

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.08.003

吉西他滨诱导人 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株 SNK-6 凋亡的机制

曹 玲,张明智,胡彦伟,张旭东,孙素珂,文建国

Apoptosis of NK/T Lymphoma Cell Line SNK-6 Induced by Gemcitabine

CAO Ling,ZHANG Mingzhi,HU Yanwei,ZHANG Xudong,SUN Suke,WEN Jianguo

Department of Oncology, Institute of Clinical Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding Author: ZHANG Mingzhi, E-mail: mingzhi_zhang@126.com

Abstract: Objective To investigate the apoptosis induced by gemcitabine in human NK/T lymphoma cell line SNK-6. **Methods** MTT, DNA fragmentation and flow cytometry (FCM) analysis were used to detect apoptosis of SNK-6 cells induced by gemcitabine. A human apoptosis microarray containing 88 cDNA fragments was used to detect apoptosis related genes expression difference. **Results** Gemcitabine could inhibit the growth rate of SNK-6 cells after 48h treatment in a concentration-dependent manner. DNA ladder was observed on DNA electrophoresis and its intensity increased with the increased concentration of gemcitabine. FCM assay revealed that apoptosis cells respectively accounted for 2.1%, 8.3%, 23.9%, 30.9% of total cells respectively after exposure to 2 μ g/ml gemcitabine for 4, 8, 24, 48 h. cDNA microarray analysis identified 4 up-regulated and 13 down-regulated genes with more than three-fold change in the first 48h as a consequence of treatment. **Conclusion** Gemcitabine can induce apoptosis of human NK/T lymphoma cell line SNK-6 cells in a time-dependent and concentration-dependent manner and alter the expression profile of apoptosis-related genes in this cell line, which provides valuable insight into the mechanism of the gemcitabine-induced apoptosis.

Key words: Lymphoma; Gemcitabine; Apoptosis

摘 要:目的 探讨吉西他滨诱导人 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株 SNK-6 产生凋亡的机制。**方法** 应用 MTT 法、DNA 电泳技术及流式细胞术观察吉西他滨诱导人 SNK-6 细胞凋亡情况,应用基因芯片技术分析加药前后凋亡相关基因的表达差异。**结果** 吉西他滨作用后,MTT 结果显示细胞生长抑制率随药物浓度的增加而逐渐增大;DNA 断裂电泳可见典型的梯形 DNA 条带,随吉西他滨作用浓度的增加而逐渐增强;流式细胞术分析,2 μ g/ml 吉西他滨作用 SNK-6 细胞 4、8、24、48 h 后,凋亡细胞比例分别为 2.1%、8.3%、23.9%、30.9%;吉西他滨作用 48 h 后,在 88 条有关凋亡的目的基因中共有 17 条基因表达发生大于 3 倍的显著变化,其中表达上调基因 4 条,下调基因 13 条。**结论** 吉西他滨可以诱导人 NK/T 细胞淋巴瘤细胞产生凋亡,呈时间和剂量依赖性;吉西他滨可使 SNK-6 细胞中多个凋亡相关基因的表达发生改变,初步揭示了其诱导淋巴瘤细胞凋亡的作用机制。

关键词: 淋巴瘤;吉西他滨;细胞凋亡

中图分类号: R73-3;R733.4 **文献标识码:** A

0 引言

吉西他滨(gemcitabine,GEM)是 80 年代末合成的一种新型脱氧胞苷类似物,有较强的细胞毒性和独特的自我增强机制,被广泛用于实体瘤的治疗,

是非小细胞肺癌、胰腺癌及乳腺癌的一线化疗药物^[1-3]。目前在恶性淋巴瘤中也有相关研究,并且单药或联合应用在复发及难治恶性淋巴瘤中有肯定的疗效^[4]。凋亡已被证实是多种肿瘤细胞死亡的重要机制之一,而关于吉西他滨与淋巴瘤细胞凋亡之间的关系却未见报道。本实验拟通过观察吉西他滨作用于人结外鼻 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株 SNK-6 后是否产生凋亡及凋亡特征,为 NK/T 细胞淋巴瘤的研究及吉西他滨的临床应用提供一定的实验依据。

收稿日期:2013-01-07;修回日期:2013-04-18
基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172118)
作者单位:450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科
河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室
通信作者:张明智,E-mail:mingzhi_zhang@126.com
作者简介:曹玲(1985-),女,硕士在读,主要从事淋巴瘤的分子研究

