

Paclitaxel Combined with TLR7/8 Agonist 3M-052 Inducing the Apoptosis of Mouse Colon Cancer CT26 Cells

Wending An, Jianqin Mao, Yun Lin, Zirui Zheng*

Zhejiang HISUN Pharmaceutical CO., LTD, Taizhou Zhejiang
Email: zirui_zheng@163.com

Received: Aug. 17th, 2018; accepted: Sep. 4th, 2018; published: Sep. 11th, 2018

Abstract

Objective: To investigate the effect and mechanism of paclitaxel combined with Toll-like receptor 7/8 agonist 3M-052 on the apoptosis of mouse colon cancer CT26 cells. **Methods:** CT26 cells were treated with different concentrations of 3M-052 and PTX. The cell viability was measured after 24 h, and the synergistic concentration of PTX and 3M-052 was analyzed. The expression of Bax, Bcl-2, active-Caspase3 and cleaved-PARP I in CT26 cells were detected by Western blot. **Results:** 3M-052 could induce TNF- α production in mouse PBMC. Exclusive or combined use of 3M-052 and PTX could up-regulate the proportion of Bax/Bcl-2 in cells, promote the shearing of Caspase3 and PARP I protein, therefore induce cell apoptosis. **Conclusion:** Both 3M-052 and PTX can promote the apoptosis of CT26 cells, and inhibit its proliferation, while the effect would be better when combined.

Keywords

Paclitaxel, 3M-052, Drug Combination, Colon Cancer, Apoptosis

紫杉醇联合TLR7/8激动剂3M-052诱导小鼠结肠癌CT26细胞凋亡的研究

安稳定, 毛剑琴, 林 赞, 郑子瑞*

浙江海正药业股份有限公司, 浙江 台州
Email: zirui_zheng@163.com

收稿日期: 2018年8月17日; 录用日期: 2018年9月4日; 发布日期: 2018年9月11日

*通讯作者。

摘要

目的: 探讨紫杉醇联合Toll样受体7/8激动剂3M-052诱导小鼠结肠癌CT26细胞凋亡的作用及其机制。**方法:** 使用不同浓度的3M-052和PTX联合处理CT26细胞, 24 h后检测细胞活力, 分析PTX与3M-052协同作用的浓度; 并采用Western blot法检测CT26细胞中的Bax、Bcl-2、active-Caspase3以及cleaved-PARP I的表达情况。**结果:** 3M-052可以明显上调小鼠PBMC分泌的TNF- α ; 3M-052与PTX单药或联用时均可上调Bax/Bcl-2比例, 促进Caspase3活化, 增强PARP I蛋白剪切, 最终导致细胞凋亡。**结论:** 3M-052或PTX单独使用均可促进CT26细胞凋亡, 抑制其增殖, 联用时效果更佳。

关键词

紫杉醇, 3M-052, 联合用药, 结肠癌, 凋亡

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结肠癌是常见的发生于结肠部位的消化道恶性肿瘤。在我国, 结肠癌的发病率和死亡率正呈上升趋势[1], 五年生存率仅为 57.6%, 低于韩国、日本等东亚国家[2]。早期结肠癌可以通过手术根治, 但是结肠癌早期症状多不明显, 常被漏诊, 仍有很多患者会进展到晚期, 因此研究及寻找新的治疗方案具有重要的临床意义。

紫杉醇(Paclitaxel, PTX, 商品名 Taxol)是植物红豆杉的树皮中提取得到的一种具有广谱抗癌作用的抗微管药物, 曾被称为“晚期癌症的最后一道防线”, 在临床上作为一线药物用于卵巢癌、乳腺癌等的治疗, 其对结肠癌[3] [4]等恶性肿瘤也有一定治疗效果。3M-052 由 3M Drug Delivery System Division 公司设计的一种新型 Toll 样受体 7/8 (toll-like receptor 7/8, TLR7/8)双重激动剂, 它通过靶向于 TLR 7 和 TLR 8 来激活多种天然免疫细胞, 从而使机体产生更强的免疫反应, 达到抗肿瘤的效果, 有望成为新一代抗肿瘤药物[5]。本文旨在研究紫杉醇联合 3M-052 诱导小鼠结肠癌 CT26 细胞凋亡的作用及其机制。

