

LPS 对 5-FU 杀伤 QBC939 细胞影响的实验研究

霍胜军 吕忠诚 邹晓鹤 宋建文 王 康

摘要 目的 探讨 LPS 联合化疗药物 5-FU 对人胆管癌 QBC939 细胞生长和诱导细胞凋亡的影响。方法 四甲基唑蓝 (MTT) 试验检测 LPS 对 5-FU 抑制 QBC939 细胞增殖的影响, 流式细胞术观察 LPS 对 5-FU 诱导 QBC939 细胞凋亡的影响。结果 ①MTT 法检测显示 5-FU 对胆管癌细胞株 QBC939 杀伤作用明显, 但易出现耐药性, LPS 可以增强 5-FU 后期杀伤作用, 能一定程度上防止耐药的出现; ②流式细胞术结果显示化疗药物 5-FU 后能显著诱导 QBC939 细胞发生凋亡, 凋亡指数为 11.50 ± 2.15 ($P < 0.05$), 对照组为 3.53 ± 0.32 , 加用 LPS 后, 能更明显地诱导凋亡, 凋亡指数达到 26.50 ± 3.12 , 与单用加化疗药物 5-FU 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 LPS 能增强 5-FU 对胆管癌细胞株 QBC939 的后期杀伤作用, LPS 联合化疗药物可能是胆管癌临床治疗的一种合理策略。

关键词 胆管癌 QBC939 CXCR4 脂多糖 基因治疗

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.022

Experimental Study of Effect of Combined with 5-FU on Killer Cells of QBC939. Huo Shengjun, Lv Zhongcheng, Zou Xiaohe, et al. *Fist Hospital of Xiangtan City, Hunan 411101, China*

Abstract Objective To explore the effect of LPS lombined with chemotherapy drugs 5-FU on QBC939 human cholangiocarcinoma cell growth and induced cell apoptosis. **Methods** Tetramethyl spit wow blue (MTT) assay was used to obserre that LPS inhibited QBC939 cell proliferation by 5-FU. Flow cytometry was used to study the LPS on 5-FU induced apoptosis QBC939. **Results** ①MTT assay showed that 5-FU QBC939 cells killing effect was obvious, but prone to drug resistance. LPS could enhance the killing effect of 5-FU late, to prevent the emergence of resistance to a certain extent. ②Flow cytometry showed that the chemotherapy drug 5-FU could significantly induce apoptosis in cells QBC939. Apoptotic index was 11.50 ± 2.15 ($P < 0.05$), (the control group was 3.53 ± 0.32). When plusing LPS, apoptosis was more obvious, and apoptotic index reached 26.50 ± 3.12 . Compared with chemotherapy alone plus 5-FU, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** LPS can enhance the killing effect of 5-FU late cholangiocarcinoma cell line QBC939. LPS bile duct cancer chemotherapy drugs may be a reasonable clinical strategy.

Key words Cholangiocarcinoma cell QBC939; CXCR4; Lipopolysaccharide; Gene therapy

化疗是目前恶性肿瘤的治疗中不可缺少的一种治疗手段, 但癌细胞对化疗药物的耐药性却是临床治疗中较为棘手的问题。研究表明, CXCR4 在胆管癌中有表达, 并与肿瘤的转移、预后相关, CXCR4 基因的抑制剂 LPS 可以抑制 CXCR4 蛋白的表达, 从而抑制胆管癌细胞株 QBC939 的增殖, 诱导凋亡, 抑制其侵袭能力试验^[1,2]。对白血病、乳腺癌等的研究表明, CXCR4 基因的单克隆抗体通过中和 CXCR4 基因, 可以增强化疗药物的敏感度, LPS 易于获得, 价格相对便宜, 是否具有此功能, 目前尚无研究。本研究应用 LPS 与 5-FU 共同作用于 QBC939 细胞后, 通过 MTT 法及流式细胞法来观察胆管癌细胞成活率及调

