

· 基础研究 ·

## 伊洛马司他联合卡培他滨对人喉癌 hep-2 细胞的影响\*

李黎, 张少容<sup>△</sup>, 熊辉强, 高树峰, 兰宁  
(南昌大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科 330006)

**摘要:**目的 探讨伊洛马司他联合化疗药物卡培他滨对人喉癌 hep-2 细胞生长的影响。方法 伊洛马司他、卡培他滨两药单独和联合处理 hep-2 细胞, 未处理组为对照组, 采用甲基偶氮唑盐(MTT)法分析 hep-2 细胞的增殖活性, 并采用金氏 Q 值判断联合用药的性质; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 hep-2 细胞中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)mRNA 的表达水平; 流式细胞术检测 hep-2 细胞的凋亡率。结果 伊洛马司他与卡培他滨对 hep-2 细胞均有抑制作用, 联合用药细胞抑制率明显增高( $P < 0.05$ ), 两药联合浓度为(8+100) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为协同作用, (40+400) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为相加作用; RT-PCR 示伊洛马司他组与联合用药组的 MMP-9 mRNA 的表达水平均低于对照组( $P < 0.05$ ), 联合用药组 MMP-9 mRNA 的表达水平低于伊洛马司他组( $P < 0.05$ ); 流式细胞术示伊洛马司他组及卡培他滨组的凋亡率高于对照组( $P < 0.05$ ), 联合用药组的凋亡率高于其他各组( $P < 0.05$ )。结论 伊洛马司他与卡培他滨联合用药可明显增强单药对喉癌 hep-2 细胞的抑制效应和诱导细胞凋亡作用, 伊洛马司他的作用机制可能是下调 MMP-9 的表达水平。

关键词: 喉肿瘤; 伊洛马司他; 卡培他滨

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.27.025

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)27-3269-03

Effect of ilomastat combined with capecitabine on human laryngeal cancer hep-2 cell<sup>\*</sup>Li Li, Zhang Shaorong<sup>△</sup>, Xiong Huiqiang, Gao Shufeng, Lan Ning

(Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of ilomastat combined with chemotherapeutic drug capecitabine on human laryngeal cancer hep-2 cell. **Methods** hep-2 cells were treated by ilomastat and capecitabine alone and their combination. The untreated group was taken as the control group. The proliferation activity of the hep-2 cells was analyzed by MTT assay, and the Jin's Q was adopted to assess the characters of combination medication of ilomastat and capecitabine; the expression level of MMP-9mRNA in hep-2 cell was detected by RT-PCR; the apoptosis rate of hep-2 cell was detected by the flow cytometry. **Results** Both ilomastat and capecitabine had the inhibiting effect on the proliferation of hep-2 cell, and the combination of ilomastat and capecitabine increased the cell inhibitory rate( $P < 0.05$ ), the interaction between ilomastat and capecitabine was the synergistic effect when the combined concentration was (8+100) $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while the interaction between ilomastat and capecitabine was the additive action when the combined concentration was (40+400) $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; RT-PCR analysis showed that compared with control group, the expression level of MMP-9mRNA in the single ilomastat group and the combination group were both decreased( $P < 0.05$ ), and the expression of MMP-9mRNA in the combination group was lower than that in the single ilomastat group( $P < 0.05$ ); the flow cytometry indicated that the apoptosis rate of hep-2 cell in the single ilomastat group and the single capecitabine group were both higher than that in the control group( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate in the combination group was higher than that in the other groups( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ilomastat combined with capecitabine can obviously enhance the inhibition and apoptosis-induced ability of single drug on laryngeal cancer hep-2 cell, the action mechanism of ilomastat is down-regulation of the expression level of the MMP-9 mRNA.

