阿霉素诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其免疫原性研究

窦征岳[1],江其生[2]
(1.保定市第三医院/肿瘤医院,河北 保定 071000;2.第二炮兵总医院,北京 100088)

摘　要:[目的]研究阿霉素诱导的人肺癌 A549 细胞凋亡及免疫原性。[方法]体外培养人肺癌 A549 细胞,将阿霉素加入 A549 细胞培养液中,使其终浓度分别为 1mg/L、3mg/L、5mg/L,12h 后以吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染色凋亡方法检测其诱导的细胞凋亡情况;以凋亡的 A549 细胞为抗原,体外致敏分离的正常人外周血单个核细胞,72h 后以 MTT 法检测其对培养的 A549 细胞的杀伤效果。[结果]阿霉素按 1mg/L、3mg/L、5mg/L 终浓度作用 A549 细胞 12h 后,凋亡率分别为 17.60%±1.77%,62.93%±1.70%,16.80%±0.65%。在外周血单个核细胞杀伤实验中,阿霉素诱导的 A549 凋亡细胞抗原组(A 组)光密度(OD)值为 0.66508±0.036859,正常细胞对照组(N 组)OD 值为 0.94132±0.018455,凋亡抑制组(Z-A 组)为 0.71810±0.026841。A 组与 N 组、Z-A 组相比,OD 值均显著降低(P<0.05)。[结论]阿霉素可诱导 A549 细胞凋亡,而由凋亡细胞致敏的体外单个核细胞可产生对 A549 细胞的杀伤效应。
主题词:肺肿瘤;细胞凋亡;阿霉素;免疫原性;免疫治疗
中图分类号:R734.2　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1671-170X(2013)06-0423-04

Adriamycin Induced Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines A549 and Immunogenicity of Apoptosis Cells

DOU Zheng-yue[1], JIANG Qi-sheng[2]
(1.*The Third Hospital/Cancer Hospital of Baoding City, Baoding* 071000, *China*; 2.*The Second Artillery Hospital of PLA, Beijing* 100088, *China*)

Abstract: [Purpose] To study adriamycin (APM) induced apoptosis in lung adenocarcinoma A549 cell lines and the immunogenicity of apoptosis cells. [Methods] A549 cells were cultivated with ADM *in vitro*. After 12h cultivation, apoptosis ratio with ADM concentration of 1mg/L, 3mg/L, 5mg/L was determined by acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double dye measurement. With apoptosis A549 cells as antigen, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were sensitized, and after 72h, killing effect was detected by MTT. [Results] After treated with ADM at concentration of 1mg/L, 3mg/L, 5mg/L, apoptosis rate of A549 was 17.6%±1.77%, 62.93%±1.70%, 16.8%±0.65% respectively. In peripheral blood mononuclear cell killing experiments, optical density (OD) in group of antigen maked by apoptotic A549 cells induced by adriamycin (group A) was 0.66508±0.036859, and that in normal cell group (group N) and in apoptosis inhibited group (group Z-A) was 0.94132±0.018455 and 0.71810±0.026841 respectively. Comparing group A with group N and with group Z-A, OD of group A was significantly lower than that of group N or group Z-A (P<0.05). [Conclusion] ADM is capcable of inducing cell apoptosis in A549 cell line, and PBMC sensitized by apoptosis cells was provided with killing effect to A549 cells.
Subject words: lung neoplasms; cell apoptosis; adriamycin; immunogenicity; immunotherapy

化疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一，阿霉素是目前常用的化疗药物，其作用机制在于可直接作用于 DNA,插入 DNA 的双螺旋链,使后者解旋,改变 DNA 的模板性质，抑制 DNA 聚合酶从而抑制 DNA 及 RNA 合成。免疫原性(抗原性)是指某物质或分子能刺激机体形成特异抗体或致敏免疫细胞使其活化、增殖、产生生物学效应的能力。阿霉素等化疗药物被认为对机体免疫细胞具有抑制作用，但其引起的凋亡肿瘤细胞是否具有免疫原性及能否由此致敏免疫细胞产生对肿瘤细胞的杀伤效应是一个值得深入研究的重要课题。为此,本文就阿霉素能否诱

通讯作者:江其生,主任,主任医师,博士;第二炮兵总医院中心实验室，北京市西城区新街口外大街 16 号 (100088);E-mail: jqs598@sina.com。
收稿日期:2012-11-07;**修回日期:**2013-02-18

导人肺癌 A549 细胞凋亡并由此产生免疫原性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

阿霉素购自辉瑞制药有限公司；人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司；RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清购自 Hyclone 公司；吖啶橙、噻唑蓝(MTT)购自 Genview 公司；泛-caspase 细胞凋亡抑制剂(Z-VAD)购自凯基普京康利科技有限公司；溴化乙锭购自 Amresco 公司；人肺腺癌 A549 细胞为本实验室常规保存。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

