

# bFGF 对骨肉瘤细胞系 U2-os 细胞的促凋亡作用

彭博<sup>1</sup>,吴哲<sup>2</sup>,张朝东<sup>2Δ</sup>

(1. 中国医科大学门诊部, 辽宁 沈阳 110001; 2. 附属第一医院神经内科)

[摘要] 目的:观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对骨肉瘤细胞系 U2-os 细胞增殖及生存的影响,探讨 bFGF 在肿瘤细胞发生发展中的作用。方法:以 bFGF 处理 U2-os 细胞,采用台盼蓝排除检测法及 MTT 法检测细胞存活及增殖情况;用 Annexin V-EGFP/PI 双染流式细胞术及 DNA 梯状带检测细胞凋亡情况。结果:bFGF 呈浓度、时间依赖性降低 U2-os 细胞活力并诱导细胞凋亡。结论:bFGF 可以诱导 U2-os 细胞发生凋亡,生长因子在细胞的生长调控方面具有双重作用。

[关键词] 骨肉瘤细胞系 U2-os 细胞;碱性成纤维细胞生长因子;凋亡

[中图分类号] Q255 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)05-0526-03

## Effect of bFGF on the apoptosis of U2-os osteosarcoma cell line

PENG Bo<sup>1</sup>, WU Zhe<sup>2</sup>, ZHANG Chao-dong<sup>2Δ</sup>

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

[Abstract] Objective: To study the role of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the generation and development of tumor by investigating the inhibition effect of bFGF on the proliferation and survival of U2-os osteosarcoma cell line. Methods: U2-os cells were treated by bFGF, and their survival and proliferation were determined with trypan blue exclusion method and MTT method. The apoptosis in U2-os induced by bFGF was determined by Annexin V-EGFP/PI staining of fixed cells and with FACS can flow cytometry and DNA ladder analysis. Results: bFGF decreased cell activity and proliferation and induced apoptosis in U2-os cells in dependency of concentration and time. Conclusion: bFGF can induce the apoptosis of U2-os osteosarcoma cell line, and the growth factors have double regulative effects on cell growth.

[Key words] U2-os osteosarcoma cell line; basic fibroblast growth factor; apoptosis

生长因子可作为促分裂剂作用于多种细胞,促进细胞增殖与存活。通常认为生长因子与促进细胞的增殖和存活有关。但许多证据显示,某些生长因子也能够诱导细胞凋亡,如表皮细胞生长因子能够诱导 A431、MDA-MB-468 细胞凋亡<sup>[1]</sup>,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factors, bFGF)也能诱导某些细胞发生凋亡。因此,生长因子在细胞的生长调控方面可能具有双重作用。

本实验采用台盼蓝排除检测法和 MTT 比色法检测 bFGF 对骨肉瘤细胞系 U2-os 细胞生长的抑制情况,采用 PI 染色流式细胞术检测 bFGF 诱导 U2-os 细胞凋亡的形式,探讨 bFGF 对骨肉瘤细胞系 U2-os 细胞生长及生存的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

扶济复(重组人 bFGF,北京双鹭药业有限公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma 公司进口分装, USA);碘化丙锭(PI, Sigma 公司, USA);DMSO(Sig-

ma 公司, USA), RNase A (Amresco);酶联免疫检测仪(TACAN 公司, 奥地利);FACSscan 型流式细胞仪(BD 公司, USA);其他试剂为分析纯。

#### 1.2 方法

1.2.1 U2-os 细胞的培养<sup>[2]</sup>:含 15%小牛血清、8 万 u/L 庆大霉素的 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱传代培养,每 2~3 d 传代一次。

1.2.2 台盼蓝排除检测法<sup>[3]</sup>:

实验分组:挑选处于对数生长期的细胞,将含 15%小牛血清 DMEM 培养液换成含 1%小牛血清 DMEM 培养液培养 12 h。

(1)实验组:浓度曲线:用含 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ng/ml bFGF 的 DMEM 培养液(含 1%小牛血清)分别培养 12 h;时间曲线:用含 100 ng/ml bFGF 的 DMEM 培养液(含 1%小牛血清)分别培养 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h;