Key words: laryngeal neoplasms; ilomastat; capecitabine

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类  $\text{Zn}^{2+}$  依赖的蛋白水解酶, 参与细胞外基质的降解与组织重塑, 可降解基底膜从而促进癌细胞的侵袭和转移。伊洛马司他是羟肟酸家族中一种有效的基质金属蛋白酶抑制剂(matrix metallo-proteinase inhibitors, MMPi), 其与存在于所有蛋白酶中的 Zn 原子的活性中心相结合, 从而抑制 MMP 的活性, 进一步抑制癌细胞的侵袭与转移<sup>[1-2]</sup>。本实验通过伊洛马司他、化疗药物卡培他滨两药单独和联合处理喉癌 hep-2 细胞, 观察其对 hep-2 细胞的影响, 并探讨伊洛马司他在抗肿瘤过程中的具体作用机制, 为喉癌的联合化疗提供理论依据。

## 1 材料与方

**1.1 材料** (1)试剂: RPMI1640 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 胰酶, 北京索莱宝科技有限公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司; MTT 购自 Sigma 公司; RT-PCR 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; PI/annexinV 凋亡盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 卡培他滨, 大连美伦医药科技发展有限公司; 伊洛马司他购自美国 Santa Cruz 公司。(2)细胞株: 人喉癌细胞株 hep-2, 购于南京凯基生物科技发展有限公司。将细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养, 其中青霉素、链霉素各 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 长满后用 0.25% 胰酶消化传代。(3)引物: 根据 prime 5.0 软件设计引物, 由金斯瑞生

\* 基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ11361)。 作者简介: 李黎(1987~), 住院医师, 硕士, 主要从事头颈部肿瘤的研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 13037222657; E-mail: zhang\_shaorong@sina.com。

物科技有限公司合成。MMP-9 引物(362 bp)的上游序列为 5'-CGG CAC CTC TAT GGT CCT C-3',下游序列为 5'-CAC TTG TCG GCG ATA AGG AA-3'。内参引物  $\beta$ -actin(434 bp)上游序列为 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3',下游序列为 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3'。

**1.2 甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 hep-2 细胞的抑制率** 取处于对数生长期的 hep-2 细胞,制成单细胞悬液,调整细胞数为  $7.5 \times 10^4$  /mL 接种于 96 孔细胞板,每孔 100  $\mu$ L,待细胞贴壁后加药。伊洛马司他单独作用组给予含伊洛马司他浓度分别为 2.5、5、10、20、40  $\mu$ g/mL 的培养液 100  $\mu$ L;卡培他滨单独作用组给予含卡培他滨浓度分别为 50、100、200、400、800  $\mu$ g/mL 的培养液 100  $\mu$ L,同时设立 DMSO 的阴性对照组、1640 培养基空白对照组。每组每个浓度下设 5 个复孔,培养 24 h 后,每孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT(5 mg/mL),孵育 4 h 后,弃上清液,加入 DMSO,终止反应。微振荡 5 min 后,于酶标仪波长 490 nm 处测吸光度(A)。以上各组实验重复 3 次。抑制率(%)=(1-治疗组 A 值/对照组 A 值)  $\times$  100%。用 SPSS13.0 软件求出 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>50</sub> 值。

MTT 联合用药实验选用两个浓度组:(1)两种药物的 IC<sub>10</sub> 浓度组(即 8  $\mu$ g/mL 伊洛马司他+100  $\mu$ g/mL 卡培他滨),该浓度组细分为 3 组,伊洛马司他+卡培他滨联合浓度(8+0)  $\mu$ g/mL 组、伊洛马司他+卡培他滨联合浓度(100+0)  $\mu$ g/mL 组,伊洛马司他+卡培他滨联合浓度(8+100)  $\mu$ g/mL 组。(2)2 种药物较接近半数抑制度(IC<sub>50</sub>)且小于 IC<sub>50</sub> 的浓度组(40  $\mu$ g/mL 伊洛马司他+400  $\mu$ g/mL 卡培他滨),同(1)中方法细分为 3 组。实验方法同前计算出各组的抑制率。采用 Q 值判断伊洛马司他和卡培他滨联合用药的性质。 $Q = Ea + b / (Ea + Eb - Ea * Eb)$ 。公式中 Ea 代表单药 A 的抑制率,Eb 代表单药 B 的抑制率,Ea+b 代表两药联用的抑制率。 $Q > 1.15$  为两药协同作用,0.85  $\leq Q \leq 1.15$  为相加作用, $Q < 0.85$  为拮抗作用。实验测得的 IC<sub>10</sub> 供后续实验使用。