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及其培养 SNK-6 细胞为人结外鼻 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株,为本实验室长期保存。用含 10% 人 AB 血清、100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、1 000 u/ml 白介素 2(欣吉尔)的 RPMI1640 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和度的培养箱内常规培养,2~3 天换液,5~6 天传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.1.2 试剂及药物 RPMI1640 培养液为 Solarbio 公司产品;人 AB 血清由河南省中心血站提供;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物;RNA 提取试剂盒购自天根生物;反转录试剂盒购自 Fermentas;凋亡相关基因 PCR 芯片及服务来自常州楚天生物;吉西他滨为江苏豪森公司产品,以 PBS 配制成 2 mg/ml 储存液,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法 取对数生长期的细胞,按 2×10^4 /孔接种于 96 孔培养板,加入吉西他滨,使终浓度分别为 200、20、2、0.2 和 0.02 μ g/ml,每组设三个复孔,并设对照孔,置入培养箱 48 h 后,每孔加入新鲜配制的 0.5% MTT 20 μ l 作用 4 h,出现蓝色结晶,弃上清液,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μ l,振荡 10 min 溶解,用酶联免疫检测仪于 490 nm 波长测定吸光度(A)值并计算细胞存活率。细胞存活率 = 实验孔平均值/对照组平均值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 吉西他滨诱导 SNK-6 凋亡 待细胞生长至对数生长期,放置 4 $^{\circ}$ C 1 h,使细胞生长同步化;根据 MTT 结果,用 4 ml 含 2 μ g/ml 吉西他滨的培养液作用细胞 48 h,移去药液,洗净药液后换培养液继续培养 12 h。

1.2.3 DNA 断裂分析 取不同浓度吉西他滨作用 48 h 的细胞,分别离心收集 2×10^6 细胞,按如下步骤操作:PBS 洗 2 遍,移入 1.5 ml EP 管中,离心去上清液,加入 50 μ l 细胞裂解液(10.0 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10.0 mmol/L NaCl, 10.0 mmol/L EDTA, 100 μ g/ml 蛋白酶 K, 1% SDS),混匀,37 $^{\circ}$ C 保温至混合物变清亮。12 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至另一洁净 EP 管中,以等体积的苯酚/氯仿(1:1),苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿各抽提 1 次。在上清液中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的冰无水乙醇,于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。于 -10 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,将沉淀溶于 20 μ l TE 缓冲液,并加入 1 μ l RNase(10 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 保温 1 h。加入 4 μ l 样品缓冲液,混匀,1.8% 琼脂糖凝胶电泳 40 min,紫外线透视仪下观察。

1.2.4 双染法流式细胞术(FCM) 收集对数生长期细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 /ml,接种于 6 孔培养板,每孔 2 ml。于细胞培养箱中培养 24 h 后用新鲜培养液换液,用吉西他滨 2 μ g/ml 作用 SNK-6,药物处理时间 4、8、24、48 h 进行处理,调整细胞数为 5×10^5 /ml,共 2 ml,1 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃上清液。预冷 PBS 洗涤细胞两次,1 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃上清液。用 400 μ l $1 \times$ Annexin V 结合液悬浮细胞,浓度大约为 1×10^6 /ml。在细胞悬液中加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色液,轻轻混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 15 min 后加入 10 μ l PI 染色液,混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪检测,吸取细胞数为 10 000~15 000 个。

1.2.5 RNA 提取及反转录 收集 5×10^6 个细胞/组,1 000 r/min 离心 5 min,加入 1 ml 裂解液,室温放置 5 min 后 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清液,转入一个新的无 RNA 酶的离心管中;加入 200 μ l 氯仿,盖好管盖振荡器振荡 15 s,室温放置 3 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,把含 RNA 的上层水相移至新管;缓慢加入 0.5 体积的无水乙醇,混匀,转入吸附柱中,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 30 s,弃废液,往吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 30 s,弃废液;漂洗液洗两遍并晾干硅胶膜;然后加入无 RNA 酶水洗脱 RNA。配置变性液:反转录引物 1 μ l、总 RNA 1 μ l、无 RNA 酶水 10 μ l 置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅 5 min,迅速放冰上,反应体系:变性液 12 μ l、5 $\times$ 缓冲液 4 μ l、RNA 酶抑制剂 1 μ l、10MMdNTP 2 μ l、反转录酶 1 μ l 共 20 μ l;反应条件:42 $^{\circ}$ C 60 min、70 $^{\circ}$ C 5 min 4 $^{\circ}$ C 停止。

