

• 论 著 •

CM 通路 AEA 对人胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响

文志华, 马超, 袁先厚, 江普查, 李志强
(武汉大学中南医院神经外科, 武汉 430071)

摘 要:目的 观察在神经酰胺(CM)通路中,大麻受体激动剂花生四烯酸乙醇胺(AEA)抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖及在诱导细胞凋亡中的作用。方法 采用噻唑蓝(MTT)法,分别测定不同浓度的 CM(5~20 $\mu\text{mol/L}$)和烟曲霉毒素(FB1)(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 后对 AEA(1~10 $\mu\text{mol/L}$)抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖作用的影响;流式细胞仪 Annexin-V/PI 双染色法定量分析 FB1(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 后对 AEA(10 $\mu\text{mol/L}$)促细胞早期凋亡作用的影响。结果 不同浓度的 AEA 对人胶质瘤 U251 细胞增殖的抑制作用不同,且与 CM 具有协同作用;10 $\mu\text{mol/L}$ FB1 预处理 24 h 后可显著对抗 AEA 对人胶质瘤 U251 细胞增殖的抑制作用;AEA(10 $\mu\text{mol/L}$)可诱导人胶质瘤 U251 细胞发生早期凋亡,而 FB1(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 后凋亡发生率明显下降。结论 AEA 可通过 CM 从头合成通路,与 CM 呈浓度依赖性协同,从而抑制人胶质瘤 U251 细胞的增殖并诱导其早期凋亡。

关键词:花生四烯酸乙醇胺; 神经酰胺; 胶质瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0046-03

The influence of CM pathway AEA in human glioma U251 cell proliferation and apoptosis

WEN Zhihua, MA Chao, YUAN Xianhou, JIANG Pucha, LI Zhiqiang

(Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: Objective To investigate the role of ceramide pathway in cell proliferation and early apoptosis induction in U251 glioma cell after cannabinoid receptor agent anandamide(AEA) treatment. **Methods** U251 glioma cells were treated with AEA(1~10 $\mu\text{mol/L}$), Ceramide(5~20 $\mu\text{mol/L}$) and fumonisins B1(FB1)(10 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment. The growth inhibition rate of U251 was investigated by MTT assay. The early events of the apoptosis were measured by flow cytometry using annexin-V/propidium iodide(PI) double staining method. **Results** Different concentrations of AEA inhibited the proliferation of human glioma U251 cells, and had synergistic effect with CM by FB1(10 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment for 24 h. After exposure to AEA(10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, U251 glioma cells could undergo the early cell apoptosis which was affected by FB1(10 $\mu\text{mol/L}$). **Conclusion** AEA through the CM de novo synthesis pathway, and CM concentration was synergistic in collaboration, thus inhibiting human glioma U251 cell proliferation and induce early apoptosis.

Key words: anandamide; ceramide; glioma; cell proliferation; apoptosis

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,呈浸润性生长。目前的各种治疗效果仍不佳,易复发,且生存率低^[1]。随着细胞生物学研究的发展,近年来,国内外有学者报道大麻素可以诱导胶质瘤细胞的凋亡,内源性大麻素-花生四烯酸乙醇胺(AEA)在诱导过程中,神经酰胺(CM)发挥了重要作用^[2]。本研究选择的 CM 是人工合成的,具有自保通透能力,烟曲霉毒素(FB1)作为工具药,探讨 AEA 对人胶质瘤 U251 细胞的增殖抑制和诱导其凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人胶质瘤 U251 细胞购自武汉大学典型培养物储藏中心;AEA、CM(产品型号 C₂-CM)及 FB1 为 Sigma 公司产品。二甲亚砜(DMSO)、DMEM 培养液和噻唑蓝(MTT)为 Gibco 公司产品;小牛灭活血清、胰蛋白酶和 96 孔板购自武汉博士德生物制品公司。Annexin/PI 双染色流式试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法 人胶质瘤 U251 细胞置于 10% 的小牛血清 DMEM 培养液,5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养。每 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代。将 10 μmol AEA 原液溶于 100 mL 不含小牛血清的 DMEM 溶液中,配成 100 $\mu\text{mol/L}$ AEA 浓缩

液;分别取 AEA 浓缩液 0.1、0.5、1.0 μmol 与 DMEM 培养液 100 mL 充分混合后配成浓度为 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 AEA DMEM 溶液;按说明书分别取 2 μmol C₂-CM 及 1 μmol FB1 粉剂,用 0.1 mL DMSO 充分溶解,制成浓缩液。试验时再用不含小牛血清的 DMEM 培养液充分混合配成浓度为 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 溶液,另取相当量 DMSO 与 DMEM 培养液混合后作为空白对照;以上药液用 0.22 μm 滤器除菌后 4 °C 备用。

