

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )04-0252-05

## Chk1/2 对肿瘤细胞凋亡的调节作用

黄 伟, 张瑶珍, 周剑锋, 刘文励 ( 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科, 武汉 430030 )

[ 摘 要 ] **目的:** 观察顺铂作用下 K562 细胞及白血病骨髓单个核细胞( BMMNC )的细胞周期变化和转染 Chk1/2 反义寡核苷酸对顺铂诱导下 K562 细胞及白血病 BMMNC 凋亡的影响。**方法:** 用流式细胞仪检测顺铂作用下 K562 细胞及白血病 BMMNC 的细胞周期变化。转染 Chk1 和 Chk2 反义寡核苷酸于 K562 细胞及白血病 BMMNC, 检测顺铂作用下转染细胞的凋亡率。**结果:** 10 μmol/L 顺铂作用下 K562 细胞和白血病 BMMNC 均出现 S 期阻滞, 转染 Chk1/2 反义寡核苷酸可明显增加顺铂诱导下 K562 细胞凋亡, 转染 Chk1 反义寡核苷酸可明显增加顺铂诱导下白血病 BMMNC 的凋亡率, 但转染 Chk2 反义寡核苷酸未增加白血病 BMMNC 的凋亡率。**结论:** Chk1 在肿瘤细胞凋亡中有重要调节作用, 可作为肿瘤增敏治疗的有效靶点, Chk2 在肿瘤细胞凋亡中的作用需进一步研究。

[ 关键词 ] K562 细胞; 白血病; Chk1; Chk2; 凋亡

[ 中图分类号 ] R733.7 [ 文献标识码 ] A

## Regulation of Chk1/2 on Apoptosis of Cancer Cells

HUANG Wei, ZHANG Yao-zhen, ZHOU Jian-feng, LIU Wen-li ( Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong Science & Technology University Wuhan 430030, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the cell cycle change of K562 cells and bone marrow mononucleate cells ( BMMNC ) of leukemic patient induced by DDP and the role of antisense oligonucleotide targeting Chk1/2. **Methods:** The change of cell cycle was assayed by means of flow cytometer after different interval in which the K562 cells and BMMNC of leukemia are treated by DDP. K562 cells or BMMNC are transfected with the antisense oligonucleotide complementary to Chk1/2 by lipofection. The apoptosis of K562 cells and BMMNC induced by DDP was investigated by flow cytometer after transfection. **Results:** K562 cells and BMMNC of leukemia arrested at S phase at 10 μmol/L of DDP. The antisense oligonucleotide targeting Chk1 or Chk2 could increase the apoptosis of K562 cells treated with DDP. The antisense oligonucleotide targeting Chk1 could increase the apoptosis of leukemic BMMNC treated with DDP, but the antisense oligonucleotide targeting Chk2 could not increase the apoptosis of BMMNC of leukemia induced by DDP. **Conclusion:** Chk1 may take part in apoptosis regulation of leukemia cells and be used as target of leukemia therapy.

[ Key words ] K562 cell; leukemia; Chk1; Chk2; apoptosis

\* 耐药是影响肿瘤治疗效果的主要因素, 肿瘤耐药与肿瘤细胞逃避化疗诱导的肿瘤细胞凋亡有关, 肿瘤细胞逃避凋亡的机制与细胞周期检测点有关, 化疗作用下细胞周期检测点激活, 导致细胞阻滞和细胞的损伤修复, 从而使细胞避免凋亡<sup>[1]</sup>。因此, 细胞周期检测点是当前增强肿瘤治疗敏感性研究的热点之一。目前研究认为细胞周期检测点途径主要由 ATM, ATR—Chk1/2—Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C 轴组成, 细胞周期检测点激酶 1、2( checkpoint kinase 1, 2 即 Chk1, Chk2 )属于丝氨酸/苏氨酸激酶, 是细胞周期检测中最关键的效应蛋白激酶, 因此, 以这两种激酶为作用靶

点, 干扰细胞损伤修复机制, 提高肿瘤治疗的敏感性可能成为一种有效的治疗选择, 本研究通过检测 Chk1/2 反义寡核苷酸对 DDP 诱导的 K562 细胞和白血病骨髓单个核细胞( bone marrow mononucleate cells, BMMNC )凋亡影响, 以探讨 Chk1/2 作为白血病治疗靶点的有效性。

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金( 30271472 )

