

文章编号:1005-6947(2005)07-0509-03

· 实验研究 ·

阿霉素诱导人肝癌细胞凋亡机制的研究

郑建勇¹, 李开宗², 王为忠¹, 管文贤¹, 易军³

(第四军医大学西京医院 1. 胃肠道外科 2. 肝胆外科 3. 血管外科, 陕西 西安 710032)

摘要:探讨阿霉素诱导 HCC-9204 细胞凋亡的作用机制, 及其与凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的关系。**方法** 用 TUNEL 法和流式细胞仪观察和检测阿霉素对 HCC-9204 细胞增殖周期的影响以及细胞凋亡, 并检测 HCC-9204 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平。**结果** 阿霉素能够显著诱导 HCC-9204 细胞凋亡, 染色显示有典型的凋亡特征。在药物处理 24 h 后流式细胞仪检测出显著的“亚二倍体峰”。阿霉素作用 HCC-9204 细胞后, Bcl-2 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$); 而 Bax 蛋白的表达虽有所增加, 但与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 阿霉素能诱导癌细胞凋亡, 是其发挥抗癌作用的重要机制之一, 这可能与其下调 Bcl-2 基因表达有关。

关键词: 癌, 肝细胞/病理生理学; 阿霉素/药理学; 细胞凋亡

中图分类号: R730.261; R979.14 **文献标识码:** A

A study on the mechanism of adriamycin-induced apoptosis of human hepatic carcinoma cells

ZHENG Jian-yong¹, LI Kai-zong², WANG Wei-zhong¹, GUAN Wen-xian¹, YI Jun³

(1. Department of Gastrointestinal Surgery 2. Department of Hepatobiliary Surgery 3. Department of Vascular Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of adriamycin-induced apoptosis of hepatic carcinoma HCC-9204 cells, and study the expression of apoptosis-associated genes Bcl-2 and Bax. **Methods** TUNEL method and flow cytometry were used to detect the effect of adriamycin on the multiplication cycle of human hepatic cancer ACC-9204 cells, and the cell apoptosis. The expression of Bel-2 and Bax protein in ACC-9204 cells was examined. **Results** Adriamycin markedly induced apoptosis of HCC-9204 cells, and typical characteristics of apoptosis were detected by staining. On cell cytometric analysis 24 h after drug treatment, a significant sub-G1 peak was detected. HCC-9204 cells treated with adriamycin showed significant down regulation of Bel-2 protein expression, but it was not significantly different from that of the control group ($P > 0.05$). **Conclusions** Adriamycin can induce apoptosis of cancer cells, and this is an important mechanism for its anticancer effect. This effect may be related to the down regulation of Bel-2 expression.

Key words: Carcinoma, Hepatic Cell/physiopathol; Adriamycin/pharmacol; Apoptosis

CLC number: R730.261; R979.14 **Document code:** A

细胞凋亡受基因调控, 是细胞主动参与其自身有序的生理性死亡过程。诱导细胞凋亡是化疗药物对抗肿瘤细胞的主要途径^[1,2], 其治疗效果依赖于它们诱导肿瘤细胞凋亡的能力。研究^[3]提示,

Bcl-2 基因家族存在一个复杂的调控网络来控制凋亡和肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。该家族分为两大类, 包括抗凋亡的成员如 Bcl-2, Bcl-xL 和促进凋亡的成员如 Bax, Bak。两大类能够形成异源二聚体, 并具有相互调节的功能。因此这些蛋白在细胞中的相对水平是自杀程序的“变阻器”^[4]。本文旨在观察阿霉素体外诱导 HCC-9204 细胞凋亡的规律, 并初步探讨其机制。

收稿日期:2004-07-15; 修订日期:2005-01-03。

作者简介:郑建勇(1968-), 男, 湖北襄樊人, 第四军医大学西京医院主治医师, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床方面的研究。

通讯作者:管文贤, 郑建勇 电话:13991180200(手机), 13636629829(手机); E-mail:zhengjy2000@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和用药方案

