

# 端粒酶抑制剂对不同非整倍体状态的人结肠癌 HCT116细胞增殖及凋亡的影响

胡腾惠<sup>1</sup> 徐兴祥<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中南大学湘雅二医院, 长沙 410013; <sup>2</sup>扬州大学苏北人民医院, 扬州 225001)

**摘要** 该文研究端粒酶在人结肠癌HCT116高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞中的表达差异及其端粒酶抑制剂3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(3'-Azido-3'-deoxythymidine, AZT)对2组细胞增殖及凋亡的影响。取HCT116细胞加入盐酸强力霉素16 h后撤药, 称为高非整倍体变异组; 另取HCT116细胞不作任何处理, 设为对照组, 称为低非整倍体变异组; 在撤药后第11 d, 采用100、250 μmol/L的AZT处理2组细胞72 h, 并分别设立空白对照组(未加AZT的高非整倍体变异组及低非整倍体变异组)。采用染色体滴定法进行染色体计数。采用Western blot检测MAD2L1、PUMA、BAX、P21、γ-H2AX蛋白质水平。采用荧光定量PCR检测*hTERT*、*PUMA*、*BAX*、*NOXA*、*P21*基因表达, 端粒酶活性试剂盒检测端粒酶活性, CCK-8法检测细胞生存率。实验结果表明, 采用盐酸强力霉素诱导HCT116细胞的非整倍体率可达到77.33%; 高非整倍体变异组细胞*hTERT*基因的表达及端粒酶活性明显高于低非整倍体变异组; 加入AZT后, 高非整倍体变异组P21、γ-H2AX蛋白质水平上升程度较整倍体明显, 低非整倍体变异组PUMA、BAX蛋白质水平上升程度较高非整倍体变异组明显。该研究表明, 盐酸强力霉素可以诱导非整倍体形成, 高非整倍体变异组的端粒酶活性及*hTERT*基因表达高于低非整倍体变异组, AZT可以对高非整倍体变异组和低非整倍体变异组细胞产生增殖抑制作用、DNA损伤作用、细胞周期阻滞作用、诱导凋亡作用。

**关键词** 端粒酶; 非整倍体; AZT; 增殖; 凋亡

## The Effects of AZT on Proliferation and Apoptosis of Human Colorectal Cancer HCT116 Cell Line with Different Aneuploidy States

Hu Tenghui<sup>1</sup>, Xu Xingxiang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>The Second Affiliated Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha 410013, China;

<sup>2</sup>Subei People's Hospital, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

**Abstract** The aim of the study was to study the differences of telomerase activities and the *hTERT* gene expression in high aneuploid variation group and low aneuploid variation group of HCT116 cells and the influence of telomerase inhibitor 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) on cell proliferation and apoptosis of two group cells. One group of HCT116 cells were added into doxycycline, known as high aneuploid variation group. One group of HCT116 cells were added nothing, known as control group (low aneuploid variation group). After the withdrawal

收稿日期: 2016-11-01 接受日期: 2017-01-20

国家自然科学基金(批准号: 81302016)和江苏省临床医学科技专项(批准号: BL2012054)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18051062315, E-mail: xuxx63@sina.com

Received: November 1, 2016 Accepted: January 20, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81302016) and the Clinical Medicine Science and Technology Projects of Jiangsu Province (Grant No.BL2012054)

\*Corresponding author. Tel: +86-18051062315, E-mail: xuxx63@sina.com

网络出版时间: 2017-03-21 15:46:11 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170321.1546.008.html>

of doxycycline, the two groups were dealt with 100, 250  $\mu\text{mol/L}$  AZT for 72 hours, control blank group and AZT-dealt group were established. The chromosomes numbers of two groups were counted by karyotype analysis. The protein levels of MAD2L1, PUMA, BAX, P21,  $\gamma$ -H2AX were detected by Western blot. Fluorescent quantitative PCR was used to detect the gene expression of *PUMA*, *BAX*, *NOXA*, *P21*, *hTERT*. The telomerase activity of two groups were detected by the Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP). CCK-8 was used to detect cell survival after added into AZT. The experiment results showed that the aneuploidy rate of cells could reach to 77.33% while added into doxycycline hydrochloride, the *hTERT* gene expression and telomerase activity of Dox(+) group were significantly higher than that of Dox(-) group. The P21,  $\gamma$ -H2AX protein levels of two groups were increased. The degree of increasing of Dox(+) group was more obvious. The PUMA, BAX protein expression of Dox(-) group increased after AZT, while it didn't increase of Dox(+) group. It was showed that doxycycline can induce aneuploidy, the *hTERT* gene expression and telomerase activity of Dox(+) group were significantly higher than that of Dox(-) group. AZT could inhibit cell proliferation, produce DNA damage and cell cycle arrest of two group cells.

**Keywords** telomerase; aneuploidy; AZT; cell proliferation; apoptosis

端粒是位于真核生物染色体末端的线性结构, 具有抑制染色体末端进行重组及融合的功能, 从而维持染色体的稳定性。端粒在细胞复制的过程中会不断缩短, 而端粒酶能够维持端粒长度, 从而促使细胞不断地进行复制<sup>[1]</sup>。研究表明, 超过90%的恶性肿瘤具有端粒酶活性, 而在正常细胞与组织中, 则只能在淋巴细胞、造血细胞、生殖细胞等具有增殖潜能的细胞中检测到端粒酶活性<sup>[2-3]</sup>。这就充分表明, 端粒酶可以作为一种肿瘤分子标志物。非整倍体是指个别染色体减少或增加一条或几条而导致染色体数目非整倍数, 所以称为非整倍体, 是细胞分裂时染色体分离、染色体丢失、染色体易位异常的结果。非整倍体严重威胁人类的健康, 如某些先天性畸形综合征、自发性流产、死胎形成等主要原因就是非整倍体<sup>[4]</sup>, 90%的实体瘤和50%的血液肿瘤也是非整倍体<sup>[5]</sup>。研究发现, 端粒酶及非整倍体在肿瘤的发生发展中起重要作用, 但端粒酶在不同非整倍体状态细胞中的表达是否具有差异, 端粒酶抑制剂3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(3'-Azido-3'-deoxythymidine, AZT)对不同非整倍体状态的细胞功能有何影响, 目前尚不清楚, 本研究拟对这些问题进行探讨。