将 A549 细胞用 RPMI-1640 培养液培养(含 10%的胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)，放置 37℃、5%CO_2 孵箱中。每日观察细胞生长情况，待细胞铺满整个培养瓶底面 80%后，进行细胞传代。

1.2.2 化疗后 A549 细胞凋亡率计算

将 A549 细胞用阿霉素按不同的作用剂量分组处理，阿霉素终浓度分别为 1mg/L、3mg/L、5mg/L，作用 12h 后，分别以 2.5g/L 胰酶消化贴壁细胞，以 PBS 重悬细胞至 1 ×10^6/L，取 100μl，以药物未处理为对照组。以吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染色方法进行细胞凋亡检测。在荧光显微镜下观察，可见 4 种细胞形态：活细胞，核染色质着绿色并呈正常结构；早期凋亡细胞，核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状；非凋亡的死亡细胞，核染色质着橘红色并呈正常结构；晚期凋亡细胞，核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。100μl 细胞悬液内加入吖啶橙/溴化乙锭（均为 100mg/L）各 2μl，取 10μl 细胞悬液滴片，荧光显微镜下计数凋亡细胞及活细胞，按下列公式计算各组细胞的凋亡率：

凋亡率= (早期凋亡+晚期凋亡)/(活细胞+早期凋亡+晚期凋亡+坏死)×100%

1.2.3 A549 细胞抗原制备

阿霉素处理后 A549 细胞抗原制备：收获 A549 细胞，完全培养基重悬 A549 细胞至 9×10^5/ml，取 6 孔板，其中 3 孔加细胞悬液 1ml，每孔追加完全培养基至 2.5ml。共制备抗原 3 组：①A 组：将阿霉素加入 3 孔中制备阿霉素处理抗原，阿霉素终浓度 3mg/l；②Z-A 组：取 3 孔加泛-caspase 细胞凋亡抑制剂 Z-VAD，终浓度 20mmol/L，20 min 后，再加阿霉素，阿霉素终浓度仍为 3mg/L；③N 组：为不加阿霉素的对照组。在阿霉素作用 12h 后分别收集各孔细胞，2 000r/min 离心 5min，PBS 清洗 2 次，各孔收集的细胞用完全培养基 3ml 重悬。取无菌 EP 管每管分装 1ml，相当于 3×10^5 个细胞，冻融 2 次，-80℃保存备用。

1.2.4 外周血单个核细胞(PBMC)的分离(密度梯度离心法)

抽取正常人外周血 20ml，5ml 肝素钠(500U/ml)抗凝，并将血液与生理盐水按 1:1 比例混合稀释，将淋巴细胞分离液 5ml 加入无菌试管中，用吸管取 5ml 稀释的细胞悬液，在分层液上 1cm 处，沿试管壁缓慢加入。试管移至离心机中，水平离心，室温，2 000r/min，30min；离心后管内由上至下分为 4 层，为血浆层、单个核细胞层、淋巴细胞分离液层、红细胞层；吸取单个核细胞，移入另一试管中，加 3~4 倍不完全培养基(未添加血清的培养基)，混匀，以 2 000r/min，离心 10min，共 2 遍。完全培养基重悬细胞调整细胞浓度为 3×10^6/ml。

1.2.5 单个核细胞杀伤实验

收获培养的 A549 细胞，完全培养基重悬至 3×10^5/mL，混匀后每孔加 100μl 于 48 孔板，留一空白孔调零，将分离重悬的单个核细胞每孔取 100μl 加于 48 孔板，单个核细胞:A549 细胞=10:1。留 3 孔对照，不加单个核细胞。共设 3 组，每组 5 孔，每孔加抗原 100μl，均相当于 3×10^4 个细胞产生的抗原量，3 组分别为：Z-A 组，A 组，N 组。添加完全培养基每孔至 1ml。

1.2.6 单个核细胞对 A549 细胞的细胞毒作用(MTT 法)

48 孔板反应 72h 后，吸弃孔中所有液体，每孔加入 200μl 完全培养基，20μl MTT 溶液(5mg/ml，即 0.5%MTT)，继续培养 4h。终止培养，小心吸去孔内培养液。每孔加入 200μl 二甲基亚砜，置摇床上低速振荡 10min，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 490nm 处测量各孔的光密度值。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SAS8.0 数据包行方差分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同剂量阿霉素诱导的 A549 细胞凋亡率

1mg/L、3 mg/L、5mg/L 阿霉素作用 A549 细胞 12h 后引起的 A549 凋亡率分别为 17.60%±1.77%，62.93%±1.70%，16.80%±0.65%。与 1mg/L 组、5mg/L 组相比，3mg/L 组阿霉素引起的凋亡率显著升高（P<0.01）。

