

• 论 著 •

BH3 诱导肺癌 H1299 细胞凋亡的试验研究

李忠新, 曾学辉

(广州中医药大学附属深圳市中医院检验科, 广东深圳 518033)

摘 要:目的 研究肽 BH3 抗人非小细胞肺癌细胞株 H1299 的作用, 并探讨其作用机制。方法 体外培养 H1299 细胞, 取 10 μ M、100 μ M 和 1 000 μ M 浓度的 BH3 作用于 H1299 细胞, 72 h 后, 用 RT-PCR 检测 Bcl-2、Capase 3 和 Bcl-xL 的表达变化、测定 Capase 3 和 Capase 9 的活性并观察体内外细胞生长的抑制情况。结果 RT-PCR 结果显示, 不同浓度的 BH3 作用后, Bcl-2、Capase 3 和 Bcl-xL 的表达表现出相应变化, Capase 3 和 9 的活性也有增高的趋势。BH3 对细胞有明显的抑制作用, 24 h 后, 抑制率分别为 2.34%、17.5%、24.46%; 48 h 后, 抑制率分别为 8.72%、20.33%、45.17%; 72 h 后, 抑制率分别为 13.11%、38.90%、50.24%。BH3(10 μ M、100 μ M 和 1 000 μ M) 对裸鼠移植性非小细胞肺癌细胞株 H1299 也有抑制作用, 3 个剂量组的抑瘤率分别为 43.85%、54.92% 和 59.02%。结论 肽 BH3 有促进 H1299 细胞凋亡的作用。降低高表达的 Bcl-2 和 Bcl-xL 基因, 升高 Capase 3 基因, 可能是 BH3 抗人非小细胞肺癌的机制之一。

关键词: BH3; H1299 细胞; 非小细胞肺癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0541-02

Apoptosis induced by BH3 in H1299 cells

Li Zhongxin, Zeng Xuehui

(Shenzhen Hospital Affiliated to Guangzhou Traditonal Chinese Mecical University, Shenzhen Guangdong 518033, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of BH3 on human NSCLC ce11 lines H1299 and its mechanisms. **Methods** The expression of apoptosis associated genes Bcl-2, Capase 3 and Bcl-xL were observed by RT-PCR. ; The direct measurements of caspase 3 and 9 activity were made using colorimetric protease assay kits; MTT assay and weighing the tumor were applied to confirm the inhibition effect. **Results** Analysis of gene expression showed that BH3 induced caspase-dependent signaling pathways of apoptosis and inhibited Bcl-2 and Bcl-xL gene. Direct measurement of caspase activity showed that the degree of activation of caspase by BH3 was significantly higher when compared with control group. After treatment with BH3 (10 μ M, 100 μ M and 1000 μ M), inhibitory effect on the transplanted H1299 was observed. The IR was 43.85% , 54.92% % and 59.02% , respectively. **Conclusion** BH3 can inhibit the growth of human NSCLC ce11 lines H1299. . Inhibiting the excessive expression of bcl-2 gene , Bcl-xL gene and facilitating the expression of caspase 3 to promote apoptosis may be one of anti-tumor mechanisms for BH3 in H1299.

Key words: BH3; H1299 cell line; NSCLC

凋亡是细胞清除的主要生理机制。细胞凋亡过程的失调可以引发诸如肿瘤等许多严重的相关疾病。Bcl-2 家族蛋白是该系统的关键调控子^[1], 其特征性的由 4 种同源结构域(BH1、BH2、BH3、BH4)构成, 是 Bcl-2 家族蛋白发挥作用的关键组分。有报道显示: Bcl-2 家族蛋白中促凋亡的 BH3 结构域可以诱导凋亡的发生^[2]。因为肿瘤的发生, 从某种意义上讲, 是由于细胞凋亡的异常, 所以本研究使用 H1299 细胞为体内外模型, 观察凋亡结构域 BH3 的抑制效应, 并对其作用机制加以阐述。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂 人非小细胞肺癌细胞株 H1299 为本室保存; 胎牛血清(FCS)和 RPMI1640 培养基(Hyclone); Access RT-PCR System (Promega); 引物(上海生工); colorimetric protease assay kits(PanVera); Balb/c 裸小鼠, 4~6 周龄(第四军医大学实验动物中心)。

1.2 细胞培养 将人非小细胞肺癌细胞株 H1299 在含 10% 小牛血清、100 U/mL 青、链霉素的 RPMI 1640 培养液内, 于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下培养。

