

· 论 著 ·

苹果酸舒尼替尼对人结肠癌细胞株 LoVo 的增殖抑制作用

卢康荣¹, 周 娅², 杜 玮³, 王万山^{4△}

(1. 南方医科大学教育部/广东省共建“重大疾病的转录组与蛋白质组学重点实验室”, 广州 510515;
2. 广州军区联勤部卫生部 510063; 3. 广州军区广州总医院 510010;
4. 南方医科大学比较医学研究所, 广州 510515)

摘要:目的 探讨苹果酸舒尼替尼体外对结肠癌 LoVo 细胞的生长抑制及诱导凋亡的作用。方法 利用四亚基噻唑蓝 (MTT) 法和台盼蓝拒染法观察苹果酸舒尼替尼对结肠癌 LoVo 细胞生长抑制作用。应用流式细胞仪、电子显微镜检测苹果酸舒尼替尼诱导 LoVo 细胞的凋亡作用。结果 MTT 结果显示苹果酸舒尼替尼在 (2.5~20 μM) 的浓度范围内对结肠癌 LoVo 细胞的生长具有显著的抑制作用。生长曲线结果显示各个浓度的药物对 LoVo 细胞的抑制作用呈时间依赖性。流式细胞仪可以观察到细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。透射电子显微镜下见到典型的早期凋亡形态学表现。结论 在一定的浓度范围内, 苹果酸舒尼替尼可以抑制 LoVo 细胞的生长, 并呈剂量和时间依赖效应。其抗肿瘤的特性与引起肿瘤细胞的凋亡有关。

关键词: 苹果酸舒尼替尼; 凋亡; 结肠癌 LoVo 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.015

中图分类号: R735.35; R73-361

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2583-03

Proliferation-inhibiting effects of Sunitinib malate on human colon cancer cell line LoVo

LU Kang-rong¹, ZHOU Ya², DU Wei³, et al.

(1. Guangdong Province-Ministry of Education Joint Key Laboratory of Transcriptomics and Proteomics of Major Human Diseases South Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Health Department of Joint Logistics Department, Guangzhou 510063, China; 3. Guangzhou General Hospital, Guangzhou Military Command Area, Guangzhou 510063, China; 4. Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;)

Abstract: **Objective** To investigate the growth-inhibiting and apoptosis-inducing effect of Sunitinib malate on human colon cancer cell line LoVo in vitro. **Methods** MTT assay and trypan blue exclusion method were applied to observe the growth-inhibiting effect of Sunitinib malate on LoVo cells. The apoptosis-inducing effects of Sunitinib malate on LoVo were examined with flow cytometry (FCM) and electron microscope (EM). **Results** MTT assay showed that Sunitinib malate had remarkable inhibitory effect on LoVo in the concentration ranges of 2.5—20 μM, and cell curve measurement results indicated the inhibitory effect displayed in a time-dependent manner. FCM assay showed the number of G₁/G₀ cell increased and sunitinib blocked the cell cycle at G₁ phase. Typical early apoptotic appearance was also seen under EM. **Conclusion** Sunitinib malate exhibits dose- and time-dependent growth-inhibiting effects on LoVo cells in a certain concentration range, its antineoplastic characteristics are related with its apoptosis-inducing effect on cells.

Key words: sunitinib malate; apoptosis; human colon cancer cell line LoVo

苹果酸舒尼替尼 (sunitinib malate, SU11248) 是一种高选择性多靶点小分子蛋白激酶抑制剂, 2006 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市, 主要用于治疗转移性肾细胞癌 (RCC) 和不能耐受或伊马替尼治疗失败的转移性胃肠道间质瘤 (GIST)。Sunitinib 能抑制多种信号通路, 同时具有抗血管生成和抗肿瘤增殖的活性。对血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) α 、 β , 血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 1、2、3, 干细胞生长因子受体 (c-kitR), FMS 酪氨酸激酶-3 (Flt-3), 集落刺激因子受体 1 (CSF-1R) 和胶质细胞源性神经营养因子受体 (RET) 等多种受体酪氨酸激酶均有抑制作用。

以往研究显示, Sunitinib 具有广谱的抗肿瘤活性, 在非小细胞肺癌、乳腺癌、肾癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、鳞状上皮细胞癌模型中, Sunitinib 有抑制肿瘤细胞生长和转移的作用^[1-3]。本实验将 Sunitinib 作用于人结肠癌细胞株 LoVo, 利用四亚基