(2)对照组:与实验组取相同时间点作对照;

(3)细胞染色与计数:常规方法将细胞消化成细胞悬液,然后按 1:2 与 2%台盼蓝染色液混合,滴入细胞计数板,2 min 后,显微镜下计数 100 个细胞,未着色者为活细胞,呈蓝色者为死细胞,计算细胞死亡百分比。

[基金项目] 辽宁省博士启动基金资助项目(20051035)

[作者简介] 彭博(1969 -),女,主治医师,硕士研究生。

Δ Corresponding Author's E-mail: xcdzhang@163.com

1.2.3 MTT 比色法测定细胞活力<sup>[4]</sup>:细胞培养 36 h 后,饥饿同步化 12 h,按分组要求施加处理因素。2 d 后倾出培养液,每孔加 MTT 溶液(5 g/L)20  $\mu$ l,继续孵育 4 h,每孔加入 150  $\mu$ l DMSO,振荡 10 min,用酶联免疫检测仪读取每孔 OD 值(测量波长 620 nm,参考波长 490 nm)。

1.2.4 Annexin V-EGFP/PI 双染流式细胞术分析细胞凋亡<sup>[4]</sup>:培养结束后,PBS 洗细胞,加入 500  $\mu$ l Binding Buffer、1  $\mu$ l Annexin V-EGFP 及 5  $\mu$ l PI 染液,室温避光反应 5 min,机检。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 梯状带(ladder):收集  $10^5 \sim 10^6$  细胞,PBS 洗,沉淀加 100  $\mu$ l Lysis A,离心将上清移至另一 EP 管。加入 20  $\mu$ l Solution A 及 Enzyme A 于 55  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,加入 20  $\mu$ l Enzyme B 于 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,加 130  $\mu$ l Precipitant 和 950  $\mu$ l 预冷的无水乙醇,混匀后-20  $^{\circ}$ C 沉淀过夜。4  $^{\circ}$ C 离心弃上清,70%冷乙醇洗涤 DNA 沉淀,溶于 10~15  $\mu$ l TE。1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后成像扫描。

1.3 统计学分析

每个实验重复 3 次,SSPS 13.0 统计程序软件包进行方差分析及 Student's *t* 检验来判断差异的统计学意义, $P < 0.05$  具有显著意义。

2 结果

2.1 台盼蓝计数细胞死亡百分比情况

2.1.1 不同浓度 bFGF 对 U2-os 细胞生长的影响:

bFGF 对 U2-os 细胞的生长有抑制作用,能够诱导 U2-os 细胞凋亡,随着 bFGF 作用浓度的增加,U2-os 细胞死亡百分比增加,两者呈正相关(图 1)

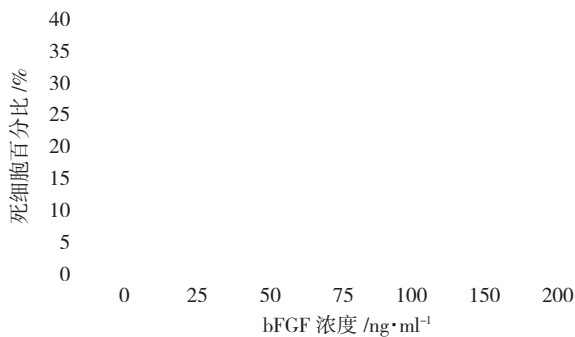


图 1 不同浓度 bFGF 对 U2-os 细胞生长的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of bFGF on the growth of U2-os osteosarcoma cell line

2.1.2 bFGF 不同处理时间对 U2-os 细胞生长的影响:随着 bFGF 作用时间的延长,bFGF 处理组 U2-os 细胞死亡百分比增加。对照组 U2-os 细胞死亡百分比无明显变化(图 2)。