1.3 RT-PCR 检测 Trizol 试剂一步法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定纯度和浓度。取 2 μ g 总 RNA, 经逆转录 PCR 扩增各处理组中 Bcl-2、Capase 3、Bcl-xL, 同时扩增 β -actin 作内对照。Bcl-2 引物序列为 5'-GGA TTG TGG CCT TCT TTG

AG-3'(正义), 5'-CCA AAC TGA GCA GAG TCT TC-3'(反义); Capase 3 引物序列为 5'-TGG AAT TGA TGC GTG ATG TT-3'(正义), 5'-GGC AGG CCT GAA TAA TGA AA-3'(反义); Bcl-xL 引物序列为 5'-ATG AAC TCT TCC GGG ATG G-3'(正义), 5'-TGG ATC CAA GGC TCT AGG TG-3'(反义)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 10 min 共 35 个循环。 β -actin 引物序列为 5'-TTG CCG ACA GGA TGC AGA A-3'(正义), 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'(反义)。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 用 FR200 图像分析仪对 DNA 电泳条带进行分析, 测定各条带的灰度值。本试验重复 3 次。

1.4 Caspase 活性测定 用 10、100 和 1 000 μ mol/L 的 BH3 与 H1299 细胞共孵育, 72 h 后, 用 Caspase 活性检测试剂盒, 按试剂盒操作说明检测各处理组 Caspase 3 和 Caspase 9 的活性^[3]。

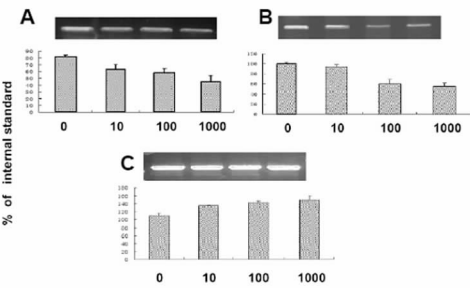
1.5 体外抑瘤试验 RPMI 1640 的细胞培养基制成细胞悬液(1×10^5 /mL), 加入 96 孔板, 200 μ L/孔, 试验组分别加入不同浓度 BH3, 使其终浓度为 10、100 和 1 000 μ mol/L。分别培养 24、48 和 72 h, 吸去培养基, 换无血清 PRMI 1640 培养基, 加入二甲苯偶氮唑盐 20 μ L, 培养 6 h 吸去培养基, 加入二甲苯亚砷 200 μ L 上机。波长 570 nm 测吸光值(A)。细胞抑制率 = (1 - 试验组平均 A 值/对照组平均 A 值) $\times$ 100%。

1.6 体内抑瘤试验 取对数生长期的 H1299,胰酶消化,以 PBS 混匀成细胞悬液,调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$,每只裸鼠于右前肢皮下接种 0.2 mL。接种 24 h 后将裸鼠随机分为 4 组:10 $\mu\text{mol/L}$ BH3 处理组、100 $\mu\text{mol/L}$ BH3 处理组、1 000 $\mu\text{mol/L}$ BH3 处理组及对照组,每组 8 只,组间平均体重差不超过 1 g。依据公式:肿瘤肿瘤变化=(对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$,计算抑瘤率。

1.7 统计学处理 使用 SPSS10.0 统计分析软件对结果进行统计分析。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用完全随机设计资料的方差分析。

2 结 果

2.1 RT-PCR 结果 图像扫描分析结果显示,与对照组 H1299 细胞相比,各不同浓度 BH3 处理组 Bcl-2 和 Bcl-xL 基因表达水平明显下调,而 Capase 3 基因的表达有上升趋势,且均有浓度依赖性。BH3(0、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理后,与内参 $\beta\text{-actin}$ 的比值分别为,Bcl-2 基因:80 $\pm 1.23\%$ 、65 $\pm 4.19\%$ 、62 $\pm 3.88\%$ 、49 $\pm 6.74\%$;Bcl-xL 基因:98 $\pm 1.92\%$ 、92 $\pm 2.00\%$ 、60 $\pm 3.49\%$ 、57 $\pm 2.84\%$;Capase 3 基因:113 $\pm 2.10\%$ 、137 $\pm 0.49\%$ 、140 $\pm 1.55\%$ 、148 $\pm 3.32\%$,各处理组与不经处理的对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1)。



