

紫杉醇对人骨肉瘤细胞凋亡及对 *bcl-2*、*bax* 基因表达的影响

张春林, 曾炳芳, 董 扬, 张长青, 眭述平, 罗从风, 陆男吉, 高 峰

Effect of Paclitaxel on Apoptosis and *bcl-2*, *bax* Gene Expression in Human Osteosarcoma Cell

ZHANG Chun-lin, ZENG Bing-fang, DONG Yang, ZHANG Chang-qing, SUI Shu-ping, LUO Cong-feng, LU Nan-ji, GAO Feng

Department of Orthopedics of the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract :Objective To investigate the apoptosis in human osteosarcoma cells induced by paclitaxel ,and the relationship between this apoptosis and expression of *bcl2* and *bax*. **Methods** MG63 OS cells were treated with various concentrations of paclitaxel. Proliferation was determined by cell count in a cytometer chamber. Viability was assessed by typan blue dye exclusion. The cell morphologic alterations were visualized using light and transmitting electron microscope. The percentage of apoptosis of osteosarcoma cell MG63 was measured by TdT-mediated dUTP Nick End Labeling technique (TUNEL) staining method and flowcytometry using Annexin V/ PI double staining method after 0 , 24 , 48 ,72 and 96 hours of culture in the presence or absence of paclitaxel. The expression of apoptosis-regulated gene *bcl2* and *bax* were detected using immunohistochemical staining. **Results** A time-dependent and dose-dependent cell growth inhibition was shown after exposure to paclitaxel. Paclitaxel induced MG63 cells to undergo apoptosis with typical apoptosis characteristics , including morphological changes of chromatin condensation , chromatin crescent formation ,nucleus fragmentation. The DNA-cleavage was detected by using TUNEL assay. The cells treated with paclitaxel showed initially G₂/ M phase arrest ,which was followed by apoptosis. Paclitaxel could reduce the expression of apoptosis-regulated gene *bcl2* and improved the expression of apoptosis-regulated gene *bax*. **Conclusion** Paclitaxel is able to induce the apoptosis in human osteosarcoma cells through the initiation of G₂/ M phase arrest and inhibiting mitosis in both a time-dependent and dose-dependent manner. This apoptosis maybe mediated by down-expression of apoptosis-regulated gene *bcl2* and up-expression of apoptosis-regulated gene *bax*.

Key words :Paclitaxel ; Apoptosis ; Osteosarcoma ; *bcl2* ; *bax*

摘 要:目的 了解紫杉醇诱导人骨肉瘤细胞的凋亡效果,以及凋亡与 *bcl2* 和 *bax* 表达之间的关系。方法 用不同浓度的紫杉醇作用于骨肉瘤细胞 MG63。采用胎盼蓝染色法,于细胞记数板进行活细胞率检测计算。采用光镜和电子显微镜对细胞形态改变进行观测,采用原位缺口末端标记凋亡检测法(TUNEL)和流式细胞术(Annexin V-FITC & PI)对细胞凋亡进行检测。采用免疫组织化学法对凋亡调节基因 *bcl2* 和 *bax* 表达进行检测。结果 骨肉瘤活细胞率随着紫杉醇作用时间延长和浓度增高而降低。紫杉醇诱导骨肉瘤细胞 MG63 凋亡表现为典型的凋亡特征,包括:细胞形态学改变,细胞染色质浓聚,染色质新月形变,胞核碎裂等。TUNEL 法检测到了细胞 DNA 片段的断裂。随着细胞凋亡的发生,开始出现 G₂/M 期阻滞。紫杉醇可以降低凋亡相关基因 *bcl2* 的表达和增加 *bax* 基因的表达。结论 紫杉醇可以通过时间依赖性和剂量依赖性方式,促使细胞 G₂/M 期阻滞和抑制细胞有丝分裂,从而诱导人骨肉瘤细胞凋亡。这种凋亡可能受到凋亡相关基因 *bcl2* 低表达和 *bax* 高表达的调控。

