

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.009

# FTY720 联合吉西他滨对非小细胞肺癌肿瘤相关细胞株增殖和凋亡作用的研究

曲智锋,徐远,王培

(河南科技大学第一附属医院放疗科,河南洛阳 471003)

**[摘要]** **目的** 探讨 FTY720 与吉西他滨用药对人非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤细胞株 A549 和 H520 增殖和凋亡的影响作用。**方法** 分别选取 0、2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 FTY720 对体外培养得到 NSCLC 细胞株 A549 及 H520 做干预影响,于培养 24、48、72 h 后分别检测吸光度值,观察各浓度条件下 FTY720 对 A549 及 H520 的抑增殖作用;对 A549 及 H520 细胞株加分别单独加 7  $\mu\text{mol/L}$  FTY720 和 0.2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨及 37  $\mu\text{mol/L}$  FTY720 结合 0.2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨,观察各组细胞培养 48 h 后抑制和凋亡差异。**结果** 不同浓度 FTY720 抑制 NSCLC 细胞株 A549、H520 增殖,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),FTY720 对 NSCLC 细胞株 A549、H520 的增殖抑制作用和浓度、时间具有相关性,FTY720 联合吉西他滨抑制 A549、H520 细胞增殖和凋亡率显著强于两种药品的单独使用( $P < 0.05$ )。**结论** FTY720 联合吉西他滨可显著抑制人 NSCLC 细胞株 A549 及 H520 的增殖,并可有效促进癌细胞凋亡的作用,临床价值较高。

**[关键词]** FTY720;吉西他滨;A549;h520;细胞增殖;细胞凋亡

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2334-03

## Study on effect of FTY720 combined with gemcitabine on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer tumor-related cell-lines

Qu Zhifeng, Xu Yuan, Wang Pei

(Department of Radiotherapy, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of FTY720 and gemcitabine on the proliferation and apoptosis of H520 and A549 cells in non-small cell lung cancer(NSCLC) cell line. **Methods** The interventional influence on the in vitro cultured NSCLC A549 and H520 cells was performed by selecting 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{mol/L}$  concentrations of FTY720, then the absorbance value was detected at 24, 48, 72 h after culture and the proliferation inhibiting effects of FTY720 on A549 and H520 were observed under the condition of different concentration of FTY720; adding single 7  $\mu\text{mol/L}$  of FTY720, single 0.2  $\mu\text{mol/L}$  gemcitabine and 37  $\mu\text{mol/L}$  FTY720 combined with 0.2 mol/L gemcitabine into A549 and H520 cells lines, then the differences of inhibition and apoptosis after 48 h in the cells of each group were observed. **Results** The inhibitory effect of different concentrations of FTY720 on NSCLC A549 and H520 cell lines was statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). The proliferation inhibiting effect of FTY720 on NSCLC H520 and A549 cell lines had the correlation with the concentration and time. The apoptosis rate of FTY720 combined with gemcitabine on A549 and H520 cells was significantly higher than that of single use in these two drugs ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** FTY720 combined with gemcitabine can significantly inhibit the proliferation of A549 and H520 in human NSCLC, and can effectively promote the apoptosis of cancer cells, and has the higher clinical value.

**[Key words]** FTY720; gemcitabine; A549; H520; cell proliferation; apoptosis

目前肺癌逐渐发展成了一种很常见的肺部恶性肿瘤,且非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌患者的 80%<sup>[1]</sup>,发病率在持续增高。约 60% NSCLC 患者被确诊,大部分已经处于癌症 III 或 IV 期,治疗难度极高,造成较高病死率。在临床中,多选择铂类药物联合化疗用于救治晚期 NSCLC 患者,虽可有效地提高生存率,但患者预后仍较差,其 5 年生存率仍小于 15%<sup>[2-4]</sup>。本文探讨 FTY720 与吉西他滨用药对人 NSCLC 肿瘤细胞株 A549 和 H520 增殖和凋亡的影响作用。现报道如下。

### 1 材料与方

**1.1 实验材料** 注射用盐酸吉西他滨来自 Lilly France S. A. 公司,批准文号是 H20100301;胎牛血清、RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司;Ficool 淋巴细胞分离液购自北京鼎国生物公司;人肺癌细胞株 A549 和 H520 生产厂家为美国派普泰克公司;FTY720 HCl 试剂购由北京乐博生物科技有限公司提供,

Alarma Blue 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒由南京凯基生物科技发展有限公司生产;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒由北京索莱宝科技有限公司生产。

