

## 阻断PLC- $\gamma$ 1通路对TNF- $\alpha$ 抑制胶质瘤细胞增殖并诱导其凋亡的影响

磷脂酶C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) 是生长因子所引起细胞有丝分裂信号路径中的一个主要信号分子, 与许多肿瘤的发生、发展都有密切关系。一般认为, PLC- $\gamma$ 1的高表达, 不但能促进肿瘤细胞的无限增殖, 更能促进肿瘤细胞的迁移运动, 从而增加恶性肿瘤的侵袭性[1]。有研究表明, 抑制PLC- $\gamma$ 1的活性, 能降低胶质瘤细胞的运动能力和侵袭能力[2]。除了旺盛的增殖与迁移能力外, 细胞凋亡的减少也在肿瘤的发生发展中起重要作用[3], 那么PLC- $\gamma$ 1除了介导肿瘤细胞的增殖、迁移外, 是否也参与调控肿瘤细胞的凋亡呢?

目前关于这方面的研究报道较少。本实验应用PLC- $\gamma$ 1的抑制剂U73122处理人SW0胶质瘤细胞, 研究阻断PLC- $\gamma$ 1通路前后, 低浓度肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )对SW0胶质瘤细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用, 探讨了PLC- $\gamma$ 1通路与肿瘤细胞凋亡的关系及其可能的分子机制, 以期进一步了解PLC- $\gamma$ 1在恶性肿瘤发生发展中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料和试剂

人SW0胶质瘤细胞株由暨南大学医学院病理教研室钟雪云教授惠赠; RPMI 1640培养基(Gibco BRL公司); 新生小牛血清(杭州四季青生物制品公司); Caspase-3抗体、bcl-2抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和增强化学发光试剂盒(Santa Cruz公司);  $\beta$ -actin抗体、U73122、碘化吡啶(PI)、噻唑蓝(MTT)、Tris碱、甘氨酸、SDS(Sigma公司); 二甲基亚砷(Fluka公司); rh TNF- $\alpha$ (邦定生物医学公司)。

#### 1.2 主要设备

CO<sub>2</sub>细胞培养箱 NAPCO Model15410(美国); YG-875B超净工作台(苏州医疗设备厂); AB-160型电子分析天平(美国Denver公司); 78HW-1型恒温磁力搅拌机(杭州仪表电机厂); TY-80s脱色摇床(南京大学); LDJ4-08型自动平衡离心机(北京医用离心机厂); 微型电泳电转移系统(美国Bio-Rad 公司); EPICS ILITE型流式细胞仪(美国COULFOR公司)。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 SW0胶质瘤细胞培养于含10%小牛血清的RPMI 1640培养基, 置37 °C、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养, 实验用对数生长期细胞。

1.3.2 MTT法检测TNF- $\alpha$ 及U73122对SW0胶质瘤细胞增殖的抑制作用 取对数生长期细胞, 经消化、制成 $2.5 \times 10^7$ /L悬液, 按每孔200  $\mu$ l接种于96孔培养板( $5 \times 10^3$  cells/well), 培养8~12 h, 细胞贴壁, 分为空白对照组(不加任何处理因素)、TNF- $\alpha$ 组(浓度分别为 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 和 $5 \times 10^4$  U/L)、U73122组(浓度分别为1、2.5和5  $\mu$ mol/L)以及U73122和TNF- $\alpha$ 联用组(TNF- $\alpha$ 的浓度同上, U73122的浓度分别为2.5和5  $\mu$ mol/L, 先加U73122, 30 min后再加入TNF- $\alpha$ , 由于U73122是用DMSO溶解的, 为排除DMSO对细胞的影响, 在对照组及TNF- $\alpha$ 组中也加入相同体积的DMSO), 每组设5个复孔。于48 h后各孔加入MTT(5 g/L)20  $\mu$ l, 继续培养4 h, 各孔加入DMSO 150  $\mu$ l, 室温下, 将平板置于微孔板振荡器上振荡10 min, 待结晶物溶解后置酶标仪测570nm波长时各孔吸光度[D( $\lambda$ )值]。肿瘤细胞生长抑制率的计算:

抑制率=[对照组D( $\lambda$ )值-实验组D( $\lambda$ )值]/对照组D( $\lambda$ )值 100%

1.3.3 PI单染流式细胞仪检测分析TNF- $\alpha$ 及U73122诱导SWO胶质瘤细胞调亡 胰酶消化收集待测细胞, 1000 r/min离心5 min去培养基, PBS漂洗2次, 1000 r/min离心5 min去PBS, 预冷的75%酒精4  $^{\circ}$ C固定至少6 h, 1000 r/min离心5 min去固定液, PBS漂洗2次, 1000 r/min离心5 min去PBS, 用900  $\mu$ l PBS重悬细胞, 加入100  $\mu$ l PI溶液(0.5 g/L), 37  $^{\circ}$ C孵育30 min, 流式细胞仪分析样品。

1.3.4 免疫印记检测TNF- $\alpha$ 及U73122处理SWO胶质瘤细胞后caspase-3的激活及bcl-2的表达情况 收集待测细胞, 加入裂解液提取总蛋白, 进行12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4  $^{\circ}$ C转膜, 5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h, TBS洗膜3 $\times$ 5 min, 一抗室温孵育1 h, TBS洗膜3 $\times$ 5 min, 二抗室温孵育1 h, TBS洗膜3 $\times$ 5 min, 常规显色、曝光。

1.3.5 统计学处理 每组实验重复3次, 取平均值进行计算处理, 采用SPSS10.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), LSD、SNK法进行组间差异比较, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,  $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 U73122对SWO胶质瘤细胞增殖的抑制作用

作用48h后, 1  $\mu$ mol/L的U73122即对SWO胶质瘤细胞增殖有明显抑制作用, 且呈量效关系(表1)。

表1 U73122对SWO胶质瘤细胞的增殖抑制作用  
Tab.1 Inhibitory effect of U73122 on proliferation of SWO glioma cells (*Mean* $\pm$ *SD*)

Group		D( $\lambda$ )	Inhibition rate(%)
Control		1.652 $\pm$ 0.074	0
U73122	1 $\mu$ mol/L	1.438 $\pm$ 0.040	11.51 $\pm$ 2.46*
	2.5 $\mu$ mol/L	1.404 $\pm$ 0.116	13.60 $\pm$ 7.12*
	5 $\mu$ mol/L	1.395 $\pm$ 0.066	14.17 $\pm$ 4.07*

\* $P < 0.05$  vs control group

### 2.2 TNF- $\alpha$ 对SWO胶质瘤细胞增殖的抑制作用

作用48h后, 高浓度的TNF- $\alpha$ ( $2 \times 10^5$ 和 $5 \times 10^4$  U/L)对SWO胶质瘤细胞增殖有明显抑制作用, 而较低浓度的TNF- $\alpha$ 则没有(表2)。

表 2 TNF- $\alpha$  对 SWO 胶质瘤细胞的增殖抑制作用

**Tab.2 Inhibitory effect of TNF- $\alpha$  on proliferation of SWO glioma cells (Mean $\pm$ SD)**

Group		D( $\lambda$ )	Inhibition rate(%)
Control		0.976 4 $\pm$ 0.092	0
TNF- $\alpha$	10 <sup>4</sup> U/L	0.897 6 $\pm$ 0.053	8.07 $\pm$ 5.47
	10 <sup>5</sup> U/L	0.925 8 $\pm$ 0.050	5.18 $\pm$ 5.14
	2 $\times$ 10 <sup>6</sup> U/L	0.756 6 $\pm$ 0.092	22.51 $\pm$ 9.38*
	5 $\times$ 10 <sup>6</sup> U/L	0.719 8 $\pm$ 0.083	26.28 $\pm$ 8.49*

TNF- $\alpha$ ; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; \*P<0.05 vs control group

### 2.3 U73122及TNF- $\alpha$ 联用对SWO胶质瘤细胞增殖的抑制作用

不同浓度的TNF- $\alpha$ 同时加上2.5或5  $\mu$ mol/L的U73122, 作用48 h后可见, 给予U73122能够明显增加低浓度的TNF- $\alpha$ (1 $\times$ 10<sup>4</sup>和1 $\times$  10<sup>5</sup> U/L)对SWO胶质瘤细胞的增殖抑制率, 而对于较高浓度的TNF- $\alpha$ , 无论是否给予U73122, 其增殖抑制率都无明显差异(表3, 4)。

