文章编号:1000-5404(2009)06-0545-03

论著

羧基-D-氨基葡萄糖对人食管癌Eca-109细胞caspase-3活化及bcl-2蛋白表达的影响

吴 静[1,2],强占荣[2],林香春[1],杨国栋[2],周永宁[2],王爱勤[3],薛群基[3] ([1]北京世纪坛医院,北京大学第九临床医学院消化科,北京 100038; [2]兰州大学第一医院消化科, 兰州 730000; [3]中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000)

摘 要: 目的 探讨D-氨基葡萄糖衍生物2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖(COPADG)对人食管癌Eca-109细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法** 体外培养Eca-109细胞;倒置显微镜下观察细胞形态学变化;流式细胞术检测COPADG作用后Eca-109细胞内半胱氨酸酶3(caspase-3)活化程度及bcl-2蛋白表达的变化;Annexin V/PI染色结合流式细胞术检测COPADG作用后Eca-109细胞凋亡率。**结果** COPADG作用显著增加Eca-109细胞凋亡率,且Eca-109细胞内caspase-3活性和bcl-2表达平均荧光强度明显增高。**结论** COPADG能显著诱导Eca-109细胞凋亡发生,并使Eca-109细胞内caspase-3显著活化以及bcl-2蛋白表达下调,并可能通过该机制诱导细胞凋亡的发生。

关键词: 2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖;食管癌;凋亡;bcl-2;半胱氨酸酶3
中图法分类号: R730.23;R735.1;R977.6 **文献标识码**: A

Effect of 2-((3-carboxy-1-oxopropyl)amino)-2-deoxy-D-glucose on Caspase-3 activation and Bcl-2 expression in human esophageal cancer cell line Eca-109

WU Jing[1,2], QIANG Zhan-rong[2], LIN Xiang-chun[1], YANG Guo-dong[2], ZHOU Yong-ning[2], WANG Ai-qin[3], XUE Qun-ji[3] ([1]Department of Gastroenterology, Ninth Clinic Medicine College of Beijing University, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, [2]Department of Gastroenterology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, [3]Lanzhou Institute of Chemical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of D-glucosamine 2-((3-carboxy-1-oxopropyl)amino)-2-deoxy-D-glucose (COPADG) on apoptosis and caspase-3 activation and bcl-2 protein expression in human esophageal cancer Eca-109 cells and discuss the possible mechanisms. **Methods** Eca-109 cells were cultured *in vitro*, then exposured to 0.03 mmol/L COPADG for different time periods. The cell morphological changes were observed by inverted phase contrast microscopy. Caspase-3 activity and bcl-2 expression were detected by flow cytometry, and apoptosis rate was analyzed by Annexin V/PI fluorescence staining together with flow cytometry. **Results** COPADG could significantly induce Eca-109 cells to apoptosis, and increase mean fluorescence intensity of caspase-3 and bcl-2 protein expressions in the cells. **Conclusion** COPADG induces the apoptosis of human esophageal cancer cell line Eca-109, as well as the activation of caspase-3 and the downregulated expression of bcl-2 protein. This may not an unique mechanism in COPADG-induced apoptosis.

Key words: 2-((3-carboxy-1-oxopropyl)amino)-2-deoxy-D-glucose; esophageal cancer; apoptosis; bcl-2; caspase-3

近年来研究表明D-氨基葡萄糖衍生物具有较强的抑制肿瘤作用,对人体正常细胞毒性很小,具有较大的潜在临床应用价值[1]。2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖[2-(3-carboxy-1-oxopropyl)amino-2-deoxy-D-glucose, COPADG]是一种含羧基侧链的D-氨基葡萄糖衍生物。本课题组在体外研究试验中发现COPADG能够显著诱导人食管癌Eca-109细胞、人肝细胞癌HepG2细胞、人结肠癌细胞SW1116细胞凋亡[2-4],但诱导细胞凋亡的内在机制仍不甚明了。研究表明caspase-3的激活与细胞凋亡有密切关系[5]。

