

细胞周期对肿瘤坏死因子诱导 HeLa 细胞凋亡的影响

侯 敢, 黄迪南, 祝其锋

摘要: 目的 研究细胞周期对肿瘤坏死因子(TNF)诱导 HeLa 细胞凋亡的影响。方法 通过胸腺嘧啶核苷酸(TdR)阻断法阻滞 HeLa 细胞的细胞周期, 以 MTT 法、流式细胞术和荧光染色分析 TdR 阻滞细胞和周期化的 HeLa 细胞对 TNF 诱导凋亡的敏感性。结果 TdR 阻滞细胞周期较周期化的 HeLa 细胞对 TNF 诱导的凋亡的敏感性降低。结论 揭示 TNF 诱导 HeLa 细胞凋亡与细胞周期有关。

关键词: 肿瘤坏死因子; HeLa 细胞; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: Q 253; R 73-76 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2001)05-0336-03

Effect of Cell Cycle in HeLa Cells to Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor

HOU Gan, HUANG Di-nan, ZHU Qi-feng

Biochemical Department of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Abstract: **Objective** To study effect of cell cycle in HeLa cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor. **Methods** HeLa cells was arrested by cell cycle-blocking drug TdR. HeLa cells in arresting and cycling were treated with tumor necrosis factor. Cell apoptosis was evaluated by MTT assay, flow cytometry and fluorescent staining. **Results** HeLa cells by cell cycle arrest became lower sensitive to TNF-induced apoptosis. **Conclusion** It suggested that HeLa cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor may be related to cell cycle.

Key words: tumor necrosis factor; HeLa cells; apoptosis; cell cycle

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是由活化的巨噬细胞和单核细胞分泌的多肽类细胞因子, 具有多种生物学活性, 广泛参与细胞扩增、分化和死亡等多种细胞调节进程。已往的研究表明, TNF 在体外能诱导某些正常细胞和大多数肿瘤细胞株(包括 HeLa 细胞株)凋亡。研究和探讨 TNF 诱导肿瘤细胞凋亡及其调节机理, 具有重要的病理生理意义和肿瘤治疗价值。本文观察了细胞周期对 TNF 诱导 HeLa 细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 RPMI-1640 培养基(Gibco 产品), 小牛血清(超级, 杭州四季青生物工程公司产品), 重组人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α , Sigma 产品) Hoechst33258 荧光染料(Sigma 产品), 碘化丙啶(PI, Sigma 产品), 四唑盐(MTT, Fluka 产品), 胸腺

嘧啶核苷酸(TdR, Sigma 产品), 余为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养与细胞株 HeLa 细胞株引自中国科学院上海细胞生物研究所。培养基为含 10% 小牛血清及青霉素(100u/ml)、链霉素(50 μ g/ml)的 RPMI-1640 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件培养。

1.3 细胞周期的阻断 采用胸腺嘧啶核苷酸阻断法。向对数生长期 HeLa 细胞培养基中加入终浓度 2mmol/L TdR 继续培养 18~20h, 阻断细胞周期(以下称 TdR 阻滞细胞)。

1.4 流式细胞仪分析 参照 Nicoletti 等^[1]的方法进行。RNA 酶处理后 PI 染色, EPICSXL 型流式细胞仪分析。

1.5 MTT 法检测 参照 Lattime 等^[2]的方法进行。

1.6 Hoechst 33258 荧光染色^[3] 收集细胞后滴片, Hoechst33258 荧光染色, 在荧光镜下观察。正常细胞的 DNA 结构均匀, 荧光表现为弥散均匀; 凋亡细胞核固缩, DNA 浓缩并向核膜靠近, 荧光表现为块状或点状。计数 200 个细胞, 计算凋亡细胞百分比。

收稿日期: 2000-09-20; 修回日期: 2000-11-05

基金项目: 广东省重点学科经费资助项目(9608)