**1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 hep-2 细胞 MMP-9 mRNA 表达的变化** 取对数生长期的 hep-2 细胞,以每孔  $5 \times 10^4$  的密度接种于 6 孔细胞培养板,待细胞铺满后加药,分为 4 组:(1)伊洛马司他组(8  $\mu$ g/mL);(2)卡培他滨组(100  $\mu$ g/mL);(3)联合用药组(8  $\mu$ g/mL 伊洛马司他+100  $\mu$ g/mL 卡培他滨);(4)对照组(未用药)。培养 24 h 后弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两遍,按 Trizol 试剂盒操作说明书提取细胞总 RNA,并对 RNA 定量测定。取 4  $\mu$ g 总 RNA 为模板,按 HiFi-MMLV cDNA 第 1 链合成试剂盒操作说明书操作,将 RNA 逆转录成 cDNA。以 3  $\mu$ L cDNA 为模板,进行扩增,扩增条件为:94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,60.5  $^{\circ}$ C 退火 60 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s,35 个循环。PCR 扩增产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,通过 Bandleader 软件分析各条带,以目的基因荧光亮度/ $\beta$ -actin 荧光亮度表示 PCR 产物含量。实验重复 3 次,取平均值作为实验结果。

**1.4 流式细胞仪检测 hep-2 细胞的凋亡** 取对数生长期的 hep-2 取对数生长期的 hep-2 细胞,同前药物分组处理 hep-2 细胞,24 h 后按 PI/AnnexinV-FITC 试剂盒操作标记细胞和流式细胞术检测细胞凋亡,每组重复 3 次。细胞凋亡比率 A<sub>1</sub> 按以下公式计算:A<sub>1</sub>(%)=亚二倍峰细胞数/细胞总数  $\times$  100%。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,MTT 单药组内采用单因素方差分析加最小显著差(least significant difference,LSD)法两两比较各浓度的抑制率,MTT 联合实验采用 *t* 检验。RT-PCR 与流式细胞术组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞生长抑制** MTT 法检测各组细胞生长抑制情况,结果表明,hep-2 细胞经不同浓度伊洛马司他、卡培他滨单独处理 24 h 后,细胞生长程度受到不同程度的抑制(表 1、2),且抑制程度依赖于药物剂量的增加,不同浓度抑制率间的差异有统计学意义(伊洛马司他组  $F = 144.167, P < 0.05$ ;卡培他滨组  $F = 60.131, P < 0.05$ )。进一步 LSD 法两两比较各浓度的抑制率,伊洛马司他组中任意浓度间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),卡培他滨组中任意两浓度间差异也均有统计学意义( $P < 0.05$ )。经 SPSS 软件求得伊洛马司他的 10% 的细胞抑制浓度(IC<sub>10</sub>)和 IC<sub>50</sub> 分别为 8  $\mu$ g/mL 和 130  $\mu$ g/mL,卡培他滨的 IC<sub>10</sub> 与 IC<sub>50</sub> 分别为 100  $\mu$ g/mL 和 910  $\mu$ g/mL。在联合用药实验中采用 *t* 检验比较,伊洛马司他+卡培他滨联合浓度(8  $\pm$  100)  $\mu$ g/mL 的抑制率明显高于浓度(8  $\pm$  0)  $\mu$ g/mL 和浓度(0  $\pm$  100)  $\mu$ g/mL,且差异均有统计学意义( $t = 8.421, P < 0.05$ ;  $t = 7.009, P < 0.05$ );联合浓度(40  $\pm$  400)  $\mu$ g/mL 的抑制率也明显高于浓度(40  $\pm$  0)  $\mu$ g/mL 和(0  $\pm$  400)  $\mu$ g/mL,差异均具有统计学意义( $t = 10.226, P < 0.05$ ;  $t = 8.879, P < 0.05$ )。伊洛马司他+卡培他滨联合浓度(8  $\pm$  100)  $\mu$ g/mL 组 Q 值为 1.45,为协同作用;浓度(40  $\pm$  400)  $\mu$ g/mL 组 Q 值为 1.05,为相加作用。

