

· 基础研究 ·

伊立替康联合X线照射对人结肠癌细胞增殖和凋亡的影响

席栋宾¹, 张怀霞¹, 徐玉珩¹, 刘毅¹, 张延英^{2*}

¹酒泉市人民医院胃肠外科, 甘肃 酒泉 735000; ²甘肃中医药大学实验动物中心, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的:探讨伊立替康(CPT-11)联合X线照射对人结肠癌细胞系HCT-116增殖和凋亡的影响。方法:采用MTT法检测不同浓度CPT-11(10、20、30、40、50 μg/mL)作用24 h以及单次不同剂量X线(3、6、9、12、15 Gy)照射对HCT-116增殖的影响;根据实验结果设计对照组、照射组和联合处理组,通过克隆形成实验检测3组细胞的增殖情况;采用AO/EB染色观察3组细胞的凋亡情况;通过Western blot实验检测各组p53和p21蛋白的水平。结果:在10~50 μg/mL范围内,CPT-11对于HCT-116细胞增殖呈剂量依赖性抑制作用;经10 μg/mL的CPT-11预处理后,分别联合3、6、9、12、15 Gy X线照射,显示联合处理组增殖抑制率大于照射组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组和照射组相比,联合处理组的集落形成数量明显减少($P < 0.05$);联合处理组的p21和p53水平明显高于其余2组($P < 0.05$),且凋亡率也显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:伊立替康联合X线照射抑制人结肠癌细胞系HCT-116的增殖,并诱导凋亡,可能与p53和p21的激活有关。

[关键词] 结肠癌;伊立替康;细胞增殖;凋亡

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)01-049-05

doi:10.7655/NYDXBNS20210109

Effects of irinotecan combined with X-ray irradiation on proliferation and apoptosis of human colon cancer cells

XI Dongbin¹, ZHANG Huaixia¹, XU Yuheng¹, LIU Yi¹, ZHANG Yanying^{2*}

¹Department of Gastrointestinal Surgery, People's Hospital of Jiuquan City, Jiuquan 735000; ²Animal Center, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of irinotecan (CPT-11) combined with X-ray treatment on the proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line HCT-116. **Methods:** MTT method was used to detect the effects after treatment with different concentrations of CPT-11 (10, 20, 30, 40, 50 μg/mL) for 24 hours and single dose of X-ray (3, 6, 9, 12, 15 Gy) on the proliferation of HCT-116. The proliferation rates of the three groups of cells were detected by clone formation assay, the apoptosis of the three groups was observed by AO/EB staining, and the levels of p53 and p21 protein were detected by Western blot. **Results:** CPT-11 inhibited the proliferation of HCT-116 cells in a dose-dependent manner in the range of 10~50 μg/mL. After pretreatment with CPT-11 at 10 μmol/L, combined 3, 6, 9, 12 and 15 Gy X-ray irradiation showed that the inhibition rate of proliferation in the combined treatment group was higher than that in the irradiation group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); compared with the control group and the irradiation group, the combined treatment group had a dose-dependent inhibition effect on the proliferation of HCT-116 cells. The number of colony formation decreased significantly ($P < 0.05$); the levels of p21 and p53 in the combined treatment group were significantly higher than those in the other two groups ($P < 0.05$), and the apoptotic rate also increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Irinotecan combined with X-ray irradiation inhibits the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cell line HCT-116, which may be related to the activation of p53 and p21.

[Key words] colon cancer; irinotecan; cell proliferation; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(01):049-053]

[基金项目] 中央引导地方科技发展专项

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 1360599656@qq.com

结直肠癌是世界上最常见的癌症之一,也是与癌症相关死亡的第二大原因^[1]。近年来,尽管发达国家的结直肠癌发病率已开始下降,但发展中国家的结直肠癌发病率仍保持急剧上升的态势^[2]。外科手术是目前结直肠癌的主要治疗手段,但术后往往因发生转移或复发而影响预后^[3-4]。远处转移是导致结直肠癌患者死亡的主要原因,肝脏是结直肠癌患者最常见的转移位点^[1]。辅助化疗可以降低术后复发率和转移率、提高患者的长期生存率。伊立替康(CPT-11)是一种选择性拓扑异构酶 I 抑制剂,临床上广泛应用于肿瘤治疗,包括转移性结直肠癌复发患者以及恶化病例的治疗。有研究报道,CPT-11可抑制食管癌 EC109 细胞增殖并具有放射增敏作用^[5],而有关伊立替康联合 X 线的联合应用对人结肠癌细胞系 HCT-116 的作用研究尚未曾报道,故本研究探讨 CPT-11 对人结肠癌细胞系体外增殖以及放射敏感性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