### 2.4 PI单染流式细胞仪检测分析TNF- $\alpha$ 及U73122诱导SWO胶质瘤细胞调亡情况

如图1所示, 单纯给予U73122 5  $\mu$ mol/L 或TNF- $\alpha$  1 $\times$ 10<sup>4</sup>U/L处理48 h, SWO胶质瘤细胞都没有出现调亡特异性的亚二倍体峰, 而联合给予U73122 5  $\mu$ mol/L 和TNF- $\alpha$  1 $\times$ 10<sup>4</sup> U/L处理48 h后, 则可见明显的亚二倍体峰。各实验组的细胞调亡率见表5。

表 3 联合应用 U73122 和低浓度 TNF- $\alpha$  对 SWO 细胞的增殖抑制率

**Tab.3 Inhibitory effect of U73122 in combination with low dose of TNF- $\alpha$  on the proliferation of SWO cells (Mean $\pm$ SD)**

Group		D( $\lambda$ )	Inhibition rate(%)
Control		0.976 4 $\pm$ 0.092	0
TNF- $\alpha$	10 <sup>4</sup> U/L	0.897 6 $\pm$ 0.053	8.07 $\pm$ 5.47
TNF- $\alpha$	10 <sup>4</sup> U/L+U73122 2.5 $\mu$ mol/L	0.708 6 $\pm$ 0.049	27.43 $\pm$ 5.05**
TNF- $\alpha$	10 <sup>4</sup> U/L+U73122 5 $\mu$ mol/L	0.695 8 $\pm$ 0.040	28.74 $\pm$ 4.12**
TNF- $\alpha$	10 <sup>5</sup> U/L	0.925 8 $\pm$ 0.050	5.18 $\pm$ 5.15*
TNF- $\alpha$	10 <sup>5</sup> U/L+U73122 2.5 $\mu$ mol/L	0.692 6 $\pm$ 0.043	29.07 $\pm$ 4.45**‡
TNF- $\alpha$	10 <sup>5</sup> U/L+U73122 5 $\mu$ mol/L	0.723 6 $\pm$ 0.060	25.89 $\pm$ 6.21**‡

\*P<0.05 vs control group; \*\*P<0.01 vs TNF- $\alpha$  10<sup>4</sup> U/L group; ‡

P<0.01 vs TNF- $\alpha$  10<sup>5</sup> U/L group

表 4 联合应用 U73122 及高浓度 TNF- $\alpha$  对 SWO 细胞的增殖抑制率

Tab.4 Inhibitory effect of U73122 in combination with high-dose TNF- $\alpha$  on the proliferation of SWO cells (*Mean* $\pm$ *SD*)

Group	D( $\lambda$ )	Inhibition rate(%)
Control	0.976 4 $\pm$ 0.092	0
TNF- $\alpha$ 2 $\times$ 10 <sup>5</sup> U/L	0.756 6 $\pm$ 0.092	22.51 $\pm$ 9.38*
TNF- $\alpha$ 2 $\times$ 10 <sup>5</sup> U/L+U73122 2.5 $\mu$ mol/L	0.686 2 $\pm$ 0.079	29.72 $\pm$ 8.17*
TNF- $\alpha$ 2 $\times$ 10 <sup>5</sup> U/L+U73122 5 $\mu$ mol/L	0.742 6 $\pm$ 0.110	23.95 $\pm$ 11.29*
TNF- $\alpha$ 5 $\times$ 10 <sup>5</sup> U/L	0.719 8 $\pm$ 0.083	26.28 $\pm$ 8.49*
TNF- $\alpha$ 5 $\times$ 10 <sup>5</sup> U/L+U73122 2.5 $\mu$ mol/L	0.761 2 $\pm$ 0.084	22.04 $\pm$ 8.68*
TNF- $\alpha$ 5 $\times$ 10 <sup>5</sup> U/L+U73122 5 $\mu$ mol/L	0.761 6 $\pm$ 0.058	21.99 $\pm$ 5.95*