1.2.6 凋亡相关基因 PCR 芯片检测 将反转录所得空白对照组及凋亡组 cDNA 低温邮寄至常州楚天生物,重复实验三次,获得吉西他滨诱导凋亡相关基因。“凋亡相关基因 PCR 芯片”将与凋亡相关的 88 个基因专一性引物分别固定在 96 孔 PCR 板中,并包括 6 个参比基因(B2M/ACTB/GAPDH/RPL27/HPRT1/OAZ1)、一个 PCR 正对照和一个基因组 DNA 对照。参比基因用于 PCR 芯片数据的标准化,PCR 正对照用于 PCR 质控,基因组 DNA 对照用于检测纯化的 RNA 样品中可能存在的残余基因组 DNA。利用荧光定量 PCR 对同一个样本重复检测三次。

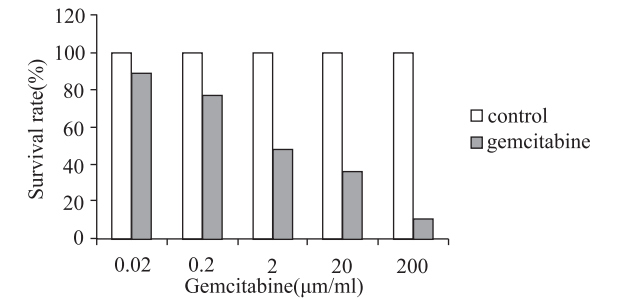
1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 软件进行。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间细胞存活率比较用 χ^2 检验;计量资料多组间比较用单因素方差分析(ANOVA 检验);凋亡率与时间的相关性分析采用 Pearson 相关系数分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉西他滨对 SNK-6 细胞的生长抑制作用

MTT 法检测吉西他滨作用 SNK-6 细胞 48h 后的生长情况,与对照组相比,吉西他滨对 SNK-6 细胞的生长具有明显抑制作用($P<0.05$),且随药物浓度的增加逐渐增强,见图 1。



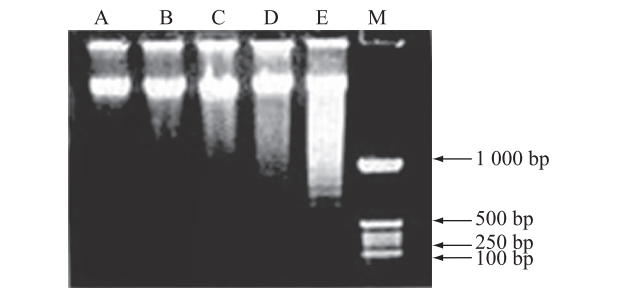
Compared with the control group, gemcitabine has obvious inhibitory effect on SNK-6, $P<0.05$

图 1 不同浓度吉西他滨对 SNK-6 细胞的生长抑制作用

Figure 1 The inhibition of SNK-6 by the increased concentration of gemcitabine

2.2 凋亡细胞的 DNA 断裂

不同浓度吉西他滨均可诱导 SNK-6 细胞发生典型的梯形 DNA 条带,并且随吉西他滨浓度的增加梯形条带越来越明显,见图 2。



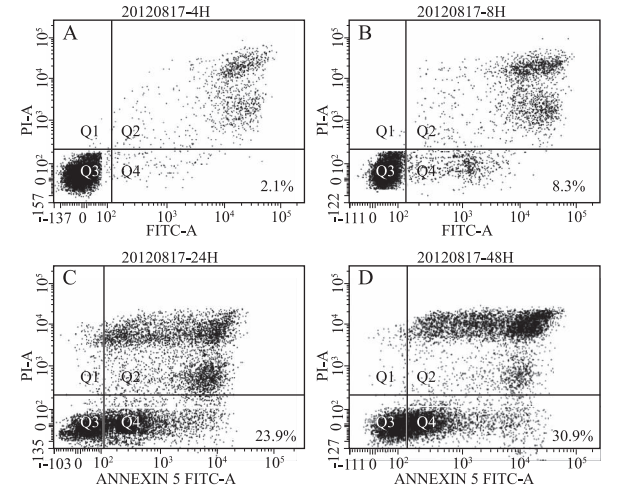
A-E:concentration of gemcitabine 0.02,0.2,2,20,200 μg/ml;M:DNA marker

图 2 不同浓度吉西他滨作用 SNK-6 细胞 48 h 的 DNA 电泳图

Figure 2 DNA fragmentation of SNK-6 cells after treated with gemcitabine in different concentration