表 1 伊洛马司他对 hep-2 细胞的增殖抑制情况( $\bar{x} \pm s$ )

伊洛马司他用药浓度( $\mu$ g/mL)	A 值	抑制率(%)
2.5	1.154 $\pm$ 0.004	2.85 $\pm$ 0.34
5.0	1.112 $\pm$ 0.005	6.42 $\pm$ 0.44
10.0	1.076 $\pm$ 0.006	9.34 $\pm$ 0.61
20.0	1.012 $\pm$ 0.016	14.67 $\pm$ 1.53
40.0	0.823 $\pm$ 0.039	30.67 $\pm$ 3.05

表 2 卡培他滨对 hep-2 细胞的增殖抑制抑制情况( $\bar{x} \pm s$ )

卡培他滨用药浓度( $\mu$ g/mL)	A 值	抑制率(%)
50	0.177 $\pm$ 0.002	3.24 $\pm$ 0.96
100	0.166 $\pm$ 0.004	9.31 $\pm$ 1.88
200	0.134 $\pm$ 0.005	27.08 $\pm$ 3.12
400	0.118 $\pm$ 0.004	35.54 $\pm$ 2.50
800	0.107 $\pm$ 0.004	41.56 $\pm$ 1.93

**2.2 RT-PCR 检测各组 hep-2 细胞 MMP-9 mRNA 表达的变化** RT-PCR 结果表明,各组均检测到 MMP-9 的表达。半定量行 *t* 检验显示,卡培他滨与正常组相比,MMP-9 的表达差异无统计学意义( $t = 2.570, P > 0.05$ );伊洛马司他组与联合用药组的 MMP-9 mRNA 的表达水平均低于正常组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );并且联合用药组 MMP-9mRNA 的表达水平低于伊洛马司他组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。对照组为 0.557  $\pm$  0.017,伊洛马司他组为 0.484  $\pm$  0.021,卡培他滨组为 0.530  $\pm$  0.006,联合用药组为 0.369  $\pm$  0.002。

**2.3 流式细胞术检测各组 hep-2 细胞凋亡率的变化** hep-2 细胞凋亡率对照组为(9.47  $\pm$  0.81)%,伊洛马司他组为(14.44  $\pm$  1.09)%,卡培他滨组为(16.33  $\pm$  1.20)%,联合用药组为(23.47  $\pm$  1.16)%。经 *t* 检验实验结果显示,伊洛马司他组和卡培他滨组处理 hep-2 细胞 24 h 后,凋亡率均高于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );联合用药组处理 hep-2 细胞 24 h 后,凋亡率高于其他各组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤,浸润和转移是喉癌的主要的生物学特性,也是喉癌患者死亡的主要原因。细胞外基质(ECM)和基底膜(BM)的降解是肿瘤侵袭和转移的首要环节,MMPs 几乎能降解 ECM 中的各种蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,因此在肿瘤侵袭、转移中起关键性作用。而现在喉癌中研究最多最广的是 IV 型胶原酶(MMP-9 和 MMP-2)。MMP-9 属于明胶酶类,它可降解 BM 的主要成分胶原 IV,其能与整合素结合从而促进肿瘤细胞的生长,调节肿瘤细胞黏附性和运动能力;也能促进肿瘤细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)加速肿瘤转移<sup>[3-4]</sup>。最新研究还发现,MMP-9 可切割蛋白连接蛋白-1(PN-1)来调控肿瘤的转移<sup>[5]</sup>。MMPIs 是当前抗肿瘤药物中很有发展前景的一类,从来源可分为天然和人工合成两大类。组织基质金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 的天然抑制剂,其和 MMPs 的表达不平衡在喉癌的浸润和转移过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。合成的 MMPIs 主要是设计来抑制肿瘤细胞产生的 MMPs 的致癌潜能,目前主要有马立马司他, BAY129566, 伊洛马司他等。