HCT-116 细胞购自中国科学院上海细胞所,CPT-11、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、普通 RIPA 裂解液和 AO 染色液均购自北京索莱宝科技有限公司,RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,兔抗 p53、p21 及内参 GAPDH 抗体购自美国 Immunoway 公司;CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo Forma 公司,酶标仪购自美国 BIO-RAD 公司,全自动蛋白质印迹定量分析系统购自美国 Protein Simple 公司,荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 HCT-116 细胞的体外培养及传代

HCT-116 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,加入 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,于 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中传代培养。用倒置显微镜观察细胞生长状况,每 3 d 传代 1 次,选对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 实验

常规消化对数期细胞后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制单细胞悬液,以每孔 2 000 个细胞密度接种到 96 孔板,每孔体积为 200 μL。贴壁后,用不同浓度 CPT-11(10、20、30、40、50 μg/mL)作用 24 h 或单次不同剂量 X 线(3、6、9、12、15 Gy)照射,每个剂量组 3 个复孔。继续培养 48 h,每孔加入

20 μL MTT 溶液,继续孵育 4 h,终止培养。每孔加 150 μL DMSO 并振荡 10 min。在酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度值。细胞增殖抑制率=(1-实验组吸光度/对照组吸光度)×100%。

1.2.3 克隆形成实验

常规消化对数期细胞后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制单细胞悬液,以每孔 1 000 个细胞密度接种到 6 孔板,每孔体积为 200 μL。贴壁后,6 Gy X 线照射(照射组)或预先用 10 μg/mL 浓度 CPT-11 作用 24 h 后联合 6 Gy X 线照射(联合处理组),继续培养 10 d 后,加入 5 mL 甲醇固定 10 min。加入适量 0.1% 结晶紫染色 15 min,在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。计算公式为:克隆形成率=(克隆形成平均数/接种细胞数)×100%。实验重复 3 次。

1.2.4 蛋白提取和全自动蛋白表达定量分析

常规收集 3 组细胞,并用预冷 PBS 洗 1 遍,每瓶细胞加入 200 μL RIPA 裂解液于冰上裂解 10 min。将裂解后的样品 12 000 g 离心 5 min,取上清,BCA 法测蛋白浓度。按照 Wes 标准流程上机检测,终浓度为 1 mg/mL。

1.2.5 AO/EB 实验

常规消化对数期细胞后,接种到 6 孔板。贴壁后,6 Gy X 线照射(照射组)或预先用 10 μg/mL 浓度 CPT-11 作用 24 h 后联合 6 Gy X 线照射(联合处理组)。继续培养 24 h 后,加入 5 mL 甲醇固定 10 min。加入 AO/EB 工作液,室温避光染色 20 min,倒置荧光显微镜下计数并拍照。吖啶橙可透过正常细胞膜,故细胞核呈绿色荧光;对于凋亡细胞,因染色质固缩或断裂形成凋亡小体,表现为黄绿色荧光。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两组细胞增殖率比较采用广义线性模型分析,以剂量作为自变量,试验组别作为分组因素,剂量和组别的乘积作为交互因素,对不同试验组别得到的两条直线的斜率进行比较,若交互项有统计学意义,说明自变量剂量对结果变量细胞增殖率的影响在不同组别中有差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPT-11 对 HCT-116 细胞增殖的抑制作用

采用 MTT 法检测 10~50 μg/mL 的 CPT-11 作用

HCT-116 细胞后的增殖情况,结果显示在此范围内呈剂量依赖性抑制细胞增殖(图1)。根据以往的研究,CPT-11对HCT-116细胞的 IC_{20} 为 $9.64 \mu\text{g/mL}$,为避免CPT-11的毒性作用,本实验选择 $10 \mu\text{g/mL}$ 进行后续研究。

