

表柔比星 + 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂对 人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响

周 丽, 李青山

【摘要】 目的 观察表柔比星、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶(5-FU) 三种药物联合对人肝癌细胞株 HepG2 生长的影响,并探讨其可能发生的机制。方法 设立空白对照组、表柔比星组、5-FU + 奥沙利铂组、表柔比星 + 奥沙利铂 + 5-FU 组。经 MTT 实验方法确认各药物 48 h 的 IC_{50} 做为联合用药的浓度分别为表柔比星(3.44 $\mu\text{mol/L}$)、5-FU(1.76 mmol/L)、奥沙利铂(6.89 mmol/L)。实时荧光定量 PCR 实验方法测定各组间 Bcl-2 基因、Bax 基因表达的变化,Western blot 实验方法测定各组间 Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白表达的变化。结果 各用药组均抑制 HepG2 细胞增殖、诱导细胞凋亡、增加 Bax mRNA 及 Bax 蛋白的表达,同时降低 Bcl-2 mRNA 及 Bcl-2 蛋白的表达,且表柔比星 + 奥沙利铂 + 5-FU 组的作用优于表柔比星组、奥沙利铂 + 5-FU 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 表柔比星 + 奥沙利铂 + 5-FU 组能够明显抑制 HepG2 细胞的增殖,其联合作用可能通过促进 Bax 基因的表达,抑制 Bcl-2 基因的表达,从而加速肿瘤细胞的凋亡。

【关键词】 表柔比星; HepG2; 肝癌; 凋亡

【中图分类号】 R 735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1006-4761(2014)06-0474-03

Effects of epirubicin combined with 5-fluorouracil and oxaliplatin on proliferation and apoptosis of human hepatoma HepG2 cells (ZHOU Li, LI Qing-shan. Chengde Medical College Hospital, Chengde 067000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of oxaliplatin combined with epirubicin and fluorouracil on proliferation and apoptosis of human hepatocarcinoma cell line HepG2 and its possible mechanism. **Methods** The HepG2 cells were divided into the blank control group, epirubicin group, 5-fluorouracil + oxaliplatin group and epirubicin combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil group. To confirm the drug IC_{50} was confirmed by MTT assay after with treatment by MTT assay. The concentration is respectively epirubicin(3.44 mol/L), 5-fluorouracil(1.76 mmol/L) and oxaliplatin(6.89 mmol/L). The changes of Bcl-2 and Bax gene expression was measured by the assay of real-time fluorescent quantitative PCR. The changes of Bax, Bcl-2 protein expression was measured by Western blot method. **Results** The treatment group could inhibit the proliferation of HepG2 cells and promote its apoptosis. The Bax mRNA and Bax protein expression were increased while Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein expression was decreased in HepG2 cells. The curative effect of epirubicin combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil group is better than those of epirubicin and oxaliplatin + fluorouracil group and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Epirubicin combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil group could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells.

【Key words】 Epirubicin; HepG2; Hepatocellular carcinoma; apoptosis

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤,发病率较高,早期无症状或症状不明显,但其进展迅速,确诊时大多数患者已经到局部晚期或发生远处转移,治疗困难,预后很差。近年来,随着新一代化疗药物的上市以及联合化疗方案的推出,肝癌的系统性化疗已逐渐受到重视。多项临床研究结果均提示^[1-2]: 5-氟尿嘧啶 + 奥沙利铂为主的 FOLFOX4 化疗方案,治疗肝癌的客观有效率有所提高,能够在一定程度控制病情发展,延长患者生存期。表柔比星已用于多种恶性肿瘤的治疗,其联合 5-氟尿嘧啶及奥沙利铂治疗肝癌是否能达到协同或相加的作用,其联合的机制及最适宜的方案需要在临床试验前进行系统的研究。因此,我们选用表柔比星联合 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂化疗探索治疗肝癌的新思路,为进一步的临床应用提供理论依据。

【基金项目】河北省中医药管理局科研计划项目(2012136)

【作者单位】河北省承德市承德医学院附属医院,承德 067000

【通讯作者】李青山。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞株 HepG2 细胞购自上海美轩生物科技有限公司。培养传代于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,选择对数生长期细胞进行试验。表柔比星购自浙江海正药业股份有限公司、用生理盐水稀释,5-氟尿嘧啶购自上海旭东海普药业有限公司,奥沙利铂(L-OHP)购自江苏恒瑞医药股份有限公司,三种药物都于 -20°C 保存,实验用时稀释。噻唑蓝(MTT,分析纯产品)、二甲基亚砜(DMSO,分析纯产品)。兔抗人 Bcl-2 及 Bax 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。DMEM 培养基购自 Thermo 公司、0.25% 胰蛋白酶消化液购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司;青霉素和链霉素购自华北制药有限公司。RT-PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HepG2 细胞接种于 10% 灭活胎牛血清的高糖 DMEM 培

