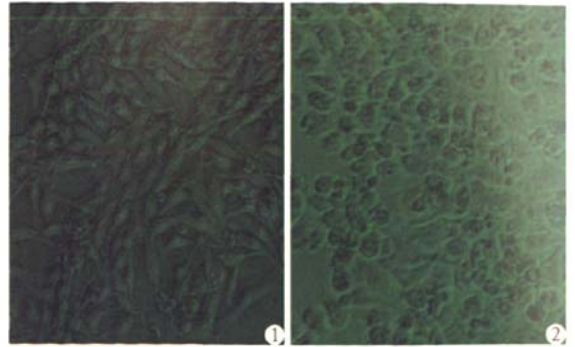


图 1 正常对照组 A375 细胞(HE, \times 100) 图 2 100 nmol/L 紫杉醇作用 24 h(HE, \times 100)

2.2 紫杉醇对 A375 细胞的抑制效应 不同浓度的紫杉醇分别作用 24、48、72 h 对 A375 细胞生长抑制结果表明: ①随着药物浓度的增加, 细胞存活率降低, 有明显的剂量依赖关系(图 3), 但当浓度增加至 1000 nmol/L 时, 细胞生长抑制率增加不明显。②同一浓度的药物有时间依赖关系, 随着作用时间的延长, 细胞存活率降低, 以作用 48 h 时最明显。

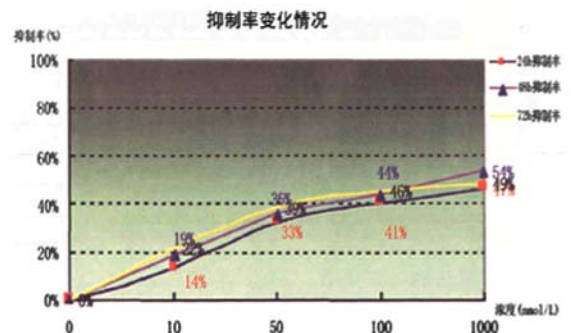


图 3 不同浓度紫杉醇作用 24 ~ 72 h 对 A375 细胞生长抑制率的变化

2.3 细胞周期及细胞凋亡率的改变 FCM 结果显示 10 nmol/L 紫杉醇作用 24 h 后 G_2/M 期细胞即增多, 同时细胞凋亡率与对照组相比从 5.23% 增至 15.23%。表明紫杉醇具有明显的周期阻滞及诱导细胞凋亡的作用。低浓度范围内(10 ~ 100 nmol/L), 细胞凋亡率随药物浓度的增加而显著增加($P < 0.05$), 呈浓度依赖性, 而浓度进一步增加, 凋亡率增加不明显($P > 0.05$)。相同浓度的紫杉醇随作用时间的延长, 细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$), 呈时间依赖关系(表 1、2)。

2.4 Western blot 检测结果 由图 4 ~ 6 可以看出不同浓度紫杉醇作用 24 h 后, Survivin 的表达逐渐增加, 有浓度依赖关系。而随着作用时间的延长, 至 48 h 后 Survivin 的表达与对照组相比减弱, Survivin 的表达呈现出随时间先升高后降低的变化趋势。

表1 不同浓度紫杉醇对 A375 细胞周期的影响

组别	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)
24 h(nmol/L)			
对照组	68.27 ± 2.95	21.57 ± 0.85	4.60 ± 0.96
10	48.17 ± 2.60*	27.37 ± 1.37*	15.80 ± 4.22*
50	34.33 ± 5.26*	15.63 ± 2.50*	42.07 ± 6.24*
100	9.80 ± 4.37*	7.70 ± 2.79*	82.30 ± 9.20*
1000	2.17 ± 0.55*	2.43 ± 1.27*	92.83 ± 3.26*
48 h(nmol/L)			
对照组	68.00 ± 3.34	22.70 ± 1.61	5.70 ± 0.36
10	39.53 ± 2.95*	17.10 ± 4.39*	28.63 ± 6.12*
50	25.83 ± 2.70*	9.80 ± 1.83*	55.37 ± 4.10*
100	1.70 ± 0.40*	1.93 ± 0.81*	95.13 ± 2.55*
1000	1.77 ± 0.15*	1.90 ± 0.40*	93.87 ± 2.35*

* 与对照组相比, P < 0.05

表2 不同浓度紫杉醇对 A375 细胞凋亡率的影响

组别	24 h(%)	48 h(%)	72 h(%)
对照组	5.23 ± 0.35	6.97 ± 0.42	6.47 ± 0.60
10	15.23 ± 2.65*	21.50 ± 2.00*	7.40 ± 0.82
50	22.70 ± 3.22*	30.00 ± 1.87*	7.13 ± 0.61
100	32.50 ± 3.38*	43.20 ± 1.90*	6.60 ± 1.39
1000	33.37 ± 2.10*	39.67 ± 1.17*	5.37 ± 0.57