端粒酶由人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、端粒酶RNA组分、端粒酶相关蛋白组成, 能以自身RNA为模板, 将端粒DNA送至真核细胞染色体末端, 使端粒延长。hTERT在端粒酶的激活过程中起关键作用, 端粒酶活性的表达与其密切相关<sup>[6-7]</sup>。研究表明, 部分

肿瘤细胞由于端粒酶的作用, 能无限增殖, 从而成为永生化细胞<sup>[8-9]</sup>。细胞周期包括G<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>期、M期。当细胞衰老或DNA损伤时, 诱导P21转录增强, 抑制cyclin-CDK2磷酸化活性, 将细胞阻滞在G<sub>1</sub>期<sup>[10-11]</sup>。组蛋白H2AX的磷酸化(histone H2AX phosphorylation,  $\gamma$ -H2AX)是H2AX组蛋白家族中的一个独特成员, 在真核生物中高度保守, 当DNA双链发生损伤时,  $\gamma$ -H2AX可迅速发生磷酸化反应<sup>[12-13]</sup>。P53上调凋亡调控因子(P53 upregulated modulator of apoptosis, *PUMA*)是细胞凋亡过程中P53的下游靶基因, 紫外线、缺氧、 $\gamma$ 射线等均会上调野生型P53基因。P53的重激活可以增强*PUMA*表达, 解除大B细胞淋巴瘤(B-cell lymphoma-extra large, *Bcl-XL*)和B细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, *Bcl-2*)对促凋亡蛋白Bcl-2拮抗剂(Bcl-2 antagonist/killer, *Bak*)和Bcl-2 X相关基因(Bcl-2 associated X, *BAX*)的抑制作用, 增加膜通透性, 释放凋亡蛋白酶和细胞色素c, 启动胱冬肽酶(caspase)反应, 诱发细胞凋亡<sup>[14]</sup>。有丝分裂阻滞缺陷2样蛋白1(mitotic arrest deficient 2 like 1, *MAD2L1*)是纺锤体组装检查位点(spindle assembly checkpoint, SAC)的成分, 如果SAC在有丝分裂过程中出现异常, 则会导致染色体的错误分离, 形成非整倍体<sup>[15]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及分组

1.1.1 材料 人结肠癌HCT116细胞来源于苏北医

院实验中心。胎牛血清购自杭州四季青公司。端粒酶抑制剂3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(AZT)购自TCI公司。盐酸强力霉素及吉姆萨染液购自上海索莱宝生物科技有限公司。Nocodazole及Eukitt®快速硬化封片剂购自Sigma公司。MG132购自Selleckchem公司。端粒酶活性试剂盒购自Roche公司。MAD2L1购自R&D Systems公司。逆转录试剂盒购自Thermo公司。荧光定量试剂购自Vazyme公司。PUMA、BAX、P21、 $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX抗体、抗兔、鼠的第二抗体均购自Merk Millipore公司。

**1.1.2 实验分组** 人HCT116细胞培养于含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青/链霉素DMEM培养基中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。取处于对数生长期的HCT116细胞加入1/1 000的0.2 mg/mL盐酸强力霉素(doxycycline)。作用16 h后,撤掉盐酸强力霉素,设为高非整倍体变异组[Dox(+)];并设立不加盐酸强力霉素的HCT116细胞作为对照组,称为低非整倍体变异组[Dox(-)]。撤药当天为第1 d,在撤药后第11 d,采用100、250  $\mu$ mol/L的AZT处理2组细胞72 h,并设立空白对照组。

## 1.2 检测指标

在盐酸强力霉素撤掉后第11 d对2组细胞进行染色体滴定。取撤药后第3 d、第6 d、第11 d的2组细胞,检测MAD2L1蛋白质水平。在撤药后第11 d检测2组细胞*hTERT* mRNA水平及端粒酶活性,荧光定量PCR检测0、100、250  $\mu$ mol/L AZT作用72 h后*PUMA*、*BAX*、*NADH*氧化酶亚基(*NADH oxidase subunit*, *NOXA*)、*P21* mRNA水平,Western blot检测0、100、250  $\mu$ mol/L AZT作用后*PUMA*、*P21*、*BAX*、 $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX的蛋白质水平。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 染色体滴定** 取撤药后生长至第11 d的高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞,加入80 ng/mL的有丝分裂抑制剂(nocodazole)和10  $\mu$ mol/L的蛋白酶体抑制剂MG132,在37 °C孵箱中孵育6 h后,按照染色体滴定的步骤进行处理<sup>[16]</sup>,然后滴于玻片上,待玻片晾干后使用吉姆萨染液进行染色,待晾干后采用Eukitt®快速硬化封片剂进行封片,封片后在100×的油镜下进行观察计数,选取150个细胞进行拍照并对其染色体数目进行计数。将染色体数目为45条或46条的定义为整倍体(根据ATCC细胞库中关于HCT116细胞染色体核型的描述),将染色体数目不

是45或46条的细胞定义为非整倍体。

**1.3.2 荧光定量PCR检测 *hTERT*、*PUMA*、*BAX*、*NOXA*、*P21* mRNA水平** 在撤药后第11 d对2组细胞*hTERT* mRNA基因进行测定,在撤药后第11 d加入0、100、250  $\mu$ mol/L AZT,作用2组细胞72 h后,检测*PUMA*、*BAX*、*NOXA*、*P21*基因表达。*hTERT*正向引物:5'-AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG-3',反向引物:5'-GCT TTG CAA CTT GCT CCA GAC-3'。并使用*GAPDH*作为内参。按照RNA提取步骤<sup>[17]</sup>提取总RNA,采用酶标仪进行定量,逆转录反应采用Thermo逆转录试剂盒,逆转录完毕后,采用SYBR Green荧光定量试剂,进行荧光定量扩增。设置反应体系为:95 °C 5 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,共40个循环;95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,终止反应。