2. 材料与方法

2.1. 主要试剂及细胞株

小鼠结肠癌 CT26 细胞株购自国家实验细胞资源共享平台; 紫杉醇原料药(API)由浙江海正药业生产; 3M-052 由 3M Drug Delivery System Division 公司设计, 结构式已公布, 购自 MedKoo Bioscience, Inc (CAT#527,804); 1640 培养基购自 Gibco 公司(22,400-089); 胎牛血清购自 Gibco 公司(10,099-158); 胰蛋白酶购自 Sigma 公司(59,428C); 淋巴细胞分离液 Percoll 购自 Sigma 公司(P4937); 磷酸盐缓冲液 PBS 购自 Gibco 公司(10,010-023)细胞活力检测试剂盒 Cell Titer-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay kit 购自 Promega 公司(G7572); 抗 Bax 兔单克隆抗体(ab32,503)、抗 Bcl-2 鼠单克隆抗体(ab692)、抗 active Caspase-3 兔多克隆抗体(ab49,822)以及抗 Cleaved-PARP I 兔单克隆抗体(ab32,064)均购自 Abcam 公司; TNF- α ELISA 检测试剂盒购自深圳达科为公司(DKW12-2720-096); Annexin V-FITC/PI 凋亡双染试剂盒购自 BD 公司

(556,547)。

2.2. 小鼠外周血淋巴细胞(mPBMC)的提取

ICR 小鼠(雄性, 22~26 g)心脏采集血液 1~2 mL, 置于抗凝采血管中, 轻柔颠倒混匀后备用; 用 PBS 将 Percoll 配置成 67.5%的工作液; 取与血液等量的 Percoll 工作液置于 15 mL 离心管中, 再将取得的小鼠血液缓慢加入到工作液上层, 注意不要混合; 室温 2000 rpm 离心 20 min, 小心取出离心管, 溶液分为三层, 吸取乳白色中间层, 再次加入到 Percoll 工作液, 离心取中间层; 将中间层用 PBS 洗涤 2 次除去 Percoll 后得到 mPBMC。

2.3. 细胞培养

小鼠结肠癌 CT26 细胞用含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 1640 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱传代培养。取对数生长期细胞进行实验。3M-052 用 DMSO 溶解成 20 mmol/L 储液, PTX 用 DMSO 溶解成 50 mmol/L 储液, 使用时均用 DMSO 稀释成 1000 \times 储液加入到培养基中, 所有对照均加入等量的 DMSO。

2.4. ELISA 检测 TNF- α

将 mPBMC 用 1640 培养基稀释到 4 $\times 10^5$ 个/mL, 传至 6 孔板, 每孔 1 mL, 再加入 2 mL 1640 培养基充分混匀, 静置后加入不同浓度的 3M-052, 24 h 后, 收取上清, 按照达科为 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 水平, 操作如下: 取 100 μL 上清及标准品分别加入对应的样品孔, 加入对应的生物素标记抗体, 室温孵育 1.5 h, 用洗液洗 3 次, 在滤纸上扣干, 加入亲和素-HRP 标记物, 室温孵育 30 min, 用洗液洗 3 次, 最后在滤纸上扣干, 加入 TMB 显色液, 室温避光孵育 10 min, 加入终止液, 在 10 min 内测定 $\lambda = 450$ nm (参比波长 630 nm) 处光密度值, 并依照标准曲线计算 TNF- α 的浓度。

2.5. 细胞活力检测

将 CT26 细胞传至 96 孔板, 每孔 1 $\times 10^4$ 个, 待细胞贴壁后, 去除原培养基, 加入上述 3M-052 处理的 mPBMC 上清 100 μL , 再加入不同浓度的 PTX, 共孵育 24 h 后, Cell Titer-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay kit 检测细胞活力: 在 96 孔板中加入 100 μL 检测液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 10 min, 500 nm 处检测自发荧光 (Luminescence), 该读值与细胞活力成正比, 反映活细胞的数量。抑制率计算公式为: 抑制率 = $(1 - \text{Luminescence}_{\text{实验组}} / \text{Luminescence}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

