

· 论 著 ·

LY294002 联合顺铂对脑胶质瘤 U87 细胞株增殖的影响*

李 焘¹, 万志先^{2#}, 罗 然², 王雄伟^{2△}, 曾 晖², 刘朝奇³, 汪 雷², 王 炜², 孙 丽³

(1. 武汉科技大学附属普仁医院神经内科, 武汉 430081; 2. 三峡大学神经病学研究所/

宜昌市中心人民医院神经外科, 湖北宜昌 443003; 3. 三峡大学分子生物研究所, 湖北宜昌 443003)

摘要:目的 体外观察磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)特异性抑制剂 LY294002 与顺铂(CDDP)联合对人脑胶质瘤 U87 细胞株增殖的抑制作用。方法 采用细胞毒实验(MTT)法、流式细胞术(FCM)检测 LY294002 单独或联合 CDDP 对人脑胶质瘤 U87 细胞增殖的抑制作用,并观察细胞形态学变化。结果 LY294002 与 CDDP 均能抑制 U87 细胞生长,呈剂量依赖性,两者联合有协同效应。当 CDDP 为 0.625 μg/mL 和 LY294002 为 5 μmol/L 时达到最大协同作用(Q=1.21),FCM 检测细胞被阻滞在 G₁ 期,S 期细胞比例减少,差异有统计学意义(P<0.01)。结论 LY294002 能有效提高神经胶质瘤 U87 细胞对 CDDP 的敏感性,本研究为两种化疗药物在临床上的联合应用提供了理论依据。

关键词:神经胶质瘤;药物疗法;顺铂;LY294002;增殖抑制

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3692-03

Effect of LY294002 combined with CDDP on proliferation in glioma U87 cells in vitro*

Li Tao¹, Wan Zhixian^{2#}, Luo Ran², Wang Xiongwei^{2△}, Zeng Hui², Liu Chaoqi³, Wang Lei², Wang Wei², Sun Li³

(1. Department of Neurology, Pu Ren Hospital Wuhan University of Science and Technology, Wuhan,

Hubei 430081, China; 2. Department of Neurosurgery, The First College of Clinical Medical Science,

China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003 China; 3. Institute of Neurology, China Three

Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of LY294002 and CDDP on proliferation of glioma cancer cell line U87. Methods MTT assay was used to examine the inhibition rate cell growth when cells were treated at various concentrations of LY294002 and CDDP alone or combination. Cell cycle and apoptosis rate of U87 cells were detected by flow cytometry (FCM) after using drugs. Optic microscope was used to detect the morphological changes of U87 cells. Results Both LY294002 and CDDP exhibited a dose dependent inhibitory effect on the proliferation of U87 cells. The combination of LY294002 and CDDP exerted a synergistic effect on U87 cell growth inhibition. LY294002 in the concentration of 5 μmol/L and CDDP in the concentration of 0.625 μg/mL interaction was the most synergistic(Q=1.21). Combined treatment group raised U87 cells' apoptosis and induced G₁ phase arrest compare with single drug treatment group(P<0.01). Conclusion LY294002 could effectively induce U87 sensitivity to CDDP. And this conclusion provides theoretical basis for the combined clinical use of LY294002 and CDDP.

Key words: glioma; drug therapy; cisplatin; LY294002; growth inhibiting

神经胶质瘤是严重危害人类健康的恶性肿瘤,单一的手术切除难以治愈,化疗是术后的主要辅助治疗手段,以顺铂为主的联合化疗是多种肿瘤的一线治疗方案,它可以联合多西他赛、依托泊苷、吉西他滨等治疗非小细胞肺癌、食管小细胞癌和乳腺癌^[1-3]。磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)信号转导通路被认为是肿瘤细胞存活的首要通路,与 LY294002 是 PI3K 特异性抑制剂,近年研究表明 LY294002 可以增强某些抗肿瘤药物的疗效,减少化疗抵抗作用^[4-6]。但 LY294002 联合顺铂(CDDP)对人胶质瘤 U87 细胞生长的影响未见报道。本研究以胶质瘤细胞株 U87 为研究对象,观察 LY294002 和 CDDP 对 U87 细胞增殖的抑制作用及细胞形态的变化,为临床增强神经胶质瘤化疗疗效提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 脑胶质瘤细胞株 U87 由华中科技大学附属同济医院神经外科实验室惠赠。在 5% CO₂、37℃ 饱和湿度的培养箱中用含 10% 胎牛血清(美国 Sigma 公司)的 RPMI-1640 培养基(美国 Sigma 公司)培养,2~3 d 更换 1 次培养液,待细胞