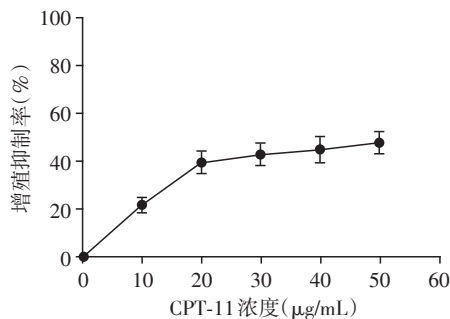


图1 不同浓度CPT-11对HCT-116细胞增殖的抑制作用
Figure 1 Inhibitory effect of different concentrations of CPT-11 on proliferation of HCT-116 cells

2.2 单次不同剂量X线照射对HCT-116细胞增殖的影响

对于经 $10 \mu\text{g/mL}$ CPT-11预处理24 h的HCT-116细胞和对照HCT-116细胞分别给予3、6、9、12、15 Gy X线照射,恢复24 h后,采用MTT法检测细胞增殖情况,发现联合处理组增殖抑制率大于照射组,差异有统计学意义($F=55.34, P < 0.001$)。随着照射剂量的增加,联合处理组的增殖抑制作用更加明显,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

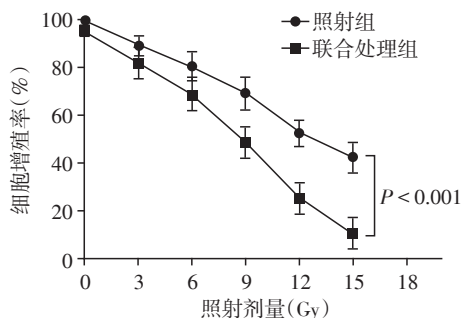


图2 不同剂量X线照射对HCT-116细胞增殖的影响
Figure 2 Effect of different doses of X-ray irradiation on proliferation of HCT-116 cells

2.3 CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞克隆形成的影响

通过克隆形成实验,检测对照组、照射组和联合处理组集落形成情况,结果与对照组相比,照射组和联合处理组的集落形成数量都明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);且联合处理组的集落形成数量少于照射组($P < 0.05$,图3)。

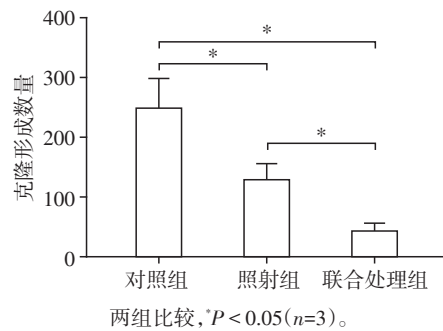


图3 CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞克隆形成的影响
Figure 3 Effect of CPT-11 combined with X-ray irradiation on colony formation of HCT-116 cells

2.4 CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞凋亡的影响

与对照组相比,照射组和联合处理组的凋亡率均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且联合处理组的凋亡率更高,明显大于照射组($P < 0.05$,图4)。

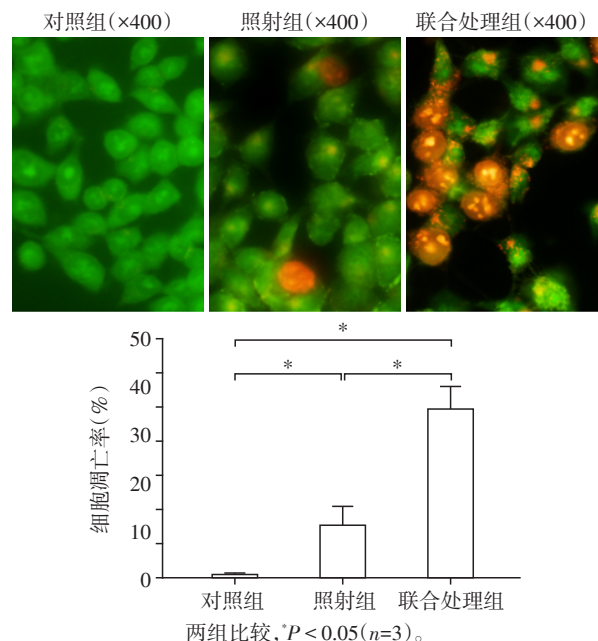


图4 CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞凋亡的影响
Figure 4 Effect of CPT-11 combined with X-ray irradiation on apoptosis of HCT-116 cells

2.5 CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞p21、p53表达的影响

X线照射后,恢复6 h,与对照组相比,照射组和联合处理组的p21和p53蛋白均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且联合处理组的p21和p53蛋白水平高于照射组($P < 0.05$,图5)。

