

本文引用:张坚. 奥沙利铂对人视网膜母细胞瘤细胞增殖及凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(11): 989-991.

【基础研究】

奥沙利铂对人视网膜母细胞瘤细胞增殖及凋亡的影响

张 坚

(陕西省人民医院眼科,陕西 西安 710068)

摘要: **目的** 探讨不同浓度奥沙利铂对人视网膜母细胞瘤(RB)细胞 Y79 增殖及凋亡的影响。**方法** 将 Y79 细胞于 RPMI 1640 培养基中进行培养,分别给予 0.000、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂对 Y79 细胞进行处理,检测 Y79 细胞增殖情况、凋亡情况及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)活性变化。**结果** 不同浓度的奥沙利铂对 Y79 细胞增殖均有抑制作用,且随着浓度的增加,抑制作用逐渐增强($P < 0.05$);与 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂比较,0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂对 Y79 细胞增殖已有较强的抑制作用($P < 0.05$)。0.000、0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞凋亡率分别为 $(2.18 \pm 0.43)\%$ 、 $(36.94 \pm 1.36)\%$,0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞凋亡率显著高于 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理时($P < 0.01$)。0.000、0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞中 Caspase-3 活性分别为 $(1.97 \pm 0.72)\%$ 、 $(5.82 \pm 0.64)\%$,0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞中 Caspase-3 活性显著高于 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理时($P < 0.01$)。**结论** 奥沙利铂可抑制人 RB 细胞增殖,并促进其凋亡。

关键词: 奥沙利铂;人视网膜母细胞瘤;细胞增殖;凋亡

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2015)11-0989-03

Effect of oxaliplatin on human retinoblastoma cell proliferation and apoptosis

ZHANG Jian

(Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Shaanxi, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of different concentrations of oxaliplatin on human retinoblastoma(RB) Y79 cells proliferation and apoptosis. **Methods** Y79 cells cultured in RPMI 1640 medium were dealt with 0.000,0.125, 0.250,0.500,1.000 and 2.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin. The Y79 cells proliferation,apoptosis and Caspases-3 activity were detected. **Results** Different concentrations of oxaliplatin had inhibitory effect on Y79 cell proliferation, and the inhibitory effect was enhanced with the increasing of concentration of oxaliplatin ($P < 0.05$). Compared with 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin,0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin had stronger inhibitory effect on Y79 cell proliferation($P < 0.05$). The apoptosis rate of Y79 cell dealt with 0.000,0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin was $(2.18 \pm 0.43)\%$ and $(36.94 \pm 1.36)\%$ respectively. The apoptosis rate of Y79 cell dealt with 0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin was significantly higher than that dealt with 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin($P < 0.01$). The activity of Caspases-3 in Y79 cell dealt with 0.000,0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin was $(1.97 \pm 0.72)\%$ and $(5.82 \pm 0.64)\%$ respectively. The activity of Caspases-3 in Y79 cell dealt with 0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin was significantly higher than that dealt with 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxaliplatin($P < 0.01$). **Conclusion** Oxaliplatin can inhibit RB cell proliferation and promote the apoptosis.

Key words: oxaliplatin; human retinoblastoma; cells proliferation; apoptosis

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是来源于胚胎型视网膜细胞的恶性肿瘤,多发于婴幼儿,是婴幼儿最常见、最严重的眼部恶性肿瘤之一^[1-3]。目前,RB的传统治疗方法主要有光凝、温热疗法、冷冻、化学治疗减容后行局部治疗、手术、多途径放射

治疗、摘除眼球后化学治疗等^[4-6],且这些治疗方法对患者早、中期 RB 效果明显。然而,手术会造成患者出现美容缺陷,放射治疗可导致患者脸部畸形,并损伤视网膜和视神经,甚至诱发继发性肿瘤;而化学治疗可导致癌细胞出现多药耐药性,尤其对于不同结构和作用的广谱化学治疗药物,癌细胞会产生较为明显的抗药性^[7]。因此,研究 RB 的耐药机制、发现新靶点、克服化学治疗的耐药性是该肿瘤研究的重点和热点^[8]。Y79 细胞是最早培养成功的人体 RB 细胞株,已被广泛应用于临床研究。本研究旨在