噻唑蓝 (MTT) 法和台盼蓝拒染法检测其生长抑制作用, 并用流式细胞仪检测细胞周期, 电镜观察细胞凋亡情况, 以此探讨 Sunitinib 对结肠癌细胞的杀伤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人结肠癌 LoVo 细胞由南方医科大学珠江医院肿瘤科提供, 常规培养于 RPMI-1640 完全培养基内, 置于 37℃、50 mL/L CO₂ 的湿化环境中培养。Sunitinib 购自辉瑞公司。MTT、碘化丙啶 (PI) 和二甲基亚砜 (DMSO) 均购自美国 Sigma 公司。胰蛋白酶购自美国 Amresco 公司, 胎牛血清购自 GIBCO 公司。顺铂 (C-DDP, 20 mg/支) 购自锦州九泰药业有限责任公司, 其他常用化学试剂购自广州化学试剂厂。酶标仪 (STAT FAX-2100) 购自广州倍威仪器有限公司, 另外还有透射电子显微镜 HITACHI H-7500、流式细胞仪 BD FACS Aria 等。

△ 通讯作者: E-mail: wws@fimmu.com.

1.2 MTT 法测定细胞抑制率 取对数生长期的细胞,用 25 g/L 的胰酶消化后,离心后计数,用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基配成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种在 96 孔板中,每孔接种 200 μ L,每组设 6 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁,再按要求加入不同浓度的药物,培养 48 h 后,每孔加入 20 μ L 含 20 mmol MTT,继续培养 4 h 后,吸去培养孔中的液体,每孔加入 150 μ L DMSO,在微量振荡器上振荡 10 min。然后在酶标仪上以 570 nm 的波长测定光密度值 A 值。结果判定:细胞生长抑制率=[(空白对照组孔平均 A 值-实验组孔平均 A 值)/空白对照组孔平均 A 值]×100%。将 Sunitinib 的浓度分别设为 1、2.5、5、10、20 μ M,实验设立阳性和阴性对照组。

1.3 台盼蓝拒染法测定生长曲线 将细胞用 100 mL/L 胎牛血清、RPMI-1640 培养基配成 100×10^4 个/mL 的细胞悬液,然后接种在 96 孔培养板上,每孔 200 μ L,实验组加入不同浓度的受试药物,空白对照组加入等体积的溶剂,每个浓度设置 6 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L 的 CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h 后,按照空白对照组和实验组给予处理。然后予 0、1、2、3、4、5、6 d 各取样 40 μ L,加入 4 mL/L 台盼蓝液 10 μ L,计数细胞数。每孔计数 3 次,取均值,再累计 5 孔均值,根据细胞浓度值的对数值与时间作用绘图,即为细胞生长曲线,实验重复 3 次。阳性对照组设为顺铂 10 μ g/mL。

1.4 流式细胞仪测细胞周期 实验分为实验组(2.5、5、10、20 μ M)和阴性对照组(加入等量的生理盐水)。以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 6 孔板上,待细胞增殖至 80% 融合时给予药物刺激。作用 24 h 后用胰酶消化细胞,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞,用 D-Hanks' 液清洗 2 次,离心,70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定。将固定的细胞以 4 000 r/min 离心 5 min,用 D-Hanks' 液清洗 1~2 次,沉淀物悬浮于 0.5 mL 的 PI 和 5 μ L 的 RNase 酶中,避光放置染色 30 min,200 目筛网过滤。用流式细胞仪作 DNA 周期分析。

1.5 透射电镜观察凋亡细胞形态 以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 10 cm 的培养皿中,待细胞增殖至 80% 融合时,加入实验药物,使其终浓度为 10 μ M,作用 24 h 后,消化,收集细胞,用 D-Hanks' 液漂洗,1 200 r/min 离心 10 min,细胞团块用 2.5% 戊二醛固定 2 h,再用 1% 锇酸固定 1 h,常规梯度脱水,醋酸铀染色,EPON812 包埋,超薄切片,经柠檬酸铅染色后封片,透射电镜下观察、照相。

1.6 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS13.0 统计软件进行方差分析和直线回归与相关分析。

2 结 果

2.1 Sunitinib 对 LoVo 细胞抑制作用的观察 浓度为 1、2.5、5、10、20 μ M 的 Sunitinib 作用于肿瘤细胞后的 MTT 结果显示:该药对 LoVo 细胞有明显的生长抑制作用,在 10 μ M 浓度处细胞抑制率已经达到 65.81%,且有明显的剂量效应关系,相关系数为 $r=0.694(P<0.004)$ 。20 μ M 的抑制率反而不高,可能与药物浓度过大有关系(表 1)。