* 与对照组相比, P < 0.05

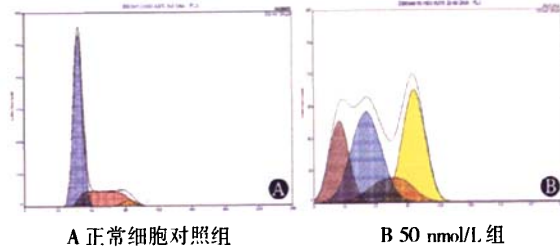


图4 紫杉醇不同浓度组作用24 h对 A375 细胞周期的变化

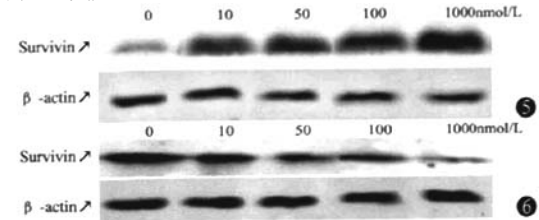


图5 不同浓度组紫杉醇作用于 A375 24 h 后 Survivin 的表达

图6 不同浓度组紫杉醇作用于 A375 48 h 后 Survivin 的表达

3 讨论

紫杉醇是一种新型的抗微管剂,通过促进微管蛋白二聚体的聚合并抑制其解聚,从而稳定微管,使细胞周期停滞于 G₂/M 期,抑制细胞分裂和增殖。⁴本研究 MTT 结果表明,紫杉醇对 A375 细胞的生长抑制作用在一定范围内呈剂量-时间依赖关系。随浓度增加,细胞抑制率逐渐增加,低浓度延长作用时间,同样可提高细胞抑制率。100 nmol/L 浓度作用 48 h 时可

灭活 50% 以上肿瘤细胞,但浓度继续增加至 1000 nmol/L 时,细胞抑制率增加不明显。

紫杉醇的主要作用是抑制细胞有丝分裂,周期阻滞作用非常敏感,即使在低剂量时其阻滞作用已非常明显,100 nmol/L 浓度紫杉醇作用 24 h 即可将超过 80% 的细胞阻滞于 G₂/M 期,细胞被阻滞于该期影响有丝分裂,为联合用药提供了重要靶点,例如顺铂主要作用于细胞 DNA,影响其复制,与紫杉醇联合应用具有协同作用,已是临床应用广泛的化疗方案。

流式细胞仪检测结果显示低浓度(10 ~ 100 nmol/L)时细胞随药物浓度的增加而凋亡率增加,但在高浓度(1000 nmol/L)时细胞凋亡率增加不明显(P > 0.05),但继发性坏死随药物浓度的提高而在不断增加。并且高浓度延长作用时间并不能明显提高细胞凋亡率。紫杉醇 1000 nmol/L 组作用于 A375 细胞 72 h 时, > 90% 细胞已死亡,而凋亡率却有所下降。这提示紫杉醇诱导细胞凋亡的机制因药物浓度的不同而不同。紫杉醇诱导细胞凋亡的途径不单纯依靠细胞周期阻滞作用。同时低剂量长时间作用和高剂量短时间的作用模式对于黑色素瘤细胞凋亡率的影响相差不大,而后的细胞毒性要高于前者,因此应用低剂量延长作用时间可作为临床给药的一种参考。

Survivin 在 G₁ 期不表达, G₂/M 期表达增加 40 倍,⁵ 这种高表达与其抑制凋亡密切相关。Survivin 对促进肿瘤细胞完成有丝分裂,维持细胞增殖活性具有重要作用。Survivin 是重要的凋亡抑制因子。我们的研究发现,在紫杉醇作用的最初 24 h 内, Survivin 与对照组相比是增加的,与朱晓东等⁶ 的报道相一致。短时间内紫杉醇能诱导 Survivin 的表达是紫杉醇引起的细胞应激反应。正常对照组细胞大部分处于 G₀/G₁ 期和 S 期, G₂/M 期细胞相对较少, Survivin 在这二期表达少,但加入紫杉醇后,细胞大部分被阻滞于 G₂/M 期,这也是 Survivin 表达增高的原因之一。紫杉醇作用 48 h, Survivin 的表达减弱,并且呈剂量依赖性。药物作用 48 h 时,细胞凋亡率达到最高,而 Survivin 的表达也降到最低,这说明 Survivin 参与了紫杉醇诱导细胞凋亡的机制。Survivin 基因高表达被认为是肿瘤细胞对紫杉醇产生抗药性的机制之一。马晓黎等⁷ 证实卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药性与 Survivin 的表达有关。Survivin 被认为是与肿瘤对药物的抵抗作用有关,特别是与微管发生相互作用的抗肿瘤药物。⁸ 利用反义寡核苷酸技术或 RNA 干扰技术抑制 Survivin 基因的表达,阻断其抗凋亡作用,或许能降低耐药性的产生。

我们的实验证实,紫杉醇对 A375 细胞有较强的生长抑制及诱导凋亡作用,且其作用有时间-剂量依

赖性。紫杉醇的抗肿瘤活性是通过多种途径实现的,包括细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡,抑制 Survivin 的表达等,这些不同的作用机制将为如何提高紫杉醇对恶性黑色素瘤的疗效提供联合用药的新思路。

参 考 文 献

1 Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396(6711): 580 - 584.