关键词:紫杉醇;凋亡;骨肉瘤;*bcl2*;*bax*

中图分类号:R738.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)08-0572-04

收稿日期:2006-07-26;修回日期:2006-12-26
基金项目:上海交通大学青年教师校内启动基金资助项目(2005-209)
作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院骨科
作者简介:张春林(1972-),男,博士,副主任医师,主要从事骨肿瘤骨病的研究

0 引言

细胞凋亡是细胞死亡的一种方式。其特征表现为主动的细胞自杀和 DNA 的破坏。细胞出现染色质浓聚,染色质新月形改变,胞核碎裂等^[1,2]。一个

细胞是否将发展为凋亡,部分原因依赖于调节细胞凋亡和促进细胞存活的蛋白质之间的平衡,例如 *bcl2* 和 *bax*。*bax* 的过表达可以促进细胞的死亡,而抑制细胞凋亡蛋白质(如 *bcl2*)的过表达则可以抑制 *bax* 引起细胞凋亡的功能^[3,4]。

紫杉醇是一种从太平洋紫杉树树皮中提取出来的一种抗有丝分裂物质,它可使细胞内微管束稳定,微管蛋白聚合,抑制细胞有丝分裂中纺锤体的形成,抑制有丝分裂,使细胞阻滞于 G₂/M 期,从而导致细胞凋亡^[5-7]。已经证实紫杉醇对许多肿瘤具有细胞毒性作用(如卵巢癌,乳腺癌,白血病等)^[5-7]。本实验旨在了解紫杉醇诱导人骨肉瘤细胞的凋亡效果,以及凋亡与 *bcl2* 和 *bax* 表达之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

紫杉醇购自北京协和制药厂。原位缺口末端标记凋亡检测(TUNEL)试剂盒购自 Roche 公司,Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 Beckman coulter 公司。*bcl2* 和 *bax* 单克隆抗体购自华美生物技术有限公司。

1.2 细胞培养和条件

人骨肉瘤细胞 MG63 获得自中山大学病理系(细胞源自美国 ATCC 细胞库)。采用不同作用时间(24~96 h)和不同浓度(0.001~1 μmol·L⁻¹)紫杉醇对骨肉瘤细胞 MG63 进行作用。

1.3 体外细胞生长抑制检测

采用 0.4%(W/V) 胎盼蓝染色法(Gibco BRL)对 MG63 细胞生存能力进行评估,细胞培养 48 h 后,被不同浓度的紫杉醇作用 24~96 h,然后用 0.25%胰酶消化收集,采用 0.4%胎盼蓝染色,于细胞计数板计数计算活细胞率。每种条件重复 3 次,取均值。

1.4 电子显微镜观察

细胞被 0.1 μmol·L⁻¹紫杉醇作用后 24~96 h,用胰酶消化后收集,用 4%戊二醛固定,浸泡于 Epon821 中,用包埋液包埋,于 60 °C 烤箱内固化 72 h。超薄切片机切片约 50~60 nm 厚,用 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,然后用透射电镜观察,并拍照。

1.5 TUNEL 检测

骨肉瘤细胞 MG63 凋亡采用原位缺口末端标记(TUNEL)检测试剂盒进行检测,阴性对照为不加入荧光素标记的 dUTP。细胞用光镜和荧光显微镜观察。凋亡指数(AI)用以下公式来计算:AI = 凋亡的细胞数目/总的细胞数 × 100%。

1.6 流式细胞术检测

采用流式细胞术(Annexin-V-FITC & PI)对细胞周期和细胞凋亡进行动态观察检测,在 FACSort 流式细胞仪(Becton-Dickinson)上进行。检测数据采用 Modifit1 TV 2.0 程序分析。

1.7 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学 LSAB 法进行染色。出现棕色处表示抗原抗体结合处,用光镜观察并拍照(×200),对照组不加一抗。阳性率(PR)用以下公式计算:PR = 阳性细胞数/细胞总数 × 100%。

1.8 统计方法

采用 Dunnett t (2 sided) 检验 ANOVA 统计分析方法对资料进行统计分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外细胞生长抑制的检测