2.2 Sunitinib 对 LoVo 细胞抑制作用的时间效应关系观察 生长曲线显示,Sunitinib 的各个浓度对肿瘤细胞生长均有抑制作用,其中以 24 h 的抑制作用最为明显。尤其在 10~20 μ M 浓度范围内抑制作用较为明显(图 1)。

2.3 流式细胞仪观察 用不同浓度的 Sunitinib 处理 24 h 后,

LoVo 细胞周期各个时相分布也相应发生改变,处于 G₀/G₁ 期的细胞比例随着 Sunitinib 作用浓度的升高而增加,当 Sunitinib 的浓度为 10 μ M 时,G₀/G₁ 期细胞达 63.6%,而阴性对照组(未加 Sunitinib 处理组)24 h 后 G₀/G₁ 期细胞仅为 46.8%,与用药组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);S 期细胞的比例则随 Sunitinib 作用浓度的增加呈现递减趋势。表明 Sunitinib 使 LoVo 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期(表 2)。

表 1 Sunitinib 对结肠癌 LoVo 细胞生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, \%$)

Sunitinib 浓度(μ g/mL)	IR	
	C-DDP	Sunitinib
1.25	0	16.19±0.124
2.5	20.34±0.027	23.81±0.219
5	58.65±0.014	41.06±0.149
10	67.04±0.048	65.81±0.246
20	53.13±0.034	58.68±0.028

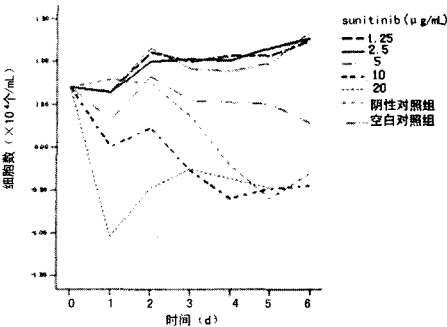


图 1 Sunitinib 对结肠癌 LoVo 细胞作用的生长曲线

表 2 不同浓度的 Sunitinib 对 LoVo 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, \%, n=6$)

组别	细胞凋亡率	细胞周期		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	0	46.8±1.32	49.7±0.21	2.41±0.28
Sunitinib 浓度(μ g/mL)				
1.25	14.3±0.58*	62.7±5.54*	9.1±4.34*	8.4±5.12*
2.5	16.7±0.69*	61.5±5.56*	8.4±3.67*	8.2±7.981*
5	19.0±0.73*	63.2±5.42*	7.5±5.12*	8.1±6.98*
10	21.3±0.83*	63.6±6.21*	7.4±4.67*	5.7±6.54*
20	25.6±0.74*	65.5±6.28*	7.9±4.32*	8.1±5.21*

与空白对照组比较,* $P<0.01$ 。

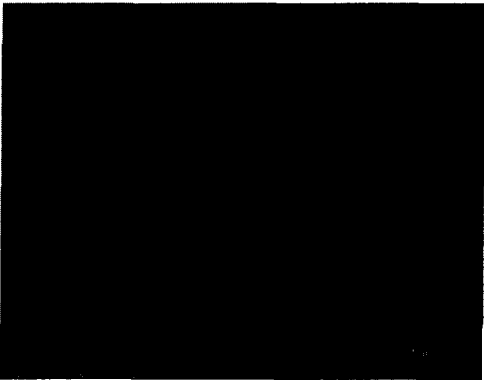


图 2 10 μ M Sunitinib 作用于 LoVo 细胞 24 h 后的电镜图像

2.4 透射电子显微镜观察 10 μM Sunitinib 作用于 LoVo 细胞 24 h 后,细胞发生凋亡,体积缩小,胞膜完整但发生皱缩,细胞核固缩,核内染色质向核膜边缘凝聚、固缩、边聚(图 2)。

