

5-氮杂胞苷增强阿霉素对神经母细胞瘤细胞的抗癌活性

刘建秋¹, 李爱敏¹, 张继红²

(1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院儿科, 山东 烟台 264000;
2. 中国医科大学盛京医院血液研究室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘 要] 目的 许多神经母细胞瘤细胞系及肿瘤组织标本中 caspase-8 表达缺失, caspase-8 基因沉寂的主要原因是其启动子区域高度甲基化。该文探讨去甲基化药物 5-氮杂胞苷对 caspase-8 表达及对化疗药阿霉素抗人神经母细胞瘤细胞作用的影响及其影响机制。方法 应用 RT-PCR 方法检测 5-氮杂胞苷作用前后 SH-SY5Y 细胞中 caspase-8 mRNA 水平变化。MTT 分析研究 5-氮杂胞苷与化疗药阿霉素联合应用前后人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的存活率, 以及加入 caspase-8 活性抑制剂后存活率的变化。结果 RT-PCR 方法发现 SH-SY5Y 细胞株不表达 caspase-8 mRNA, 5-氮杂胞苷作用 3 d 后可检测到 caspase-8 mRNA 表达, 5 d 后表达较第 3 天增加; 5-氮杂胞苷与不同浓度阿霉素(0.05, 0.1, 0.25, 0.5 $\mu\text{g/mL}$)联合应用后 SH-SY5Y 细胞存活率为(77.61 $\pm$ 7.30)%, (57.35 $\pm$ 6.64)%, (46.25 $\pm$ 4.46)%, (35.59 $\pm$ 5.12)%, 同一浓度单独应用阿霉素组细胞存活率为(94.89 $\pm$ 4.15)%, (80.60 $\pm$ 8.50)%, (64.48 $\pm$ 4.92)%, (52.32 $\pm$ 6.71)%, 5-氮杂胞苷与阿霉素联用组细胞存活率明显低于单用阿霉素组, 差异均有显著性。caspase-8 抑制剂组与同一浓度的 5-氮杂胞苷 + 阿霉素组比较, 细胞存活率明显增加, 依次为(92.95 $\pm$ 3.48)%, (78.39 $\pm$ 4.28)%, (62.31 $\pm$ 6.50)%, (49.92 $\pm$ 5.77)%, 差异均有显著性。结论 阿霉素对神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 具有增殖抑制作用, 5-氮杂胞苷可以增强阿霉素的抗癌活性。其发生机制可能是通过上调 caspase-8 mRNA 的表达而实现的。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(6): 577-579]

[关键词] 神经母细胞瘤; caspase-8; 5-氮杂胞苷; 阿霉素; 细胞系

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)06-0577-03

5-azacytidine enhances anti-tumor efficacy of doxorubicin to neuroblastoma cell lines

