

文章编号:1005-6947(2008)01-0034-03

· 肝肿瘤专题研究 ·

骨形成蛋白2诱导肝癌细胞凋亡及其机制

唐四元

(中南大学护理学院 基础医学教研室, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察骨形成蛋白2(BMP-2)诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的作用及机制。方法 以 ELISA 法检测 BMP-2 诱导 HepG2 细胞凋亡, 并以 Western blot 法检测 BMP-2 处理后 Bcl-2 和 Fas 抗原的表达变化。**结果** 1~100 ng/mL 浓度 BMP-2 均对 HepG2 细胞有诱导凋亡的作用, 并能下调 Bcl-2 的表达量, 同时增加 Fas 抗原的表达。**结论** BMP-2 可诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡, 其机制可能是通过 Fas 介导的途径。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1):34-36]

关键词: 肝肿瘤/病理学; 骨形成蛋白-2; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** A

Effect of BMP-2 on apoptosis of hepatoma cells and its mechanisms

TANG Siyuan

(Department of Basic Medicine, School of Nursing, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of BMP-2 on apoptosis of human hepatoma HepG2 cells and the mechanisms. **Methods** Cell apoptosis was assessed by ELISA. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Fas proteins in HepG2 cells after treatment of BMP-2. **Results** 1~100 ng/mL BMP-2 induced HepG2 cell apoptosis, and down-regulated Bcl-2 protein expression and increased Fas protein expression. **Conclusions** The present study suggests that BMP-2 induces HepG2 cell apoptosis may through Fas pathway.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1):34-36]

Key words: Liver Neoplasms/pathol; Bone Morphogenetic protein-2; Apoptosis

CLC number: R 735.7 **Document code:** A

研究表明, 肝癌癌旁组织中骨形成蛋白2 (bone morphogenetic protein-2, BMP) 的含量高于肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞^[1]; 另有研究发现 BMP-2 促进肝癌细胞系 HepG2 细胞中抑癌因子 PTEN 蛋白的表达^[2]。BMP-2 对肝癌细胞的生物学行为的作用及其机制尚不明了。笔者对 BMP-2 对 HepG2 细胞凋亡的作用及其机制进行了研究, 旨在为 HCC 临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料及细胞培养

人肝癌细胞系 HepG2 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。用 RPMI-1640 培养液 (GIBCO 公司) 培养, 其中含 10% 胎牛血清 (FBS, GIBCO 公司)、青霉素 100 U/mL 及链霉素 100 U/mL。置 37℃, 5% CO₂ 培养箱内传代培养, 隔天换液 1 次。每次传代时用 0.25% 胰酶 (含 0.02% EDTA) 溶液消化。

1.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞凋亡

HepG2 细胞培养于 6 孔板。A 组分别用 0, 1, 10, 100, 200 ng/mL BMP-2 干预细胞 48 h, 检测其剂量依赖关系; B 组用 100 ng/mL BMP-2 分别干预细胞 0, 6, 12, 24 h, 检测其时间依赖关系。

基金项目: 中国博士后科学基金资助(20070410995)

收稿日期: 2007-07-01; **修订日期:** 2007-11-23。

作者简介: 唐四元, 男, 中南大学护理学院副教授, 主要从事病理学及病理生理学方面的研究。

通讯作者: 唐四元, E-mail: tangsiyuan@yahoo.com.cn

检测步骤:(1)用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,用试剂盒中的细胞裂解液裂解,1 500 r/min离心10 min,取上清液(其中含有核小体);(2)在微量板上加入吸附组蛋白体;(3)加上清液使抗组蛋白抗体与核小体上的组蛋白结合;(4)加辣根过氧化物酶标记的抗DNA抗体使之与核小体上的DNA结合;(5)加酶的底物,测光450nm吸收值。

1.3 免疫印迹(Western blot)

参照分子克隆实验指南进行操作。用0,1,10,100 ng/mL BMP-2 干预细胞24h后裂解细胞收集蛋白。各组取50 μg 蛋白电泳,转移至硝酸纤维素膜上。封闭后分别用0.4 μg/mL 单克隆鼠抗人Bcl-2,各多克隆鼠抗人Fas抗体(Santa Cruz公司)PBS温育2 h。1:2 500 兔抗鼠辣根过氧化物酶的PBS温育1 h。化学发光增强试剂(Amersham Pharmacia公司)自显影1 min,洗片显带。所有杂交信号在BioRad-Jeldoc2000 图像分析系统进行光