作者单位: 524023 湛江, 广东医学院生物化学与分子生物学研究所



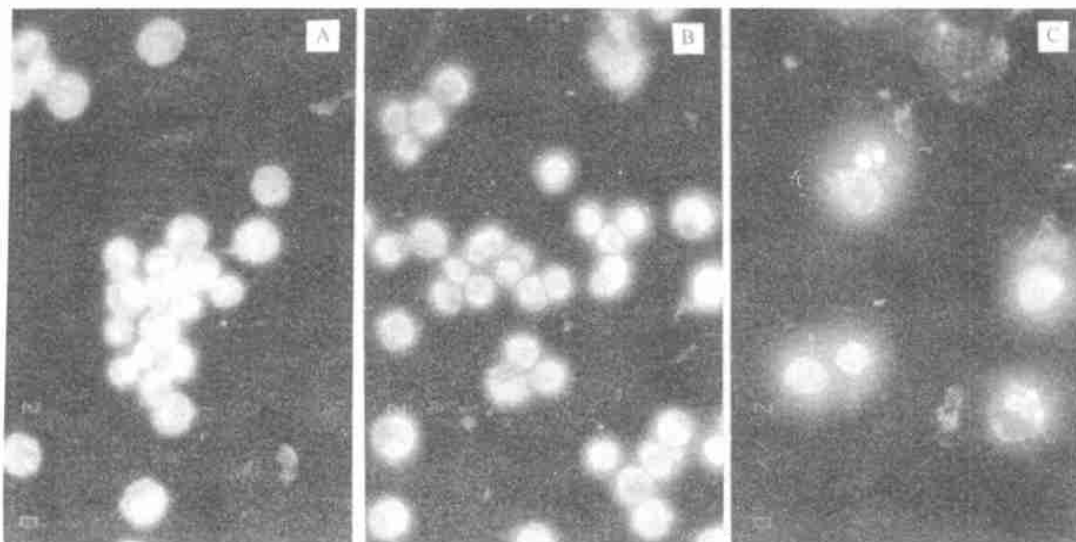


图3 TNF 诱导 G₁ 期和正常 HeLa 细胞凋亡的荧光染色 (×40)

A: 正常对照; B: TdR 阻滞细胞用 TNF 处理 48h; C: 周期化细胞用 TNF 处理 48h

2 结果

2.1 MTT 法检测 取 TdR 阻滞细胞和正常培养的(以下称周期化细胞)HeLa 细胞, 分别用不同浓度 TNF 处理 48h 后, 进行 MTT 法检测。结果显示 TNF 对 TdR 阻滞的 HeLa 细胞的生长抑制作用较周期化细胞减弱, TdR 阻滞细胞对 TNF 的细胞毒作用的抗性增加, 见图 1。

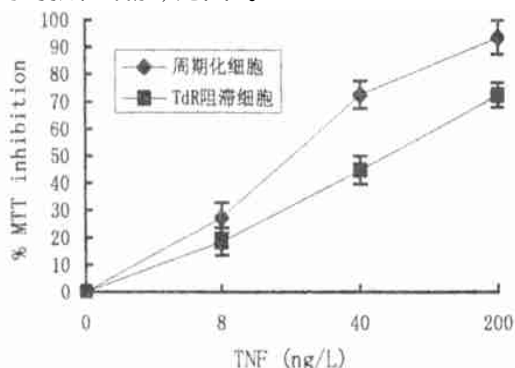


图1 TNF 诱导 TdR 阻滞和周期化 HeLa 细胞生长的抑制作用 (n=5)

2.2 Hoechst33258 荧光染色 TdR 阻滞细胞和周期化 HeLa 细胞分别用 2ng/L TNF 处理不同时间后, 进行 Hoechst33258 荧光染色。细胞凋亡计数结果见图 2。图 3 为 TNF 处理 48h 的 Hoechst33258 荧光染色结果。图 2 和图 3 表明, TdR 阻滞的 HeLa 细胞对 TNF 诱导凋亡的敏感性较周期化细胞降低。

