

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0210-07

奥曲肽对紫杉醇抑制非小细胞肺癌细胞的增效作用

刘延国¹, 王秀文^{1*}, 魏军民¹, 王亚伟¹, 申洪昌¹, 马道新²(1. 山东大学 齐鲁医院 肿瘤中心 化疗科, 济南 250012; 2. 山东大学 齐鲁医院 肿瘤中心 血液科, 济南 250012)

[摘 要] 目的: 探讨生长抑素类似物奥曲肽(octreotide)对紫杉醇抑制非小细胞肺癌细胞的增效作用及其可能的机制。方法: RT-PCR 检测非小细胞肺癌细胞株 A549 和 H157 生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR)1~5 mRNA 的表达; 检测不同时间和浓度梯度的奥曲肽对两株细胞的抑制率, 光镜下观测奥曲肽作用后细胞形态学的变化; MTT 法检测奥曲肽与紫杉醇对两细胞株增殖的抑制是否具有协同作用; 采用流式细胞仪检测奥曲肽、紫杉醇以及两者联合作用时 A549 细胞的凋亡率; 荧光实时定量 PCR 检测奥曲肽作用后细胞多药耐药相关基因的改变。结果: A549 细胞检测到 SSTR1~SSTR5 mRNA 的表达, 而 H157 细胞只有 SSTR1 和 SSTR4 mRNA 的表达。奥曲肽对 A549 细胞增殖具有抑制作用并具有时间(24、48、72 h)和浓度(1~1 000 nmol/L)依赖性, 在光镜下可观测到细胞细胞受损伤的形态学改变; 而对 H157 细胞无抑制作用。对于 A549 细胞, 125、250、500 nmol/L 奥曲肽作用 48 h 可明显增加其对紫杉醇化疗的敏感性($P < 0.01$), 并能诱导细胞凋亡, 但未增加与紫杉醇联合作用后细胞的凋亡率; 而对 H157 细胞, 奥曲肽未发现化疗增效作用。奥曲肽可下调 A549 细胞多药耐药相关基因 MDR-1、MRP-1 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而对 H157 细胞多药耐药相关基因的表达无影响。结论: 奥曲肽可提高 SSTR 受体阳性的非小细胞肺癌细胞对紫杉醇的敏感性, 下调多药耐药相关基因的表达是其可能的机制之一。

[关键词] 肺癌, 非小细胞; 奥曲肽; 紫杉醇; 细胞凋亡; 多药耐药; 增效作用

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

Octreotide enhances the anti-proliferative effect of paclitaxel against non-small cell lung cancer cells

LIU Yan-guo¹, WANG Xiu-wen^{1*}, WEI Jun-min¹, WANG Ya-wei¹, SHEN Hong-chang¹, MA Dao-xin²(1. Department of Chemotherapy, Cancer Center of Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Department of Hematology, Cancer Center of Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the enhancing effect of octreotide on the anti-proliferative effect of paclitaxel against non-small cell lung cancer cells and to explore the possible mechanisms. **Methods:** The expression of somatostatin receptor(SSTR)1-5 mRNA was examined in non-small cell lung cancer cell lines A549 and H157 by RT-PCR. The inhibitory effect of octreotide (different treatment periods and concentrations) on the growth of A549 and H157 cells was evaluated by MTT assay and the morphological change of the cells was observed by microscopy after octreotide treatment. MTT assay was also used to investigate whether combinations of octreotide and paclitaxel had synergetic interaction. Apoptosis of A549 cells was analyzed by flow cytometry after treatment with paclitaxel, octreotide, or a combination of both. The changes of MDR-1, MRP-1, BCRP expression in the cells was evaluated by real-time PCR after treatment with octreotide. **Results:** The expression of SSTR1-5 mRNA was detected in A549 cells and only SSTR1 and SSTR4 mRNA was detected in H157 cells. Octreotide inhibited growth of A549 cells in a time(24 h, 48 h, 72 h) and dose(1-1 000 nmol/L)-dependent manner; morphological changes of the injured cells were observed under microscope; Octreotide had no effect on H157 cells. The anti-proliferative effect of paclitaxel on A549 cells was enhanced by octreotide (125 nmol/L, 250 nmol/L, 500 nmol/L, $P < 0.01$); octreotide showed no enhancing effect on the chemo-sensitivity of H157 cells. Octreotide induced cell apoptosis in A549 cells, but the apoptosis of A549 cells induced by paclitaxel was not promoted by octreotide. Octreotide down-regulated MDR-1, MRP-1 expression in A549 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but not in H157

[基金项目] 山东省科技厅科技计划项目资助课题(2004GG3202017)。Supported by the Development Program of Science and Technology Committee of Shandong Province (2004GG3202017)

[作者简介] 刘延国(1980-),男,山东省淄博市人,硕士研究生,主要从事肿瘤内科治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail:wangxw12@yahoo.com

cells. **Conclusion:** Octreotide can promote the anti-proliferative effect of paclitaxel on SSTR-positive non-small cell lung cancer cells; and down-regulation of multidrug related genes may be one of the possible mechanisms.