**1.3.3 端粒酶活性检测** 收集撤药后第11 d的高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞( $2.5 \times 10^3$ 个),按照试剂盒说明书制备端粒酶提取液<sup>[18]</sup>,并进行PCR扩增,PCR条件如下,25 °C引物延伸15 min,94 °C端粒酶灭活5 min;扩增共30个循环:94 °C变性30 s,50 °C退火30 s,72 °C延伸90 s;72 °C延伸10 min;4 °C保存PCR产物。取扩增产物2.5  $\mu$ L,进行ELISA反应。从酶标仪上读取其在450 nm处的D值,以690 nm处作为参考波长。端粒酶活性(relative telomerase activity, RTA)计算公式为:RTA= $\Delta A/AS.IS/[(ATS8-ATS8.0)/ATS8.IS] \times 100\%$ 。 $\Delta A=AS-ASO$ ,若 $\Delta A$ 大于2倍的ASO则判定为端粒酶阳性;AS:样品吸光度;ASO:热处理后样品吸光度;AS.IS:IS样品吸光度;ATS8:对照模板吸光度;ATS8.0:裂解液吸光度;ATS8.IS:对照模板的IS吸光度。由试剂盒提供阳性对照(为含有端粒重复序列的DNA片段),阴性对照为将端粒酶提取物在85 °C环境中处理10 min。

**1.3.4 CCK-8检测细胞活力** 采用CCK-8法<sup>[19]</sup>检测细胞活力。取撤药后第11 d对数生长期的高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞,按 $4 \times 10^3$ /孔接种于96孔培养板,每孔加液量为100  $\mu$ L。2组分别设立AZT处理组和空白对照组,AZT的终浓度分别为:0、100、200、250、500、1 000  $\mu$ mol/L,每个组均重复5个复孔。空白对照组为未加药的高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞,并设立调零孔。加药完毕后将孔板放入恒温培养箱内培养24、48、72 h后加入10  $\mu$ L CCK-8,再放入恒温培养箱内继续培养

4 h后在酶标仪上测在450 nm时的D值。实验重复3次。细胞活力%=(D加药细胞-D空白)/(D对照细胞-D空白)×100%。

**1.3.5 Western blot检测PUMA、P21、BAX、 $\gamma$ -H2AX、MAD2L1蛋白质水平** 采用Western blot检测2组细胞撤药后第3 d、第6 d、第11 d MAD2L1蛋白质水平变化,在撤药后第11 d加入0、100、250  $\mu$ mol/L AZT,作用2组细胞72 h后,检测PUMA、BAX、NOXA、P21蛋白质水平。采用裂解液裂解细胞后获得总蛋白。采用Bradford法<sup>[20]</sup>于575 nm处测定总蛋白浓度。然后,配制12%的SDS-PAGE分离蛋白质样品,上样量为60  $\mu$ g,采用PVDF膜进行转膜,恒压2 h,5%的脱脂奶粉封闭1.5 h,一抗4  $^{\circ}$ C封闭过夜。TBST洗涤3次后于室温孵育二抗1 h,采用ECL化学发光剂进行显色,采用凝胶成像系统进行显影并拍照。目的蛋白质的灰度值与内参 $\alpha$ -tubulin灰度值的比值代表样品中目的蛋白的相对含量,采用Image Lab软件对蛋白质灰度值进行分析。

**1.4 统计学分析**

所有数据采用SPSS 18.0进行统计学分析,两样本均数比较采用t检验,两独立样本率比较采用 $\chi^2$ 检验,组内比较及组间比较采用双因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

**2 结果**

**2.1 高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞染色体滴定**

在低非整倍体变异组的150个细胞中,有12个是非整倍体,其非整倍体率为9.33%;在高非整倍体变异组的150个细胞中,共有116个细胞为非整倍体,非整倍体率为77.33%(表1)。

**2.2 MAD2L1蛋白质水平比较**

在撤掉盐酸强力霉素第3 d后,高非整倍体变异组MAD2L1蛋白质水平明显下降,与低非整倍体变异组相比,2组比较具有统计学差异( $P < 0.05$ );第6 d时,高非整倍体变异组MAD2L1逐渐恢复;第11 d时,MAD2L1完全恢复正常(图1)。

**2.3 hTERT mRNA水平及端粒酶活性比较**

低非整倍体变异组及高非整倍体变异组细胞在第11 d hTERT mRNA水平分别为1.00和1.51、端粒酶活性为(3.52 $\pm$ 0.23)和(2.88 $\pm$ 0.08)。高非整倍体变异组hTERT mRNA水平及端粒酶活性明显高于低非整倍体变异组,组比较具有统计学差异( $P < 0.05$ ,图2)。