DOI:10.7683/xyxyxb.2015.11.004

收稿日期:2015-05-04

基金项目:陕西省科学技术研究发展计划资助项目(编号:2014K11-01-01-23)

作者简介:张 坚(1973 -),男,陕西西安人,硕士,副主任医师,研究方向:眼底疾病。

观察奥沙利铂对人 RB 细胞株中 Y79 细胞的增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源、试剂及仪器 RB 细胞株 Y79 购自北京贝纳联创科技有限公司,奥沙利铂购自德国 Fresenius公司,RPMI 1640 培养基、链霉素和青霉素均购自美国 Invitrogen 公司,甘氨酸、噻唑兰(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 和碘化丙啶(propidium iodide,PI)均购自美国 Sigma 公司,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (cysteine-containing aspartate-specific proteases-3,Caspase-3)检测试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。Accuri C6 型流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司,CKX41-A32RC 显微镜购自日本 Olympus 公司,倒置荧光显微镜 XSP-63XDV 购自上海光学仪器一厂,BI-2000 医学图像分析系统购自成都泰盟软件有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 Y79 细胞于 RPMI 1640 培养基中进行培养,滴加体积分数 5% 的灭活胎牛血清 5 mL、24. 0 mmol · L⁻¹ 碳酸氢钠溶液 10 mL、1 × 10⁵ U · L⁻¹青霉素 0. 5 mL、10 mg · L⁻¹链霉素 0. 5 mL,将培养基置于 37 ℃、含体积分数 5% 二氧化碳、饱和湿度的环境中进行培养。

1.2.2 细胞增殖率检测 取 96 孔细胞培养板,每孔滴入 100 μL 培养液(约含 7 000 个细胞),置于 37 ℃、含体积分数 5% 二氧化碳、饱和湿度的环境中培养 24 h,然后加入新配置的奥沙利铂溶液,浓度分别为 0. 000、0. 125、0. 250、0. 500、1. 000、2. 000 μmol · L⁻¹,针对每一药品浓度取 5 个复孔,于细胞处理 24、48、72 h 时检测细胞存活率,同时设空白对照和阴性对照。加药物培养总计时 24 ~ 72 h,培养 4 h 后再加 150 μL 的三联液,室温下孵育 7 ~ 8 h,培养终止前 4 h,每孔滴加 10 μL MTT 溶液,然后在 570 nm 波长下测定每孔的吸光度值,实验重复 3 次。细胞增殖率 = (1 - 实验组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%。

1.2.3 细胞凋亡检测 取 6 孔培养板对细胞进行接种,每孔约 1 × 10⁵ 个细胞,培养 24 h 后滴加 0. 250 μmol · L⁻¹奥沙利铂进行细胞激活,并设对照组。将培养板置于 37 ℃、含体积分数 5% 二氧化碳、饱和湿度的环境中培养 24 h。然后用磷酸盐缓

冲液进行洗涤,加入 1 mL 体积分数 70% 的冷乙醇进行固定,置 4 ℃ 环境下冷置 7 ~ 8 h,用磷酸盐缓冲液将固定液洗去,加入 PI 染液 300 μL 混匀,置于无光环境 40 min,用细胞仪检测细胞凋亡情况,计算细胞凋亡率,实验重复 3 次。

1.2.4 Caspase-3 活性测定 取 6 孔培养板对细胞进行接种,每孔约 1 × 10⁵ 个细胞,培养 24 h 后滴加 0. 250 μmol · L⁻¹奥沙利铂进行细胞激活,并设对照组。将培养板置于 37 ℃、含体积分数 5% 二氧化碳、饱和湿度的环境中培养 24 h。然后将培养液悬浮于 50 μL 冷细胞裂解液 10 min,4 ℃ 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,将细胞和上清液分离。取细胞提取液置入试管,滴加 50 μL 二硫苏糖醇混合液和 5 μL 1. 000 mmol · L⁻¹ Caspase-3 底物,37 ℃ 下水浴 60 min;然后在 405 nm 波长下测定吸光度值。根据实验说明书提供的斜率计算 Caspase-3 活性,计算公式为: Caspase-3 活性 = (实验组吸光度值 - 对照组吸光度值)/斜率 × 100%。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17. 0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一浓度下不同时间的 RBY79 细胞增殖率比较采用 *t* 检验,凋亡率及 Caspase-3 活性比较采用两独立样本 *t* 检验,*P* < 0. 05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的奥沙利铂对 Y79 细胞增殖的影响