融合达 80% 时即消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 主要试剂 LY294002 粉剂购自美国 Cayman 公司, CDDP 购自齐鲁制药有限公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)细胞增殖分析试剂为 Promega 公司产品。全波长酶标仪为 Thermo 公司产品。Epics XL-4 流式细胞仪(FCM)为 Beckman Coulter 公司产品。Eclips TE2000-S 倒置荧光显微镜为日本尼康公司产品。

1.3 方法

1.3.1 细胞毒实验(MTT)法检测细胞的增殖抑制率 取对数生长期细胞,调整到所需细胞浓度,接种于 96 孔培养板(100 微升/孔),置于培养箱中培养 24 h。实验分组如下:(1) LY294002 组分别按浓度梯度给药浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 μmol/L;(2) CDDP 组分别按浓度梯度给药 0.315、0.625、1.250、2.500、5.100 μg/mL;(3) 联合用药组分别加入上述两种药物,两药相应浓度以 1:1 相互组合。以上 3 组为实验组,每个浓度设 3 个复孔。设实验对照组和空白对照孔(对照组)。给药后继续置于 5% CO₂、37℃ 饱和湿度的培养箱中培养 48 h,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,微量振荡

器震荡 10 min,用酶联免疫检测仪检测波长在 570 nm 的吸光度(A 值)。实验重复 3 次,均设 3 个复孔,取 3 个复孔的均值为最终结果。按以下公式计算各组细胞的增殖抑制率(IR)。IR=(1-实验孔 A/对照孔 A)×100%。按金正均提出的概率和法计算 Q 值并判断两药的协同作用^[7]。Q= E(A+B)/[EA+(1-EA)×EB],其中 E(A+B)为两药联合应用时的细胞增殖抑制率,EA 和 EB 分别为两药单独应用时的细胞增殖抑制率。当 Q 为 0.85~1.15 时,表示两药作用相加;当 Q>1.15 时,表示两药作用协同;当 Q<0.85 时,表示两药相互拮抗。

1.3.2 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡 选取 Q>1.15 即 CDDP 0.625 μg/mL,LY294002 5 μmol/L 单用或联合 48 h 作为药物实验组。细胞悬浮磷酸盐缓冲液(PBS)中,1 000 r/min,离心 10 min,去上清液,调整细胞数至 2×10⁶,细胞悬液用 70%的冰乙醇固定,4℃固定过夜,离心去除固定液,PBS 清洗 1 次,RNA 酶 37℃处理 1 h,与碘化丙啶(PI)在 37℃反应 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.3 细胞形态学观察 用 6 孔培养板接种细胞过夜,分别用 LY294002 与 CDDP 单独和联合作用 U87 细胞 48 h 后,用倒置荧光显微镜观察培养板中 U87 细胞用药前后的形态变化。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。同一药物不同浓度组间采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-t 检验,α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 LY294002 和 CDDP 单药及联合用药对胶质瘤 U87 细胞的抑制作用 LY294002 和 CDDP 对 U87 细胞体外生长有明显的抑制作用(封 2 图 1),其抑制率呈剂量依赖关系(P<0.01),两者联合抑制作用增加(P<0.05),见表 1。经计算 Q 值显示,两种药物联合均有相加作用;LY294002 和 CDDP 浓度分别为 0.625 μg/mL 和 5 μmol/L 时具有协同作用(P>1.15),见表 2。

表 1 LY294002 与 CDDP 单用或者联合 48 h 对 U87 细胞的增殖抑制作用 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	抑制率(%)
对照组		
LY294002(μmol/L)	2.500 0	16.3±1.3*
	5.000 0	23.1±1.0*
	10.000 0	31.6±2.1*
	20.000 0	35.4±1.1*
	40.000 0	47.1±2.2*
	80.000 0	52.8±1.0*
CDDP(μg/mL)	0.312 5	19.7±2.1*
	0.625 0	27.0±1.5*
	1.250 0	47.7±1.6*
	2.500 0	60.1±1.4*
	5.000 0	68.5±1.2*
	10.000 0	75.4±2.7*
LY294002 联合 CDDP (μmol/L,μg/mL)	2.5+0.312 5	35.0±1.3*○
	5.0+0.625 0	51.4±2.1*○
	10.0+1.250 0	56.2±1.3*○
	20.0+2.500 0	66.4±1.2*○
	40.0+5.000 0	76.1±2.4*○
	80.0+10.000 0	80.3±1.8*○