\**P*<0.05 vs control group

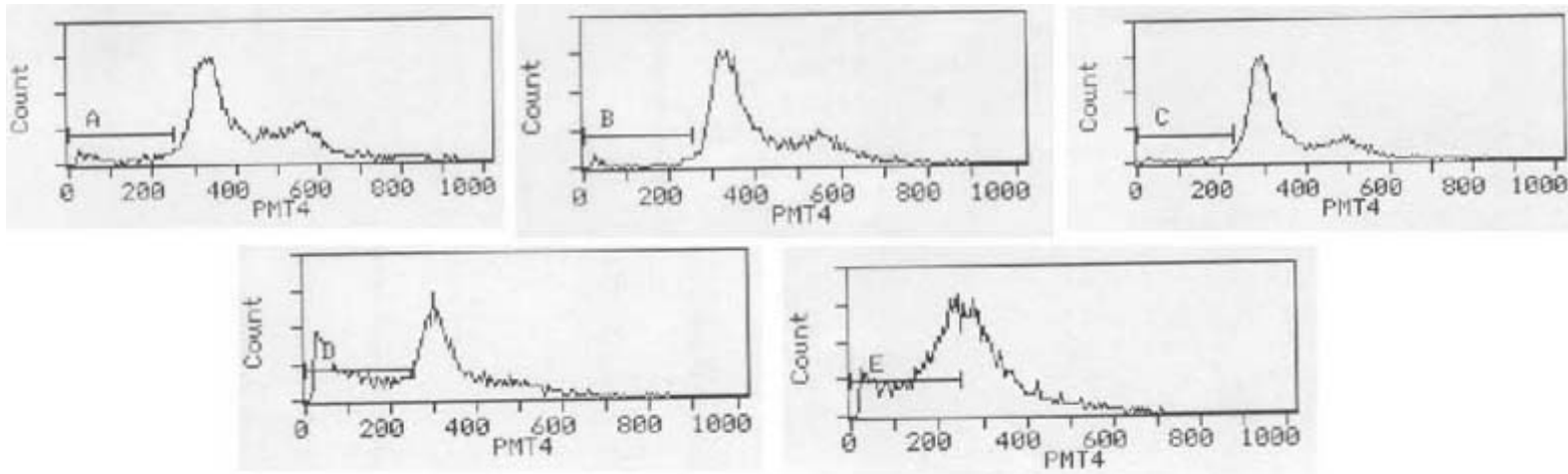


图1 PI单染的流式细胞仪检测SWO细胞凋亡

Fig.1 Detection of apoptosis by flow cytometry with PI staining

A: Control group; B: U73122 5  $\mu$ mol/L; C: TNF- $\alpha$  1 $\times$ 10<sup>4</sup> U/L; D: U73122 5  $\mu$ mol/L+TNF- $\alpha$  1 $\times$ 10<sup>4</sup> U/L; E: 5-Fu group

表 5 PI 单染的流式细胞仪检测 SWO 细胞凋亡率

Tab.5 Apoptosis rate detected by flow cytometry with PI staining (*n*=3, *Mean* $\pm$ *SD*)

Group	Apoptosis rate(%)
Control	6.633 $\pm$ 0.737
U73122 5 $\mu$ mol/L	6.100 $\pm$ 0.954
TNF- $\alpha$ 1 $\times$ 10 <sup>4</sup> U/L	6.233 $\pm$ 1.193
U73122 5 $\mu$ mol/L+TNF- $\alpha$ 1 $\times$ 10 <sup>4</sup> U/L	39.067 $\pm$ 2.779*

\**P*<0.05 vs control group



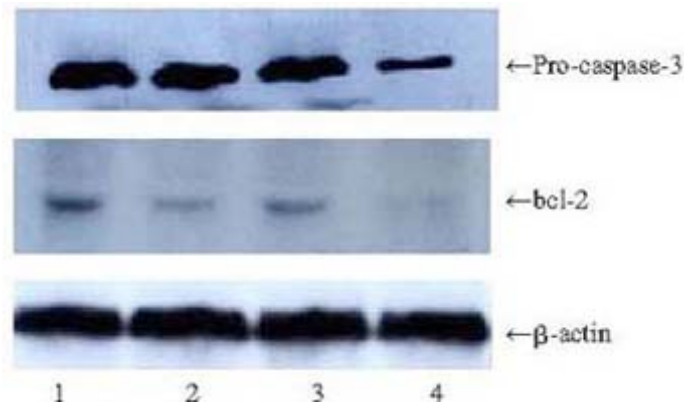


图2 U73122与TNF- $\alpha$ 作用于SWO细胞

Fig 2 Effect of U73122 and TNF- $\alpha$  on SWO cells

Activation of caspase-3 is induced, and expression of bcl-2 is down-regulated.

