

PCNA 表达与肺癌细胞株凋亡的关系

董晓荣¹, 刘莉¹, 董继华²

Relationship between PCNA expression and apoptosis of human lung cancer cell line

DONG Xiao-rong, LIU Li, DONG Ji-hua

Department of Cancer Center, Union hospital, Tongji medical college, Huazhong university of science and technology, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and apoptosis of human lung cancer cell line. **Methods** Arsenic trioxide (As_2O_3) was used to induce the direct apoptosis in human lung cancer GLC-82 cell line. The MTT method and flow cytometry (FCM) were used for detection. With RT-PCR, the changes and relationship of PCNA in the process of GLC-82 apoptosis were studied. **Results** The data showed that As_2O_3 significantly inhibited proliferation of GLC-82 cells and inhibitory effects had a dose- and time-dependence. The change of DNA content of GLC-82 cell indicated that cell cycle progress could be blocked by As_2O_3 in G_2/M phase, with a presence of sub- G_1 peak in a dose-dependent manner. And PCNA mRNA activation was inhibited by As_2O_3 . **Conclusion** During apoptosis of GLC-82 cell induced by As_2O_3 , PCNA activation could apparently be inhibited. Hence, inhibition of PCNA activation may represent a new chemosensitization for tumors resistant to anticancer drugs.

Keywords: Proliferating cell nuclear antigen; Apoptosis; Lung cancer cell line; RT-PCR

摘要:目的 探讨肺癌细胞株增殖细胞核抗原(PCNA)的表达与肺癌细胞株凋亡的关系。方法 用三氧化二砷(As_2O_3)诱导肺癌细胞株GLC-82凋亡。运用细胞培养、MTT、流式细胞技术(FCM)检测及逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测PCNA表达在细胞凋亡过程中的变化及相互关系。结果 三氧化二砷可明显抑制GLC-82细胞增殖,使细胞周期阻滞于 G_2/M 并随后凋亡,PCNA表达受到抑制。结论 三氧化二砷诱导GLC-82凋亡过程中,PCNA表达受到明显抑制。对于耐药性肿瘤,PCNA活性的抑制可能代表一种新的化疗策略。

关键词: 增殖细胞核抗原; 细胞凋亡; 肺癌细胞; 逆转录聚合酶链反应

中图分类号: R734.2; R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2003)05-0395-03

0 引言

增殖细胞核抗原(PCNA)是DNA聚合酶的辅助因子,在DNA复制、细胞增殖及细胞周期调控中发挥着极为重要的作用^[1]。PCNA在许多肿瘤组织中都有高表达,并随着肿瘤浸润程度增加和转移,其表达呈明显上升趋势^[2]。肺癌为我国发病率最高的肿瘤之一,本文对PCNA在肺癌细胞中的表达及药物诱导肺癌细胞凋亡过程中PCNA表达变化的情况,作了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 肿瘤细胞系

肺癌细胞株(GLC-82)由昆明医学院肿瘤所建立^[3],在含10%灭活小牛血清、青霉素100U/ml及

链霉素100 μ g/ml的RPMI1640(Gibco公司)培养基中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养。

1.2 主要试剂

As_2O_3 试剂为Sigma公司产品。四甲基偶氮唑蓝(MTT)为Fluke产品。细胞培养基:RPMI1640、小牛血清(GIBCO.BRL)。PCNA引物序列为

P1: 5'-AACTAGCTAGACTTTCTC-3'

P2: 5'-TCACGCCCATGGCCAGGTTG-3' 扩增

目的片段为274bp,由上海生工公司合成。AMV逆转录酶为美国Promega产品。dNTP、Taq酶购自华美生物公司。

1.3 细胞增殖抑制试验

采用MTT法。取对数生长期的GLC-82细胞,以 1×10^5 /ml接种于96孔培养板,100 μ l/孔,分别加入终浓度0.5、1.0、2.0、4.0 μ mol/l的 As_2O_3 液,每组设5个复孔,并设空白对照组。在1、2、3、4d在上述各组癌细胞中加入0.5% MTT 20 μ l/孔,继续培养

收稿日期:2003-06-24; 修回日期:2003-08-15

作者单位:1.430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤研究中心,2. 中心实验室

4h, 弃去上清, 加 DMSO 100 μ l/孔, 室温下振荡至结晶溶解, 立即于酶标仪态 570nm 波长处测定吸光度 (A) 值。癌细胞增殖活性抑制率 (%) = (1 - 实验组平均吸光度 A 值/对照组平均吸光度 A 值) \times 100%。