基金项目:中国科学院西部之光项目(CX805)
Supported by the Projects for Western Researchers by Chinese Academy of Sciences (CX805)

作者简介:吴 静,女,河北省唐山市人,博士,主任医师,教授,主要从事消化道肿瘤基础与临床方面的研究。电话:(010)63926370,E-mail:wujing36@163.com

收稿日期:2008-07-08;**修回日期**:2008-09-01

Bcl-2 为重要的抗凋亡蛋白,对细胞凋亡担负着重要的调控作用,可以抑制多种机制引起的细胞凋亡[6,7]。本研究观察 COPADG 对人食管癌 Eca-109 细胞增殖和凋亡的影响及其作用后 Eca-109 细胞内 caspase-3 活化及 bcl-2 蛋白表达的改变,从体外细胞学实验的角度来研究 COPADG 抗人食管癌的作用并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人管癌细胞系 Eca-109 由兰州大学第一医院中心实验室保存;COPADG 由中国科学院兰州化学物理研究所合成并惠赠,分子式为:C10H17NO8,用 RPMI1640 培养液配成所需浓度的工作液,过滤除菌,4 ℃保存;AnnexinV/PI 双标试剂盒(奥地利 Bender Medsystems 公司),caspase-3 活性检测试剂盒(美国 Biovision 公司),FIX/PERM(Caltag 公司),Mouse IgG1 FITC、Bcl-2-FITC(BD Pharmigen 公司),EPICS XL 型流式细胞仪(美国 Beckman coulter 公司),WALLAC 1420 型多功能时间分辨仪(芬兰 Victor 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人食管癌 Eca-109 细胞用含小牛血清的 RPMI1640 全培养液(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)在饱和湿度、37 ℃、50 ml/L CO_2孵箱中培养传代。

1.2.2 实验分组 实验分为 2 组:COPADG 组加入 30 μmol/L 的 COPADG;同等条件下设一未加药对照组,每组设 2 个平行组。

1.2.3 细胞形态学观察 药物作用各组细胞 24、48 h 后,倒置相差显微镜 200 倍下观察细胞形态学变化,拍照。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 按 AnnexinV-FITC/PI 双标试剂盒说明操作,分别于处理 24、48 h 后收集细胞,PBS 洗涤,用结合缓冲液调整细胞数为 1×10^6/ml,取 100 μl 细胞悬液,加入 5 μl AnnexinV-FITC,随后加入 195 μl 结合缓冲液,混匀,室温避光孵育 15 min,PBS 洗涤 1 次,弃上清;加入 10 μl PI 及 190 μl 结合缓冲液,避光、冰浴 5 min;上机检测,Cell Quest 软件分析各组细胞 AnnexinV-FITC 和 PI 染色细胞百分含量。

1.2.5 流式细胞术检测细胞 caspase-3 活性 按 caspase-3 活性检测试剂盒说明操作。分别于作用 24、48 h 后收集处理组及对照组细胞,PBS 洗涤,吹打成单细胞悬液,控制细胞数在 1×10^6/ml;取 300 μl 细胞悬液,加入 1 μl 荧光底物(FITC-DEVD-FMK),37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育 30 min;3 000 r/min 离心细胞,弃上清;以 500 μl 洗涤缓冲液洗涤细胞 2 次,弃上清;再用 300 μl 洗涤缓冲液重悬细胞,冰浴 5 min;上流式细胞仪检测,Cell Quest 软件分析各组染色阳性细胞的平均荧光强度。每组测得的平均荧光强度(MFI)反映细胞内 caspase-3 的活性。

1.2.6 流式细胞术检测细胞 bcl-2 蛋白表达 各组处理 24 h 后分别收集 1×10^6细胞,按 FIX/PERM 试剂盒说明书处理,每组分别加入 100 μl Reagent A(固定剂) 室温孵育 15 min,含 5% FBS 的 PBS 洗 1 次,300 r/min 离心 5 min;每组加入 100 μl Reagent B(渗透剂),并分别加入抗 Bcl-2-FITC 及阴性对照(Mouse IgG1 FITC),混匀,室温孵育 20 min,含 5% FBS 的 PBS 洗 1 次,300 r/min 离心 5 min,弃上清,1% 多聚甲醛重悬后流式细胞仪检测。Cell Quest 软件分析各组 bcl-2 蛋白表达的阳性率和 MFI。