LIU Jian-Qiu, LI Ai-Min, ZHANG Ji-Hong. Department of Pediatrics, Yantai Yuhuangding Hospital, School of Medicine, Qingdao University, Yantai, Shandong 264000, China (Li A-M, Email: liaimin652002@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective The loss of casepase-8 expression correlates with unfavorable survival outcomes in neuroblastoma (NB). Caspase-8 gene inactivation is caused by methylation. This study aimed to explore the effect of the demethylation agent 5-azacytidine on casepase-8 expression and whether 5-azacytidine can increase the sensitivity of chemotherapy drug doxorubicin to NB cells. **Methods** Caspase-8 mRNA expression in NB cell lines (SH-SY5Y cells) was examined by RT-PCR before and after 5-azacytidine treatment. Survival rates of SH-SY5Y cells were detected using MTT analysis and compared among the doxorubicin alone treatment, 5-azacytidine along with doxorubicin treatment, and caspase-8 inhibitor + 5-azacytidine + doxorubicin treatment groups. **Results** Caspase-8 mRNA was not expressed in untreated SH-SY5Y cell lines. Caspase-8 mRNA expression in SH-SY5Y cells was detectable 3 days after 5-azacytidine treatment, and increased significantly 5 days after 5-azacytidine treatment ($P < 0.05$). Survival rates of SH-SY5Y cells treated with 5-azacytidine along with different concentrations of doxorubicin (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 $\mu\text{g/mL}$) were (77.61 $\pm$ 7.30)%, (57.35 $\pm$ 6.64)%, (46.25 $\pm$ 4.46)% and (35.59 $\pm$ 5.12)%, respectively, which were significantly lower than those treated with doxorubicin alone (94.89 $\pm$ 4.15%, 80.60 $\pm$ 8.50%, 64.48 $\pm$ 4.92% and 52.32 $\pm$ 6.71%) ($P < 0.01$). Caspase-8 inhibitor pretreatment resulted in an increased survival rate of SH-SY5Y cells (92.95 $\pm$ 3.48%, 78.39 $\pm$ 4.28%, 62.31 $\pm$ 6.50% and 49.92 $\pm$ 5.77%) compared with the 5-azacytidine + doxorubicin treatment group. **Conclusions** 5-azacytidine may enhance anti-tumor efficacy of doxorubicin to NB cell lines, possibly through an up-regulation of caspase-8 mRNA expression. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6): 577-579]

Key words: Neuroblastoma; Caspase-8; 5-azacytidine; Doxorubicin; Cell line

[收稿日期] 2006-11-20; [修回日期] 2007-02-10
[基金项目] 烟台市科学技术计划项目(2004221)。
[作者简介] 刘建秋, 女, 大学, 副教授。主攻方向: 小儿血液肿瘤及呼吸系统疾病。
[通讯作者] 李爱敏, 教授, 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院儿科, 邮编: 264000。

业已发现,许多神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)细胞系中存在 caspase-8 不表达或表达减弱^[1],而 caspase-8 表达水平是决定 NB 病人能否长期存活的独立预后因素^[2],caspase-8 表达减弱或缺失的 NB 病人预后不良。据报道^[3,4]甲基化是 caspase-8 基因失活的主要原因。去甲基化药能逆转某些肿瘤细胞 caspase-8 基因的高甲基化状态,上调 caspase-8 的表达^[5]。本文选择了缺乏 caspase-8 表达的 NB 细胞株 SH-SY5Y,探讨去甲基化药 5-氮杂胞苷能否恢复 caspase-8 的表达,进而提高 NB 细胞对化疗药阿霉素的敏感性。

1 材料和方法

1.1 材料

SH-SY5Y NB 细胞系由美国国立癌症研究所希尔教授提供。四甲基偶氮唑蓝(美国 Sigma 公司);5-氮杂胞苷、阿霉素(美国 ICN 产品);caspase-8 特异性抑制剂 z-IETD-fmk(美国 Santa Cruz 产品)。caspase-8-mRNA 引物由美国国立癌症研究所希尔教授提供,序列为:caspase-8a:5'-TTC CCT TTC CAT CTC CTC CT-3', caspase-8 s:5'-GGT CAC TTG AAC CTT GGG AA-3',产物为 390 bp。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养 人 NB 细胞株 SY5Y 培养于含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 IU/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,培养条件为 37℃、5% CO₂ 培养箱中。实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 MTT 分析 先用 5-氮杂胞苷(2.5 μm/L)预处理 SY5Y 细胞 3 d,然后加不同浓度的阿霉素作用 24 h;另组提前用 caspase-8 特异性抑制剂 z-IETD-fmk 预处理 1 h 后再加不同浓度的阿霉素作用 24 h;用不加 5-氮杂胞苷组为对照。每个组均设 4 个复孔,作用结束后,加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL,培养 4 h 后,每孔加 150 μL DMSO(二甲基亚砷),震荡 15 min,于 1 h 内在酶标仪上分别测出波长 570 nm 处的吸光度值。各组细胞存活率(%)=(实验组吸光度/对照组吸光度)×100%。