**1.2 实验方法** **细胞培养:**将 A549 及 H520 细胞株分别滴入 10% 浓度胎牛血清加 1% 浓度 RPMI 1640 调配培养液,置入 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱培养 3 d,取出滴入 25% 胰酶和 1% 浓度 EDTA 做消化传代培养,取对数生长期贴壁细胞。

**增殖计数:**在 A549 和 H520 在对数生长期,将  $4 \times 10^3$  / 孔细胞密度接种在 96 孔培养板孔内,分别在 A549 和 H520 中添加 0、2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$  FTY720,培养时间为 1、2、3 d, A549 和 H520 都设置 5 复孔,实验组和对照组要分别在 A549 内添加 7  $\mu\text{mol/L}$  FTY720、0.2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨和 7  $\mu\text{mol/L}$  FTY720 结合 0.2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨, H520 内添加 7  $\mu\text{mol/L}$  FTY720、0.2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨和 7  $\mu\text{mol/L}$  FTY720 结合 0.2

μmol/L 吉西他滨;空白组不实行以上过程。培养 3 d。在药物产生作用的前 1 h 加入 CCK-8 溶液,在 1 h 测定后各培养板孔 A450,试验次数是 3 次。

细胞凋亡计数: NSCLC 细胞 A549 及 H520 在对数生长期,实验选择 6 孔培养板,通过类似的细胞增值计数方式来添加 FTY720 和吉西他滨,培养时间是 3 d,凋亡检测试剂盒要按照说明书实行,使用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡检测。

**1.3 指标的计算** 计算体外培养人 NSCLC 细胞株 A549 及 H520 抑制率的公式为<sup>[5]</sup>: A549 和 H520 肿瘤细胞生长抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

细胞存活率(%)=(实验 OD 值-空白 OD 值)/(对照 OD 值-空白 OD 值)×100%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多种浓度间对比分析采用单因素方差,组间两两比较检验是 SNK-*q*,组间计量资料对比使用两组独立样本 *t* 检验;计数资料采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 FTY720 对体外培养的人 NSCLC 细胞株 A549 的抑制作用观察** 同一培养时间内不同浓度下 FTY270 对 A549 细胞株的抑制作用不同( $P < 0.05$ ),同一种浓度下 FTY720 不同培养时间对 A549 细胞株的抑制作用不同( $P < 0.05$ ),FTY720 对体外培养的人 NSCLC 细胞株 A549 细胞株的增殖抑制作用具有浓度、时间依赖关系。见表 1。

**表 1 不同浓度 FTY720 对 A549 细胞株的抑制率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

FTY720(μmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
2	14.05±1.76*	18.58±1.51*#	21.25±2.06*#
4	23.92±1.88*	24.89±1.66*#	31.14±2.14*#
6	30.75±1.92*	35.58±1.67*#	51.24±2.28*#
8	35.26±1.96*	60.21±1.72*#	71.48±2.39*#
10	50.24±1.99*	73.28±1.86*#	82.35±2.47*#

\*:  $P < 0.05$ ,与前一浓度 FTY720 比较;#:  $P < 0.05$ ,同前一培养时间比较。

**2.2 FTY720 对体外培养的人 NSCLC 细胞株 H520 的抑制作用观察** 不同浓度 FTY270 对于体外培养人 NSCLC 细胞株 H520 产生的抑制效果不同( $P < 0.05$ ),相同浓度的 FTY720 体外培养人 NSCLC 细胞株 H520 在经过不同的培养时间抑制率不等( $P < 0.05$ ),FTY720 对体外培养人 NSCLC 细胞株 H520 增殖抑制作用和药物的浓度、时间等存在一定的关系。见表 2。

**2.3 两药单用或联合对 A549 细胞株、H520 细胞株抑制率影响** 分别实行对 A549 和 H520 细胞株加上 FTY720(7 μmol/L)结合吉西他滨(0.2 μmol/L)及单纯使用 7 μmol/L FTY720、0.1 μmol/L 吉西他滨的 48 h 培养,得知 FTY720 联合吉西他滨对 A549、H520 细胞抑制效果显著优于两种药品单独使用( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 两药单用或联合对 A549、H520 细胞株细胞凋亡效果** 分别对 A549 及 H520 细胞株加以 7 μmol/L FTY720 联合 0.2 μmol/L 吉西他滨和单独 7 μmol/L FTY720、0.2 μmol/L 吉西

他滨培养 48 h,得知 FTY720 联合吉西他滨作用于 A549、H520 细胞株细胞凋亡率显著高于两种药品单独使用的效果( $P < 0.05$ )。见表 4。