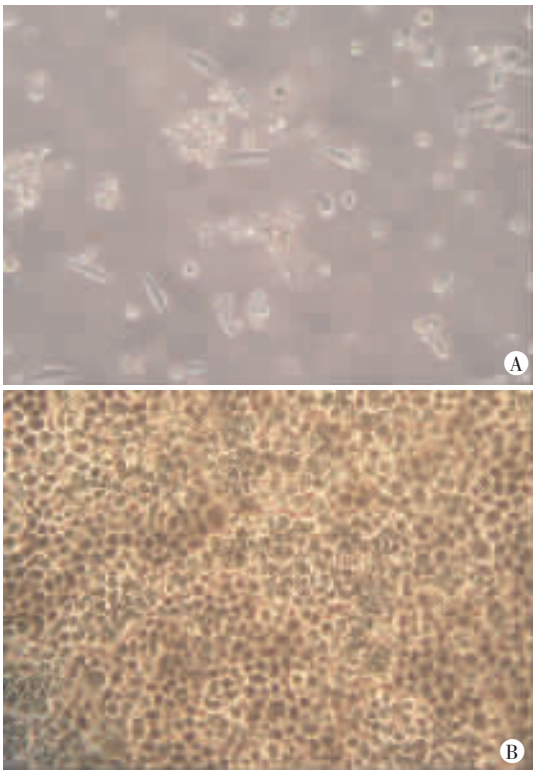
1.3 统计学处理

以 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,计量结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD t 检验。

2 结果

2.1 细胞形态学变化

倒置相差显微镜下观察,药物处理 24 h 后,COPADG 组细胞出现贴壁不良,作用 48 h 后 COPADG 组出现大量漂浮细胞,胞膜皱缩发泡,细胞固缩成圆形或卵圆形。对照组细胞生长良好,贴壁,密集(图 1)。



A:COPADG 组; B:对照组

图 1 各组 Eca-109 细胞(48 h)形态学观察 (倒置相差显微镜×200)

2.2 COPADG 对 Eca-109 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测显示,药物作用 24、48 h 后,COPADG 组细胞凋亡率分别为(51.7±1.3)%、(66.5±4.0)%,对照组细胞凋亡率分别为(3.4±0.3)%、(3.6±0.4)%,前者明显高于后者,各时间段 2 组之间比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。COPADG 组随着COPADG作用时间延长凋亡率进一步升高。

2.3　COPADG 对 Eca-109 细胞内 caspase-3 活性的影响

流式细胞术检测显示,药物作用 24、48 h 后,COPADG 组细胞内 caspase-3 平均荧光强度分别为(6.5 ± 0.4)、(36.2 ± 1.1),对照组细胞内 caspase-3 平均荧光强度分别为(1.8 ± 0.1)、(1.9 ± 0.0),前者明显高于后者,各时间段 2 组之间均存在统计学差异($P < 0.01$);随着 COPADG 作用时间延长,caspase-3 平均荧光强度进一步升高,作用 48、24 h 比较存在统计学差异($P < 0.01$)。

2.4　COPADG 对 Eca-109 细胞 bcl-2 蛋白表达的影响

流式细胞术检测显示,药物作用 24 h 后,COPADG 组细胞 bcl-2 蛋白表达的阳性率(PR)和 MFI 分别为(70.1 ± 2.7)% 和(2.0 ± 0.1),均明显低于对照组的(85.4 ± 3.3)% 和(3.5 ± 0.3),2 组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3　讨论