1.2.3 caspase-8-mRNA 的检测 采用 RT-PCR 方法。将培养的细胞用 Trizol 提取总 RNA。逆转录合成 cDNA 第一链取总 RNA 2 μL 用于 cDNA 第一链的合成,操作步骤根据 RT-PCR 试剂盒说明进行。PCR 产物及内参照 β-actin、DNA Mark DL 2000 在 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,经凝胶成像分析系统摄影,扫描 PCR 产物强度,以 caspase-8 密度/β-actin 密度比值表示 caspase-8-mRNA 相对含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析。实验结果以均数±标准差表示。

2 结果

2.1 5-氮杂胞苷对阿霉素抗 SY5Y 细胞活性的影响

由表 1 可见,5-氮杂胞苷单独应用对 SY5Y 细胞增殖无明显影响,阿霉素对 SY5Y 细胞有增殖抑制作用。5-氮杂胞苷预处理后加入不同浓度阿霉素的实验组细胞存活率明显降低,与同一浓度单独用阿霉素组比较差异均有统计学意义。

2.2 caspase-8 抑制剂对 5-氮杂胞苷+阿霉素作用下的 SY5Y 细胞存活率的影响

5-氮杂胞苷预处理 3 d 后提前 1 h 加入和不加 caspase-8 特异性抑制剂再加阿霉素共同作用 24 h,阿霉素对 SY5Y 细胞存活率的影响见表 2。由表 2 可见,caspase-8 抑制剂预处理组 SY5Y 细胞的存活率明显增加,与同一浓度阿霉素+5-氮杂胞苷组比较差异均有统计学意义。

2.3 5-氮杂胞苷作用前后 caspse-8 mRNA 表达的变化

RT-PCR 半定量分析显示 5-氮杂胞苷诱导前未检测到 caspse-8 mRNA 表达(相对比值<0.5 认为不表达)。5-氮杂胞苷(2.5 μM/L)处理 SY5Y 细胞第 3 天后检测到 caspse-8 mRNA 表达,第 5 天 caspase-8 mRNA 水平较第 3 天明显升高。

表 1 5-氮杂胞苷应用前后阿霉素对 SY5Y 细胞存活率的影响 (%)

药物	阿霉素(μg/mL)				
	0	0.05	0.1	0.25	0.5
对照组	100 ± 4.58	94.89 ± 4.15	80.60 ± 8.50	64.48 ± 4.92	52.32 ± 6.71
5-氮杂胞苷	99.67 ± 5.51	77.61 ± 7.30	57.35 ± 6.64	46.25 ± 4.46	35.59 ± 5.12
t	0.119	4.12	4.37	5.49	3.96
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表2 caspase-8 抑制剂对 5-氮杂胞苷 + 阿霉素作用下的 SY5Y 细胞存活率的影响 (%)

药物	阿霉素(μg/mL)				
	0	0.05	0.1	0.25	0.5
5-氮杂胞苷	99.67 ± 5.51	77.61 ± 7.30	57.35 ± 6.64	46.25 ± 4.46	35.59 ± 5.12
加抑制剂组	98.29 ± 4.59	92.95 ± 3.48	78.39 ± 4.28	62.31 ± 6.50	49.92 ± 5.77
<i>t</i>	0.38	3.79	5.32	4.08	3.72
<i>P</i>	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05

表3 5-氮杂胞苷作用不同时间 caspase-8 mRNA 表达的变化(电泳密度相对值)

组别	caspase-8 mRNA 相对含量
5-氮杂胞苷(0 d)	0.271 ± 0.012
5-氮杂胞苷(1 d)	0.391 ± 0.017
5-氮杂胞苷(3 d)	0.858 ± 0.054
5-氮杂胞苷(5 d)	1.246 ± 0.111 ^a
<i>F</i>	51.94

a 与 3 d 组比较, *P* < 0.05

3 讨论

神经母细胞瘤(NB)是起源于胚胎期神经嵴细胞的儿童恶性肿瘤。阿霉素是治疗 NB 的主要药物,但阿霉素易产生骨髓抑制并存在严重的心脏毒性,而且由于药物耐药的产生,严重影响了其治疗效果^[6]。如何调整其药物剂量、减少毒副作用及提高疗效成为 NB 治疗中的重要课题。

