

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.010

· 基础研究 ·

鸦胆子油乳抑制肺癌 NCI-H460 细胞的增殖及其机制

张晓娇^{1,4}, 王雪莲¹, 赵峰², 安春丽¹, 王晓娜³ (1. 中国医科大学基础医学院病原生物学教研室, 辽宁沈阳 110001; 2. 天津医科大学总医院科研处, 天津 300052; 3. 沈阳市妇婴医院检验科, 辽宁沈阳 110014; 4. 盘锦市疾病预防控制中心体验科, 辽宁盘锦 124010)

[摘要] 目的: 探讨鸦胆子油乳在体外对人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞的抑制作用及其机制。方法: 以不同质量浓度鸦胆子油乳(2.5、5.0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理 NCI-H460 细胞, 24、48、72 h 后收集细胞, MTT 法检测鸦胆子油乳对 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用; 吉姆萨染色后光学显微镜下观察 NCI-H460 细胞形态学改变; 流式细胞仪测定 NCI-H460 细胞凋亡率; caspase-3 酶活性试剂盒检测 NCI-H460 细胞 caspase-3 酶活性。结果: 鸦胆子油乳可剂量和时间依赖性抑制 NCI-H460 细胞的增殖, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳作用 72 h 时的抑制率达(91.07 \pm 1.60)%。鸦胆子油乳作用后, NCI-H460 细胞呈现典型凋亡形态学改变; 流式细胞术检测结果显示, 10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳作用 48 h 后, NCI-H460 细胞凋亡率分别为(45.23 \pm 4.30)%、(54.14 \pm 3.09)%和(61.57 \pm 7.28)% ($P < 0.01$)。鸦胆子油乳可剂量依赖性上调 NCI-H460 细胞 caspase-3 酶活性, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳时 caspase-3 酶活性为(1.07 \pm 0.07) $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$, 是对照组的 4.97 倍($P < 0.01$)。结论: 鸦胆子油乳可能通过活化 caspase-3 诱导 NCI-H460 细胞凋亡, 抑制 NCI-H460 细胞增殖。

[关键词] 肺癌; NCI-H460 细胞; 鸦胆子油乳; 凋亡; caspase-3

[中图分类号] R734.2; R730.52

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0519-05

Inhibitory effect of *Brucea javanica* oil emulsion on proliferation of NCI-H460 cells and underlying mechanism

ZHANG Xiao-jiao^{1,4}, WANG Xue-lian¹, ZHAO Feng², AN Chun-li¹, WANG Xiao-na³ (1. Department of Pathogen Biology, Basic Medical School, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China; 2. Department of Scientific Research, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Shenyang Sleeper Davis Hospital, Shenyang 110014, Liaoning, China; 4. Department of Physical Examination, Disease Control and Prevention Center of Panjin, Panjin 124010, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of *Brucea javanica* oil emulsion on the growth of human large-cell lung cancer NCI-H460 cells in vitro and its mechanisms. **Methods:** NCI-H460 cells were treated with different concentration of *Brucea javanica* oil emulsion (2.5, 5.0, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24, 48, and 72 h. The inhibitory effects of *Brucea javanica* oil emulsion on proliferation of NCI-H460 cells was examined by MTT; morphological changes was observed by optical microscope after Giemsa staining; apoptotic rate of NCI-H460 cells was examined by flow cytometry; and caspase-3 activity in NCI-H460 cells was detected with caspase-3 activity kit. **Results:** *Brucea javanica* oil emulsion significantly inhibited the proliferation of NCI-H460 in a dose- and time-dependent manner, and the inhibiting rate reached (91.07 \pm 1.60)% after 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion treatment for 72 h. Typical apoptotic morphological changes also appeared after *Brucea javanica* oil emulsion treatment. Flow cytometry results demonstrated that the apoptotic rates of NCI-H460 cells were (45.23 \pm 4.30)%, (54.14 \pm 3.09)% and (61.57 \pm 7.28)% after 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion treatment for 48 h, respectively ($P < 0.01$). In NCI-H460 cells, the *Brucea javanica* oil emulsion increased the activity of caspase-3 in a dose-dependent manner. after 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30670916); 沈阳市科技局科技计划资助项目(No. 1063315-1-00)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670916), and the Science and Technology Program of Science and Technology Bureau of Shenyang (No. 1063315-1-00)

[作者简介] 张晓娇(1984-), 女, 辽宁省鞍山市人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: dongfenglook@163.com

[通信作者] 安春丽(AN Chun-li, corresponding author), E-mail: cmuel@126.com

treatment, caspase 3 activity reached $1.07 \pm 0.07 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$, which was 4.97 fold higher than control group ($P < 0.01$).

