喜树碱对小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 表达及细胞凋亡影响的研究

于睿鹏　范潇婷　童宏选　邓恺文　罗广彬　马志涛
（北京中医药大学，北京 100029）

摘　要　目的：观察喜树碱对小鼠骨髓中性粒细胞 X 连锁凋亡抑制蛋白（XIAP）、Toll 样受体 4（TLR4）、CXC 趋化因子受体 2（CXCR2）mRNA 的表达和细胞凋亡的影响。方法：使用 percoll 不连续密度梯度离心法分离纯化小鼠骨髓中性粒细胞，对得到的中性粒细胞使用不同浓度的喜树碱加药处理 1h。使用荧光定量 PCR 检测喜树碱对小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 mRNA 表达的影响；采用 Annexin V-FITC/PI 染色法，使用流式细胞仪检测喜树碱对小鼠骨髓中性粒细胞凋亡的影响。结果：与空白组相比，喜树碱作用 1h 后，小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 mRNA 表达水平下降，其中喜树碱浓度为 2μmol/L 和 20μmol/L 时，上述指标表达水平明显下降（$P<0.001$）；与空白组相比，喜树碱作用 1h 后，小鼠骨髓中性粒细胞凋亡比例略有升高。结论：喜树碱因其具有的拓扑异构酶 I 毒性诱导骨髓造血干细胞凋亡而导致中性粒细胞数量减少，同时还可能通过抑制骨髓中性粒细胞的迁移和诱导其凋亡，减少进入血液前往炎症和肿瘤部位的中性粒细胞数量。

关键词　喜树碱　骨髓中性粒细胞　XIAP　TLR4　CXCR2　细胞凋亡　小鼠
中图分类号　R282.710.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-397X(2017)06-0080-03

喜树碱（Camptothecin，CPT）来源于中药喜树，因其具有很好的抗癌活性，目前已是临床常用的化疗药物。喜树碱类抗肿瘤药作用靶点明确，其通过结合拓扑异构酶 I（Topoisomerase，TOP1），引起 TOP1 中毒发挥抗肿瘤作用，其衍生物已被广泛应用于临床治疗结肠癌等癌症。但是临床应用中发现 CPT 存在严重副作用，在杀死肿瘤细胞的同时，会导致血液白细胞尤其是中性粒细胞数量减少[1-2]，以往的研究认为这是由于 CPT 诱导骨髓中的造血干细胞凋亡而导致中性粒细胞数量减少，但尚未有人具体研究 CPT 如何对中性粒细胞产生影响。中性粒细胞是人体血液循环最丰富的免疫细胞，最新研究发现其在肿瘤形成的特定阶段会促进肿瘤细胞的增殖和迁移，减少肿瘤部位的中性粒细胞数量能够抑制肿瘤[3]。因此，本研究拟观察抗癌药物 CPT 对骨髓中的中性粒细胞能够产生怎样的影响。本实验以正常小鼠骨髓中性粒细胞为研究对象，分别以一定浓度 CPT 处理中性粒细胞 1h，对中性粒细胞 X 连锁凋亡抑制蛋白（XIAP）、Toll 样受体 4（TLR4）、CXC 趋化因子受体 2（CXCR2）mRNA 的表达和细胞凋亡情况进行检测。

1　实验材料

1.1　实验试剂　喜树碱（上海阿拉丁生物试剂公司），Percoll 密度梯度分离液（GE），RPMI 1640（CORNING），胎牛血清，胰蛋白酶（Amresco），CXCR2 引物、TLR4 引物、XIAP 引物、GAPDH 引物（Invitrogen），反转录试剂盒（TOYOBO），SYBR Green（TOYOBO），70μm 细胞滤网（FALCON），凋亡试剂盒（BD），APC-ly6G 荧光抗体（BD）。

