

# 紫杉醇抗人骨肉瘤作用的实验研究

许小涛,吴晓芳,张一桥

## Experimental Study of Paclitaxel against Human Osteosarcoma

XU Xiao-tao, WU Xiao-fang, ZHANG Yi-qiao

Department of Oncology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

**Abstract:** **Objective** To study the effect and mechanism of paclitaxel against human osteosarcoma. **Methods** The effects of paclitaxel on human osteosarcoma cell line MG-63, fresh osteosarcoma specimens and nude mice with osteosarcoma were assessed by MTT test, morphologic observation and flow cytometry (FCM). **Results** The cytotoxicity of paclitaxel against human osteosarcoma was in a time and dose-dependent manner. Paclitaxel induced apoptosis with bcl-2 phosphorylation, and this could be decreased by caspase inhibitors. **Conclusion** The cytotoxicity of paclitaxel against human osteosarcoma maybe helpful to chemotherapy.

**Key words:** Paclitaxel; Osteosarcoma; Cytotoxicity; Apoptosis

**摘要:**目的 研究紫杉醇抗骨肉瘤作用及其机制。方法 应用 MTT 法、形态学观察、AO/EB 染色、流式细胞术等方法观察和检测紫杉醇对人骨肉瘤细胞系 MG-63、新鲜骨肉瘤组织块及荷瘤裸鼠的毒性作用和 bcl-2、bax 基因的表达变化。结果 紫杉醇对骨肉瘤细胞具有毒作用,呈现一定的时间和剂量依赖性,并能下调 bcl-2 基因的表达,诱导骨肉瘤细胞凋亡,caspase 抑制剂能部分阻断此种过程。结论 紫杉醇抗骨肉瘤作用明显,可用于骨肉瘤化疗。

**关键词:**紫杉醇;骨肉瘤;细胞毒作用;凋亡

中图分类号:R738.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)06-0333-03

## 0 引言

紫杉醇作为一种新型抗肿瘤药物已广泛用于临床,在乳腺癌、卵巢癌、肺癌等恶性肿瘤的治疗中具有明确疗效<sup>[1]</sup>,但少见应用于骨肿瘤的治疗。本实验观察和检测紫杉醇对人骨肉瘤细胞系和新鲜骨肉瘤组织块的作用,探讨其机制及应用于骨肉瘤化疗的可能性。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验用人骨肉瘤细胞系 MG-63 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心;骨肉瘤新鲜组织标本为本院 2002 年 3 月~2003 年 6 月手术标本,共 12 例,均经病理诊断证实。紫杉醇为美国百时美施贵宝公司生产,商品名泰素(Taxol);bcl-2 及 bax 单克隆抗体为 Dako 公司产品;Z-VAD-FMK、Z-DEVD-FMK 及四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品;小牛血清及 DMEM 培养基均为 Gibco 公司产品;流式细胞仪为 BD 公司产品。

**1.2 细胞培养** MG-63 细胞进行常规培养,生长至对数期后,加入 PBS 液稀释紫杉醇至所需浓度,观察加入紫杉醇 12h、24h、36h、48h 的细胞形态变

化,行 AO/EB 染色及流式细胞术检测。重复 100nmol 紫杉醇 2 组,加入紫杉醇后分别加入 100nmol 的 Z-VAD-FMK 和 Z-DEVD-FMK,培养 24h 后行 AO/EB 染色及流式细胞术检测。

**1.3 扫描电镜** 制作目的细胞爬片后扫描电镜观察。

**1.4 组织标本处理** 新鲜瘤组织去除血凝块及坏死部分,剪成 1mm<sup>3</sup> 大小用 DMEM 培养基培养于平皿内,加紫杉醇至所需浓度,对照组加等体积 PBS,24h 后收集瘤细胞悬液行 FACS 分析。

**1.5 AO/EB 染色** AO/EB 染色 10min 后用荧光显微镜观察计数 200 个细胞:具有正常核的活细胞(VN);具有凋亡核的活细胞(VA);具有正常核的死细胞(NVN);具有凋亡核的死细胞(NVA)。按下式计算凋亡指数、坏死细胞百分率和死细胞百分率:

$$\text{凋亡细胞百分率(凋亡指数)} = \frac{(VA + NVA)}{(VN + VA + NVN + NVA)} \times 100\%$$

$$\text{坏死细胞百分率} = \frac{NVN}{(VN + VA + NVN + NVA)} \times 100\%$$

$$\text{死细胞百分率} = \frac{(NVN + NVA)}{(VN + VA + NVN + NVA)} \times 100\%$$

**1.6 MTT 检测** MG-63 细胞生长至对数期后加以不同浓度紫杉醇,以加等体积 PBS 为对照,分别

收稿日期:2004-05-18;修回日期:2004-11-16

作者单位:430060 武汉大学人民医院肿瘤诊疗中心

培养 12h、24h、36h、48h 后每孔加入 5mg/ml MTT 溶液 20μl 后在酶联免疫检测仪上测定各孔 A<sub>490</sub>, 计算不同浓度紫杉醇对 MG-63 细胞的抑制率。

细胞抑制率 = (对照组平均 A<sub>490</sub> - 实验组平均 A<sub>490</sub>) / 对照组平均 A<sub>490</sub> × 100 %

1.7 流式细胞术检测细胞周期和 bcl-2、bax 基因的表达 收集六孔板内实验组和对照组细胞, 处理后上样行 FACS 分析。bcl-2、bax 基因表达的检测按试剂说明书标记抗体后上样, 以标记上荧光的细胞为阳性, 计算阳性细胞占总计细胞的百分比。

1.8 统计学处理 测得数据用均数 + 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 SAS V 6.12 统计软件行 t 检验或方差分析。

2 结果

2.1 形态学观察 倒置显微镜下可见 10nmol 紫杉醇处理 12h 后的细胞, 其折光性发生改变, 部分细胞体积变小; 24h 后出现细胞皱缩, 贴壁能力差, 细胞体积更小, 细胞核固缩, 约 10 % 的细胞变圆飘浮; 36h 后上述变化更加明显, 飘浮细胞更多; 48h 后细胞体积普遍明显变小, 胞质浓缩, 大量细胞变圆飘浮, 见图 1。AO/EB 染色显示 10nmol 紫杉醇处理 12h 后开始有凋亡细胞出现, 多数细胞形态有轻度萎缩; 24h 后出现较多凋亡细胞, 活细胞萎缩明显, 见图 2。扫描电镜显示大多数细胞呈球形, 不很牢固地附着在其生长的基质上, 细胞表面有微绒毛。这符合 G<sub>2</sub>/M 期的表现, 见图 3。