[**Key words**] carcinoma, non-small-cell lung; octreotide; paclitaxel; apoptosis; drug resistance, multiple

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 210-216]

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%。许多患者确诊时已失去手术机会,化疗已成为晚期NSCLC的主要治疗手段。目前常规化疗的有效率仍较低(30%~50%),而且不良反应较多,因此提高现有化疗的有效率,减轻不良反应,并且改善患者的症状已成为目前需要迫切解决的问题。

奥曲肽(octreotide)是一种人工合成的生长抑素类似物,比天然生长抑素有更长的半衰期,已经被证明对神经内分泌肿瘤、消化道肿瘤、乳腺癌和白血病等多种肿瘤具有抑制作用^[1-3],并且奥曲肽能改善化疗的不良反应和晚期癌症患者的多种症状^[4],已经被用于多种肿瘤的诊断和辅助治疗。

奥曲肽对非小细胞肺癌的抑制作用研究尚少,特别是奥曲肽对非小细胞肺癌一线化疗药物紫杉醇的增敏作用及其可能的机制国内外尚未见相关报道。本课题就奥曲肽对非小细胞肺癌的抑制作用及奥曲肽与非小细胞肺癌紫杉醇化疗的协同作用进行探讨,并研究其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI 1640 培养液、新生牛血清和胰蛋白酶购自 Invitrogen GIBCO 公司;胎牛血清购自天津灏洋有限公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司,Trizol 购自加拿大 BBI 有限公司,生长抑素受体(sermatostatin receptor, SSTR) 1~5、 β -actin 及 MDR-1、MRP-1、BCRP、GAPDH 引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成。DL2000、TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 购自宝生物(大连)有限公司,凋亡试剂盒 Annexin V FITC kit 购自 Bender 公司,实时定量 PCR 试剂盒 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 购自 Roche 公司。紫杉醇购自海南顺园化学技术有限公司。倒置显微镜和成像系统为日本 OLYMPUS 公司产品,Model 680 型 Microplate Reader 和 PTC150 型 minicycler PCR 仪(MJ Research)为 BioRAD 公司产品,凝胶成像系统为江苏捷达公司产品,FACSCalibur 流式细胞仪为 BD 公司产品,实时定量 PCR 仪 LightCycler 2.0 为 Roche 公司产品。

1.2 细胞株的培养

人肺腺癌 A549 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所,在含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中贴壁生长,置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,待细胞生长至 80% 贴壁时,0.25% 胰酶消化传代。人肺鳞癌 NCI-H157 细胞株自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,在含 10% 胎牛血清、1 mmol/L 丙酮酸钠的 1640 培养液中贴壁生长,置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,待细胞生长至 80% 贴壁时,0.25% 胰酶消化传代。

1.3 RT-PCR 检测人肺腺癌 A549 和肺鳞癌 NCI-H157 细胞株 SSTR1~SSTR5 mRNA 的表达

采用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 试剂盒检测 A549 和 H157 两种细胞株生长抑素受体 mRNA 的表达,SSTR1~SSTR5 各引物序列设计参照文献^[5],并于 GenBank 上核对无误,见表 1。

RT 反应按试剂盒说明书进行,PCR 反应条件:94.0 °C 5 min;94.0 °C 40 s;55.0 °C 40 s;72.0 °C 1 min;30 个循环;扩增出的 cDNA 产物在 2% 琼脂糖凝胶 70 V 电压下电泳,采用 DL2000 作为 Marker,电泳结果用捷达凝胶成像系统拍照记录。

1.4 奥曲肽对非小细胞肺癌细胞增殖抑制效应的观察

取 A549 和 H157 对数生长期细胞,按每孔 5 000 个细胞分别种于 96 孔板,24 h 贴壁后分别加入终浓度为 0.01~1 μ mol/L 浓度梯度的奥曲肽,同时设不加药的对照组,每个浓度和对照组均设 5 个复孔,并设只加培养液的孔作为调零孔;并同时设 24、48、72 h 3 个时间组,每组实验重复 3 次;于终止培养前 4 h 加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),继续孵育 4 h 后弃去培养液,加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min 后,用酶联仪检测 490 nm 的光密度值 D_{490} ,并分别求出奥曲肽对两种细胞的抑制率:

肿瘤细胞抑制率(%) = (1 - 实验组 D_{490} /对照组 D_{490}) × 100%

1.5 奥曲肽作用后 A549 和 H157 细胞形态的观察

取 A549 和 H157 对数生长期细胞,调成密度为 5×10^4 个/ml 的单细胞悬液,接种于 6 孔培养板,待细胞贴壁后,加入终浓度为 1 000 nmol/L 的奥曲肽,并同时设不加药的对照组,于 48 h 在倒置显微镜下

分别观察两细胞株形态,并用摄像系统软件记录。

表 1 生长抑素受体基因引物设计
Tab.1 Primers of *SSTR* and β -*actin*

Gene	Primer sequences	Product size(bp)	GenBank No.
<i>SSTR1</i>	Forward 5'-ATGGTGGCCCTCAAGGCCGG-3'	318	NM_001049
	Reverse 5'-CGCGGTGGCGTAATAGTCAA-3'		
<i>SSTR2</i>	Forward 5'-TCCTCTGGAATCCGAGTGGG-3'	332	NM_001050
	Reverse 5'-TTGTCTGCTTACTGTCACT-3'		
<i>SSTR3</i>	Forward 5'-GGAGAAGACTGAGGAGGAGG-3'	235	NM_001051
	Reverse 5'-TTTCCCCAGGCCCTACAG-3'		
<i>SSTR4</i>	Forward 5'- ATCTTCGCAGACACCAGACC-3'	321	NM_001052
	Reverse 5'- ATCAAGGCTGGTCACGACGA-3'		
<i>SSTR5</i>	Forward 5'- CGTCTTCATCATCTACACGG -3'	223	NM_001053
	Reverse 5'- GGCCAGGTTGACGATGTTGA -3'		
β - <i>actin</i>	Forward 5'-ATCATGAAGTGTGACGTGGAC-3'	461	NM_001101
	Reverse 5'-AACCGACTGCTGTCACCTTCA-3'		

1.6 MTT 法检测紫杉醇与奥曲肽的联合作用效应

按 1.4 方法将细胞接种于 96 孔板,24 h 贴壁后加入 0.1 ~ 1 μ mol/L 浓度梯度的紫杉醇,同时加入终浓度为 0、125、250、500 nmol/L 的奥曲肽,同时设不加药的对照组,每个浓度和对照组均设 5 个复孔,每组实验重复 3 次;药物作用 48 h 后同 1.4 方法检测各孔光密度值 D_{490} ,并分别求出两种细胞生存率:细胞生存率(%) = 实验组 D_{490} /对照组 D_{490} \times 100%

1.7 流式细胞术检测奥曲肽联合紫杉醇作用对 A549 和 H157 细胞凋亡的影响

分别在 A549 和 H157 两种细胞中加入终浓度为 250 mol/L 的奥曲肽、10 mol/L 的紫杉醇、以及同时加入 250 mol/L 的奥曲肽和 10 mol/L 的紫杉醇作用 48 h,并设不加药物的对照组,每组重复 3 次。用流式细胞仪检测细胞早期和晚期凋亡率,操作按 Annexin V-FITC 试剂盒说明书进行。具体方法为:收集细胞后用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用结合缓冲液重悬细胞,调整密度为 1×10^6 个/ml;在 100 μ l 细胞悬液中加入 5 μ l AnnexinV/FITC 和 10 μ l PI (20 μ g/ml),避光孵育 15 min 后加入 400 μ l PBS,上机检测;用 WinMDI2.9 软件分析数据,计算细胞凋亡率。

1.8 荧光实时定量 PCR 检测奥曲肽作用前后 A549 和 H157 细胞多药耐药相关基因的表达

A549 和 H157 两细胞中分别加入终浓度为 250 nmol/L 的奥曲肽,作用 48 h,并同时设不加药对照组;收集细胞后,提取细胞总 RNA,RT 反应逆转录为 cDNA,方法同 1.3。采用 Roche LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 荧光实时定量试剂盒检测各细胞株多药耐药相关基因 *MDR-1*、*MRP-1*、*BCRP* 的表达;具体程序为:预热 95 $^{\circ}$ C 10 min;扩增,95 $^{\circ}$ C 10 s,64 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 5 s,共 45 个循环;溶解曲线:95 $^{\circ}$ C 0 s,65 $^{\circ}$ C 10 s,95 $^{\circ}$ C 0 s,温度转换率 0.1 $^{\circ}$ C/s;冷却:40 $^{\circ}$ C 30 s。采用 20 μ l 体系反应,用 530 通道在扩增步骤末采集荧光信号;并用 Roche Light Cycler 4.0 软件分析数据。*GAPDH*、*MDR-1*、*MRP-1*、*BCRP* 的引物设计见参考文献 [6],见表 2。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组之间的比较用方差分析,两组均数之间比较用 *t* 检验,采用软件 SPSS13.0 处理数据, $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 和 H157 细胞 *SSTR* mRNA 的表达