[ 作者简介 ] 黄伟( 1969- ), 男, 博士, 主要从事白血病治疗研究

[ 通讯作者 ] 周剑锋, E-mail: hwejhcx@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

#### 1.1.1 562 细胞培养

人红白血病细胞系 K562 细胞引自中国典型培养物保藏中心。细胞培养于含 10% 小牛血清 RPMI-1640 中,培养条件为 37℃,CO<sub>2</sub>浓度为 5%。

#### 1.1.2 骨髓单个核细胞的分离和培养

选择一例诊断明确但未经化疗的白血病,经骨髓细胞学检查诊断为 ANLL-M2a,骨髓中粒系占 94%,其中原粒占 61%,取骨髓 5 ml,加 4 倍的无血清的 RPMI-1640 稀释,缓慢加在淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 15 min,取中层单个核细胞,用 1640 洗涤 2 次后,培养于含 10% 的胎牛血清的 1640 中,培养条件为 37℃,CO<sub>2</sub>浓度为 5%。

### 1.2 顺铂(DDP)作用下细胞周期分析

#### 1.2.1 顺铂作用和细胞固定

将  $1 \times 10^6$ /ml K562 细胞和白血病病人骨髓单个核细胞接种于 6 孔板中,加入 DDP(云南个旧生物制药厂),使药物终浓度分别为 10 μmol/L, 20 μmol/L, 40 μmol/L, 80 μmol/L, 160 μmol/L, 24 h 后收获细胞。再将细胞接种于 6 孔板中,加入 DDP 使药物终浓度为 10 μmol/L,分别于 12, 24, 36, 48, 72 h 后收获细胞。冷 PBS 洗涤 1 次,800 r/min 离心 5 min,加入 75% 冰乙醇 1 ml 固定, -20℃ 保存。

#### 1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡

从 -20℃ 中取出固定的细胞,离心, PBS 洗涤 1 次,弃上清。加 PC 缓冲液 100 μl 37℃ 水浴 30 min,并间断振荡。加 500 μl 碘化丙啶(Sigma 公司)染液室温避光 30 min,用流式细胞仪(BD 公司)检测,实验重复 3 次。

### 1.3 Chk1/2 反义寡核苷酸的转染

#### 1.3.1 寡核苷酸的设计和合成

根据 Chk1、Chk2 的 mRNA 序列,应用相应计算机软件设计 18 个碱基组成的反义寡核苷酸链(AsODN),并同时合成相应的正义寡核苷酸链(sODN),序列如下: Chk1 的 AsODN: 5'-GGCACTGCCATGACTCCA-3'; Chk1 的 sODN: 5'-TGGAGTCATGGCAGTCCC-3'; Chk2 的 AsODN: 5'-TCCACAGGCACCACTTCC-3'; Chk2 的 sODN: 5'-GGAAGTGCTGCCTGTGA-3'。均采用全硫代修饰,均由上海博亚生物技术有限公司合成。

#### 1.3.2 细胞转染

按试剂说明书操作,具体如下:取培养的骨髓单个核细胞,用不含抗生素的无血清 RPMI-1640 调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^6$ /ml,接种于 6 孔板内,每孔 1 ml。取

1.5 μg 的 AsODN 或 sODN 加到 100 μl 的 1640 中,混匀。然后取 Lipofectamine 2000 脂质体(invitrogen 公司)4 μl 加到 100 μl 1640 中,混匀,5 min 内将 100 μl 含寡核苷酸的 1640 与 100 μl 含脂质体的 1640 混合均匀后置室温下 20 min,然后加入到 6 孔板中,混匀,37℃ 培养箱中培养。4 h 后加入小牛血清,使血清终浓度为 2%。

#### 1.3.3 实验分组

实验分 6 组:A 正常组:未经任何处理;B 对照组:10 μmol/L 的 DDP 处理细胞 24 h;C 转染 chk1 sODN 组;D 转染 chk1 AsODN 组;E 转染 chk2 sODN 组,F 转染 chk2 AsODN 组。C ~ F 组在转染终止 10 h 后同样用药物 10 μmol/L DDP 处理 24 h。