细胞凋亡是一个多基因参与的、复杂的生命过程,Bcl-2 是重要的抗凋亡成员,它可能通过抑制氧化应激,影响细胞钙内流,以及稳定线粒体膜电位、抑制线粒体细胞色素 C 的释放和通过抑制半胱氨酸酶活性等多种机制来抑制细胞凋亡的发生[6,7]。经典的细胞凋亡通路有 2 条,即死亡受体通路和线粒体通路,最后都激活半胱氨酸酶蛋白酶家族导致凋亡的发生[6]。研究表明 caspase-3 是细胞凋亡发生和调控机制中最重要的组成部分,是凋亡途径下游进行底物酶解的关键蛋白酶[5]。

本研究通过细胞形态学观察、流式细胞术分析显示:COPADG 能够有效诱导人食管癌 Eca-109 细胞凋亡,同时显著诱导 Eca-109 细胞内 caspase-3 活化;能明显降低 Eca-109 细胞内 bcl-2 蛋白表达。本课题组前期的研究中已发现,随着 COPADG 作用浓度增加,线粒体膜电位呈下降趋势[8]。因此,可推测 COPADG 可能通过下调 bcl-2 蛋白表达,进而打破线粒体膜电位的稳定性,引起细胞色素 C 的释放并最终激活 caspase-3 诱导 Eca-109 细胞凋亡的发生。但本研究结果显示 COPADG 诱导的 Eca-109 细胞内 caspase-3 活化水平与细胞的凋亡率之间并不完全平行。由此提示 COPADG 诱导人食管癌 Eca-109 细胞凋亡过程中可能还有其他凋亡信号转导系统的参与,bcl-2 蛋白表达下调及 caspase-3 活化在 COPADG 诱导 Eca-109 细胞凋亡过程中发挥着重要作用,但并非唯一的作用机制。

参考文献:

[1] 乔　岩, 王　丽, 王爱勤. D-氨基葡萄糖的化学修饰及其在生物医药领域的应用[J]. 中国海洋药物, 2003, 22(6): 51 - 55.

[2] Wu J, Lu H, Zhou Y, *et al*. Effect of 2-(3-carboxy-1-oxopropyl) amino-2-deoxy-D-glucose on human esophageal cancer cell line[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (22): 3380 - 3381.

[3] Wu J, Kou W, Gao M T, *et al*. Effects of {2-[(3-carboxy-l-oxoprogy1) amino]-2-deoxy-D-glucose} on human hepatocellular carcinoma cell line[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (5): 635 - 640.

[4] 寇　炜, 吴　静, 赵　晋, 等. D-氨基葡萄糖衍生物诱导人结肠癌 SW1116 细胞凋亡的形态学变化[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(18): 1636 - 1638.

[5] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death[J]. Physiol Rev, 2007, 87 (1): 99 - 163.

[6] Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2007, 92(1): 81 - 94.

[7] Gustafsson A B, Gottlieb R A. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C45 - C51.

[8] 吴　静, 杨国栋, 强占荣, 等. 羧基-D-氨基葡萄糖衍生物对人食管癌 Eca-109 细胞线粒体膜电位的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(3): 230 - 231.

(编辑　栾　嘉)

第六届全军手外科学术会议暨全国手外科新进展学习班通知

由中华医学会手外科学会、军队显微外科专业委员会手外科专业组、《人民军医》杂志编辑部联合主办,解放军 153 医院全军创伤骨科中心承办的"第六届全军手外科学术会议暨全国手外科新进展学习班",定于 2009 年 4 月 15 ~ 19 日在河南省郑州市嵩阳饭店举行。届时中国工程院王澍寰、顾玉东院士,中华医学会手外科分会主任委员徐建光、显微外科分会主任委员侯春林及田光磊、程国良等多位知名专家教授到会授课。会议及学习班授予国家继续教育Ⅰ类学分;交流论文将择优在国家科技论文统计源期刊《人民军医》杂志上发表,或编辑出版《人民军医》杂志专刊。欢迎全国和全军同道赴会。

通信地址:河南省郑州市郑上路解放军 153 医院全军创伤骨科中心手外科　　邮编:450042

E-mail:zmw153@126.com　　**联系电话**:(0371)60645230

中华医学会手外科分会、全军手外科专业学组

《人民军医》杂志编辑部、中国人民解放军创伤骨科中心