

洛铂联合放疗对肺癌细胞杀伤作用的研究

陶 华^{1,2}, 孙新臣^{3*}, 鲁世慧¹, 成红艳³, 郭 林³, 袁 喜³

(¹东南大学医学院, 江苏 南京 210009; ²南京医科大学附属江苏省肿瘤医院放疗科, 江苏 南京 210009; ³东南大学附属中大医院放疗科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 研究洛铂联合放疗对非小细胞肺癌细胞的杀伤作用以及对细胞周期和凋亡的影响。方法: MTT 法观察肺癌 A549 细胞增殖抑制, 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期分布, 蛋白免疫印迹检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。结果: 洛铂对肺癌 A549 细胞有增殖抑制作用, 且细胞毒性呈剂量依赖性; 洛铂联合放疗组观察到有更高的细胞凋亡率和 G2/M 期阻滞; 蛋白免疫印迹结果显示洛铂联合放疗组 Bcl-2 表达水平下降, 促进凋亡诱导蛋白 Bax 表达水平升高。结论: 洛铂有放疗增敏作用, 作用机制可能与抑制 Bcl-2 表达、促进 Bax 表达、激活 Bcl-2(Bax)-Caspase 信号通路有关。

[关键词] 洛铂; 肺癌; A549 细胞; 凋亡

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-669-04

Study of labaplatin combined with irradiation on lung cancer cell *in vitro*

TAO Hua^{1,2}, SUN Xin-chen^{3*}, LU Shi-hui¹, CHENG Hong-yan³, GUO Lin³, YUAN Xi³

(¹Medical College of Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Radiation Oncology, Cancer Hospital of Jiangsu Province Affiliated to NJMU, Nanjing 210009; ³Department of Radiation Oncology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of labaplatin combined with irradiation on non-small cell lung cancer cell line A549 and explore its radiosensitizing mechanism. **Methods:** MTT was used to examine the effect of labaplatin and /or irradiation on lung cancer cell line A549 proliferation. Flow cytometry was applied to detect the cell cycle distribution and cell apoptosis. Western blotting was used to observe the expression of Bcl-2 and Bax. **Results:** Lung cancer cell line A549 could be inhibited by labaplatin in a concentration dependent manner. G2/M phase peak and apoptosis rate was the highest in cells treated with labaplatin combined with irradiation. Western blotting illustrated the decrease of Bcl-2 and the increase of Bax. **Conclusion:** Labaplatin could radiosensitize A549 cells and the possible mechanism might be related with inhibiting Bcl-2, inducing Bax expression and activating the Bcl-2 (Bax)-caspase signaling way.

[Key words] labaplatin; lung cancer; A549 cell line; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 669-672]

洛铂 (laboplatin) 化学名为 1,2 二氨甲基-环丁烷-乳酸铂, 是继顺铂和卡铂之后第三代铂类衍生物, 对小细胞肺癌初治有效率为 38.2%~42.1%, 对化疗后复发患者的有效率也有 40%, 但洛铂对非小细胞肺癌的疗效报道很少。本实验主要研究目的为探讨洛铂与放疗在非小细胞肺癌治疗上是否有协同增效作用, 从而为洛铂与放疗联合在肺癌

中的应用提供相应的理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

非小细胞肺癌细胞株 (A549) 由中国药科大学提供; 洛铂 (海南长安国际制药有限公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司), 胰蛋白酶和 RPMI1640 (美国 Gibco 公司), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 美国 Amresco 公司); 二甲基亚砜 DMSO (美国 Amresco 公司)。主要实验仪器有 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Cabinet 公

[基金项目] 国家自然科学基金 (30970792)

*通讯作者, E-mail: sunxch505@yahoo.com.cn

司),⁶⁰Co γ 线放疗机 (加拿大 T780 型), FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人非小细胞肺癌细胞株(A549)在含 15%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37℃,体积分数为 5% CO₂,饱和湿度培养箱中培养,3 d 换液传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞照射

采用 ⁶⁰Co γ 线放疗机照射,照射时培养瓶瓶面加垫 0.5 cm 等效组织补偿胶。源皮距 100 cm,照射野 10 cm × 10 cm,照射 4 Gy,照射后的细胞置于 37℃,5%CO₂,饱和湿度培养箱中继续培养。