2.3 流式细胞仪分析 TdR 阻滞细胞和周期化 HeLa 细胞分别用 2ng/L TNF 处理 48h 后, 流式细胞仪进行 DNA 含量分析表明, TdR 阻滞细胞的

HeLa 细胞对 TNF 诱导凋亡的敏感性降低, 见图 4。

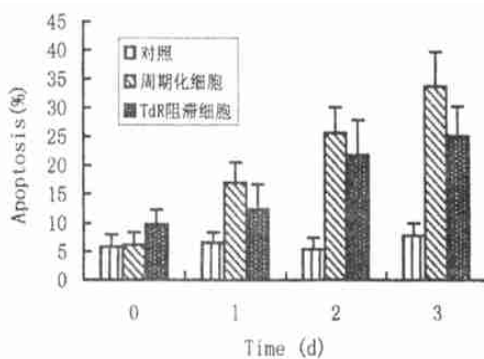


图2 TNF 诱导 TdR 阻滞和周期化 HeLa 细胞凋亡的荧光染色计数 (n=5)

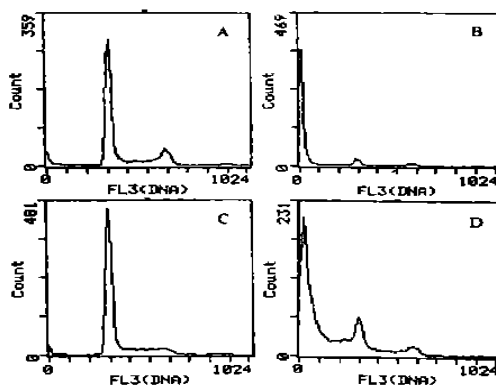


图4 TNF 诱导 G₁ 期和正常 HeLa 细胞凋亡的流式细胞仪分析结果

A: 正常对照; B: 周期化细胞用 TNF 处理 48h; C: TdR 阻滞细胞; D: TdR 阻滞细胞用 TNF 处理 48h。

3 讨论

在诱导肿瘤细胞凋亡方面, 细胞毒因子和抗癌

药物是研究的重点。TNF在体外显示出细胞毒性,并且不同肿瘤细胞株对TNF诱导的细胞死亡显示出不同的敏感性,约40%的肿瘤细胞株表现出生长抑制或细胞溶解^[4]。虽然在几个模型中可观察到细胞坏死,但一般认为TNF的细胞毒作用最初是以诱导细胞凋亡的形式发挥作用^[5]。TNF诱导敏感细胞凋亡的机理,被认为是通过与靶细胞膜上特异性的TNF受体(TNFRs)结合后,触发细胞内信号转导而启动凋亡机制^[6]。

关于细胞凋亡与细胞周期的关系的研究已有些报道。如T淋巴细胞或自然杀伤细胞介导的细胞杀伤、生长因子去除、糖皮质激素诱导的T-细胞凋亡等,对静止期细胞或周期化细胞的任何时相的作用都是等同的。另一方面,依赖细胞周期的细胞凋亡已在其他一些模型中观察到,如某些药物作用于肿瘤细胞株引起的凋亡^[7]和T-细胞受体参与的T-细胞凋亡。这些观察提示不同的细胞需求导致细胞凋亡的最终途径有两种截然不同的机制,其中之一要求在细胞周期的某一精确时相传递死亡信号。TNF介导的细胞杀伤亦要求细胞处于正确的细胞时相。较早的研究显示,TNF敏感的细胞死于有丝分裂的后期,并且使细胞处于静止状态能增强TNF的细胞溶解效果。后来的研究显示TNF的细胞毒性是同细胞周期相关连的^[8],并且G₁期抑制剂可增加细胞对TNF的抗性^[2]。基于细胞大小和细胞周期状态的相关性分析,TNF或产生TNF的毒性细胞在整个细胞周期仅杀伤一部分靶细胞^[9]。Shih等^[10]的研究显示TNF诱导WEHI细胞凋亡是同细胞周期事件相连系的,并发现WEHI靶细胞接受TNF细胞毒信号主要是在G₁-S期。本文采用TdR阻断法阻滞细胞周期的原理是:TdR是细胞DNA合成不可缺少的前体,但向培养基中加入过量的TdR,能形成过量的三磷酸腺苷,后者能反馈抑制其他核苷酸的磷酸化,从而阻抑DNA合成。本文结果显示,TdR阻断Hela细胞周期后,细胞对TNF诱导凋亡的敏感性降低,提示TNF诱导Hela细胞凋亡与细胞周期有关。