密度扫描,数值以各地塞米松干预组与对照组的比值表示。

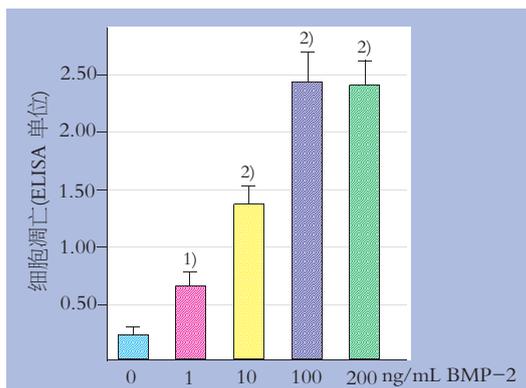
1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 ELISA 检测 BMP-2 对 HepG2 细胞凋亡的影响

ELISA 检测显示,1 ~ 200 ng/mL BMP-2 干预组细胞凋亡值显著高于对照组($P < 0.05$),其中100 ng/mL 浓度作用最强;在1 ~ 100 ng/mL 浓度范围内呈剂量依赖性(图1)。BMP-2 100 ng/L 干预细胞6,12,24 h 后检测到细胞凋亡;随着时间的延长,凋亡值增加,呈时间依赖性(图2)。表明 BMP-2 促进 HepG2 细胞凋亡,且呈剂量和时间依赖性。



注:与对照组相比,1) $P < 0.05$;2) $P < 0.01$

图1 BMP-2 对 HepG2 细胞凋亡的剂量影响

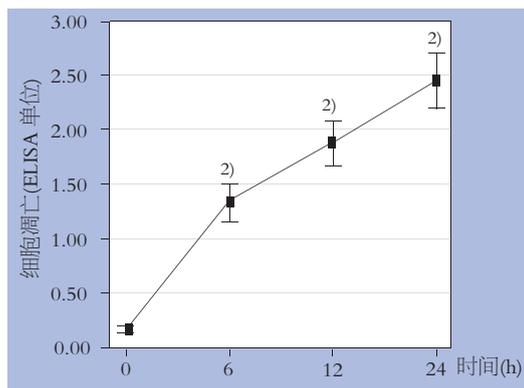


图2 BMP-2 作用时间对 HepG2 细胞凋亡的影响

2.2 Western blot 法检测 BMP-2 对 HepG2 细胞 Bcl-2 和 Fas 蛋白表达的影响

BMP-2 促进 Fas 蛋白表达,而抑制 Bcl-2 蛋白表达,均呈剂量依赖性($P < 0.05$)(图3)。

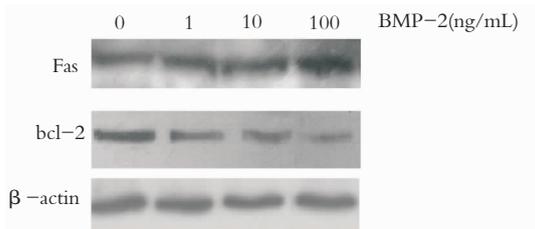


图3 BMP-2 对 Bcl-2 与 Fas 蛋白表达的影响

3 讨论

中国是原发性肝癌(primary liver cancer, PHC)的高发区。原发性肝癌在中国恶性肿瘤的发病率中占第3位,仅次于胃癌和肺癌,年发病率约为欧美的10倍以上。肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在中国占原发性肝癌(PHC)的91.5%,其具体发病机制目前尚未阐明。

有研究表明,癌旁组织中 BMP 的含量比 HCC 高^[1],推测 HCC 发生可能与肝细胞中 BMP 的含量减少有关;BMP-2 还能促进 HepG2 中抑癌因子 PTEN 蛋白的表达^[2]。BMP 属于 TGF- β 细胞因子超家族,是一种在细胞生长、分化、凋亡和机体多

种组织和器官形态发生中起重要调控作用的细胞因子。最初发现 BMP 是一种可在异位诱导骨和软骨形成的蛋白随着对 BMPs 家族成员的深入研究和扩展,已发现 BMPs 广泛分布于人体多种组织和细胞中,对靶细胞的生长、分化以及凋亡具有调控作用,在机体胚胎生长发育、创伤愈合、肿瘤^[3-6]的发生发展等过程中起重要作用。研究证明,BMP-2 可抑制乳腺癌细胞增殖;BMP-2 在机体的许多肿瘤如骨肉瘤、骨纤维异常增殖症^[7]、唾液腺肿瘤^[8]中均有表达,并且影响其临床和预后^[3-4]。

恶性肿瘤的发生发展,不仅是肿瘤细胞无限增殖的结果,而且是肿瘤细胞凋亡受阻的结果。因此能抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的药物,将在肿瘤的治疗中发挥重要作用。人为地启动凋亡的发生则可对肿瘤达到治疗目的。一般抗癌药物、激素制剂、放疗等的作用均系通过启动内在的凋亡机制,诱导各自敏感的细胞发生凋亡以达到治疗目的^[9]。对细胞凋亡加以诱导或抑制,已成为防治肿瘤的一种新策略和研究的新热点。故认为能否诱导凋亡以及诱导凋亡的程度成为评价抗肿瘤药物的重要指标。本研究发现 BMP-2 可促进肝癌细胞系 HepG2 的凋亡。