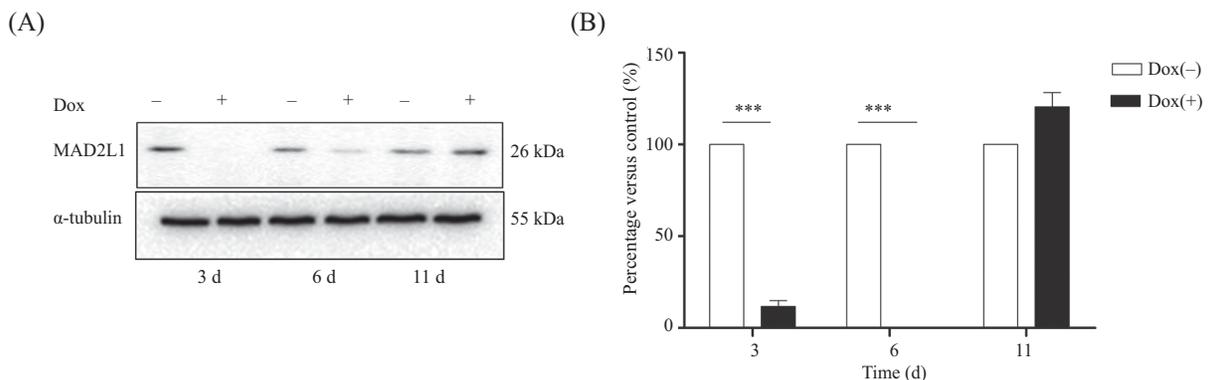
**2.4 AZT对低非整倍体变异组及高非整倍体变异组细胞增殖的影响**

由图3A可以观察到,随着AZT浓度的升高和处

表1 高非整倍体变异组和低非整倍体变异组细胞第11 d染色体滴定结果比较

Table 1 Karyotype analysis of Dox(+) and Dox(-) group cells at day 11

组别 Groups	数量 Amounts	非整倍体率(%) Percentage of aneuploidy (%)	各种细胞核型的染色体数目 Chromosome numbers of indicated karyotype																		
			37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	66
Dox(-)	150	9.33					2	1	1	69	69	1	2	1	2		2				
Dox(+)	150	77.33	2	3	3	7	8	13	11	19	15	19	17	8	8	5	4	2	1	3	2

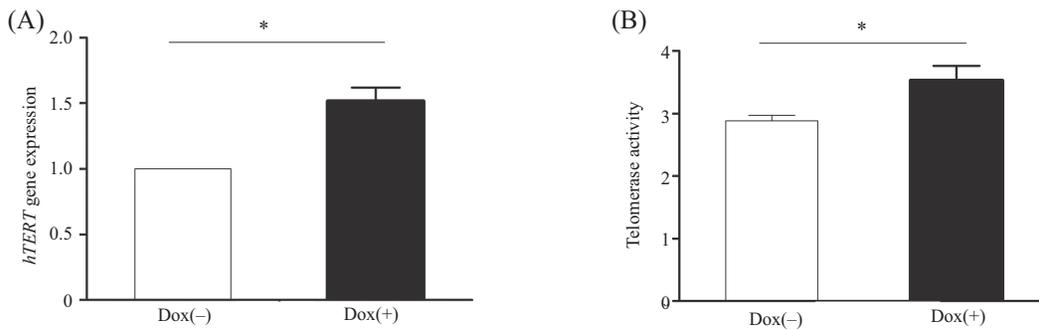


A: MAD2L1蛋白质水平变化; B: MAD2L1蛋白灰度值分析。\*\*\* $P < 0.001$ ,与Dox(-)组比较。

A: MAD2L1 protein levels; B: the gray-value of MAD2L1 protein. \*\*\* $P < 0.001$  vs Dox(-) group.

图1 加入盐酸强力霉素后不同时间MAD2L1蛋白质水平变化

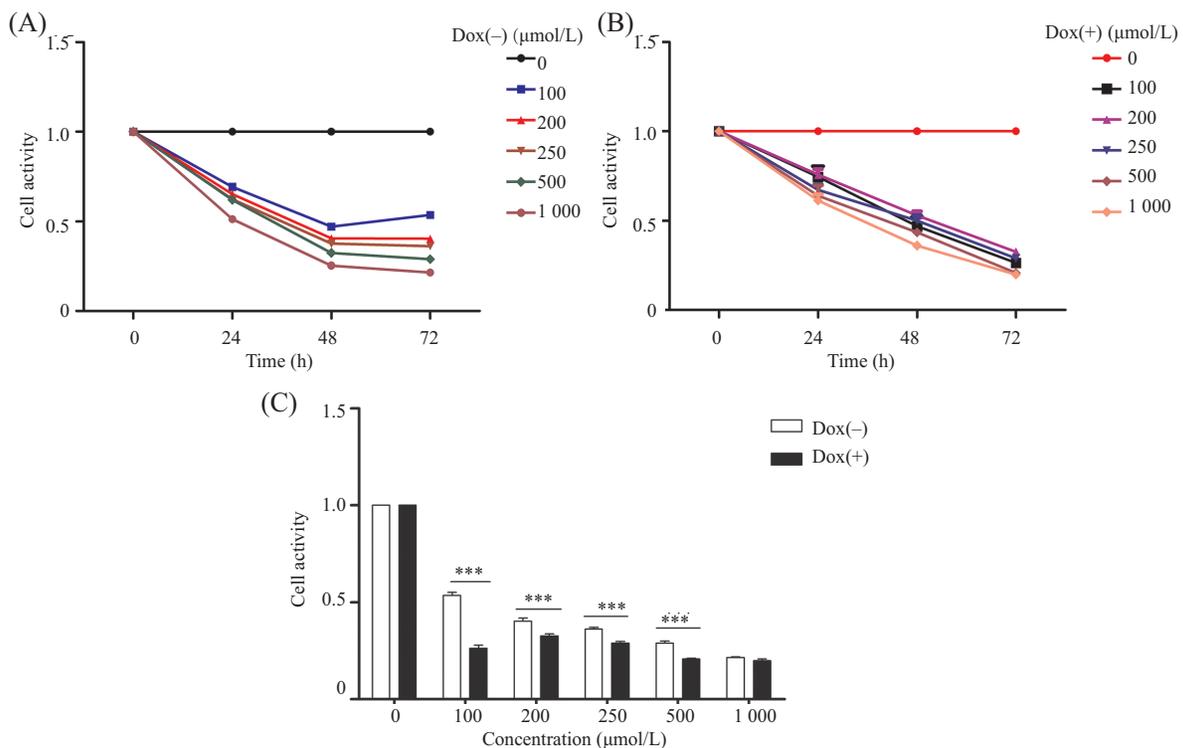
Fig.1 The alteration of MAD2L1 protein levels after doxycycline at different time points



A: 低非整倍体变异组及高非整倍体变异组 *hTERT* mRNA 水平; B: 低非整倍体变异组及高非整倍体变异组端粒酶活性。\* $P<0.05$ 。  
A: *hTERT* mRNA levels of Dox(+) and Dox(-) group; B: telomerase activity of Dox(+) and Dox(-) group. \* $P<0.05$ .