结果见表 1。不同浓度的奥沙利铂对 Y79 细胞增殖均有抑制作用,且随着浓度增加,抑制作用逐渐增强(*P* < 0. 05);与 0. 000 μmol · L⁻¹奥沙利铂比较,0. 250 μmol · L⁻¹的奥沙利铂对 Y79 细胞增殖已有较强的抑制作用(*P* < 0. 05)。

表 1 不同浓度奥沙利铂对 RB 的 Y79 细胞增殖的影响
Tab.1 Effect of different concentrations of oxaliplatin on RB Y79 cells proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

奥沙利铂浓度/ (μmol · L ⁻¹)	细胞增殖率/%		
	24 h	48 h	72 h
0. 000	100. 00 ± 0. 00	100. 00 ± 0. 00	100. 00 ± 0. 00
0. 125	96. 15 ± 1. 64 ^a	93. 61 ± 1. 57 ^a	90. 74 ± 1. 93 ^a
0. 250	84. 38 ± 1. 74 ^{ab}	77. 27 ± 1. 36 ^{ab}	66. 15 ± 1. 66 ^{ab}
0. 500	73. 22 ± 1. 55 ^{ac}	68. 16 ± 1. 33 ^{ac}	51. 35 ± 1. 52 ^{ac}
1. 000	64. 39 ± 1. 83 ^{ad}	53. 16 ± 1. 75 ^{ad}	40. 83 ± 1. 49 ^{ad}
2. 000	55. 35 ± 1. 27 ^{ae}	40. 73 ± 1. 09 ^{ae}	28. 95 ± 1. 23 ^{ae}

注: 与 0. 000 μmol · L⁻¹奥沙利铂比较^a*P* < 0. 05; 与 0. 125 μmol · L⁻¹奥沙利铂比较^b*P* < 0. 05; 与 0. 250 μmol · L⁻¹奥沙利铂比较^c*P* < 0. 05; 与 0. 500 μmol · L⁻¹奥沙利铂比较^d*P* < 0. 05; 与 1. 000 μmol · L⁻¹奥沙利铂比较^e*P* < 0. 05。

2.2 奥沙利铂对 Y79 细胞凋亡的影响 0.000、0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞凋亡率分别为 $(2.18 \pm 0.43)\%$ 、 $(36.94 \pm 1.36)\%$ ，0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞凋亡率显著高于 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理时，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 奥沙利铂对 Y79 细胞中 Caspase-3 活性的影响 0.000、0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞中 Caspase-3 活性分别为 $(1.97 \pm 0.72)\%$ 、 $(5.82 \pm 0.64)\%$ ，0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞中 Caspase-3 活性显著高于 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理时，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

奥沙利铂是第 3 代铂类抗肿瘤药物，其能产生水化衍生物，作用于细胞内 DNA，促使其形成链内及链间交联，抑制 DNA 复制及信使 RNA 合成，从而发挥抗肿瘤作用，且奥沙利铂对听神经和肾脏损害作用小，胃肠道不良反应较轻^[9]。本研究通过观察奥沙利铂对人 RB 细胞株中 Y79 细胞的增殖及凋亡的影响，以期奥沙利铂的临床应用提供依据。