有关基质金属蛋白酶及其抑制剂在肿瘤中的研究在国内外已见较多报道,例如 Sun 等<sup>[7]</sup>研究发现,由病毒介导的 RNA 干扰 MMP-9 基因沉默可以抑制喉鳞状细胞癌浸润和生长;李为等<sup>[8]</sup>认为 TIMP-1 的表达和肿瘤的发生具有明显的负相关性;Almholt 等<sup>[9]</sup>也发现采用伊洛马司他(GM6001)处理的乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因小鼠与安慰剂处理的小鼠相比,乳腺癌的平均转移量减少了至少 10 倍。

化疗药物卡培他滨是一种氟尿嘧啶氨甲酸酯类药物,它是氟尿嘧啶(5-FU)的前体,口服后以完整药物形式经肠黏膜进入肝脏,并转化为细胞毒性成分 5-FU,起到靶向性杀伤肿瘤细胞作用,具有高效、低毒的特点<sup>[10]</sup>,其存在的问题是单药卡培他滨在治疗癌症时的效果并不太满意。

在本实验中使用人工合成 MMPIs 伊洛马司他、卡培他滨单独和联合处理喉癌 hep-2 细胞。伊洛马司他又名 GM6001,一种羧氨酸修饰的二肽,可抑制 MMP-1,-2,-3,-8,-9 的活性<sup>[2,11]</sup>。它不但能可逆性结合蛋白酶中含锌离子的活性区,直接抑制蛋白酶的活性,还可抑制 MMPs 前体转化为有活性的 MMPs,从而抑制肿瘤的浸润与转移。实验结果显示伊洛马司他和卡培他滨单独用药 24 h 后都可抑制喉癌 hep-2 细胞的生长,且呈现浓度依赖性。当伊洛马司他药物浓度从 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  成倍增加至 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,它对 hep-2 细胞的抑制率逐渐增加,此药的  $\text{IC}_{10}$  与  $\text{IC}_{50}$  分别为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 130  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;化疗药物卡培他滨药物剂量从 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  成倍增加至 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,它对 hep-2 细胞的抑制率也随之增加,此药物的  $\text{IC}_{10}$  与  $\text{IC}_{50}$  分别为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 910  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在伊洛马司他联合卡培他滨用药 24 h 后发现,其对 hep-2 细胞的抑制率在相同剂量下明显高于两种药物单独用药 24 h,且伊洛马司他与卡培他滨联合用药(8+100) $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组中两药为协同作用,(40+400) $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组中为相加作用,这说明伊洛马司他联合卡培他滨对 hep-2 细胞的抑制效应强于二者单独用药,且在低浓度时具有协同作用。同时,作者使用流式细胞术检测喉癌 hep-2 细胞的凋亡,为避免非凋亡性杀伤的细胞太多造成流式细胞仪检测碎片太多,作者选取两种药物的  $\text{IC}_{10}$  浓度进行检测,作用 24 h 后显示伊洛马司他和卡培他滨单独用药都可诱导 hep-2 的凋亡过程,两种药物联合作用后,hep-2 细胞凋亡的程度明显增加。这表明,伊洛马司他不但可以抑制 hep-2 细胞的增殖,还可诱导其

