

阿克拉霉素协同顺铂杀伤卵巢癌细胞中泛素表达

阴梅云 阎蕴力* 周娜静 郑力芬

(河北医科大学基础医学研究所细胞生物研究室 石家庄 050017)

摘要 为探讨泛素在阿克拉霉素(aclarubicin, ACR)协同顺铂(cisplatin, CDDP)杀伤卵巢癌细胞中的作用,应用 ACR 及 CDDP 的药物血浆峰浓度,分别及共同作用 SKOV₃ 卵巢癌细胞株 24h。采用吖啶橙、溴乙啶双荧光染色观察细胞活率;克隆培养观察克隆形成率,以及免疫细胞化学方法检测泛素表达。结果可见:细胞活率,ACR 组为 78.3 ± 3.1 ;CDDP 组为 70.1 ± 6.6 ;ACR 和 CDDP 共用组为 50.8 ± 3.2 ($P < 0.05$)。克隆培养显示,ACR 和 CDDP 共用组能够显著抑制细胞的生存能力。同时,两药共用组细胞内泛素表达水平明显高于药物单用组。以上结果表明:ACR 与 CDDP 合用能够提高对卵巢癌细胞杀伤效果,泛素-蛋白质降解途径在其中发挥重要作用。

关键词: 泛素 阿克拉霉素 顺铂 卵巢癌细胞

细胞正常生命活动不但依赖于基因调控下的蛋白质表达,同样也依赖蛋白质的降解过程。蛋白质表达与降解关系失衡是影响细胞生长分化、导致细胞癌变或死亡的主要原因之一。

泛素(ubiquitin)是具有 76 个氨基酸、相对分子质量为 8kD 的多肽,表达于所有真核细胞中。它既能以游离形式存在,又可与带有降解信号的其他蛋白质结合以泛素结合蛋白形式存在。其主要功能是在 ATP 存在下,与细胞内一些周期性短暂表达的、受损的、异源及不适当折叠的蛋白质形成共价结合,并将其提呈给 26S 蛋白酶体降解。蛋白质的泛素化不仅为蛋白质生理性更新所需,而且也可作为细胞内监视系统一部分,对诸如感染、环境因素、化疗药物等诱因产生反应,以清除受损蛋白质、修复细胞损伤或诱导细胞凋亡^[1]。关注细胞内泛素表达的改变,对于了解病变进程、揭示药物作用机理有重要意义。

阿克拉霉素(aclarubicin, ACR)属蒽环类抗肿瘤药物,具有抑制拓扑异构酶 II (topoisomerase II, topo II)的作用^[2]。该药于 20 世纪 90 年代中期在我国进入临床,并逐渐应用于白血病和实体瘤的治疗。目前,ACR 在卵巢癌的治疗中使用较少,并且与其他抗癌药物合并应用时相互作用机理尚不明确。在诸多卵巢癌化疗方案中,顺铂(cisplatin, CDDP)是常用药物。但由于应用普遍,相关的抗药性问题越来越突出,选择能有效与之配伍的化疗药物已成为临床急需探索的问题之一。在以往的研究中,我们观

察到 ACR 与 CDDP 合用能够显著增强对卵巢癌细胞的抑制作用^[3]。但对其机理尚需进一步探讨。

对此,本研究拟通过观察药物对卵巢癌细胞内泛素-蛋白质降解途径的影响,继续探讨 ACR 与 CDDP 合用对卵巢癌细胞的抑制作用,为筛选有效抗肿瘤药物提供依据。

材料与方法

1. 材料

(1) 细胞株、药物与试剂 卵巢浆液性囊腺癌细胞株(SKOV₃)引自北京大学人民医院。ACR 为深圳万乐药业有限公司产品;CDDP 为昆明三戎金属药业有限公司产品。免疫细胞化学试剂,一抗为小鼠抗人泛素单克隆抗体(美国 Sandcrux 公司)。生物素化羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲本素,购自武汉博海生物公司。RPMI-1640 培养基(美国 GIBCO)、多聚左旋赖氨酸、吖啶橙(AO)、溴乙啶(EB)购自华美公司。新生牛血清为本室分离。