1.4 细胞周期和细胞凋亡的检测

采用流式细胞仪 (FCM) 分析。经 As_2O_3 处理后的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞, 用 70% 乙醇固定 24 小时后, 加入 RNase 及碘化丙啶, 用流式细胞仪 (Becton Dickson 公司) 进行 DNA 含量和细胞周期分析, 所用软件为 CELLQUEST。

1.5 PCNA 的检测

采用逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 方法。细胞总 RNA 的提取参照 Trizol Reagent Kit 使用说明书进行。逆转录反应后, 进行 PCR 扩增。引物序列: PCNA (274bp) 上游: 5' \uparrow AAACTAGCTA-GACTTTCCTC-3'; 下游: 5' \uparrow TCACGCCCATG-GCCAGGTTG-3'; 以 β -tubulin (410bp) 作为反应内参照。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并拍照。

2 结果

2.1 MTT 检测 见表 1 所示, As_2O_3 对 GLC-82 具有极强的生长抑制作用, 且随药物浓度的提高, 作用时间的延长而增强。 As_2O_3 4.0 μ mol/L 处理 96 小时, 增殖抑制率可达 57.26%。

表 1 As_2O_3 对 GLC-82 细胞生长抑制率 (%)

浓度	治疗时间			
	24h	48h	72h	96h
0.5 μ mol/L	1.65	2.25	3.59	3.98
1.0 μ mol/L	6.16	6.64	8.56	12.23
2.0 μ mol/L	11.26	17.75	24.69	50.87
4.0 μ mol/L	14.87	26.35	50.00	57.26

2.2 As_2O_3 对 GLC-82 细胞周期分布及凋亡指数 (AI) 的影响 As_2O_3 使 GLC-82 细胞出现 G_2/M 期阻滞。细胞凋亡率与 As_2O_3 的浓度呈正比, DNA 组方图上各 As_2O_3 作用组均可见凋亡标志亚 G_1 峰。

2.3 RT-PCR 从 GLC-82 和对照用人膀胱移行上皮细胞癌 BIU-87 株中均可检出高表达的 PCNA, 在 274bp 处出现清晰的条带, 而培养基对照为阴性。不同浓度 As_2O_3 引起 GLC-82 凋亡细胞中 PCNA 的表达与药物浓度的提高、作用时间的延长而降低, 并发现当增殖抑制率达 50% 及以上时, PCNA 检测均为阴性。图 1 为 As_2O_3 作用 96 小时的结果。当 As_2O_3 为 2.0 和 4.0 μ mol/L 时, 完全检测不到, 对应

增殖抑制率为 50.87% 和 57.26%。



图 1 PCNAcDNA 扩增结果

1. GLC-82; 2. 0.5 μ mol; 3. 1.0 μ mol; 4. 2.0 μ mol; 5. 4.0 μ mol; 6. BIU-87

3 讨论

PCNA 作为 DNA 聚合酶的辅助因子, 不仅在 DNA 复制中起关键的作用, 而且来自细胞外的增殖信号都须经过 PCNA 的参与, 才能引发 DNA 的合成, 细胞才能生存和增殖。近年来, 国内外在病理学上报告, 应用 PCNA 作为识别增殖细胞的一个重要标志。PCNA 在许多肿瘤组织中都有高表达, 并随着肿瘤浸润深度增加和转移, 其表达呈明显上升趋势。

检测 PCNA 方法常采用免疫组化荧光标记法, 结果用 PCNA 增殖指数 LI (即肿瘤细胞中 PCNA 阳性细胞所占比例) 评估。可反映细胞 DNA 复制的活跃程度。在动物实验及人体实体瘤研究中发现 PCNA 作为细胞增殖状态的标记与 Ki-67 标记和流式细胞仪有很好的相关性。证明了 PCNA 用于检测增殖细胞是切实可行的。

Lipponen 等^[4] 研究发现, PCNA 的表达与膀胱移行细胞癌的肿瘤临床分期, 病理分级密切相关。有浸润转移的膀胱癌较表浅膀胱癌 PCNA 表达明显增强, 分化程度越低, 恶性程度越高则 PCNA 的表达也越强。彭万玲^[5] 研究也表明 PCNA 的表达水平与膀胱移行细胞癌的恶性程度及患者的预后有关。众多研究同时表明, 星形细胞表达 PCNA, 其表达水平与星形细胞肿瘤的恶性程度和预后密切相关^[6]。王秀玲^[7] 的研究表明大肠癌中 PCNA 的表达显著高于 p53 和 C-erbB-2。张春林^[8] 最近报道 PCNA 在 45 例骨肉瘤中均有表达, 表达率为 100%, PCNA-LI 越高, 其术后生存时间越短, 即 PCNA-LI 与术后生存时间呈负相关, 表明 PCNA 是判断骨肉瘤患者预后的良好指标。