Conclusion: *Brucea javanica* oil emulsion can induce apoptosis and inhibit the proliferation of NCI-H460 cells, possibly through increasing caspase-3 activity.

[**Key words**] lung cancer; NCI-H460 cell; *Brucea javanica* oil emulsion; apoptosis; caspase-3

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 519-523]

鸦胆子油乳为苦木科植物鸦胆子的干燥成熟果实提取物制备的油乳剂。鸦胆子油乳在临床常联合化疗药物治疗多种恶性肿瘤,并得到了较为满意的疗效,如鸦胆子油乳联合化疗药物治疗癌性胸腔积液^[1]、恶性腹腔积液^[2]、急性髓细胞白血病^[3]、晚期胃癌^[4]、中晚期前列腺癌^[5]、食管癌^[6]、原发性肝癌^[7]等。肺癌是人体常见恶性肿瘤之一,近年来我国肺癌的发病率及病死率持续升高,每年新增患者约 120 万人,其中 80% 为非小细胞肺癌(non-small-cell carcinoma, NSCLC)。由于缺乏有效的早期诊断方法,多数肺癌患者在确诊时已属中晚期。目前肺癌的临床治疗以手术联合放疗及化疗等方法为主,但放疗和化疗的毒性作用都很大。鸦胆子油乳既具有抗肿瘤作用还具有免疫保护作用,联合放疗可同时对体液免疫及细胞免疫有促进作用,从而降低放疗所伴随的毒性作用,提高患者的生活质量与治疗依从性^[8]。鸦胆子油乳联合化疗治疗肺腺癌具有一定的疗效^[9],但是鸦胆子油乳对人大细胞肺癌细胞 NCI-H460 有无抑制作用尚未见报道。本实验观察鸦胆子油乳对 NCI-H460 细胞的抑制作用,研究其作用机制,期望为鸦胆子油乳的临床应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料

鸦胆子油乳剂购于沈阳药科大学制药厂。PR-MI 1640 培养基、新生牛血清及胰蛋白酶均购自沈阳汇佰生物科技有限公司。人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞购于中科院上海细胞库,用含 10% 小牛血清的 1640 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化传代。冷冻休克法同步化处理细胞,细胞传代后 4 h 从培养箱取出,放入 4 ℃ 冰箱 8 h,收集对数生长期 NCI-H460 细胞,培养待用。凋亡细胞形态学检测试剂盒、MTT、AnnexinV-EGFP 及 PI 均购自沈阳凯基生物公司。Casepase-3 活性检测试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒均购自宝泰克生物科技公司。

1.2 MTT 法检测鸦胆子油乳作用对 NCI-H460 细胞增殖的影响

将鸦胆子油乳倍比稀释成 80、40、20、10、5.0 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在 96 孔板每孔加入 NCI-H460 细胞悬液 200 μl (细胞数 1×10^4 个),每一药物浓度设 6 个复孔,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。阴性对照组细胞浓度及培养方法同上,但不加鸦胆子油乳。分别于加药后 24、48 和 72 h 后每孔加入 MTT 50 μl ,孵育 4 h,去上清,每孔加入 150 μl DMSO,平板摇床振荡 15 min。用酶标仪在 490 nm 处测光密度(D)值,实验数据利用 Origin 6.0 软件进行分析。细胞增殖抑制率($\text{IR}, \%$) = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值} / \text{阴性对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.3 吉姆萨染色检测 NCI-H460 细胞凋亡的形态学改变

将 NCI-H460 细胞消化后滴入已放有盖玻片的 6 孔板中爬片,将 6 孔板中同步化处理生长良好的 NCI-H460 细胞分为正常细胞对照组和 A、B、C 三个实验组,稀释药物浓度为 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加入三个实验组中,孵育 48 h。用 PBS 洗涤细胞 2 次,室温晾干,甲醇固定 5 min,于盖玻片上滴加 100 μl 吉姆萨染液,室温染色 5 ~ 20 min,用流水轻轻冲洗去染液,室温晾干,二甲苯浸泡 3 min,以去除杂质,使载玻片透明,最后树胶封片,显微镜下观察细胞形态,并拍照。

