

收能力高于 DR 组,这可能与 Na⁺ 依赖性单糖转运体 1(SGLT - 1) 和易化性单糖转运体 2(GLUT - 2) 2 种转运体蛋白在 2 组大鼠中的表达差异有关^[7]。减少食物中葡萄糖摄入或抑制葡萄糖吸收是否会减轻 DIO 组大鼠体重还有待进一步研究。

参考文献

[1] 麻微微,王舒然,蒲威明,等. 饮食诱导肥胖和肥胖抵抗大鼠胃肠动力学研究[J]. 中国公共卫生 2007 23(4): 431-432.
 [2] Jin HX, Jian D, Chen DZ. Alterations of gastrointestinal motility in obesity[J]. Obes Res 2004 12: 1723-1732.
 [3] Levin BE, Keeseey RE. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats[J]. Am J Physiol 1998, 274: R412-419.
 [4] Chandler PC, Viana JB, Oswald KD, et al. Feeding response to

melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet[J]. Physiol Behav 2005 85: 221-230.
 [5] Sfecikova Z, Hajek T, Lenhardt L, et al. Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats[J]. Physiol Res 2008 57: 467-474.
 [6] Prieto-Hontoria PL, Pérez-Matute P, Fernández-Galilea M, et al. Lipoic acid prevents body weight gain induced by a high fat diet in rats: effects on intestinal sugar transport[J]. J Physiol Biochem, 2009 65(1): 43-50.
 [7] Hyland NP, Rybicka JM, Ho W, et al. Adaptation of intestinal secretomotor function and nutrient absorption in response to diet-induced obesity [J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(6): 602-e171.

收稿日期: 2011-08-08

(解学魁编辑 张翠校对)

• 实验研究 •

Smac 联合顺铂对人肝癌细胞凋亡调控因子影响*

郭彩霞¹, 李艳博¹, 于洋¹, 于永波¹, 段军超¹, 王斌¹, 刘颖², 孙志伟^{1, 2}

摘要: 目的 研究第二线粒体源的半胱天冬酶激活物(Smac)基因联合顺铂对人肝癌细胞 SMMC-7721 中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3、caspase-9 和细胞色素 c(Cyt c)蛋白表达的影响。方法 利用脂质体介导的方法将 Smac 转入 SMMC-7721 G418 筛选后采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白印迹(western blot)法检测筛选所得 SMMC-7721/Smac 细胞中 Smac mRNA 和蛋白的表达,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法绘制细胞生长曲线;顺铂处理后采用免疫细胞化学法检测细胞中 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 蛋白的表达。结果 SMMC-7721/Smac 细胞中 Smac mRNA 和蛋白表达均明显增加,12~120 h A₄₉₀ 值为 0.28~0.70,均明显低于同一时间点的 SMMC-7721 (0.31~1.10) (P<0.05);与 SMMC-7721 比较, SMMC-7721/Smac 细胞中 caspase-3 和 Cyt c 蛋白表达均增高,累积光密度值(OD)分别从 19 939/14 924 增至 28 347/21 017 (P<0.05);顺铂作用下, SMMC-7721 和 SMMC-7721/Smac 细胞中 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 蛋白表达均增加,且后者更明显;剂量为 25 μg/mL 时, SMMC-7721/Smac 的 caspase-3、caspase-9 的 OD 分别从对照的 28 347/22 412 增至 46 696/39 728 (P<0.001)。结论 Smac 稳定过表达联合顺铂可明显增强细胞中凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 表达,从而促进细胞凋亡。

关键词: 顺铂; Smac; 凋亡; SMMC-7721; caspase; 细胞色素 c(Cyt c)

中图分类号: R 393

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)10-1315-03

Effect of Smac combined with cisplatin on expressions of apoptosis-regulated factors in hepatocellular carcinoma cells

GUO Cai-xia^{*}, LI Yan-bo, YU Yang, et al.^{*} School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To study effects of the cotreatment of second mitochondria-derived activator caspase(Smac) and cisplatin on the expressions of caspase-3, caspase-9, and cytochrome c(Cyt c) in hepatocellular carcinoma cells(SMMC-7721). **Methods** SMMC-7721 cells were transfected with Smac by lipofectamine-mediated method and then screened by G418. Smac mRNA and protein expressions in SMMC-7721/Smac cells acquired by G418 screen were determined by reverse transcription-PCR(RT-PCR) and western blot and its growth curve was performed by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. After cisplatin treatment, expressions of caspase-3, caspase-9 and Cyt c were evaluated by western blot. **Results** Expressions of both Smac mRNA and its protein in SMMC-7721/Smac cells increased significantly and its A₄₉₀ value was significantly lower than that of SMMC-7721 cells in the same time-point (P<0.05, P<0.001). Protein expression detection showed that expressions of caspase-3 and Cyt c increased in SMMC-7721/Smac cells compared with that of SMMC-7721 cells from 19 939 to

