

亲细胞非均质分子脂质抑制人脑胶质瘤 U87 细胞株增殖的实验研究

周 斌, 陈东江, 任 杰, 狄 冲, 楼美清

(同济大学附属第十人民医院神经外科, 上海 200072)

【摘要】目的 研究亲细胞非均质分子脂质(cytotropic heterogeneous molecular lipid, CHML)对人脑胶质瘤 U87 细胞增殖的影响及其可能的作用机制。方法 不同浓度 CHML 不同作用时间处理 U87 细胞后,采用 MTT 比色法检测细胞活力,流式细胞术检测细胞周期和凋亡,Western 印迹法检测细胞周期相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达。结果 CHML 作用于 U87 细胞后,细胞生长受到明显抑制。流式细胞术检测显示,CHML 使 G_0/G_1 期细胞比例升高, S 期和 G_2/M 期细胞比例降低。Annexin V-PI 法发现,用药 24 h 后, U87 细胞凋亡比例随着 CHML 的浓度升高而上升。Western 印迹法检测显示,CHML 引起 U87 细胞的周期相关蛋白 Cyclin D1 和 CDK6 表达降低, p21 表达升高, 凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase 3 表达增高, Bcl-2 表达下降。结论 CHML 可能通过诱导细胞凋亡和 G_1 期细胞周期阻滞抑制 U87 细胞的增殖。

【关键词】亲细胞非均质分子脂质; 脑胶质瘤细胞 U87; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

【中图分类号】R 392.12 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1008-0392(2014)05-0006-05

Proliferation inhibition of human brain glioma U87 cells by cytotropic heterogeneous molecular lipid

ZHOU Bin, CHEN Dong-jiang, REN Jie, DI Chong, LOU Mei-qing

(Dept. of Neurosurgery, Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of cytotropic heterogeneous molecular lipid (CHML) on proliferation of human brain glioma U87 cells. **Methods** U87 cells were treated with different concentration of CHML for various time. Cell viability was detected by MTT assay. Apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry, and the expression of cell-cycle and apoptotic proteins were examined by Western blotting. **Results** After treated with CHML, the growth of U87 cells were markedly inhibited. Flow cytometric analysis showed that CHML increased the number of cells in G_0/G_1 and reduced the percentage of cells in S and G_2/M phase. Annexin V-PI method indicated that apoptosis rates of U87 cells rose with the increasing concentration of CHML after 24 hours of treatment. Western blotting demonstrated that CHML down-regulated the expression of Bcl-2, cyclin

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: 上海市科委自然科学基金(11ZR1428500)

作者简介: 周 斌(1988—),男,硕士研究生. E-mail: zb_8228@sina.com

通信作者: 楼美清. E-mail: loumqpro@163.com

D1 and CDK6, and up-regulated the expression of p21, Bax, and Caspase 3. **Conclusion** CHML can inhibit proliferation of U87 cells by inducing cell apoptosis and cell cycle arrest in G₁ phase.

【Key words】 cytotropic heterogeneous molecular lipid; U87 glioma cell; cell proliferation; cell cycle; cell apoptosis

脑神经胶质瘤是起源于脑部神经胶质细胞的一类最常见的中枢神经系统原发性肿瘤。目前对胶质瘤的治疗手段集中在手术、放射疗法与化学疗法 3 个方面,但脑胶质瘤的治疗效果仍不理想。即便采取广泛性外科切除联合放射疗法、化学疗法的综合疗法后,胶质瘤也倾向于复发,预后较差,极大地威胁着人们的身体健康。因此,寻找能有效治疗脑胶质瘤的药物具有重要意义。

亲细胞非均质分子脂质 (cytotropic heterogeneous molecular lipid, CHML) 是一种新型的脂质类抗癌制剂。研究^[1-2]显示,CHML 可抑制多种肿瘤细胞增殖,并诱导凋亡。然而,关于 CHML 对人脑胶质瘤细胞的作用机制的研究尚未见报道。本研究以体外培养的人脑胶质瘤 U87 细胞株作为研究对象,观察不同浓度的 CHML 对 U87 细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡的影响,探讨 CHML 对人脑胶质瘤 U87 细胞增殖的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