2.2 阿霉素诱导的 A549 细胞凋亡的形态学特点

荧光显微镜下见 A549 早期凋亡细胞核染色质着绿色，呈固缩状或圆珠状（Figure 1，2），而正常 A549 活细胞核呈绿色，呈正常结构（Figure 3）。

2.3 MTT 结果

A 组、Z-A 组、N 组 OD 值分别为 0.66508±0.036859，0.71810±0.026841，0.94132±0.018455（Figure 4）。A 组与 N 组比较，P=0.0001，阿霉素处理的抗原与正常细胞都经过冻融过程，两者之间的统计学差异表明，并非冻融过程引发了免疫原性增强，而是经阿霉素处理后 A549 细胞免疫原性增强。

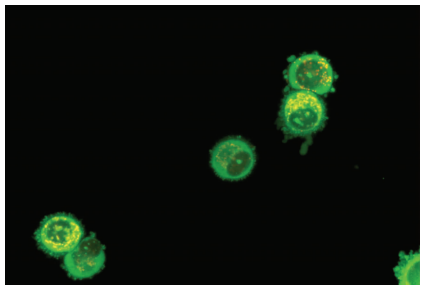


Figure 1 Early apoptotic A549 cells(×40)

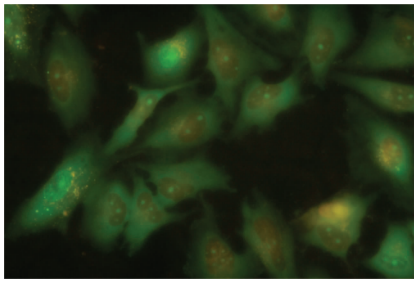


Figure 2 Early apoptotic A549 cells(×40)

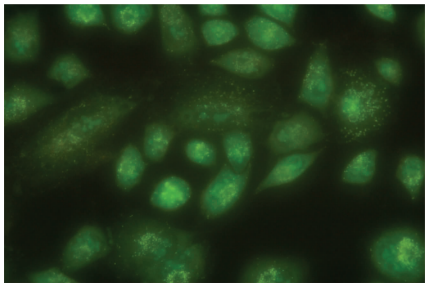
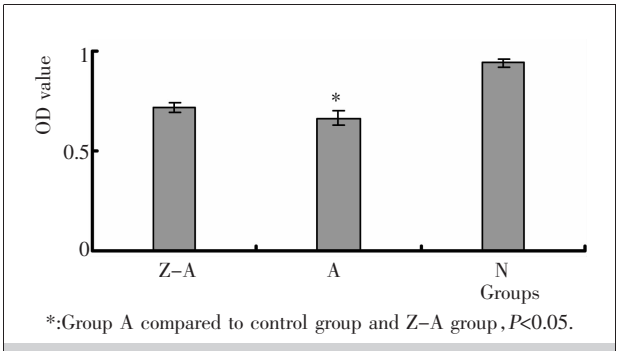


Figure 3 Normal A549 cells(×40)



*:Group A compared to control group and Z-A group, P<0.05.

Figure 4 OD value of lethal effect by different antigenic stimulation mononuclear cells

A 组与 Z-A 组比较，P=0.0316，说明应用泛-caspase 细胞凋亡抑制剂 Z-VAD 可降低单个核细胞对 A549 细胞的杀伤能力和凋亡细胞的免疫原性，表明经阿霉素处理的 A549 细胞的免疫原性与凋亡程度相关。

3 讨 论

化疗是肿瘤治疗的重要手段，在肿瘤根治性治疗、辅助治疗、姑息治疗中发挥重要作用。但其对造血系统和免疫细胞的细胞毒性作用，使其通常被认为是免疫抑制剂。部分化疗药物所引起的肿瘤细胞死亡或凋亡所释放的抗原能否诱导机体免疫活性细胞产生对肿瘤细胞的杀伤作用尚不明确，为此，本实验采用临床常用的蒽环类化疗药物阿霉素处理 A549 细胞制备肿瘤抗原并体外进行对正常 A549 细胞的杀伤研究。实验采用吖啶橙/溴化乙锭（AO/EB）双染色法检测阿霉素诱发 A549 细胞凋亡情况，结果发现一定浓度阿霉素在作用 12h 后可引起细胞早期凋亡，细胞形态学特点表现为核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状，为细胞早期凋亡状态；本实验进一步发现不同浓度阿霉素所诱发的 A549 细胞凋亡率有所不同，3mg/L 阿霉素组所诱发的凋亡率明显高于 1mg/L 组和 5mg/L 组。不同浓度阿霉素诱导的细胞凋亡率的不同是否与小剂量化疗引起细胞凋亡，大剂量化疗则导致细胞坏死有关[1]尚待进一步