1.2.1 MTT 法 分别测定不同浓度的 C₂-CM(5~20 $\mu\text{mol/L}$)和 FB1(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 后,对 AEA(1~10 $\mu\text{mol/L}$)抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖作用的影响。将对数生长长期的人胶质瘤 U251 细胞(1×10^5 个/mL)加入 4 块 96 孔板中,每孔 100 μL 。(1)其中 3 块板培养 24 h 细胞贴壁后分别单用 AEA(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)、C₂-CM(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)及合用 AEA(3 个浓度同单用)和 C₂-CM(3 个浓度同单用)处理人胶质瘤 U251 细胞 24 h;(2)以 FB1(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理另 1 块板后培养 24 h,再加入 AEA(3 个浓度同单用)作用 24 h,同时设置空白对照组。以上试验均于终止培养前 4 h 加入 MTT(5 g/L)50 μL ,再继续培养 4 h,吸去培养液,加入 DMSO 150 μL ,

充分震荡,使结晶完全溶解,用酶标仪上在 490 nm 波长测量吸光度 A 值。每次取 3 管算平均值,重复 3 次。每组样本在加人 MTT 前,用倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)观察细胞增殖情况。细胞增殖百分率=(各处理组 A 值/各对照组 A 值)×100%^[3]。药物互相作用以 Q 值评价, $Q = P_{a+b}/(P_a + P_b - P_aP_b)$, P_a 、 P_b 为 a、b 药单独效应, P_{a+b} 为 a、b 药合用效应^[4]。

1.2.2 流式细胞分析术 流式细胞仪 Annexin-V/PI 双染色法用于定量分析 10 μmol/L FB1 预处理 24 h 后对 AEA(10 μmol/L)促细胞早期凋亡作用的影响。AEA(10 μmol/L)处理人胶质瘤 U251 细胞 24 h 作为处理 A 组;FB1(10 μmol/L)预处理人胶质瘤 U251 细胞 24 h 后,再加入 AEA(10 μmol/L)作用 24 h 作为处理 B 组;同时设空白对照组。先收集处理 A、B 组与对照组培养液中的悬浮细胞于离心管中,贴壁细胞用胰蛋白酶消化后,制成单细胞悬液,并与先前收集于离心管中的悬浮细胞合并,调整细胞浓度为(5~10)×10⁵ 个/mL。取 1 mL 细胞悬液,4 ℃的 PBS 溶液洗涤并离心(1 000 r/min),10 min 沉淀细胞 3 次去上清后,加入缓冲液 200 μL,再加 Annexin V 10 μL 和 PI 10 μL,常温避光染色反应 10 min,然后加入缓冲液 300 μL,上流式细胞仪(美国 BD 公司产品,由武汉大学结构生物研究中心提供),在 1 h 内检测完毕,重复 3 次,Expo32 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析与处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验,不同浓度 FB1 处理组与单用 AEA 组的比较采用配对 *t* 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 AEA 与 C₂-CM 对抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖的影响 MTT法表明 AEA(1~10 μmol/L)与 C₂-CM(5~20 μmol/L)对人胶质瘤 U251 细胞的增殖均呈浓度依赖性抑制作用,见表 1;且两者具有协同效应(平均 $Q = 1.01$),当 AEA 为 5 μmol/L,C₂-CM 为 10 μmol/L 时,两者合用能明显增强对人胶质瘤 U251 细胞增殖的抑制作用($Q = 1.16$)。见表 2。

表 1 AEA 与 C ₂ -CM 合用对人胶质瘤 U251 细胞增殖百分率的影响($\bar{x} \pm s$,%)				
AEA (μmol/L)	C ₂ -CM(μmol/L)			
	0	5	10	20
0	—	48.3±2.4	28.3±3.5	19.7±1.1
1	91.8±1.2	36.6±2.8	22.7±1.7	16.9±1.0
5	52.1±2.0	26.0±1.5 ^a	19.5±3.2 ^a	14.8±1.6
10	36.6±2.4	22.8±2.7 ^a	15.6±1.4 ^a	14.3±2.9

