艰难梭菌毒素 A 对胆管癌细胞株 FRH-0201 增殖和凋亡的影响

刘小红[1] 沈 阳[2△]

(1 兰州大学第二临床医学院 甘肃 兰州 730030;2 兰州大学第二医院 甘肃 兰州 730030)

摘要 目的:研究艰难梭菌毒素 A(TcdA)对人胆管癌细胞株 FRH-0201 细胞凋亡影响及作用机制。**方法:**采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率,荧光染色检测 TcdA 作用后细胞形态学变化,流式细胞术检测细胞凋亡,免疫细胞化学法检测 Bcl-2 表达水平,Caspase 3 活性检测试剂盒检测 Caspase-3 的活性。**结果:**TcdA 能抑制胆管癌细胞株 FRH-0201 细胞增殖且呈时间、剂量依赖性,荧光染色和流式细胞仪检测到细胞凋亡,与对照组相比,TcdA 作用后 Bcl-2 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$),Caspase-3 活性增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**TcdA 可以通过下调 Bcl-2 蛋白表达表达,激活 Caspase-3 而诱导 FRH-0201 细胞凋亡。

关键词:胆管肿瘤;细胞凋亡;艰难梭菌毒素 A

中图分类号:R735.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)01-60-03

Effect of Clostridium DifficileToxin A on Proliferation and Apoptosis of FRH-0201 Cholangiocarcinoma Cell Line

LIU Xiao-hong[1], SHEN Yang[2△]

(1 The Second Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China;

2 the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the proliferation inhibition and apoptosis effect of Clostridium difficile toxin A on the cholangiocarcinoma cell lines FRH-0201. Methods: The cytotoxic activity of TcdA on FRH-0201 cells was tested by the MTT assay, Morphological changes were observed by fluorescence microscopy. Apoptosis was examined by flow-cytometric analysis. The expression of Bcl-2 protein was examined by SABC immunocytochemistry staining, and Caspase-3 activity was determined with a microplate reader. Results: TcdA inhibited the proliferation of FRH-0201 cell line in a time- and dose-dependent manner, the cells presented the typical morphological changes of apoptosis, the expression of Bcl-2 protein was down-regulated compared with control group ($P<0.05$), in addition,Caspase-3 was activated significantly compared with control group ($P<0.05$). Conclusions: TcdA can induce apoptosis in FRH-0201 cells by the down-regulation of Bcl-2 protein and activity of Caspase-3.

Key words: Billary tract neoplasms; apoptosis; Clostridium difficile toxin A

Chinese Library Classification: R735.8 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)01-60-03

前言

肝门部胆管癌起病隐匿,根治较困难,是预后很差的恶性肿瘤。由于多基因变异的协同作用而致肝门部胆管癌细胞具有的复杂的生物学特性;虽手术切除率现明显提高、手术病死率亦明显下降;但真正达到根治性切除的病例很少,局部复发率很高[1]。目前认为应采取包括手术、放疗、化疗等的综合治疗措施,其中化疗地位非常重要的[2]。艰难梭菌毒素 A(Clostridium difficile toxin A, TcdA) 是由艰难梭菌产生的一种细胞外毒素,为一种可溶性蛋白,通过受体介导的内吞作用进入细胞,进而产生细胞毒性。已有研究表明:TcdA 能诱导多种实体肿瘤细胞发生凋亡,而对正常的 vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)生长抑制作用非常小[3];肿瘤的发生不仅仅是细胞增殖和分化异常的疾病,同时也是细胞凋亡异常的疾病。为此,本研究观察 TcdA 对胆管癌细胞株 FRH-0201 的生物学效应,为胆管癌化疗提供临床参考。

作者简介:刘小红(1976-),男,硕士研究生,主治医师,胃肠道肿瘤微创治疗,电话:13679473779,E-mail:onlyhawk@163.com

△通讯作者:沈阳,男,主任医师,副教授,硕士生导师。E-mail:shenydxy@126.com

(收稿日期:2010-10-05 接受日期:2010-10-30)

1 材料与方法

1.1 细胞株

胆管癌细胞株 FRH-0201 由兰州大学基础医学院遗传学研究所根据吴晓鹏的报道[4]构建并惠赠。

1.2 试剂

艰难梭菌 VPI 10463 菌株脑心浸液培养物,经 50 %饱和硫酸胺盐析,酸沉淀后再经 DEAE Toyopearl 650M 阴离子交换层析提纯得到电泳纯的精制 A 毒素[5]。RPMI1640 细胞培养基(购自 Gibco 公司),新生小牛血清(购自杭州四季青公司)。MTT(四甲基偶氮唑蓝)、DSMO(二甲基亚砜)为 Sigma 公司产品。AnnexinV-FITC / PI 双染凋亡试剂盒 (购自深圳晶美试剂公司)。Bcl-2 一抗(兔抗人)、二抗(山羊抗兔)、SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均为武汉博士德公司产品,Caspase-3 活性检测试剂盒为碧云天公司产品。