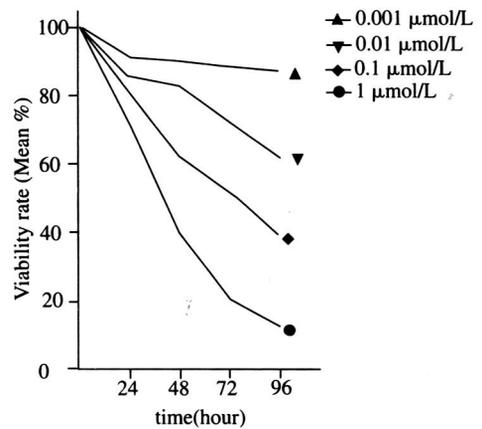


图 1 不同浓度紫杉醇作用不同时间骨肉瘤细胞 MG63 活细胞率

紫杉醇对 MG63 细胞有明显的生长抑制作用。在同一浓度条件下,活细胞率随着作用时间的延长而降低;在相同作用时间条件下,活细胞率随着药物浓度的增高而降低,呈现出时间依赖性和剂量依赖性关系,见图 1。0.1 μmol·L⁻¹紫杉醇、5 μmol·L⁻¹ADM、6.6 μmol·L⁻¹DDP、1320 μmol·L⁻¹MTX 处理 48 h,活细胞率分别为 62.3%、40.4%、71.5%、80.1%,四组的差异有统计学意义(F = 687.9, P < 0.05)。

2.2 细胞形态学改变

经 0.1 μmol·L⁻¹紫杉醇作用 24 h 后,于透射电子显微镜观察下,可见骨肉瘤细胞 MG63 出现凋亡特征,包括染色质浓聚,染色质新月状改变,细胞核碎裂,见图 2。

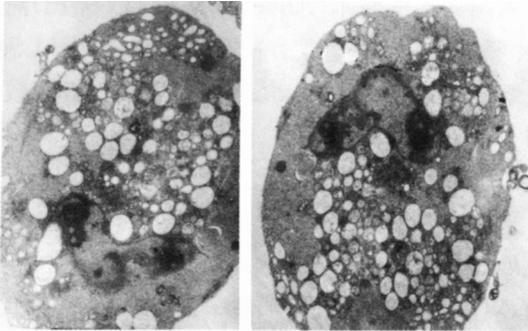


图2 紫杉醇诱导骨肉瘤细胞 MG63 细胞凋亡
(透射电子显微镜 $\times 4000$)

2.3 TUNEL 检测

阳性荧光染色和棕褐色染色位于细胞核中,结果显示经紫杉醇($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于骨肉瘤 MG63 细胞 24 ~ 96 h 后,随着时间的延长,细胞凋亡指数明显地增加($P < 0.05$),见图 3。

2.4 流式细胞术分析

随着紫杉醇的作用时间延长, G_0/G_1 期细胞比例明显下降,而较多的细胞阻滞于 G_2/M 期。紫杉醇作用前骨肉瘤细胞 MG63 凋亡平均比例为 1.76%,经 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 紫杉醇作用 24 ~ 96 h,细胞的凋亡比例从 17.5% 上升至 75.9% (0 h 2.0%、24 h 17.5%、48 h 29.7%、72 h 52.0%、96 h 75.9%)。当紫杉醇的作用浓度从 $0.001 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,则平均细胞凋亡率从 15.75% 上升为 56.86%。随着细胞凋亡率的增加, G_0/G_1 期细胞比例下降, G_2/M 期细胞比例上升,图 4 略。

2.5 *bcl2* 蛋白表达

阳性表达信号位于细胞质中。结果显示,经紫杉醇作用 24 ~ 96 h,*bcl2* 蛋白阳性表达率随着作用时间增加而明显减低($P < 0.05$)。这提示紫杉醇的作用可能会减低 *bcl2* 的表达。

2.6 *bax* 蛋白表达

阳性表达信号位于细胞质中。结果显示,经紫杉醇作用 24 ~ 96 h,*bax* 蛋白阳性表达率随着作用时间增加而明显升高($P < 0.05$)。这提示紫杉醇的作用可能会升高 *bax* 的表达。

