

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0215-02

## TGF- $\beta$ 1 诱导视网膜母细胞瘤细胞凋亡及对 p53 的影响

闵红波<sup>1</sup>, 楼建华<sup>1</sup>, 王建文<sup>2</sup>, 步世忠<sup>2</sup>(1. 解放军第 455 医院眼科, 上海 200052; 2. 第二军医大学生理教研室, 上海 200433)

转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1), 是一种重要的细胞活性因子, 它对细胞的生长、分化、增殖和凋亡有重要的调节作用<sup>[1]</sup>。有报道, TGF- $\beta$ 1 可诱导多种肿瘤细胞凋亡, 但其细胞内机制则根据肿瘤细胞种类的不同而不同。视网膜母细胞瘤是恶性程度很高的眼底肿瘤, 一旦发现, 目前主要的治疗方法是患眼摘除。即便如此, 预后还是很差。本实验以视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 细胞株 Y79 为对象, 研究 TGF- $\beta$ 1 对 Y79 细胞凋亡的诱导作用, 并探讨其细胞内机制, 以期寻找治疗 Rb 有效的途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

TGF- $\beta$ 1 由瑞典乌普萨拉大学 Marene Landstrom 教授惠赠。溴化四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 二甲基亚砜 (DMSO), 细胞培养液 RPMI-1640, 兔抗人 p53 和磷酸化 p53 (Pp53) 抗体, HRP 标记的羊抗兔抗体均购于美国 Sigma 公司。

#### 1.2 细胞培养

Y79 细胞株引自美国国家组织细胞中心 (ATCC), Y79 细胞浓度为  $10^6$ /ml, 在 37°C, 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 1.3 TGF- $\beta$ 1 对 Y79 细胞增殖的影响

Y79 细胞 ( $10^6$ /ml) 中加入 TGF- $\beta$ 1 (1, 5, 10 ng/ml), 每剂量设 3 复孔, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 h, 12 h, 24 h 及 36 h。1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每孔加 RPMI-1640 (含 10% FCS) 190  $\mu$ l 和 MTT (5 mg/ml) 溶液 10  $\mu$ l, 再培养 4 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ l, 充分吹打, 酶标仪测定 A<sub>570</sub> 值。

细胞增殖抑制率 (%) =

$$\frac{\text{对照组 } A_{570} \text{ 值} - \text{实验组 } A_{570} \text{ 值}}{\text{对照组 } A_{570} \text{ 值}} \times 100\%$$

#### 1.4 DNA 片段凝胶电泳测定<sup>[2]</sup>

以 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 处理 Y79 细胞并经 PBS 洗涤后加入细胞溶解液, 4°C 孵育 10 min, 10 000 r/min 离

心, 取上清液加入 2  $\mu$ l RNaseA (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 37°C 孵育 1 h, 再加入 2  $\mu$ l 蛋白酶 K (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 37°C 孵育 1 h, 加入 5 mol/L NaCl 和异丙醇 -20°C 过夜, 离心, 加入 TE 溶解 DNA, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.5 细胞周期分析和凋亡细胞测定

按文献<sup>[3]</sup>方法, 所用流式细胞仪为 Epics Elite (美国), 汞激光激发波长为 488 nm。结果分析软件为 Elite 4.0 和 DNA Multicycle。经 TGF- $\beta$ 1 处理及对照组细胞各  $10^6$ /ml, PBS 洗涤, 以 70% 冷乙醇 4°C 固定 4 h, 离心 (500 r/min, 5 min) 去除乙醇, 加入磷酸-枸橼酸钠 40  $\mu$ l 悬浮细胞, 室温置 30 min, 离心 (500 r/min, 5 min), PBS 100  $\mu$ l 悬浮沉淀细胞, 加入 RNase A 溶液 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 37°C 孵育 30 min, 加入碘化丙锭溶液 50  $\mu$ l (1 mg/ml) 混合, 置暗室 30 min 染色。用流式细胞仪测定细胞周期及凋亡细胞数。

#### 1.6 免疫印迹实验

蛋白质提取和免疫印迹检测参照文献<sup>[4]</sup>进行。 $10^6$ /ml 细胞经冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 溶于 1.0 ml 细胞溶解液中 [2% SDS, 0.15 mol/L NaCl, 10  $\mu$ mol/L Tris (pH7.5), 1 mmol/L EDTA], 然后置于冰上 30 min。蛋白浓度测定用总蛋白诊断盒和分光光度仪测定。每孔蛋白含量为 40  $\mu$ g, 煮沸变性 5 min, 分别经 10% SDS-PAGE 电泳, 然后电转移至 PVDF 膜上。该膜用含 5% 脱脂牛奶 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h, 与 p53 和 Pp53 (1:1000) 单抗室温孵育 3 h, TBS-T 缓冲液洗涤 30 min, 再与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:5000) 室温孵育 1 h, 洗涤 30 min。应用增强的化学放射发光法 (ECL) 检测, 与 ECL A 和 ECL B 混合液反应 1 min, 显影在 X 光片上。