养液中,置 37℃,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中,1~2 d 用 0.25% 胰酶消化传代,取处于对数生长期细胞分组进行实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

实验设定四组,分别为:空白对照组、表柔比星组、5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组、表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组。取 HepG2 细胞 2×10^5 /mL 接种于 96 孔板培养,待细胞贴壁后,按实验分组,分别培养 24、48 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μ L。4 h 后,吸尽各孔培养液,每孔加 DMSO 200 μ L,轻轻震荡 10 min 后,用酶标仪检测 490 nm 处各孔吸光度 A 值,计算细胞抑制率。细胞抑制率(%) = (1 - 实验组各孔平均 A 值/正常对照组各孔平均 A 值) $\times$ 100%,实验重复 3 次。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 Bcl-2 mRNA 及 Bax mRNA 表达

培养 48 h 后 Trizol 法提取总 RNA。取 500 ng 的 RNA,按试剂盒 DRR037A 说明书逆转录合成 cDNA。引物探针由上海基康生物技术有限公司设计并合成。Bcl-2 上游引物: 5'-GGATGCCTTTGTGGAAGTGT-3'; 下游引物: 5'-AGCCTG-CAGCTTTGTTTCAT-3'; Bax 上游引物: 5'-TTTGCT-TACAGGTTTCATCC-3'; 下游引物: 5'-CAGTTGAAGTTGC-CGTCAGA-3'; β -Actin 上游引物: 5'-AGAGCTACGAGCTGC-CTGAC-3'; 下游引物: 5'-AGCACTGTGTTGGCTACAG-3'; 荧光定量 PCR 反应体系及条件参照 SYBR Premix ExTaq™ 说明书。数据采用 LightCycler 480 Software 分析。

1.2.4 western blot 法检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达

细胞经上述四个分组加药处理后,消化收集细胞,加入细胞裂解液 100 μ L (20 mmol/L Tris-HCl, pH 值 7.4; 150 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 50 μ g/mL 亮氨酸, 1 mmol/L PMSF) 后,于 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。等量样品 (30 μ g/mL) 经 12.5% SDS-PAGE 胶分离蛋白质,分离后的蛋白质转到硝酸纤维膜上。加上一抗过夜,再加入二抗。洗膜后加入 ECL 化学显影剂, X 光片曝光显示结果。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS17.0 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 SNK 或 LSD 检验法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组药物对 HepG2 细胞增殖的影响

先筛选出各药物 48 h 的 IC₅₀ 做为联合用药的浓度分别为:表柔比星、5-FU 及奥沙利铂的 IC₅₀ 分别为 3.44 μ mol/L, 1.76 mmol/L, 6.89 mmol/L。MTT 结果显示,四个不同分组的细胞药物分别处理 48 h 后,各组的抑制率分别为 14.87% (表柔比星组)、27.20% (5-FU + 奥沙利铂组)、29.77% (表柔比星 + 5-FU + 奥沙利铂组),差异有明显统计学意义 ($F = 120.198$, $P < 0.001$)。与空白对照组比较,表柔比星组、5-FU + 奥沙利铂组、表柔比星 + 5-FU + 奥沙利铂组的 OD 值均降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),说明三组药物均能抑制了肝癌细胞的增殖;而表柔比星 + 5-FU + 奥沙利铂组 OD 值最低,5-FU + 奥沙利铂组的 OD 值次之,说明表柔比星 +

5-FU + 奥沙利铂增加了 5-FU + 奥沙利铂对肝癌细胞增殖的抑制率。(空白对照组、表柔比星组、5-FU + 奥沙利铂组比较差异具有统计学意义 ($F = 120.198$, $P < 0.001$))

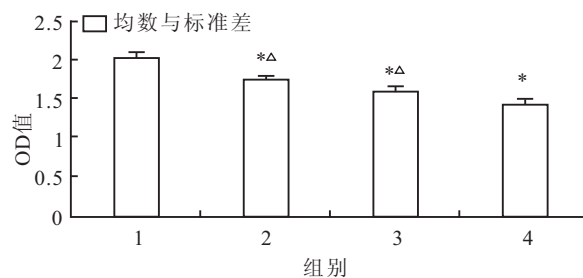


图1 各组药物干预肝癌细胞 HepG2 48h 后对细胞增殖的影响:随着药物的联合作用,对肝癌细胞 epG2 细胞增殖的抑制作用越强,表柔比星 + 5-FU + 奥沙利铂组的 OD 值最低。