(2) 主要仪器 荧光显微镜(日本 Olympus),倒置显微镜(日本 Olympus)。CO₂ 培养箱(日本 Hitachi),LXJ-II 型离心机(上海医用分析仪器厂)。

2. 方法

(1) 细胞培养和药物浓度选择 SKOV₃ 细胞以 RPMI-1640 培养基培养,内含 10% 新生牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100μg/ml。置 37℃、5% CO₂ 环境下培养。采用药物的血浆峰浓度,其中 ACR 为 6μg/ml;CDDP 为 3μg/ml。实验

本文 2003 年 1 月 14 日收到,5 月 4 日接受。

* 通讯作者。E-mail: yanyl@hebm. edu. cn

分为 ACR 单独作用组、CDDP 单独作用组,以及 ACR 与 CDDP 合用组。并设对照样品。

(2) 双荧光染色观察细胞活率 将细胞与药物共同作用 24h 后,经 1500rpm/min 离心 5min,悬浮于磷酸盐缓冲液中。配制 AO 和 EB 各为 0.05mg/ml 的混合染液。加荧光染液于细胞悬液内,吹打混匀、滴至载玻片上,置荧光显微镜下观察,并定量计数 10 个视野共 1000 个细胞。按公式:活细胞数/总细胞数 $\times 100\%$,计算细胞活率,用 t 检验分析结果。

(3) 克隆形成检测 将细胞按 1×10^5 /ml 浓度接种于培养瓶。细胞进入对数生长期后加入药物,每组均为 3 个实验瓶。药物与细胞共同孵育 24h 后,消化细胞,无血清培养液清洗。按 1×10^3 /ml 细胞加入培养皿培养。连续培养 7 天后,0.5% 结晶紫染色,镜下计数各组克隆形成数。按公式:克隆形成数/接种细胞数 $\times 100\%$,计算克隆形成率,用 t 检验分析结果。

(4) 免疫细胞化学检测泛素表达 实验分组如上。药物作用后离心收集细胞,经 4% 多聚甲醛固定后,滴至涂有多聚左旋赖氨酸载片上。用冷 0.1 mol/L PBS(pH7.4)冲洗。3% 甲醇-过氧化氢室温孵育 15min 封闭过氧化物酶。1% Triton- $\times 100$,4℃ 过夜。冷 PBS 冲洗 3 遍,5min/次。湿盒内 10% 山羊血清 37℃ 孵育 30min。滴加 1:200(抗体:稀释液,PBS 稀释)一抗,小鼠抗人泛素单克隆抗体,于湿盒内 4℃ 孵育过夜。其后 PBS 清洗 3 次,5min/次;滴加二抗,羊抗小鼠生物素 IgG(1% BSA-PBS 稀释),湿盒内 37℃ 温育 30min。PBS 冲洗后,滴加 1:300 稀释(0.01 mol/L PBS 稀释)HRP 标记的亲本素,37℃ 温育 30-40min。滴加 DAB、显微镜监测下显色。苏木精复染,常规脱水、透明、封片、观察记录。

结 果

1. 药物对细胞活率的影响

为了解 ACR 与 CDDP 共用对卵巢癌细胞的杀伤作用,将药物与细胞共同作用后,行双荧光凋亡检测。观察可见,活细胞被 AO 染成绿色;中晚期凋亡细胞或死细胞被 EB 染为橘红色或红色。死细胞的体积明显小于活细胞。分别计算各组细胞活率,进行统计检验。结果表明,ACR 和 CDDP 合用与药物单用相比,细胞活率明显降低。结果见表 1 和图版图 A-D。

