

细胞周期蛋白依赖激酶 Roscovitine 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡及其机制的研究

张海华¹ 孟瑾² 张峰^{2△}

(1 第四军医大学口腔医学系 2 第四军医大学药学院药理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)抑制剂 Roscovitine(Ros)诱导非小细胞肺癌(NSCLC)A549 细胞凋亡及其作用机制。方法 :以不同浓度 Ros(10 μ M、20 μ M、40 μ M)处理细胞 24h ,采用 Annexin V-PI 染色以流式细胞仪检测细胞凋亡 ,Western blot 法检测胞浆中和线粒体促凋亡蛋白 Bax 和 Bad 的表达 ,流式细胞仪检测线粒体膜电位(MMP)变化。结果 :Ros 以剂量依赖的方式诱导 A549 细胞凋亡 ,同时 Bad 和 Bax 在胞浆的含量随着 Ros 剂量的增加而减少 ,而在线粒体中却出现相反的结果 ,线粒体膜电位随 Ros 剂量的增大而降低。结论 :Ros 可通过促进 Bax 和 Bad 由胞浆向线粒体易位 ,诱导 NSCLC A549 细胞由线粒体途径发生凋亡。

关键词 Roscovitine; 肺癌细胞 细胞凋亡 ;Bax; Bad

中图分类号 R734.2 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)20-3835-03

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Roscovitine-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells and Its Mechanisms

ZHANG Hai-hua¹, MENG Jin², ZHANG Feng^{2△}

(1School of Clinical Medicine and Stomatology; 2Department of Pharmacology, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of cyclin dependent kinase inhibitor roscovitine (Ros)-induced apoptosis on non-small cell lung cancer A549 cells and its mechanisms. **Methods:** A549 cells were exposed to varying concentrations of Ros for 24h. Apoptosis was detected with Annexin V-PI staining by flow cytometry. The expression of pro-apoptotic protein Bax and Bad in cytoplasm and mitochondria was detected by western blot. The changes of mitochondrial membrane potential (MMP) were analyzed by flow cytometry. **Results:** Roscovitine could effectively induce apoptosis and this effect increased with the increasing of the drug concentration. The expression levels of Bax and Bad in the cytosol declined with Ros treatment, while increased in the mitochondria, and which was in a dose-dependent manner. Ros also caused decreasing of MMP dose-dependently. **Conclusions:** Ros induced apoptosis in A549 cells in a dose-dependent way by facilitating mitochondrial translocation of Bax and Bad, thus activating mitochondrial apoptotic pathway.

Key Words: Roscovitine; Non-small cell lung cancer; Apoptosis; Bax; Bad

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3835-03

前言

肺癌在世界癌症患者中是头号杀手 ,而非小细胞肺癌在肺部的恶性肿瘤中占有 80%。尽管早期肺癌可能通过手术切除得到治愈 ,但是复发率仍旧很高并且通常仅能在晚期才被发现。一般认为肿瘤的发生是由于单个细胞的转化导致其过度增殖引起 ,凋亡信号的失调在其中发挥了重要的作用 ,这为针对肺癌细胞凋亡途径的治疗策略提供了理论基础。

细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂 roscovitine(Ros)对癌细胞增殖具有阻遏作用 ,目前已经进入临床试验阶段。Ros

是一个小分子 ,它通过直接在 APT 结合区的竞争作用来抑制 CDK。尤其对 CDK1、CDK2 和 CDK5 具有激活作用 ,并诱导处于 G1 期与 G2-M 期的细胞发生凋亡^[1]。

促凋亡蛋白 Bad^[2]和 Bax^[3]在线粒体与胞浆之间的易位参与了细胞凋亡的调节作用。其促凋亡机制为 :正常生理状态下磷酸化的 Bad 与 14-3-3 结合组成无活性的复合物。接受凋亡刺激后 ,钙调磷酸酶等诱导 Bad 去磷酸化 ,去磷酸化的 Bad 与分子伴侣蛋白 14-3-3 解离 ,Bad 从构成性结合的 Bcl-xL-Bax 二聚体中置换并释放促凋亡的 Bax^[4] ,Bax 移位到线粒体 ,促使线粒体释放细胞色素 c 和凋亡诱导因子(AIF) ,引起 Caspase 级联反应导致细胞凋亡^[5]。本文旨在研究 Ros 诱导 A549 细胞凋亡作用及其对 Bad 与 Bax 活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