1.2.3 MTT 法检测洛铂联合放疗对肺癌 A549 细胞增殖抑制作用

取对数生长期 A549 细胞制成 5 × 10⁴ 个/ml 的细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,设空白对照组,洛铂浓度依次为 0.040、0.122、0.366、1.100 μmol/L,每组设 6 个复孔;37℃,5%CO₂,饱和湿度培养箱中培养 72 h 后,每孔加入 20 μl MTT,继续孵育 4 h 后,弃上清,加 150 μl DMSO,室温振荡 15 min,使结晶颗粒充分溶解,选择 490 nm 波长测定各孔吸光度值,计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率=[1-实验组 D(490 nm)/对照组 D(490 nm)]×100%。

1.2.4 台盼蓝染色法考察洛铂联合放疗对细胞生长曲线的影响

细胞消化、计数、制成浓度为 1 × 10⁴ 个/ml 的细胞悬液,6 孔板中每孔加入 2 ml 细胞悬液(每孔 2 × 10⁴ 个细胞)。6 孔板置于 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。用完全培养基稀释药物至所需浓度,加入含药培养基使药物终浓度分别为 0.01、0.05、0.25 μmol/L,同时设立阴性对照组;于药物作用 1、2、3、4、5、6 d 时台盼蓝染色法进行细胞计数,并绘制生长曲线。

1.2.5 细胞周期和细胞凋亡分析

细胞经 5 μmol/L 洛铂处理后消化收集细胞,碘化丙啶和锚定蛋白 V 双染检测细胞凋亡。细胞经不同浓度的洛铂(1.5、3.0、6.0 μmol/L)处理后消化收集细胞,用购自南京恩晶生物科技有限公司细胞周期检测试剂盒检测细胞周期。

1.2.6 Western blot

检测肺癌 A549 细胞 Bcl-2、Bax 及活化的 Caspase-3 蛋白的表达水平改变,Bcl-2、Bax 及活化的 Caspase-3 抗体及二抗由南京恩晶生物提供。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件包进行数据处理。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组均数比较用 *t* 检验,多组均数比较用单因素方差分析,采用析因设计的方差分析来检验联合效应。以 *P* < 0.05 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 洛铂±放疗对肺癌 A549 细胞增殖抑制试验

不同浓度洛铂作用 72 h 后,A549 细胞生长均受到抑制,且对细胞增殖抑制呈剂量依赖性,0.040、0.122、0.366、1.100 μmol/L 组的抑制率分别为 14.16%、35.96%、40.34%、59.94%。洛铂对肺癌 A549 细胞半抑制浓度(IC₅₀)为 3.884 μmol/L,洛铂联合照射 ⁶⁰Co γ 线 4 Gy 对肺癌 A549 细胞 IC₅₀ 为 0.173 μmol/L,洛铂联合放疗引起肺癌 A549 细胞杀伤敏感性提高超过 20 倍。洛铂联合放疗(4 Gy)对 A549 人肺癌细胞生长曲线的影响见图 1。洛铂联合放疗(4 Gy)比单用放疗细胞抑制率明显下降,0.25 μmol/L 洛铂比 0.01、0.05 μmol/L 洛铂联合放疗的抑制率更明显,差异有统计学意义(*P* 均 < 0.05)。

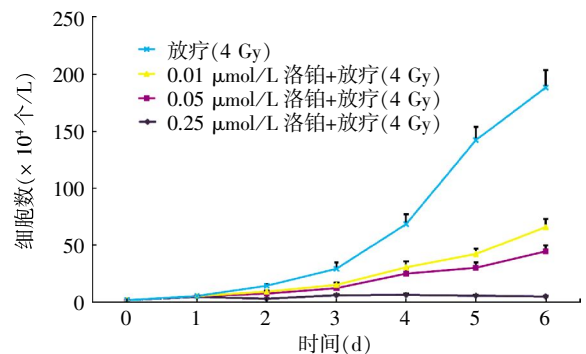


图 1 洛铂联合放疗(4 Gy)对 A549 人肺癌细胞生长曲线的影响

Figure 1 Effect of lobaplatin combined with irradiation (4 Gy) on proliferation of lung cancer A549 cells