2 Kami K, Doi R, Koizumi M, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery* 2004; 136(2): 443 - 448.

3 Pushkarev VM, Starenki DV, Saenko VA. Molecular mechanisms of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* 2004; 145(7): 3143 - 3152.

4 Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, et al. Paclitaxol induced apoptosis and mitotic arrest assessed by serial fine needle aspiration: implication for early prediction of breast cancer response to neoadjuvant treatment. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12): 4610 - 4617.

5 Rodriguez JA, Span SW, Freneira CG, et al. CRM1 - mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the anti-apoptotic protein survivin. *Exp Cell Res* 2002; 275(1): 44 - 53.

6 朱晓东, 林庚金, 靳嘉巍, 等. 紫杉醇对 Survivin 表达的影响及其抗肿瘤作用. *复旦学报(医学版)* 2008; 35(1): 67 - 71.

7 马晓黎, 邢辉, 翁丹卉, 等. 真核表达 Survivin 基因对卵巢癌细胞紫杉醇敏感性的影响. *华中科技大学学报(医学版)* 2007; 36(2): 224 - 227.

8 陈小兵, 罗素霞, 肖毅军, 等. 抗凋亡蛋白表达与晚期乳腺癌紫杉醇化疗敏感性的关系. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13(3): 181 - 183. (收稿: 2009 - 07 - 29 修回: 2010 - 01 - 12)

· 经验交流 ·

开远市 2002 - 2008 年新发现麻风病人分析

潘琼华 王 曦 李黎娜 王 兵

开远市地处云南省东南部, 少数民族比较集中, 全市累计发现麻风病人 537 例。近年来, 发现率和患病率, 是全国患病率超过 1/万的少数县(市)之一。为了制定相应防治措施, 现将 2002 - 2008 年新发现麻风病人资料分析如下。

1 资料与方法

资料来自本市麻风病疫情监测系统数据库和病案资料。麻风的诊断标准、分型和畸残分级参照“麻风防治手册”¹。

2 结果

7 年间, 共发现 131 例麻风患者(含复发 2 例), 平均年发现率为 6.23/10 万; 确诊时平均年龄 38.8 岁, 平均延迟期 1.43 年。131 例麻风患者的传染源和发现途径见表 1。

表 1 131 例麻风患者传染源及发现方式

年度	发现数	传染源			发现方式					
		家内	家外	不明	报病	皮肤科	接触者	线索调查	疫点调查	团体检查
2002	16	2	14		1	6		8		1
2003	15	3	12		1	8	1	4	1	
2004*	20	1	18		1	7		4	7	
2005*	28	13	10	4		8	1		18	
2006	17		10	7		10	3	2	2	
2007	12		2	10	3	4		3	2	
2008	23	5	2	16	2	3	5	10	3	
合计	131	24(18.3)	68(51.9)	37(28.2)	8(6.1)	46(35.1)	10(7.6)	31(23.7)	33(25.2)	1(0.8)

* 2004 和 2005 年各有 1 例复发, 未计入统计

131 例麻风患者中, 15 岁以下儿童患者 3 例(2.3%); 单皮损者 23 例(17.6%); 确诊时有 I 型或 II 型麻风反应者 11 例(8.4%), 2 级畸残者 15 例(11.5%); 多菌型 95 例(72.5%); 细菌指数(BI) ≥ 4.0+ 者 66 例(50.4%)。

3 讨论

开远市曾于 2003 年和 2008 年开展了两次消除麻风运动, 期间在人群中开展了广泛的健康教育活动, 从而使较多的病人

早期就诊与皮肤科而被发现。因此, 诊断延迟期(平均 1.43 年)和 2 级畸残率(11.5%)明显低于全国水平。^{2,3}

131 例患者中, 有明确接触史者占 71.3%, 与全国的 70.8% 相近。虽然理论上通过对接触者追踪和定期检查可发现较多病人, 但对追踪方式和时限仍需进一步探讨。⁴

参 考 文 献

1 马海德. 麻风防治手册, 南京: 江苏科学

技术出版社, 1989. 194 - 195.

2 周玉祥, 周龙朝. 云南麻风新发病例分析. *中国麻风皮肤病杂志* 2003; 3: 272.

3 李文忠, 沈建平, 陈祥生, 等. 1990 - 1998 年中国麻风新发病例分析. *中国麻风皮肤病杂志* 2000; 增刊: 6 - 9.

4 Chen SM, Zhang L, Liu DC, et al. Should household contact examination in a low endemic situation of leprosy continue? *Int J Lepr* 2003; 71: 95 - 100.

(收稿: 2009 - 11 - 05)