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30700672)

作者单位: 1. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院,北京 100069; 2. 吉林大学公共卫生学院

作者简介: 郭彩霞(1981-),女,山西平遥人,讲师,博士,研究方向:肿瘤治疗和毒理学安全性评价。

通讯作者: 孙志伟, E-mail: zwsun@ccmu.edu.cn; 李艳博, E-mail: ybli@ccmu.edu.cn

28 347 and 14 924 to 21 017, respectively ($P < 0.05$, $P < 0.001$, with F values of 12.588 and 23.811). Cisplatin treatment increased expressions of caspase-3, caspase-9 and Cyt c in both SMMC-7721 and SMMC-7721/Smac cells, especially in Smac cells. After the treatment of 25 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, expressions of caspase-3 and caspase-9 increased from 28 347 to 46 696 and 22 412 to 39 728, respectively ($P < 0.001$, F with values of 12.588 and 12.180). **Conclusion** Cotreatment of stable Smac over-expression and cisplatin could increase cellular expressions of caspase-3, caspase-9 and Cyt c, which could promote cell apoptosis.

Key words: cadmium chloride; Smac; apoptosis; SMMC-7721; caspase; cytochrome C

顺铂是临床常用的抗癌药物,但毒副作用较为严重,且对某些肿瘤细胞活性较低或耐药^[1-2]。近年来,为减少毒副作用、提高药物疗效,将顺铂与其他药物、基因、放射线等联合进行肿瘤治疗已成为研究热点,并取得了一定进展^[3-4]。有研究发现,顺铂与第二线粒体源的半胱天冬酶激活物(second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)联合可提高人肝癌细胞 SMMC-7721 对顺铂的敏感性,可更好抑制癌细胞增殖,促进细胞凋亡^[5]。为进一步探讨 Smac 联合顺铂促细胞凋亡的相关机制并以为 Smac 为基础的肿瘤基因治疗和肝癌临床治疗效果的改善提供科学依据,本研究构建稳定过表达 Smac 的细胞株 SMMC-7721/Smac,检测联合顺铂后细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase-3、caspase-9)和细胞色素 c (cytochrome c, Cyt c) 的表达情况。

1 材料与方法

1.1 质粒 重组质粒 pcDNA3.1⁺-hSmac(吉林大学卫生毒理学教研室构建^[6])。

1.2 主要试剂与仪器 顺铂(cisplatin, CDDP)(锦州九泰制药有限公司);脂质体 lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清和新霉素 G418(美国 Gibco 公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Smac、caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 兔多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);RNA 提取试剂盒、逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(上海 Sangon 公司);SP 免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司);实验所用其他化学试剂均为国产分析纯。RKI-4002 CO₂ 细胞培养箱(日本 SIKAKOGYO 公司);超净工作台(江苏净化设备厂);低温高速离心机(日本 TOMY 公司);分光光度计(美国 Beckman 公司);紫外凝胶检测和成像系统、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);DYY-III31A 水平电泳槽(北京六一仪器厂);TC-1 PCR 扩增仪(美国 Perkin-Elmer 公司)。

1.3 细胞培养 人肝癌细胞 SMMC-7721(吉林省肿瘤医院)在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,37℃,5% CO₂ 和 100% 饱和湿度条件下培养,每

2~3 d 传代 1 次。

1.4 基因转染及筛选 采用脂质体介导的方法将重组质粒 pcDNA3.1⁺-hSmac 转染入 SMMC-7721,具体操作按 lipofectamine 2000 说明书进行。转染后 48~72 h,待细胞生长接近融合时按 1:3 密度传代,继续培养至细胞密度达 50%~70% 融合,更换浓度为 400 $\mu\text{g/ml}$ 的 G418 培养液进行筛选,3 周后挑选阳性克隆并扩大培养。同时设未转染细胞为对照组。将筛选得到的稳定过表达 Smac 的肿瘤细胞株,命名为 SMMC-7721/Smac。