2.3 FCM 分析

在二维流式分析图上,细胞分为四个亚群:左上象限(Q1)Annexin V-FITC / PI⁺为培养过程中出现的机械性损伤细胞;左下象限(Q3) Annexin V-FITC / PI 为活细胞群;右上象限(Q2) Annexin V-FITC⁺ / PI⁺为晚期凋亡细胞;右下象限(Q4) Annexin V-FITC⁺ / PI 为早期凋亡细胞。吉西他滨 2 μg/ml 作用 SNK-6 4、8、24、48 h 后,诱导的凋亡细胞比例分别达到 2.1%、8.3%、23.9%、30.9%,与时间呈正相关(Pearson 相关系数 $r = 0.952$, $P<0.05$)。



A:4 h after treated with gemcitabine; B: 8 h after treated with gemcitabine; C: 24 h after treated with gemcitabine; D: 48 h after treated with gemcitabine

图 3 吉西他滨 2 μg/ml 作用 SNK-6 4、8、24、48 h FCM 分析图

Figure 3 FCM analysis of SNK-6 after 4、8、24、48 h treatment of 2 μg/ml gemcitabine

2.4 凋亡相关基因 PCR 芯片检测

在 88 条有关凋亡的目的基因中,共筛选出吉西他滨作用前后表达量改变比值大于 2 或者小于 2 的基因 17 条,其中表达上调基因 4 条:凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 3 (apoptosis-related cysteine peptidase3,Caspase-3)、程序化细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4)、性别决定区 Y-box1 [SRY (sex determining region Y)-box 1, SOX1]、转化生长因子 β-1 (transforming growth factor, beta 1, TGFβ1),下调基因 13 条:丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、丝裂原活化蛋白 3 激酶 10 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10, MAP3K10)、丝裂原活化蛋白 3 激酶 14 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14, MAP3K14)、丝裂原活化蛋白 3 激酶 11 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11, MAP3K11)、磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚单位 2 [phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta), PI3KR2]、信号转导活化翻译因子 5B (signal transducer and activator of transcription 5B, STAT5B)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (B-cell CLL/lymphoma 2, Bcl-2)、X-关联凋亡抑制因子 (X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)、凋亡染色质凝集诱导因子 (apoptotic chromatin condensation inducer 1, ACIN1)、V-AKT 小鼠胸腺瘤病毒同源癌基因 2 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2, AKT2)、凋亡肽酶活化因子 1 (apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1)、肿瘤坏死

因子受体超家族 10B (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b, TNFRSF10B)、死亡相关蛋白激酶 2 (death-associated protein kinase 2, DAPK2)。这些转录差异基因主要为 MAPK 家族、bcl-2、Caspase-3、PDCD4 及 PI3KR2。

3 讨论

吉西他滨是一种新型的嘧啶类抗代谢药物, Huang 等^[5]认为抑制细胞内 DNA 合成并造成 DNA 断裂是吉西他滨诱导凋亡的主要作用机制。吉西他滨为细胞周期特异性药物,主要作用于 DNA 合成期,即 S 期,可将细胞增殖阻断于 S 期及 G₁ 期,对 G₂ 及 M 期无作用,并可在人体肿瘤细胞内长时间停留。吉西他滨已被证实对多种实体瘤细胞(如胰腺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、胆管癌等)有致凋亡作用^[6-10]。

本实验用 MTT 法检测吉西他滨对 SNK-6 细胞生长的抑制作用,结果表明,细胞存活率随药物浓度的增加而逐渐下降;DNA 断裂电泳实验发现,0.02 μg/ml 吉西他滨作用 SNK-6 细胞 48 小时即有明显的 DNA ladder 出现,说明吉西他滨激活了凋亡信号通路,增强了核酸内切酶的活性,引起 DNA 分子在核糖体外部位被切割,形成长度为 180~200 bp 或其整倍数的 DNA 片段^[11]。FCM 结果显示:吉西他滨 2 μg/ml 作用 SNK-6 4、8、24、48 h 后,诱导的凋亡细胞比例分别达到 2.1%、8.3%、23.9%、30.9%。以上实验均可证明,吉西他滨可以有效诱导 NK/T 细胞淋巴瘤细胞凋亡,并呈时间和剂量依赖性。