**表 2 不同浓度 FTY720 对体外培养的人 NSCLC 细胞株 H520 的抑制率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

FTY720(μmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
2	7.74±1.52*	18.82±1.76*#	26.31±2.25*#
4	13.32±1.63*	20.23±1.87*#	38.84±2.27*#
6	17.74±1.84*	32.22±1.78*#	48.87±2.31*#
8	23.41±1.81*	38.85±1.77*#	64.88±2.34*#
10	28.49±1.82*	56.38±1.82*#	79.21±2.42*#

\*:  $P < 0.05$ ,与前一浓度 FTY720 比较;#:  $P < 0.05$ ,同前一培养时间比较。

**表 3 FTY720 与吉西他滨单用或联合对 A549、H520 细胞株抑制率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

细胞种类	吉西他滨	FTY720	FTY720 结合吉西他滨
A549	54.14±4.18	41.75±4.28	75.56±3.21*
H520	35.96±3.78	56.38±4.32	78.24±2.92*

\*:  $P < 0.05$ ,与 FTY720 或吉西他滨单独应用时比较。

**表 4 FTY720 与吉西他滨单用或联合对 A549、H520 细胞株凋亡率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

细胞种类	吉西他滨	FTY720	FTY720 结合吉西他滨
A549	22.41±4.12	13.86±3.69	51.74±4.28*
H520	26.84±5.14	23.85±4.02	77.43±3.89*

\*:  $P < 0.05$ ,与 FTY720 或吉西他滨单独使用比较。

**3 讨 论**

多数的 NSCLC 患者被确诊为肺癌时,均已处于癌症 III b 及 V 期<sup>[6]</sup>。此时已经失去了最佳的手术机会,因此晚期患者主要采用化疗治疗。吉西他滨是新一代抗代谢抗癌药物,可通过细胞内脱氧胞嘧啶核苷激酶磷酸化,生成二、三磷酸双氟胞苷等抗癌活性物,同时具有细胞内浓度自增强的特点,具有独特高效抗癌作用,主要应用于临床肺癌、卵巢癌等癌症治疗中。NSCLC 无论吉西他滨联合用药还是单药治疗,化疗效果始终不理想,且 NSCLC 晚期单药治疗效果仅为 20%~27%,限制其临床应用。因此寻找有效治疗方案,增强对吉西他滨药物敏感性,对改善患者预后意义重大。

FTY720 是由冬虫夏草提取研制的一种硝铵醇类物质 ISP-1,在氢链上会引入苯环以及羟烷基后改造制成的新型药物,具有高效免疫抑制作用,可与常规免疫抑制剂如西罗莫司、环孢素等联合应用,通过协同作用增强免疫抑制作用,且多种肿瘤细胞系均具有较好抑制作用。本次试验发现,FTY720 对肺癌细胞的增殖有明显抑制作用,2 μmol/L 的 FTY720 作用在 A549 细胞 2 d 后就能发挥增殖抑制作用,细胞的存活率为(82.38±3.80)%;而 10 μmol/L 的 FTY720 在 2 d 后,存活率仅为(19.23±1.41)%。并且还说明了 FTY720 对肺癌细胞的增殖抑制作用存在显著的时间和剂量的依赖。

经过此次研究,不同浓度的 FTY270 对体外培养的人 NSCLC 细胞株 A549 的抑制作用不同,同一种浓度下 FTY720

下体外培养的人 NSCLC 细胞株 A549 不同培养时间的抑制率不同,FTY720 对体外培养的人 NSCLC 细胞株 A549 的增殖抑制作用具有浓度、时间依赖关系。因此认为 FTY720 对体外培养人 NSCLC 细胞株 H520 增殖抑制作用和药物的浓度、时间等存在一定的关系。此外,FTY720 联合吉西他滨对 A549、H520 细胞抑制效果显著优于两种药品单独使用( $P < 0.05$ )

综上所述,FTY720 联合吉西他滨可显著抑制人 NSCLC 细胞株 A549 及 H520 的增殖,并可有效促进癌细胞凋亡的作用,临床价值较高。但是此次研究还存在一定的不足,未对 FTY720 和吉西他滨协同抑癌机制实行进一步的研究,需要开展进一步的探究。