#### 1.7 统计学方法

采用 *t* 检验。

## 2 结果与讨论

2.1 经 TGF- $\beta$ 1 处理后的 Y79 细胞增殖抑制率明显上升, 并呈剂量和时间依赖性, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 效果明显, 在处理 24 h 和 36 h 时, 细胞增殖显著受抑制, 36 h 其抑制率达 62%。表明, TGF- $\beta$ 1 对 Y79 细胞增

殖有明显的抑制作用。

2.2 TGF- $\beta$ 1 诱导 Y79 细胞凋亡的 DNA 片段琼脂糖凝胶电泳显示如图 1, Y79 细胞经 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 处理 24 h 开始出现 DNA 片段形成, 36 h 最为明显, 染色体 DNA 断裂成分子量为 200 bp 左右的片段, 呈典型的凋亡 DNA 梯形带。这是细胞凋亡时最明显的特征。细胞周期各期的 DNA 含量分析表明, Y79 细胞经 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 处理 6 h 后, Sub-G1 期(亚 G1 期)细胞开始逐渐增加, 至 36 h 时达 32.4%, 并出现明显的 Sub-G1 凋亡峰。S 期和 M 期细胞无明显变化。凋亡 (apoptosis) 是机体为了维持自身的稳定, 所采取的一种主动的死亡方式<sup>[5]</sup>。抑制肿瘤细胞并诱导其凋亡, 对肿瘤治疗具有重要意义。本研究中 DNA 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪分析都显示 TGF- $\beta$ 1 在抑制细胞生长的同时可诱导 Y79 细胞凋亡。而且细胞周期分析表明, G0/G1 期细胞经历了分裂期阻滞, TGF- $\beta$ 1 对 G2/M 细胞没有阻滞作用。提示, TGF- $\beta$ 1 诱导 Y79 细胞凋亡发生在 G0/G1 期细胞阻滞的基础之上。

图 1 TGF- $\beta$ 1 对 Y79 细胞增殖的影响

2.3 免疫印迹实验分析如图 2 示, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 处理后, 20 min p53 开始磷酸化, Pp53 条带逐渐加深, 含量增加, 6 h 时达到高峰。p53 在 2 h 时略有升高, 其余时间点变化不明显。 $\beta$ -actin 作为内参照则无明显变化。p53 是一种重要的肿瘤相关基因, 野生型 p53 具有抑癌性<sup>[6]</sup>, 而突变型 p53 具有致癌性, 磷酸化的 p53 有野生型的功能, 即具有抑癌性<sup>[7]</sup>。其抑癌功能表现为将肿瘤细胞阻滞在 Sub-G1 期并影响其它肿瘤相关基因表达, 使肿瘤细胞进入凋亡程序<sup>[8]</sup>。本研究中, TGF- $\beta$ 1 处理的 Y79 细胞的 p53 在 6 h 时磷酸化最为明

显, 此时 Y79 细胞开始被阻滞于 Sub-G1 期。进而 TGF- $\beta$ 1 在 24 h 出现细胞凋亡。以上结果表明 p53 可能参与了 TGF- $\beta$ 1 阻滞 Y79 细胞增殖, 诱导细胞凋亡。提示, TGF- $\beta$ 1 通过活化 p53 发挥其促 Y79 细胞的凋亡, 预示其在视网膜细胞瘤的治疗中的潜在价值。

图 2 TGF- $\beta$ 1 诱导 Y79 细胞凋亡

[关键词] TGF- $\beta$ 1; p53; 细胞凋亡

[中图分类号] R730.5

[文献标识码] A

- [1] Wahl SM, Chen W. TGF-beta: How Tolerant Can It Be? [J]. *Immunol Res*, 2003, 28(3): 167-180.
- [2] Ling YH, Yang Y, Tornos C, *et al.* Paclitaxel-induced apoptosis is associated with expression and activation of c-Mos gene product in human ovarian carcinoma SKOV3 cells [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 3633-3640.
- [3] Hsu SC, Gavrilin MA, Tsai MH, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25769-25776.
- [4] Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of Taxol-induced G2-M Arrest and Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells Grown as Multicellular Tumor Spheroids [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 2388-2393.
- [5] Waxman DJ, Schwartz PS. Harnessing apoptosis for improved anti-cancer gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2003, 15; 63(24): 8563-8572.
- [6] Terui T, Murakami K, Takimoto R, *et al.* Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2003, 15, 63(24): 8948-8954.
- [7] Chavez-Reyes A, Parant JM, Amelse LL, *et al.* Switching mechanisms of cell death in mdm2- and mdm4-null mice by deletion of p53 downstream targets [J]. *Cancer Res*, 2003, 15, 63(24): 8664-8669.
- [8] Bu SZ, Yin DL, Ren XH, *et al.* Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines [J]. *Cancer*, 1997, 79: 1944-1950.

[收稿日期] 2004-02-01

[修回日期] 2004-05-10