A: Bcl-2; B: Bcl-xL; C: Capase 3
图 1 RT-PCR 检测凋亡相关基因的表达

2.2 Caspase 活性检测结果 随着 BH3 浓度的增加,各处理组 Caspase 3 和 Caspase 9 的活性增高,并有浓度依赖性。BH3(0、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理后,Capase 9 的 relative unit 分别为:1、2.8、4、6.5;Caspase 3 的 relative unit 分别为:1、1.8、3.2、5.0,各处理组与不经处理的对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 2)。

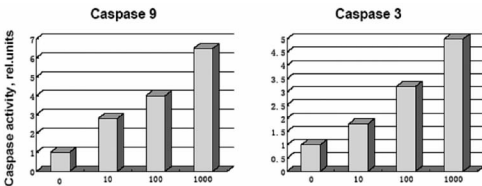


图 2 各处理组 Caspase 9 和 Caspase 3 的活性分析

2.3 BH3 对 H1299 细胞的抑制结果 10 $\mu\text{mol/L}$ BH3 作用 24、48、72 h 后,抑制率分别为 2.34%、8.72%、13.11%;100 $\mu\text{mol/L}$ BH3 作用 24、48、72 h 后,抑制率分别为 17.50%、20.33%、38.90%;1 000 $\mu\text{mol/L}$ BH3 作用 24、48、72 h 后,抑制率分别为 24.46%、45.17%、50.24%。对照组 H1299 细胞生长良好,经 BH3 作用后的 H1299 细胞,随着浓度(10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、1 000 $\mu\text{mol/L}$)逐渐增高,作用时间(24、48、72 h)的不断延长,H1299 细胞的生长抑制程度增强(图 3)。

3.4 BH3 对 H1299 荷瘤裸鼠的抑瘤率 各组裸鼠在接种后

5~7 d 内均出现可触及的瘤结节,并呈进行性增大,BH3 各个剂量对肿瘤均有显著的抑制作用,并呈一定的量效关系,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

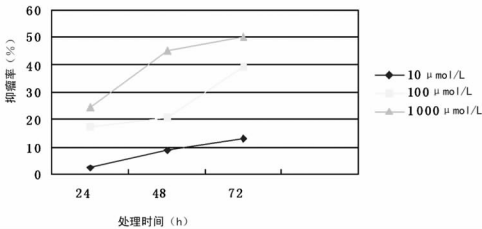


图 3 不同浓度的 BH3 对 H1299 细胞的生长抑制作用

表 4 不同浓度 BH3 对 H1299 荷瘤裸鼠抑瘤率的比较

分组	剂量($\mu\text{mol/L}$)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
对照组	0	2.44 $\pm$ 0.15	—
处理组	10	1.37 $\pm$ 0.54 *	43.85
	100	1.10 $\pm$ 0.25 *	54.92
	1 000	1.00 $\pm$ 0.23 *	59.02

与对照组相比, $P < 0.01$.*:与对照组比较, $P < 0.05$;—:无数据。

3 讨 论

细胞过度增殖及通过抑制凋亡促进肿瘤细胞存活被认为是肿瘤发生、发展的关键^[4]。多种化疗药物均可引起肿瘤细胞凋亡^[5]。通过诱导细胞凋亡治疗肿瘤是目前肿瘤治疗的一个热点。但化疗药物本身具有局限性,一是它的不良反应,二是它在发挥治疗作用的同时,却激活了细胞抗凋亡的防御。化疗解决不了根本问题,化疗的结果是人类肿瘤对化疗产生抗性,而凋亡的缺陷是其机制之一^[6]。

BCL-2 家族是一类十分重要的凋亡调节蛋白,按其功能的不同,分为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白两大类^[7-9]。抗凋亡蛋白包括^[10-12] bcl-2、bcl-xl、mcl-1、Al、Bagl、ced-9、bfl-1、Mbcl-x、BHRF1、LMW5-HL、CrmA、NR-13 等;促凋亡蛋白包括 bax、bcl-xs、bak、bad、ced-3、ced-4 等。每种 Bcl-2 家族分子在结构上具有相似性,至少含 4 种同源结构域(BH1~4)中的 1 种,其中 BH4 是抗凋亡蛋白所特有的结构域,BH3 是与促进凋亡有关的结构域。BH3 肽的促凋亡作用已经得到了广泛的证实,许多文献报道^[13-15];BH3 肽能抑制 BCL-2 蛋白家族抗凋亡成员的活性。