## 参考文献

- [1] Sugiura K, Hagihara A. FTY720 stimulated ROS generation and the Styl/Atf1 signaling pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Genes Cells*, 2014, 19(4):325-337.
- [2] Grler MH. The role of sphingosine 1-phosphate in immunity and sepsis[J]. *Am J Clin Exp Immunol*, 2012, 1(2): 90-100.
- [3] Stepkowski M, Khattar R. Novel sphingosine-1-phosphate receptor modulator KRP203 combined with locally delivered regulatory T cells induces permanent acceptance of pancreatic islet allografts[J]. *Transplantation*, 2013, 95(7):919-927.
- [4] 谭文华,刘巍. FTY720 对卵巢癌细胞增殖的影响及其机制研究[J]. *实用癌症杂志*, 2015, 30(1):13-16.
- [5] 楼君,盛誉. 晚期非小细胞肺癌患者手术标本人源核苷酸平衡转运体 1 蛋白表达与吉西他滨化疗敏感度的相关性分析[J]. *中国医药*, 2015, 10(2):165-169.
- [6] Emmanuelle B, David O. BZM055, an Iodinated radiotracer candidate for PET and SPECT imaging of myelin and FTY720 brain distribution[J]. *Chem Med Chem*, 2011, 6(4):667-677.
- [7] 宿濛,秦宝丽. DC-CIK 技术联合奥沙利铂、吉西他滨化疗治疗进展期中央型非小细胞肺癌的临床研究[J]. *现代仪器与医疗*, 2015, 20(2):31-34.
- [8] Dargahi M, Asle-Rousta Z. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide induced impairment of spatial learning and memory in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(3):524-532.
- [9] 罗田应. 胸腺肽  $\alpha 1$  对非小细胞肺癌患者免疫功能及 CY-FRA21-1 水平的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2015, 32(2): 166-168.
- [10] 肖宇,曹宝山. 尼妥珠单抗对不同化疗药物在肺癌 PC9 细胞中敏感性的影响及其机制[J]. *中国肺癌杂志*, 2015, 17(2):98-103.
- [11] Liao YC, Li ZG. Mechanisms of ROS in U266 cell death induced by FTY720[J]. *J experiment hematol*, 2013, 21(3):643-646.
- [12] 安富荣,王淑萍. 晚期非小细胞肺癌一线治疗新药阿法替尼[J]. *中国药师*, 2015, 18(1):136-138.
- [13] Zeng SM, Zhang YX. FTY720, a sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor modulator, protects sinusoid endothelial cells from radiation injury in vitro[J]. *Hepato Int*, 2015, 9(1):149-154.
- [14] Chun Y, Kihara M. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8[J]. *British J Pharmacol*, 2014, 171(15):3575-3594.
- [15] 楼君,盛誉. 人类平衡型核苷转运蛋白 1 高表达晚期非小细胞肺癌患者术后应用不同剂量吉西他滨治疗的临床效果观察[J]. *中国医药*, 2015, 10(1):8-12.
- [16] Han CS, Garris VA. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: trafficking and beyond[J]. *Immunol*, 2014, 142(3):347-53.
- [17] Rodrigues JR, Vasconcelos MR. Adenovirus vector-induced CD8 T effector memory cell differentiation and recirculation, but not proliferation, are important for protective immunity against experimental *Trypanosoma cruzi* Infection[J]. *Human Gene Therapy*, 2014, 25(4):350-363.
- [18] Yang Guangwei, Liu Yujing. Targeting S1P1 receptor protects against murine immunological hepatic injury through myeloid-derived suppressor cells[J]. *J Immunol*, 2014, 192(7):3068-3079.
- [19] Raffai G, Wang RY. The immunosuppressant FTY720 prolongs survival in a mouse model of diet-induced coronary atherosclerosis and myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(2):132-143.
- [20] 曲莉莉,刘晓晴. 胞浆-5'-核苷酸酶-II 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 5(1):56-60.
- [21] Pfeilschifter A, Cai F. Coadministration of FTY720 and rt-PA in an experimental model of large hemispheric stroke-no influence on functional outcome and blood-brain barrier disruption[J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2013, 5(1):11.
- [22] 张敏. 细胞水平验证 FTY720 对非小细胞肺癌增殖及凋亡的影响与浓度的关系[D]. 哈尔滨:哈尔滨医科大学, 2014.
- [23] 张淑芳,方芳. FTY720 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及 Bax/Bcl-2 基因表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 10(1):141-143.
- [24] Grech S, Baldacchino C. Deregulation of the phosphatase, PP2A is a common event in breast cancer, predicting sensitivity to FTY720[J]. *EPMA J*, 2014, 5(1):3.
- [25] Dudek L, Wang S. FTY720 (s)-phosphonate preserves sphingosine 1-phosphate receptor 1 expression and exhibits superior barrier protection to FTY720 in acute lung injury[J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(3):189-199.