肺癌为我国发病率最高的肿瘤之一, 其复发和易耐药的特性是目前如何提高肺癌治愈率, 延长生存时间关键问题, 故人们积极寻找有效的抗癌新药。研究表明 As_2O_3 可显著抑制肺癌细胞 GLC-82 的增

殖,其机理同干扰细胞周期诱导细胞凋亡有关。本文研究了 PCNA 在肺癌细胞凋亡过程中的表达情况。在 As₂O₃ 引起的肺癌凋亡细胞中 PCNA 的检出与药物浓度的增高,作用时间的延长而降低,与细胞凋亡呈正相关。PCNA 随着细胞的凋亡,表达而逐渐降低甚至停止。本研究认为 PCNA 可作为检测细胞凋亡的一个良好指标,也可作为肿瘤手术及预后的一个重要指标。在肿瘤细胞凋亡过程中,PCNA 表达受到明显抑制,对于耐药性肿瘤,PCNA 活性的抑制可能代表一种新的化疗策略^[9]。

参考文献:

[1] Prelich G, Tan CK, Kosture M, et al. Functional identification of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase auxiliary protein [J]. Nature, 1987, 326 (6112): 517-520.
 [2] Maeda K, Chung YS, Onoda N, et al. Proliferating cell nuclear antigen and cyclin D1 expression in gastric cancer tissue [J]. J. Clin. Oncol., 1994, 12 (12): 2528-2533.

[3] 梁达明, 贾伟, 胡美英, 等. 肺腺癌细胞系 (GLC-82) 的建立及其生物学特性 [J]. 中华肿瘤杂志, 1985, 7 (2): 81-82.
 [4] Liipponen PK, Eskelinen MJ. Cell proliferation of transitional cell bladder tumor determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value [J]. Br J Cancer, 1992, 66 (1): 171-175.
 [5] 彭万玲, 曲孟泰, 邹永清, 等. PCNA 在膀胱移行细胞癌的应用意义 [J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17 (8): 478-480.
 [6] 卞修武, 史景泉, 柳凤轩, 等. 胶质瘤增殖活性和肿瘤基因蛋白表达及意义 [J]. 中华病理学杂志, 1997, 26 (2): 89-92.
 [7] 王秀玲, 徐杭蓓, 益莉娜, 等. 大肠癌中 PCNA、P53 和 C-erbB-2 的表达及与机体免疫反应的关系 [J]. 中国癌症杂志, 2001, 11 (3): 217-219.
 [8] 张春林, 廖威明, 李佛保, 等. 骨肉瘤 p21 蛋白、PCNA 与 Ki-67 的表达及其意义 [J]. 中国癌症杂志, 2001, 11 (2): 109-112.
 [9] 童强松, 曾甫清, 林晨, 等. 稳定转导反义增殖细胞核抗原基因对膀胱癌细胞体外增殖活性的调控作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19 (5): 644-645.

(周永红校对)

动态·简讯·

《肿瘤研究与临床》征订启事

《肿瘤研究与临床》杂志是反映肿瘤学领域科研成果、学术动态及临床经验的肿瘤学科专业学术性期刊。国内统一刊号 CN14-1036/R, 国际连续出版物号 ISSN1006-9801, 邮发代号: 22-137。主要栏目有述评、基础研究、临床研究、综述、讲座、调查报告、技术改进、短篇报道等。读者对象为中、高级肿瘤防治工作者及医药卫生技术人员。

《肿瘤研究与临床》杂志为双月刊, 大 16 开本, 72 页, 双月 25 日出版, 每期定价 6.00 元, 全年定价 36.00 元。国内总发行太原市邮政局, 欢迎到全国各地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部邮购(免邮寄费)。凡订阅本刊全年刊物的作者, 向本刊投稿时可凭 2004 年邮局订阅存根复印件, 免交稿件处理费。

编辑部地址: 山西省太原市职工新街 3 号 邮政编码: 030013

电话: (0351) 4651415, 4650389