1.2　主要仪器　细胞培养箱（Thermo），核酸浓度仪，PCR 仪（BIO-RAD），荧光定量 PCR 仪（BIO-RAD），荧光显微镜（Nikon）。

1.3　实验动物　C57BL/6 小鼠，8 周，雄性，SPF 级，由北京斯贝福生物技术有限公司提供，合格证号：SCXK（京）2016-0002。

2　实验方法

2.1　小鼠骨髓中性粒细胞的提取　取小鼠大腿股骨两根，剪去两端骨头，用 PBS 冲洗骨头内部，将冲洗出的细胞经 70μm 滤网过滤，1500r/min 离心 10min，加入 10mL 0.2%NaCl 重悬细胞 10s，裂解红细胞，再加入 10mL 1.6%NaCl，终止裂解，1500r/min 离心 8min，用 1mL 1640（10%FBS）重悬细胞。用 percoll 与 10×PBS 按 9:1 混合，配成 percoll 原液，percoll 原液与 1×PBS 按比例分别在 15mL 离心管中配置 4mL 72.5%percoll 和 4mL 62.5%percoll，用注射器将 4mL 62.5%percoll 缓慢加入到 4mL 72.5%percoll 液面之上，然后用注射器将得到的 1mL 骨髓细胞缓缓加入到 62.5% percoll 液面之上，2893r/min 离心 30min，加

速度 9，减速度 0。最终得到的中性粒细胞位于 72.5% percoll 和 62.5%percoll 液面之间。将中性粒细胞吸出，加入等体积 PBS，1200r/min 离心 8min，加入 1mL PBS 重悬，1200r/min 离心 8min，用 PBS 或者培养基重悬，用台盼蓝计数检测存活中性粒细胞的数量，用瑞氏染色在 100 倍油镜下观察中性粒细胞的纯度。

2.2 荧光定量 PCR 检测小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 mRNA 表达 提取 C57BL/6 小鼠骨髓中性粒细胞，将其培养于 6 孔板中，每孔细胞数 4×10^6 个，分别设空白组、CPT 200nmol/L 组、CPT 2μmol/L 组、CPT 20μmol/L 组，加药处理 1h 后，提取细胞的 RNA，按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录，得到 cDNA，用三蒸水将 cDNA 稀释 10 倍，按照如下比例配置样品：2×SYBR premix 10μL，10μmol/L 上游引物 1μL，10μmol/L 下游引物 1μL，cDNA 模板 4μL，三蒸水 4μL，配置成 20μL 的体系。反应条件为 50℃ 2min，95℃ 10min，95℃ 15s，60℃ 1min，循环数 44 个。XIAP 上游引物 5'-CAGAACACAGGAGACACT-3'，下游引物 5'-ACTCACACCAGATTCACTT-3'；TLR4 上游引物 5'-GCCTTCACTACAGAGACTT-3'，下游引物 5'-TAGACACTACCACAATAACCTT-3'；CXCR2 上游引物 5'-ATCCAGAAGAGACACTTG-3'，下游引物 5'-CATAGCAGACTAAGGTAGAA-3'；内参基因 GAPDH 上游引物 5'-AGTGGCAAAGTGGAGATT-3'，下游引物 5'-GTGGAGTCATACTGGAACA-3'。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 提取 C57BL/6 小鼠骨髓中性粒细胞，将其培养于 6 孔板中，每孔细胞数 4×10^6 个，分别设为空白组、CPT 200nmol/L 组、CPT 2μmol/L 组、CPT 20μmol/L 组，加药处理 1h 后，将每组细胞吸至离心管中，1891r/min 离心 5min，用 1mL PBS 重悬，1891r/min 离心 5min，用凋亡试剂盒中 1×缓冲液 200μL 重悬，加入 4μL annexin V 染料、4μL APC 标记的 ly6G 染料，冰上避光孵育 20min，加入 5μL PI 染料，上机检测。

2.4 统计学方法 对荧光定量 PCR 结果计算得到的 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ 使用 SPSS 20 进行单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 检验，以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

3 实验结果

3.1 percoll 不连续密度梯度离心法分离小鼠骨髓中性粒细胞纯度的检测 经过 percoll 密度梯度离心，小鼠骨髓中性粒细胞位于 4mL 刻度线处，如图 1a 所示。将 percoll 密度梯度离心分离纯化得到的骨髓中性粒细胞通过瑞氏染色的方法，在 100 倍油镜下观察，如图 1b 所示。获得的中性粒细胞纯度大于 90%，经台盼蓝染色计数，证明细胞存活率大于 99%。