图2 作用2组细胞11 h后 *hTERT* mRNA 水平及端粒酶活性变化

Fig.2 The alteration of *hTERT* gene expression and telomerase activity after 11 h of exposure



A: 空白对照组及100、200、250、500、1 000  $\mu\text{mol/L}$  AZT作用低非整倍体变异组细胞24、48、72 h时细胞活性; B: 空白对照组及100、200、250、500、1 000  $\mu\text{mol/L}$  AZT作用高非整倍体变异组细胞24、48、72 h时细胞活性; C: 空白对照组及100、200、250、500、1 000  $\mu\text{mol/L}$  AZT作用2组细胞72 h时细胞活性。\*\*\* $P<0.001$ 。

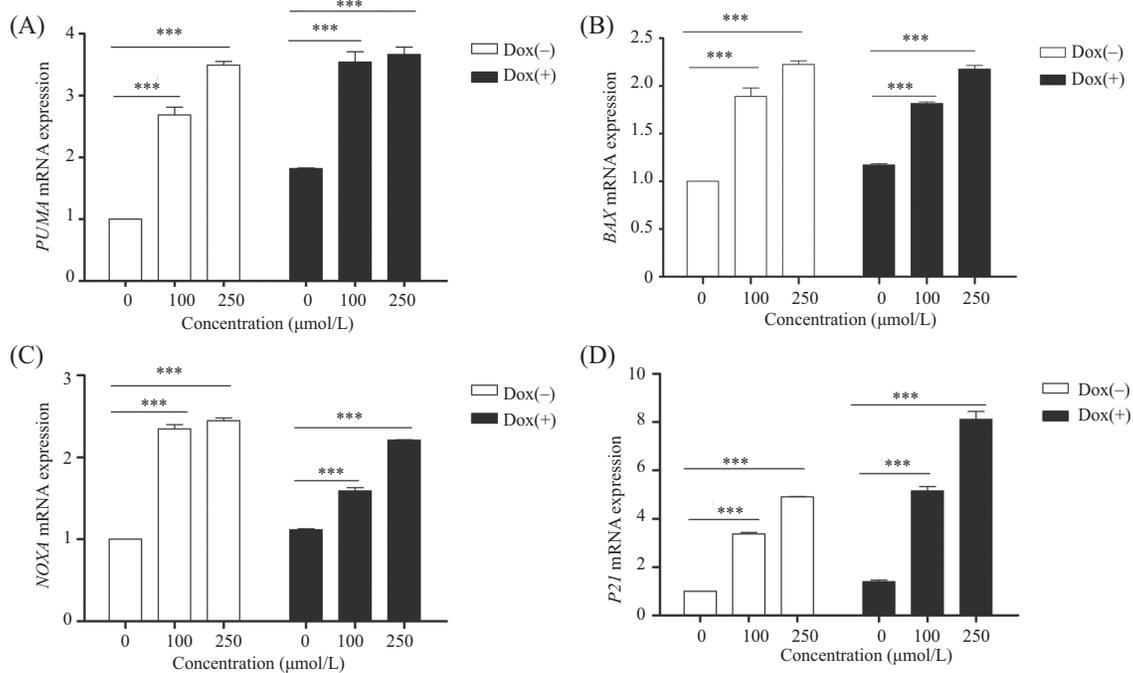
A: the cell activity of low aneuploid variation group exposed to 0, 100, 200, 250, 500, 1 000  $\mu\text{mol/L}$  AZT of 24, 48, 72 h; B: the cell activity of high aneuploid variation group exposed to 0, 100, 200, 250, 500, 1 000  $\mu\text{mol/L}$  AZT of 24, 48, 72 h; C: the cell activity of two group cells exposed to 0, 100, 200, 250, 500, 1 000  $\mu\text{mol/L}$  AZT of 72 h, respectively. \*\*\* $P<0.001$ .

图3 不同浓度AZT作用2组细胞24、48、72 h后的细胞存活率

Fig.3 Dox(+) and Dox(-) group cells were exposed to various concentrations AZT after 24, 48, 72 h of exposure

理时间的延长, 低非整倍体变异组细胞存活率不断降低。由图3B可以观察到, 随着AZT浓度的升高和处理时间的延长, 高非整倍体变异组细胞存活率不断降低。由图3C可以观察到, 在AZT作用72 h后, 高非整倍体变异组细胞的存活率均低于低非整倍体

变异组, 2组细胞在0、100、200、250、500  $\mu\text{mol/L}$  处具有统计学差异( $P<0.05$ )。AZT对2组细胞生长的抑制作用与药物处理时间及浓度呈正相关。AZT对高非整倍体变异组的细胞增殖抑制作用更明显。



A: *PUMA* mRNA水平; B: *BAX* mRNA水平; C: *NOXA* mRNA水平; D: *P21* mRNA水平。\*\*\* $P < 0.001$ 。

A: *PUMA* mRNA levels; B: *BAX* mRNA levels; C: *NOXA* mRNA levels; D: *P21* mRNA levels. \*\*\* $P < 0.001$ 。

图4 不同浓度AZT作用后2组细胞*PUMA*、*BAX*、*NOXA*、*P21* mRNA水平

Fig.4 *PUMA*, *BAX*, *NOXA* and *P21* mRNA levels of two groups treated with various concentrations AZT