CHML 购自美国高立食品药品有限公司,由 CHML-6.0 和 CHML-6.1 两种型号组成。此两种型号需配成复合液同时使用,以加强药效和减少抗药性。用 5% 葡萄糖生理盐水配制成各种浓度的 CHML-6.0 和 CHML-6.1 的复合液。两者的浓度比恒定,所以实验所采用的复合液的浓度以 CHML-6.0 的浓度来表示。DMEM/高糖培养液、胎牛血清购自 Gibco 公司;双抗、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自 Sigma 公司;Annexin V/PI 双染试剂盒和 PI 细胞周期检测试剂盒购自 BD 公司;Cyeylin D1 抗体、CDK6 抗体、p21 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、Caspase 3 抗体、 β -actin 抗体和二抗购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养

人脑胶质瘤细胞株 U87 由中国科学院上海细胞库提供。U87 细胞置于含 10% 胎牛血清及 1% 双

抗的 DMEM/高糖培养液中常规培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度。每隔 2~3 d 换液,使细胞维持在最佳生长状态。实验时取对数生长期细胞。

1.3 MTT 比色法检测细胞活力

将 U87 细胞以 8×10^3 /孔接种于 96 孔板中,过夜贴壁培养,第 2 天分别加入不同浓度的 CHML 混合液,浓度梯度为 0 (对照组)、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$,设 6 个复孔。培养 12、24、48 h 后,每孔加入 MTT 液 (5 mg/ml) 20 μl ,培养 4 h,每孔加入 DMSO 100 μl ,轻轻振荡 30 min,用酶标仪测定波长 530 nm 处吸光值 (D_{530})。计算不同浓度不同作用时间 CHML 对 U87 细胞的抑制率,抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组 } D_{530 \text{ nm}} \text{ 值} / \text{对照组 } D_{530 \text{ nm}} \text{ 值}) \times 100\%$

1.4 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡

取对数生长期的 U87 细胞,以 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板,培养过夜后,加入浓度梯度为 0 (对照组)、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 CHML 工作液。培养 24 h 后,0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液,收集细胞,1 \times PBS 洗涤 2 次,离心重悬。取 100 μl 细胞悬液 (1×10^5 个) 至试管中,按 Annexin V/PI 试剂盒的要求,加入 5 μl Annexin V-FITC, 2.5 μl 碘化丙啶 (PI) 混匀。室温避光孵育 10 min,然后用流式细胞仪检测。

1.5 PI 法检测细胞株周期

细胞接种和 CHML 浓度梯度同凋亡检测,不同浓度的 CHML 作用 24 h 后,收集细胞,预冷的 70% 乙醇固定 4 °C 过夜。用预冷的 PBS 清洗 1 次后,加 200 μl 染液 (25 mg/ml RNase A 4 μl , PI 20 μl , PBS 186 μl) 37 °C 孵育 30 min,然后用流式细胞仪检测。

1.6 Western 印迹法检测

细胞接种和 CHML 浓度梯度同凋亡检测,不同浓度的 CHML 作用 24 h 后,收集细胞,提取细胞总蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度一致后加蛋白上样缓冲液煮沸 5 min,上样。进行 SDS-PAGE 电泳 80 V 100 min。依预染 marker 的指示条带切

胶制成电转膜的“三明治”结构进行转膜 200 mA 90 min。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。用 Cyclin D1 单克隆抗体(1:1 000 稀释),CDK6 单克隆抗体(1:1 000 稀释),p21 单克隆抗体(1:1 000 稀释),Bax 单克隆抗体(1:1 000 稀释),Bcl-2 单克隆抗体(1:1 000 稀释),Caspase 3 单克隆抗体(1:1 000 稀释),β-actin 单克隆抗体(1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, PBST 洗涤 10 min × 3 次,二抗稀释液室温孵育 1 h, PBST 洗涤 10 min × 3 次。最后用 Odyssey 红外双色激光成像系统(LI-COR 美国)检测蛋白条带。

1.7 统计学处理

所有实验重复 3 次,结果取 3 次相应实验的平均值。所有结果经配对 *t* 检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U87 细胞经 CHML 处理后呈时间和剂量依赖性增殖抑制

细胞抑制率呈剂量和时间依赖性升高,浓度为 200、400 μg/ml 的 CHML 对 U87 细胞的增殖抑制显著,见表 1。

表 1 不同浓度 CHML 对 U87 细胞增殖的影响
Tab.1 Effects of CHML on proliferation of U87 cells with different concentration and at different time points
($\bar{x} \pm s$, %)