1.4 流式细胞术检测 NCI-H460 细胞的凋亡

将培养瓶中同步化处理生长良好的 NCI-H460 细胞分为正常细胞对照组和 A、B、C 三个实验组,稀释药物密度为 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加入三个实验组中,孵育 48 h。不含 EDTA 的胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,调细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,常规方法加入 Annexin V-EGFP 及 PI 染色,流式细胞仪检测,数据均经 Lvsis II 软件收集和分析。

1.5 Casepase-3 检测试剂盒检测 caspase-3 活性

将培养瓶中同步化处理生长良好的 NCI-H460 细胞分为细胞对照组和 A、B、C 三个实验组,稀释药物浓度为 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加入三个实验组中,孵育 48 h。先测定 pNA(p-nitroaniline)标准曲线。将胰酶消化实验组和对照组的 NCI-H460 细胞收集至备用的细胞培养液中。600 $\times g$ 4 ℃ 离心 5 min,收集细胞,小心吸除上清,确保尽量没有细胞被

吸除, PBS 洗涤 1 次。同前吸尽上清后, 按照每 2×10^6 细胞加入 100 μl 裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解 15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 ~ 20 000 $\times g$ 离心 10 ~ 15 min, 把上清转移到冰浴预冷的离心管中。取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度, 同时测定检测 caspase-3 酶活性, 先加检测缓冲液, 阴性对照组加入 90 μl , 实验组各加入 80 μl , 再加待测样品, 适当混匀。随后再加入 10 μl Ac-DEVD-pNA (2 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 测定 D_{405} 。样品的 D_{405} 减去空白对照的 D_{405} , 即为样品中 caspase-3 催化产生的 pNA 产生的光密度。通过同标准曲线的对比计算样品中催化产生多少量的 pNA。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行 F 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鸦胆子油乳对 NCI-H460 细胞增殖的抑制

鸦胆子油乳对大细胞肺癌 NCI-H460 细胞的抑制作用见表 1。细胞增殖抑制率与鸦胆子油乳作用时间和浓度有关, 随着作用时间的延长和鸦胆子油乳浓度的加大, 细胞增殖抑制率逐渐增强。同一鸦胆子油乳浓度随作用时间延长, 抑制率逐渐增高。同一时间点, 随鸦胆子油乳浓度增高, 抑制率也逐渐增高, 提示鸦胆子油乳时间和浓度依赖性地抑制 NCI-H460 细胞的增殖 ($P < 0.01$)。

2.2 鸦胆子油乳作用后 NCI-H460 细胞形态改变

吉姆萨染色后光学显微镜观察发现, 对照组 NCI-H460 细胞贴壁较紧, 充分生长且连接成片, 细胞轮廓清楚, 胞核胞质对比明显, 细胞核较规则, 核质均匀, 细胞背景染料杂质少(图 1A)。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳作用 48 h 后, NCI-H460 细胞外形不规则, 胞质着色加深, 核染色质呈粗块状聚集于核膜下方, 呈凋亡早期变化(图 1B); 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳作用 48 h 后, NCI-H460 细胞核裂解为碎块, 核碎片大小不等散于胞质内(图 1C)。提示鸦胆子油乳可诱导 NCI-H460 细胞凋亡。

2.4 鸦胆子油乳作用后 NCI-H460 细胞的凋亡

Annexin V-EGFP/PI 双染色后, 流式细胞仪检测 NCI-H460 细胞凋亡率。由于晚期凋亡细胞和坏死细胞多为早期凋亡细胞继发而来, 故将两者之和计为总体凋亡率。如图 2 所示, 阴性对照组 NCI-H460 细胞凋亡率为 (12.87 \pm 0.72)%, 鸦胆子油乳 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48 h 后 NCI-H460 细胞凋亡率

分别为 (45.23 \pm 4.30)%、(54.14 \pm 3.09)%、(61.57 \pm 7.28)% ($P < 0.01$)。结果提示, 鸦胆子油乳可诱导 NCI-H460 细胞凋亡。

表 1 鸦胆子油乳对 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用(%)
Tab. 1 Inhibitory effect of *Brucea javanica* oil emulsion on proliferation of NCI-H460 cells(%)

