

[文章编号] 1000-4718(2009)02-0215-05

Caspase-3 抑制剂抑制长春碱诱导的人乳腺癌细胞凋亡及 I κ B- α 降解*

方 勇, 吴金民, 潘宏铭

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院肿瘤科, 临床医学研究所, 浙江 杭州 310016)

[摘要] 目的: 本实验通过阻断 caspase-3 途径, 观察长春碱诱导的肿瘤细胞凋亡及胞浆内 I κ B- α 蛋白降解的影响, 以探索长春碱诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导途径。方法: 用二甲基亚砜对照、100 μ mol/L caspase-3 抑制剂 (DEVD-CHO) 预处理乳腺癌 Bcap37 细胞 3 h 后, 加入不同浓度的长春碱, 以 MTT 法检测肿瘤细胞增殖能力, 以细胞 DNA 片段分析及 PI 染色法检测肿瘤细胞凋亡, 以蛋白免疫印迹法检测 pro-caspase-3 和 I κ B- α 蛋白的变化。结果: 蛋白免疫印迹证实长春碱可诱导 pro-caspase-3 蛋白的降解。经 MTT 法、DNA 凋亡梯状条带法及流式细胞仪 PI 染色法证实, DEVD-CHO 能减弱由长春碱所诱导的肿瘤细胞凋亡。两组的 IC₅₀ 分别为 56.8 μ mol/L 和 87.4 μ mol/L。蛋白免疫印迹实验表明, DEVD-CHO 能抑制由长春碱所诱导的 I κ B- α 蛋白磷酸化降解。结论: 在长春碱诱导肿瘤细胞凋亡过程中, NF- κ B/I κ B 信号转导途径起着重要作用, caspase-3 途径参与调节。阻断该途径将减弱长春碱所诱导的肿瘤细胞凋亡和 I κ B- α 磷酸化降解。

[关键词] 长春碱; 细胞凋亡; NF- κ B/I κ B 信号转导通路; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Attenuation of vinblastine-induced apoptosis and degradation of I κ B- α in breast cancer cell line by caspase-3 inhibitor

FANG Yong, WU Jin-min, PAN Hong-ming

(Department of Oncology, Sir Run Run Shaw Hospital, Institute of Clinical Medical Research, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China. E-mail: fyzju@sina.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the changes of apoptosis and activation of I κ B- α induced by vinblastine via the blockage of caspase-3 signal transduction pathway, and to explore the possible mechanism of signal transduction pathway involving in the vinblastine-induced apoptosis. **METHODS:** The breast cancer cell lines Bcap37 were treated with different concentrations of vinblastine dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) or caspase-3 inhibitor (DEVD-CHO, 100 μ mol/L) for 3 h. The changes of the proliferation were detected by MTT methods. The apoptosis was determined by observing the internucleosomal DNA cleavage and PI staining, and the proteins of pro-caspase-3 and I κ B- α were detected by Western blotting methods. **RESULTS:** The results showed that vinblastine induced the pro-caspase-3 degradation. The significantly attenuation of vinblastine-induced apoptosis in breast cancer cell line by caspase-3 inhibitor DEVD-CHO was verified by MTT assay, internucleosomal DNA cleavage and flow cytometry PI staining analysis. The IC₅₀ was 56.8 μ mol/L and 87.4 μ mol/L respectively for two groups. The inhibition of vinblastine-induced phosphorylated degradation of I κ B- α was also observed by DEVD-CHO. **CONCLUSION:** Based on these finding, vinblastine induces apoptosis in breast cancer cells via NF- κ B/I κ B signal transduction pathway, which is co-operated by caspase signal pathway. Through the blockage of caspase pathway with caspase-3 inhibitor, vinblastine-induced apoptosis and the phosphorylated degradation of I κ B- α in breast cancer cells are suppressed greatly.

