

长春瑞滨诱导人肺癌 Calu-3 细胞凋亡及机制

张涛^{1*}, 张峰², 周勇安¹, 王云杰¹, 程庆书¹, 刘 锐¹

(第四军医大学 1. 唐都医院胸外科, 陕西 西安 710038, 2. 药理学教研室, 陕西 西安 710032)

摘要: **目的** 观察长春瑞滨(VRB)诱导人肺癌 Calu-3 细胞凋亡时 Bcl-2 和半胱天冬酶-3 的表达有无变化。**方法** 以不同浓度的 VRB(20, 40 和 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用于体外培养的人肺癌 Calu-3 细胞 24 h 后, TUNEL 法和吖啶橙染色法观察肺癌细胞凋亡形态学特征; 流式细胞仪检测肺癌细胞凋亡率和肺癌细胞 Bcl-2 蛋白表达水平; 以半胱天冬酶-3 荧光分析检测试剂盒测定肺癌细胞半胱天冬酶-3 活性。**结果** VRB(20, 40 和 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞 24 h, TUNEL 法及吖啶橙染色均观察到典型的凋亡细胞形态学特征。流式细胞仪检测 VRB 处理的肺癌细胞凋亡率分别为 $(3.1 \pm 0.6)\%$, $(7.8 \pm 1.2)\%$ 和 $(19.6 \pm 4.3)\%$, 较对照组(凋亡率为 0)显著增高且呈剂量依赖性($P < 0.01$); Bcl-2 蛋白阳性表达细胞率分别为 $(37.6 \pm 6.9)\%$, $(25.4 \pm 6.2)\%$ 和 $(8.4 \pm 2.5)\%$, 较对照组 $(48.3 \pm 7.1)\%$ 显著降低且呈剂量依赖性($P < 0.05$); 肺癌细胞半胱天冬酶-3 活性分别为 (332 ± 16) , (417 ± 11) 和 (631 ± 27) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 较对照组 (195 ± 12) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 显著增高且呈剂量依赖性($P < 0.01$)。**结论** VRB 可以诱导肺癌细胞凋亡, 抑制 Bcl-2 表达及增强半胱天冬酶-3 活性。

关键词: 长春瑞滨; 肿瘤细胞, 培养的; 凋亡; 蛋白, Bcl-2; 半胱天冬酶-3; 癌, 肺细胞, Calu-3

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)03-0207-04

长春瑞滨(vinorelbine, VRB)是长春碱的第三代衍生物,其药理作用为通过阻断微管蛋白质形成微

管和诱导微管解聚,使有丝分裂停留在中期而发挥抑制肿瘤细胞分裂的作用,是一个广谱的抗肿瘤药物。临床研究表明 VRB 是目前治疗非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)最有效的药物之一,但对其作用机制研究报道较少。近几年,随着对细胞凋亡现象及其发生机制的进一步研究,人们逐渐认识到大多数化疗药物具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,而这可能是其主要的的作用机制。Bcl-2 家族是凋亡调控机制中最重要的一类蛋白家族,是主要的抑凋亡蛋白;半胱天冬酶-3(caspase-3)是凋亡的参与者,两者对凋亡有重要的调控作用^[1]。本实验旨在观察 VRB 诱导体外培养肺癌细胞凋亡的作用及其对 Bcl-2 表达和半胱天冬酶-3 活性的影响,以初步探讨 VRB 诱导肺癌细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及细胞培养

人肺癌细胞系(Calu-3)由中国科学院上海细胞研究所提供;细胞周期及凋亡染色试剂购于 Coulter 公司;RPMI 1640 培养粉及胎牛血清购于 Hyclone 公司;DNA 末端标记凋亡检测试剂盒(ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit)和半胱天冬酶-3 荧光分析试剂盒(ApoAlert™ Caspase Assay Kit)购于 Clontech 公司;吖啶橙荧光染色剂购于 Sigma 公司;鼠抗人 Bcl-2 抗体和羊抗鼠 IgG-FITC 购于博士德公司;VRB 为法国皮尔法伯药厂产品。

细胞生长于 RPMI 1640 培养液中,内含 10% 胎牛血清,青霉素 100 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$,链霉素 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,于 37℃,5% CO_2 孵箱中培养。

1.3 TUNEL 法检测肺癌细胞凋亡

取对数生长期的肺癌细胞接种于铺有盖玻片的细胞培养板内,加入 VRB 3 个剂量(20, 40 和 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养 24 h,取对照组和给药组的肺癌细胞爬片,以 4% 多聚甲醛于 4℃ 固定 30 min,加用荧光