2.2 流式细胞仪检测各组细胞周期阻滞

结果表明 24 h 内随洛铂浓度增加,肺癌细胞进入 S 期比例增多。而洛铂联合放疗将肺癌细胞阻滞于 G2/M 期(表 1)。

2.3 Annexin V-EGFP 染色流式细胞术检测凋亡百分率的影响

经灰度分析,放疗能明显提高洛铂诱导肿瘤细胞凋亡的能力(图 2,表 2)。

2.4 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 及活化的 Caspase-3 蛋白的表达

洛铂联合放疗可以明显诱导细胞凋亡过程中

表 1 不同浓度洛铂联合放疗(4 Gy)对肺癌 A549 细胞周期的调控作用

Table 1 Impact of lobaplatin combined with irradiation (4 Gy) on A549 cells cell cycle (% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	细胞周期		
	G0/G1	S	G2/M
阴性对照组	61.39 ± 2.63	25.33 ± 2.51	13.28 ± 1.34
1.5 μmol/L 洛铂	31.51 ± 2.73 **	51.55 ± 1.02 **	16.94 ± 1.93
1.5 μmol/L 洛铂联合放疗(4 Gy)	31.37 ± 0.76 **	0.00 ± 0.00 *##	68.63 ± 0.76 *##
3.0 μmol/L 洛铂	25.49 ± 1.10 **	65.88 ± 2.06 **	8.62 ± 1.24 *
3.0 μmol/L 洛铂联合放疗(4 Gy)	4.91 ± 0.83 *##	0.00 ± 0.00 *##	95.09 ± 0.83 *##
6.0 μmol/L 洛铂	25.63 ± 1.95 **	74.37 ± 1.95 **	0.00 ± 0.00 **
6.0 μmol/L 洛铂联合放疗(4 Gy)	3.50 ± 0.32 *##	70.23 ± 0.33 **	26.27 ± 0.44 *##