### 1.4 细胞凋亡的检测

采用 Annexin V-FITC 试剂盒(Bender MedSystems 公司)检测细胞凋亡,按试剂盒使用说明操作,具体方法如下:收获细胞, PBS 洗涤后用预先稀释的 binding buffer 重新悬浮细胞,调节细胞浓度为  $(2 \sim 5) \times 10^5$ /ml,取 195 μl 细胞悬液,加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育 10 min,离心,弃上清,细胞重新悬浮于 190 μl 的稀释 binding buffer 中,加入 10 μl 的碘化丙啶(20 μg/ml),流式细胞仪(BD 公司)检测。

## 2 结果

### 2.1 DDP 对 K562 细胞周期变化的影响

K562 细胞在不同浓度的 DDP 作用 24 h 表现为 S 期阻滞或 G1 期阻滞,10 μmol/L 的 DDP 作用出现 S 期阻滞,此时 S 期检测点激活;20 μmol/L 的 DDP 作用出现 G1 阻滞,代表 G1 期检测点激活;但 G2/M 期细胞无明显变化;药物浓度在 60 μmol/L 时,细胞凋亡率基本达到平台( $P < 0.01$ )。在 10 μmol/L 的 DDP 作用 36 h(箭头 A)时 S 期阻滞最明显,提示此时 S 期检测点激活。60 h(箭头 B)后 S 期细胞迅速下降,细胞凋亡率迅速增加,提示凋亡细胞部分可能来自释放的 S 期细胞(图 1)。

### 2.2 DDP 对白血病骨髓单个核细胞周期变化的影响

骨髓单个核细胞在不同浓度的 DDP 作用 24 h 表现为 S 期阻滞或 G1 期阻滞,箭头 A 指 S 期阻滞最明显,箭头 B 指 G1 期阻滞最明显(图 2)。10 μmol/L 用 24 h S 期阻滞最明显,提示此时 S 期检测点激活,随着作用时间的延长 S 期细胞下降,凋亡增加,说明凋亡细胞来自 S 期细胞释放。

### 2.3 Chk1/2 反义寡核苷酸对 DDP 作用下 K562 细胞凋亡影响

转染 Chk1 反义寡核苷酸后药物诱导的细胞早期

凋亡和晚期凋亡总共有( 60.33 ± 3.34 )% ,明显高于转染 Chk1 正义寡核苷酸组( 8.59 ± 2.23 )%(  $P < 0.01$  ),

的细胞早期凋亡和晚期凋亡总共有( 20.58 ± 2.12 )% ,高于转染 Chk2 正义寡核苷酸组( 17.15 ± 2.04 )%(  $P < 0.05$  ),说明转染 Chk2 反义寡核苷酸同样可增加药物诱导的 K562 细胞凋亡( 图 3 )。

图 1 10 μmol/L 的 DDP 作用下不同时间点 K562 细胞周期分析

Fig. 1 The analysis on cell cycle of K562 cells treated with 10 μmol/L DDP for different time

A: Treated with DDP for 36 h; B: Treated with DDP for 60 h

说明转染 Chk1 反义寡核苷酸可明显增加药物诱导的 K562 细胞凋亡。转染 Chk2 反义寡核苷酸后药物诱导

图 2 不同浓度的 DDP 作用 24 h 白血病骨髓单个核细胞周期变化

Fig. 2 The analysis on cell cycle of bone marrow mononucleate cells ( BMMNC ) of leukemia after treated 24 h with DDP of different concentration

A: Treated with 10 μmol/L DDP for 24 h; B: Treated with 40 μmol/L DDP for 24 h

图 3 Chk1/2 反义寡核苷酸对 DDP 诱导的 K562 细胞凋亡影响

Fig. 3 Influence of antisense oligonucleotide targeting Chk1/2 on the apoptosis of K562 cells induced by DDP

A: Normal; B: Control; C: Transfected with chk1 sODN; D: Transfected with chk1 AsODN; E: Transfected with chk2 sODN; F: Transfected with chk2 AsODN

#### 2.4 Chk1/2 反义寡核苷酸对 DDP 诱导白血病单个核细胞凋亡的影响

转染 Chk1 反义寡核苷酸后 DDP 诱导的白血病骨髓单个核细胞早期凋亡和晚期凋亡总共有(38.23 ± 3.56)%,明显高于转染 Chk1 正义寡核苷酸组(8.34 ± 3.45)%( $P < 0.01$ ),说明转染 Chk1 反义寡核苷酸可