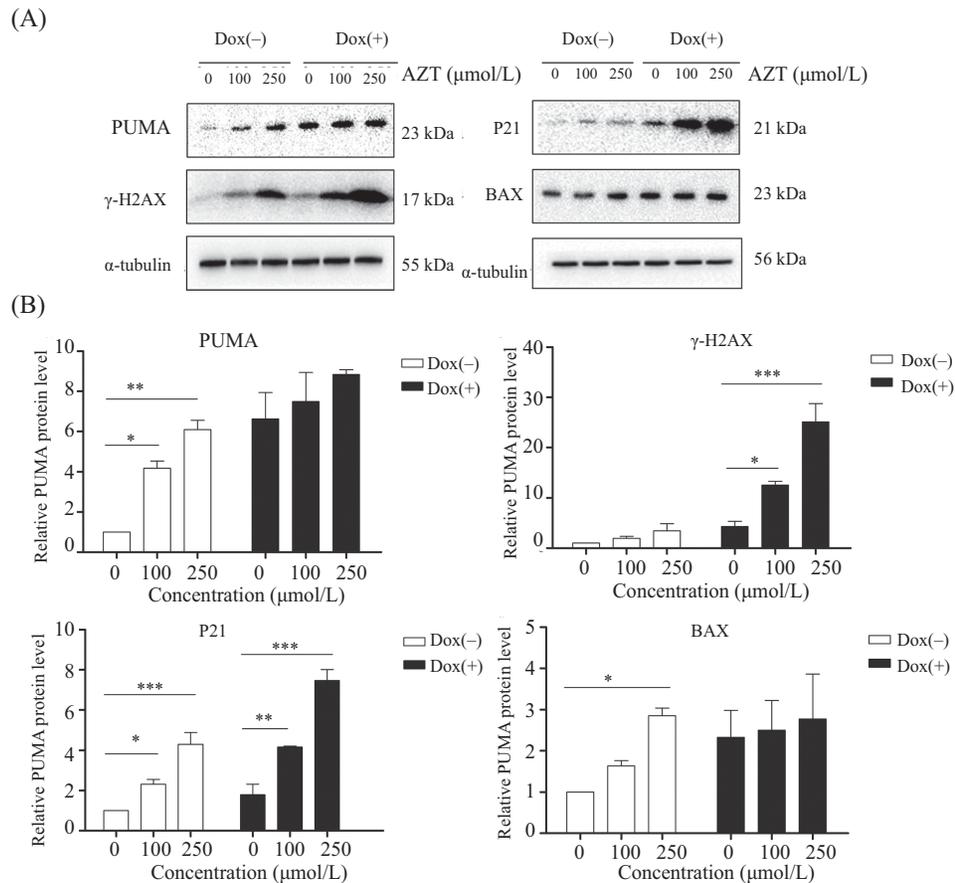
## 2.5 AZT对*PUMA*、*BAX*、*NOXA*、*P21* mRNA水平变化影响

如图4所示, 采用100、250 μmol/L的AZT作用低非整倍体变异组及高非整倍体变异组细胞72 h后, 2组细胞*PUMA*、*BAX*、*NOXA*、*P21* mRNA水平均随着AZT浓度的增加和时间的延长而增高, 2组细胞对AZT均具有药物浓度和时间依赖性。随着药物浓度的增加, 低非整倍体变异组*PUMA*、*BAX*、*NOXA* mRNA水平上升程度较高非整倍体变异组上升明显, 低非整倍体变异组*PUMA* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、2.68、3.49, *BAX* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、1.89、2.22, *NOXA* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、2.34、2.44; 高非整倍体变异组细胞在*PUMA* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、1.94、2.01, *BAX* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、1.54、1.85, *NOXA* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、1.42、1.97; 2组细胞*PUMA*、*BAX*、*NOXA* mRNA水平在100、250 μmol/L处具有统计学差异( $P < 0.05$ ); 随着药物浓度的增加, 高非整倍体变异组*P21* mRNA水平上升程度较整倍体组明显, 低非整倍体变异组

*P21* mRNA水平在0、100、250 μmol/L处为1.00、3.67、5.78, 2组细胞在100、250 μmol/L处均具有统计学差异( $P < 0.05$ )。此结果表明, AZT对高非整倍体变异组细胞周期阻滞作用较低非整倍体变异组明显, AZT诱导低非整倍体变异组凋亡作用较高非整倍体变异组明显。

## 2.6 *PUMA*、*P21*、*BAX*、 $\gamma$ -H2AX蛋白质水平

如图5所示, 与空白对照组相比, 低非整倍体变异组细胞*PUMA*、*BAX*蛋白质水平上升, *PUMA*蛋白质水平在100、250 μmol/L处具有统计学差异( $P < 0.05$ ), *BAX*蛋白质水平在250 μmol/L具有统计学差异( $P < 0.05$ )。与空白对照组相比, 高非整倍体变异组细胞*PUMA*、*BAX*蛋白质水平上升不明显( $P > 0.05$ )。与空白对照组相比, 2组细胞 $\gamma$ -H2AX、*P21*蛋白质水平上升, 在100、250 μmol/L处均具有统计学差异( $P < 0.05$ )。随着AZT药物浓度的增加, 高非整倍体变异组 $\gamma$ -H2AX、*P21*蛋白质水平上升程度较低非整倍体变异组明显, 低非整倍体变异组 $\gamma$ -H2AX蛋白质水平在0、100、250 μmol/L为1.00、2.23、3.94, *P21*蛋白质水平在0、100、250 μmol/L为1.00、1.97、3.43; 高非整倍体变异组细胞 $\gamma$ -H2AX蛋白质水平在0、100、250 μmol/L为1.00、2.93、5.32,



A: PUMA、 $\gamma$ -H2AX、P21、BAX蛋白质水平变化; B: PUMA、 $\gamma$ -H2AX、P21、BAX蛋白质灰度值分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。  
A: PUMA、 $\gamma$ -H2AX、P21、BAX protein level; B: the gray-value of PUMA、 $\gamma$ -H2AX、P21、BAX protein level. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图5 不同浓度AZT对2组细胞PUMA、BAX、P21、 $\gamma$ -H2AX蛋白质水平的影响

Fig.5 Effect of AZT on PUMA, BAX, P21,  $\gamma$ -H2AX protein levels of Dox(+) and Dox(-) group cells

P21蛋白质水平在0、100、250  $\mu$ mol/L为1.00、3.02、5.91, 2组细胞在100、250  $\mu$ mol/L处具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。以上结果表明, AZT对高非整倍体变异组的细胞周期阻滞作用及DNA损伤作用较整倍体明显, AZT对低非整倍体变异组的凋亡作用较高非整倍体变异组明显。