1.3 细胞培养

FRH-0201 细胞接种于含 10 %小牛血清的 RPMI1640、

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素的培养液中，在 5% CO_2 培养箱中 37℃、饱和湿度条件下常规培养，待 3 天后细胞接近铺满瓶底，进行传代(2~3d 一代)，台盼蓝染色活细胞 98%以上进行实验。

1.4 MTT 法观察 TcdA 对 FRH-0201 细胞增殖的影响

取对数生长期细胞，以每孔 2× 10^3 个细胞接种于 96 孔培养板；设置 TcdA 处理组浓度分别为：50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml 和 400ng/ml，每个浓度设置 5 个复孔。37℃、5 % CO_2 培养 24h 后细胞贴壁，弃掉培养液后分别加入含上述浓度梯度 TcdA 的培养液。同时用未处理的 FRH-0201 细胞作阴性对照，空白对照组只加培养液，每孔总体积 100μ l。37℃、5 % CO_2 培养箱分别培养 24、48 和 72 小时，结束前 4 小时加入 0.5% MTT 10μ l/ 孔，继续孵育 4 小时，每孔加入 100μ l DMSO，摇床低速振荡 10min，空白孔调零，波长 490nm，在 DG-5031 型酶联免疫检测仪 OD490nm 处测定各孔吸光值，并计算抑制率。实验重复两次。细胞增殖抑制率(inhibition rate,IR)的计算采用以下公式：IR(%)=(阴性对照组 A490 均值 -TcdA 处理组 A490 均值 /(阴性对照组 A490 均值 - 空白对照组 A490 均值)× 100%，SPSS17.0 软件计算半数抑制浓度 IC_{50}[6]。

1.5 荧光染色观察细胞凋亡的形态学变化

分别离心收集 TcdA 处理组(400ng/ml,48h)和阴性对照组细胞，加入 1ml 固定液，重悬后固定 15 分钟，离心弃上清后 PBS 洗 2 次，最后一次保留约 50 μ l 液体，重悬细胞、涂片，待稍晾干后均匀滴上 100 μ l Hoechst 33342 染色液，避光染色 5 分钟，弃去 Hoechst 液，PBS 洗 2 次后，用荧光显微镜观察细胞形态。

1.6 AnnexinV-FITC / PI 双染法检测早期细胞凋亡

离心收集(1000r/ min 离心 5min，PBS 洗涤 1 次，再次离心去上清) 阴性对照组和不同浓度 Tcd A 作用(50ng/ml,100ng/ml,200ng/ml,400ng/ml)24 小时的细胞 >1× 10^6 个。每个样品取 10^5 个细胞，PBS 洗涤 2 次，按 AnnexinV-FITC / PI 双染凋亡检测试剂盒说明分别处理各组细胞，1 小时内上机检测，光源为 488nm 氢离子激光器，早期凋亡细胞为 FITC(+)PI(-)。

1.7 免疫细胞化学 SABC 法检测 Bcl-2 蛋白表达

相同方法离心收集对照组、Tcd A 处理组(400ng/ml,48h)细胞，PBS 重悬，调整细胞密度为 1× 10^6 个 /ml，细胞悬液滴至经防脱片剂 APES 处理过的载玻片上，遵照即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒说明书操作，每次染色用 PBS 代替一抗设为阴性对照组；中性树胶封片后光镜观察并拍照。结果判定：胞浆或胞核出现棕黄色团块或颗粒为(+)，应用 IPP6.0 专业图像分析软件(Image-Pro Plus，Media Cybernetics 公司)对图片进行光密度分析。

1.8 Caspase-3 活性检测

同样方法分别收集对照组、TcdA 50ng/ml 组、100ng/ml 组、200ng/ml 组、400ng/ml 组的 24 和 48 小时的细胞，PBS 洗涤后按照 Caspase-3 活性检测试剂盒操作，酶标仪检测 A405 值。Caspase-3 的一个酶活力单位定义为当底物饱和时，在 37℃可以剪切 1nmol Ac-DEVD-pNA 产生 1nmol pNA 的 Caspase 3 的酶量。