收稿日期: 2002-07-01 接受日期: 2003-02-09

作者简介: 张涛(1970-),男,山西省太原市人,主治医师,医学博士,从事胸外科临床和科研工作;刘锐(1922-),男,陕西人,教授,研究方向为食管功能及食管癌;王云杰(1950-),男,甘肃人,教授,研究方向为肺部疾病。

*联系作者 E-mail: zhangtfmmu@sina.com Tel: (029)3377737

素 FITC 标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶 (TdT) 的混合液, 37°C 作用 60 min。于荧光显微镜下观察, 以核染色阳性作为结果判定的标准。

1.4 吖啶橙染色法检测肺癌细胞凋亡

对照组和 VRB 3 个剂量组细胞经 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化后, 用 PBS 洗涤 2 次, 并以 PBS 调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 制成单细胞悬液, 取 $25 \mu\text{L}$ 细胞悬液, 加入 $1 \mu\text{L}$ $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的吖啶橙染液混匀, 取 $10 \mu\text{L}$ 混合液加于载玻片上, 加盖玻片后于荧光显微镜下观察凋亡细胞形态学改变。

1.5 流式细胞仪检测肺癌细胞凋亡率

肺癌细胞与对照组及 VRB 3 个剂量组培养 24 h 后, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 3 次, 并调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 制成单细胞悬液, 离心去除 PBS, 加入 2 mL 预冷的无水乙醇固定细胞 12 h 以上, 离心除去乙醇, PBS 洗 3 次, 调节终体积为 100 μL , 加入 DNA-Stain 染色液 500 μL , 于室温下避光染色 30 min。Elite ESP 型流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 Bcl-2 蛋白表达的检测

上述各组制备单细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 离心去除 PBS, 以 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 离心除去固定液, 以 PBS 洗 3 次, 加入鼠抗人 Bcl-2 抗体 (1:50) 于 4°C 冰浴 1 h, 然后加入荧光素 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白阳性表达细胞的百分率。

1.7 半胱天冬酶-3 活性检测

上述各组制备单细胞悬液, 倒置显微镜下计数细胞, 每组取细胞数约为 1×10^6 , $400 \times g$ 离心 10 min, 细胞重悬于 50 μL 细胞溶解缓冲液中, 按半胱天冬酶-3 荧光分析试剂盒说明进行, 用荧光分光光度计检测荧光强度, 激发波长为 400 nm, 发射波长为 505 nm。绘制 7-氨基-4-三氟甲基香豆素 (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin, AFC) 标准曲线, 并根据标准曲线求出半胱天冬酶-3 的活性。反应时间为 1 h, 终反应细胞数为 $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 半胱天冬酶-3 活性单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 即以单位时间 AFC 浓度变化来表示。

1.8 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均值的比较用非配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 肺癌细胞凋亡形态学特征

未经 VRB 处理的肺癌细胞培养 24 h 后, TUNEL

法未检测到阳性细胞。VRB 处理肺癌细胞后可检测到 TUNEL 阳性细胞, 胞核被染为黄绿色荧光, 呈小圆形、半月形或环形 (图 1); 吖啶橙染色则可见细胞核染色质固缩, 体积缩小, 表现为黄色强荧光染色, 早期凋亡细胞还可见典型的胞膜出泡现象, 正常细胞为黄绿色荧光深浅不一的结构样特征 (图 2)。

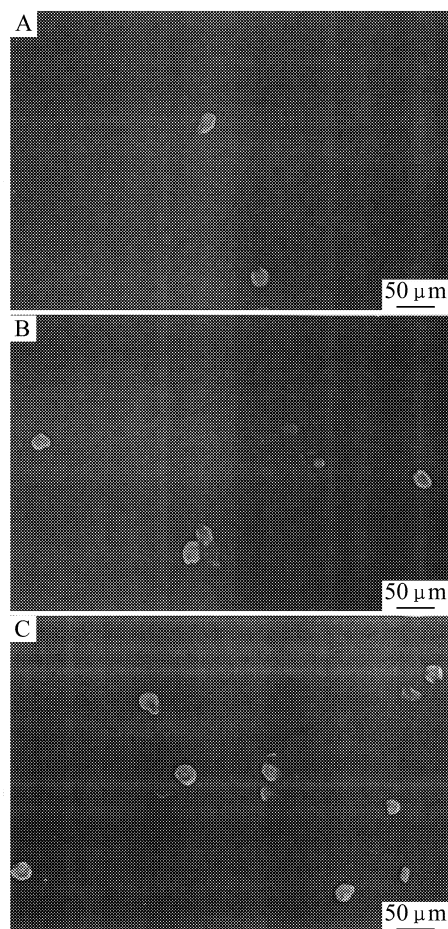


Fig 1. Typical morphological features of vinorelbine (VRB)-induced apoptosis of Calu-3 lung cancer cells stained by TUNEL-FITC method. A - C: VRB 20, 40 and 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h, respectively.

