

rhBMP-2 抑制胶质瘤细胞方式的初步探讨

荆俊杰¹, 章翔², 吴景文², 王守森¹, 高大宽², 王如密¹

摘要:目的 初步探讨 BMP-2 抑制胶质瘤细胞的作用方式。方法 在培养的人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 中加入 rhBMP-2, 测定生长曲线, 应用流式细胞仪法分析细胞周期, 用 FITC 标记的 AnnexinV 染色法分析凋亡和坏死的比例。结果 经 rhBMP-2 作用的 SHG-44 细胞 G1 期所占比例明显升高 ($P < 0.01$); 10 μ g/ml 组中, 完整细胞 (PI-/FITC-) 比例 (35.6%) 明显低于 5 μ g/ml 组 (94.3%) 和对照组 (96.9%) ($P < 0.01$), 坏死细胞 (PI+/FITC+) 比例 (58.0%) 明显高于 5 μ g/ml 组 (3.1%) 和对照组 (0.5%) ($P < 0.01$)。结论 在 rhBMP-2 抑制胶质瘤细胞 SHG-44 增殖中, 诱导其坏死是主要作用, 其中也有凋亡作用的参与; AnnexinV 染色法较流式细胞仪法可更加准确的区分正常细胞, 早、晚期凋亡细胞和坏死细胞。

关键词: 人骨形成蛋白; 脑胶质瘤; 凋亡; 坏死

中图分类号: R739.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2002) 03-0203-02

Study on the action mode of bone morphogenetic protein-2 inhibiting glioma cells

JING Jun-jie, ZHANG Xian-g, WU Jin-g-wen, et al

Department of Neurosurgery, Fu Zhou General Hospital of PLA, Fuzhou 350025, China

Abstract: **Objective** To investigate the action mode of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibiting glioma cells. **Methods** We incubated cultured human SHG-44 glioma cells with recombinant bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) protein. Cell growth curve was characterized. Cell cycle and AnnexinV stainings were detected by flow cytometry for studying the action mode of rhBMP-2. **Results** The DNA content of SHG-44 increased in G1 cycle, and decreased in S cycle obviously ($P < 0.01$) in groups incubated with rhBMP-2. Intact cells (PI-/FITC-) in 10 μ g/ml group (35.6%) were lesser than which in 5 μ g/ml group (94.3%) and control group (96.9%) ($P < 0.01$). Necrotic cells (PI+/FITC+) in 10 μ g/ml group (58.0%) were more than 5 μ g/ml group (3.1%) and control group (0.5%) ($P < 0.01$). **Conclusion** The inhibition effect of rhBMP-2 achieved by inducing cell necrosis, and apoptosis partly. AnnexinV staining was better than FCM assay to distinguish intact cell, early or late apoptosis, and necrosis.

Keywords: Bone morphogenetic protein-2; Glioma; Apoptosis; Necrosis

通常认为, 细胞死亡分两种方式, 即坏死和凋亡, 绝大多数的抑癌基因都与诱导瘤细胞凋亡有关, 国内也已有报道, 将 BMP-2 基因转染入 NH3T3 成纤维细胞中, 可引起细胞凋亡。我们曾报道, rhBMP-2 能够在体内、外抑制胶质瘤细胞增殖, 并可诱导凋亡^[1,2], 但凋亡比例与细胞抑制程度并不一致, 提示 rhBMP-2 抑制胶质瘤细胞还有其他途径。本文应用 FITC 标记的 AnnexinV 染色分析对此进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 由全军神经外科研究所保存提供, rhBMP-2 蛋白由该所吴景文博士提供; RPMI-1640 培养液及胰蛋白酶均购自美

国 GIBCO 公司; 细胞凋亡 AnnexinV 检测试剂盒购自宝泰克生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 用 RPMI-1640 培养液 (含 10% 小牛血清), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 潮湿空气中培养。

1.2.2 处理及分组 将培养细胞随机分为 3 组, 细胞贴壁后 24h 更换培养液, 第 1、2 组分别加入 5、10 μ g/ml rhBMP-2 孵育, 第 3 组为对照组, 同时换液, 但不加 rhBMP-2。

1.2.3 MTT 实验 按文献[1] 进行。

1.2.4 生长曲线测定 取生长状态良好的细胞, 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液, 800r/min 离心收集细胞, 以 1640 培养液制备单细胞悬液, 以 $2 \times 10^7/l$ 密度接种于 25ml 培养瓶, 3 组各接种 7 瓶, 按上述方法处理, 每 48h 更换培养液, 并维持 rhBMP-2 浓度,

收稿日期: 2001-05-24; 修回日期: 2001-08-08

作者单位: 1. 350025 南京军区福州总医院神经外科; 2. 第四军医大学西京医院全军神经外科研究所

每日各取一瓶倒置显微镜下观察记数,绘制生长曲线。

1.2.5 细胞凋亡测定 采用流式细胞仪技术。按文献[2]进行。

1.2.6 Annexin 染色流式细胞仪分析 取 3 组待测细胞,分别 1000rpm 离心 5min,弃上清;加入 5~7mlPBS,1000rpm 离心 5min,弃上清;加入 100 按说明书临时配好的含有 FITC 标记的 AnnexinV 的应用液,混匀,室温放置 15min;加入 1ml 稀释液,混匀,流式细胞仪检测。