Roscovitine 和 DMSO 均购自美国 Sigma 公司 ,DMEM 购

作者简介 张海华(1989-) ,男 ,本科学员 ,临床医学专业。E-mail: 15829710072@126.com

△通讯作者 张峰(1970-) ,女 ,博士 ,副教授 ,硕士生导师 ,研究方向 肿瘤细胞周期与凋亡调控。

Tel :15829383623, E-mail: zhangf37@yahoo.cn

(收稿日期 2011-05-10 接受日期 2011-05-31)

自美国 Gibco 公司 ;Annexin V-FITC 购自美国 BD Pharmingen 公司 ;Bad 和 Bax 抗体购自 Santa Cruz 公司 ;辣根过氧化物酶购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

A549 细胞在 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下用含 10%新生牛血清、10mg/ml 抗生素 (青霉素与链霉素)、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基中培养。将 Ros 溶于 DMSO 中,并用终浓度为 10μM、20μM 和 40μM 的 Ros 处理细胞,对照组加用相同体积的 DMSO 时间为 24h。

1.3 AnnexinV-FITC 和 PI 染色

经过不同的处理后,用胰蛋白酶消化细胞,然后经 PBS 洗涤两次,重悬于 100μL 结合缓冲液中,该缓冲溶液含有 10mM HEPES,140 mM NaCl 和 2.5 mM CaCl₂ pH 7.4,以 5μL Annexin V-FITC 和 5μL PI 染液进行染色。以流式细胞仪采用 Cell Quest 程序进行分析,分别以 FL1 和 FL2 表示 Annexin V-FITC 和 PI 染色阳性细胞。

1.4 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位(MMP)的变化

通过 MitoTracker 染料以流式细胞仪对 MMP 进行检测,该染料可聚集于正常线粒体,而当线粒体受损膜电位下降时染色减弱或消失。在使用前将染料溶解于 DMSO 并经 PBS 进行稀释,加入培养的活细胞培养液中处理 45 分钟后,经胰蛋白酶消化细胞。然后用 PBS 洗涤细胞两次,细胞样品通过流式细胞仪 Cell Quest 程序进行检测,以 FL2 表示染色强度。

1.5 Western blot 检测

经过不同剂量 Ros 处理 A549 细胞 24h,裂解细胞,裂解液为 250 mM sucrose,70 mM KCl,137 mM NaCl,4.3 mM Na₂HPO₄,1.4 mM KH₂PO₄(pH 7.2),200 μg/ml digitonin,100 mM PMSF 和 1:25 的蛋白酶抑制剂。裂解产物冰浴 30 分钟后 4℃、14000rpm 离心 30 min。取上清液,获得胞浆蛋白。而后将其溶解于含有 1% SDS 的裂解液中,以获取线粒体片段。Bradford 法测定蛋白浓度,取 20μg 的蛋白上样,SDS-PAGE 电泳,然后转移到硝酸纤维膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 1 小时,将 NC 膜先后与第一抗体 Bax、Bad、COX IV 和 Actin 抗体 4℃孵育过夜,PBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10min,加入 1:5000 稀释的第二抗体室温孵育 1 小时,再次洗膜共 3 次,每次 10min。用 ECL (enhanced chemiluminescence) 化学发光试剂盒检测蛋白的表达。