2.6. Western blot 检测

CT26 细胞传至 T25 培养瓶, 每瓶 1 $\times 10^6$ 个, 贴壁后用 3M-052 处理过的 mPBMC 培养液上清和 PTX 联合处理 CT26 细胞, 24 h 后胰酶消化收集细胞, NP40 裂解液裂解, 等量蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 低温转印至 PVDF 膜, 封闭, 与相应的一抗、二抗杂交, 显色, 用数字成像仪对图像进行拍照和分析。

2.7. 细胞凋亡检测

将 CT26 细胞按每孔 5 $\times 10^5$ 个接种于 6 孔板中, 贴壁后用 3M-052 处理过的 mPBMC 培养液上清和 PTX 联合处理 CT26 细胞。共孵育 18 h 后, 胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 1 次, 用 300 目无纺布过滤除去细胞团块。再次离心收集细胞, 用 Binding buffer 重悬调整细胞悬液浓度为 1 $\times 10^6$ 个/mL, 取 100 μL (1 $\times 10^5$ 个细胞), 加入 5 μL FITC 标记的 Annexin V 和 5 μL 碘化丙啶(PI), 轻轻混匀后室温下避光孵育 30 min;

加入 400 μL Binding buffer 充分混匀, 立即上流式细胞仪检测, Cell quest 软件分析数据。

2.8. 统计学分析

数据统计和半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})计算采用 SPSS 22.0 软件进行, 用 Duncan's 多重分析进行组间显著性检验, 显著水平为 $P < 0.05$, 极显著水平为 $P < 0.01$; 联合用药系数 (Combination Index, CI)采用 compusyn 2.0 进行分析, 计算公式为: $\text{CI} = \text{D}_1/\text{D}_{\text{X}1} + \text{D}_2/\text{D}_{\text{X}2} + \alpha\text{D}_1\text{D}_2/\text{D}_{\text{X}1}\text{D}_{\text{X}2}$, 其中 D_1 、 D_2 为合用时产生 X 效应时两药各自所需的浓度, $\text{D}_{\text{X}1}$ 、 $\text{D}_{\text{X}2}$ 为两药单用时产生 X 效应时各自的浓度。 $\alpha = 1$ 为两种相互非排斥性药物, $\alpha = 0$ 为两种相互排斥性药物。 $\text{CI} \geq 1.1$ 为拮抗作用, $0.9 \leq \text{CI} < 1.1$ 为叠加作用, $0.8 \leq \text{CI} < 0.9$ 为低度协同作用, $0.6 \leq \text{CI} < 0.8$ 为中度协同作用, $0.4 \leq \text{CI} < 0.6$ 为高度协同作用, $0.2 \leq \text{CI} < 0.4$ 为强协同作用[6]。

3. 结果

3.1. 3M-052 促进 mPBMC 分泌 $\text{TNF-}\alpha$

将 3M-052 用 DMSO 配置成 1.25、2.5、5、10 mmol/L , 使用前按 1:1000 加入到 1640 培养基中, 使终浓度为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 。24 h 后, 收集上清, 以 ELISA 法检测细胞上清 $\text{TNF-}\alpha$ 表达水平。结果显示, 以上不同浓度的 3M-052 均能够促进 mPBMC 细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ ($P < 0.05$), 且呈剂量效应关系(图 1)。

3.2. 与 3M-052 联用降低紫杉醇对 CT26 细胞的 IC_{50}

将 3M-052 加入到 mPBMC 的培养基中, 使终浓度分别为 0、1.25、5、10 $\mu\text{mol/L}$, 24 h 后收集上清加入到 CT26 细胞中, 同时加入 PTX, 使终浓度分别为 0、0.1、1、5、50 $\mu\text{mol/L}$, 每个联合浓度三个复孔, 24 h 后检测细胞活力, 以不加药组为对照, 计算联合用药对 CT26 细胞的抑制率(表 1)。根据抑制率计算联合用药指数, 结果如表 2 所示: PTX 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时无叠加作用, 3M-052 和 PTX 其余浓度联用时均具有叠加或协同作用。以抑制率为纵坐标, 以浓度数值的以 10 为底的对数值为横坐标做图(图 2), 从而得到 PTX 在 3M-052 浓度分别为 0、1.25、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 时的 IC_{50} 分别是 5.37、1.68、1.40、0.53、0.27 $\mu\text{mol/L}$, 可见与 3M-052 联用可以降低 PTX 对 CT26 细胞的 IC_{50} , 且呈剂量依赖效应, 说明 3M-052 能够加强 PTX 对 CT26 细胞的杀伤作用。