### 3 讨论

非整倍体与肿瘤形成之间的关系一直备受关注。有人认为, 非整倍体只是肿瘤形成过程中的一个产物; 有人认为, 非整倍体可以促进肿瘤形成。对于特定的非整倍体核型分析表明, 非整倍体既可以促进也可以抑制肿瘤的形成。在老鼠模型中, 多出来的16号染色体可以抑制结肠腺瘤性息肉病转变为结肠癌<sup>[21]</sup>。具有3条21号染色体的人与正常人相比, 得实体瘤的可能性更小。而具有3条8号染色体会促进血液方面的肿瘤发生, 25%的慢性粒细胞白血病

及10%~15%的急性粒细胞白血病以及5%的急性淋巴细胞白血病患者会出现3条8号染色体<sup>[22-23]</sup>。低频率的染色体错误分离会通过产生促进肿瘤形成的核型而促进肿瘤形成。当染色体发生错误分离的频率太高, 细胞则无法产生促进肿瘤形成的核型。

研究表明, 一系列细胞压力因子可以导致非整倍体的形成<sup>[24-30]</sup>。Meena等<sup>[16]</sup>通过采用慢病毒敲除连接蛋白 $\beta$ 3(gap junction protein beta 3, *GJB3*)、松弛素/胰岛素样家庭肽受体1(relaxin/insulin like family peptide receptor 1, *RXFPI*)、氧类固醇结合蛋白3(oxy-sterol binding protein like 3, *OSBPL3*)、StAR相关的脂质转移域9(StAR related lipid transfer domain containing 9, *STARD9*)等基因获得非整倍体, 这些基因与肿瘤形成及整倍体形成的相关通路有关。Li等<sup>[31]</sup>通过运用siRNA敲低*MAD2L1*获得非整倍体。既往研究中尚未有人采用盐酸强力霉素诱导非整倍体, 据相关报道表明, 盐酸强力霉素可能可以

诱导非整倍体。本研究就这一问题进行尝试,证实盐酸强力霉素可以诱导非整倍体。我们就盐酸强力霉素诱导非整倍体的机制进行研究,在撤药后第3 d,非整倍体细胞MAD2L1表达完全消失。这表明,盐酸强力霉素可以通过破坏纺锤体组装检查位点的成分MAD2L1,导致染色体的错误分离,继而形成非整倍体。随着撤药时间的增加,细胞MAD2L1逐渐恢复正常,表明不健康的非整倍体细胞大量死亡,而存活下来的非整倍体则可以继续生长及增殖。与既往通过shRNA敲除相关基因或采用siRNA敲低MAD2L1等方法相比,采用药物诱导非整倍体的方法操作简便,价格便宜,为之后非整倍体的获得提供了一个简单易行的方法。

AZT是应用最广的一种端粒酶抑制剂,能阻断端粒复制模板与单核苷酸之间的结合,使肿瘤细胞维持端粒长度的机制遭到破坏,从而导致端粒随着自身染色体复制而逐渐缩短,最终促进肿瘤细胞发生衰老及凋亡<sup>[32-34]</sup>。本研究2组细胞加入AZT后,通过CCK-8实验表明,AZT可以抑制高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞增殖,具有药物浓度及时间依赖性,AZT对高非整倍体变异组的增殖抑制作用更明显。

本研究结果表明,AZT可以对高非整倍体变异组及低非整倍体变异组细胞产生细胞周期阻滞作用、DNA损伤作用、促凋亡作用,AZT对高非整倍体变异组的细胞周期阻滞作用及DNA损伤作用较整倍体明显,AZT对低非整倍体变异组的促凋亡作用较高非整倍体变异组明显。我们知道,非整倍体在促进或抑制肿瘤形成的过程中具有双重作用,特定的染色体核型可以产生特定的肿瘤,通过干扰纺锤体组装检查位点的功能形成的非整倍体在早期多以凋亡为主。本研究通过加入盐酸强力霉素诱导非整倍体后,经过一段时间的休整后加入AZT,在这段时间内,不利于生存的非整倍体大量死亡,而存活下来的非整倍体则可能由于获得特定的染色体核型则发挥着促进肿瘤形成作用。其促肿瘤形成作用足以对抗AZT诱导的凋亡作用,从而导致非整倍体的凋亡程度不如整倍体明显。低非整倍体变异组细胞PUMA、BAX蛋白质水平与基因表达趋势一致,非整倍体细胞出现PUMA、BAX、NOXA基因的表达上升,而相应的蛋白质水平未上升,是由于盐酸强力霉素破坏了高非整倍体变异组细胞凋亡基因翻译到