亡率的变化, 观察 LPS 对化疗的影响。

材料与方法

1. 材料: 人永生胆管癌细胞系 QBC939, 由第三军医大学西南医院肝胆外科中心王曙光等建株。胰蛋白酶: 购自湘雅医学院细胞中心。新生小牛血清购自天津灏洋生物工程有限公司。溴化二甲基噻唑二苯四氮唑 (MTT) 购自美国 AM-RESLO 公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购自北京鼎国生物工程有限公司。

2. 试验方法: (1) 细胞培养: 人胆管癌细胞株 QBC939, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中培养, 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。(2) 试验分组: 取对数生长的 QBC939 细胞, 分为对照组及试验组, 对照组加等量培养液, 试验组分为两组, 试验 1 组加 5-FU (浓度为 1 μg/ml), 试验 2 组加 5-FU + LPS, 5-FU 浓度相同, LPS 剂量采用 1 μg/ml。观察 QBC939 细胞生长状况良好, 加到 96 孔板内, 每孔细胞数 1×10^4 , 按组加入药物, 每孔总体积为 0.2ml, 每孔设 3 个复孔, 共接种 7 板。(3) MTT 比色法绘制细

基金项目: 江西省卫生厅基金资助项目 (20091198)

作者单位: 411101 湖南省湘潭市第一人民医院普外三科

通讯作者: 霍胜军, 电子信箱: hsj909@163.com

胞生长曲线:每日取出 1 板,弃去培养液,生理盐水漂洗 1 遍,每孔加入 20 μ l 的 MTT,浓度为 5mg/ml;继续培养 4h,倾尽上清;每孔加入二甲亚砜 0.1ml 摇床上摇动约 15min 以充分溶解;用酶标仪在波长 540nm 处检测各孔光密度值(A 值)。然后以 A 值为纵坐标时间(天)为横坐标绘制细胞生长曲线。

(4) 流式细胞仪检测细胞凋亡:调整细胞浓度至 $1 \times (10^5 \sim 10^6)$ ml, 3 组细胞常规条件下培养 72h 后,1000r/min 离心 5min PBS 洗涤,重复 3 次,70% 乙醇固定后上机。采用 Beckon/Dickinson Facsort 型流式细胞仪,在 488nm 波长处进行检测,测量的数据和图片送入计算机,应用相应程序软件进行资料的处理和分析。

3. 统计学方法:使用 SPSS 13.0 统计软件包处理数据。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间比较应用 *t* 检验及单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MTT 检测 LPS 对 5 - FU 化疗效果的影响:从各组细胞的生长曲线可以看出,对照组细胞移植处于增殖中,试验 1 组(5 - FU 组)和 2 组(5 - FU + LPS 组)生长趋势一致,前 2 天 A540 值均明显下降,但自第 3 天开始,试验 1 组 A540 值停止下降,第 4 天 A540 值出现缓慢上升,而试验 2 组却持续下降,至第 7 天,两组细胞的 A540 值出现统计学差异($P < 0.05$),提示 5 - FU 对胆管癌细胞株 QBC939 杀伤作用明显,但易出现耐药性,而加用 LPS 后,能一定程度上防止耐药的出现(图 1,表 1)。

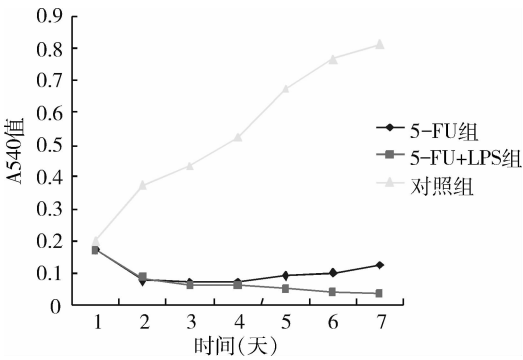


图 1 各组 1 周生长曲线图

2. 流式细胞仪检测 LPS 对 5 - FU 诱导 QBC939 细胞凋亡的影响:化疗药物 5 - FU 能显著诱导

表 1 第 7 天两试验组 OD 值比较

组别	第 7 天 A540 值	P
对照组	0.816 $\pm$ 0.110	
试验 1 组	0.125 $\pm$ 0.013	0.000
试验 2 组	0.059 $\pm$ 0.011	0.026