研究显示，奥沙利铂可以诱导肿瘤母细胞凋亡，并可以激活 Caspases 家族蛋白的抗癌因子^[10]。细胞凋亡主要受 Caspases 家族成员所介导的蛋白酶间产生的级联反应影响，在细胞凋亡诱导信号刺激下，启动型 Caspases 与特异辅因子相结合而被激活，从而发挥对细胞内蛋白质的水解作用，同时激活其下游效应型 Caspases；当下游效应型 Caspase 激活时，其又可以对细胞内的靶物质进行高效能及大范围水解，进一步降解细胞内蛋白质，最终使细胞不可逆地凋亡^[11-12]。Caspases-3 作为 Caspases 家族成员之一，属于一种白细胞介素-1 β 转化酶，能够激活多种细胞的凋亡途径，尤其在细胞凋亡效应的下游中起着核心作用，促进细胞凋亡。活化的 Caspases-3 可对 DNA 依赖性蛋白激酶及聚腺苷二磷酸核糖多聚酶等进行分解和切割，从而对 DNA 复制、转录以及损伤修复产生影响^[13]。本研究结果显示，不同浓度的奥沙利铂对 Y79 细胞增殖均有抑制作用，且随着浓度增加抑制作用逐渐增强，0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂对 Y79 细胞增殖已有较强的抑制作用，因此，在观察奥沙利铂对人 Y79 细胞凋亡的影响时剂量选用 0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究结果显示，

0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞凋亡率显著高于 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂；0.250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理下 Y79 细胞中 Caspase-3 活性显著高于 0.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂。本研究结果显示，奥沙利铂能够显著增强 Caspases-3 活性，促进其发挥抑制肿瘤细胞增殖和加快肿瘤细胞凋亡的作用。

参考文献:

[1] 王一卓,黄东生,史季桐,等. 侵犯视神经的视网膜母细胞瘤患儿 465 例预后分析[J]. 中华儿科杂志,2015,53(2):109-113.

[2] 刘秋玲. 视网膜母细胞瘤的诊断与治疗[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(3):161-163.

[3] 胡辅华,刘丽林,季建,等. 卡铂联合 MicroRNA-34a 抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖和肿瘤生长的作用研究[J]. 眼科新进展,2015,35(6):528-531.

[4] 刘盛涛. AChE 缺失或抑制可减少碘酸钠诱导的视网膜色素上皮及感光细胞凋亡与 Caspase 3 表达[D]. 南昌:南昌大学医学院,2014.

[5] 刘瑾,朱豫. 视网膜母细胞瘤的治疗进展[J]. 眼科新进展,2013,33(1):91-94.

[6] 翟晓文. 儿童视网膜母细胞瘤治疗进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(3):167-171.

[7] Subramanian N,Raghunathan V,Kanwar J R,*et al.* Target-specific delivery of doxorubicin to retinoblastoma using epithelial cell adhesion molecule aptamer[J]. *Mol Vis*,2012,18:2783-2795.

[8] Luo J,Zhou X,Diao L,*et al.* Experimental research on wild-type p53 plasmid transfected into retinoblastoma cells and tissues using an ultrasound microbubble intensifier[J]. *J Int Med Res*,2010,38(3):1005-1015.

[9] D'Anneo A,Augello G,Santulli A,*et al.* Paclitaxel and beta-lapachone synergistically induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by downregulating the levels of phospho-Akt[J]. *J Cell Physiol*,2010,222(2):433-443.

[10] Di Fiore R,Drago-Ferrante R,D'Anneo A,*et al.* In human retinoblastoma Y79 cells okadaic acid-parthenolide co-treatment induces synergistic apoptotic effects, with PTEN as a key player[J]. *Cancer Biology & Therapy*,2013,14(10):922-931.

[11] 马岚,张奕霞,练海东,等. 右美沙芬对糖尿病视网膜神经病变中 Caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(5):432-434.

[12] Ishikawa Y,Nagai J,Okada Y,*et al.* Function and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured human Y79 retinoblastoma cells[J]. *Biol Pharm Bull*,2010,33(3):504-511.

[13] Wojcieszak J,Zawilska J B. PACAP38 and PACAP6-38 exert cytotoxic activity against human retinoblastoma Y79 cells[J]. *J Mol Neurosci*,2014,54(3):463-468.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)