2. 药物对细胞克隆形成的影响

为判断细胞对不同药物所致损伤的修复能力,细胞经药物作用后,连续培养 7 天,观察细胞的克隆形成情况。结果可见,随着所用药物的不同,细胞形成的集落大小不等。对照组细胞一个集落内的细胞数平均超过 50 个细胞;而经药物作用后,集落内细

胞数在 5-30 个不等。为统一判断标准,本实验将大于 10 个细胞的集落定为一个克隆。计算不同药物组克隆形成的差别,显示 ACR 和 CDDP 合用与药物单用相比,能够显著抑制克隆形成。实验结果见表 1。

表 1 药物对卵巢癌细胞活率和克隆形成的影响($\bar{x} \pm s\%$)

药物($\mu\text{g}/\text{ml}$)	细胞活率	克隆形成率
对照组(0)	91.3 $\pm$ 2.2	76.5 $\pm$ 5.1
ACR(6)	78.3 $\pm$ 3.1	6.8 $\pm$ 1.2
CDDP(3)	70.1 $\pm$ 6.6	4.8 $\pm$ 2.0
ACR(6)+CDDP(3)	50.8 $\pm$ 3.2*	1.2 $\pm$ 0.3*

注:“*”表示与 ACR 或 CDDP 单独用药比较有明显差别(t 检验 $P < 0.05$)。

3. 药物对泛素表达的影响

各组细胞经免疫细胞化学染色显示泛素的表达情况,结果可见,对照组细胞的胞质和胞核内均呈阴性反应(图版图 E)。细胞经药物作用后可被染成浅棕色、棕色、深棕色不等,依次定为弱阳性、阳性和强阳性以区分泛素表达程度的不同。弱阳性和阳性细胞内着色部位多位于细胞质,细胞核呈浅着色或不着色;强阳性细胞质和细胞核均明显着色,细胞体积相对较小。

比较不同组别之间的差异可见:细胞经 ACR(图版图 F)和 CDDP(图版图 G)单独用药后,以弱阳性和阳性细胞居多。ACR 与 CDDP 共同作用后,强阳性细胞明显增加;且另有部分深棕色颗粒,其细胞质成分不明显,应为凋亡小体(图版图 H)。每组分别计数 200 个细胞,计算强阳性细胞所占比率可见:ACR 单独用药时强阳性细胞所占比率为 2.3%;CDDP 单独用药为 5.6%;ACR 与 CDDP 共同作用后,强阳性细胞数为 18.5%,以上实验结果表明:ACR 与 CDDP 合用能够提高泛素的表达水平。

讨 论

研究细胞的生长分化、衰老死亡,以及肿瘤治疗和预后,不但要重视基因调控下的蛋白质表达,也应关注蛋白质降解的作用。细胞内蛋白质降解途径较复杂,主要包括 ATP-泛素-蛋白酶体途径、溶酶体途径和依赖 Ca^{2+} 途径等。其中,ATP-泛素-蛋白酶体途径是真核细胞内蛋白质的主要降解系统。

泛素在细胞内分布广泛,不但存在于细胞质,也

分布于细胞核内^[4,5]。目前已知受泛素化调控的蛋白质越来越多,包括细胞周期调节因子 cyclin A、cyclin B、cyclin C;转录因子 c-jun、c-fos、c-myc、E2F、NF- κ B;抑癌基因产物 p53、p21、p27;以及增殖细胞核抗原 PCNA、topo II 等^[6-8]。其中, topo II 含 α 和 β 两种同功酶,是细胞核内重要的 DNA 结合蛋白,在 DNA 复制、转录、修复等细胞生命活动中发挥重要作用^[9]。关于药物作用后 topo II 表达水平变化,有资料表明:应用 topo II 抑制剂作用后, topo II 蛋白结构产生改变引起泛素表达增加,并与 topo II 蛋白结合将其降解,导致细胞内 topo II 含量降低^[10-12]。不同药物对 topo II α 和 β 具有不同的选择性。如鬼臼噻吩甙(teniposide, VM-26)能够高选择性的作用于 topo II β ,致使 ATP-泛素-26S 蛋白酶体途径活化,并有针对性的对 topo II β 降解作用更强^[13]。