<i>Brucea javanica</i> oil emulsion ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Inhibitory rate		
	24 h	48 h	72 h
2.5	17.13 \pm 1.55	47.57 \pm 2.46	70.86 \pm 1.40
5.0	20.50 \pm 0.94	48.88 \pm 0.47	74.35 \pm 0.72
10	22.02 \pm 1.74	54.32 \pm 1.48	78.54 \pm 2.09
20	25.51 \pm 1.65	58.96 \pm 1.74	81.31 \pm 0.31
40	35.02 \pm 4.40	60.63 \pm 1.28	90.16 \pm 0.71
80	44.95 \pm 1.77	65.34 \pm 1.49	91.07 \pm 1.60
F	63.06	56.74	128.54
P	<0.01	<0.01	<0.01

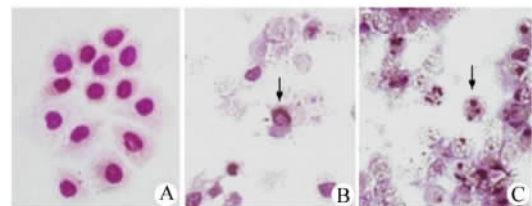


图 1 鸦胆子油乳作用后 NCI-H460 细胞形态学的改变($\times 400$)

Fig. 1 Morphological changes of NCI-H460 cells induced by *Brucea javanica* oil emulsion ($\times 400$)

A: Control; B: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion; C: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion

2.5 鸦胆子油乳作用后 NCI-H460 细胞 caspase-3 活性的变化

检测鸦胆子油乳处理后 NCI-H460 细胞 caspase-3 活性的变化, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳作用 48 h 使 NCI-H460 细胞 caspase-3 活性显著增高, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鸦胆子油乳作用时活性达到最大, 为 (1.07 \pm 0.07) $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$, 是对照组的 4.97 倍 ($P < 0.01$), 显示鸦胆子油乳剂量依赖性上调 NCI-H460 细胞 caspase-3 酶活性。

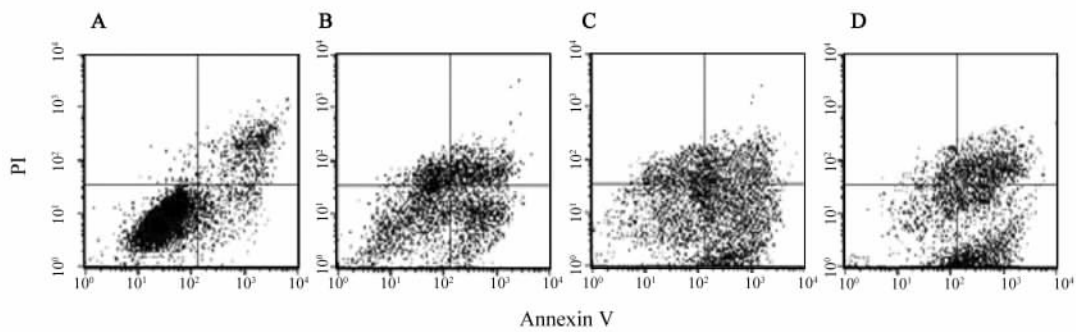


图2 流式细胞术检测鸦胆子油乳作用后 NCI-H460 细胞的凋亡

Fig. 2 Apoptosis rate of NCI-H460 cells after treatment with *Brucea javanica* oil emulsion as detected by FCM

A: Control; B: 10 $\mu\text{g/ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion; C: 20 $\mu\text{g/ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion; D: 40 $\mu\text{g/ml}$ *Brucea javanica* oil emulsion

3 讨论

肺癌是人类常见恶性肿瘤之一,其死亡率位于恶性肿瘤之首位。近年来,我国肺癌的发病率及病死率也持续升高。目前肺癌的临床治疗以手术联合放疗及化疗等方法为主,但放疗和化疗的毒性作用都很大,严重影响患者的生存期和生存质量。鸦胆子油乳既具有抗肿瘤作用还具有增效减毒作用^[10]和免疫保护作用^[11]。研究^[8]显示,鸦胆子油乳对肺腺癌、鳞癌有较强的抑制作用,对晚期小细胞肺癌也有一定的疗效^[11],但是对大细胞肺癌细胞的作用及其作用机制尚未见报道。