1.9 统计学处理

所有数据均在 SPSS17.0 中进行统计分析。计量资料用均数± 标准差表示，两组之间比较用独立样本 t 检验、分类资料采用 2 检验，P 值 <0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 TcdA 对 FRH-0201 细胞的增殖抑制作用

MTT 法检测结果显示 50-400ng/ml 各个浓度的 TcdA 均能抑制 FRH-0201 细胞的增殖，同一时间段药物处理组与对照组比较差异均有统计学意义(P<0.05)，而且浓度越高、时间越长、抑制作用越明显(表 1)；其 24、48 和 72 小时的 IC50 分别为 354.21ng/ml、299.62ng/ml 和 212.07ng/ml。

表 1 TcdA 对 FRH-0201 细胞的增殖抑制作用

Table 1 Growth inhibition effect of TcdA on FRH-0201 cells

Dose (ng/ml)	24h		48h		72h	
	A490	IR(%)	A490	IR(%)	A490	IR(%)
0	0.37± 0.005	-	0.46± 0.006	-	0.63± 0.009	-
50	0.33± 0.018	4.41	0.36± 0.006	6.71	0.46± 0.014	8.46
100	0.30± 0.004*	9.59	0.32± 0.012*	10.72	0.41± 0.005*	19.03
200	0.25± 0.006*	23.30	0.28± 0.010*	31.73	0.31± 0.006*	39.75
400	0.20± 0.004*	53.05	0.21± 0.002*	60.63	0.24± 0.016*	68.14

注：* 和对照组比较存在差异(P<0.05)

*P<0.05 vs control group

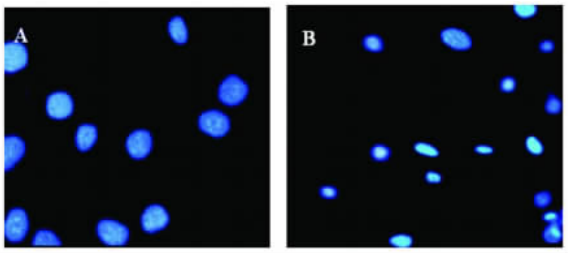
2.2 TcdA 诱导 FRH-0201 细胞凋亡的形态学变化

400ng/ml TcdA 作用于 FRH-0201 细胞 48 小时后，荧光显微镜下可见典型凋亡细胞形态：细胞体积变小，核内或胞质内可见致密浓染颗粒，部分细胞出现核碎裂，伴凋亡小体形成。而正常细胞大小及染色均匀(图 1)。

2.3 TcdA 诱导的 FRH-0201 细胞早期凋亡

AnnexinV-FITC / PI 双染法检测结果表明，各个浓度组均能诱导 FRH-0201 细胞凋亡，随浓度增加，细胞凋亡比例逐渐增加(表 2)。 2 检验证实各治疗组的凋亡率和对照组的凋亡率存在显著差异(P<0.05)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



对照组 Control group　　TcdA(400ng/ml)处理 48 小时 Treated with TcdA(400ng/ml)for 48 hours

图 1 Hoechst 33342 染色观察 FRH-0201 细胞凋亡(× 400)

Fig.1 Observation of K562 cells apoptosis staining with Hoechst 33342 (× 400)

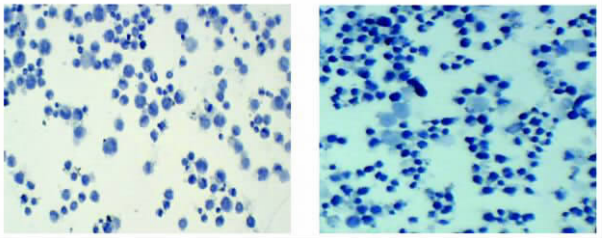
表 2 各组细胞凋亡率(%)

Tab 2 inhibition ratio of FRH-0201 cells in each group(%)

对照组	TcdA 组 (50ng/ml)	TcdA 组 (100ng/ml)	TcdA 组 (200ng/ml)	TcdA 组 (400ng/ml)
0.94	4.88	8.79	20.60	45.02