Lane1: Control group; Lane 2: U73122 (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ), 12 h; Lane 3: TNF- $\alpha$  ( $1 \times 10^4$  U/L), 12 h; Lane4: U73122 (2.5  $\mu\text{mol/L}$ )+TNF- $\alpha$  ( $1 \times 10^4$  U/L), 12 h

## 2.5 免疫印记检测TNF- $\alpha$ 及U73122处理SWO胶质瘤细胞后caspase-3的激活及bcl-2的表达情况

2.5.1 U73122与TNF- $\alpha$ 联用可激活caspase-3 Western免疫印记结果显示(图2), 单用U73122或TNF- $\alpha$ 处理细胞, caspase-3前体的表达水平并没有变化, 而U73122及TNF- $\alpha$ 联合处理细胞后, caspase-3前体的表达水平明显降低, 说明caspase-3这一调亡执行蛋白被激活。

2.5.2 U73122与TNF- $\alpha$ 联用可降低bcl-2的表达 Western免疫印记结果显示(图2), 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 的U73122处理细胞12 h后, bcl-2的表达略有下降,  $1 \times 10^4$  U/L的TNF- $\alpha$ 对bcl-2的表达无明显影响, 二者联用, 则使bcl-2的表达显著下降。说明U73122可能通过下调抗调亡蛋白bcl-2的表达来增加SWO胶质瘤细胞对低浓度TNF- $\alpha$ 的敏感性。

## 3 讨论

PLC- $\gamma$ 1信号的活化对于许多状态下细胞的存活是必需的[4][5], 同时在不少调亡诱导因素所引发的细胞调亡中也能检测到PLC- $\gamma$ 1分子的降解失活[6][7][8]。

本实验首先应用MTT法研究了PLC- $\gamma$ 1的抑制剂U73122与TNF- $\alpha$ 联用对SWO胶质瘤细胞的增殖抑制作用。发现低浓度的TNF- $\alpha$  ( $1 \times 10^4$  U/L和 $1 \times 10^5$  U/L)对SWO细胞的增殖基本没有影响, 而加入2.5  $\mu\text{mol/L}$  U73122之后, 再给予低浓度TNF- $\alpha$ 刺激, SWO细胞的增殖抑制率显著增高(分别为27.42%和29.07%), 且远远高于单用2.5  $\mu\text{mol/L}$  U73122对细胞的增殖抑制率(13.60%)。而高浓度的TNF- $\alpha$  ( $5 \times 10^5$  U/L和 $5 \times 10^6$  U/L)对SWO细胞的增殖抑制率达到22.51%和26.28%, 此时, 再加入2.5  $\mu\text{mol/L}$  或5  $\mu\text{mol/L}$  U73122, 其增殖抑制率都没有显著差异。由此可推断, U73122与低浓度的TNF- $\alpha$ 存在协同效应, 即阻断PLC- $\gamma$ 1通路后, 能显著增加SWO胶质瘤细胞对低浓度TNF- $\alpha$ 的敏感性。

为进一步证实此推断, 本实验通过PI单染流式细胞仪检测U73122与TNF- $\alpha$ 联用诱导SWO胶质瘤细胞调亡的情况。结果显示, 2.5  $\mu\text{mol/L}$  U73122或 $1 \times 10^4$ U/L TNF- $\alpha$ 单独使用都不能引起细胞调亡, 而二者联用则使SWO细胞的调亡率达到39.067%。说明单纯阻断PLC- $\gamma$ 1通路并不能启动细胞调亡, 但是, 阻断PLC- $\gamma$ 1通路后, 却使原本不能诱导调亡的低浓度TNF- $\alpha$ 能够诱导调亡, 即增加了SWO胶质瘤细胞对低浓度TNF- $\alpha$ 的敏感性。