时间/h	CHML 浓度/(μg · ml ⁻¹)				
	0	50	100	200	400
12	0 ± 0.00	8.01 ± 2.86	17.11 ± 3.93 [*]	50.27 ± 3.37 [*]	63.04 ± 2.09 [*]
24	0 ± 0.00	11.12 ± 2.01 [*]	23.36 ± 1.51 [*]	63.31 ± 2.58 [*]	71.15 ± 4.47 [*]
48	0 ± 0.00	15.33 ± 1.47 [*]	29.50 ± 4.22 [*]	69.25 ± 2.36 [*]	75.90 ± 3.09 [*]

与对照组相比, * $P < 0.05$

2.2 U87 细胞经 CHML 处理后呈剂量依赖性凋亡

随着 CHML 剂量的增加,细胞凋亡率(Q2 + Q4)从 5.7% 逐渐增加到 37.9%。与对照组相比,100、200 μg/ml CHML 组凋亡率差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) ,见图 1。

2.3 CHML 导致 U87 细胞阻滞于 G₁ 期

当细胞分别被 0、50、100、200 μg/ml CHML 处理后,G₁ 期细胞从 58.77% 增加到 86.95% ,同时 S 期细胞从 29.27% 下降至 12.17% ,G₂/M 期细胞也从 11.96% 降至 0.89% ,差异有统计学意义($P < 0.05$) ,见图 2。

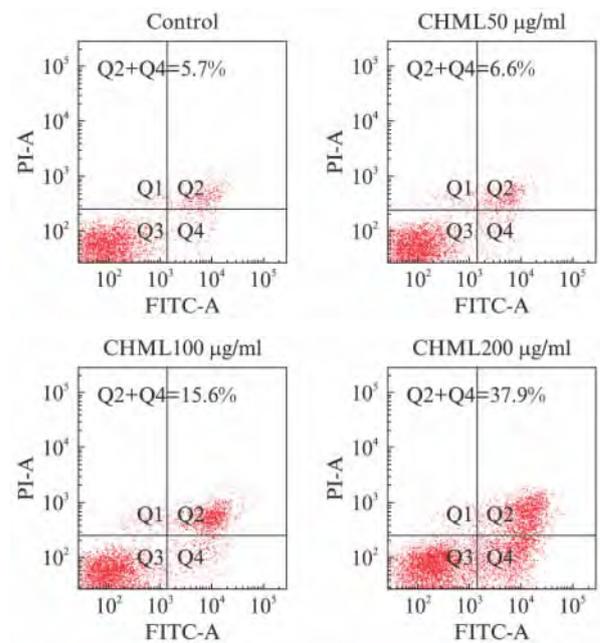


图 1 不同浓度的 CHML 对 U87 细胞凋亡率的影响
Fig.1 Effects of CHML on U87 cells apoptosis with different concentration

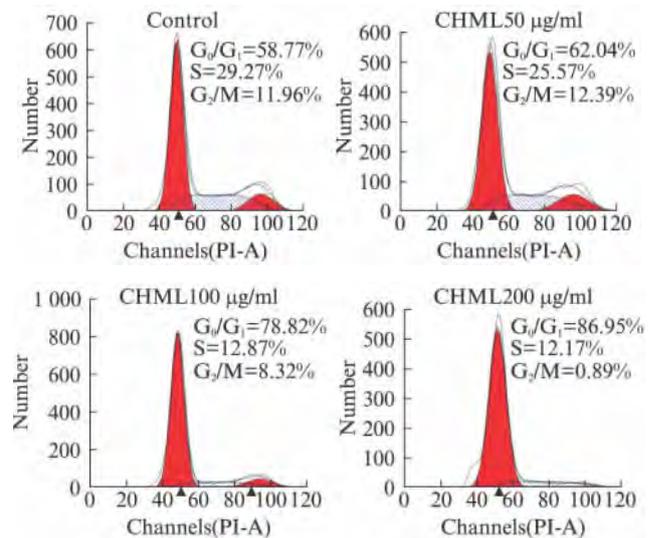


图 2 不同浓度的 CHML 对 U87 细胞细胞周期分布的影响
Fig.2 Effects of CHML on cell cycle of U87 cells with different concentration