凋亡,从而抑制喉癌的发生、发展;并且伊洛马司他联合卡培他滨用药对 hep-2 细胞的影响明显优于其单独用药。

此外,本研究中采用 RT-PCR 检测喉癌 hep-2 细胞中 MMP-9 mRNA 表达水平,发现 MMP-9 mRNA 在 hep-2 细胞中表达阳性,当伊洛马司他  $\text{IC}_{10}$  浓度单独用药 24 h 后,hep-2 细胞中 MMP-9 mRNA 的表达水平下降。兰菁等<sup>[12]</sup>在宫颈癌 HCE1 多细胞球体浸润人脐静脉内皮单层细胞模型中得到与本研究类似的结果,GM6001 干预后的宫颈鳞癌 HCE1 多细胞球体 MMP-9 的表达明显降低。这表明伊洛马司他对 hep-2 细胞的生长抑制、诱导细胞凋亡作用以及联合卡培他滨用药的作用,可能与下调 MMP-9 mRNA 的表达,抑制 MMP-9 的活性有关。本实验还发现卡培他滨不能降低 MMP-9 mRNA 的表达水平,但当两种药物在  $\text{IC}_{10}$  浓度联合作用时,MMP-9 mRNA 的表达水平不仅明显低于对照组,且低于伊洛马司他单独用药组,提示卡培他滨虽然对 MMP-9 mRNA 的表达水平没有影响,但很有可能可促进伊洛马司他对 MMP-9 mRNA 活性的抑制作用,这也进一步说明两药物在  $\text{IC}_{10}$  浓度联合作用时具有协同作用。

综上所述,伊洛马司他与卡培他滨联合用药可明显增强单药对喉癌 hep-2 细胞的抑制效应和诱导细胞凋亡作用,同时推测伊洛马司他的作用机制可能是下调 MMP-9 的表达水平,从而抑制喉癌的浸润和转移。这些都提示 MMPI 伊洛马司他有可能作为临床化疗药物良好的辅助药物,为喉癌和其他恶性肿瘤的联合药物治疗提供了一定的实验依据。但是,伊洛马司他和卡培他滨联合应用的不良反应是否减少,最为适合的配比剂量,在临床上实现的可能性还有待进一步实验研究。

### 参考文献:

- [1] Galardy RE, Galardin[J]. *Drugs Future*, 1993, 18(12): 1109-1111.
- [2] Grobely D, Poncz L, Galardy RE. Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids [J]. *Biochemistry*, 1992, 31(20): 7152-7154.
- [3] Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche, et al. Structural properties of matrix metalloproteinases [J]. *Cell Mollife Sci*, 1999, 55(4): 639-652.
- [4] Suarez-Cuetwo C, Merrell MA, Watson I, et al. Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(6): 525-533.
- [5] Xu D, McKee CM, Cao Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1 [J]. *Cancer research*, 2010, 70(17): 6988-6998.
- [6] 孟粹达,徐艳萍. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与喉癌的浸润和转移 [J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 31(3): 174-177.
- [7] Sun Y, Liu M, Yang B, et al. Inhibition of laryngeal cancer cell invasion and growth with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human MMP-9 gene [J]. *Cancer invest*, 2008, 26(10): 984-989.
- [8] 李为,刘卫卫,白文忠,等. MMP-7 和 TIMP-1 在喉癌中的表达 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2007, 14(7): 406.
- [9] Almholt K, Juncker-Jensen A, Lorum(下转第 3274 页)

触,进而发挥其免疫杀伤作用。

本研究还发现,在鼻咽癌中女性患者 FoxP3<sup>+</sup> Treg 数量高于男性患者,这提示了不同个体间激素差异可能影响 FoxP3 合成或表达。从肿瘤细胞的分化程度上来看,分化型鼻咽癌组以 FoxP3 低表达为主,而未分化型鼻咽癌组以 FoxP3 高表达为主,这提示分化型癌细胞和未分化型癌细胞可能通过不同的机制影响 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞的增殖,而且,未分化型鼻咽癌患者体内的免疫抑制状态较分化型鼻咽癌更强,更有利于癌细胞逃避机体的抗肿瘤免疫作用,从而促进肿瘤的进一步发展。此外,本研究还发现,FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞数量与临床分期无关,提示了 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞介导的免疫抑制作用可能是在肿瘤发生的早期,而随着疾病的进展,Treg 细胞的作用并非是维持肿瘤免疫逃逸或促进其继续发展的决定性因素。