A549 细胞 *SSTR1* ~ *SSTR5* 5 种受体均检测到 mRNA 的表达;而 H157 只表达 *SSTR1* 和 *SSTR4* mRNA,未检测到 *SSTR2*、3 和 5 mRNA 的表达,其中

SSTR1 表达高于 *SSTR4*(图 1)。

表 2 多药耐药相关基因引物设计

Tab. 2 Primers of multidrug resistance related genes

Gene	Primer sequences	Product size(bp)
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	225
	Reverse 5'-GAAGATGCTGATGGGATTTC-3'	
<i>MDR-1</i>	Forward 5'-TCTGGAGGAAGACATGACCAGCTA-3'	95
	Reverse 5'-GGCACCAAAATGAAACCTGAATGT-3'	
<i>MRP-1</i>	Forward 5'-AGAGACAGCTCAGCAGCTCCT-3'	127
	Reverse 5'-GCCTTGTCAGCCTCCATCAG-3'	
<i>BCRP</i>	Forward 5'-TATCAATGGGATCATGAAACCTGG-3'	140
	Reverse 5'- GCGGTGCTCCATTTATCAGAAC-3'	

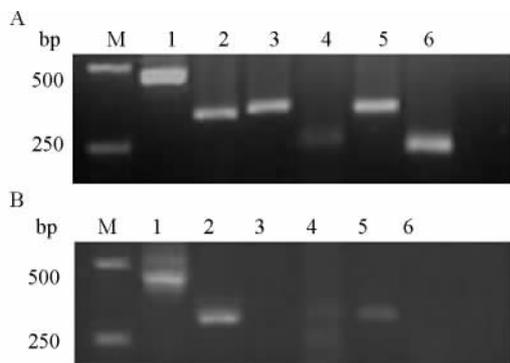


图 1 A549 和 H157 细胞 *SSTR1* ~ *SSTR5* mRNA 的表达

Fig. 1 *SSTR1*-*SSTR5* mRNA expression

in A549(A) and H157(B) cells

M: Marker; 1: β -actin; 2: *SSTR1*; 3: *SSTR2*;
4: *SSTR3*; 5: *SSTR4*; 6: *SSTR5*

2.2 奥曲肽作用后 A549 和 H157 细胞形态的变化

未加药的对照组细胞均生长良好,正常伸展贴壁生长,状态较好。1 000 nmol/L 的奥曲肽作用于 A549 细胞 48 h 后,细胞形态发生改变,多数伸展差、形态不规则,体积缩小,核固缩,胞质浓缩,折光性增强,少部分细胞崩解(图 2);而 1 000 nmol/L 作用 48 h 后的 H157 细胞形态较正常对照组无明显改变。

2.3 奥曲肽对 A549 和 H157 细胞增殖的抑制作用

低浓度的奥曲肽(0.01 ~ 0.1 nmol/L)对 A549 细胞有轻微的促进增殖作用,而高浓度的奥曲肽对 A549 细胞具有抑制作用,并且呈浓度和时间依赖性;不同浓度梯度的奥曲肽作用于 A549 细胞 24、48、72 h 后的抑制率见表 3。而奥曲肽对 H157 细胞

未发现有明显抑制作用。

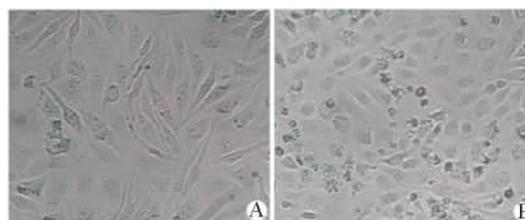


图 2 奥曲肽(1 000 nmol/L)作用 A549 细胞 48 h 后细胞形态的变化($\times 100$)

Fig. 2 Morphological change of A549 cells after treatment with 1 000 nmol/L octreotide for 48 h($\times 100$)

A: A549 cells control; B: A549 cells after treatment with 1 000 nmol/L octreotide for 48 h

表 3 不同浓度和时间作用的奥曲肽对 A549 细胞增殖的抑制(%)

Tab. 3 Inhibitory effect of octreotide on A549 cells proliferation at different concentrations and acting periods (%)