人肝癌细胞系 HCC-9204 为第四军医大学病理教研室建立并惠赠,其 p53 基因已发生突变。在含有酚红,50 mL/L 胎牛血清的 Eagle 培养液中培育。阿霉素 (ADR) 是由美国 Pharmacia & Upjohn 公司提供,作用细胞的终浓度为 20 μ mol/L。HCC-9204 细胞接触 ADR 4 h 后撤药,并继续培养 24 h 或 48 h,然后进行后续实验。

1.2 TUNEL 检测细胞凋亡

收集细胞采用 TUNEL 方法染色。采用 Boehringer Mannheim 的细胞死亡检测试剂盒 (FITC)。在室温下用含 3% 小牛血清蛋白的磷酸盐缓冲液中培育 HCC-9204 细胞 30 min,玻片覆以 TUNEL 试剂 (内含 TdT 酶, FITC-12-dUTP 和 CoCl₂ 的 1' 缓冲液), 37℃ 作用 1~2 h 后,荧光显微镜观察形态学特征。采用去掉 TdT 酶的试剂染色标本作为阴性对照。凋亡形态学标准如下: (1) 染色体及胞浆明显浓聚 (凋亡细胞)。 (2) 胞浆小体, 伴或不伴有染色体浓聚 (凋亡小体)。 (3) 染色体碎片化 (微核形成)。

1.3 流式细胞仪分析细胞周期和凋亡

收集用胰蛋白酶 - EDTA 消化的 HCC-9204 贴壁细胞, PBS 冲洗后重悬在 4℃, 70% 的乙醇中至少 1~2 h。以 1 000 r/min 离心细胞后重悬在含 100 mg/L RNA 酶和 10 mg/L 碘化丙锭的 PBS 中, 在 25℃ 暗处孵育 15 min。用 FACScalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson, USA) 进行单色荧光细胞流式计数。结果用 Multiplus software II 软件分析数据。每个样本采集 10 000 个细胞。

1.4 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的检测

收集 ADR 诱导后 HCC-9204 细胞, 重悬于 70% 乙醇溶液中, 4℃ 过夜; 加入 1:100 稀释的兔抗人 Bcl-2 抗体、兔抗人 Bax 抗体 (Santa Cruz 公司) 100 μ L, 37℃ 培育 30 min, 加 1:20 稀释的 FITC 标记的二抗 100 μ L。加入 1.0 mL PBS, 经 400 目滤网过滤, 流式细胞仪 (FACS) 测定 Bcl-2 及 Bax 阳性率及荧光强度。以未诱导的 HCC-9204 细胞为空白对照。每组设 3 个复孔。

1.5 统计学处理

采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 ADR 诱导 HCC-9204 细胞凋亡

TUNEL 阳性信号为黄绿色或黄色荧光, 位于胞核, 呈小圆形、环行或颗粒状。TUNEL 染色结果显示, 镜下可见许多典型的“出泡”所形成的细胞周围黄绿色强荧光点 (图 1)。流式细胞仪对细胞周期的分析显示 ADR 诱导后 24 h 和 48 h 能够出现显著的“亚二倍体”峰, 分别占总细胞数的 31% 和 58% (图 2)。

图 1 ADR 诱导 24 h 后 HCC-9204 细胞的凋亡改变

a: 0h

b: 24h

c: 48h

图 2 阿霉素处理后 24 h 和 48 h 后 HCC-9204 细胞的细胞周期和凋亡分析

2.2 ADR 对 HCC-9204 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

ADR 作用 HCC-9204 细胞后, Bcl-2 蛋白表达明显减少, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); 而 Bax 蛋白的表达虽有所增加, 但与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$) (附表)。

附表 HCC-9204 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 (%)

分组	例数	Bcl-2		Bax	
		阳性率	荧光强度	阳性率	荧光强度
对照	3	45.41 ± 6.18	73.85 ± 2.63	34.91 ± 3.08	71.28 ± 2.77
ADR	3	26.79 ± 3.06	67.47 ± 2.19	39.35 ± 2.87	67.39 ± 3.26
P 值		<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

