

FOLFOX 方案联合沙利度胺体外抑制人肝癌 HepG2 细胞 VEGF、Caspase-3 基因表达的研究

孙媛 李青山*

摘要 目的 研究沙利度胺联合 FOLFOX(folinic acid fluorouracil oxaliplatin)作用肝癌细胞 HepG2 后 VEGF、Caspase-3 的表达,以及探讨沙利度胺联合 FOLFOX 诱导 HepG2 细胞凋亡的机制。方法 应用 MTT 法和流式细胞仪体外研究沙利度胺对 HepG2 细胞增殖的影响;采用 western blot 法,观察沙利度胺联合 FOLFOX 作用 HepG2 细胞 48h 后 VEGF、Caspase-3 的表达情况。结果 沙利度胺对肝癌 HepG2 细胞有抑制作用,且沙利度胺联合 FOLFOX 显著提高了对肝癌细胞生长的抑制作用,沙利度胺联合 FOLFOX 作用于 HepG2 细胞 48h 后,细胞表面 Caspase-3 的表达均增强,VEGF 的表达均降低。结论 沙利度胺联合 FOLFOX 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的机制可能通过调节 VEGF 蛋白表达激活 caspase-3,从而诱导 HepG2 细胞凋亡。

关键词 沙利度胺;肝癌 HepG2 细胞;血管内皮生长因子;Caspase-3

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号 1007-9564(2015)02-0289-04

DOI 编码 10.11723/mtgyyx 1007-9564 201502036

INHIBITORY ACTION OF FOLFOX PLAN JOINT GILAD AMINE ON VEGF, CASPASE 3 GENE EXPRESSION OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA HEPG2 CELLS IN VITRO Sun Yuan, Li Qingshan. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Abstract Objective To reasearch VEGF, Caspase-3 expressions in HepG2 cells treated by thalidomide combined folinic acid fluorouracil oxaliplatin(FOLFOX), and to explore preliminary apoptosis mechanism induced by thalidomide combined FOLFOX. **Methods** HepG2 cell growth inhibition and apoptosis was assessed by MTT and FMC respectively; The expressions of VEGF, Caspase-3 were detected by western blot. **Results** The effects of thalidomide on hepatocellular carcinoma HepG2 cells were inhibited, and thalidomide combined with FOLFOX significantly increased the inhibitory effect on the growth of hepatocellular carcinoma cells. Induced by thalidomide combined with FOLFOX after 48h, expression of HepG2 cells surface Caspase-3 was enhanced, but VEGF expression was decreased. **Conclusion** The mechanism of thalidomide combined with FOLFOX induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells may activate caspase-3 by regulating the expression of VEGF protein, which induces apoptosis in HepG2 cells.

Key words Thalidomide; Hepatocellular carcinoma HepG2 cells; VEGF; Caspase-3

原发性肝癌(hepatocelhlar carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,其病因和发病机制尚未完全阐明。全世界每年约有 25 万人死于此病,其中 40% 发生在我国。肝癌预后普遍很差,即使进行手术治疗,术后 5 年生存率也只有 25%~29%。目前仍无标准有效的化疗治疗方案。奥沙利铂(草酸铂, L-OHP)是继顺铂和卡铂之后的第三代铂类抗癌药,其疗效更好,毒性更低,药学特性得到了改善,扩大了抗癌谱,在肺癌、卵巢癌和胃癌的治疗中也得到了广泛应用^[1-3]。氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)属经典的抗代谢类肿瘤化疗药,广泛用于恶性肿瘤的治

疗,目前仍然是治疗原发性肝癌的主要药物之一。5-Fu 联合奥沙利铂的化疗方案成为 FOLFOX(folinic acid fluorouracil oxaliplatin)方案,其在临床中广泛用于肝癌治疗。Aydogan 等^[4]的研究显示沙利度胺治疗可降低豚鼠视网膜缺血/再灌注损伤中 VEGF 的水平。体外试验也证实了沙利度胺对血管生成的抑制作用^[5]依据。肿瘤的克隆增殖和生长部分是由凋亡逃避介导的。研究表明沙利度胺可降低多发性骨髓瘤患者外周血和骨髓中。Bcl-2(凋亡抑制蛋白)的表达^[6]。另外,Boige 等^[7]研究表明沙利度胺主要通过抑制由血管内皮生长因子(VEGF)的表达,抗肿瘤坏死因子(A-TNF),激活 T 细胞,改变 Bcl-2 家族蛋白的表达,影响 Caspase 凋亡通路而起到抗肿瘤的作用。我们以人肝癌细胞株 SMMC7721 为研究对象,探讨沙利度胺联合 L-