2.4 CHML 对 U87 细胞的凋亡相关蛋白和 G₁ 期周期相关蛋白表达的影响

随着 CHML 浓度的逐渐升高,凋亡相关蛋白中的 Bax 和 Caspase 3 的表达也逐渐增加,Bcl-2 的表达逐渐降低,同时 G₁ 期周期相关蛋白 Cyclin D1 和 CDK6 的表达则逐渐下降,p21 的表达增高,见图 3。

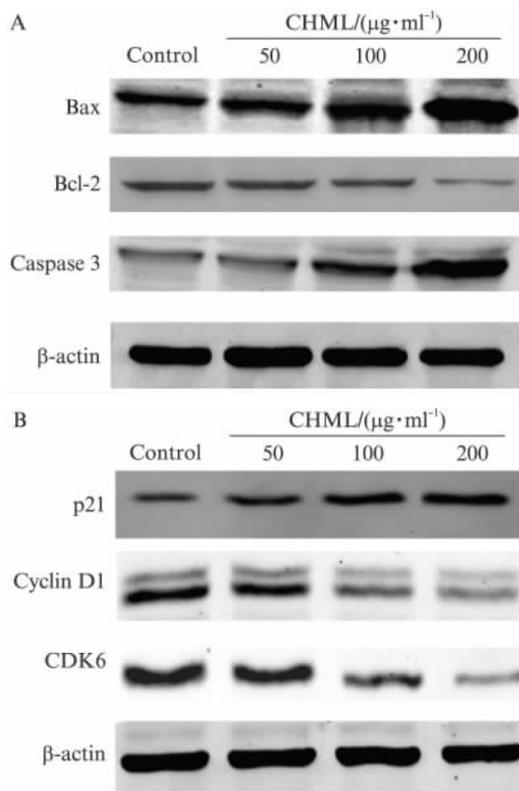


图3 不同浓度的CHML对凋亡相关蛋白和G₁期相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of CHML on expression of apoptosis-and G₁ phase-associated proteins with different concentration

A: 凋亡相关蛋白的表达; B: G₁期相关蛋白的表达

3 讨 论

CHML作为一种脂质类抗癌新药,是针对增殖的癌细胞比正常细胞需要更多脂质维持其生长的特性设计的。其所有组分是通过脂质活化方式从天然产物中分离获得的,包含有80%的不饱和脂肪酸、15%饱和脂肪酸、4%脂溶性维生素和1%异三十烷^[3]。Zhan等^[1]的研究表明,CHML可以抑制多种肿瘤细胞(乳腺癌细胞MCF-7、结肠癌细胞RKO、白血病细胞ML-1、肾癌细胞G410)的增殖,以及诱导这些肿瘤细胞发生凋亡,并通过和人正常细胞(皮肤成纤维细胞AG155,人淋巴母细胞GM536)的毒性实验对比,显示出CHML对正常细胞的低毒性和对肿瘤细胞的敏感性。Zhan等^[4]通过裸鼠体内用药,表明CHML能够明显抑制乳腺肿瘤的生长。Chen等^[3]的研究显示,通过临床二期试验,对肝癌患者进行动脉或静脉内注射用药,CHML可以明显

提高肝癌患者的生存期。研究^[2,5]表明,CHML可以抑制SHG-44脑胶质瘤细胞的增殖和鼠脑胶质瘤的生长,但对于CHML抑制胶质瘤细胞增殖的机制仍不清楚。本研究表明,CHML能够抑制U87人脑胶质瘤细胞的增殖,且抑制作用呈时间和浓度依赖效应。

细胞凋亡和细胞周期阻滞是调控细胞生长的两种主要机制^[6]。细胞凋亡是多细胞生物去除机体内不需要的或异常的细胞,以维持内环境稳定的一种基本生物学现象。许多抗肿瘤药物或具有肿瘤抑制作用的化合物都可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而达到抑制肿瘤的发生和发展。流式细胞凋亡分析结果显示,CHML诱导U87胶质瘤细胞发生凋亡,并且凋亡率随着CHML浓度的增加而升高。