3 讨论

细胞凋亡是多细胞有机体为了调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程。细胞凋亡参与机体许多病理生理过程^[9,10]。*bcl2* 基因家族在控制细胞凋亡过程中起着重要的作用,该家族包括抑制凋亡的基因 *bcl2* 和 *bcl-xL*,以及促进凋亡基因 *bax* 和 *bad*。它们具有同源的氨基酸序列^[11,12]。*bax* 的过表达已经证明可以促进细胞的死

亡^[13,14],然而,抑制细胞凋亡蛋白质(如 *bcl2*) 的过表达则可以抑制 *bax* 引起的细胞凋亡的功能^[15,16]。这样,*bcl2* 和 *bax* 的比率就成为决定细胞是否发生凋亡的关键因素^[17]。

紫杉醇是一种微管稳定剂,它可以使微管蛋白聚集,微管蛋白形成束,使细胞周期停滞^[18,19],已经证实紫杉醇对许多肿瘤具有细胞毒性作用(如卵巢癌、乳腺癌、白血病等^[5-7])。可诱导多种肿瘤发生凋亡。

本研究结果显示,紫杉醇可以在体外以剂量依赖性和时间依赖性的方式抑制骨肉瘤细胞的生长。电镜观察发现,经 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 紫杉醇作用后,部分细胞出现典型的凋亡变化,包括:细胞染色质浓聚,染色质新月形变,胞核碎裂等。

内源性核碎裂被认为是凋亡最主要的生物化学变化,它导致 DNA 裂解为寡核苷酸片段^[20]。因此,可以通过酶促原位 DNA 缺口末端标记技术(TUNEL)来定量测定凋亡细胞。TUNEL 检测结果显示,经紫杉醇($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 24 ~ 96 h 后,骨肉瘤细胞 MG63 中凋亡率随着作用时间延长而明显升高($P < 0.05$)。这和细胞存活率分析结果相关。

1997 年 Nagata 等^[21]发现了暴露于凋亡细胞膜外的磷脂酰丝氨酸(PS)是凋亡细胞表面分子之一,可用 Annexin V 与 PS 相结合对凋亡进行检测,结合流式细胞仪 PI 染色法即 Annexin V/PI 法是目前最理想的凋亡定量检测方法之一。采用此方法对细胞凋亡和细胞周期动态进行定量检测,我们发现随着凋亡细胞数目的增加,大多数细胞阻滞于 G_2/M 期,这可能与紫杉醇对有丝分裂的抑制作用有关。流式细胞分析还显示了凋亡细胞典型的特征——高的亚二倍体峰,这证实了紫杉醇可能是通过抑制正常细胞周期发挥其抑癌作用的。

采用免疫组织化学染色法对 *bcl2* 蛋白和 *bax* 蛋白表达进行检测,结果显示,经紫杉醇($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 24 ~ 96 h 后,骨肉瘤细胞 MG63 中 *bcl2* 阳性表达率随着作用时间而明显减低($P < 0.05$),*bax* 阳性表达率随着作用时间而明显升高($P < 0.05$)。提示紫杉醇可能可减少 *bcl2* 的表达提高 *bax* 的表达。*bcl2* 和 *bax* 的比率随着作用时间的延长而降低,这可能促进了骨肉瘤细胞 MG63 凋亡。

本研究证实紫杉醇可以在体外以剂量依赖性和时间依赖性的方式诱导骨肉瘤细胞发生凋亡。这种凋亡可能是受到抑制凋亡基因 *bcl2* 表达下调和促进凋亡的基因 *bax* 基因表达上调的调节。紫杉醇作

为一种新的治疗骨肉瘤(特别是对常规化疗耐药的骨肉瘤)的化疗药物,其作用机制尚需进一步研究。

(本文图 3 见第 644 页)

参考文献:

- [1] Manygoats KR, Yazzie M, Stearns DM. Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study[J]. J Biol Inorg Chem, 2002, 7(7-8): 791-798.
- [2] Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L, et al. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 30738-30745.
- [3] Lanzi C, Cassinelli G, Cuccuru G, et al. Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2001, 48(4): 254-264.
- [4] Salah Eldin A E, Inoue S, Tsukamoto S, et al. An association of *bcl2* phosphorylation and *bax* localization with their functions after hyperthermia and paclitaxel treatment[J]. Int J Cancer, 2003, 103(1): 53-60.
- [5] Zanotti KM, Belinson JL, Kennedy AW, et al. Treatment of relapsed carcinoma of the ovary with single-agent paclitaxel following exposure to paclitaxel and platinum employed as initial therapy[J]. Gynecol Oncol, 2000, 79(2): 211-215.
- [6] Bhall K. Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells[J]. Leukemia, 1993, 7(8): 563-568.
- [7] Long HJ. Paclitaxel: a novel anticancer chemotherapeutic drug[J]. Mayo Clin Proc, 1994, 69(4): 341-345.
- [8] Pucci B, Bellincampi L, Tafani M, et al. Paclitaxel induces apoptosis in Saos-2 cells with CD95L upregulation and *bcl2* phosphorylation[J]. Exp Cell Res, 1999, 252(1): 134-143.
- [9] Tsuruo T, Naito M, Tomida A, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal[J]. Cancer Sci, 2003, 94(1): 15-21.
- [10] Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms[J]. J Pathol, 2003, 199(3): 275-288.
- [11] Konopleva M, Konoplev S, Hu W, et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins[J]. Leukemia, 2002, 16(9): 1713-1724.
- [12] Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of *bax* and *Bak* in B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2002, 100(5): 1810-1816.
- [13] Usuda J, Chiu SM, Azizuddin K, et al. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on *bax*[J]. Photochem Photobiol, 2002, 76(2): 217-223.
- [14] Jang M, Shin M, Shin H, et al. Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via *bax*-dependent caspase-3 activation[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 449(1-2): 39-45.
- [15] Mertens HJ, Heineman MJ, Evers JL. The expression of apoptosis-related proteins *bcl2* and *ki67* in endometrium of ovulatory menstrual cycles[J]. Gynecol Obstet Invest, 2002, 53(4): 224-230.
- [16] Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, et al. *bcl2* down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance[J]. Mol Pharmacol, 2003, 64(1): 51-58.
- [17] Pettersson F, Dagleish AG, Bissonnette RP, et al. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of *bcl2/bax*[J]. Br J Cancer, 2002, 87(5): 555-561.
- [18] Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(10): 3025-3030.
- [19] Charles AG, Han TY, Liu YY, et al. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 47(5): 444-450.
- [20] Kressal M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA[J]. Cell Tis Res, 1994, 278(3): 549-556.
- [21] Nagata S. Apoptosis by death factor[J]. Cell, 1997, 88(3): 355-365.

[编辑:安凤;校对:周永红]

2008 年《医学研究生学报》征订、征稿启事

南京军区南京总医院主办的《医学研究生学报》是国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊),大 16 开,112 页,月刊,每期定价 10 元,全年 120 元。

本刊被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国科技资料目录(医学)》、《中国生物医学文献光盘数据库》、《中国科技期刊数据库》、《中国期刊全文数据库》、《中文科技资料目录—医药卫生》、《中国学术期刊综合评价数据库》等 10 余种数据库全文收录。2005 年度影响因子为 0.556,他引总引比为 0.629。

本刊优先刊登各类基金资助课题论文、研究生毕业论文,尤其是对国家自然科学基金资助课题论文会以最快速度刊用。自 2005 年起增设“导师论坛”,欢迎医学院士、导师们赐稿。国外作者可投英文稿。

欢迎订阅、欢迎交换、欢迎投稿。凡在当地邮局逾期未订者,可直接汇款到本刊编辑部订购。

邮发代号:28-280 邮编:210002

地址:南京市中山东路 305 号《医学研究生学报》编辑部

电话:(025)80860347 传真:(025)84805383

网址: <http://JL.YB.chinajournal.net.cn>

E-mail: JL.YB@chinajournal.net.cn