2.2 紫杉醇下调 bcl-2 基因表达诱导 MG-63 细胞凋亡, 见图 4。

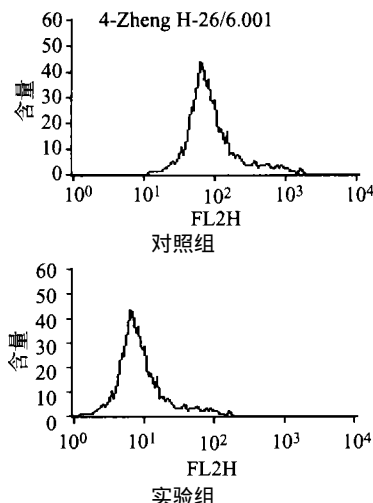


图 4 可见 bcl-2 表达主峰明显右移

2.3 紫杉醇对 MG-63 的细胞毒作用在一定范围内呈现明显的时间和剂量依赖性 本实验各组细胞培养到 48 h 以后直至 72 h, 不再有明显变化。紫杉醇

浓度增大到 5000 nM 的数据与 1000nM 的差异不具显著性, 见表 1。

表 1 不同浓度紫杉醇作用 MG-63 细胞不同时间的细胞毒作用比较

时间 (h)	紫杉醇浓度 (nmol/L)	细胞凋亡率 (%)	细胞抑制率 (%)	bcl-2/ bax
12	1	3.9 ± 2.4 *	6.1 ± 1.9	4.712
	10	5.6 ± 1.9	9.1 ± 1.3	4.433
	100	11.7 ± 1.1	29.9 ± 2.9	1.537
	1000	28.3 ± 1.5 *	39.4 ± 1.8 *	3.331
24	1	7.1 ± 3.1	11.4 ± 3.7 *	4.363
	10	8.2 ± 1.1	13.3 ± 1.1	4.181
	100	25.1 ± 3.2	73.0 ± 5.2	1.466 *
	1000	37.1 ± 2.2	79.1 ± 1.2	1.092 *
36	1	7.7 ± 1.7	14.4 ± 8.8	3.993
	10	11.6 ± 2.1 *	25.8 ± 3.1	3.349
	100	32.7 ± 1.4	76.1 ± 5.1	1.250
	1000	43.8 ± 5.4	84.9 ± 4.7 *	0.921
48	1	11.8 ± 3.6	19.3 ± 4.7 *	3.253 *
	10	12.1 ± 1.4	26.9 ± 2.3	3.211
	100	41.4 ± 3.8	81.8 ± 2.1	0.991
	1000	54.1 ± 2.8 *	86.6 ± 5.8	0.682 *

注: \* 表示 P < 0.05。

2.4 caspase 抑制剂的作用 具有多种 caspase 抑制作用的 Z-VAD-FMK 和特异性抑制 caspase3 的 Z-DEVD-FMK 分别使 MG-63 在 100nM 紫杉醇 24h 的凋亡率由 25.1 % 降到 1.9 % 和 8.2 %, 而坏死细胞数无显著变化。

2.5 紫杉醇对骨肉瘤细胞周期的影响 紫杉醇对骨肉瘤组织和 MG-63 显示出显著的 G<sub>2</sub> 阻滞作用, 见图 5, 并且有一定的时间和剂量依赖性, 见表 2、表 3, 而且 G<sub>2</sub> 阻滞作用所需的紫杉醇浓度远低于其诱导相同百分比的凋亡的浓度。骨肉瘤组织块在紫杉醇作用下的细胞周期变化结果与表 2 结果数据很相近, 未另表列出。

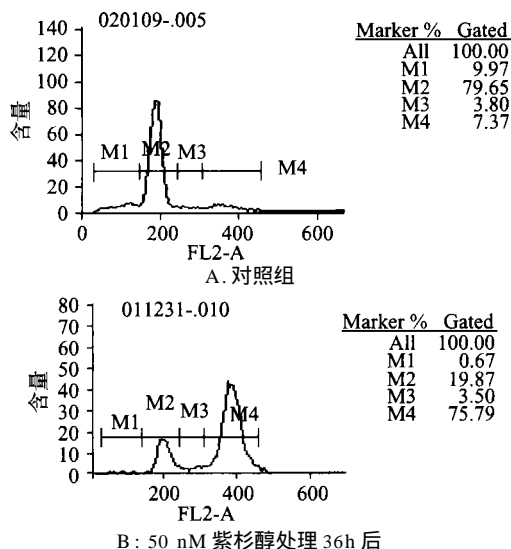


图 5 紫杉醇的 G<sub>2</sub> 阻滞作用 (未洗去死亡细胞的计数)

表 2 骨肉瘤细胞在不同浓度紫杉醇作用 24h 后周期分布( %)

紫杉醇浓度 (nM)	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	58.8 ±6.1	27.5 ±2.9	13.7 ±1.8
25	11.8 ±3.6	40.1 ±3.9	49.7 ±3.1
50	8.9 ±3.6	27.8 ±7.4	63.3 ±4.1
75	8.2 ±0.8	16.6 ±4.7	75.2 ±9.6
100	5.6 ±0.7	11.4 ±2.5	83.0 ±6.8

注:数据表述为均数 ±标准差,  $P<0.01$

表 3 骨肉瘤细胞在 50 nM 紫杉醇作用不同时间的周期分布( %)

时间 (h)	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	55.7 ±4.7	29.4 ±3.2	14.9 ±1.1
12	11.9 ±2.3	35.8 ±5.6	52.3 ±3.7 *
24	8.9 ±3.6	27.8 ±7.4	63.3 ±4.1 *
36	6.9 ±0.7	20.3 ±1.2	71.8 ±9.7
48	3.5 ±1.7	13.6 ±3.1	82.9 ±7.5