作者单位:067000 河北省承德市,承德医学院附属医院

* 通讯作者

OHP 及 5-Fu 的体外抗肝癌作用,旨在为提高临床化疗治疗方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药物及细胞株 肝癌细胞株 HepG2 购自上海美轩生物科技有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司;沙利度胺(美国 Sigma 公司生产,生产批号:T144 规格 100mg/支),5-Fu(美国 sigma 公司生产,生产批号:F6627;规格:1g/支),L-OHP(美国 Sigma 公司生产,生产批号:09512;规格 5mg/支)。

1.1.2 检测试剂 噻唑蓝(MTT,分析纯产品)、二甲亚砜(DMSO,分析纯产品)、细胞培养耗材购自启东碧云天公司。兔抗人 Bcl-2 及 Bax 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。RPMI-1640 细胞培养液、0.25%胰蛋白酶消化液购自 Hyclone 公司。PI 细胞周期流式检测试剂盒购自上海美轩生物有限公司。

1.1.3 仪器设备 所有实验检测设备,均由河北省承德市承德医学院附属医院中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及周期同步化 HepG2 培养于含 10%胎牛血清的细胞培养液中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3d 传代 1 次,取对数生长期细胞制成 2.0×10^5 /ml 细胞悬液,接种后过夜,再用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的磷酸缓冲液洗 3 次,换上无血清培养液培养,24h 后细胞大多处于 G₀/G₁ 期,达到周期同步化,然后进行实验。

1.2.2 体外细胞增殖抑制实验(四甲基偶氮唑盐实验,MTT 法) 实验设定四组,分别为:空白对照组、沙利度胺组、FOLFOX 组,沙利度胺联合 FOLFOX 组,无菌手法将周期同步化的 HepG2 细胞配成 2.0×10^5 /ml,96 孔培养板每孔 100 μl,培养 24h,36h,48h 后加入药物。每个剂量设 3 个复孔,加药后分别培养 48h,以 MTT 法检测细胞增殖活性。然后按公式[细胞抑制率=(1-A 处理/A 对照)×100%]进行计算。

1.2.3 流式细胞仪分析 分组同上,将 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板,24h 后加入含有药物的 RPMI1640 培养液,继续培养 48h 后获取细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,加入 70%冷乙醇固定后重新收集细胞,PBS 洗去固定液,加入 RNA 酶反应过夜,与碘化丙啶(PD)染液混匀后,用流式细胞仪作流式细胞分析,汞激发波长为 488nm,并用 ModfitLT 210 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。计算各期

细胞所占比例及凋亡率。

1.2.4 Western-blot 分析 VEGF、Caspase-3 蛋白表达 取对数生长期的 HepG2 细胞,按每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板上,培养 24h 后加入药物。药物中培养 48h,收集细胞并加入细胞裂解液提取细胞总蛋白。每组各取 20 μg 总蛋白样品,采用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,分离后的蛋白电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride,PVDF)膜上,将 VEGF、Caspase-3 一抗(1:1 000 稀释)与转移膜反应 2h,TBST 洗膜 5min×3 次。以 GAPDH 为内参照。应用美国 Bio-Rad 公司化学发光成像系统。

1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 进行统计学处理。数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,二组间比较用 SNK 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 沙利度胺联合 FOLFOX 对 HepG2 增殖抑制的影响

筛查出各药物组 48h 的 IC₅₀ 分别是:沙利度胺为 0.1mmol/L,FOLFOX 为 40 μmol/L,5-Fu 及 L-OHP 5 μmol/L。沙利度胺对 HepG2 细胞具有抑制作用,联合 FOLFOX 后对细胞的生长抑制率明显升高,且具有时间依赖性,见表 1。随着作用时间的延长,48h 抑瘤效率较强($P<0.01$),72h 的抑瘤效率下降($P<0.01$),在以后的实验中均采用 48h。

2.2 沙利度胺联合 FOLFOX 对细胞凋亡的影响

沙利度胺联合 FOLFOX 对肝癌 HepG2 细胞周期的影响。转染 48h 后,流式细胞仪空白对照组、沙利度胺组、FOLFOX 组,沙利度胺联合 FOLFOX 组细胞周期(图 3~6)。空白对照组、沙利度胺组、FOLFOX 组,沙利度胺联合 FOLFOX 组在 G₀/G₁ 期百分比明显增加($P<0.05$),而在 S、G₂/M 期百分比不成任何趋势,说明随着药物的联合作用,药物抑制率逐渐升高,且被阻滞于 G₀/G₁ 期(如图 1-4)。