3.3. 3M-052、PTX 单药及联合用药对 CT26 细胞凋亡的影响

取 3M-052 和 PTX 具有强协同作用($\text{CI} = 0.25$)的给药浓度 3M-052 5 $\mu\text{mol/L}$ 、PTX 1 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验: 分别以 DMSO (Ctrl), 3M-052 5 $\mu\text{mol/L}$, PTX 1 $\mu\text{mol/L}$ 以及 3M-052 5 $\mu\text{mol/L}$ + PTX 1 $\mu\text{mol/L}$

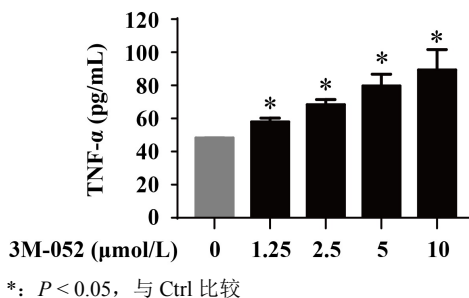


Figure 1. 3M-052 promotes $\text{TNF-}\alpha$ secretion of mPBMC
图 1. 3M-052 促进 mPBMC 分泌 $\text{TNF-}\alpha$

Table 1. Inhibition of CT26 cell proliferation by 3M-052 combined with PTX (%)

表 1. 3M-052 与 PTX 联用对 CT26 细胞增殖的抑制作用(%)

3M-052 (μmol/L)	PTX (μmol/L)				
	0	0.1	1	5	50
0	0.00 ± 0.00	31.55 ± 0.36**	36.26 ± 2.28**	50.70 ± 0.68**	63.15 ± 0.54**
1.25	0.00 ± 3.65	36.28 ± 0.93**	41.94 ± 2.15**	57.82 ± 3.53**	70.44 ± 0.62**
2.5	6.80 ± 3.01	36.89 ± 3.30**	44.64 ± 0.81**	57.47 ± 0.01**	71.43 ± 1.65**
5	3.93 ± 0.27*	44.00 ± 0.43**	47.60 ± 0.47**	63.30 ± 0.16**	77.33 ± 1.15**
10	15.45 ± 2.15**	47.35 ± 0.88**	51.86 ± 2.53**	68.28 ± 2.62**	80.31 ± 0.09**

注: Value = Mean ± SD, N = 3; *P < 0.05, **P < 0.01, 与 Ctrl 比较。

Table 2. Combination index

表 2. 联合用药指数

3M-052 (μmol/L)	PTX (μmol/L)			
	0.1	1	5	50
1.25	0.05	0.35	1.03	4.81
2.5	0.05	0.30	0.69	2.77
5	0.04	0.25	0.96	1.75
10	0.03	0.20	0.35	1.34

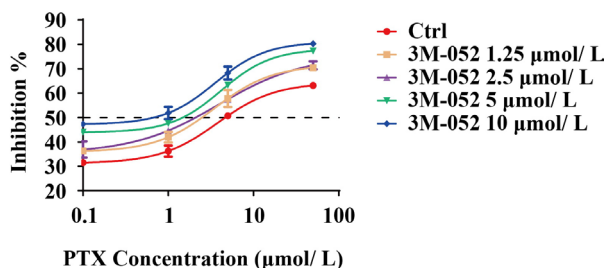


Figure 2. Inhibition of CT26 cell proliferation by 3M-052 combined with PTX

图 2. 3M-052 与 PTX 联用对 CT26 细胞增殖的抑制作用

处理 CT26 细胞 18 h, Annexin V-FITC/PI 双染, 流式细胞仪检测 CT26 细胞凋亡水平, 结果显示(图 3): 3M-052、PTX 单独处理组或联合处理 CT26 细胞均能引起细胞凋亡, 联用时效果更强。

3.3. 3M-052、PTX 单药及联合用药对 CT26 细胞凋亡相关蛋白的影响

分别以 DMSO (Ctrl), 3M-052 5 μmol/L, PTX 1 μmol/L 以及 3M-052 5 μmol/L + PTX 1 μmol/L 处理 CT26 细胞 24 h, 以 Western blot 法检测细胞中 Bax、Bcl-2、active-Caspase3 及 cleaved-PARP I 的表达水平。结果发现, 与对照组相比, 3M-052、PTX 单独处理组和联合处理组细胞中 Bax/Bcl-2 比值和 a-Caspase3、c-PARP 水平均增加; 联合用药组细胞中 Bax/Bcl-2 比值、a-Caspase3 和 c-PARP 水平均高于 3M-052 或 PTX 单独处理组(见图 4)。