线粒体在细胞凋亡过程中发挥着决定性的作用。细胞凋亡的线粒体途径可通过Bcl-2基因家族中的促凋亡基因(如Bax)水平与抗凋亡基因(如Bcl-2)水平之间的平衡来调控^[7]。Bcl-2可通过阻止线粒体细胞色素C的释放来发挥抗凋亡作用,而Bax则可以通过破坏线粒体膜的完整性发挥促凋亡作用^[8]。Bcl-2/Bax比值可调节线粒体凋亡途径,决定细胞最终是否走向凋亡^[9]。当Bcl-2/Bax比值下降,线粒体内的细胞色素C释放入胞浆,从而激活上游凋亡蛋白Caspase 9的表达,活化的Caspase 9又激活其下游终末凋亡蛋白Caspase 3,最终诱发细胞凋亡^[10]。本研究中,Western印迹法检测结果显示,CHML可引起U87细胞内Bax和Caspase 3蛋白的表达升高,Bcl-2蛋白表达降低。以上结果提示,CHML可能是通过线粒体途径诱导U87细胞发生凋亡,从而抑制胶质瘤细胞的增殖。

目前认为,肿瘤属于细胞周期性疾病,如能对肿瘤细胞的生长周期中的检查点进行调控,使其产生周期阻滞,将对抑制肿瘤增殖、延缓肿瘤发展产生有利影响^[11]。细胞周期中检查点调控的核心是细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)和细胞周期蛋白(Cyclin)一起构成的复合体驱动真核细胞周期不断运行。Cyclin D1-CDK4/CDK6驱动细胞由G₀期进入G₁期,而细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKIs)p21^{Cip1/waf1}则可引起Cyclin/CDK复合体失活,从而使细胞阻滞于G₁期^[12-14]。流式细胞周期分析显示,U87细胞经CHML作用后阻滞于G₁期,

且呈浓度依赖性。本研究还发现在 G_1 期阻滞过程中 p21 蛋白表达增高。因为 p21 被认为是 Cyclin/CDK 复合体的抑制剂,进而检测 Cyclins 和 CDKs 蛋白的表达,发现 Cyclin D1 和 CDK6 蛋白表达下降。以上提示 CHML 对 U87 胶质瘤细胞生长的抑制作用,也可能是通过阻滞肿瘤细胞滞留于 G_1 期实现的。

本研究发现,CHML 可以通过诱导细胞凋亡和 G_1 期细胞阻滞,有效地抑制人脑胶质瘤 U87 细胞的增殖,且 CHML 诱导的 U87 细胞凋亡可能是通过线粒体途径实现的。同时,CHML 可以通过下调 Cyclin D1 和 CDK6 表达及上调 p21 表达,引起 G_1 期细胞阻滞以有效地抑制肿瘤细胞增殖。

【参考文献】

- [1] Zhan QM, Xu Z. CHML suppresses cell growth and induces apoptosis in multiple human tumor lines [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(4B): 2893-2900.
- [2] 陈衍城,顾宇翔,王宇倩. 亲细胞非均质分子脂质对人脑胶质瘤细胞系的抑制作用 [J]. *中国癌症杂志*, 2002, 12(1): 57-64.
- [3] Chen XC, Yu B, Dong JC, et al. A phase II clinical trial with cytotoxic heterogeneous molecular lipids (CHML) for patients with hepatic malignancies [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(3B): 1593-1600.
- [4] Zhan QM, Zhao SC, Xu Z. Antitumor activity of cytotoxic heterogeneous molecular lipids (CHML) on human breast cancer xenograft in nude mice [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(4A): 2477-2482.
- [5] 顾宇翔,陈衍城,徐宏志,等. 亲细胞非均质分子脂质对鼠脑胶质瘤局部治疗的研究 [J]. *中国临床神经科学*, 2003, 11(4): 367-369.
- [6] King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 601-617.
- [7] Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(1): 61-66.
- [8] Xu Y, Chiu JF, He QY, et al. Tubeimoside-1 exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1585-1593.
- [9] Streffer JR, Rimmer A, Rieger J, et al. Bcl-2 family protein modulate radio sensitivity in human malignant glioma cells [J]. *J Neurooncol*, 2002, 56(1): 43-49.
- [10] Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex [J]. *Cell*, 1996, 85(6): 817-827.
- [11] Pan J, She M, Xu ZX, et al. Farnesyltransferase inhibitors induce DNA damage via reactive oxygen species in human cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3671-3681.
- [12] Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21 [J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6(4): 387-400.
- [13] Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G_1 -phase progression [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1501-1512.
- [14] Hengst L, Gopfert U, Lashuel HA, et al. Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21 (Cip1) [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(24): 3882-3888.