*:P<0.01,组内比较;○:P<0.05,与单药组比较。

表 2 LY294002 联合 CDDP 作用 48 h 胶质瘤 U87 细胞的 Q 值

LY294002 (μmol/L)	CDDP(μg/mL)					
	10.000 0	5.000 0	2.500 0	1.250 0	0.625 0	0.312 5
80.0	0.91					
40.0	0.89					
20.0	0.87					
10.0	0.90					
5.0	1.21					
2.5	1.07					

2.2 流式细胞术分析 根据 MTT 实验结果,选取 Q 值最大的 CDDP 和 LY294002 浓度,即 CDDP 0.625 μg/mL,LY294002 5 μmol/L 单用或联合 48 h 作为药物实验组。LY294002 和 CDDP 单用或联用均表现改变细胞周期的活性,两药联合作用 G₁ 期细胞比例较单药组增加更明显,S 期减少(P<0.01),而 G₂ 期比例变化不大,见表 3。

表 3 LY294002 联合 CDDP 48 h 对 U87 细胞周期的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期分布(%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	48.3±3.1	45.0±2.9	6.7±1.7
LY294002 组	64.3±2.3*	29.1±1.8*	6.5±2.2
CDDP 组	66.2±2.8*	27.0±2.5*	6.8±2.6
联合用药组	73.4±2.1*▲	19.6±1.7*▲	7.4±1.8

*:P<0.01,与对照组比较;▲:P<0.01,与单药组比较。

2.3 细胞形态 倒置显微镜下,对照组 U87 细胞呈单层生长,生长密度大,呈梭形或三角形,核分裂相多,实验组经 LY294002 或 CDDP 处理后,胶质瘤细胞逐渐减少,体积变小,胞质透亮度下降,颗粒感增强,细胞突触变短、变圆,部分细胞胞突回缩变圆,脱落呈悬浮状,而 CDDP 联合 LY294002 用药处理的细胞,上述变化更加显著,并可见细胞形态破坏,胞膜破裂,细胞凋亡。

3 讨 论

神经胶质瘤约占颅内原发恶性肿瘤的 40%,胶质母细胞瘤(GBM)是神经胶质瘤中一种最常见的、恶性程度最高的一种类型,预后极差,超过 90%的 GBM 是原发性 GBM,绝大部分患者在确诊后的生存期只有 1 年,2 年生存期的患者小于 10%^[8],目前主要采取以手术切除为主、放化疗为辅的综合治疗。

在体外试验中,所有化疗药物在高剂量时均会对肿瘤生长有抑制作用,但是,某种化疗药物能否成功运用于临床的关键是其疗效与毒性剂量之间的安全范围,如何上调肿瘤细胞对化疗的敏感性至关重要。化疗敏感性由肿瘤细胞的固有耐药和化疗中的获得性耐药决定,肿瘤细胞对化疗药物的固有耐药不能改变,只能通过调节获得性耐药增强化疗药物的敏感性。CDDP 广泛运用于临床,为铂的金属络合物,作用似烷化剂,主要作用靶点为 DNA,作用于 DNA 链间及链内交链,形成 DDP-DNA 复合物,干扰 DNA 复制,或与核蛋白及胞浆蛋白结合,研究发现 CDDP 可以激活多种信号转导通路,包括 Fas/FasR、ATR、p53 及 MAPK 信号通路,最终通过活化 Caspase-3 促进

细胞凋亡^[9]。

PI3K/Akt 细胞转导通路被认为是肿瘤细胞存活的首要通路,与肿瘤的发生、发展密切相关,在肿瘤细胞恶性增殖、转移以及对放、化疗的拮抗起着重要作用^[10]。近年来应用信号通路靶点抑制剂与放、化疗结合治疗的方法,为肿瘤的治疗开辟了一条新的途径,日益受到癌症研究者得重视。研究发现,磷酸化的 Akt 可以将 Bad 磷酸化,磷酸化的 Bad 失去与 Bcl-XL 结合的能力,恢复了 Bcl-2 的抗凋亡能力,通过控制细胞色素 C 从线粒体的释放来介导 Caspases 家族的活性^[11]。Fujiwara 等^[12]发现,CDDP 可以诱导胰腺癌细胞中 Akt 活化,LY294002 通过抑制 Akt 和 Bad 的磷酸化,上调 Caspase-3 的表达,从而增加了胰腺癌 AsPC-1、PANC-1 细胞对 CDDP 的敏感性,并在动物实验中得到证实。Asechi 等^[13]认为,survivin 的表达上调介导了大鼠肝癌细胞 K-251 对 CDDP 的耐药,LY294002 通过抑制 survivin 的表达增加肿瘤细胞对 CDDP 的敏感性。