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同剂量单用洛铂组比较, ## $P < 0.01$ 。

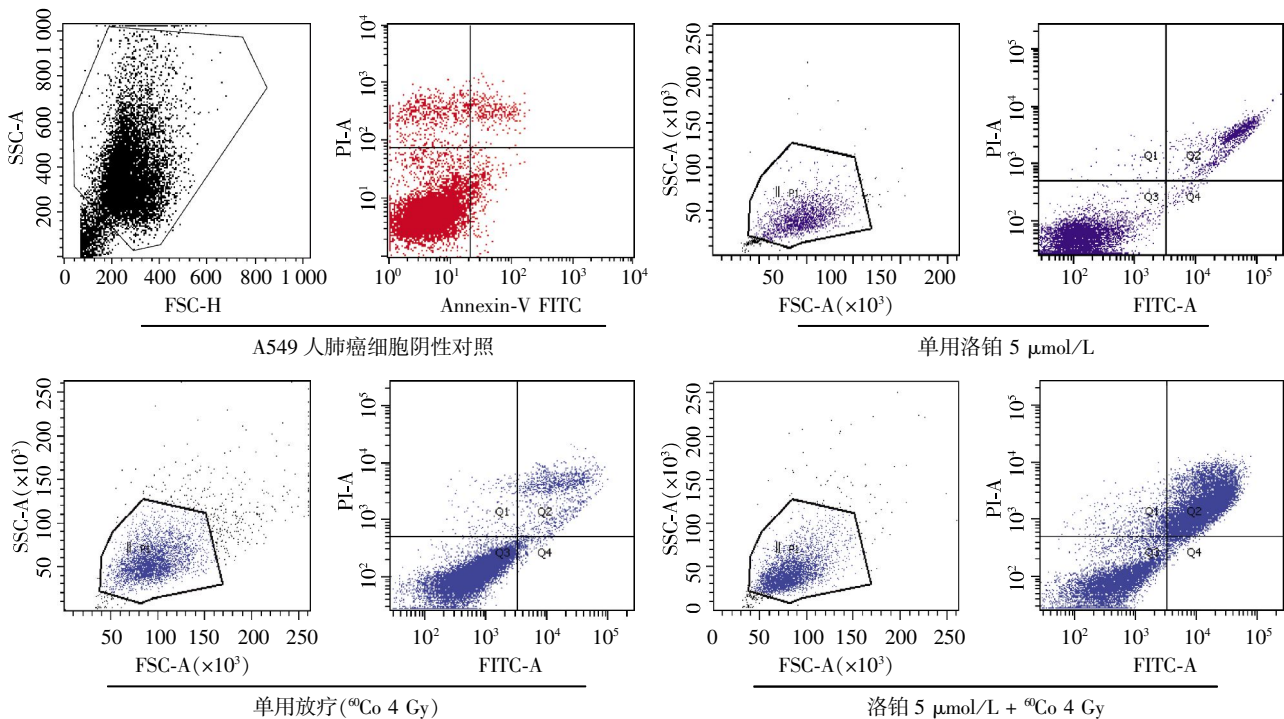


图 2 洛铂单用或与放疗联合应用对 A549 人肺癌细胞 Annexin V-EGFP 染色流式细胞术检测结果图

Figure 2 Outcome of A549 cell treated by lobaplatin and/or irradiation (4 Gy) through FCM analysis

的级联酶执行分子 Caspase-3 的活化, 同时可以显著诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下降, 促进凋亡诱导蛋白 Bax 表达水平升高(图 3)。

3 讨论

非小细胞肺癌占全部肺癌的 80%~85%, 而 80% 左右的患者就诊时已为晚期^[1], 失去手术机会。放疗和化疗成为这部分患者的主要治疗手段。而提高肺癌细胞对放射线的敏感性是提高肺癌治疗效果的关键所在。洛铂的抗肿瘤作用主要是通过形成 Pt-GG 和 Pt-AG 链内连接, 阻碍 DNA 的复制和转录过程, 从而干扰肿瘤细胞周期。洛铂的抗肿瘤效果与顺铂、卡铂的作用相当或者更好, 毒性作用与卡铂相同, 且与顺铂无交叉耐药性。

文献报道洛铂能抑制肺癌 A549 细胞增殖, 诱导细胞凋亡和细胞周期变化^[2], 在非小细胞肺癌荷瘤裸鼠抑瘤作用的实验研究中观察到了比顺铂更好的疗效^[3], 并有报道肯定了洛铂在非小细胞肺癌治疗中的临床疗效^[4-6]。而洛铂联合放疗是否有协同效果, 国内外尚未见报道。本研究 MTT 试验结果显示随药物浓度增加, 细胞增殖抑制作用越明显。细胞凋亡和细胞周期阻滞结果显示随洛铂浓度增加, 肺癌细胞进入 S 期比例增多, 而洛铂联合放疗将肺癌细胞阻滞于 G2/M 期, 而细胞处于 G2/M 期时最易被放射线杀伤^[7], 从而达到放疗增敏的效果。

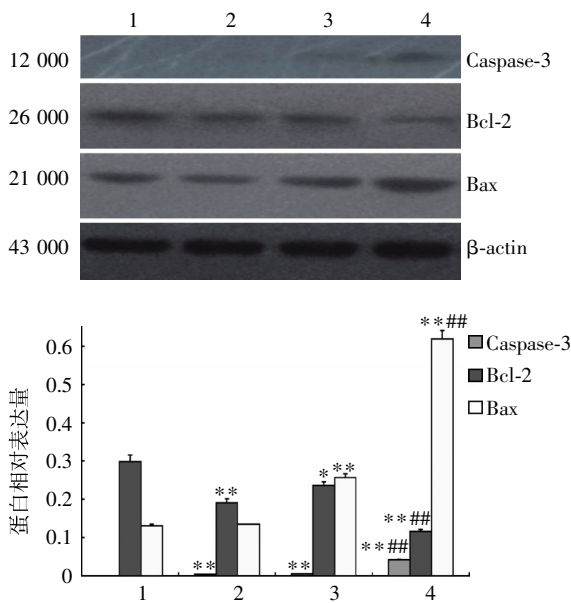
很多化疗药物都是通过诱导细胞凋亡发挥作用。其凋亡发生主要通过线粒体依赖途径和死亡受体途径调节。线粒体途径^[8]由 Bcl-2 家族调节, 使线

表 2 洛铂单用或与放疗联合应用对 A549 人肺癌细胞凋亡百分率的影响

Table 2 Apoptosis rate of A549 cell treated by lobaplatin combined with irradiation through FCM analysis (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡百分率
A549 细胞阴性对照组	5.61 ± 0.93
5 μmol/L 洛铂	13.30 ± 1.25**
⁶⁰ Co 4 Gy	8.27 ± 0.68*
5 μmol/L 洛铂+ ⁶⁰ Co 4 Gy	55.27 ± 1.06***#