肿瘤细胞对不同的化疗药物的反应性是有差异的。对这种差异性反应机制的认识将有助于设计特异性的肿瘤治疗方案。化疗药物作用于细胞凋亡的最后共同途径, 即通过激活 caspase-3, 引起 DNA 的损伤而诱导肿瘤细胞凋亡以实现抗肿瘤作用, 化疗药物的治疗效果依赖于它们诱导肿瘤细胞凋亡的能力^[5]。不管抗肿瘤药物的化学性有何不同, 绝大多数能诱导肿瘤细胞的凋亡。肿瘤细胞自身检测细胞损伤并激活凋亡反应将决定化疗最终是否成功。Brown^[6] 提出一个假说, 即无论采用何种化疗药物, 肿瘤细胞均死于凋亡; 细胞对凋亡的耐受决定细胞对化疗药物的敏感性。

凋亡受一系列基因复杂的正性和负性的调控, 其中以 p53 抑癌基因和 Bcl-2 家族的基因最为重要^[7]。p53 基因作为一种转录因子能促进 p21 和 Bax 等凋亡相关基因的表达, 从而通过直接或间接调节凋亡途径中多个关键因子调控凋亡。把功能性 p53 基因引入人白血病细胞, 能增加其对 DNA 损伤性药物表阿霉素的化疗敏感性^[8]。但大量研究表明, p53 基因并不是细胞凋亡必不可少的调控基因。已知在 HCC-9204 细胞中 p53 基因是突变的, 在其他细胞系中也常常发生突变。因此在 HCC-9204 细胞中 p53 依赖性的凋亡途径已不存在, 那么这些细胞是如何发生凋亡的? 探讨这一问题可推测由 DNA 损伤性药物诱导的肝癌细胞的凋亡很可能是非依赖 p53 的。

Bcl-2 家族是目前最受重视的调控细胞凋亡的

基因家族。凋亡因子和凋亡抑制因子的相互作用决定了细胞的命运是凋亡还是存活。这个家族的促凋亡成员包括 Bax, Bak 和 Bcl-xS, 而抗凋亡的成员包括 Bcl-2, Bcl-xL 和 Bcl-w, 这些基因都参与上述过程。当细胞接触各种凋亡性刺激后, Bcl-2 家族的蛋白通过控制细胞内膜结构中的离子和蛋白质的流动而控制细胞的生与死。而 Bax/Bcl-2 比值被认为是决定临床肿瘤细胞耐药性的重要指标之一。研究显示, 高水平的 Bcl-2 或高比例的 Bax/Bcl-2 将使肿瘤对治疗产生耐受^[9,10]。本研究表明, ADR 可通过下调 Bcl-2 的蛋白表达以诱导肝癌细胞凋亡。据此提示, 临床上可运用 Bcl-2 的反义寡核苷酸等技术阻断 Bcl-2 的表达, 以提高肿瘤的化疗敏感性; 还可以通过检测肿瘤细胞的凋亡率, 评估化疗的效果。

参考文献:

- [1] Lee S, Schmitt CA. Chemotherapy response and resistance [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(1): 90-96.
- [2] 黄文广, 李杰, 王峰, 等. 维甲酸诱导肝癌细胞株凋亡及其与 midkine 基因表达关系的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(10): 783-785.
- [3] Finnegan NM, Curtin JF, Prevost G, *et al.* Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(1): 115-121.
- [4] Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 647-656.
- [5] 杨建青, 黄柏英, 吕新生. Caspase-9 在氟尿嘧啶诱导的肝癌细胞凋亡中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(3): 173-175.
- [6] Brown JM. NCI's anticancer drug screening program may not be selecting for clinically active compounds [J]. *Oncol Res*, 1997, 9(5): 213-215.
- [7] Blagosklonny MV. Paradox of Bcl-2 (and p53): why may apoptosis-regulating proteins be irrelevant to cell death? [J]. *Bioessays*, 2001, 23(10): 947-953.
- [8] Komarova EA, Chernov MV, Franks R, *et al.* Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo [J]. *EMBO J*, 1997, 16(6): 1391-1400.
- [9] Sartorius UA, Krammer PH. Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(5): 584-592.
- [10] Parton M, Krajewski S, Smith I, *et al.* Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2100-2108.