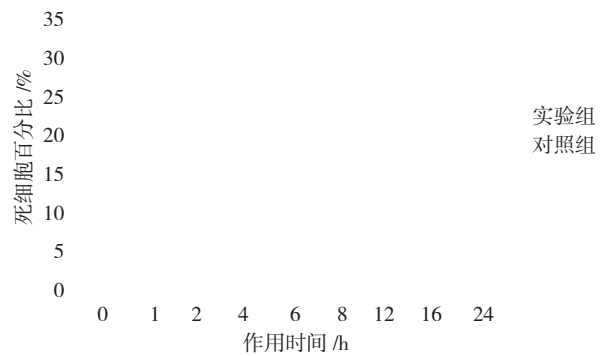


图 2 100 ng/mL bFGF 作用不同时间对 U2-os 细胞生长的影响

Fig.2 Effect of different times of 100 ng/ml bFGF on the growth of U2-os osteosarcoma cell line

2.2 MTT 比色法测定细胞活力变化情况

2.2.1 不同浓度 bFGF 对 U2-os 细胞活力的影响:

bFGF 对 U2-os 细胞的生长有抑制作用,能够抑制 U2-os 细胞的活力,随着 bFGF 作用浓度的增加,U2-os 细胞活力逐渐降低(图 3)。

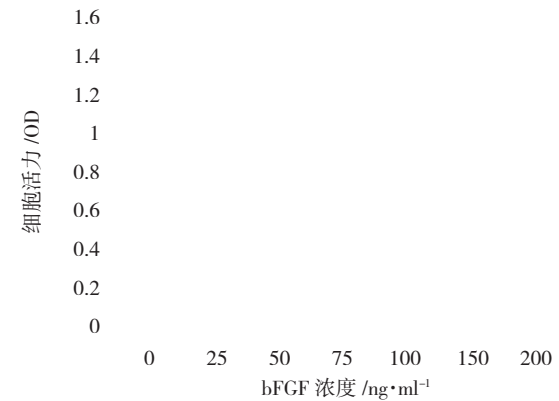


图 3 不同浓度 bFGF 对 U2-os 细胞活力的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of bFGF on the activity of U2-os osteosarcoma cell line

2.2.2 bFGF 不同处理时间对 U2-os 细胞活力的影响:

随着 bFGF 作用时间的延长,bFGF 处理组 U2-os 细胞活力逐渐下降,对照组 U2-os 细胞活力无明显变化(图 4)。

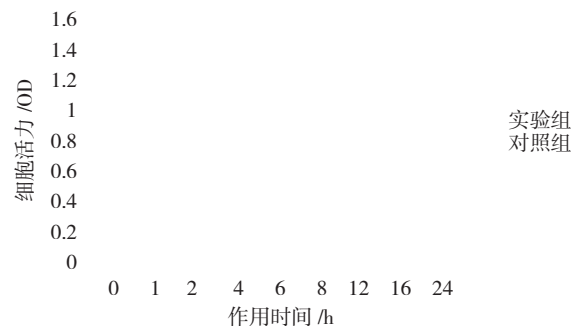


图 4 100 ng/ml bFGF 不同处理时间对 U2-os 细胞活力的影响

Fig.4 Effect of different times 100 ng/ml of bFGF on the activity of U 2-os osteosarcoma cell line

### 2.3 Annexin V-EGFP/PI 双染流式细胞术及 DNA ladder 法测定 U2-os 细胞凋亡变化

bFGF 处理 12 h 后, 与对照组相比,U2-os 细胞出现凋亡( $P < 0.01$ ),并且随着 bFGF 作用时间的延长,细胞凋亡百分比逐渐增加(图 5)。琼脂糖凝胶电泳结果显示 bFGF 处理 12 h、24 h 组均出现明显的 DNA 梯状带(图 6)。

对照组                  bFGF 处理 12 h                  bFGF 处理 24 h

图 5 bFGF 对 U2-os 细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of bFGF on the apoptosis of in U2-os osteosarcoma cell line

