

flavopiridol 体外诱导人尤文肉瘤细胞凋亡机制的研究

范姝丽¹, 李旭^{2△}, 李岩², 朱悦², 屠冠军², 范广宇²

(1. 中国医科大学附属第一医院干诊科, 辽宁 沈阳; 2. 骨科)

[摘要] 目的:探讨细胞周期蛋白激酶抑制剂 flavopiridol(FP)体外抑制人尤文肉瘤细胞(WE-68 细胞)增殖及诱导凋亡作用机制。方法:四甲基偶氮唑蓝(MTT)还原法测定细胞活力;流式细胞计数法检测细胞周期和凋亡率。免疫印迹(Western blot)法检测 Bcl-2、Bax、活化型多聚 ADP 核糖多聚酶(PARP-85)、pro-caspase-3 和活性型 caspase-8 蛋白水平的表达。结果:FP 通过诱导细胞凋亡抑制 WE-68 细胞生长,并呈时间和剂量依赖性,Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达无变化,PARP-85 和活性型 caspase-8 的表达上调,pro-caspase-3 的表达下调。结论:FP 可诱导 WE-68 细胞发生凋亡,其机制可能与死亡受体激活信号转导途径有关。

[关键词] 细胞周期;尤文肉瘤;凋亡;天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶

[中图分类号] R738.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)-05-0575-02

Apoptosis induced by flavopiridol in human Ewing's Sarcoma WE-68 cells

FAN Shu-li¹, LI Xu^{2△}, LI Yan², ZHU Yue², TU Guan-jun², FAN Guang-yu²

(1. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Orthopedics)

[Abstract] Objective: To investigate the growth-inhibitory and apoptosis-inducing effects of flavopiridol in human Ewing's sarcoma WE-68 cells and its mechanism in vitro. Methods: The proliferation of WE-68 cells was detected by MTT assay. The cell cycle and apoptotic rate were determined by flow cytometry. The expressions of Bcl-2, Bax, PARP-85, caspase-3, and caspase-8 were detected by Western blotting. Results: Flavopiridol inhibited the growth of WE-68 cells in a time- and dose-dependent manner. There were no significant differences in the expressions of Bcl-2 and bax between control group and flavopiridol group. The expressions of PARP-85 and active caspase-8 were up-regulated and the expression of pro-caspase-3 down regulated in flavopiridol group. Conclusion: Flavopiridol could induce the apoptosis of WE-68 cells via death receptor pathway.

[Key words] cell cycle; Ewing's sarcoma; apoptosis; caspase

儿童恶性骨肿瘤中,尤文肉瘤(Ewing's sarcoma, ES)的发病人数仅次于骨肉瘤。尤文肉瘤细胞中异常表达的融合蛋白 EWS-Fli1 造成细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的异常活化和其抑制因子的失活,可能是诱发尤文肉瘤细胞无限增殖,永生化的主要成因之一^[1,2]。我们探讨强效的 CDK 抑制剂 flavopiridol(FP)对尤文肉瘤细胞的增殖抑制作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人尤文肉瘤细胞株 WE-68 由德国明斯特大学 F van VALEN 博士惠赠。FP 由美国 Aventis 公司 JOSE-RAMON 博士惠赠,溶于二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司)中,浓度 10 mmol/L, -20℃冻存。四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品。活化型多聚 ADP 核糖多聚酶(PARP-85)抗体购自美国

Promega 公司, Bcl-2、Bax、caspase-3 和 caspase-8 抗体购自美国 BD Biosciences Pharmingen 公司, actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:人尤文肉瘤细胞株 WE-6 在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液于 37℃, 5%CO₂ 条件下培养, 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 肿瘤细胞增殖抑制(MTT 实验):将细胞浓度调整为 5×10³/ml,接种于 96 孔板,每孔 100μl,培养 24 h 后,设阴性对照组(加入细胞和同等稀释度的 DMSO),实验组分别加入 75, 150, 300 nmol/L 的 FP, 每组设 9 个复孔,每隔 24 h 终止培养 3 孔,至 72 h。每组终止培养前加入 MTT (5 g/L)20 μl,继续培养 3~4 h 后离心,弃上清,加 DMSO 200 μl,避光振荡 15 min,在全自动酶标仪上测定 570 nm 处吸光度 A 值,描绘细胞增殖曲线计算细胞生长抑制率。

1.2.3 细胞周期检测:两组细胞各设 3 个平行培养皿,75, 150, 300 nmol/L 的 FP 作用 48 h 后,分别收集细胞 1×10⁶ 个, PBS 洗涤两次, 70%冷无水乙醇固定, 4℃过夜,检测前再次离心,弃上清液, 0.5%Tri-

[基金项目] 国家自然科学基金科学部主任基金资助项目(30640001)

[作者简介] 范姝丽(1972-),女,讲师,博士。

△Corresponding Author's E-mail: likyoku@yahoo.com.cn

tonX-100 破膜,Rnase 酶消化 RNA,PI 染色 30 min,过网,流式细胞仪测定 DNA 含量变化,分析细胞凋亡和细胞周期,低于 G1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。