注:AEA 和 C₂-CM(5、10 μmol/L)合用组与单用 AEA 组比较,^a $P < 0.05$;—为此项无数据。

2.2 FB1 对 AEA 抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖的影响 单用 FB1 对人胶质瘤 U251 细胞的增殖无明显影响。但 FB1(10 μmol/L)预处理 24 h 后,可明显减弱 AEA(1、5、10 μmol/L)对人胶质瘤 U251 细胞增殖的抑制作用,提示 FB1 能拮抗 AEA 抗人胶质瘤 U251 胶质瘤细胞增殖的作用,并且其主要是通过抑制 CM 合成酶来抑制胞内 CM 的聚集而实现的。见表 3。

2.3 FB1 对 AEA 诱导人胶质瘤 U251 细胞早期凋亡作用的影响 采用 Annexin-V/PI 双染色流式细胞分析术定量分析正常细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞的百分率。研究结果发现人胶质瘤 U251 细胞自然早期凋亡率为 1.8%,AEA(10 μmol/L)处理人胶质瘤 U251 细胞 24 h 后即有早期凋亡发生,凋亡率为 21.3%,而 FB1(10 μmol/L)预处理人胶质瘤 U251 细胞 24 h 后,凋亡率降为 8.3%,且两者比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 AEA 与 C ₂ -CM 合用抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖的相互作用($\bar{x} \pm s$,μmol/L)			
AEA	C ₂ -CM		
	5	10	20
10	0.94	0.97	0.92
5	0.99	0.99	0.95
1	1.14	1.16	1.01

注: $Q < 0.85$ 为拮抗作用, Q 在 0.85~1.15 为协同作用, $Q > 1.15$ 则为增强作用^[4]。

表 3 FB1 预处理 24 h 后,AEA 对人胶质瘤 U251 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$,μmol/L)			
FB1	AEA		
	1	5	10
0	93.7±2.4	58.2±3.1	33.5±2.7
1	98.2±1.5	78.1±1.7	42.0±2.1
10	99.4±1.0 [*]	91.3±4.6 [*]	67.7±3.9 [*]

注:FB1 预处理与单用 AEA 组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨 论

胶质瘤是人体常见的神经系统恶性肿瘤,其预后随着恶性程度的升高而逐渐变差,目前治疗手段主要是手术切除及术后放、化疗。而胶质瘤大多呈浸润性生长,与正常脑组织无明显的边界,从而限制了术中对于肿瘤范围的识别和切除程度的判断。而位于重要功能区的肿瘤,则更难以做到全切。术后放、化疗的效果也不尽相同,受到肿瘤自身对放、化疗的敏感程度,患者对放、化疗的耐受程度等因素的制约^[5]。因此,从分子水平研究胶质瘤的发生和生长过程,为临床提供可能的诊断和治疗就显得尤为重要。

随着细胞生物学研究的发展,近年来,国内外有学者报道大麻素可以诱导胶质瘤细胞的凋亡。AEA 属于内源性大麻素,哺乳动物体内 AEA 主要在神经细胞内合成、释放和降解。有研究表明,内源性大麻素系统及其相关药物能在体内外实验中抑制胶质瘤的生长^[6]。

在大麻素诱导的神经变异细胞凋亡中,包含了一系列信号通路的参与。CM 被认为在中枢神经系统的细胞功能调节中起重要的作用^[2]。Wang 等^[7]学者报道 C6 胶质瘤细胞的凋亡可能与 CM 持续产生有关。在胶质瘤细胞凋亡过程中,大麻素可以激发 CM 的表达水平升高,而这一作用可以激活 Raf-1 调控的胞外信号调控蛋白激酶(ERK)级联反应。在一些情况下,ERK 可以调解许多细胞包括神经细胞的生长抑制(细胞凋亡和非凋亡性死亡)。另外 Held-Feindt 等^[8]也报道在胶质瘤

中可见内源性大麻素对生长因子诱导增殖的拮抗效应。

本实验利用 C₂-CM 和特异性神经酰胺合成酶抑制剂 FB1 作为工具药,明确了 C₂-CM 在 AEA 抗人胶质瘤 U251 增殖作用中具有协同作用,同时 FB1 能够减弱 AEA 的这些作用。本研究结果表明,CM 在 AEA 对人胶质瘤 U251 细胞作用过程中发挥了重要作用。同时,因为 FB1 阻断了胞内 CM 的聚集,因而可以认为,在 AEA 对人胶质瘤 U251 细胞作用过程中,部分是通过 CM 转导胞外应激信号,增加胞内 CM 的水平而发挥作用的。杜向一等^[9]学者的研究也支持内源性大麻素系统可通过影响信号通路来调节神经胶质瘤细胞的增殖与凋亡这一观点。