对照组与两试验组比较, P 均 = 0.000;试验 1、2 组间比较, P = 0.026

QBC939 细胞发生凋亡,未加药前凋亡指数为 3.53 ± 0.32 ,而加化疗药物 5 - FU 后,凋亡指数为 11.5 ± 2.15 ,两者比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),同时合用 LPS 后,能更明显的诱导凋亡,凋亡指数达到 26.5 ± 3.12 ,与单用加化疗药物 5 - FU 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 LPS 对 5 - FU 诱导 QBC939 细胞凋亡的影响

组别	凋亡指数 (%)
对照组	3.53 $\pm$ 0.32
试验 1 组	11.5 $\pm$ 2.15
试验 2 组	26.5 $\pm$ 3.12

对照组与两试验组比较, P 均 < 0.05 ;试验 1、2 组间比较, $P < 0.05$

讨 论

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因。其耐药机制有多种解释,主要是多药耐药(multidrug resistance, MDR),包括 P - 糖蛋白和多药耐药相关蛋白等,肿瘤细胞凋亡机制的缺陷也是 MDR 其中的机制之一,不同肿瘤细胞对化疗敏感度的差异,主要是各种肿瘤细胞对凋亡的阈值不同。对细胞凋亡机制的修复可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感度,克服耐药性的产生,因此诱导肿瘤细胞的凋亡和增强化疗药物的敏感度成为近年来肿瘤治疗的重要策略。

本试验结果表明,5 - FU 对胆管癌杀伤作用明显,但 3 天后即出现明显的耐药。有研究显示,单用 LPS 对胆管癌细胞株 QBC939 的增殖有抑制作用,但没有杀伤作用:1.0 μ g/ml 浓度的 LPS 与细胞共培养 72h,OD 值为 0.329 ± 0.108 ,较对照组细胞 0.552 ± 0.142 的 OD 值低,但较同浓度 LPS 与细胞共培养 24h 时的 OD 值 0.229 ± 0.074 增高,说明细胞有增殖,而 LPS 与 5 - FU 合用对胆管癌细胞株 QBC939 的杀伤作用明显而且持续,从 MTT 法绘制出的生长曲线可以看出,合用 LPS 虽然不能加强早期 5 - FU 对胆管癌细胞株 QBC939 的杀伤效应,但可以有效防止耐药性的产生,1 周后,合用 LPS 杀伤作用明显强于不用者,单用 5 - FU 组的 OD 值为 0.125 ± 0.013 ,5 - FU + LPS 组的 OD 值为 0.059 ± 0.011 ,差异有统计学意义^[2]。结合流式细胞结果看,LPS 有效的防止 5 - FU 对胆管癌细胞株 QBC939 耐药性的产生可能与 LPS 能更明显的诱导细胞凋亡有关。SDF - 1/CXCR4 基因在很多肿瘤中有表达,而对白血病的研究表明,抑制白血病细胞表面的 CXCR4 基因表达,也能很好的增强化疗药物对白血病细胞后期的杀伤作用,本

试验结果与此一致^[3-6]。说明 CXCR4 基因的过表达可能是肿瘤细胞耐药的重要机制。而应用 LPS 后,能明显的诱导肿瘤细胞凋亡,并增强化疗药物 5-FU 对胆管癌细胞株 QBC939 的后期杀伤作用,在胆管癌的治疗中,LPS 能发挥积极作用。

趋化因子及其受体是近年肿瘤研究的热点,CXCR4 基因及其配体 SDF-1 在多种肿瘤的生长与转移中发挥重要作用^[4]。虽然其机制尚未完全清楚,但针对这一基因组的抗肿瘤治疗已经在一些试验研究中得到证实,本试验表明,LPS 不仅能抑制胆管癌细胞株 QBC939 的增殖与侵袭能力,也能很明显的增强化疗药物的作用。