本实验结果中鼻咽癌的癌巢、间质中 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞表达不相关,差别无统计学意义( $P>0.05$ )。这与 Zhang 等<sup>[11]</sup>和 Yip 等<sup>[12]</sup>在鼻咽癌中的研究结果相一致。而张艳芳等<sup>[13]</sup>提出在食管癌的间质中 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞表达呈负相关。由此可以推测,在不同器官的肿瘤组织中,FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞之间作用机制可能不同。

综上所述,本研究证实了 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞增加现象存在于鼻咽癌组织中,且与患者性别和癌组织分化程度相关,但 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量并未对患者临床分期及转移等参数产生影响,也未见 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量之间存在简单的数量对应关系。因鼻咽部与外界环境密切接触,可能有其他因素如空气污染或感染等因素影响癌组织中 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量及功能状态,故应扩大研究样本量以及增加观察参数指标,并采用更为科学准确的定量研究方法,进一步深化研究 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞在鼻咽癌发生和发展中的作用。

#### 参考文献:

- [1] Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34(2): 173-179.
- [2] Paul S, Michael P, Fabienne G, et al. Tumor-infiltrating FoxP3<sup>+</sup> regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(2): 186-192.
- [3] Raoul D, Inti Z, Ergin K, et al. Differential pattern and prognostic significance of CD4<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular

breast cancers[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 134.

- [4] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12): 3623-3633.
- [5] Alexandar T, Cecile M, Petra H, et al. Correlation of high numbers of intratumoral FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma [J]. *Haematologica*, 2008, 93(2): 193-200.
- [6] Ninke L, Marloes J, Gooden M, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(3): 449-459.
- [7] Sylvain L, Francois M, Francois G, et al. Prognostic role of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells infiltrating human carcinomas, the paradox of colorectal cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(7): 909-918.
- [8] Cao XF. Regulatory T cells and immune tolerance to tumors [J]. *Immunol Res*, 2010, 46(1/3): 79-93.
- [9] Christian P, Paolo A, Peter H, et al. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell levels in patients with melanoma [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9(7): 2551-2559.
- [10] Curiel TJ, Coukos G, Iou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege reduced survival [J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(9): 942-949.
- [11] Zhang YL, Li J, Mo HY, et al. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 4.
- [12] Yip WK, Abdullah MA, Yusoff SM, et al. Increase in tumour-infiltrating lymphocytes with regulatory T cell immunophenotypes and reduced Zeta-chain expression in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 155(3): 412-422.
- [13] 张艳芳, 李印, 郭伟华, 等. CD8<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞在食管癌中表达及与预后的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(12): 1615-1617.

(收稿日期: 2013-03-20 修回日期: 2013-05-22)

(上接第 3271 页)

- OD, et al. Metastasis is strongly reduced by the matrix metalloproteinase inhibitor Galardin in the MMTV-PymT transgenic breast cancer model [J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2008, 7(9): 2758-2767.
- [10] 万钟, 姚月华, 钟瑜, 等. 长春瑞滨联合卡培他滨治疗难治性鼻咽癌的临床观察 [J]. *中国实用医药*, 2009, 4(34): 30-31.
- [11] Hao JL, Nagano T, Nakamura M, et al. Galardin inhibits

collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases [J]. *Exp Eye Res*, 1999, 68(5): 565-572.

- [12] 兰菁, 吴宜林. GM6001 对宫颈鳞癌 HCE1 多细胞球体浸润人脐静脉内皮细胞的影响 [J]. *中南大学学报*, 2010, 35(8): 868-874.

(收稿日期: 2013-03-12 修回日期: 2013-05-22)