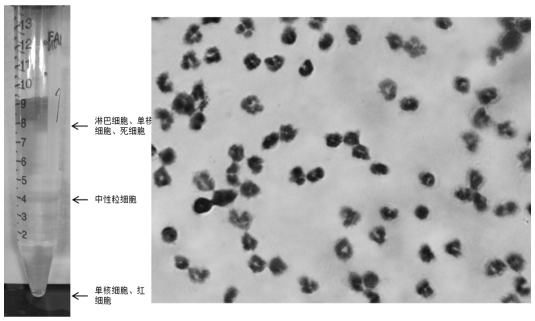


图 1 小鼠骨髓中性粒细胞瑞氏染色镜下观察

注：a 表示中性粒细胞在 percoll 分离液中的位置；b 表示分离出的细胞通过瑞氏染色在 100 倍油镜下观察得到的中性粒细胞纯度，图中显示中性粒细胞纯度>90%。

3.2 CPT 对小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 mRNA 表达的影响 见表 1。与空白组比较，CPT 2μmol/L 和 20μmol/L 剂量组小鼠骨髓中性粒细胞中 XIAP、TLR4、CXCR2 mRNA 的表达明显降低（$P<0.001$）。

表 1 各组小鼠骨髓中性粒细胞 XIAP、TLR4、CXCR2 mRNA 表达比较 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$

组别	样本数	XIAP	TLR4	CXCR2
空白组	4	1	1	1
CPT 200nmol/L 组	4	0.86±0.1	0.965±0.075	0.9±0.08
CPT 2μmol/L 组	4	0.655±0.195***	0.54±0.17***	0.535±0.095***
CPT 20μmol/L 组	4	0.51±0.1***	0.285±0.035***	0.485±0.075***

注：*** 与空白组比较，$P<0.001$。

3.3 CPT 对小鼠骨髓中性粒细胞凋亡的影响 见图 2。与空白组相比，CPT 各剂量组中性粒细胞开始出现凋亡，随着 CPT 浓度增高，凋亡率有所上升但不显著。

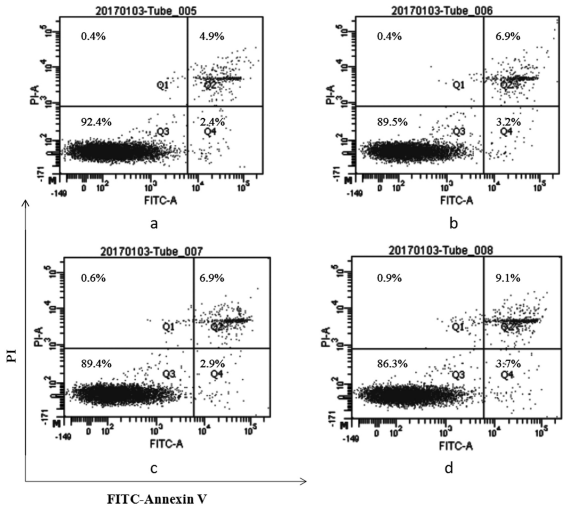


图 2 各组小鼠骨髓中性粒细胞凋亡情况

注：a.空白组；b.CPT 200nmol/L 组；c.CPT 2μmol/L 组；d.CPT 20μmol/L；Q1 区表示已死亡的细胞；Q2 区表示凋亡中后期细胞；Q3 区表示未凋亡细胞；Q4 区表示凋亡早期细胞。

4 讨论

1966 年 Monroe E. Wall 等首次从喜树皮、果实中提取出 CPT。CPT 是具有较高抗癌活性的修饰单

喜树碱类生物碱，其抗肿瘤的作用机理是导致肿瘤细胞 TOP1 中毒从而杀死肿瘤细胞。TOP1 在细胞 DNA 复制和转录过程中发挥着重要作用，能够切开超螺旋双链 DNA 的一条链，与被切割的 DNA3'端共价连接，形成所谓的 TOP1 共价复合物(TOP1cc)，释放 DNA 的扭转力，然后介导 DNA 的断链重连，恢复成双链 DNA。正常情况下，TOP1cc 存在时间短，而有 CPT 存在时，CPT 能够与 TOP1cc 结合，阻碍 DNA 断链重连，导致 DNA 单链断裂，这种单链断裂在 DNA 复制时，可能与前进的 DNA 复制叉碰撞，导致复制叉塌陷和 DNA 双链断裂的产生，在细胞中累积的双链断裂到一定量时可诱导细胞凋亡。因此，CPT 能够特异杀死分裂旺盛的细胞，而肿瘤细胞正是这类细胞。