参考文献

1 霍胜军,汤恢焕,魏伟. CXCL12 及受体 CXCR4 在胆管癌中的表达

及其临床意义[J]. 现代生物医学进展,2008,8(4):658-660

2 霍胜军,汤恢焕,曾祥福. CXCR4 抑制剂 LPS 对胆管癌细胞株 QBC939 生物学行为的影响[J]. 中国肿瘤临床,2010,37(12):669-672

3 章大谦,吴广胜. 急性白血病患者血清、脑脊液趋化因子 SDF-1 测定及意义[J]. 现代生物医学进展,2010,10(3):658-660

4 徐斌,韩绍伟,周笑珍,等. CXCR4 和 MMP-9 在胃癌组织中的表达及其与淋巴转移的关系[J]. 医学研究杂志,2012,41(4):112-115

5 李利义,罗越,郑志强,等. CXCR4 和 VEGF 在胃癌中的表达及临床病理因素的关系[J]. 医学研究杂志,2011,40(10):85-88

6 王莹,李文缘,梁金花,等. SDF-1/CXCR4 的表达与喉癌组织 VEGF-C 表达的淋巴管生成及预后的相关性[J]. 医学研究杂志,2012,41(8):50-54

(收稿日期:2014-08-17)

(修回日期:2014-09-16)

浙南地区强直性脊柱炎患者 KIR 基因多态性分析

徐慧英 朱哲慧 唐丽丽 朱晶晶 潘晓东 陈必成 张纯武 林向阳

摘要 目的 分析浙南地区强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptors,KIRs)基因多态性,并分析其在 AS 形成中的作用。**方法** 采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)的方法检测浙南地区无血缘关系的 99 名 AS 患者的 KIR 基因型和单倍体型,并与 100 例浙南地区健康对照的 KIR 基因分布特点进行比较。**结果** 所有 AS 患者均存在 2DL1、2DL3、2DL4、3DL2、3DL3 基因及假基因 2DP1 和 3DP1。共有 28 种基因型,其中 AA1 型比例最高(35.35%),BX2 其次(13.13%)。AS 患者活化性基因 KIR2DS3 的表型频率明显高于健康人群($P < 0.01$)。AS 患者抑制性基因型(AA 型)频率明显低于健康人群($P < 0.05$),但两组之间单倍体型比例差异无统计学意义($P = 0.256$)。**结论** 活化性基因 KIR2DS3 在 AS 患者中的表型频率明显升高,且 AS 患者活化型和抑制性 KIR 基因比例出现免疫活化的倾向,可能与 AS 的发生有一定的关系。

关键词 强直性脊柱炎 杀伤细胞免疫球蛋白样受体 基因型 单倍型

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.023

Analysis of the Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors in Ankylosing Spondylitis in Zhejiang South Area. Xu Huiying, Zhu Zhehui, Tang Lili, et al. Department of Clinical Laboratory Medical Science, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) in the ankylosing spondylitis (AS) patients in the South of Zhejiang Province, and analyze the role of KIR in the pathogenesis of AS. **Methods** KIR genotype and haplotype of 99 AS individuals in Zhejiang south area were detected using Polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) method, and the frequencies of them were compared with the healthy control. **Results** We found that 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL2, 3DL3 genes and the pseudogene 2DP1 and 3DP1 were administered to all AS patients. Twenty-eight genotypes were detected in these patients, with the frequency of AA1 genotype being the highest (35.35%), followed by BX2 (13.13%). The frequen-

基金项目:浙江省科技厅局基金资助项目(2013C33173);浙江省卫生厅基金资助项目(11-ZC24);浙江省教育厅重中之重外科学项目:温州市科技局基金资助项目(Y20100188,H2005B032)

作者单位:325000 温州医学大学附属第一医院临床实验诊断中心(徐慧英、林向阳),移植中心实验室(朱哲慧、唐丽丽、朱晶晶、潘晓东、陈必成、张纯武)

通讯作者:林向阳,电子信箱:bisonch@163.com;张纯武,电子信箱:zcw6681@126.com