3 讨论

CPT-11是喜树碱(camptothecin, CPT)的一种

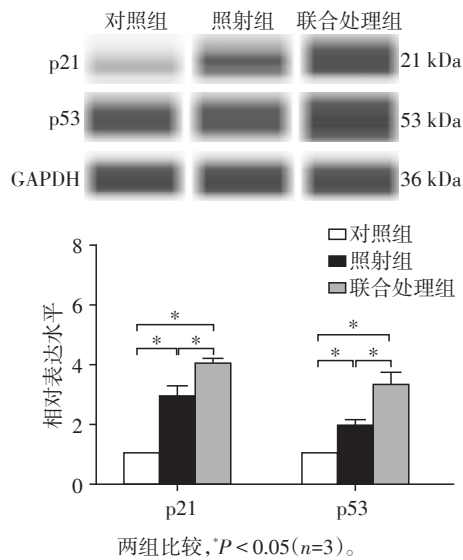


图5 CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞p21、p53表达的影响

Figure 5 Effect of CPT-11 combined with X-ray irradiation on the expression of p21 and p53 in HCT-116 cells

水溶性半合成衍生物。因为CPT-11的广泛抗肿瘤活性,临床上用于肺癌、胃癌、卵巢癌和淋巴瘤等多种肿瘤的治疗^[6]。在DNA复制以及转录过程中,其通过与拓扑异构酶-1(Topo-1)结合,共同形成DNA Topo-1复合物。在此过程中,CPT-11及活性代谢产物(SN-38)可以通过与该复合物结合,从而阻断DNA复制而达到抗肿瘤作用^[7-8]。目前,CPT-11已获批用于转移性结直肠癌的辅助治疗,而以往的多项研究也发现其联合放疗时能增加放疗效果^[5,9-11]。在伊立替康联合放疗治疗小细胞肺癌脑转移患者的报道中,其可显著降低患者的病死率,改善患者的生存状况^[11],并且该治疗方法的有效性和安全性均较高,可有效提高疾病控制率,减少不良反应,提高患者的耐受程度。此外,CPT-11可有效抑制放疗早期宫颈癌细胞的增殖,提高放疗诱导的癌细胞凋亡率,结果显示宫颈肿瘤50%消退时间明显缩短,肿瘤体积缩小^[9]。大多数放疗增敏剂的作用机制是,通过抑制细胞增殖并诱导凋亡来增强放射线对细胞的杀伤作用,故本研究进一步探讨CPT-11联合X线照射对人结肠癌细胞HCT-116增殖和凋亡的影响。

CPT-11的主要不良反应是骨髓抑制和胃肠道不良反应,呈剂量依赖性,严重的腹泻反应限制了其临床应用。本研究结果显示,在10~50 μg/mL范围内,CPT-11呈浓度依赖的方式抑制HCT-116细胞

增殖,与以往研究报道一致。为进一步研究CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞的放疗增敏效果,本研究选择10 μg/mL的CPT-11处理,约为CPT-11对HCT-116细胞的IC₂₀浓度,毒性较轻。在MTT实验和克隆形成实验中,与对照组和照射组相比,联合处理组增殖率明显提高,且随着照射剂量的增加,联合处理组的增殖抑制作用更加明显。CPT-11在较低浓度下即具有增殖抑制和放疗增敏作用,提示其临床应用中可采用低浓度CPT-11联合X线照射来提高结直肠癌的治疗效果,既可以减轻不良反应,还可以减轻患者负担、提高生存率。

放射治疗引起肿瘤细胞DNA损伤进一步引起凋亡,是肿瘤治疗的基本策略。为进一步研究CPT-11联合X线照射对HCT-116细胞凋亡的影响,AO/EB染色结果显示联合处理组细胞凋亡率显著提高,Western blot检测其p21和p53蛋白水平也高于照射组,进一步提示应用CPT-11可增加HCT-116对X线照射的敏感性,诱导其凋亡。p53是细胞内重要的抑癌基因,广泛参与DNA损伤修复、细胞周期调控和凋亡等过程,对维持基因组的完整性和稳定性至关重要^[12]。本研究中,HCT-116细胞接受电离辐射及CPT-11处理后时,p53能被迅速激活进而促进多种重要下游靶基因如p21的激活,从而促进凋亡的发生。