2.4 TcdA 对 FRH-0201 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

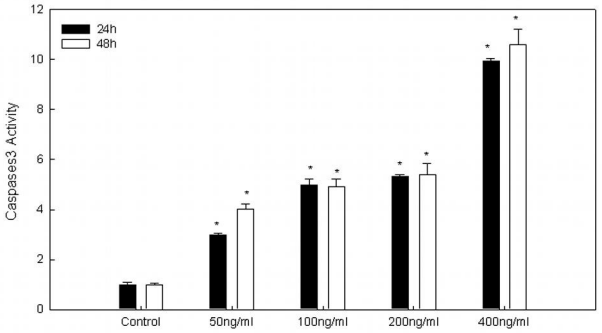
免疫组化结果显示：Bcl-2 蛋白表达在 TcdA 处理后水平下降(图 3)，图像分析显示，对照组光密度值 0.081± 0.005，TcdA (400ng/ml)处理 48h 后光密度值 0.078± 0.009，t<0.05；对照组显著高于处理组。



Control group　　Treated with TcdA(400ng/ml) for 48 h

图 3 FHR-0201 细胞 Bcl-2 蛋白表达(× 100)

Fig3 Bcl-2 expression in FRH-0201 cells(× 100)



*P<0.05 vs Control group(the same time stage)

图 5 不同浓度 TcdA 对 FRH-0201 细胞 Caspase-3 活性的影响

Fig 5 Caspase-3 activity of FRH-0201cells treated with different concentrations of TcdA

2.5 TcdA 作用对 FRH-0201 细胞 Caspase-3 活性的影响

Caspase-3 活性测定结果：FRH-0201 细胞 Caspase-3 酶活性较低，24 和 48 小时分别为 1.00± 0.10 和 0.98± 0.09，TcdA 能显著增强 Caspase-3 的酶活性，各浓度组的 Caspase-3 酶活力单位与对照组的相同时间段相比，差异均有统计学意义 (P<0.05) (图 4)。

3 讨论

目前临床常用抗恶性肿瘤药大多属于直接杀伤肿瘤细胞的细胞毒类药物，但对肿瘤细胞和正常细胞缺乏理想的选择作用；同时由于胆管癌细胞生物学特性复杂，特异性强的化疗药物研发困难，而常规化疗药物疗效差、毒副作用强[7]；故行之有效的新化疗药物的研制就显得更加迫切。TcdA 可以诱导多种哺乳动物细胞发生凋亡，癌细胞对 TcdA 反应的敏感性高但 TcdA 对正常细胞影响甚微[8]，TcdA 的这种特性表明其在胆管癌的化疗中可能的临床应用价值。

本研究证实：TcdA 能显著抑制 FRH-0201 细胞增殖，并呈现出时间和剂量依赖关系。通过观察形态学变化及凋亡率的检测，TcdA 的增殖抑制作用应该主要是通过诱导细胞凋亡而实现的。细胞凋亡的发生是由众多相关基因参与调控的结果，Bcl-2 蛋白家族与半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspases)在细胞凋亡的调控中具有重要作用。Bcl-2 过表达可阻止 staurosporine 诱导的 Jurkat T 细胞凋亡，以及 Caspase-3、7 的活化。在射线、化学药物等情况下，细胞色素 C 从线粒体内释放，与凋亡细胞蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合；募集到的半胱氨酸蛋白酶原通过与凋亡诱导蛋白 apaf-1 的 NH-2 末端区域结合而激活，首先激活 Caspases9，并进一步激活 Caspases3、6 和 7，促进细胞凋亡[9-11]。TcdA 处理后，Bcl-2 蛋白在 FRH-0201 细胞中的表达明显下调，Caspases-3 活性较前明显增强；这些可能是 FRH-0201 细胞发生凋亡的原因。

作为术后的主要辅助治疗手段，化学治疗对胆管癌患者的生活质量和 5 年生存率均有重要影响[12-13]。研究未对 TcdA 和其他临床常用化疗药物的治疗效果进行比较、没有进行体内试验、其诱导肿瘤细胞凋亡的机制尚未完全阐明；尚不能肯定 TcdA 治疗胆管癌的临床效果和优越性。本研究组将在未来的研究中进行进一步报道。但其通过诱导肿瘤细胞凋亡的特性和正常细胞低敏感性的优点，是临床将来科学选择化疗药物的方向。

参 考 文 献(References)

[1] 丛文铭，吴孟超，陈汉. 肝内胆管癌多基因变异表型分析[J]. 中华医学杂志，2001，81：271-273
Cong Wen-ming, Wu Meng-chao, Chen Han. Genotyping of multiple genetic alterations of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Natl Med J China, 2001,81:271-273

[2] Chamberlain RS, Blumgart LH. Hilar cholangiocarcinoma: a review and commentary[J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7: 55-66