Octreotide ($c_B/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h
0	0.00	0.00	0.00
0.01	$-(2.96 \pm 0.97)$	$-(3.73 \pm 0.12)^{**}$	$-(3.9 \pm 0.81)^*$
0.1	0.83 ± 0.21	1.10 ± 0.10	1.97 ± 0.21
1	2.81 ± 0.60	3.78 ± 0.55	$5.56 \pm 0.88^*$
10	$5.58 \pm 0.85^*$	$6.31 \pm 1.68^*$	$10.64 \pm 2.14^{**}$
100	$6.48 \pm 0.56^{**}$	$7.72 \pm 1.01^{**}$	$14.34 \pm 2.63^{**}$
1 000	$7.54 \pm 0.71^{**}$	$11.52 \pm 2.02^{**}$	$18.64 \pm 1.83^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L

2.4 不同浓度的奥曲肽和紫杉醇联合作用对 A549 和 H157 细胞增殖的抑制作用

不同浓度的奥曲肽(125、250、500 nmol/L)与紫杉醇(0.1 nmol/L ~ 1 $\mu\text{mol/L}$)联合作用于 A549 细胞 48 h 后,细胞存活率较单用紫杉醇或奥曲肽明显下降($P < 0.01$),两药表现出较强的协同作用;但是不同浓度的奥曲肽与紫杉醇联合作用组之间无明显差别($P > 0.05$)。联合作用于 H157 细胞,细胞存活率较单用紫杉醇组无差别(图 3)。

2.5 奥曲肽和紫杉醇单独或联合作用对 A549 和 H157 细胞凋亡的影响

250 nmol/L 的奥曲肽作用于 A549 细胞 48 h 后,其凋亡率为(15.88 ± 4.33)%,明显高于正常对照组的凋亡率(8.33 ± 3.08)%($P < 0.01$);而 250 nmol/L 奥曲肽与 10 nmol/L 紫杉醇联合作用于 A549 细胞 48 h 后的凋亡率为(20.63 ± 0.54)%,与 10 nmol/L 紫杉醇单独作用 48 h 的凋亡率($24.86 \pm$

5.62)% 相比,并无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 奥曲肽对 A549 和 H157 细胞多药耐药相关基因表达的影响

加入终浓度为 250 nmol/L 的奥曲肽作用 48 h 后,A549 细胞的 *MDR-1* 的相对表达量为(0.48 ± 0.19),*MRP-1* 的相对表达量为(0.17 ± 0.05),较对照组相比均明显下调($P < 0.05, P < 0.01$);*BCRP* 与对照组相比改变无统计学意义($P > 0.05$)。H157 细胞经奥曲肽处理后与对照组相比各耐药基因的改变与对照组相比均无统计学意义($P > 0.05$,表 4)。荧光实时定量 PCR 过程中 *GAPDH*、*MDR-1*、*MRP-1*、*BCRP* 的熔解曲线均为单一特异性峰,无非特异性产物,说明扩增准确、特异性好,各产物的熔解曲线见图 4。在扩增目的基因时同时设不加模板 *cDNA* 的阴性对照(加入 *GAPDH* 上下游引物),扩增曲线为一水平直线,说明操作过程中没有 *cDNA* 污染,目的基因得到的结果可靠。

3 讨论

生长抑素受体(*SSTR*)是一种跨膜糖蛋白,有 5 种亚型,即 *SSTR1*、*SSTR2*、*SSTR3*、*SSTR4*、*SSTR5*;生长抑素类似物奥曲肽与不同的亚型具有不同的亲和力,与 *SSTR2* 和 *SSTR5* 亲和力最高,*SSTR3* 较低,而 *SSTR1* 和 *SSTR4* 则不结合。人非小细胞肺癌细胞中也有生长抑素受体的表达,并且明显高于正常组织^[7-9],这使得生长抑素及其类似物有可能用于非小