2.2 长春瑞滨诱导的肺癌细胞凋亡率

未加 VRB 的对照组肺癌细胞, 流式细胞仪未检测到凋亡峰; VRB 处理组流式细胞仪检测到在 G_1 期峰前有明显的亚二倍体凋亡峰 (图 3)。肺癌细胞凋亡率随 VRB 浓度的增加而增高 (表 1)。

2.3 长春瑞滨对肺癌细胞 Bcl-2 蛋白表达和半胱天冬酶-3 活性的影响

表 1 结果可见, 对照组肺癌细胞 Bcl-2 蛋白表达

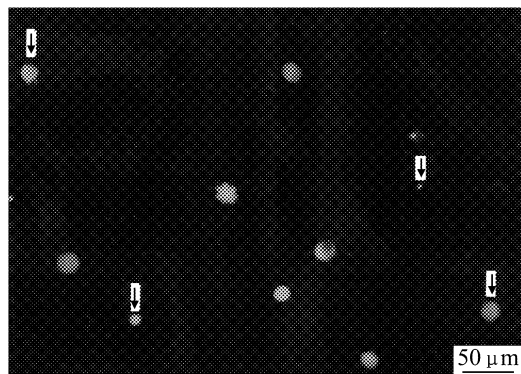


Fig 2. Typical morphological features of VRB-induced apoptosis of Calu-3 lung cancer cells stained by acridine orange. Arrows pointed from left to right: early stage of apoptotic cell, late stage of apoptotic cell, apoptotic body, normal cell.

Tab 1. Vinorelbine-induced apoptosis of lung cancer cells and its influence on Bcl-2 protein expression and caspase-3 activity

Vinorelbine / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Apoptosis rate/%	Bcl-2 expression rate/%	Caspase-3 activity / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
0	0	48.3 ± 7.1	195 ± 12
20	3.1 ± 0.6 **	37.6 ± 6.9 *	332 ± 16 **
40	7.8 ± 1.2 **	25.4 ± 6.2 *	416 ± 11 **
60	19.6 ± 4.3 **	8.4 ± 2.5 **	631 ± 27 **

Cells were incubated with three different concentrations of VRB for 24 h before the indexes were detected. Caspase activity was measured in 50 μL of $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ cells. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group by unpaired t test.

率为(48.3 ± 7.1)%, VRB 处理组 Bcl-2 蛋白表达率较对照组显著降低,且随 VRB 浓度的增加而降低。VRB 处理的肺癌细胞半胱天冬酶-3 活性较对照组

显著增高,且随 VRB 浓度的增加而增高。

3 讨论

本实验结果表明 VRB 可诱导肺癌细胞凋亡,且呈现浓度依赖性,TUNEL 染色和吖啶橙染色均可见典型的凋亡细胞形态学特征,如胞膜出泡、染色质浓缩、聚集等,流式细胞仪检测到明显的亚二倍体凋亡峰。因此,VRB 可能通过有效的诱导肺癌细胞凋亡而发挥治疗肿瘤的作用。

半胱天冬酶-3 是最重要的凋亡执行者之一^[3],半胱天冬酶-3 一旦被激活,细胞凋亡的发生将不可逆转。与此相反,Bcl-2 是制约细胞凋亡的一个重要因素,它可以抑制线粒体破裂,阻止凋亡执行者半胱天冬酶激活物细胞色素 C 的释放,还可直接与凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)结合,使半胱天冬酶-3 无法激活,从而抑制细胞凋亡发生^[4]。关于半胱天冬酶-3 和 Bcl-2 的关系问题是凋亡信号传导和调控机制研究中最前沿的一项课题,也是细胞是否凋亡的决定因素^[1]。近年来对半胱天冬酶-3 和 Bcl-2 关系的研究表明,Bcl-2 作用于半胱天冬酶-3 的上游,通过抑制半胱天冬酶-3 激活而发挥作用^[5];进一步的研究证明,Bcl-2 还是半胱天冬酶-3 的直接底物,激活的半胱天冬酶可特异性裂解 Bcl-2,使其功能发生根本改变,由抑制凋亡变为触发凋亡,因此,裂解凋亡抑制蛋白也是半胱天冬酶-3 活化后诱导细胞凋亡的机制之一^[6]。