在本研究中,用 10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 BH3 处理 H1299 细胞,RT-PCR 结果显示 Bcl-2 和 Bcl-xL 基因表达水平明显下调,而 Capase 3 基因的表达有上升趋势,均有浓度依赖性。

Caspase 活性检测结果表明,随着处理组 BH3 浓度的增加,各组 Caspase 3 和 Caspase 9 的活性增高,也呈现出浓度依赖性。提示 BH3 促 H1299 细胞凋亡的作用,可能是通过降低高表达的 Bcl-2 和 Bcl-xL 基因,升高 Capase 3 基因来实现的,可能是 BH3 抗人非小细胞肺癌的机制之一。观察体内外细胞生长的抑制情况,本研究显示 BH3 有抑制 H1299 细胞增殖的作用,促进了细胞的凋亡。Caspase 3、Caspase 9、Bcl-2 和 Bcl-xL 可能是 BH3 诱导肿瘤凋亡的机制之一,对于其他机制及其对其他肿瘤细胞的抗肿瘤活性需进一步研究。

参考文献

[1] 宋旭红.细胞凋亡与抗肿瘤[J].新疆医科大学学报,2003,26(4): 409-411.
[2] 周长辉,关方霞,常建辉,等.PUMA 作为细胞保(下转第 584 页)

危型 HPV 长期反复感染是子宫颈癌发生的必要因素。子宫颈癌成为在肿瘤发生研究中唯一一个机理明确的肿瘤。这一突破不仅为肿瘤发生的机理指出了新的方向,更为子宫颈癌最终有效的预防提供了可能。HPV 作为宫颈癌的主要病因的发现揭示了其感染性疾病的本质,这对预防和治疗都产生了巨大的影响^[3]。

HPV 的基因型分布存在明显的地区差异,但全世界范围内共同的最常见感染基因型为 HPV16 型,在国际癌症研究协会(International Agency for Research on Cancer,IARC)最新报道的包括全球 25 个国家的 3607 例宫颈癌患者中 HPV16 在所有 HPV 阳性的宫颈癌者中的平均感染率为 57.4%^[4]。由 IARC 最新公布的 15 种最常见的基因型依次为(递减) 16,18,45,31,33,52,58,35,59,56,39,51,73,68,66。除 HPV16 型外,HPV18 感染居第 2 位,HPV45 在非洲、欧洲、南亚及北美居第 3 位,但在南美洲居第 3 位的是 HPV31^[5],在亚洲国家 HPV52 和 HPV58 感染更常见,日本 HPV52 型居第 2 位,在上海有 42.5%的宫颈癌标本存在 HPV52,58 感染,在台湾除 HPV16,18 外,HPV31,33,35 的感染率较高^[6]。国内研究结果表明,中国南方长江中下游地区 HPV58 和 HPV59 感染明显高于北方,在湖南省和广州市,HPV58 和 HPV59 仅次于 HPV16,18 并列位居第 3 常见型,而且湖南地区的 HPV58 阳性率明显高于广州^[7]。这些结果均说明 HPV 基因型感染存在着地区差异。我们的研究结果:检测出 HPV23 种基因型中的 19 种,其感染频度由高到低依次为 HPV52,16,58,33,56,31,68,43,11,18,42,35,51,6,39,53,59,66,83。HPV52 及 HPV58 居第 1 位和第 3 位,HPV16 居第 2 位,但 HPV16 在 CIN3 及鳞癌中仍是感染的主要基因型,说明 HPV16 的致癌性最强,临床上在制定治疗方案时应特别注意。研究结果与文献报道有一致性,但也反映出有地区差异。

HPV 的多重感染是否促进宫颈癌的发生在目前还存在争议,有学者认为多重感染促进宫颈癌的发生,并使治疗棘手^[8]。在我们的研究中,双重或多重感染在宫颈病变各级别中均占有相当高的比例也说明多重感染的问题值得进一步研究。HPV16 型感染参与了宫颈各级别病变中的多重感染,因而联合感染中不同基因型对宫颈疾病发展的作用也值得思考。

HPV 感染是子宫颈癌发生的病因,凡是有 HPV 高危型感染的女性患宫颈癌的可能性是未感染者的 250 倍。直接病因的检测是真正意义上的子宫颈癌早期筛查和早期预防。HPV 高危型的早期筛查可以高度浓缩宫颈癌高危人群。有