1.5 SMMC-7721/Smac 中 Smac 表达检测 分别采用 RT-PCR 和蛋白印迹(Western blot)法检测细胞株中 Smac mRNA 和蛋白的表达,具体操作步骤参见文献[6]。

1.6 细胞生长曲线测定 四甲基偶氮噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法进行细胞生长曲线的测定,操作步骤参见文献[5]。

1.7 免疫细胞化学测定蛋白表达 细胞于 24 孔板中爬片,每孔 1×10^5 个细胞,5 复孔。分别给予低剂量(15 $\mu\text{g/ml}$)、高剂量(25 $\mu\text{g/ml}$) CDDP,对照组不染毒,仅加入 1 mL 无血清的 RPMI 1640 培养液。作用 24 h 后,磷酸盐缓冲液洗 3 次,每孔加入固定液 1 mL,15 min;然后按照 SP 试剂盒说明书进行操作。阳性细胞胞浆(或胞膜)呈棕黄色染色,在显微镜下至少随机选取 5 个不同视野拍照,用 Image pro plus 软件测量累积光密度值(integrated optical density, IOD)取平均值。

1.8 统计分析 应用 SPSS 14.0 软件进行两样本 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 稳定过表达 Smac 基因细胞株中 Smac 表达检测(图 1) RT-PCR 结果表明,SMMC-7721/Smac 细胞中 Smac mRNA 表达明显增加,经灰度分析得出 Smac/ β -actin 比值在 SMMC-7721 细胞中为 0.40,而在 SMMC-7721/Smac 细胞中为 1.00。Western blot 结果表明,SMMC-7721/Smac 细胞中 Smac 蛋白表达也明显增加,灰度分析结果显示 Smac/GAPDH 比值在 SMMC-7721 细胞中为 0.83,而在 SMMC-7721/Smac 细胞中为 1.67。

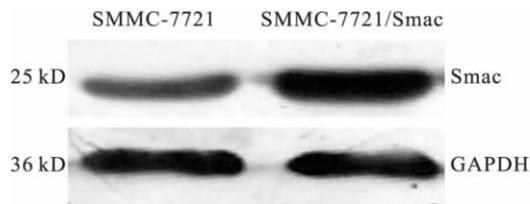


图 1 SMMC-7721 和 SMMC-7721/Smac 细胞中 Smac 蛋白的表达

2.2 SMMC-7721/Smac 细胞生长特性 已建立的 Smac 稳定转染细胞株 SMMC-7721 生长状态良好,但发现生长速度慢于 SMMC-7721 细胞。MTT 法检测结果显示,12、24、36、48、72、96 和 120 h 的 SMMC-7721 A_{490} /SMMC-7721/Smac A_{490} 值分别为:

表 1 SMMC-7721 和 SMMC-7721/Smac 细胞中 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	caspase-3		caspase-9		Cyt c	
		SMMC-7721	SMMC-7721/Smac	SMMC-7721	SMMC-7721/Smac	SMMC-7721	SMMC-7721/Smac
对照组	0	19 939 \pm 2 558	28 347 \pm 2 923 ^d	23 656 \pm 3 283	22 412 \pm 1 259	14 924 \pm 939	21 017 \pm 1 591 ^f
低剂量组	15	20 969 \pm 1 098	36 314 \pm 5 072 ^f	34 361 \pm 2 563 ^b	38 707 \pm 4 298 ^e	18 047 \pm 1 310 ^a	26 453 \pm 2 043 ^{ef}
高剂量组	25	24 458 \pm 3 147	46 696 \pm 9 037 ^{ef}	31 046 \pm 6 324 ^c	39 728 \pm 761 ^{ee}	21 440 \pm 1 195 ^e	27 702 \pm 1 414 ^{ef}

注:与对照组比较 a $P < 0.05$ b $P < 0.01$ c $P < 0.001$;与 SMMC-7721 比较 d $P < 0.05$ e $P < 0.01$ f $P < 0.001$ 。

3 讨论

Smac 是一种线粒体促凋亡蛋白^[7-8],在肿瘤中低表达,与肿瘤化疗抵抗有关^[9]。对正常细胞 Smac 无凋亡诱导作用,但过表达能增强肿瘤对放疗和 TRAIL 等的敏感性,促进凋亡。本研究结果表明,SMMC-7721/Smac 细胞中 Smac mRNA 和蛋白表达均明显增加,说明 Smac 基因已稳定插入细胞染色体中。稳定过表达 Smac 的人肝癌细胞株 SMMC-7721/Smac 的建立为后续研究奠定基础。虽形态上与 SMMC-7721 无明显差异,但 SMMC-7721/Smac 增殖速度较慢,可能与 Smac 蛋白的表达加重细胞负荷有关。