本研究观察鸦胆子油乳体外对人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞的抑制作用,并探讨其作用机制。结果表明,鸦胆子油乳在体外能够明显抑制 NCI-H460 细胞的增殖,并且随作用时间的延长和鸦胆子油乳浓度的增加其抑制作用逐渐增强,具有时间和浓度依赖性。10 $\mu\text{g/ml}$ 鸦胆子油乳作用 48 h 后 NCI-H460 细胞增殖抑制率超过 50%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 鸦胆子油乳作用 72 h 后增殖抑制率超过 90%。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,诱导肿瘤细胞凋亡及其凋亡机制的研究是近年来肿瘤研究的重要方面。研究^[12-14]表明,鸦胆子油乳可以诱导膀胱癌 J82 细胞、Jurkat 细胞及 K562 细胞凋亡。本研究中,不同浓度鸦胆子油乳作用 NCI-H460 细胞 48 h 后,观察到 NCI-H460 细胞核内染色质凝聚、边集于核膜,细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒等凋亡的形态学变化。说明鸦胆子油乳对 NCI-H460 细胞有诱导凋亡的作用,提示鸦胆子油乳可能通过诱导细胞凋亡抑制 NCI-H460 细胞增殖。Annexin V-EGFP/PI

双染色法进一步证实不同浓度鸦胆子油乳作用 48 h 后,NCI-H460 细胞凋亡率分别为(45.23 \pm 4.30)%、(54.14 \pm 3.09)%、(61.57 \pm 7.28)%,呈逐渐升高趋势。证实鸦胆子油乳通过诱导 NCI-H460 细胞凋亡抑制其增殖。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用^[15-16],其中 caspase-3 是凋亡细胞中的一种主要酶,是凋亡的关键执行分子,与 DNA 断裂、染色质凝聚和凋亡小体形成有关^[17-19]。Caspase-3 在正常状态下以酶原的形式存在于胞质中,没有活性;但在细胞发生凋亡时被激活,活化的 caspase-3 由两个大亚基和两个小亚基组成,裂解相应的胞质胞核底物,最终导致细胞凋亡^[20]。本实验中,不同浓度鸦胆子油乳作用 NCI-H460 细胞后 caspase-3 酶活性增强,caspase-3 活性呈剂量依赖性上升趋势。表明鸦胆子油乳诱导 NCI-H460 细胞凋亡的机制可能是通过激活 caspase-3 酶活性而实现的。

综上所述,鸦胆子油乳能够抑制 NCI-H460 细胞的增殖并诱导其凋亡,且激活 caspase-3 酶活性是鸦胆子油乳诱导 NCI-H460 细胞凋亡的途径之一。

[参考文献]

- [1] 吴述洪, 芮磊, 洪原城. 鸦胆子油乳联合顺铂胸腔注射治疗癌性胸水 68 例疗效观察 [J]. 海南医学, 2009, 20(9): 14-15.
- [2] 石惠燕, 田义洲, 黄立萍, 等. 鸦胆子油乳经胸、腹腔灌注治恶性胸、腹腔积液 54 例 [J]. 江西中医药, 2010, 3(21): 45-46.
- [3] 王志刚, 刘丽梅, 孙丽兰. 鸦胆子油乳联合优福定治疗老年晚期胃癌疗效观察 [J]. 中国当代医药, 2009, 16(11): 242-244.