在以往的研究中我们观察到, CDDP 能够诱导细胞内 topo II 表达增加; ACR 与 CDDP 合用可降低 topo II, 尤其对 topo II β 表达的影响更为明显;同时可显著提高对 SKOV₃ 卵巢癌细胞的杀伤效率。并认为 topo II, 尤其 topo II β 是药物的重要作用靶点^[3]。

本实验采用与文献^[3]相同的诱导方法,表明 ACR 与 CDDP 共同作用可使卵巢癌细胞内,尤其细胞核内泛素表达水平增高;提示泛素是降解 topo II, 尤其 topo II β 并参与细胞损伤修复或诱导细胞凋亡或死亡的原因之一。

近年来,关于泛素在细胞凋亡中的作用受到普遍关注。研究表明,泛素同时具有抑制和诱导细胞凋亡双向调节作用^[14]。其功能导向,即抑制细胞凋亡或促进细胞凋亡,取决于细胞的受损状态。细胞损伤轻微时,通过泛素途径能够降解受损蛋白、修复细胞损伤,抑制细胞凋亡^[15];如细胞受损严重,超出其修复能力时,泛素能够抑制 bcl-2 表达,活化细胞内细胞色素 C 和半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族,以及通过肿瘤坏死因子受体-1(tumor necrosis factor α receptor-1)等途径诱导细胞凋亡^[16-19]。细胞凋亡时,胞核和胞质内泛素表达均有增加,尤其在凋亡小体表达更为明显^[20]。

本实验观察到,药物作用后泛素可表达于细胞质和细胞核。ACR 和 CDDP 单独用药多表现为细胞质内泛素增加,两药共用可明显提高细胞核内泛素表达水平。对此,本文认为,泛素表达部位的不同

可能提示细胞受损程度的差异,即细胞相对损伤较轻时,首先表现为细胞质内泛素表达增加;细胞质和细胞核内泛素同时高表达,提示细胞受损严重或细胞凋亡。此观点结合本实验克隆培养结果可进一步证实:ACR 与 CDDP 合用能够显著抑制卵巢癌细胞损伤修复,提高杀伤效果。

参 考 文 献

- [1] Laney JD and Hochstrasser M, 1999, *Cell*, **97**:427-430.
- [2] Fortune JM and Osheroff N, 1998, *J Biol Chem*, **273**:17643-17650.
- [3] 阴梅云、韩硕、郑力芬等, 2003, 细胞生物学杂志, **25**(1):47-51.
- [4] Beers EP, Moreno TN, Callis J, 1992, *J. Biol Chem*, **22**:15432-15439.
- [5] Floyd ZE, Julie S, Trausch-Azar, et al., 2001, *J Biol Chem*, **276**:22468-22475.
- [6] Rolfe MM, Chiu I, Pagano M, 1997, *J Mol Med*, **75**:5-17.
- [7] Desterro JMP, Rodriguez MS, Hay RT, 2000, *Cell Mol Life Sci*, **57**:1207-1219.
- [8] Mao Y, Desai S D, Liu LF, 2000, *J Biol Chem*, **25**:26066-26073.
- [9] 阴梅云、郑全辉、郑力芬等, 2002, 细胞生物学杂志, **4**:212-217.
- [10] Nakajima T, Morita K, Ohi N, et al., 1996, *J Biol Chem*, **271**:24842-24849.
- [11] Nakajima T, Kimura M, Kuroda K., et al., 1997, *Res Commun*, **239**:823-829.
- [12] Honda Y, Tojo M, Matsuzaki K., et al., 2002, *J Biol Chem*, **277**:3599-3605.
- [13] Mao Y, Desai SD, Ting CY, et al., 2001, *J Biol Chem*, **276**:40652-40658.
- [14] MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB. et al., 2002, *J Biol Chem*, **277**:36611-36616.
- [15] Li Bi and Dou QP, 2000, *PNAS*, **97**:3850-3855.
- [16] Orlowski RZ, 1999, *Cell Death Differ*, **6**:303-313.
- [17] Dallaporta B, de Pablo M, Maisse C, et al., 2000, *Cell Death Differ*, **7**:368-373.
- [18] Cord N, Stephan H, 2002, *United States and Canadian Academy of Pathology*, **82**:965-980.
- [19] Jesenberger V and Jentsch S, 2002, *Mol Cell Biol*, **3**:112-121.
- [20] Wojcik C, 1999, *Cell Mol Life Sci*, **56**:908-917.