细胞肺癌的治疗。

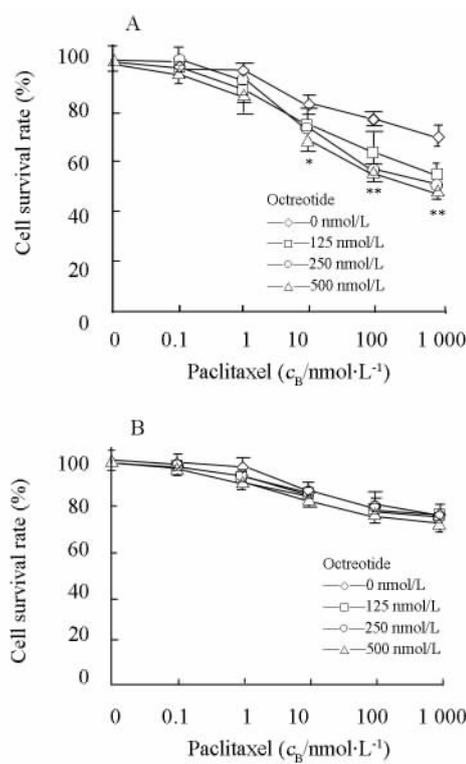


图 3 不同浓度的奥曲肽与紫杉醇联合作用 48 h 时 A549 和 H157 细胞的存活率

Fig. 3 Survival rates of A549 and H157 cells after combined treatment with octreotide and paclitaxel for 48 h
A: A549 cells; B: H157 cells; ** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L octreotide group

表 4 奥曲肽作用后 A549 和 H157 细胞多药耐药相关基因的表达

Tab. 4 Expression of multidrug resistance related genes in A549 and H157 cells after octreotide treatment

Group	A549			H157		
	<i>MDR-1</i>	<i>MRP-1</i>	<i>BCRP</i>	<i>MDR-1</i>	<i>MRP-1</i>	<i>BCRP</i>
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Octreotide group	$0.48 \pm 0.19^*$	$0.17 \pm 0.05^{**}$	0.97 ± 0.19	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.01	0.99 ± 0.61

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

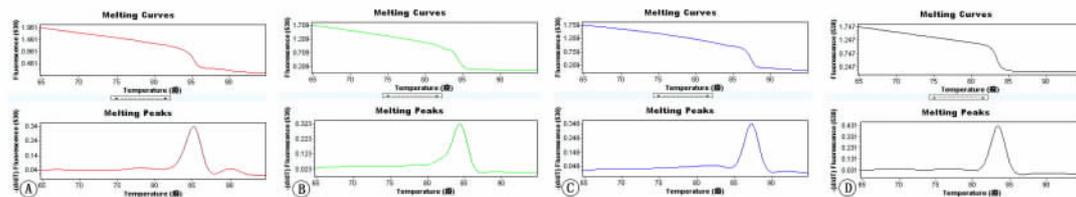


图 4 荧光实时定量 PCR 产物的熔解曲线

Fig. 4 Melting curves of fluorescence real-time PCR products

A: *GAPDH*; B: *MDR-1*; C: *MRP-1*; D: *BCRP*

在实验中观察到,奥曲肽对于 SSTR 阳性的 A549 细胞在较高浓度时具有明显的抑制作用,并且具有浓度和时间依赖性,同时也可以观察到细胞的形态学改变;而对 SSTR2、SSTR3 和 SSTR5 阴性的 H157 细胞则没有作用。这说明奥曲肽对非小细胞肺癌细胞的抑制作用是通过 SSTR 介导起作用的。在低浓度时(0.01 nmol/L),实验观察到奥曲肽有轻微的促进肿瘤细胞生长的作用,这与在其他体外实验中观察到的生长抑素类似物在低浓度时有促进肿瘤细胞如甲状腺癌、胃癌细胞增殖的作用相一致^[10]。在实验中发现奥曲肽也有诱导 A549 细胞凋亡的作用。目前认为生长抑素类似物对肿瘤细胞抑制作用的多种可能机制,包括:直接抗增殖作用^[11],间接抗增殖作用,主要通过 SSTR2^[12]和 SSTR3^[13]介导的诱导肿瘤细胞凋亡作用,以及抗肿瘤血管形成^[14]等。

本实验发现奥曲肽与紫杉醇联合应用时,细胞存活率明显下降,两者联合应用的抑制率明显高于单用奥曲肽或紫杉醇或两者抑制率之和,表现出了较强的协同作用;同时不同浓度的奥曲肽与紫杉醇联合应用时表现出对细胞类似的抑制率,进一步说明奥曲肽对紫杉醇具有增敏作用,不是通过自身对肿瘤细胞的抑制作用,而是通过其他可能的机制。奥曲肽自身有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,但与紫杉醇联合应用时并没有使紫杉醇诱导 A549 细胞的凋亡率增加;说明奥曲肽对紫杉醇的增敏作用可能不是通过诱导凋亡来实现的。蒋华^[15]等在胃癌的研究中也得到了类似的结果。