性活动的女性患宫颈炎的机率很大。几乎所有类型的炎症刺激(感染因素,内分泌因素等)均可导致宫颈上皮细胞一定程度的形态学改变,但只有 HPV 感染导致的细胞形态学改变才有真正意义上的肿瘤发生的可能。同时 HPV 感染的一定阶段并不引起明显的细胞形态学改变,但其致癌因子对感染细胞的肿瘤诱导却是客观存在的。HPV 分型检测为客观检测方法,特异性,重复性等较好,可以有效地指导医生临床诊治。HPV 的检测有助于对液基细胞学阴性,ASCUS 和 LSIL 的结果再分类。对大部分 ASCUS 和 LSIL 患者来说,如 HPV 检测阴性,其细胞学转阴的机率大为增加,通常无需进行临床干预,仅定期复查即可。如果 HPV 持续阳性(排除新感染),其肿瘤发生的机率大为增加,并提示治疗无效或干预后不彻底。了解宫颈疾病中 HPV 高危型基因型的分布,对宫颈疾病的预后判断,治疗效果检测以及 HPV 疫苗的研制等方面具有重要价值。

参考文献

[1] Bosch FX,Lorincz A,Munoz N,et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol,2002,55(4):244.
[2] Palefsky JM, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,1995,4(4):415-428.
[3] 郎景和. 迎接子宫颈癌预防的全球挑战与机遇[J]. 中华妇产科杂志,2002,37(8):129-131.
[4] Munoz N,Bosch FX,Castellsague X,et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen[J]. Int J Cancer,2004,111(12):278-285.
[5] Munoz N,Bosch FX,de Sanjose S,et al. Epidemiologic classification of human papilloma virus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med,2003,348(6):518-527.
[6] 陶萍萍,卞美璐. 女性生殖道人乳头状瘤病毒基因型研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2005,21(8):507-508.
[7] 郎景和. 妇科学新进展(子宫颈病变的防治)[M]. 北京:中华医学电子音像出版社,2005:34-41.
[8] Bechtiry B,Obermair A,Dreier B,et al. Impact of multiple HPV DNA infection on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for cervical cancer[J]. Int J Cancer,2002,102(3):237-243

(收稿日期:2010-05-10)

(上接第 542 页)

护和肿瘤治疗靶点的研究进展[J]. 生命科学,2010,22(6):556-560.
[3] 顾孔珍,王晓春. Caspase 活性测定与 siRNA 对宫颈癌 CaSki 细胞凋亡的影响[J]. 实用预防医学,2008,15(4):975-976.
[4] Litvak DA, Bilchik AF, Cabot MC. Modulators of ceramide metabolism sensitize colorectal cancer cells to chemotherapy: A novel treatment strategy[J]. J Gastrointest Surg,2003,7(12):140-148.
[5] 孙国平,沈玉先,张玲玲,等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. 中国药理学通报,2003,19(8):160-162.
[6] Dharap SS,Qiu B,Williams GC. Molecular targeting of drug delivery systems to ovarian cancer by BH3 and LHRH peptides[J]. Journal of Controlled Release,2003,91(10):61-73.
[7] Liu JW,Chandra D,Tang SH,et al. Identification and characterization of Bimgamma,a novel proapoptotic BH3-only splice variant of Bim[J]. Cancer Res,2002,62(10):2976-2981.
[8] Petros AM,ET Olejniczak,SW Fesik. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins[J]. Biochim Biophys Acta,2004,1644(2-3):83-94.

[9] Lutz R. J. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins[J]. Biochem Soc Trans,2000,28(2):51-56.
[10] 张宇雯,刘兴汉. 唯 BH3 域蛋白与细胞凋亡[J]. 医学分子生物学杂志,2007,4(2):143-146.
[11] 卫菊,王椿. 从 BCL-2 凋亡抑制因子家族的调控中寻找癌症治疗的新途径[J]. 世界临床药物,2006,27(5):270-273.
[12] 覃尚忠. Bcl-2 家族蛋白质相互作用的机制和应用[J]. 中国医药生物技术,2007,2(3):218-221.
[13] 蔡应木,张俏忻,肖颖秀,等. 2-甲氧雌二醇对 HL60 白血细胞增殖和凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(11):961-963.
[14] 郭文娟,王爱英. 凋亡抑制基因 Bcl-xL 的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(25):2871-2876.
[15] 张文毅,詹辉,王剑松. 凋亡素诱导肿瘤细胞凋亡机制研究及其进展[J]. 临床泌尿外科杂志,2007,10(7):551-553.

(收稿日期:2010-08-20)