本研究还采用凋亡相关基因 PCR 芯片对吉西他滨诱导淋巴瘤细胞凋亡的机制进行了初步探索,结果发现,与凋亡相关的 88 条基因中有 4 条基因表达上调,13 条基因表达下调。其中上调最明显的是 Caspase-3、PDCD4。研究发现,细胞凋亡信号转导的关键是 Caspase 的激活,所有 Caspase 均以无活性的酶原形式存在,一经激活将产生 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[12]。Wei 等^[13]发现,PDCD4 在凋亡中也起到了重要作用。有研究发现,MAPK 介导了糖皮质激素诱导淋巴细胞凋亡的过程,可能与人糖皮质激素受体的磷酸化有关^[14]。本研究结果显示 Caspase 及 PDCD4 在吉西他滨作用前后明显上调,说明吉西他滨诱导 SNK-6 凋亡同时激活了 Caspase 通路及 PDCD4。同时 MAPK 家族中 MAPK3、MAP3K10、MAP3K11 及 MAP3K14 均明显下调,提示吉西他滨诱导淋巴瘤细胞 SNK-6 凋亡的过程中抑制了 MAPK 通路,但其作用机制还需深入研究。

总之,吉西他滨可以诱导 NK/T 细胞淋巴瘤细胞产生凋亡,并且呈时间与剂量依赖性;凋亡相关基因的改变是吉西他滨诱导凋亡的重要途径,为进一步研究其分子机制提供了重要线索。

参考文献:

- [1] Borson R, Harker G, Reeves J, *et al.* Phase II study of gemcitabine and bevacizumab as first-line treatment in taxane-pre-treated, HER2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer [J]. *Clinical Breast Cancer*, 2012, 12(5): 322-30.
- [2] Dudek AZ, Kumar P, H Thaw SS, *et al.* Phase II Study of Bi-weekly Carboplatin, Gemcitabine, and Bevacizumab as First-line Treatment in Patients with Stage IIIB/IV NSCLC [J]. *Am J Clin Oncol*, 2012. [Epub ahead of print]
- [3] Goldstein D, Spry N, Cummins MM, *et al.* The GOFURTGO Study: AGITG phase II study of fixed dose rate gemcitabine-oxaliplatin integrated with concomitant 5FU and 3-D conformal radiotherapy for the treatment of localised pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(1): 61-9.
- [4] Ahn HK, Kim SJ, Hwang DW, *et al.* Gemcitabine alone and/or containing chemotherapy is efficient in refractory or relapsed NK/T-cell lymphoma [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(2): 469-72.
- [5] Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine [J]. *Semin Oncol*, 1995, 22(4 Suppl 11): 19-25.
- [6] Zheng T, Wang J, Chen X, *et al.* Disruption of p73-MDM2 binding synergizes with gemcitabine to induce apoptosis in HuCCT1 cholangiocarcinoma cell line with p53 mutation [J]. *Tumour Biol*, 2010, 31(4): 287-95.
- [7] Kawanami T, Takiguchi S, Ikeda N, *et al.* A humanized anti-IGF-1R monoclonal antibody (R1507) and/or metformin enhance gemcitabine-induced apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(3): 867-72.
- [8] Kim MK, Jeon YK, Woo JK, *et al.* The C-terminal region of Bfl-1 sensitizes non-small cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis by suppressing NF-κB activity and down-regulating Bfl-1 [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 98.
- [9] Shao J, Huang T, Fan HN. Apoptosis of breast cancer cell line MCF-7 cells induced by Gemcitabine [J]. *Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban)*, 2005, 34(2): 213-5. [邵军, 黄韬, 樊海宁. 吉西他滨诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2005, 34(2): 213-5.]
- [10] Wang YD, Ha MW, An YZ, *et al.* Clinical observation of Gemcitabine monotherapy in treatment of elder advanced non-small cell lung cancer [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2011, 38(6): 698-700. [王亚帝, 哈敏文, 安煜致, 等. 单药吉西他滨治疗老年晚期非小细胞肺癌疗效观察 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(6): 698-700.]
- [11] Zhang YL, Ma J, Li ZJ. Research progress in mechanism of apoptosis [J]. *Ya Tai Chuan Tong Yi Yao*, 2010, 6(3): 123-5. [张玉龙, 马佳, 李志军. 细胞凋亡作用机制的研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2010, 6(3): 123-5.]
- [12] Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspase [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8543-67.
- [13] Wei N, Liu SS, Chan KK, *et al.* Tumour suppressive function and modulation of programmed cell death 4 (PDCD4) in ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30311.
- [14] Miller AL, Webb MS, Copik AJ, *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211 [J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(6): 1569-83.

[编辑:周永红;校对:刘红武]