本研究主要探讨 LY294002 联合 CDDP 是否可以增强对神经胶质瘤 U87 细胞的增殖抑制作用,以期改善化疗药物对预防脑胶质瘤术后复发的效果。本研究发现,在体外环境下 LY294002 联合 CDDP 能增强对胶质瘤 U87 细胞的增殖抑制作用。当 LY294002 浓度为 5 μmol/L、CDDP 0.625 μg/mL 时,联合用药存在协同作用(Q=1.21),说明 LY294002 有增加 CDDP 治疗效果的作用。FCM 结果表明,用相同剂量的 CDDP 作用 U87 细胞,在 LY294002 干预后,G₁ 期细胞比例增加,S 期细胞减少,G₂ 期变化不大。本研究发现,LY294002 和 CDDP 单药组可以抑制细胞增殖,联合用药组抑制作用更加明显。

总之,本研究已证实 LY294002 和 CDDP 能协同抑制人胶质瘤细胞株 U87 增殖,但 LY294002 增强胶质瘤对 CDDP 敏感性的分子机制尚未明确,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 申洁,贺外信.多西他赛联合顺铂治疗非小细胞肺癌近期疗效观察[J].中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(1):68-69.
- [2] 刘莺,曹婧,张艳玲,等.依托泊甙联合顺铂治疗食管小细胞癌的疗效[J].肿瘤防治研究,2011,38(12):1423-1425.
- [3] 王蓓,王浙,吕晓皑.吉西他滨联合顺铂一线治疗晚期三阴乳腺癌疗效分析[J].实用肿瘤杂志,2011,26(5):507-

509.

- [4] 王晶宇,王志平,赵俊丽,等.LY294002 联合姜黄素对人膀胱癌 EJ 细胞的体外抑制作用[J].中国临床药理学杂志,2011,27(1):37-41.
- [5] Chen L,Han L,Shi Z,et al.LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway[J].Mol Med Report,2012,5(2):575-579.
- [6] Wu D,Tao J,Xu B,et al.Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 suppresses proliferation and sensitizes doxorubicin chemotherapy in bladder cancer cells[J].Urol Int,2011,87(1):105-113.
- [7] 金正均.合并用药中的相加[J].中国药理学报,1980,1(2):70-76.
- [8] Schwartzbaum JA,Fisher JL,Aldape KD,et al.Epidemiology and molecular pathology of glioma[J].Nat Clin Practice,2006,2(9):494-503.
- [9] Brozovic A,Osmak M.Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance[J].Cancer Lett,2007,251(1):1-16.
- [10] Morgensztern D,McLeod HL.PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy[J].Anti Cancer Drugs,2005,16(8):797-803.
- [11] Chong ZZ,Maiese K.Targeting WNT,protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system[J].Histol Histopathol,2004,19(2):495-504.
- [12] Fujiwara M,Izuishi K,Sano T,et al.Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells[J].J Exp Clin Cancer Res,2008,27:76.
- [13] Asechi H,Hatano E,Nitta T,et al.Resistance to cisplatin-induced apoptosis via PI3K-dependent survivin expression in a rat hepatoma cell line[J].Int J Oncol,2010,37(1):89-96.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)

(上接第 3691 页)

- Lung Cancer,2009,63(2):219-226.
- [7] Biedler JL,Riehm H.Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro;cross-resistance,radioautographic,and cytogenetic studies[J].Cancer Res,1970,30(4):1174-1184.
- [8] Juliano RL,Ling V.A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J].Biochim Biophys Acta,1976,455(1):152-162.
- [9] Chen CJ,Chin JE,Ueda K,et al.Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human

cells[J].Cell,1986,47(3):381-389.

- [10] Robey RW,Polgar O,Deeken J,et al.ABCG2:determining its relevance in clinical drug resistance[J].Cancer Metastasis Rev,2007,26(1):39-57.
- [11] 王秀英,冷水龙.小白菊内酯增强肝癌 HepG2 细胞对顺铂敏感性的实验研究[J].实用医学杂志,2011,29(2):177-180.
- [12] Zhao LJ,Xu YH,Li Y.Effect of parthenolide on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line SGC7901 [J].J Dig Dis,2009,10(3):172-180.

(收稿日期:2012-06-09 修回日期:2012-08-22)