近年来，中性粒细胞在肿瘤治疗中发挥的作用逐渐引起人们关注。肿瘤发展后期，中性粒细胞可以通过释放蛋白酶（主要是弹性蛋白酶 NE 和基质金属蛋白酶 MMP9）和通过 NETosis 方式死亡释放中性粒细胞胞外诱捕网促进肿瘤细胞的增殖和迁移，也可以通过自身背负肿瘤细胞迁移至血管，这些作用都不利于肿瘤的治疗[4-8]。于是，能抑制中性粒细胞迁移至肿瘤部位的药物逐渐引起关注。

本研究我们选择正常小鼠的骨髓中性粒细胞作为研究对象，CPT 处理小鼠骨髓中性粒细胞后，发现中性粒细胞中 XIAP、TLR4、CXCR2 的 mRNA 表达量下降。XIAP 是小鼠细胞中的凋亡抑制蛋白，当 XIAP 表达量下降时，往往会促进细胞凋亡。本实验结果显示，在 CPT 处理 1h 后，中性粒细胞开始出现细胞凋亡，并且随着剂量增加，凋亡率升高。综上说明，CPT 可能通过下调中性粒细胞 XIAP 的表达来诱导细胞凋亡。TLR4 是与炎症相关的膜表面受体，与中性粒细胞迁移到炎症部位密切相关。本实验结果显示，CPT 可能通过下调 TLR4 的表达从而阻断中性粒细胞进入血液和炎症部位发挥作用。CXCR2 是与中性粒细胞迁移相关的膜表面受体，趋化因子可以通过与 CXCR2 作用从骨髓中招募中性粒细胞，CXCR2 表达降低会导致进入血液的中性粒细胞数量减少，中性粒细胞趋向于保留在骨髓中。在最新的癌症治疗研究中发现，使用 CXCR2 阻断剂抑制中性粒细胞进入肿瘤部位，能够有效地提高癌症的治疗效果[3]。关于乳腺癌的最新研究发现，使用中性粒细胞表面蛋白 CXCR2 的阻断剂，能够有效减少中性粒细胞进入肿瘤细胞的数量，与抗癌药联用能够大大提高乳腺癌的治疗效果[9]。本实验结果说明 CPT 可能通过下调中性粒细胞 CXCR2 的表达，抑制中性粒细胞进入肿瘤部位，从而达到治疗肿瘤的效果。这也许是 CPT 在肿瘤治疗中与传统观念不同的另一条途径。

综上所述，CPT 不止因为其具有的 TOP1 毒性诱导骨髓干细胞凋亡而导致中性粒细胞数量减少，还可能通过抑制骨髓中性粒细胞的迁移和诱导其凋亡，减少了进入血液前往炎症和肿瘤部位的中性粒细胞数量。下一步拟建立肿瘤动物模型，研究 CPT 是否能够通过影响中性粒细胞功能而达到抑制肿瘤生长的目的。

参考文献

[1] KWEEKEL D,GUCHELAAR H J,G ELDERBLOM H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity[J].Cancer Treat Rev,2008,34(7):656.

[2] GARST J.Safety of topotecan in the treatment of recurrent small-cell lung cancer and ovarian cancer[J]. Expert Opinion on Drug Safety,2006,6(1):53.

[3] JAMIESON T,CLARKE M,STEELE C W,et al.Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis[J].J Clin Invest,2012,122(9):3127.

[4] POWELL D R,HUTTENLOCHER A.Neutrophils in the Tumor Microenvironment [J].Trends Immunol,2016,37(1):41.

[5] SWIERCZAK A,MOUCHEMORE K A,HAMILTON J A,et al.Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis [J].Cancer Metastasis Rev,2015,34(4):735.

[6] HOUGHTON A M,RZYMKIEWICZ D M,JI H,et al.Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth[J].Nat Med,2010,16(2):219.

[7] HOJILLA C V,WOOD G A,KHOKHA R.Inflammation and breast cancer:metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer[J].Breast Cancer Res,2008,10(2):205.

[8] WU Q D,WANG J H,CONDRON C,et al.Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration [J].Am J Physiol,Cell Physiol,2001,280(4):C814.

[9] ACHARYYA S,OSKARSSON T,VANHARANTA S,et al.A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis[J].Cell,2012,150(1):165.

第一作者：于睿鹏(1993—)，男，学士，硕士研究生，中西医结合基础专业，研究方向为抗癌药物毒副作用。

通讯作者：罗广彬，博士，教授，博士研究生导师。luol35@hotmail.com

收稿日期：2017-03-07

编辑：吴　宁