注:数据表述为均数 ±标准差,  $P<0.01$ , \*  $P<0.05$

3 讨论

新辅助化疗对提高骨肉瘤患者的五年生存率至为重要,但应用历史相对其他恶性肿瘤较短,化疗药种类不多。新药筛选和克服多药耐药成为当前两个关键性问题。紫杉醇通过抑制微管解聚而干扰有丝分裂纺锤体装配,使肿瘤细胞染色体分裂失败<sup>[2]</sup>。这种独特的作用机制使其对部分耐常规药物的肿瘤治疗具有较好的疗效,对骨肉瘤效果如何令人关注。本实验证实紫杉醇对人骨肉瘤细胞系 MG63、新鲜骨肉瘤组织均具有诱导凋亡的效应,这种效应在 0~48h、1~1 000nM 范围内呈现明显的时间和剂量依赖性。紫杉醇抑制荷瘤裸鼠肿瘤生长进一步验证了其对于骨肉瘤的价值。这进一步证实紫杉醇可用于骨肉瘤化疗。

bcl-2 基因家族位于线粒体膜,在调节细胞凋亡中起着重要作用。bcl-2 蛋白能阻断线粒体释放细胞色素 C,抑制细胞凋亡,bcl-2 蛋白磷酸化后失去其抗凋亡能力。bax 蛋白则与 bcl-2 蛋白功能相反,可促进细胞凋亡。两者都在凋亡进程早期发挥调节作用。肿瘤细胞受到凋亡诱导因子刺激后是否启动后续凋亡进程取决于 bcl-2 蛋白/bax 蛋白的比率<sup>[3]</sup>。当 bax 蛋白增加时,形成 bcl-2 蛋白与 bax 蛋白的同二聚体,加速细胞凋亡;bcl-2 蛋白增加时则形成 bcl-2 蛋白与 bax 蛋白的异二聚体,抑制细胞凋亡。本实验表明,随着紫杉醇浓度的增加和作用时间的延长,bcl-2 表达下降,bax 表达上升,bcl-2/bax 比率下降,这可能是紫杉醇诱导骨肉瘤细胞凋

亡的机制之一。

诱导细胞凋亡是化疗和放疗杀伤肿瘤细胞的主要机制,肿瘤细胞对凋亡的抑制则是产生多药耐药的重要原因,阐明化疗药诱导凋亡的过程将为合理安排化疗组合以进一步提高疗效提供理论基础。目前,凋亡信号通过级联反应激活半胱天冬酶(caspase)系列最终实现凋亡的途径正在受到特别的关注<sup>[4]</sup>。在本实验中 2 种 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 和 Z-DEVD-FMK 都能显著抑制紫杉醇诱导的细胞凋亡,说明在这种药物诱导的凋亡中,通过 caspase 实现的途径占主要部分。Z-DEVD-FMK 特异性抑制 caspase-3,而 Z-VAD-FMK 能抑制多种 caspase,所以后者比前者显示出更加显著的效应。

紫杉醇对肿瘤细胞周期的影响不仅在于诱导凋亡,其独特的 G<sub>2</sub> 期阻滞作用是一个很重要的特点<sup>[5]</sup>。本研究发现紫杉醇对骨肉瘤 MG63 细胞的 G<sub>2</sub> 期阻滞作用所需的紫杉醇浓度远低于其凋亡的浓度。在 50nmol 作用 36h 后,洗去已经死亡的漂浮细胞,在尚存活的细胞中,被阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期的占 75.79%,而且这种阻滞作用也具有浓度依赖性。也就是说更高的药物浓度将导致更高比例的细胞发生 G<sub>2</sub> 阻滞。本实验最高达到了 85.9% 的高阻滞率。在放疗与细胞周期的相关研究中已经证明 G<sub>2</sub>/M 期的细胞对射线最敏感,而 G<sub>1</sub> 期的细胞敏感性较差,S 期的细胞则放疗不敏感<sup>[6]</sup>。这就意味着紫杉醇很可能对骨肉瘤具有放疗增敏作用,值得进一步研究。

(本文图 1~3 见封 3)

参考文献:

[1] Downs LS Jr, Judson PL, Argenta PA, et al. A phase I study of ifosfamide, paclitaxel, and carboplatin in advanced and recurrent cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003, 95 (2) : 347-351.

[2] Poivier VJ, Hershey AE, Burgess KE, et al. Efficacy and toxicity of paclitaxel for the treatment of canine malignant tumors[J]. J Vet Intern Med, 2004, 18 (2) : 219-222.

[3] Leung LK, Wang TT. Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax[J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 55 (1) : 73-83.