阿霉素对 NB 细胞的诱导凋亡机制在 S-型细胞与 N-型细胞中有所不同,在 S-型 NB 细胞中是 caspase 依赖性的,在 N-型细胞中是 caspase 非依赖性的^[7]。本文以 N-型 NB 细胞株 SY5Y 为研究对象,实验结果显示随着阿霉素浓度的增加,对 SY5Y 细胞的抗瘤作用逐渐增强,这表明阿霉素对 SY5Y 细胞有诱导凋亡作用,而 SY5Y 细胞株缺乏 caspase-8 表达^[8]。caspase 家族是细胞凋亡过程的关键元件,caspase-8 是起始 caspase , caspase-8 活化后能够引发 caspase 蛋白酶解级联反应,最后激活其效应物 caspase-3 发生生物效应。故阿霉素对 SY5Y 细胞的诱导凋亡作用可能是 caspase 非依赖性的,有文献报道^[9] NF-κB 在阿霉素对 N-型 NB 细胞的诱导凋亡过程中发挥了重要作用。

我们用去甲基化药 5-氮杂胞苷处理 SY5Y 细胞,发现 caspase-8 mRNA 水平明显升高,同时用 MTT 分析发现提前用 5-氮杂胞苷处理后再加阿霉素组对细胞的杀伤作用明显高于单用阿霉素组。表明 5-氮杂胞苷可以增强阿霉素对 NB 细胞 SY5Y 的杀伤作用。我们认为 5-氮杂胞苷提高了化疗药阿霉素对 NB 细胞的敏感性,其机制可能为 5-氮杂胞苷诱导了 caspase-8 的表达,从而激活了 caspase 依

赖途径,增加了细胞的凋亡。所以我们在 5-氮杂胞苷作用 3 d 后提前加入 caspase-8 特异性抑制剂再加阿霉素,结果 5-氮杂胞苷与阿霉素的联合诱导凋亡作用被 caspase-8 特异性抑制剂所阻断。进一步证明 5-氮杂胞苷是通过诱导 caspase-8 表达,激活了 caspase 依赖途径,使阿霉素的诱导凋亡作用放大,从而提高了阿霉素对 NB 细胞的敏感性。故阿霉素和 5-氮杂胞苷联合应用在 NB 的治疗中可能有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

[1] Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression[J]. Cancer Res, 2001, 61(4):1314-1319.

[2] Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, Rorke LB, Phillips PC, Shalaby T, et al. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(17):6401-6409.

[3] Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, et al. Deregulation of caspase-8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines[J]. Cancer Res, 2002, 62(20):5897-5901.

[4] Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Inda MM, Alonso ME, Arjona D, Aminoso C, et al. Deletion and aberrant CpG island methylation of caspase 8 gene in medulloblastoma[J]. Oncol Rep, 2004, 12(3):663-666.

[5] Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Patti M, Bartucci M, et al. Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction[J]. Cancer Res, 2005, 65(24):11469-11477.

[6] Wu J, Harris NL, Inqe TH. Nuclear factor-kappa B and apoptosis inducing factor activation by doxorubicin analog WP744 in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. J Surg Res, 2004, 122(2):231-239.

[7] Hopkins-Donaldson S, Yan P, Bourloud KB, Muhlethaler A, Bodmer JL, Gross N. Doxorubicin-induced death in neuroblastoma does not involve death receptors in S-type cells and is caspase-independent in N-type cells[J]. Oncogene, 2002, 21(39):6132-6137.

[8] Ribas J, Gomez-Arbonex X, Boix J. Caspase-8/10 are not mediating apoptosis in neuroblastoma cells treated with CDK inhibiting drugs[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 524(1-3):49-52.

[9] Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Fenq Z, Porter AG, et al. NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(52):48921-48929.

(本文编辑:吉耕中)