1.6 统计学处理

所有的数据均以 s 表示,两组均值的比较用非配对 t 检验,P<0.05 表示两组差别具有显著性的意义。

2 结果

2.1 Roscovitine 诱导 A549 细胞凋亡

Ros 可以在某些肿瘤细胞中引起凋亡^[6-7],本研究首先在 A549 细胞中确定 Ros 确实存在诱导肺癌细胞凋亡的作用。A549 细胞以不同浓度 Ros 处理 24h,以 Annexin V 阳性细胞代表凋亡细胞。结果如图 1 所示,早期凋亡细胞(Annexin V+ 和 PI-)显示在图中右下象限,而晚期凋亡的细胞(Annexin V+ 和 PI+)显示在右上象限。与对照组相比,10μM 的 Ros 对凋亡无明显影响,而 20μM 和 40μM 的 Ros 可以显著的诱导 A549 细

胞凋亡(P<0.01),呈剂量依赖性。

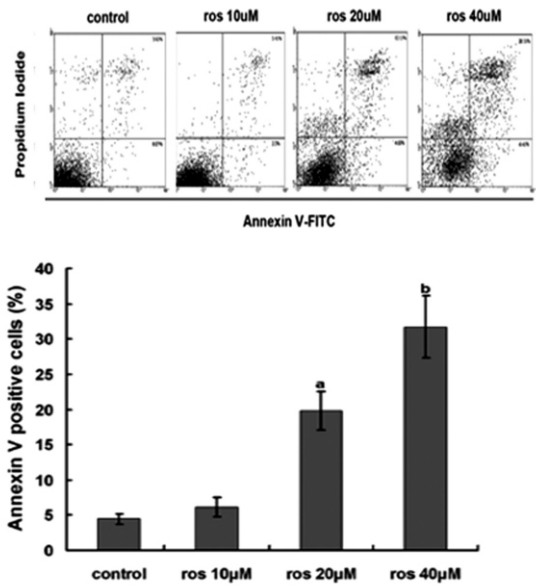


图 1 A549 细胞经不同剂量 roscovitine(10μM、20μM 和 40μM)处理 24h 后,用流式细胞仪通 Annexin V-FITC 和 PI 染色检测凋亡($\bar{x} \pm s$, n=3) ^aP<0.01 vs 对照组 ^bP<0.01 vs ros 20μM

Fig. 1 A549 cells were treated with DMSO as vehicle control or roscovitine(ros)10μM、20μM and 40μM for 24h. Apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC and PI staining with flow cytometry. ($\bar{x} \pm s$, n=3), compared to control group, aP<0.05; compared to ros 20μM group, bP<0.01

2.2 Roscovitine 促进胞浆中 Bax 和 Bad 向线粒体转位

Ros 处理细胞 24h 后,提取各组蛋白,Western blot 法检测胞浆和线粒体组分中 Bax 和 Bad 的蛋白表达水平。结果如图 2,对照组和 Ros10μM 组胞浆中可检测到 Bax 和 Bad,但线粒体中未检测到两种蛋白表达,而 Ros20μM 和 40μM 处理组均检测到线粒体 Bax 和 Bad 蛋白,且蛋白水平随 Ros 浓度增高而增高,表明一定浓度的 Ros 可促进 Bax 和 Bad 由胞浆向线粒体转位。

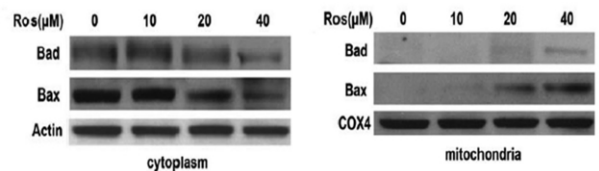


图 2 Western blot 检测经 roscovitine 处理过的 A549 细胞中 Bad 与 Bax 在胞浆和线粒体组分中的水平

Fig. 2 The expression levels of Bax and Bad in cytosol and mitochondria were detected by western blotting using the antibodies against Bax and Bad. Actin and Cox IV blots were used as cytosolic and mitochondrial protein loading control, respectively