目前非小细胞肺癌常规化疗的有效率仍然较低,化疗耐药是其重要原因之一。非小细胞肺癌大多数表现为原发性耐药,其中多药耐药是非小细胞肺癌耐药的重要机制之一^[16];非小细胞肺癌患者术后病理切片检测表明其多药耐药相关基因和蛋白均有很高的表达率^[17-18]。本实验发现,奥曲肽作用后的 A549 细胞多药耐药相关基因 *MDR-1*、*MRP-1* 等均有不同程度的下调。多药耐药相关基因编码的蛋白如 *MRP-1*,特别是 P 糖蛋白的过表达,是肿瘤耐药的主要原因之一,脂溶性药物如紫杉醇、阿霉素等是其作用底物。综合本研究结果推测奥曲肽可能通过下调多药耐药基因的表达,从而增加对紫杉醇化疗的敏感性。其他研究者在对肝癌、胃癌等的研究中,也发现了奥曲肽有下调多药耐药基因 *MDR-1*、*MRP-1* 或 P 糖蛋白表达的作用^[15,19]。

在对胰腺癌^[20]、结直肠癌^[21]、黑色素瘤^[22]等实验中发现,生长抑素类似物能增强多种化疗药物的敏

感性。目前,尚未见生长抑素类似物与化疗药物对非小细胞肺癌联合应用的研究。本实验证实了奥曲肽对非小细胞肺癌具有抑制增殖及诱导细胞凋亡的作用,能显著增强其对紫杉醇的化疗敏感性,其可能的机制之一是下调非小细胞肺癌多药耐药基因 *MDR-1*、*MRP-1* 等的表达。本研究为生长抑素类似物在非小细胞肺癌治疗中的应用打下了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Huang MT, Chen ZX, Wei B, *et al.* Preoperative growth inhibition of human gastric adenocarcinoma treated with a combination of celecoxib and octreotide[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(11): 1842-1850.
- [2] Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, *et al.* Long acting octreotide in the treatment of advanced hepatocellular cancer and overexpression of somatostatin receptors: randomized placebo-controlled trial[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(23): 3164-3170.
- [3] Tjomsland V, El-Salhy M. Anti-tumour effects of triple therapy with octreotide, galanin and serotonin in comparison with those of 5-fluorouracil/leukovorin on human colon cancer[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(2): 427-432.
- [4] Gilbar PJ, Pharm B. The role of octreotide in symptom management in oncology and palliative care[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2000, (6)3: 81-91.
- [5] Ferone D, Arvigo M, Semino C, *et al.* Somatostatin and dopamine receptor expression in lung carcinoma cells and effects of chimeric somatostatin-dopamine molecules on cell proliferation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289(6): E1044-105.
- [6] Buchholz S, Keller G, Schally AV, *et al.* Therapy of ovarian cancers with targeted cytotoxic analogs of bombesin, somatostatin, and luteinizing hormone-releasing hormone and their combinations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(27): 10403-10407.
- [7] O'Byrne KJ, Schally AV, Thomas A, *et al.* Somatostatin, its receptors and analogs, in lung cancer[J]. *Chemotherapy*, 2001, 47(Suppl 2): 78-108.
- [8] Sun ML, Wei JM, Wang XW, *et al.* Paclitaxel-octreotide conjugates inhibit growth of human non-small cell lung cancer cells *in vitro*[J]. *Exp Oncol*, 2007, 29(3): 186-191.
- [9] 孙美丽,王秀问,王朴,等. 紫杉醇——奥曲肽耦连药靶向治疗非小细胞肺癌[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(4): 368-372.
- [10] Hoelting T, Duh QY, Clark OH, *et al.* Somatostatin analog octreotide inhibits the growth of differentiated thyroid cancer cells *in vitro*, but not *in vivo*[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(7): 2638-2641.
- [11] Zapata PD, Roper RM, Valencia AM, *et al.* Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002,

- 87(2): 915-926.
- [12] Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, *et al.* Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(3):955-962.
- [13] Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3[J]. *Mol Endocrinol*, 1996, 10(12): 1688-96.
- [14] Florio T, Morini M, Villa V, *et al.* Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(4):1574-1584.
- [15] 蒋华, 束永前, 范萍, 等. 奥曲肽对胃癌细胞 SGC-7901 增殖及 P-糖蛋白表达的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2003, 23(5):464-467.
- [16] Monzo M, Rosell R, Taron M. Drug resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2001, 34(Suppl 2): S91-S94.
- [17] Roy S, Kenny E, Kennedy S, *et al.* MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 mRNA and protein expression in non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(3A): 1325-1330.
- [18] Paredes-Lario A, Blanco-García C, Echenique-Elizondo M. Expression of multiple-drug resistant proteins in lung cancer[J]. *Cir Esp*, 2006, 79(1):46-56.
- [19] 李文欢, 崔屹, 乔惠梅, 等. 生长抑素类似物逆转肝细胞肝癌多药耐药机制的初步研究[J]. *中华消化杂志*, 2004, 24(5): 309 - 310.
- [20] Weckbecker G, Raulf F, Tolcsvai L, *et al.* Potentiation of the anti-proliferative effects of anti-cancer drugs by octreotide *in vitro* and *in vivo*[J]. *Digestion*, 1996, 57(Suppl 1): 22-28.
- [21] Massari D, Trobonjac Z, Rukavina D, *et al.* SMS 201-995 enhances S-phase block induced by 5-fluorouracil in a human colorectal cancer cell line[J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(9): 989-96.
- [22] Szende B, Horváth A, Bökönyi G, *et al.* Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(1): 132-136.
- [收稿日期] 2008 - 02 - 21 [修回日期] 2008 - 04 - 15
- [本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