- [4] 张育军, 雒向宁. 鸦胆子油乳联合内分泌治疗中晚期前列腺癌 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(12): 1464-1465.
- [5] 王伟, 崔海朋. 鸦胆子油乳联合小剂量阿糖胞苷治疗老年急性髓细胞白血病 32 例 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(14): 1839.
- [6] 李心忠, 姜松岭, 王亚, 等. 鸦胆子油乳肝动脉灌注联合碘油栓塞治疗原发性肝癌的临床观察 [J]. 肿瘤基础与临床, 2010, 23(2): 146-148.
- [7] 王晓娜, 马力, 安春丽, 等. 鸦胆子油乳对宫颈癌 SiHa 细胞的抑制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(5): 494-497.
- [8] 吴玉昌. 鸦胆子油乳注射液联合放疗治疗鼻咽癌的疗效分析 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(6): 95-96.
- [9] 崔瀚之, 牛旗, 管静芝, 等. 鸦胆子油乳注射液联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌疗效观察 [J]. 四川医学, 2010, 31(5): 590-591.
- [10] 周浩本, 王均海. 化疗加鸦胆子油乳注射液治疗中晚期恶性肿瘤 86 例 [J]. 实用肿瘤杂志, 2007, 22(2): 172-174.
- [11] 赵本玉, 方明. 鸦胆子油乳注射液联合 EP 方案治疗晚期小细胞肺癌临床观察 [J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(9): 1233-1234.
- [12] 吕峰, 王禾, 秦卫军. 鸦胆子油乳诱导膀胱癌细胞 J82 凋亡及其机制的初步研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(5): 432-433.
- [13] 胡美薇, 张越峰, 冯键. 鸦胆子油乳诱导 Jurkat 细胞凋亡及与柔红霉素的协同作用 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(7): 400-402.
- [14] 李英, 李颖, 张凌岩. 鸦胆子油乳诱导白血病 K562 细胞凋亡及分子机制的实验研究 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2006, 33(8): 637-639.
- [15] Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis [J]. J Exp Med, 1998, 187(4): 587-600.
- [16] Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis [J]. Biochem J, 1997, 26(Pt 1): 1-16.
- [17] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.
- [18] Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies [J]. Blood, 1999, 93(11): 3587-3600.
- [19] Donald D. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death [J]. Cell, 2003, 112(4): 481-490.
- [20] 吴丽贤, 许建华, 张昆仲. Hsp90 抑制剂新生霉素诱导 HL260 细胞凋亡及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11): 1419-1424.

[收稿日期] 2011-07-25 [修回日期] 2011-09-12

[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

P53 诱导产生的长链非编码 RNA 参与 P53 下游反应基因的广泛抑制

P53 是一个重要的肿瘤抑制基因,当细胞受到损伤时,P53 会变得更加稳定并且转录活化或抑制一系列基因,引起 DNA 修复、细胞周期阻滞或细胞凋亡等生物学效应,从而维持细胞基因的完整性,但 P53 抑制下游基因的分子机制尚不清楚。论文作者通过长链非编码 RNA(lincRNA)来阐述 P53 是如何参与其下游基因的广泛抑制。

目前在哺乳动物基因组中发现了 1 000 多个 lincRNA,这些 lincRNA 进化非常保守,推测其在许多生物学过程中发挥重要作用。作者通过 2 个缺失内源性 P53 的实验体系:小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast,MEF)和肺癌细胞 K-ras,两体系中均发现 11 个 lincRNA 的转录活化是依赖于 P53 的。基因芯片结果显示,干扰 lincRNA-p21 后会使得原本被 P53 抑制的几百个目的基因活化,证明 lincRNA-p21 在 P53 依赖转录反应的信号通路中发挥抑制子的作用。LincRNA-p21 干扰后能增强细胞的活力,而对细胞周期并无影响;相反,过表达 lincRNA-p21 后会减弱细胞活力,促进细胞凋亡。通过生物素标记的 lincRNA-p21 做 RNA pull down 实验,经质谱鉴定该特异性蛋白为不均一核蛋白 KhnRNP-K,并且发现 lincRNA-p21 5'端的 778 个核苷酸能与 hnRNP-K 结合。相对于全长 lincRNA-p21 序列,过表达该结合序列不能有效地诱导细胞凋亡。干扰 hnRNP-K 后,发现原本被 P53 和 lincRNA-p21 共同抑制的基因发生脱阻抑,证明 hnRNP-K 参与了 P53 和 lincRNA-p21 下游基因的抑制作用。同时发现 hnRNP-K 能与绝大部分抑制基因的启动子区域结合,但干扰 lincRNA-p21 后,hnRNP-K 失去了与抑制基因启动子结合的能力,证明 lincRNA-p21 介导了 hnRNP-K 与目的基因启动子区的结合。

综上所述,当细胞 DNA 受到损伤时,P53 能结合到 lincRNA-p21 的启动子区,活化转录 lincRNA-p21,该 RNA 与 hnRNP-K 结合后能特异性地结合到目的基因的启动子区,导致这些基因的转录受阻,从而引起细胞凋亡,维持细胞基因组的完整性。

[郑青亮 摘译,陈涛涌 审阅. Huarte M, Guttman M, Feldser D. et al. Cell, 2010, 142(3): 409-419.]