4. 讨论

结肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 而且绝大多数发现时都已到中晚期, 现在的治疗手段主要是适当手术和术后化疗, 但预后较差。因此开发新的并且有效的化疗方案, 对提升结肠癌防治的整体水平具有重要意义。

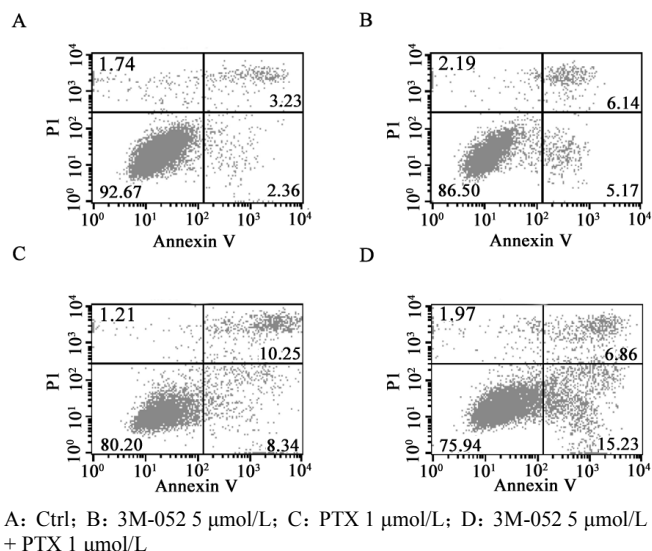


Figure 3. Annexin V/PI staining for detection of apoptosis of CT26 cells
图 3. Annexin V/PI 双染检测 CT26 细胞凋亡水平

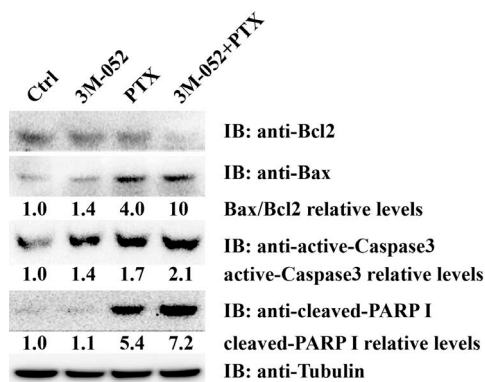


Figure 4. Effects of 3M-052 and PTX monotherapy or combination drugs on apoptosis-related proteins in CT26 Cells
图 4. 3M-052、PTX 单药及联合用药对 CT26 细胞凋亡相关蛋白的影响

紫杉醇的抗肿瘤作用主要是通过稳定微管使细胞停滞在 G2/M 期，导致有丝分裂无法完成，从而诱导细胞凋亡[7]。但是其对正常的细胞也同样具有促凋亡的作用，在临床上亦表现出剂量依赖的药物毒性，主要包括骨髓抑制和神经毒性[8]。临床上长期大量使用紫杉醇，会导致癌细胞的抗药性，使治疗效果减小。本研究结果显示，与 3M-052 联用，紫杉醇对 CT26 细胞的 IC50 随着 3M-052 浓度的升高逐渐降低，预示着与 3M-052 联用可能减少紫杉醇在临床上治疗结肠癌的使用剂量，具有重大意义。

3M-052 分子具有长链脂肪酸尾，微溶于水，在肿瘤内部注射后能达到缓释效果，通过促进单核吞噬细胞、淋巴细胞在肿瘤部位的积累，并同时激活多种细胞因子的释放从而诱导肿瘤组织死亡，3M-052 的瘤内注射亦可抑制远端肿瘤的生长[9]。当小鼠肌肉注射 3M-052 后其血液中的 TNF- α 、IL-6、TGF- β 等细胞因子会出现剂量依赖的升高。本研究采用 ELISA 方法检测 mPBMC 上清中的 TNF- α 用以验证 3M-052 对 mPBMC 的激活作用。由于紫杉醇对 PBMC 具有很强的杀伤作用，因此本实验未考虑采用将 3M-052 活化的 PBMC 细胞直接加入到 CT26 中的方法，而是将 mPBMC 的培养基加入到细胞中，模拟远端肿瘤的抑制。