与阴性对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与单用洛铂或单独放疗组比较,###*P* < 0.01。



1: 阴性对照细胞;2: 洛铂 5 μmol/L, 24 h; 3: ⁶⁰Co 4 Gy 放疗 24 h; 4: 洛铂 5 μmol/L 与 ⁶⁰Co 4 Gy 联合应用。与阴性对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与单独化疗或放疗组比较,###*P* < 0.01。

图 3 洛铂、⁶⁰Co 放疗及联合应用对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 3 Expression of Bcl-2 Bax and Caspase-3 protein in 549 cells treated by different regimen

粒体释放细胞色素 C 至胞浆,与凋亡蛋白酶活化因子-1 结合,使其分子结构改变来激活启动因子 Caspase-9,进而激活 Caspase-3 触发细胞凋亡。而死亡受体途径主要由细胞表面的死亡受体介导,如死亡受体 Fas 和其特异性配体 FasL 结合,在细胞膜表面发生聚合,形成的复合物与启动因子 Caspase-8 特异的结构域结合并使 Caspase-8 形成二聚体而自身激活,进而激活 Caspase-3 等效酶导致细胞凋亡。Bcl-2 家族是最重要的凋亡相关基因。Bcl-2 蛋白可增加细胞对抗促进凋亡的因素,包括放射线、热疗、化疗药物、糖皮质激素、P53 等的作用,延长细胞存活时间。Bax 与 Bcl-2 相反,可促进细胞凋亡,并可

与 Bcl-2 形成二聚体抑制 Bcl-2 的功能。Bcl-2/Bax 比例可能是决定细胞对凋亡刺激信号的敏感性的的重要因素^[9]。当 Bcl-2 高表达时,细胞免遭凋亡,反之细胞易于凋亡。Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的成员,是细胞凋亡的直接执行因子^[10]。本实验观察到洛铂联合放疗组 Bax 蛋白表达的增加和 Bcl-2 蛋白表达的减少,进一步支持了细胞凋亡和周期阻滞的增加可能是洛铂联合放疗诱导肺癌 A549 细胞凋亡的作用机制。

总之,洛铂联合放疗较单纯放疗和单纯洛铂更具有杀伤非小细胞肺癌 A549 细胞的作用,但洛铂联合放疗是否能在体内起到放疗增敏作用,有待下一步的研究。

[参考文献]

[1] 陈公琰. 晚期非小细胞肺癌维持治疗的新进展 [J]. 肿瘤研究与临床,2010,22(1):16-18

[2] 赵 珊,杨光磊,吕英谦,等. 洛铂对肺癌 A549 细胞作用的初步探讨[J]. 临床肿瘤学杂志,2011,16(1):14-18

[3] 秦叔逵,黄 勇,隋东虎,等. 不同铂类联合紫杉类或长春瑞滨对非小细胞肺癌荷瘤裸鼠抑瘤作用的实验研究 [J]. 临床肿瘤学杂志,2011,16(3):206-210

[4] 杨柳青,施 毅,秦叔逵,等. 洛铂联合长春瑞滨治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 临床肿瘤学杂志,2006,11(12):890-894

[5] 姜丽岩,韩宝惠,顾建庆,等. 洛铂联合诺维本与卡铂或顺铂联合诺维本治疗非小细胞肺癌的前瞻性临床研究 [J]. 中华临床医学实践杂志,2006,5(4):305-306

[6] 汪晓洁,寿 涛,陈 庆,等. 洛铂联合长春瑞滨治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察 [J]. 中国癌症杂志,2009,19(12):929-932

[7] Williams JR,Zhang Y,Zhou H, et al. Genotype-dependent radiosensitivity:clonogenic survival,apoptosis and cell-cycle redistribution [J]. Int J Radiat Biol,2008,84(2):151-164

[8] Li K, Li Y, Shelton JM, et al. Cytochrome C deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis[J]. Cell,2000,101(4):398-399

[9] Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, et al. Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. J Clin Oncol,2005,23(28):6976-6981

[10] Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response [J]. Nat Rev Cancer, 2005,5(3):231-237

[收稿日期] 2012-01-06