1.2.7 统计学处理 采用 *F* 检验进行统计学处理。

2. 结果

2.1 由 MTT 实验测得 $ID_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$ 。

2.2 生长曲线测定 接种 3d 后,第 1 组和第 2 组细胞明显进入对数生长期,第 3 组细胞生长缓慢至第 6d 后几乎停滞。

2.3 细胞周期测定 经流式细胞仪检测见后两组细胞 G1 期所占比例明显升高,S 期所占比例明显降低 ($P < 0.01$),其中第 3 组出现凋亡峰,凋亡细胞所占比例为 12.3%。见表 1。

2.4 AnnexinV 染色结果分析 $10 \mu\text{g/ml}$ 组中,完整细胞 (PI-/FITC-) 比例 (35.6%) 明显低于 $5 \mu\text{g/ml}$ 组 (94.3%) 和对照组 (96.9%) ($P < 0.01$),坏死细胞 (PI+/FITC+) 比例 (58.0%) 明显高于 $5 \mu\text{g/ml}$ 组 (3.1%) 和对照组 (0.5%) ($P < 0.01$),早期凋亡细胞数 (PI-/FITC+) 为 3.9%,与另两组 (1.4% 和 1.5%) 无显著差异。

表 1 流式细胞仪分析 SHG-44 细胞不同处理后细胞周期

	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	凋亡 (%)
SHG-44 组	55.2	33.3	11.5	
$5 \mu\text{g/ml}$ rhBMP 组	72.7 *	19.0 *	8.3	2.5
$10 \mu\text{g/ml}$ rhBMP 组	77.4 *	15.2 *	7.4	12.3

* $P < 0.01$, 与 SHG-44 组比较

3 讨论

在 Glozak 等^[3,4] 研究中,以维甲酸(RA)和 BMP-2 或 BMP-4 联合应用于恶性胚胎瘤细胞 p19,24h 内协同诱导有 40% 瘤细胞发生凋亡,而单独 RA 只能诱导 10%~15% 的瘤细胞凋亡,联合应用至第 4d 时,有 95% 的细胞发生凋亡,这些研究结果提示,BMP-2 具有抑制肿瘤细胞增殖、促进瘤细胞凋亡的作用。Ide 等^[5] 研究了不同 BMP 受体在前列腺及前列腺癌细胞中的分布和意义。研究发现,BMP-2 传递生长抑制信号。活化的 II 型受体可与胞浆内以同源寡聚体形式存在的 Smad1 分子短暂结合(已磷

酸化),介导信号由胞膜传至细胞核,其中主要是羧基端 SSXS 序列中的丝氨酸参与了 Smad1 体内磷酸化过程。BMP 诱导的 Smad1 核转移可与 schnurri 基因同源物 PDR-1/BF1 结合形成转录调节复合物,激活细胞和发育阶段特异性基因转录,包括周期素依赖激酶抑制剂基因 p15,其产物 p15Ink4B 可改变一系列早期细胞周期调控事件,使细胞停滞于 G1 晚期^[6]。

细胞凋亡早期,细胞膜的变化之一为细胞膜内层的磷脂酰丝氨酸转移到外层,并暴露在细胞膜的表面。AnnexinV 是一种磷脂酸结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有很高的亲和性,将其用荧光素 FITC 标记后,与 PI 共同孵育细胞,用流式细胞仪检测,根据细胞的不同荧光特点,区分正常细胞,早、晚期凋亡细胞和坏死细胞。本实验发现, $10 \mu\text{g/ml}$ 组中,完整细胞 (PI-/FITC-) 比例 (35.6%) 明显低于 $5 \mu\text{g/ml}$ 组 (94.3%) 和对照组 (96.9%),坏死细胞 (PI+/FITC+) 比例 (58.0%) 明显高于 $5 \mu\text{g/ml}$ 组 (3.1%) 和对照组 (0.5%),早期凋亡细胞数 (PI-/FITC+) 为 3.9%,与另两组 (1.4% 和 1.5%) 无显著差异,说明在 rhBMP-2 抑制胶质瘤细胞 SHG-44 增殖中,诱导其坏死是主要作用,其中也有凋亡作用的参与,早期凋亡约占凋亡细胞总数的 1/3;抑制程度与 rhBMP-2 浓度呈正相关,但非线性关系。同时也说明,流式细胞仪法在检测早期凋亡时,假阳性率较高,AnnexinV 染色法可更加准确的区分正常细胞,早、晚期凋亡细胞和坏死细胞。

参考文献:

- [1] 荆俊杰,章翔,吴景文,等.人骨形成蛋白-2 对人脑胶质瘤细胞增殖、细胞周期的影响及其抑瘤作用[J].中华实验外科杂志,2000,17 (4):371.
- [2] 荆俊杰,章翔,吴景文,等.重组人骨形成蛋白-2 (rhBMP-2) 对人脑胶质瘤细胞凋亡的影响[J].肿瘤防治研究,2000,27 (5):325-327.
- [3] GlozakMA,RogersMB.Specific induction of apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid and BMP-2 or BMP-4[J].Dev Biol,1996,179 (2):458-470.
- [4] GlozakMA,RogersMB.BMP-4 and RA-induced apoptosis mediated through the activation of retinoic receptor alpha and gamma in P19 embryonal carcinoma cells[J].Exp Cell Res,1998,242 (1):165-173.
- [5] IdeH,Yoshida,MatsumotoN,etal.Growth regulation of human prostatic cancer cells by bone morphogenetic protein-2[J].Cancer Res,1997,57 (22):5022-5027.
- [6] KretschmarM,LiuF,HataA,etal.The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase[J].Genes Dev,1997,11 (8):984-995.

(李奇明校对)