TLR4 相关蛋白 PRAT4A 参与 TLR 依赖的免疫反应

Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)目前被认为是最重要的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 不同的 TLR 亚型可识别不同的病原体相关模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 诱导不同的天然免疫应答。如 TLR3 主要识别病毒的双股 RNA(dsRNA), TLR4 主要识别细菌的脂多糖(LPS), TLR5 识别细菌的鞭毛蛋白, TLR9 识别多种病原体的核酸成分(CpG), TLR1/TLR2 和 TLR6 则识别脂蛋白和肽聚糖(peptidoglycan)等。

Toll 样受体信号转导通路的研究已经比较清楚。不同类型的 TLR 与其配体结合后, 可通过募集接头分子 MyD88 或者 TRIF 以及下游的 IRAK 激酶家族成员和 TRAF 来最终激活 NF- κ B, IRF3/7 和 MAPK 通路, 从而调控炎症因子和干扰素等产生和激发的天然免疫反应。TLR 不仅对天然免疫的激发至关重要, 还在败血症等疾病时维持全身性炎症状态中发挥着重要作用。目前关于 TLR 信号转导通路及其相关调节, 尤其时负向调节的研究已经很多, 然而关于 TLR 的翻译后加工及其细胞内转运机制还不清楚。此前, 免疫学家们只发现热休克家族蛋白 GP96 可以伴侣 TLR3、4、9 并调节以上分子的膜表达, 但 GP96 同时也可以伴侣免疫球蛋白以及 MHC 分子, 目前还没有 TLR 的高度特异伴侣分子。

来自日本东京大学医学院感染遗传学研究室 Miyake 教授等在 2007 年 11 月的实验学杂志(JME)中发表了一个关于新的 TLR4 相关蛋白 PRAT4A 的最新研究成果, PRAT4A 在 TLR2、4、9 的膜表达中具有重要的作用, 提示 PRAT4A 可能是一个潜在的 TLR 特异性的伴侣性分子。PRAT4A 为内质网驻留蛋白。实验利用 PRAT4A 敲除小鼠模型揭示, PRAT4A 在巨噬细胞、B 细胞和 DC 的 TLR 配体诱导 TNF- α 、IL-6、IFN 等因子的产生中是必需的, 且 PRAT4A 的这一功能是调节 TLR 受体膜表达的形式来实现的。

PRAT4A 敲除小鼠来源的巨噬细胞、B 细胞和 DC 细胞, 对 TLR 配体 lipid A、PCSK、FSL-1 和 CpG 等反应明显降低, 且 PRAT4A 敲除小鼠来源的巨噬细胞、B 细胞和 DC 细胞中 TLR2、4、9 膜表达显著下降。其机制可能是 PRAT4A 通过与 TLR 受体在内质网中的相互作用、并伴侣其成熟的形式实现的。共聚焦结果显示, PRAT4A 缺失或干扰的细胞中 TLR2、4、9 均被驻留在内质网, 提示未经 PRAT4A 作用的 TLR 受体不具有出内质网的功能, 而外源 PRAT4A 的 Rescue 实验可以逆转 TLR2、4、9 被驻留在内质网; 最后用 PRAT4A 敲除小鼠对内毒素休克的抵抗和结核杆菌的易感性增加两个疾病模型, 进一步验证了 PRAT4A 在 TLR 受体细胞内转运过程中的重要作用。

该研究通过严密的实验设计, 应该 PRAT4A 敲除小鼠、共聚焦和 Rescue 等实验体系论证了 PRAT4A 在 TLR2、4、9 的出内质网和膜表达中起着重要的作用, 可能成为治疗某些炎症性疾病的潜在靶点。

[刘 聪 摘译, 安华章 审阅. Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, *et al.* *J Exp Med*, 2007, 204(12):2963-2976.]