明显增加 DDP 诱导的原代白血病细胞凋亡。转染 Chk2 反义寡核苷酸后 DDP 诱导的细胞早期凋亡和晚期凋亡总共有(8.47 ± 3.02)%,与转染 Chk2 正义寡核苷酸组(8.72 ± 2.96)%无明显差异( $P > 0.05$ ),说明转染 Chk2 反义寡核苷酸未增加药物诱导的 K562 细胞凋亡。(图4)。

图4 Chk1/2 反义寡核苷酸对 DDP 诱导的白血病骨髓单个核细胞凋亡影响

Fig.4 Influence of antisense oligonucleotide targeting Chk1/2 on the apoptosis of BMMNC of leukemia induced by DDP

A: Normal; B: Control; C: Transfected with chk1 sODN; D: Transfected with chk1 AsODN;  
E: Transfected with chk2 sODN; F: Transfected with chk2 AsODN

### 3 讨论

细胞在损伤刺激下,细胞周期检测点激活导致细胞周期阻滞,使细胞获得损伤修复的机会,经修复的细胞可继续进入正常的增殖周期,未能修复的细胞进入凋亡,细胞周期检测点激活诱导的肿瘤细胞周期阻滞与肿瘤细胞逃避凋亡有关。因此,我们首先分析了 DDP 对 K562 细胞和白血病骨髓单个核细胞周期变化的影响。10  $\mu\text{mol/L}$  的 DDP 作用 24 h, K562 细胞和白血病骨髓单个核细胞均出现 S 期阻滞,高浓度的顺铂作用 24 h, K562 细胞和白血病骨髓单个核细胞出现 G1 期阻滞。在 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DDP 作用下,随着作用时间延长, S 期细胞释放,凋亡细胞逐渐增加。

由于细胞周期检测点激活与肿瘤细胞在化疗中

逃避凋亡有关,因此,灭活肿瘤细胞周期检测点增强肿瘤治疗敏感性已成为创新药物研究的热点之一。Chk1 和 Chk2 是细胞周期检测点中重要激酶<sup>[2-3]</sup>,国外研究报道 Chk1 特异性抑制剂 UCN-01 处理细胞后不仅增加细胞对替莫唑胺(TMZ)的敏感性,而且阻断 TMZ 诱导的 Chk1 活化和短暂的 G2/M 阻滞,从而增加细胞凋亡<sup>[4]</sup>。因此,我们设想采用反义寡核苷酸封闭 Chk1/2 蛋白表达,抑制细胞的周期阻滞,可能促进药物诱导细胞凋亡。由于脂质体和寡核苷酸的毒性可诱导细胞非特异性凋亡,为了消除这种非特异性凋亡对实验结果的影响, Chk1/2 正义寡核苷酸作为对照以准确反映 Chk1/2 反义寡核苷酸特异性促凋亡作用。结果说明转染 Chk1/2 反义寡核苷酸可特异性促进 DDP 诱导的 K562 细胞凋亡,转染

Chk1 反义寡核苷酸可明显增加 DDP 诱导的白血病骨髓单个核细胞的凋亡率,但转染 Chk2 反义寡核苷酸未增加 DDP 诱导的骨髓单个核细胞的凋亡率,这可能与白血病骨髓单个核细胞内 Chk2 表达水平低有关(未发表资料)。总之,抑制 Chk1 表达可促进药物诱导的 K562 细胞和白血病骨髓单个核细胞凋亡,说明 Chk1 对药物诱导的肿瘤细胞凋亡有重要的调节作用,而 Chk2 对肿瘤细胞凋亡的调节作用尚需进一步研究。

由于 Chk1 对药物诱导的肿瘤细胞凋亡有重要的调节作用,这种作用表现为 Chk1 表达的抑制可促进肿瘤细胞凋亡,因此,Chk1 可以作为肿瘤增敏治疗的有效靶点。

· 研究简报 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )04-0256-01

## 中老年人肺癌抗血管和抗淋巴管生成治疗的可行性探讨

田 辉<sup>1</sup>, 刘贤锡<sup>2</sup>, 王善政<sup>1</sup>( 1. 山东大学齐鲁医院胸外科, 济南 250012; 2. 山东大学医学院分子生物学实验中心, 济南 250012 )