B0      B12 h      B 24 h

B0:对照组;B12 h:bFGF 处理 12 h;B 24 h:bFGF 处理 24 h

图 6 bFGF 对 U2-os 细胞凋亡的影响(DNA 梯状带)

Fig.6 Effect of bFGF on the apoptosis of in U2-os osteosarcoma cell line(DNA ladder)

### 3 讨论

由台盼蓝排除法可以看出,随 bFGF 作用于 U2-os 细胞时间的延长和浓度的增加,细胞被台盼蓝着色的比率逐渐增加,即细胞死亡百分比逐渐增加。MTT 比色法显示随着 bFGF 作用于 U2-os 细胞时间的延长和浓度的增加,细胞活力逐渐下降。提示 bFGF 能够抑制 U2-os 细胞的生长,诱导 U2-os 细胞的凋亡,并且 bFGF 的这种抑制作用是浓度和时间

依赖性的。在 bFGF 对 U2-os 细胞生长影响的时间曲线上,bFGF 作用 16 h 后,台盼蓝排除法提示细胞死亡百分比有所降低,MTT 比色法提示细胞活力有所增加。这可能是由于 bFGF 在培养液中水解而引起的活性降低造成,bFGF 的半衰期为 6 h。

由流式细胞术结果可以看出,在 bFGF 处理 12 h、24 h 时,可诱导大量的 U2-os 细胞凋亡。琼脂糖凝胶电泳结果显示明显的 DNA 梯状带,证明 bFGF 诱导 U2-os 细胞的死亡是以凋亡的形式发生,并且凋亡细胞的百分比随作用时间延长而逐渐增加,与台盼蓝排除法和 MTT 比色法得出的结果是一致的。本实验结果证明了 bFGF 作为一种重要的生长因子,对细胞的生长调控有双重的作用,不仅能促进细胞增殖而且还能够诱发细胞的凋亡。

U2-os 细胞之所以能够被传统的生长因子 bFGF 诱导凋亡,产生这种表型差异,其本质所在可能存在于细胞自身,存在于细胞生长与死亡信号转导途径的异常/异质性上面。一方面可能是由于细胞表面受体的异常引发下游信号转导的异常,有报道称 EGF 对 A431、MDA-MB-468 等细胞的凋亡诱导作用与细胞高表达 EGF 受体存在相关性<sup>[5]</sup>。另一方面,可能是由于信号转导通路上组成成分的异常,引起凋亡诱导通路的超敏感,超越了促生长通路对细胞信号的反应,引起凋亡。

#### 参考文献:

[1] FRANKLIN RA, McCUBREY JA. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis [J]. *Leukemia*,2000,14(12):2019-2034.

[2] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及应用[M]. 北京:科学出版社,1998.

[3] BOSCHERT MT,BECKERT BW,PUCKETT CL,et al. Analysis of lipocyte viability after liposuction[J]. *Plast Reconstr Surg*,2002,109(2):761-767.

[4] 叶丽平, 孙黎光, 张莹. bFGF 对卵巢癌 CAOV3 细胞 Bcl-2、Bcl-Xl、Bax、Bad 表达的影响[J]. *医学分子生物学杂志*,2007,4(3):215-220.

[5] WESTWOOD G,DIBLING BC,CUTHBERT-HEAVENS D,et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway [J]. *Oncogene*,2002,21(5):809-824.

[收稿日期] 2007-07-13

(上接第 525 页)

[2] HASENSEN S,MAATTA M,ROUSSELLE P,et al. The immortalized human corneal epithelial cells adhere to laminin-10 by using Lutheran glycoproteins and integrin alpha3beta1 [J]. *Exp Eye Res*,2005,81(4):415-421.

[3] LI N,ZHANG Y,NAYLOR MJ,et al. Beta1 integrins regulate mam-

mary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli [J]. *EMBO J*,2005,24(11):1942-1953.

[4] STEPP MA. Corneal integrins and their functions [J]. *Exp Eye Res*,2006,83(1):3-15.

[收稿日期] 2006-09-20