2.3 沙利度胺联合 FOLFOX 诱导肝癌细胞 HepG2 的 VEGF、Caspase-3 蛋白表达的影响

肝癌细胞 HepG2 给予不同刺激后收集蛋白,western blot 检测 VEGF、Caspase-3 蛋白的表达,从图中可以看出,随着药物的联合作用,VEGF 蛋白逐渐降低,Caspase-3 蛋白逐渐升高。表明沙利度胺可诱导细胞 VEGF、Caspase-3 的表达,且沙利度胺联合 FOLFOX 处理 HepG2 细胞后,可诱导更强烈的 VEGF、Caspase-3 的表达。

表 1 各组细胞在 48h、72h 的增殖抑制率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	48h		72h	
	$\bar{x} \pm s$	抑制率	$\bar{x} \pm s$	抑制率
空白对照	1.014 ± 0.036	0	1.412 ± 0.061	0
沙利度胺	0.819 ± 0.016 * Δ	19.171 * Δ	1.245 ± 0.037 * Δ	0.118 * Δ
FOLFOX	0.513 ± 0.011 * Δ	49.408 * Δ	1.004 ± 0.013 * Δ	28.893 * Δ
沙利度胺联合 FOLFOX	0.325 ± 0.026 *	67.889 * Δ	0.825 ± 0.010 *	41.572 *
F 值	1031.869		471.935	
P 值	<0.01		<0.01	