研究。

本实验利用 MTT 方法检测了凋亡的 A549 细胞诱发免疫杀伤作用的效果，结果发现阿霉素组对 A549 细胞的杀伤能力明显强于对照组($P<0.01$)，提示由阿霉素处理的凋亡 A549 细胞能够增强单个核细胞对肿瘤细胞的杀伤能力，即阿霉素可通过诱导肿瘤细胞凋亡而产生免疫原性。

文献报道[2]，阿霉素诱导细胞凋亡是通过泛-caspase 途径。而泛-caspase 细胞凋亡抑制剂以不可逆的形式与活化的 caspases 结合从而阻断细胞凋亡的发生。本实验发现与阿霉素组比较，加入凋亡抑制剂后的阿霉素组(Z-A 组)所诱发的单个核细胞杀伤效果明显降低($P<0.05$)，提示阿霉素引起的凋亡的 A549 细胞诱发单个核细胞的杀伤作用。

化疗诱导的细胞死亡主要为凋亡，通常被认为无免疫原性，或处于免疫耐受状态，并认为与巨噬细胞介导的免疫静默有关[3]。化疗药物可诱导肿瘤细胞死亡，而这些死亡细胞可激活抗肿瘤免疫。另外可在肿瘤的微环境中，化疗药物通过辅助的和大量未知的免疫学的反应，作用于肿瘤及宿主引起抗肿瘤免疫[4]。本实验发现阿霉素体外可通过诱导肿瘤细胞凋亡而产生免疫原性，从而促进对肿瘤细胞的免疫杀伤效应，其机制可能与以下因素有关：①阿霉素可上调肿瘤细胞表面识别分子，如：MHC Ⅰ，NKG2D，FAS 等[5]。Liu 等[6]发现肿瘤细胞化疗后人类白细胞抗原(HLA)表达增加，有利于细胞毒性 T 细胞的杀伤；②阿霉素可促进死亡细胞抗原释放有关。阿霉素可使肿瘤细胞死亡释放一些免疫相关物质[5]，如高迁移率族蛋白 1(high-mobility group box1，HMGB1)等，可加强抗原递呈激活细胞毒性 T 细胞活性[7]；③阿霉素活化钙网织蛋白(calreticulin，CRT)有关。Obeid 等[8]发现肿瘤细胞胞浆中的 CRT 移位于细胞膜表面可产生免疫原性，阻断和敲除 CRT 都能抑制免疫反应的发生，经阿霉素等蒽环类化疗药物处理的肿瘤细胞可使 CRT 从胞浆移位于细胞膜中，从而产生免疫原性，并诱发免疫细胞的杀伤肿瘤细胞效应，而其它化疗药物如足叶乙甙、丝裂霉素 C 等并不具有这种能力。本实验得到的试验效果可能与此机制有关，在后续试验中将对细胞膜表面的 CRT 进行进一步检测。

阿霉素可诱导 A549 细胞凋亡并产生免疫原性，这为实施以树突细胞(DC)—细胞因子活化的杀伤细胞(CIK)—细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)等免疫活性细胞治疗肿瘤提供了基础，因此，化疗联合免疫治疗在理论上具有协同性，在具体实施时需要考虑化疗药物种类、毒性、半衰期等因素对免疫活性细胞的影响。根据本文研究结果推测，在应用化疗药物引起肿瘤细胞凋亡的高峰期及时实施以 DC-CIK 为基础的免疫治疗似乎更为合适，这也为恶性肿瘤化疗联合免疫治疗新模式的探索提供了实验依据。

参考文献：

[1] Wang SB，Yang CZ. Research advance in apoptosis induced by chemotherapy [J]. Chinese Journal of Cancer，2000，19(12): 1173-1176.[王树滨，杨纯正.肿瘤化疗药物诱导细胞凋亡的研究进展[J].癌症，2000，19(12): 1173-1176.]

[2] Casares N，Pequignot MO，Tesniere A，et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death[J]. J Exp Med，2005，202(12): 1691-701.

[3] Obeid M，Tesniere A，Panaretakis T，et al. Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy [J]. Immunol Rev，2007，220: 22-34.

[4] Chen G，Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity[J]. Cancer Immunol Immunother，2013，62(2): 203-216.

[5] Menard C，Martin F，Apetoh L，et al. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect，but also an adjuvant for antitumor immunity [J]. Cancer Immunol Immunother，2008，57(11): 1579-1587.

[6] Liu WM，Fowler DW，Smith P，et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses[J]. Br J Cancer，2010，102(1): 115-123.

[7] Kepp O，Tesniere A，Schlemmer F，et al. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment [J]. Apoptosis，2009，14(4): 364-375.

[8] Obeid M，Tesniere A，Ghiringhelli F，et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. Nat Med，2007，13(1): 54-61.