[3] Baton O, Azoulay D, Adam DVR, et al. Major Hepatectomy for Hilar Cholangiocarcinoma Type 3 and 4: Prognostic Factors and Longterm Outcomes. Journal of the American College of Surgeons 2007, 204: 250-260

(下转第 70 页)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tional, 2007, 31 :985-990

[2] Karin Kehe, Michael Abend, Kai Kehe, et al. Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line [J]. Arch Dermatol Res, 1999, 291: 600-605

[3] 张菊芳,沈海燕,王佳鸣,等。构建含黑色素细胞组织工程表皮的实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志,2008,6 (4) :3-6
Zhang Jufang, Shen Haiyan, Wang Jiaming, at al. An Experimental Study of Reconstruction of a Tissue-engineered Epidermis Containing Melanocytes [J]. Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2008,6(4):3-6

[4] S.W.Spiekstra a, G.G.dosSantos a et al. Potential method to determine irritant potency in vitro - Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency [J]. Toxicology in Vitro,2009,23: 349-355

[5] E. Tinois, Gaetni, Gayraud et al. The Episkin model: successful reconstruction of human epidermis in vitro. In vitro skin Toxicology Irritation, phototoxicity [M]. Sensitization. Rougier, Goldberg & Maibach Eds Mary Ann Liebert Inc. New York, 133-140, 1994

[6] ECVAM. Statement on the application of the EPIDERM® human skin model for skin corrosivity testing[M]. ATLA, 2001,28, 365-367

[7] Ting Hua, RuthE .Bailey et al. Dermal penetration and metabolism of p-aminophenol and p-phenylenediamine: Application of the EpiDermTM human reconstructed epidermis model [J]. Toxicology Letters,2009, 188:119-129

[8] MartinMacfarlane a, PennyJones a et al. A tiered approach to the use of alternatives to anima ltesting for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009, 54 :188-196

[9] GregC.Muna, MarilynJ.Aardema et al. Further development of the EpiDermTM3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay[J]. Mutation Research, 2009, 673:92-99

[10] DANBOLT NC, Glutamate uptake [J]. Progress in Neurobiololgy, 2001, 65:1-105

(上接第 62 页)

[4] 吴小鹏,王占民,何晓冉,等. 肝门部胆管癌细胞系 FRH0201 的建立及生物学特性研究[J].中华医学杂志,2005,85(25):1784-1785
Wu Xiao-peng, Wang Zhan-ming, He Xiao-rang, etal. Establishment and characterization of human hilar cholangiocarcinoma cell line FRH-0201[J]. Natl Med J China,2005,85(25):1784-1785

[5] 傅思武, 周殿元. 艰难梭菌 A 毒素的纯化 [J]. 中国生化药物杂志, 2004,25 (2): 86-88
Fu Si-wu, Zhou Dian-yuan. Purification of Clostridium difficile toxin A [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2004, 25 (2): 86-88

[6] 周一平. 用 spss 软件计算新药的 LD_ (50)[J]. 药学进展,2003,27 (5) :314-316
Zhou Yi-ping. The Calculation of LD_ (50) in New Drugs with Software SPSS [J]. Progress In Pharmaceutical Sciences, 2003,27 (5) : 314-316

[7] Jonas S, Benckert C, Thelen A,et al.Radical surgery for hilar cholangiocarcinoma [J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2008, 34: 263-271

[8] Zhao J, Wang D, Zhao H, et al. Comparative study on apoptosis induction of SMMC7721 and Vero cells by Clostridium difficile toxin A[J]. Chinese Journal of Cancer, 2003, 22 (7): 719-24

[9] Jonas S, Benckert C, Thelen A, et al. Radical surgery for hilar cholangiocarcinoma [J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2008, 34: 263-271

[10] Mazzoni C, Falcone C. Caspase-dependent apoptosis in yeast [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2008, 1783: 1320-1327

[11] Oppenheim R, Milligan C, Larry RS. Programmed Cell Death[J]. Encyclopedia of Neuroscience Oxford: Academic Press 2009: 1117-1124

[12] Hidalgo E, Asthana S, Nishio H, et al. Surgery for hilar cholangiocarcinoma: The Leeds experience [J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2008, 34: 787-794

[13] 霍胜军,汤恢焕,魏伟. 肿瘤局部切除加 125I 残瘤间植入治疗肝门部胆管癌[J].现代生物医学进展, 2008,8(7):1297-1298
Huo Sheng-jun, Tang Hu-huan, Wei Wei. Application of Local Resection of Tumour plus Interstitial25I Implants in Treatment of Cancer of Bile Duct of Hepatic Portal [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(7):1297-1298

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net