2.3 Roscovitine 诱导 MMP 下降

MMP 的降低在诱发凋亡过程中扮演了重要的角色,MMP 下降可以使线粒体膜通透性显著增加,导致许多重要的促凋亡蛋白从线粒体基质内扩散到胞浆进而诱发凋亡。本实验发现经 20μM 和 40μM 的 Ros 处理后引起细胞 MMP 显著下降(P<0.01),并呈浓度依赖性(图 3)。

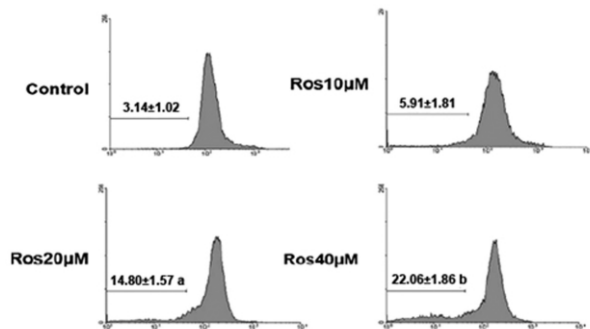


图3 A549细胞经不同剂量(10 μ M、20 μ M、40 μ M)的 roscovitine 处理后,应用流式细胞仪检测细胞中MMP的变化($\bar{x} \pm s$, n=3) aP<0.01 vs 对照组 bP<0.01 vs ros 20 μ M

Fig. 3 A549 cells were exposed to varying concentrations(10 μ M、20 μ M、40 μ M) of roscovitine (Ros), MMP changes was measured by flow cytometry. ($\bar{x} \pm s$, n=3), compared to control group, aP<0.05; compared to ros 20 μ M group, bP<0.01

3 讨论

肿瘤的形成是一个复杂的、多步骤的过程,凋亡系统的失活在其中扮演了重要的角色,因此研究癌细胞的凋亡途径及其机制对抑制癌症的发生、癌症患者的治疗、提高癌症患者的生存率至关重要。

据相关文献的报道将 Ros 应用在一些类型的肿瘤中具有诱导癌细胞凋亡的作用,这其中就包括 Ewing 肉瘤^[8]、前列腺癌^[9]、乳腺癌^[10]和白血病^[11]等。本实验首先证实 Ros 以剂量依赖的方式引起 NSCLC A549 细胞凋亡,有效的起始浓度为 20 μ M。在凋亡过程中,线粒体途径可以被多种损伤信号激活,MMP 下降是线粒体损伤的标志,可使线粒体膜通透性显著增加,导致许多重要的促凋亡蛋白从线粒体基质内扩散到胞浆,其中包括细胞色素 c 和 AIF,进而导致 Caspase-9 的活化和下游 Caspase-3 的激活。在人类 MCF-7 乳腺癌细胞,已证明 Ros 通过促进线粒体损伤以及细胞色素 c 和 AIF 的释放诱导细胞凋亡^[12]。

生理状态下,Bad 与 Bax 主要存在于胞浆之中。虽然在线粒体上也发现有部分 Bax 存在,但 Bax 分子并非插入线粒体外膜内而是附着于线粒体表面^[13]。Bad 游离于胞浆而不是固定于线粒体外膜,不含信号锚定蛋白的结构特点决定了它接受多种细胞外传入的信号,并传递到线粒体外膜与其他 Bcl-2 家族成员相互作用,从而调节细胞的生长或凋亡^[14]。本实验中,对照组的 Bad 和 Bax 在胞浆中均有表达,而在线粒体未检测到,这验证了上述蛋白生理状态细胞内分布。

目前尚未明确 Ros 如何活化 Bax 和 Bad 蛋白,有研究表明蛋白激酶 B (PKB)/AKT 的激活可以通过磷酸化 Bad 和 Bax 介导抑制凋亡的生存信号^[15]。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT 生存信号转导通路作为重要的细胞生存通路,在促进细胞生长、增殖、抑制细胞凋亡等方面起着重要作用。AKT 可诱导 Bad 分子中丝氨酸 Ser155 磷酸化^[16],抑制细胞凋亡。Bad 在内源性线粒体凋亡途径中发挥了重要作用^[16-18],凋亡信号及其他细胞损伤信号均通过 Bad 转呈至线粒体外膜,藉此触发 Caspase 依赖性凋亡进程^[19-21]。凋亡信号可诱导 Bad 去磷酸化,进而发生构象