3 讨论

受体酪氨酸激酶(RTK)属于 III 和 V 类裂解激酶家族成员,它们的功能异常与多种实体瘤和造血系统恶性肿瘤的发生和发展相关。RTKs 由细胞外的配体结合域和细胞内的催化结构域构成。RTK 受体与配体结合后,受体寡聚化,并且自磷酸化而激活下游信号通路。该信号传导的级联反应最终促使细胞存活和增殖,如肿瘤细胞通过分泌 VEGF 和 PDGF 直接作用于内皮细胞促进血管新生,使肿瘤生长、增殖和转移。Sunitinib 能抑制体内多种受体 RTK 的磷酸化作用,特别是对与肿瘤相关的受体 RTK、PDGFR、RET、KIT 等,以及 PDGFR β 和 VEGFR2-依赖的肿瘤血管生长因子显示很强的抑制作用,对肿瘤生长和转移显示抑制作用^[3-4]。2006 年 1 月 FDA 批准舒尼替尼用于治疗转移性肾细胞癌和不能耐受或伊马替尼(甲磺酸伊马替尼,imatinib mesylateG、Gleevec)治疗失败的胃肠道间质瘤(GIST)患者。实验显示,在放、化疗同时加用舒尼替尼有助于增强放、化疗的抗肿瘤效应^[5]。

本实验应用 Sunitinib 作用于人结肠癌细胞,观察其对 LoVo 细胞的生长抑制作用。实验结果显示在 1.25~20 μM 的浓度范围内对 LoVo 细胞有不同程度的抑制作用,体外实验药物作用浓度范围对临床用药选择最佳给药浓度具有借鉴意义。细胞生长曲线除了显示 Sunitinib 有较明显的生长抑制作用外,还较直接地反映了其对肿瘤细胞生长抑制的动态变化情况。细胞凋亡是一个细胞主动参与的复杂的病理生理过程,近年来的研究表明,许多抗肿瘤药物可以诱导肿瘤细胞凋亡,可能是抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞生长的机制之一。化疗药物主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到治疗目的,肿瘤细胞对化疗药物的敏感性决定了化疗的效果。本研究中 Sunitinib 作用于 LoVo 细胞后,电镜观察结果显示细胞体积缩小,胞膜完整但发生皱缩,细胞核固缩,核内染色质向核膜边缘凝聚、固缩、边

聚等凋亡的特异性变化。流式细胞仪还观察到 Sunitinib 对肿瘤细胞 DNA 合成期及 G₂/M 期的阻滞。

细胞凋亡是基因导向的细胞自我消灭的过程,通过细胞内的核酸内切酶,使核小体间的 DNA 裂解成碎片,继而核裂解,导致细胞死亡。它是通过外源性或内源性的凋亡信号,激活细胞内编码的自杀程序而促发的^[6-7]。本实验观察到 Sunitinib 对结肠癌细胞的抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡实现的。

参考文献:

- [1] Mendell BD, Laird AD, Xin XH, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 327.
- [2] Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, et al. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor β in pre-clinical models of human small cell lung cancer[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2003, 2(2): 471.
- [3] Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(7): 884.
- [4] Le Tourneau C, Faivre S, Raymond E. New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumours[J]. Cancer Treat Rev, 2008, 34(1): 37.
- [5] 董肖椿, 周福生, 闻初. 抗肿瘤药物苹果酸舒尼替尼的合成[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(1): 28.
- [6] 周桔, 罗荣保, 汤长发, 等. bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(10): 1950.
- [7] 耿礼文, 赵韶春, 梁桃. 舒尼替尼抑制结肠癌细胞株增殖诱导凋亡[J]. 重庆医学, 2008, 37(15): 1704.

(收稿日期: 2010-03-09 修回日期: 2010-04-30)

(上接第 2582 页)

- 脐静脉血管内皮细胞增殖及合成 VEGF 的初步研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(7): 618.
- [6] 杨丽霞, 沈珠甫, 郭瑞, 等. Ang II 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 414.
 - [7] 宋永兴, 金才益, 曾忠友, 等. 人参皂甙对大鼠急性脊髓损伤的保护作用及其机制[J]. 海南医学, 2009, 20(5): 6.
 - [8] Haverkate F. Levels of haemostatic factors, arteriosclerosis and cardiovascular disease[J]. Vascu Pharmacol, 2002, 39: 109.
 - [9] Rui WG, Li XY, Mao QL, et al. Angiotensin II induced NF- κ B activation in HUVEC via the p38 MAPK pathway

[J]. Peptides, 2006, 27: 3267.

- [10] Landon EJ, Inagami T. Beyond the G protein: the saga of the type 2 angiotensin II receptor[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 15.
- [11] 贺国洋, 李巍, 冶亚平, 等. Ang II 对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报, 2009, 26(3): 257.
- [12] 金惠铭. 病理生理学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 179.
- [13] 王海燕, 王启会, 王高芳, 等. 植物诱导 HeLa 细胞凋亡的机制[J]. 安徽医药, 2007, 11(7): 580.

(收稿日期: 2010-02-12 修回日期: 2010-03-04)