促凋亡蛋白 Bax 属于 Bcl-2 基因超家族成员，在胞内，Bax 与 Bcl-2 形成异源或同源二聚体作为细胞

凋亡通路的分子开关。当 Bax 表达量多于 Bcl-2 时, 则同源二聚体 Bax/Bax 多于异源二聚体 Bcl-2/Bax, 线粒体膜通透性增加, 细胞色素 C 释放, 进而激活 caspase 级联反应, 促进 PARP I 的剪切导致细胞凋亡 [10]。因此 Bax/Bcl-2 的比值、active-Caspase3 和 cleaved-PARP I 的水平可以反映细胞凋亡的程度。在本实验中 Western Blot 结果显示 3M-052 和紫杉醇单药处理均能诱导 CT26 细胞 Bcl-2 蛋白水平下调以及 active-Caspase3 蛋白水平上调; 同时紫杉醇促进 Bax 的表达, 但是 3M-052 无明显增加; 两药联用时 Bcl-2 水平下降更为明显, 推测联合组可能通过促进 Bcl-2 的大量降解, 形成更多的 Bax/Bax 同源二聚体, 从线粒体途径诱导细胞凋亡。

本实验从细胞活力、细胞凋亡方面论证了 3M-052 和紫杉醇联合用药的可能性, 以减少紫杉醇用量, 降低其对机体的毒副作用。同时为新的减少紫杉醇耐药性治疗方案的开发提供理论依据。

参考文献

- [1] Chen, W., Zheng, R., Baade, P.D., *et al.* (2016) Cancer Statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **66**, 115-132. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- [2] Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., *et al.* (2018) Global Surveillance of Trends in Cancer Survival 2000-14 (CONCORD-3): Analysis of Individual Records for 37,513,025 Patients Diagnosed with One of 18 Cancers from 322 Population-Based Registries in 71 Countries. *Lancet*, **391**, 1023-1075. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3)
- [3] Guo, X.Y., Wang, P., Du, Q.G., *et al.* (2015) Paclitaxel and Gemcitabine Combinational Drug-Loaded Mucoadhesive Delivery System in the Treatment of Colon Cancers. *Drug Research (Stuttg)*, **65**, 199-204.
- [4] Xiong, M., Lei, Q., You, X., *et al.* (2017) Mannosylated Liposomes Improve Therapeutic Effects of Paclitaxel in Colon Cancer Models. *Journal of Microencapsulation*, **34**, 513-521. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1339739>
- [5] Zhao, B.G., Vasilakos, J.P., Tross, D., *et al.* (2014) Combination Therapy Targeting Toll Like Receptors 7, 8 and 9 Eliminates Large Established Tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **2**, 12. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-12>
- [6] Soriano, A.F., Helfrich, B., Chan, D.C., *et al.* (1999) Synergistic Effects of New Chemopreventive Agents and Conventional Cytotoxic Agents against Human Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, **59**, 6178-6184.
- [7] Xu, M., Li, M., Yang, J., *et al.* (2014) Adenovirus-Mediated Interleukin-24 Enhances the Inhibitory Effect of Paclitaxel on the Growth of Lung Cancer A549 Cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, **30**, 1150-1153.
- [8] Tanimukai, H., Kanayama, D., Omi, T., *et al.* (2013) Paclitaxel Induces Neurotoxicity through Endoplasmic Reticulum Stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **437**, 151-155. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.057>
- [9] Mullins, S.R., Vogel, K., Vasilakos, J.P., *et al.* (2017) Intratumoral Immunotherapy with TLR7/8 Agonist MEDI9197 Modulates the Tumor Microenvironment and Holds Potential for Combination with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Research*, **77**, 4697. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-4697>
- [10] Porichi, O., Nikolaidou, M.E., Apostolaki, A., *et al.* (2009) BCL-2, BAX and P53 Expression Profiles in Endometrial Carcinoma as Studied by Real-Time PCR and Immunohistochemistry. *Anticancer Research*, **29**, 3977-3982.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: wjcr@hanspub.org