蛋白质这一过程,还是由于高非整倍体变异组细胞的凋亡通路有别于低非整倍体变异组细胞,尚有待进一步研究。

综上所述,该研究结果表明,盐酸强力霉素可以通过破坏纺锤体组装检查位点的MAD2L1蛋白获得非整倍体,hTERT基因表达与端粒酶活性在不同非整倍体状态结肠癌细胞中具有差异,端粒酶抑制剂可以抑制不同非整倍体状态细胞的增殖能力、促进细胞凋亡、产生DNA损伤作用、诱导细胞周期阻滞。而关于高非整倍体变异组与低非整倍体变异组的细胞凋亡通路尚有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Kumar M, Lechel A, Gunes C. Telomerase: the devil inside. *Genes (Basel)* 2016; 7(8): 235-43.
- 2 Shekhani MT, Barber JR, Bezerra SM, Heaphy CM, Gonzalez RN, Taheri D, *et al.* High-resolution telomere fluorescence *in situ* hybridization reveals intriguing anomalies in germ cell tumors. *Hum Pathol* 2016; 54(8): 106-12.
- 3 Effros RB. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: Effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol* 2011; 46(2/3): 135-40.
- 4 Santaguida S, Amon A. Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(8): 473-85.
- 5 Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463(7283): 899-905.
- 6 Avin BA, Umbricht CB, Zeiger MA. Human telomerase reverse transcriptase regulation by DNA methylation, transcription factor binding and alternative splicing. *Int J Oncol* 2016; 24(38): 67-74.
- 7 Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li S. Transcription regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Genes (Basel)* 2016; 7(8): 1203-16.
- 8 Piqueret-Stephan L, Ricoul M, Hempel WM, Sabatier L. Replication timing of human telomeres is conserved during immortalization and influenced by respective subtelomeres. *Sci Rep* 2016; 6(34): 325-33.
- 9 Zhang N, Li J, Zhong X, An X, Hou J. Reversible immortalization of sheep fetal fibroblast cells by tetracycline-inducible expression of human telomerase reverse transcriptase. *Biotechnol Lett* 2016; 38(8): 1261-8.
- 10 Liu X, Song M, Gao Z, Cai X, Dixon W, Chen X, *et al.* Stereoisomers of astaxanthin inhibit human colon cancer cell growth by inducing G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis. *J Agric Food Chem* 2016; 25(87): 438-44.
- 11 Wang LL, Su Z, Tai W, Zou Y, Xu XM, Zhang CL. The p53 pathway controls SOX<sub>2</sub>-mediated reprogramming in the adult mouse spinal cord. *Cell Rep* 2016; 17(3): 891-903.
- 12 Duran R, Mirpour S, Pekurovsky V, Ganapathy-Kanniappan S, Brayton CF, Cornish TC, *et al.* Preclinical benefit of hypoxia-activated intraarterial therapy with evofosfamide in liver cancer.

- Clin Cancer Res 2016; 7(19): 267-74.
- 13 Jenkins GR, Lee T, Moland CL, Vijay V, Herman EH, Lewis SM, *et al.* Sex-related differential susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity in B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; 310(12): 159-74.
- 14 Jarauta V, Jaime P, Gonzalo O, de Miguel D, Ramirez-Labrada A, Martinez-Lostao L, *et al.* Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett* 2016; 382(1): 1-10.
- 15 Vleugel M, Hoek TA, Tromer E, Sliedrecht T, Groenewold V, Omerzu M, *et al.* Dissecting the roles of human BUB1 in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci* 2015; 128(16): 2975-82.
- 16 Meena JK, Cerutti A, Beichler C, Morita Y, Bruhn C, Kumar M, *et al.* Telomerase abrogates aneuploidy-induced telomere replication stress, senescence and cell depletion. *EMBO J* 2015; 34(10): 1371-84.
- 17 Xu H, Gong X, Zhang HH, Zhang Q, Zhao D, Peng JX. Targeting human telomerase reverse transcriptase by a simple siRNA expression cassette in HepG2 cells. *Hepat Mon* 2015; 15(3): e24343.
- 18 Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-kappaB pathway. *Tumour Biol* 2015; 36(11): 8425-37.
- 19 McNeill-Blue C, Wetmore BA, Sanchez JF, Freed WJ, Alex Merrick B. Apoptosis mediated by p53 in rat neural AF5 cells following treatment with hydrogen peroxide and staurosporine. *Brain Res* 2006; 1112(1): 1-15.
- 20 Katarkar A, Saha A, Mukherjee S, Kundu D, Bandyopadhyay P, Chaudhuri K. Telomerase expression in individuals with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2015; 86(5): 656-65.
- 21 Sussan TE, Yang A, Li F, Ostrowski MC, Reeves RH. Trisomy represses Apc(Min)-mediated tumours in mouse models of Down's syndrome. *Nature* 2008; 451(7174): 73-5.
- 22 Jones L, Wei G, Sevcikova S, Phan V, Jain S, Shieh A, *et al.* Gain of MYC underlies recurrent trisomy of the MYC chromosome in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 2010; 207(12): 2581-94.
- 23 Paulsson K, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55(1): 37-48.
- 24 Orr B, Compton DA. A double-edged sword: How oncogenes and tumor suppressor genes can contribute to chromosomal instability. *Front Oncol* 2013; 3(34): 164.
- 25 Duijff PH, Benezra R. The cancer biology of whole-chromosome instability. *Oncogene* 2013; 32(40): 4727-36.
- 26 Zhang D, Chen C, Li Y, Fu X, Xie Y, Li Y, *et al.* Cx31.1 acts as a tumour suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines through inhibition of cell proliferation and metastasis. *J Cell Mol Med* 2012; 16(5): 1047-59.
- 27 Bathgate RA, Halls ML, van der Westhuizen ET, Callander GE, Kocan M, Summers RJ. Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol Rev* 2013; 93(1): 405-80.
- 28 Feng S, Agoulnik IU, Truong A, Li Z, Creighton CJ, Kaftanovskaya EM, *et al.* Suppression of relaxin receptor RXFP1 decreases prostate cancer growth and metastasis. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(4): 1021-33.
- 29 King TJ, Lampe PD. The gap junction protein connexin32 is a mouse lung tumor suppressor. *Cancer Res* 2004; 64(20): 7191-6.
- 30 Lehto M, Mayranpaa MI, Pellinen T, Ihalmo P, Lehtonen S, Kovanen PT, *et al.* The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 5): 695-705.
- 31 Li M, Fang X, Baker DJ, Guo L, Gao X, Wei Z, *et al.* The ATM-p53 pathway suppresses aneuploidy-induced tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14188-93.
- 32 Armando RG, Gomez DM, Gomez DE. AZT exerts its antitumoral effect by telomeric and non-telomeric effects in a mammary adenocarcinoma model. *Oncol Rep* 2016; 36(5): 2731-6.
- 33 Rotella DP. The critical role of organic chemistry in drug discovery. *ACS Chem Neurosci* 2016; 7(10): 1315-6.
- 34 Mariano D, de Souza D, Meinerz DF, Allebrandt J, de Bem AF, Hassan W, *et al.* The potential toxicological insights about the anti-HIV drug azidothymidine-derived monoselenides in human leukocytes: Toxicological insights of new selenium-azidothymidine analogs. *Hum Exp Toxicol* 2016; 23(16): 123-34.