有研究表明, Fas 抗原在细胞凋亡事件中起传递信号的作用^[10-11]。当 Fas 抗原与 Fas 配体 (FasL) 结合,通过神经鞘磷脂酶的活化,使神经鞘磷脂分解,产生神经酰胺,从而激活一系列神经酰胺依赖性蛋白激酶,启动了胞内磷酸化过程,最终导致 DNA 降解,细胞凋亡。Bcl-2 参与 Fas 介导的细胞凋亡的调控^[12]。Fas 重组表达载体导入小鼠淋巴细胞,使之表达 Fas 抗原,再用 Fas 抗体处理,结果转染细胞出现明显的凋亡;如果以 Bcl-2 与 Fas 共转染这些细胞,再用 Fas 抗体处理,发生凋亡的程度明显减轻。表明 Bcl-2 与 Fas 介导的细胞凋亡关系极为密切。另外, Fas 介导的凋亡通过 Fas 受体、Ras 到小 G 蛋白、Ras1 和 Ras2 的信号传递途径;而 Bcl-2 能干扰 Ras 与其下游效应蛋白分子的结合而阻挠信号传递途径,使凋亡形成减少。有研究者^[13]发现阿霉素通过下调 Bcl-2 基因表达诱导肝癌细胞 HCC-9204 的凋亡。本研究显示,BMP-2 处理后的 HepG2 细胞 Fas 的表达高于未经处理的细胞, Bcl-2 的表达少于未经处理的细胞,表明 BMP-2

可能通过调控 Bcl-2 和 Fas 的表达而促进 HepG2 细胞的凋亡。

本研究发现,BMP-2 通过从蛋白水平上调节 Bcl-2 和 Fas 的表达从而促进肝癌细胞 HepG2 的凋亡,为肿瘤的治疗提供一定的理论依据。但 BMP-2 与肝癌细胞增殖凋亡之间的联系仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 杨智英,段贤斌,黄河,等. HCC 及其癌旁组织中 BMPs 的免疫组化定量分析[J]. 实用预防医学,2002,9(4):323-324.
- [2] 李秀青,王琦. 肝癌中骨形成蛋白 2 对 PTEN 蛋白水平影响的研究[J]. 中国药物与临床,2007,7(1):24-26.
- [3] Sulzbacher I, Bimer P, Trieb K, *et al.* The expression of bone morphogenetic proteins in osteosarcoma and its relevance as a prognostic parameter[J]. Clin Pathol, 2002, 5(5):381-385.
- [4] 傅升,金岩. 骨形成蛋白(BMP)-2/4, IA 型 BMP 受体及 Smad1,4,5 在 Teac8113 舌癌细胞中的表达及意义[J]. 现代口腔医学杂志,2002,16(5):393-394.
- [5] 何飞,杨崢嵘. BMP-2 在大鼠牙髓损伤修复中的表达及其对牙髓细胞的生物学效应[J]. 第三军医大学学报,2002,24(10):1222-1225.
- [6] Jin Y, Tipoe GL, Liang EC, *et al.* Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium[J]. Oral Oncol, 2001, 7(3):225-233.
- [7] 岳文,杨连甲,马明,等. 骨形成蛋白在颌骨骨肉瘤中的表达及临床意义[J]. 中华口腔医学杂志,1999,34(3):175-177.
- [8] Zhao M, Takata T, Ogawa I, *et al.* Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and type II collagen in pleomorphic adenoma of salivary glands[J]. Oral Pathol Med, 1998, 27(7):293-296.
- [9] Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions[J]. Science, 2003, 299(5604):214-215.
- [10] Cappello F, Bellafiore M, Palma A, *et al.* Defective apoptosis and tumorigenesis: role of p53 mutation and Fas/FasL system dysregulation[J]. Eur J Histochem, 2002, 46(3):199-208.
- [11] 陈能志,吕新生,魏尚典,等. 缺血处理对鼠肝细胞凋亡及调控基因(Bcl-2, Fas)蛋白表达的影响[J]. 中国普通外科杂志,2001,10(4):334-328.
- [12] Fujiwara I, Nakajima H, Mizuta N, *et al.* Bcl-2 expression in pig cells suppresses the apoptosis caused by human perforin/granzymes-or FasL/Fas-mediated cytotoxicity[J]. Transplant Proc, 2000, 32(5):941-942.
- [13] 郑建勇,李开宗,王为忠,等. 阿霉素诱导人肝癌细胞凋亡机制的研究[J]. 中国普通外科杂志,2005,14(7):509-511.