1.2.4 免疫印迹 (Western blot) 检测 Bcl-2、Bax、PARP-85、caspase-3 及 caspase-8 表达水平的变化:收集正常培养的细胞和经 FP(75, 150, 300 nmol/L)处理 48 h 的细胞,Laemmli Sample Buffer 裂解细胞后行 4%~12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 每孔加样 20 μg,转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(0.3% Tris, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.1% Tween-20, pH=7.4)封闭 1h,加一抗(按说明书稀释)4℃过夜(或室温 1h,视具体抗体而定);TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,二抗(辣根过氧化物酶标记,1:2000 稀释)室温孵育 1 h;TBST 洗涤同前,ECL 化学发光显色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件处理系统进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学方法采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FP 对 WE-68 细胞的体外增殖抑制效应 经 FP 处理后的 WE-68 细胞,代谢 MTT 的能力明显降低。随着 FP 浓度的增加以及作用时间的延长,WE-68 细胞的生长抑制率逐渐升高,抑制作用呈剂量-效应及时间-效应依赖性。结果见表 1。

表 1 flavopiridol 对尤文肉瘤细胞的抑制率(%)

Tab.1 Effect of FP on proliferation of Ewing's sarcoma cells(%)

FP 浓度(nmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
75	10.9 ± 1.5	21.9 ± 2.6	37.0 ± 4.6
150	25.4 ± 2.3	60.1 ± 3.8	76.3 ± 5.2
300	30.1 ± 4.6	73.2 ± 6.6	93.2 ± 6.0

注:与对照组比较,P 均 <0.05

2.2 FP 对 WE-68 细胞周期的影响 实验组细胞凋亡标志峰 Sub-G₁ 期比率随 FP 的给药浓度的增加而逐渐上升。结果见表 2。

2.3 FP 对 WE-68 细胞 Bcl-2、Bax、PARP-85、caspase-8 和 pro-caspase-3 表达水平的影响 经不同浓度 FP 处理 48 h 后,Bcl-2、Bax 的表达水平无明显变化,而 PARP-85 和 caspase-8 的活化型(40/36 kDa 及 23 kDa) 则明显上升,pro-caspase-3 的表达下调。其效应具有剂量相关性(图 1)。

表 2 尤文肉瘤细胞周期分布(%)

Tab.2 Effect of flavopiridol on apoptosis and cell cycle of Ewing's sarcoma cells(%)

FP(nmol/L)	Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	1.51 ± 0.23	63.03 ± 1.90	11.54 ± 0.99	23.77 ± 2.10
75	9.43 ± 1.24 ¹⁾	59.42 ± 2.10	19.22 ± 1.98	11.74 ± 0.67
150	48.46 ± 3.34 ²⁾	45.04 ± 2.28	4.03 ± 0.65	8.32 ± 0.98
300	58.41 ± 4.55 ²⁾	35.71 ± 4.33	6.81 ± 0.54	6.67 ± 0.34

注:与对照组比较 1)P < 0.05, 2)P < 0.01

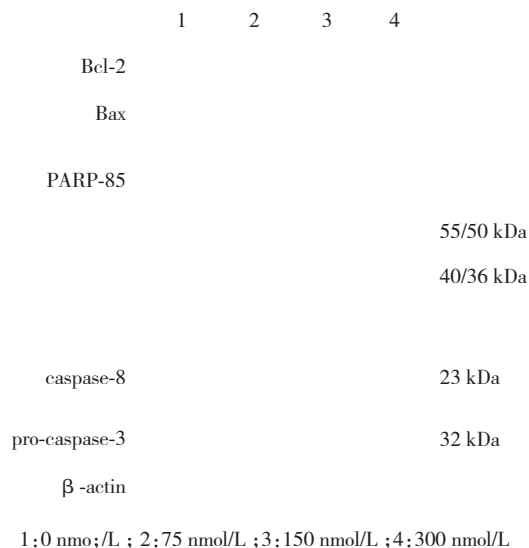


图 1 Bcl-2、Bax、PARP-85、caspase-8 和 caspase-3 的表达

Fig.1 Expression of Bcl-2、Bax、PARP-85、caspase-8 and caspase-3

3 讨论

本文结果提示,FP 对尤文肉瘤细胞 WE 的生长具有强烈的抑制作用,并呈剂量、时间依赖性。通过细胞周期测定,发现其抑制作用主要来源于 FP 对尤文肉瘤细胞的凋亡诱导作用。在调控细胞凋亡的众多的信号转导系统中,以 caspase-8 激活为触发点的死亡受体激活途径,以及由 Bcl-2 和 Bax 等调控的线粒体激活路径,是细胞凋亡信号转导的两大基本途径^[3,4]。Bcl-2 及 Bax 是细胞凋亡线粒体激活路径中的主要调控基因,二者蛋白表达的比率可控制细胞对死亡刺激的相对反应性。尽管有研究表明,Bcl-2 可能参与 FP 诱导的细胞凋亡^[5],本实验中 FP 给药前后 Bcl-2 的表达无明显变化,提示 FP 诱导尤文肉瘤细胞凋亡与 Bcl-2 无关。Bax 被确认为 p53 的直接早期应答基因^[6],其功能为启动细胞凋亡,本实验中所使用的 WE-68 细胞为表达野生型 p53 的细胞株^[7],但 Bax 的表达在 FP 给药前后无变化,提示 FP 诱导 WE-68 细胞凋亡可能为非 p53 依赖

(下转第 579 页)