PI单染流式细胞仪检测虽能在一定程度上说明问题, 但还不是检测调亡的金标准。为此, 本实验应用Western免疫印记法检测U73122和TNF- $\alpha$ 联用后, caspase-3前体的表达情况。Caspase-3是启动细胞调亡的执行者和关键分子, 以无活性的前体形式存在(相对分子质量32 000), 当它被位于上游的caspase通过级联反应切割并激活后, 可水解细胞质和细胞核内与DNA修复、复制、RNA剪接和细胞骨架等有关的蛋白, 从而启

动细胞凋亡, 是许多细胞凋亡的共同下游途径[8]。结果显示, 单用2.5  $\mu\text{mol/L}$  U73122或 $1 \times 10^4 \text{U/L}$  TNF- $\alpha$ 处理48 h后, caspase-3前体的表达与对照组相比并无差异, 而联用2.5  $\mu\text{mol/L}$  U73122和 $1 \times 10^4 \text{U/L}$  TNF- $\alpha$ 处理48 h后, caspase-3前体的表达显著降低, 说明阻断PLC- $\gamma$ 1通路虽不能直接激活caspase-3这一凋亡终末通路, 但有助于低浓度的TNF- $\alpha$ 激活caspase-3, 也就是说, 阻断PLC- $\gamma$ 1通路虽不能直接启动凋亡, 但有可能使肿瘤细胞对某些促凋亡因素更加敏感。

那么, 阻断PLC- $\gamma$ 1通路能增加SWO胶质瘤细胞对低浓度TNF- $\alpha$ 的敏感性, 其可能的分子机制是什么呢? 为了初步探讨该问题, 本实验检测了U73122和TNF- $\alpha$ 联用后对bcl-2表达的影响。bcl-2基因通过广泛抑制各种刺激剂诱导的细胞凋亡, 延长细胞活力而发挥作用。曾有研究发现, 在氧化应激条件下, PLC- $\gamma$ 1通路通过正调控bcl-2的磷酸化来促进细胞存活[4]。本实验结果显示, 5  $\mu\text{mol/L}$  U73122作用12 h后, bcl-2的表达与对照组相比略有下降,  $1 \times 10^4 \text{U/L}$  TNF- $\alpha$ 作用12 h对bcl-2的表达则无显著影响, 5  $\mu\text{mol/L}$  U73122和 $1 \times 10^4 \text{U/L}$  TNF- $\alpha$ 共同作用12 h后, bcl-2的表达与对照组及TNF- $\alpha$ 处理组相比有所下降, 说明阻断PLC- $\gamma$ 1通路, 可在一定程度上降低SWO细胞抑凋亡基因bcl-2的表达, 这可能是阻断PLC- $\gamma$ 1通路后能增加SWO胶质瘤细胞对低浓度TNF- $\alpha$ 敏感性的原因之一。

综上所述, 阻断PLC- $\gamma$ 1通路本身虽不能直接启动凋亡, 但却能增加SWO胶质瘤细胞对某些凋亡因素(如TNF- $\alpha$ )的敏感性, 其分子机制之一可能是下调抑凋亡基因bcl-2的表达。这使我们对PLC- $\gamma$ 1这一细胞存活信号分子的作用有了更全面的了解, 它不但调控细胞的增殖、运动, 还参与调节细胞凋亡, 虽然它并不是细胞凋亡通路中的关键分子, 但其作用不容小视。

#### 参考文献:

- [1] Wells A, Grandis JR. Phospholipase C- $\gamma$ 1 in tumor progression[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(4): 285-90.
- [2] Khoshyomn S, Penar PL, Rossi J, et al. Inhibition of phospholipase C-gamma1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates[J]. Neurosurgery, 1999, 44(3): 568-77.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [4] Bai XC, Deng F, Liu AL, et al. Phospholipase C- $\gamma$ 1 is required for cell survival in oxidative stress by protein kinase C[J]. Biochem J, 2002, 363(Pt2): 395-401.
- [5] Lee YH, Kim S, Kim J, et al. Overexpression of phospholipase C-gamma1 suppresses UVC-induced apoptosis through inhibition of c-fos accumulation and c-Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1440(2-3): 235-43.
- [6] Bae SS, Perry DK, Oh YS, et al. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells[J]. FASEB J, 2000, 14(9): 1083-92.
- [7] Woo JH, Kim YH, Choi YJ, et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(7): 1199-208.
- [8] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004, 116(2): 205-19.