变化并自转位至线粒体外膜,干扰 Bcl-xL-Bax 聚合物的稳定性,将 Bax 从中置换出来。解离后的 Bax 作用于线粒体外膜形成孔道,导致线粒体膜电位下降和细胞色素 c、AIF 外流,触发整个凋亡事件的发生^[22]。本实验通过 Western blot 检测发现随着 Ros 剂量的升高,Bad 与 Bax 在胞浆中表达减少,在线粒体中表达增加,同时伴有线粒体膜电位下降,说明在 Ros 诱导的凋亡中存在着 Bad 与 Bax 从胞浆到线粒体的转位,然而 Ros 是否通过影响 PI3K 通路进而促进 Bax 与 Bad 活化有待进一步证实。

综上所述,Ros 可诱导 NSCLC 中 A549 细胞凋亡,其机制与 Bad 和 Bax 由胞浆向线粒体的转位进而激活线粒体凋亡途径密切相关。本研究为 CDK 抑制剂用于临床抗肿瘤治疗提供了理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclindependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5[J]. Eur J Biochem, 1997, 243: 527-536
- [2] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. Cell, 1997, 91: 231-241
- [3] Havasi A, Li ZJ, Wang ZY, et al. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a PI3 kinase-dependent mechanism [J]. Biol Chem, 2008, 283: 12305-12313
- [4] Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death [J]. Cell, 1995, 80 (2): 285-291
- [5] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. Science, 2001, 292(5517): 727-730
- [6] Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59: 1903-1910
- [7] Hahtow IN, Schneller F, Oelsner M, et al. Cyclin dependent kinase inhibitor roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells[J]. Leukemia, 2004, 18: 747-755
- [8] Tirado OM, Mateo-lozano S, Notario V. Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 2005, 65: 9320-9327
- [9] Mohapatra S, Chu B, Zhao XH, et al. Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65: 7717-7723
- [10] Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, et al. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer[J]. Int J Cancer, 2002, 106: 486-495
- [11] Mohapatra S, Chu B, Wei S, et al. Roscovitine inhibits STAT5 activity and induces apoptosis in the human leukemia virus type 1-transformed cell line MT-2[J]. Cancer Res, 2003, 63: 8523-8530
- [12] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [J]. Science, 1998, 282: 1318-1321

(下转第 3829 页)

表 1 PSP 对 Molt-4 细胞周期相对移动参数和 DNA 合成时间的影响
Table 1 The effect of PSP on relative movement and DNA synthesis time of the Molt-4 cells

	Time(h)	RM	Ts
Control	12	1.05± 0.01	12.10± 0.58
PSP(0.1 mg/ml)	12	0.61± 0.00*	108.40± 0.22*
Control	24	1.55± 0.01	11.95± 0.43
PSP(0.1 mg/ml)	24	0.65± 0.00*	114.52± 0.31*

数据表示为 mean ± SEM(n=2) ,*,**: P<0.05, 0.01 vs 对照。相对移动参数 $RM(t) = (Flud(t) - FG0/G1)/(FG2/M - FG0/G1)$ Flud(t), FG0/G1 和 FG2/M 分别为 BrdU 标记 t 小时后被 BrdU 标记的未分裂的 S 期细胞(lud) ,G0/G1 期细胞和 G2/M 期细胞的 PI 参数的平均荧光强度(DNA 含量)。DNA 合成时间 $Ts = 0.5 \times t/(RM(t) - RM(0))$ RM(0)和 RM(t) 是 BrdU 标记 t 小时后的相对移动参数 RM(0)设为 0.55。
All data are expressed as mean ± SEM (n=2). *,**: P<0.05, 0.01 vs control. RM, relative movement, $RM(t) = (Flud(t) - FG0/G1)/(FG2/M - FG0/G1)$. Where Flud(t), FG0/G1 and FG2/M are the mean PI fluorescence (DNA content) of the BrdU labelled undivided cells, the G0/G1 and G2/M population at time (t) (hour) after BrdU pulsing. Ts, DNA synthesis time, $Ts = 0.5 \times t/(RM(t) - RM(0))$.RM(0) and RM(t) are the relative movement values at time 0 and t (hour) after BrdU pulsing respectively, RM(0) is estimated to be 0.55.