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与表柔比星 + 5-FU + 奥沙利铂组比较,Δ $P < 0.01$ 。1:空白对照组;2:表柔比星;3:5-FU + 奥沙利铂;4:表柔比星 + 5-FU + 奥沙利铂

2.2 各组 Bcl-2、Bax mRNA 表达比较(表 1)

表柔比星组、5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组、表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组较空白对照组 Bcl-2 mRNA 表达均降低 ($F = 27.392$, $P < 0.001$)、Bax mRNA 均升高 ($F = 70.490$, $P < 0.001$),其中 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组较表柔比星组 Bcl-2 mRNA 降低 ($P < 0.01$)、Bax mRNA 增高 ($P < 0.01$),而表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组较 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组的 Bcl-2 mRNA 降低,其 Bcl-2 mRNA 最低 ($P < 0.01$);较 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组的 Bcl-2 mRNA 升高,其 Bcl-2 mRNA 最高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的比较

组别	Bcl-2 ($\bar{x} \pm s$) ($\times 10^{-3}$)	Bax ($\bar{x} \pm s$) ($\times 10^{-3}$)
空白对照	1.1565 $\pm$ 0.2725	1.0028 $\pm$ 0.0360
表柔比星	0.7498 $\pm$ 0.0385 *Δ	3.9089 $\pm$ 0.0108 *Δ
5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂	0.5355 $\pm$ 0.0528 *Δ	5.9560 $\pm$ 0.0358 *Δ
表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂	0.3103 $\pm$ 0.0252 *	7.581 $\pm$ 0.0616 *

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与沙利度胺联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组比较,Δ $P < 0.01$

2.3 表柔比星和 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂对肝癌 HepG2 细胞蛋白表达的影响(图 2) western blot 检测显示,予以空白对照组、表柔比星组、5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组、表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组四个分组药物干扰后,随着药物的联合,Bcl-2 蛋白表达逐渐增高,差异有统计学意义 ($F = 816.418$, $P < 0.001$)。表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组 Bcl-2 蛋白表达最高,差异有统计学意义 ($F = 62.916$, $P < 0.001$)。表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组 Bax 蛋白表达最低。

3 讨论

肝癌起病隐匿,早期常无症状,发现时多数属于晚期患

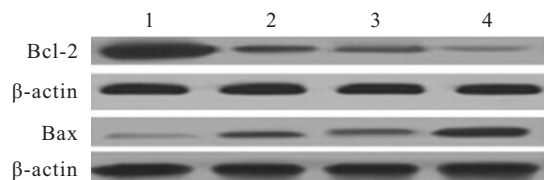


图2 用药物预处理 HepG2 细胞株后,三种药物联合组 Bcl-2 蛋白的表达明显最少、Bax 蛋白的表达明显最高

1: 空白对照组; 2: 表柔比星组; 3: 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组; 4: 表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组

者,手术切除率较低,预后差,严重威胁人类的生命健康^[3-4]。目前肝癌的治疗主要以手术切除为主,放疗、化疗、靶向治疗等方法效果不满意,这主要与肝癌侵袭转移的生物学特性有关。因此在包括化学治疗在内的综合治疗是当前肝癌治疗的研究方向。现今肝癌的化疗基本方案为 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂,其主要是通过抑制酶的活性、组织 DNA 的合成及阻滞细胞周期、促进细胞凋亡而发挥细胞毒性作用^[5]。但同时存在不良反应多、疗效有限等缺陷,寻找一种能提高疗效又减少不良反应的药物是目前国内外研究的热点。

奥沙利铂为铂络合物类抗癌药物,其第三代铂类衍生物,通过产生烷化络合物作用于 DNA,形成链内和链间交联,从而抑制肿瘤细胞的 DNA 合成和复制。据有关报道^[6],该药与传统化疗药物氟脲嘧啶具有联合协同作用,可提高杀灭肿瘤细胞的效果。表柔比星又叫表阿霉素,是较新的蒽醌类抗肿瘤药,与多柔比星相比,表柔比星在氨基糖部分 4 位的羟基由顺式变成了反式,具有广谱高效的优点,它的毒副作用较柔红霉素和阿霉素低,所以目前在临床上被广泛使用,为同类药物的首选^[7]。它的主要作用机制是:直接插入到 DNA 相邻的碱基对之间,与 DNA 双螺旋形成可逆的结合,干扰转录过程,从而抑制 DNA 和 RNA 的合成,达到治疗肿瘤的目的^[8]。表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂是胃癌常用的化疗方案,朱晓东等^[9]应用此方案对晚期胃癌作了评估。研究结果显示此方案相比其他化疗方案具有很高的有效率,近期疗效好,且具有良好的耐受性,毒性反应低。