注：与空白对照组比较，* $P < 0.01$ ；与沙利度胺联合 FOLFOX 组比较， $\Delta P < 0.01$

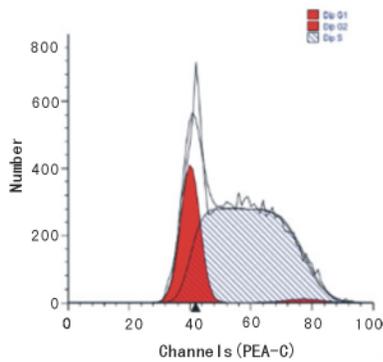


图 1 空白对照组

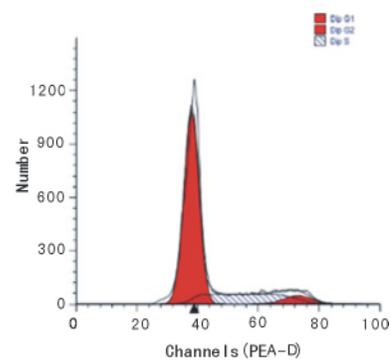


图 4 沙利度胺联合 FOLFOX 组

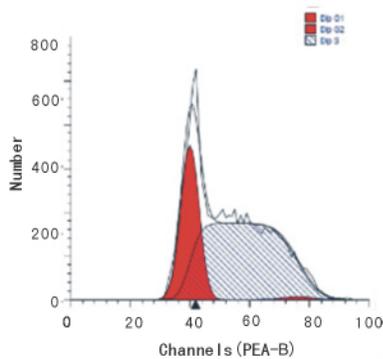


图 2 沙利度胺组

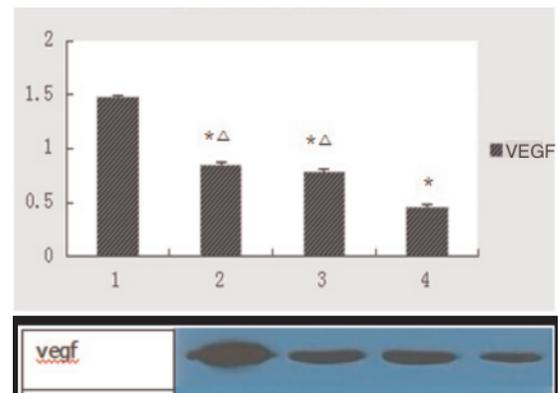


图 5 各组 VEGF 蛋白的表达

注：1 为空白对照组，2 为沙利度胺组，3 为 FOLFOX 组，4 为沙利度胺联合 FOLFOX 组；

与空白对照组比较，* $P < 0.01$ ；与沙利度胺联合 FOLFOX 组比较， $\Delta P < 0.01$

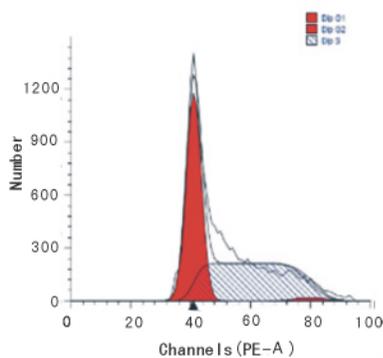


图 3 FOLFOX 组

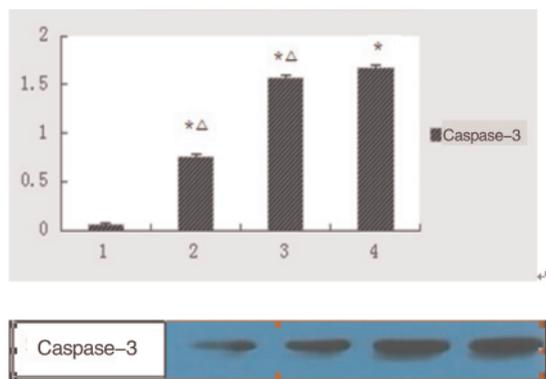


图 6 各组 Caspase-3 蛋白的表达

注:1 为空白对照组,2 为沙利度胺组,3 为 FOLFOX 组,4 为沙利度胺联合 FOLFOX 组;
与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与沙利度胺联合 FOLFOX 组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

肝癌是目前临床上比较常见的消化道的恶性肿瘤,依据其发病是否为原发可分为原发性和继发性肝癌。目前每年患病患者已超过 62.6 万人,处于恶性肿瘤的第五位,而其每年的死亡患者能够接近 60 万,其死亡率在消化系统的恶性肿瘤中仅次于胃癌和食管癌栖居于第三位。因此对于肝癌发生的病因及其该疾病发展的相关因素的研究在肝癌的预防以及诊断和治疗等方面存在着更加积极的意义。

血管内皮生长因子 (VEGF) 是在化验室检查中能在肿瘤组织内外都可以大量发现的,VEGF 的特异性抗体有着明显抑制肿瘤细胞生长的作用,其与癌组织内的血管密度和转移存在着显著的相关性。caspase 是一组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,其家族成员中研究最多、功能相对较明确的为 caspase-3。近年来,人们发现 caspase-3 蛋白酶在凋亡信号传导中起核心作用,是细胞凋亡的执行人,为 Fernander-Alnemri 等^[8]从人 T 淋巴细胞文库中筛选到的。它广泛分布于各种类型的细胞中,正常情况下,在细胞内以无活性的 procaspase-3 存在,只有当细胞凋亡时才转变为有活性的 caspase-3,可以说 caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路^[9]。

我们用 Western blot 反复检测发现,联合用药组(沙利度胺联合 FOLFOX)caspase-3 蛋白表达水平最高,VEGF 蛋白表达水平最低,而 RTPCR 结果

显示联合用药组 caspase-3 mRNA 表达最高,VEGF mRNA 表达最低。表明联合用药组可能通过调节 Bcl-2 蛋白的表达激活 caspase-3,从而诱导 SMMC7721 细胞凋亡,目前机制尚未清楚。

4 参考文献

- [1] Worland RL, Johnson GV, Alemparte J, et al. Ten to fourteen year survival and functional analysis of the AGG total knee replacement system[J]. Knee, 2002, 9(2):133-137
- [2] 蔡海鸥,张伟明,陆廷仁.全膝关节置换术后肌力训练对膝关节功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志, 2007, 29(3):178-180
- [3] 侯来勇,王廉,谢欲晓,等.全膝关节置换术后个性化系统化康复的疗效观察[J].中国康复医学杂志, 2008, 23(8):707-710
- [4] Aydogan S, Celiker U, Turkcuoglu P, et al. The effect of thalidomide on vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor- α levels in retinal ischemia/reperfusion injury[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(3):363-368
- [5] Vasvari GP, Dyckhoff G, Kashfi F, et al. Combination of thalidomide and cisplatin in a head and neck squamous cell carcinomas model results in an enhanced antiangiogenic activity in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2007, 121: 1697-1704
- [6] Dmoszynska A, Podhorecka M, Manko J, et al. The influence of thalidomide therapy on cytokine secretion, immunophenotype, BCL-2 expression and microvessel density in patients with relapsed multiple myeloma[J]. Neoplasms, 2005, 52: 175-181
- [7] Boige V, Malka D, Ducreux M. Therapeutic strategies using VEGF inhibitors in colorectal cancer[J]. Bull Cancer, 2005, 92 (Suppl): 529-536
- [8] Fernander-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta converting enzyme[J]. J Biol Chem, 1994, 269(49):30761-30764
- [9] Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths[J]. Curr Opin Cell Biol, 2002, 14(6):727-733

[2014-07-03 收稿 2014-09-23 修回]