expression of interleukins-1 beta,-6, and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes [J]. J Altern Complement Med, 2002, 8 (5): 591-602

[7] Hsieh TC, Wu P, Park S, et al. Induction of cell cycle changes and modulation of apoptogenic/anti-apoptotic and extracellular signaling regulatory protein expression by water extracts of I'm-Yunity (PSP) [J]. BMC Complement Altern Med, 2006, 6: 30

[8] Fogt F, Wan J, O'Hara C, et al. Flow cytometric measurement of cell cycle kinetics in rat Walker-256 carcinoma following in vivo and in vitro pulse labelling with bromodeoxyuridine[J]. Cytometry, 1991, 12 (1): 33-41

[9] 马晓方, 杜晓光, 辛现良, 等. 肿瘤细胞恶性增殖和细胞周期调控改变的分子机制[J]. 现代生物医学进展, 2009(05): 950-953
MA Xiao-fang, DU Xiao-guang, XIN Xian-liang, et al. Molecular mechanism of tumor cell proliferation and cell cycle regulation[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009(05): 950-953

[10] Sears RCAJ. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate[J]. J. Biol. Chem, 2002, 277: 11617-11620

[11] Nimmagadda S, Shields AF. The role of DNA synthesis imaging in cancer in the era of targeted therapeutics [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(4): 575-587

[12] Wan JM, Sit WH, Louie JC. Polysaccharopeptide enhances the anticancer activity of doxorubicin and etoposide on human breast cancer cells ZR-75-30[J]. Int J Oncol, 2008, 32(3): 689-699

[13] Hui KP, Sit WH, Wan JM. Induction of S phase cell arrest and caspase activation by polysaccharide peptide isolated from Coriolus versicolor enhanced the cell cycle dependent activity and apoptotic cell death of doxorubicin and etoposide, but not cytarabine in HL-60 cells[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1): 145-155

[14] Wan JM, Sit WH, Yang X, et al. Polysaccharopeptides derived from Coriolus versicolor potentiate the S-phase specific cytotoxicity of Camptothecin (CPT) on human leukemia HL-60 cells[J]. Chin Med, 2010, 5: 16-21

(上接第 3837 页)

[13] Desagher S, Astrid S, Nicols A, et al. Bid induced conformational changes of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis[J]. J Cell Biol, 1999, 144(5): 891-901

[14] Niquet J, Wasterlain CG. Bim, Bad, and Bax: a deadly combination in epileptic seizures[J]. J Clin Invest, 2004, 113: 960-962

[15] Corvera S, Czech MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction [J]. Trends Cell Biol, 1998, 8: 442-446

[16] Datta SR, Katsov A, Hu L, et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation [J]. MolCell, 2000, 6(1): 41-51

[17] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312

[18] Jung JI, Lim SS, Choi HJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells [J]. JNutr Biochem, 2006, 17(10): 689-696

[19] Kim BC, Mamura M, Choi KS, et al. Transforming growth factor beta1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(5): 1369-1378

[20] Ranta F, Avram D, Berchtold S, et al. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells an effect reversed by exendin-4 [J]. Diabetes, 2006, 55(5): 1380-1390

[21] Grethe S, Cohella N, Di Renzo MF, et al. p38 MAPK downregulates phosphorylation of Bad in doxorubicin-induced endothelial apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(3): 781-790

[22] Xiao D, Singh SV. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2006, 27: 533-540