[4] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5 (11) : 897-907.

[5] Serra M, Scotlandik, Manara MC, et al. Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2001, 48 (4) : 254-264.

[6] 徐万鹏,冯传汉. 骨科肿瘤学[M]. 第 1 版. 北京:人民军医出版社,2001. 235-245.

[编辑:周永红;校对:安 凤]

紫杉醇抗人骨肉瘤作用的实验研究

(正文见 333 页)

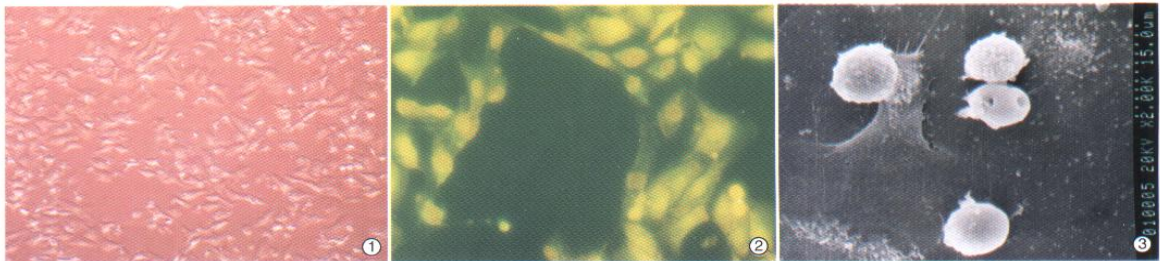


图 1 10nM 紫杉醇处理 48h 后对 MG-63 细胞的细胞毒作用  
图 2 紫杉醇处理 24h 后诱导 MG-63 细胞凋亡，凋亡细胞数增加  
图 3 G2 期 MG-63 细胞扫描电镜 (× 2000)

肝左叶纤维板层型肝细胞癌 1 例

(正文见 353 页)

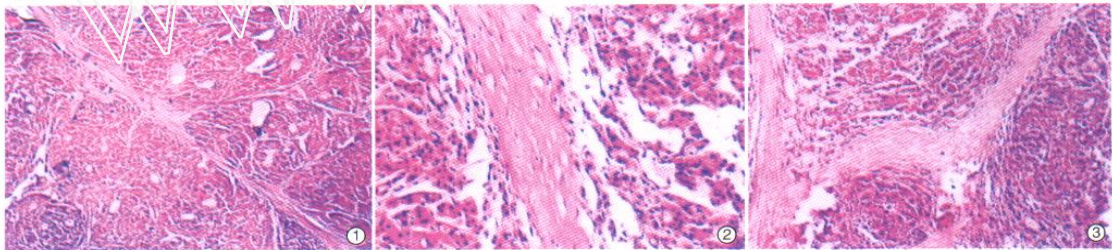


图 1 癌细胞呈团、梁状排列 (HE × 20)  
图 2 癌细胞多角形、胞浆丰富，颗粒状，伊红染色深；胞核多形，染色质集中于核周，呈囊泡样，核仁明显，可见核分裂 (HE × 100)  
图 3 癌巢间可见呈板层排列的纤维基质，富含血管 (HE × 40)

巢式 RT-PCR 扩增 CK20、MMP-7 诊断大肠癌淋巴结微转移的初步研究

(正文见 346 页)



图 1 大肠淋巴结转移性腺癌 (微小转移)(× 200)

E- 上皮钙黏附素和 PTEN 在胆管癌中的表达

(正文见 364 页)

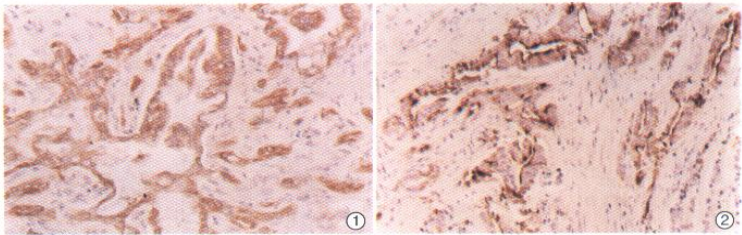


图 1 胆管癌组织 ED 免疫组织化学阳性染色 (CSA × 200)  
图 2 胆管癌组织 PTEN 免疫组织化学阳性染色 (CSA × 200)