不同的大麻素已经被证实可以诱导胶质瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤和嗜铬母细胞瘤的体外培养细胞凋亡,以及体内培养的恶性胶质瘤退变^[10]。更重要的是,内源性大麻素药物既能区分肿瘤细胞和未转化的正常细胞,也能保护正常细胞免于死亡,相对于常用的细胞毒性药物,显示出很好的肿瘤选择性^[11]。有研究揭示大麻素可能是脑肿瘤的一个新药理学靶标,AEA 作为一种内源性大麻受体的配体,只要能通过对内源性大麻素转运载体和内源性大麻素水解酶的抑制作用^[12],从而提高 AEA 的组织水平,将为胶质瘤的临床治疗提供参考。随着对内源性大麻素系统抗胶质瘤作用机制的深入研究,内源性大麻素系统很可能成为胶质瘤治疗的新靶点,对于改善胶质瘤的化疗效果具有重要的临床意义。

参考文献

[1] Lu C, Shervington A. Chemoresistance in gliomas[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 312(1/2): 71-80.

[2] Goswami R, Dawson G. Does ceramide play a role in neural cell apoptosis[J]. Neurosci Res, 2000, 60: 141-149.

[3] 吴涛,袁先厚,江普查,等. 选择性环氧合酶-2 抑制剂对胶

质瘤生长的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(12): 1495-1497.

[4] Jan CR, Lu YC, Tseng LL, et al. Effect of the antidepressant desipramine on cytosolic (Ca²⁺): movement and proliferation in human osteosarcoma cells[J]. Pharmacology, 2003, 69: 190-196.

[5] 赵继宗. 神经外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 393.

[6] Parolaro D, Massi P. Cannabinoids as potential new therapy for the treatment of gliomas[J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(1): 37-49.

[7] Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009, 89(3/4): 112-119.

[8] Held-Feindt J, Drner L, Sahan G, et al. Cannabinoid receptors in human astroglial tumors[J]. J Neurochem, 2006, 98(3): 886-893.

[9] 杜向一, 闫长祥. 内源性大麻素系统与神经胶质瘤细胞增殖与凋亡的关系分析[J]. 陕西医学杂志, 2014, 43(4): 387-389.

[10] 张小林, 林志雄. 内源性大麻素系统抗胶质瘤的作用机制[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(3): 274-277.

[11] 费帆, 何永生. 脑胶质瘤分子靶向与优化治疗[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 10(2): 199-201.

[12] Nomura DK, Long JZ, Niessen S, et al. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis[J]. Cell, 2010, 140(1): 49-61.

(收稿日期: 2016-07-28 修回日期: 2016-10-18)

(上接第 45 页)

且对疗效评估、监测复发均有重要价值。

综上所述, CEA、SCC 可用于不同组织类型的肺癌鉴别, 并且两者联合具有互补性, 可提高阳性检出率, 便于肺癌早发现、早治疗, 具有推广价值。

参考文献

[1] 杜黎黎, 卢忠心, 李艳. 血清 CEA、SCC、CA125 联合检测诊断肺癌的临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(12): 930-931.

[2] 潘俊辉, 邱海山. 血清 CEA、SCC、CYFRA21-1、ProGRP 联合检测在肺癌诊断中的价值[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2014, 7(4): 40-43.

[3] 方莉萍, 邵丽佳, 朱以军. 血清 CEA、SCC、NSE 联检对诊断肺癌的临床价值[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(6): 846-847.

[4] 林称意. 肺泡灌洗液和血清中肿瘤标志物检测在肺癌诊断中的价值[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(4): 712-714.

[5] 王瑾. 四种肿瘤标志物血清水平的联合检测对肺癌诊断

的临床价值[J]. 实用心脑血管病杂志, 2011, 19(5): 753-754.

[6] 郭忠燕, 方晓慧, 申咏梅, 等. 血清多种肿瘤标志物联合检测对肺癌的诊断价值[J]. 苏州大学学报(医学版), 2011, 31(5): 789-792.

[7] 王淑春. 血清肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 肿瘤研究与临床, 2010, 22(7): 499-500.

[8] 冷平, 乔凤伶, 余蓉, 等. 4 种血清肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 成都医学院学报, 2015, 10(2): 180-181.

[9] Kim HC, Song JS, Lee JC, et al. Clinical significance of NQO1 polymorphism and expression of p53, SOD2, PARP1 in limited-stage small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6743-6751.

[10] 税莉莉. 肺癌患者血清中 CEA、CYFRA21-1、NSE、SCC 检测的临床意义[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2010, 31(6): 708-710.

(收稿日期: 2016-08-30 修回日期: 2016-11-19)