凋亡是同许多基因如c-myc和p53等被激活有关,而这些基因是细胞周期依赖性表达并介导细胞从静止到扩增的转变。同样一些关键蛋白激酶和周期蛋白被确认是细胞周期各时相的转变的调节因子。已有研究表明,TNF在诱导Hela细胞凋亡过程中,核c-myc和Cyclin D₃起着重要的作用^[11,12]。本实验的结果可解释为,TNF通过与Hela细胞膜上

的TNFRs结合后,触发细胞内信号转导而启动凋亡机制。同时由于细胞周期化被阻断,可能涉及到某些同细胞周期事件相连系的基因如c-myc、p53和关键蛋白激酶等激活受阻,抑或某些细胞周期蛋白如Cyclin D₃等表达受抑制,从而导致TdR阻滞细胞周期的Hela细胞对TNF诱导凋亡的敏感性降低,其确切机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nicoletti LM, Iglorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. J Immunol Methods, 1991, 139: 271-279.
- [2] Lattime FC, Stutman O. WEHI-164 clone 2F: in vitro antitumor effects of tumor necrosis factor and γ -interferon [J]. Nat Immun, 1992, 11: 34-45.
- [3] Oberhammer F, Bursch W, Tiefenbacher R, et al. Apoptosis is induced by transforming growth factor- β 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation on the DNA. Hepatol, 1993, 18(5): 1238-1246.
- [4] Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). Science, 1985, 230: 630-632.
- [5] Rubin B, Smith LJ, Helleman GR, et al. Correlation between the anticellular and DNA fragmenting activities of tumor necrosis factor [J]. Cancer Res, 1989, 48: 6006-6010.
- [6] Broskhaus M, Schoenfeld HJ, Schlager EJ, et al. Identification of two types of tumor necrosis receptor human cell lines by monoclonal antibodies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 3127-3131.
- [7] Gorczyca W, Gong J, Ardelt B, et al. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents [J]. Cancer Res, 1993, 53: 3186-3192.
- [8] Coffin FD, Haviland DL, Green ML, et al. Cytotoxicity by tumor necrosis factor is linked cell cycle but does not require DNA synthesis [J]. Growth Factors, 1989, 1: 357-364.
- [9] Belizario JE, Dinarello CA. Interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor, and transforming growth factor β increase cell resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity by growth arrest in G₁ phase of the cell cycle [J]. Cancer Res, 1991, 51: 2379-2385.
- [10] Lin JX, Yilck J. Tumor necrosis factor and interleukin 1 cause a rapid and transient stimulation of c-fos and c-myc mRNA levels human fibroblasts [J]. J Biol Chem, 1987, 262: 11908-11911.
- [11] Janicke RU, Lin XY, Lee FH, Porter AG. Cyclin D3 sensitizes tumor cells to tumor necrosis factor-induced, c-Myc-dependent apoptosis [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(10): 5245-5253.
- [12] Janick RU, Lee FH, Porter AG. Nuclear c-Myc plays an important role in cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(9): 5661-5670.

(李奇明校对)