线粒体是顺铂的重要靶点^[10-11]。本研究选取与线粒体凋亡途径和 Smac 密切相关的凋亡调控因子 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c,结果表明,与 SMMC-7721 比较,SMMC-7721/Smac 细胞中 caspase-3 和 Cyt c 表达增加;顺铂处理后,二者中 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 表达均增加,尤以 SMMC-7721/Smac 明显。caspase-3 表达增加可能原因是:过表达的 Smac 结合并解除肿瘤细胞中高表达的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins,IAPs),从而释放 caspase-3。有研究发现,顺铂通过促进 Smac 转录和翻译,提高其表达水平,从而诱导凋亡^[12]。顺铂可促进 SMMC-7721 细胞中 caspase-9 和 Cyt c 的表达;对于 SMMC-7721/Smac,顺铂可能通过损坏线粒体,改变线粒体膜通透性和膜电位,促进更多的 Smac 基因从线粒体释放到胞质中,进而胞浆 Smac 结合

0.31/0.28、0.32/0.28、0.40/0.32、0.49/0.39、0.72/0.45、1.02/0.57、1.10/0.70。相同时间点的 SMMC-7721/Smac 细胞 A_{490} 值均明显低于 SMMC-7721 细胞,差异均有统计学意义($t = 2.966、4.011、7.510、2.406、5.789、11.859、13.178$ $P < 0.05$)。

2.3 稳定 Smac 基因过表达联合顺铂对肝癌细胞凋亡相关因子影响(表 1) 与 SMMC-7721 细胞比较,SMMC-7721/Smac 细胞中 caspase-3 和 Cyt c 蛋白表达水平均增加;顺铂处理后细胞中 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 蛋白表达均增加;与 SMMC-7721 细胞比较,SMMC-7721/Smac 细胞中 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 蛋白的表达均明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

并解除 IAPs 对 caspase-3 和 caspase-9 的抑制,促进 caspase-9 活化,继而活化 caspase-3,最终触发凋亡。综上所述,本研究结果表明,Smac 增强顺铂的抗肿瘤作用机制与增加细胞内 caspase-3、caspase-9 和 Cyt c 的表达有关。

参考文献

- [1] 高丽萍,马润宇,周俊波.顺铂诱导肾性贫血大鼠模型的建立[J].中国公共卫生,2006,22(4):459-460.
- [2] 卢永科,川岛明,掘井郁夫,等.顺铂对大鼠肝细胞毒性及谷胱甘肽的保护作用[J].中国公共卫生,2004,20(4):440-441.
- [3] Xu SP,Sun GP,Shen YX,et al.Synergistic effect of combining paenonol and cisplatin on apoptotic induction of human hepatoma cell lines[J].Acta Pharmacol Sin,2007,28(6):869-878.
- [4] Wang R,Zhang XW,Wang GQ,et al.Systemic inhibition of tumor growth by soluble Flk-1 gene therapy combined with cisplatin[J].Cancer Gene Ther,2006,13(10):940-947.
- [5] 郭彩霞,李艳博,杜海英,等.Smac 基因过表达联合顺铂对 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响[J].中华肝脏病杂志,2008,16(9):674-677.
- [6] 郭彩霞,李艳博,刘晓梅,等.全长型 Smac 基因真核表达载体构建及表达[J].中国公共卫生,2008,24(11):1328-1330.
- [7] Du C,Fang M,Li Y,et al.Smac a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J].Cell,2000,102(1):33-42.
- [8] Verhagen AM,Ekert PG,Pakusch M,et al.Identification of DIABLO,a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J].Cell,2000,102(1):43-53.
- [9] Tirrò E,Consoli ML,Massimino M,et al.Altered expression of c-IAP1 survivin and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells[J].Cancer Res,2006,66(8):4263-4272.
- [10] Cullen KJ,Yang Z,Schumaker L,et al.Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer[J].J Bioenerg Biomembr,2007,39(1):43-50.
- [11] 周志刚,喻爱喜,祝少博,等.顺铂诱导骨肉瘤 HOS-8603 细胞凋亡并降低其线粒体跨膜电位[J].现代肿瘤医学,2005,13(3):301-303.
- [12] 成先东,蔡绍曦,赵海金,等.Smac 在顺铂促非小细胞肺癌细胞凋亡中的作用[J].南方医科大学学报,2008,28(3):389-391.