本实验中,MTT 检测法显示,与空白对照组对比,表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂三药联合组在单药表柔比星组及 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂两药联合组对肝癌细胞的增殖的抑制作用最强,肝癌细胞的凋亡率最高。细胞凋亡 (Apoptosis) 是机体的一种主动、程序化的生理过程,受体内多种因素调节,是细胞衰老、死亡过程的主要形式。而肿瘤发生 (Tumorigenesis) 不仅由原癌基因激活和 (或) 抑癌基因失活引起,而且与细胞凋亡过程的紊乱密切相关^[10]。Bcl-2 家族是迄今为止研究较为透彻的原癌基因家族,Bax 和 Bcl-2 为其中 2 个重要的凋亡相关基因,通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡^[11]。目前,大部分学者认为细胞内 Bax 与 Bcl-2 比值大小决定细胞受刺激后是凋亡还是存活。当

细胞 Bcl-2 含量较多时,Bcl-2 和 Bax 的异源二聚体增多,凋亡趋势减弱;反之则 Bax 本身形成的同源二聚体占主导,易于发生凋亡。杨闯等研究结果显示,Bcl-2 蛋白在肝细胞癌中高表达,Bax 蛋白在肝癌组织中表达较低^[12]。本实验中荧光定量 PCR 法显示,四组用药组与空白对照组相对比,表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组比单药表柔比星组及 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂两药联合组中的 Bcl-2 mRNA 表达最低、Bax mRNA 表达最高;Western blot 检测法结果也显示,与空白对照组相对比,表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂组比单药表柔比星组及 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂两药联合组的 Bcl-2 蛋白表达最低、Bax 蛋白表达最高,可能也上述直接插入到 DNA 的碱基对,与 DNA 双螺旋结合,干扰转录过程有关。

本研究结果显示表柔比星联合 5-氟脲嘧啶 + 奥沙利铂能够明显抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖,通过促进 Bax 的表达,抑制 Bcl-2 表达加速肿瘤细胞的凋亡,为原发性肝癌临床应用提供了可靠的理论依据。

参考文献

- 1 Qin S, Bai Y, Ye S, et al. Phase III study of oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin (Folfox4) versus doxorubicin as palliative systemic chemotherapy in advanced HCC in Asian patients. J Clin Oncol 2010, 28(15 Suppl): 4008
- 2 杨柳青,秦叔逵,赵宁莉,等. FOLFOX4 方案治疗中晚期原发性肝癌的临床研究. 临床肿瘤学杂志 2013, 18(2): 108-113
- 3 熊奇如,夏俊,李立祥,等. 脂氧化酶抑制剂对肝癌细胞株 HepG2 增殖及 MEK/ERK 信号通路的影响. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(1): 1-5
- 4 许小兵,张晓华,杨妙芳,等. PTPeta 介导生长抑素对 SMMC7721 生长抑制作用的实验研究. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(11): 1222-1226
- 5 周香,游涛,王维明,等. 姜黄素联合 5-FU + 奥沙利铂诱导胃癌细胞发生凋亡及其机制研究. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(6): 810-813
- 6 陈晓,何敏洁. TACE 联合 CIK 治疗原发性肝癌方案分析. 西部医学, 2012, 24(9): 1686-1688
- 7 王晓晖. 中药抗肿瘤作用机理及临床应用. 实用中医内科杂志, 2013, 2(16): 126-127
- 8 贺云龙,赵春波,鄂明艳,等. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤作用机制的研究进展. 现代生物医学进展, 2013, 17: 3397-3400
- 9 朱晓东,王碧云,曹军宁,等. 表柔比星、奥沙利铂、氟脲嘧啶联合治疗晚期胃癌的疗效及安全性评价. 中国癌症杂志, 2006, 16(5): 367-373
- 10 阮军,缪李丽. 凋亡素与肿瘤细胞的凋亡的研究进展. 中国药房, 2014, 25(1): 82-85
- 11 Deng W, Aimone BJ, Gage HF. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory. Nat Rev Neurosci 2010, 11(5): 339-350
- 12 杨闯,魏振彤. 肝癌中 Bcl-2、Bax 和 C-myc 基因的表达及其临床意义. 中国老年学杂志, 2009, 29(4): 450-451.

(本文编辑 赵义军)