综上所述,本实验结果表明,VRB 可诱导人肺癌 Calu-3 细胞凋亡;其机制与抑制抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达以及提高凋亡执行者半胱天冬酶-3 的活性有关。

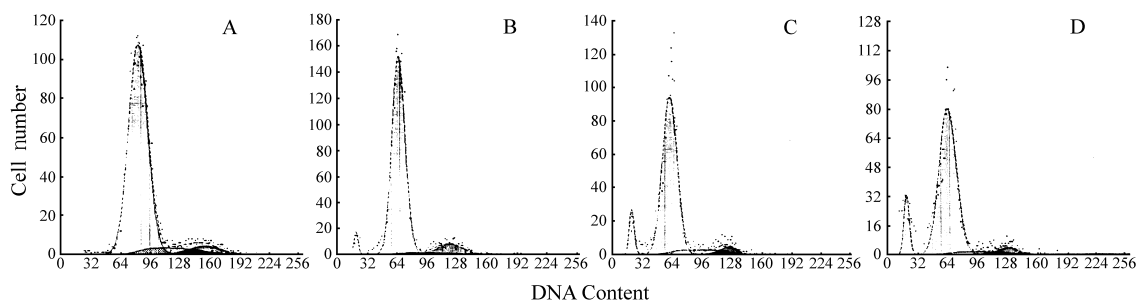


Fig 3. VRB-induced apoptosis of human Calu-3 lung cancer cells detected by flow cytometry. A: control; B - D: VRB 20, 40 and 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h, respectively.

4 参考文献:

- [1] Zhang XM. The focuses in the researches of apoptosis[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2000, **14**(2):81-85.
- [2] Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes[J]. *Nature*, 1992, **356**(6372):768-774.
- [3] Zhang X, Steiner MS, Rinaldy A, Lu Y. Apoptosis induction in prostate cancer cells by a novel gene product, pHyde, involves caspase-3[J]. *Oncogene*, 2001, **20**(42):5982-5990.
- [4] Hengartner MO. Apoptosis. Death cycle and Swiss army knives[J]. *Nature*, 1998, **391**(6666):441-442.
- [5] Swanton E, Savory P, Cosulich S, Clarke P, Woodman P. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts[J]. *Oncogene*, 1999, **18**(10):1781-1787.
- [6] Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, *et al.* Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases[J]. *Science*, 1997, **278**(5345):1966-1968.

Vinorelbine-induced apoptosis of cultured human lung cancer cells and mechanisms

ZHANG Tao¹, ZHANG Feng², ZHOU Yong-An¹, WANG Yun-Jie¹, CHENG Qing-Shu¹, LIU Kun¹

(1. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **AIM** To study if there were any changes of Bcl-2 expression and caspase-3 activity in vinorelbine(VRB)-induced apoptosis of human lung cancer cell line Calu-3. **METHODS** Cells were incubated with VRB(20, 40 and 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. Morphological changes in apoptotic cells were studied by TUNEL-FITC staining and acridine orange(AO) staining. Flow cytometer was used to detect apoptotic rates and Bcl-2 expression. Caspase-3 activity was detected by spectrofluorometer. **RESULTS** After treatment with VRB (20, 40 and 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, typical morphological features of apoptotic cells were appeared. Apoptotic rates of different concentrations of VRB treated cells were (3.1 \pm 0.6)%, (7.8 \pm 1.2)% and (19.6 \pm 4.3)%, respectively, significantly higher than that of control cells (0%, $P < 0.01$). Bcl-2 expression

rates of VRB treated cells were (37.6 \pm 6.9)%, (25.4 \pm 6.2)% and (8.4 \pm 2.5)%, respectively, much lower than that of control ones(48.3 \pm 7.1)% ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Caspase-3 activity of VRB treated cells were (332 \pm 16), (416 \pm 11) and (631 \pm 27) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively, significantly higher than that of control ones (195 \pm 12) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($P < 0.01$). All changes were in a concentration-dependent manner. **CONCLUSION** VRB can induce apoptosis of human lung cancer cells Calu-3 effectively through inhibiting Bcl-2 protein and activation of caspase-3 activity.

Key words: vinorelbine; tumor cells, cultured; apoptosis; protein, Bcl-2; caspase-3; carcinoma, lung cell, Calu-3

(本文编辑 乔虹)