THE ROLE OF UBIQUITIN IN ACLARUBICIN COMBINATION WITH CISPLATIN TO KILL OVARIAN CELLS

YIN Mei Yun YAN Yun Li* ZHOU Na Jing ZHENG Li Fen

(Cell Biology Division, Institute Basic Medicine Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT For investigating the role of ubiquitin in aclarubicin(ACR) combination with cisplatin(CDDP) to kill ovarian cancer cells, the peak serum concentration of ACR and CDDP were used separately, or combined with each other to treat the SKOV₃ ovarian cancer cell line for 24 hours. The double fluorescence stain with acridine orange and ethidium bromide was performed to detect the cell vitality. The clone culture method was used to test the cell viability. The immunocytochemistry stain was applied to observe ubiquitin expression of the cells after induced by the drugs. It was observed that the cell vitality was 78.3 ± 3.1 for the ACR alone, 70.1 ± 6.6 for the CDDP alone, and 50.8 ± 3.2 for the ACR combined with CDDP ($P < 0.05$). It was shown that treatment with ACR and CDDP could significantly reduce the cell viability to contrast with only ACR or CDDP used depending on the results of clone culture. It was also noticed that there is a higher ubiquitin expression in the cells by the two drugs used together over the other groups. In conclusion, ACR combined with CDDP can increase the efficiency of killing the ovarian cancer cells, and the ubiquitin-protein degradation system might play an important role in it.

Key words: Ubiquitin Aclarubicin Cisplatin Ovarian cancer cell

* Corresponding author. E-mail: yanyl@hebm. edu. cn

冷冻对视网膜色素上皮细胞分泌肝细胞生长因子的影响

陶晓锋 王 方* 顾 青

(上海交通大学附属第一人民医院眼科 上海市眼科研究所 上海 200080)

摘 要 本研究观察冷冻处理后的人视网膜色素上皮细胞 (human retinal pigment epithelium cells, hRPE) 在体外培养和体内玻璃体环境中分泌肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 水平的变化, 调查变化后的玻璃体对正常 RPE 细胞的促增生作用。体外培养的 RPE 细胞在 -80°C 下进行冷冻, 冷冻时间分为 0s、15s 和 60s, 随后继续体外培养和注入正常兔眼玻璃体, 冷冻后的第 3d 和 6d 收集细胞培养液和玻璃体样本, ELISA 法测定 hHGF 含量; 进一步, 用 MTT 法测定正常 RPE 细胞加入玻璃体样本后的生长状态。结果显示冷冻刺激 RPE 细胞 hHGF 的分泌增多, 并可促进 RPE 细胞增生。

关键词: 视网膜色素上皮细胞 冷冻 肝细胞生长因子 增生性玻璃体视网膜病变

随着对增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 研究的深入, 许多学者认为肝细胞生长因子 (human hepatocyte growth factor, hHGF) 在 PVR 的发生发展中扮演了重要的作

用^[1,2]。HGF 是具有多种生物效应的生长因子, 参

本文 2003 年 3 月 7 日收到, 2003 年 7 月 12 日接受。

* 通讯作者。E-mail: milwang@public7. sta. net. cn