肿瘤的侵袭和转移是恶性肿瘤死亡的主要原因。基质金属蛋白酶 9( MMP-9)是降解基底膜和细胞外基质成分的蛋白水解酶,可促进癌细胞对周围组织的浸润,在肿瘤血管生成及肿瘤侵袭和转移过程中起重要调节作用。乙酰肝素酶( HPSE)在多种人类恶性肿瘤中高度表达,具有促进肿瘤细胞侵袭和转移的重要作用,并且与肿瘤新生血管的形成具有密切关系。血管内皮生长因子 C( VEGF-C)是迄今发现的唯一特异性促淋巴管生长因子。肺癌是人类最常见的恶性肿瘤,目前所有的各种治疗肺癌的方法效果均不能令人满意。本研究采用免疫组织化学染色方法检测了 65 例肺癌组织、癌旁组织和正常肺组织中 MMP-9, HPSE 和 VEGF-C 蛋白的表达,以探讨人肺癌抗血管和淋巴管生成治疗的可行性。

65 例肺癌病例来源于山东大学齐鲁医院胸外科 1997 年 1 月~1998 年 12 月间经手术后临床病理确诊的患者,术前均未行放、化疗。男性 51 例,女性 14 例。年龄 41~76 岁,中位年龄 61 岁。65 例患者无住院期间死亡,术后随访至 2002 年 12 月;实访 61 例,失访 4 例。标本均在手术中收集,取材后速冻于液氮中, -80℃ 超低温贮存备用。肿瘤组织均在原发灶取材,避开坏死、炎症区域;癌旁组织取自相应肿瘤旁 2 cm;正常肺组织取自距肿瘤边缘 5 cm 以上的肺组织,并经病理学检查未见癌细胞。免疫组化染色采用即用型 SABC 法, MMP-9, HPSE 和 VEGF-C 蛋白染色阳性为胞浆呈清晰棕色颗粒,当阳性胞浆染色的细胞 <5% 时,定为“-”,5%~

### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Melo J, Toczyski D. A unified view of the DNA-damage checkpoint[ J ]. *Curr Opin in Cell Biol*, 2002, 14( 2 ):237-245.  
 [ 2 ] Walworth NC. DNA damage: Chk1 and Cdc25, more than meets the eye[ J ]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11( 1 ): 78-82.  
 [ 3 ] Bartek J, Falck J, Lukas J. Chk2 kinase-a busy messenger[ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2( 12 ): 877-886.  
 [ 4 ] Hirose Y, Berger MS, Pieper RO, *et al*. Abrogation of the Chk1-mediated G( 2 ) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61( 15 ): 5843-5849.

[ 收稿日期 ] 2004 -03 -12

[ 修回日期 ] 2004 -09 -20

25% 为“+”, 25%~50% 为“++”, >50% 为“+++”。应用 X<sup>2</sup> 检验进行统计学处理。

本研究结果发现,肺癌组织中 MMP-9、HPSE 和 VEGF-C 蛋白阳性表达率明显高于癌旁组织和正常肺组织( P < 0.05 ),提示 MMP-9、HPSE 蛋白表达在肺癌的生长、侵袭和转移以及血管生成中发挥着重要作用;VEGF-C 是促进肿瘤经淋巴转移的重要因素,诱导肿瘤内淋巴管形成,从而使肺癌细胞通过淋巴管进行转移和扩散。本研究结果发现Ⅲ期和Ⅳ期肺癌组织中 MMP-9, HPSE 和 VEGF-C 蛋白阳性表达率明显高于 I 期和 II 期( P < 0.05 );生存 3 年以下肺癌 MMP-9, HPSE 和 VEGF-C 蛋白阳性表达率明显高于生存 3 年以上者( P < 0.05 )。表明 MMP-9、HPSE 和 VEGF-C 蛋白高表达的肿瘤细胞侵袭和转移的能力强,提示 MMP-9, HPSE 和 VEGF-C 在促进肿瘤细胞穿越血管壁、实行扩散和转移中发挥着重要作用。研究表明, MMP-9, HPSE 和 VEGF-C 在肺癌的生长、侵袭、转移和血管、淋巴管生成中发挥着重要作用,为人肺癌抗血管和抗淋巴管生成治疗的可行性提供了一定的实验依据,有望成为肺癌治疗的新靶点。

[ 关键词 ] 肺癌; 基质金属蛋白酶( MMP-9); 乙酰肝素酶( HPSE)蛋白; VEGF-C 蛋白; 免疫组织化学

[ 中图分类号 ] R734.2

[ 文献标识码 ] D

[ 收稿日期 ] 2004 -08 -02

[ 修回日期 ] 2004 -10 -10