综上所述,CPT-11可抑制食管癌HCT-116细胞增殖并具有放疗增敏作用,同时诱导凋亡,为临床上结肠癌的治疗提供一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] HUR K, TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, et al. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer[J]. Gut, 2017, 66: 654-665
- [2] ZEUNER A, TODARO M, STASSI G, et al. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic[J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(6): 692-705
- [3] 王征,周志祥. 结直肠癌综合治疗的个体化原则[J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 28(1): 1-5
- [4] 武雪亮,王立坤,薛军,等. Id-1和MMP-9在结直肠癌中的表达及与临床病理因素的关系[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(9): 1089-1094
- [5] 欧阳玉秀,徐智健,叶奕菁,等. 伊立替康对食管癌细胞放疗增敏作用及核因子κB活性的影响研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21(11): 961-966
- [6] 张依宁,魏敏杰,孙明军,等. 伊立替康抑制人结肠癌细胞增殖和ATP敏感性钾通道的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(1): 10-13

- [7] 张程亮,高静,沈倩,等.预防和治疗伊立替康所致腹泻的研究进展[J].中国药学杂志,2010,45(22):1704-1707
- [8] 张明,时建明,余蓉,等.周剂量伊立替康挽救治疗草酸铂治疗失败的转移性结直肠癌[J].南京医科大学学报(自然科学版),2008,28(2):108-109
- [9] 宋颖秋,伍钢,李贵玲,等.伊立替康增敏对宫颈癌放疗中细胞凋亡和增殖及VEGF表达的影响[J].中国肿瘤临床与康复,2008,15(5):401-404
- [10] 田晓刚,赵林,王小虎.伊立替康联合同期放疗治疗局部晚期宫颈癌放射增敏的临床研究进展[J].甘肃医药,2014,33(11):845-847
- [11] 闫睿.伊立替康联合放疗在小细胞肺癌脑转移治疗中的效果观察[J].中国现代医生,2015,53(21):63-65
- [12] 尹钰,张秀园,令吉明,等.ZNF331过表达对结肠癌细胞增殖与凋亡的影响[J].军事医学,2018,42(248):41-46

[收稿日期] 2019-06-06

(上接第15页)

- ney organoids from human pluripotent stem cells[J]. Nat Protoc,2016,11(9):1681-1692
- [7] WU H, UCHIMURA K, DONNELLY E, et al. Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single cell transcriptomics[J]. Cell Stem Cell,2018,23(6):869-881
- [8] 王维东,万博文,周灵杰,等.PTH通过Notch信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[J].南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(11):1517-1521
- [9] LAM A Q, FREEDMAN B S, MORIZANE R, et al. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers[J]. J Am Soc Nephrol,2014,25(6):1211-1225
- [10] MORIZANE R, LAM A Q. Directed differentiation of pluripotent stem cells into kidney[J]. Biomark Insights,2015,10(Suppl 1):147-152
- [11] LAM A Q, FREEDMAN B S, BONVENTRE J V. Directed differentiation of pluripotent stem cells to kidney cells[J]. Semin Nephrol,2014,34(4):445-461
- [12] MORIZANE R, BONVENTRE J V. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells[J]. Nat Protoc,2017,12(1):195-207
- [13] YAMAGUCHI S, MORIZANE R, HOMMA K, et al. Generation of kidney tubular organoids from human pluripotent stem cells[J]. Sci Rep,2016,6(2):224-232
- [14] PRZEPIORSKI A, SANDER V, TRAN T, et al. A simple bioreactor-based method to generate kidney organoids from pluripotent stem cells[J]. Stem Cell Reports,2018,11(2):470-484
- [15] NAM S A, SEO E, KIM J W, et al. Graft immaturity and safety concerns in transplanted human kidney organoids[J]. Exp Mol Med,2019,51(11):1-13
- [16] VAN DEN BERG C W, RITSMA L, AVRAMUT M C, et al. Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney organoids induces neo-vasculogenesis and significant glomerular and tubular maturation *in vivo* [J]. Stem Cell Reports,2018,10(3):751-765
- [17] BANTOUNAS I, RANJZAD P, TENGGU F, et al. Generation of functioning nephrons by implanting human pluripotent stem cell-derived kidney progenitors[J]. Stem Cell Reports,2018,10(3):766-779

[收稿日期] 2020-03-11