[KEY WORDS] Vinblastine; Apoptosis; NF- κ B/I κ B signal transduction pathway; Caspase-3

长春碱类化疗药物主要以长春碱 (vinblastine) 血病、淋巴瘤以及其它一些实体肿瘤^[1]。长春碱类和长春新碱 (vincristine) 为代表, 广泛地用于治疗白 药物能封闭形成微管蛋白二聚体的区域, 阻止微管

[收稿日期] 2008-04-10 [修回日期] 2008-09-04

* [基金项目] 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 (No. 教外司留 2005-383)

E-mail: fyzju@sina.com

蛋白聚合,干扰微管的正常功能,使细胞有丝分裂阻滞于G₂/M期,从而诱导多种实体肿瘤细胞凋亡^[2]。但尚不清楚其诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导途径。我们前期实验证实长春碱类药物通过NF-κB/IκB信号转导途径诱导肿瘤细胞凋亡^[3]。Caspase-3是凋亡过程中激活的关键激酶,也是凋亡的主要效应因子^[4]。为探索长春碱诱导肿瘤细胞凋亡的可能信号转导途径,本研究以人乳腺癌Bcap-37细胞株为对象,观察caspase-3抑制剂DEVD-CHO对长春碱类药物诱导肿瘤细胞凋亡的影响以及IκB蛋白磷酸化降解的作用。

材 料 和 方 法

1 细胞培养及相关药物、试剂

在含10%小牛血清RPMI-1640培养液中常规培养人乳腺癌Bcap-37细胞。

长春碱(vinblastine)和caspase-3抑制剂DEVD-CHO(C₉₄H₁₅₈N₂₀O₂₇, MW:2000.4)分别购自Sigma和Calbiochem(EMD Biosciences),溶解在100%二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)中配成贮存液。经前期预试验证实,100 μmol/L DEVD-CHO不影响肿瘤细胞增殖,但可显著减弱紫杉醇诱导肿瘤细胞的凋亡。故将细胞分为两组,即“DMSO对照组+长春碱”组和“DEVD-CHO+长春碱”组。分别用DMSO或100 μmol/L DEVD-CHO预处理3 h后,再加入不同浓度长春碱。兔抗人Pro-caspase-3、IκB-α和β-actin IgG抗体及ECL显色试剂购于Santa Cruz。

2 MTT法测定细胞增殖

按照常规的实验方法进行MTT试验。胰酶消化胃癌细胞后,将细胞稀释成2 × 10⁸ cells/L的浓度,按每孔100 μL加入96孔培养板(Falcon, Oxnard, CA)。细胞贴壁24 h后,分成两组:(1)DMSO作为对照组;(2)100 μmol/L DEVD-CHO预处理3 h组。3 h后加入不同浓度的长春碱作用48 h后,离心弃上清,每孔加入100 μL 3.0 mmol/L MTT;37 °C、5% CO₂条件下孵育4 h后,离心弃上清,每孔加入200 μL DMSO(Sigma),微量振荡器振荡10 min,自动酶标读数仪计数测定吸光度值(A_{560nm})。用NDST软件(Bliss法)计算IC₅₀值。生长抑制率 = 1 - (A药物组/A对照组) × 100%,计算每组的生长抑制率。

3 细胞DNA片段分析

药物作用于细胞后,收集细胞,用PBS洗2次后,加入低渗细胞裂解液[5 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 20 mmol/L EDTA和0.5% (V/V) Triton

X-100],冰浴20 min,10 000 × g离心20 min,等体积的苯酚:氯仿:异丙醇(25:24:1)抽提1次。用7.5 mol/L醋酸钠和乙醇沉淀DNA,溶解在Tris-EDTA缓冲液中(含RNase)。1.5%琼脂糖凝胶电泳,室温、恒流70 V电泳2 h,紫外灯下观察结果并照相。出现DNA梯状条带说明细胞出现凋亡。

4 PI染色法和流式细胞仪检测

胰酶消化并收集细胞,70%乙醇固定,4 °C保存。600 × g离心5 min,并用PBS液(含有0.5% BSA和0.1% Triton X-100)洗2次。加入PI染色液避光保存30 min后用流式细胞仪检测DNA含量和凋亡细胞数。

5 Pro-caspase-3和IκB-α蛋白免疫印迹

胰酶消化收集细胞,PBS洗2次,加入蛋白提取液提取细胞总蛋白。Bio-Rad Dc蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。12.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离80 μg细胞总蛋白后,转至PVDF膜(Bio-Rad);常规封闭过夜,室温下与抗人抗体Pro-caspase-3(1:1 000, Santa Cruz)、IκB-α(1:1 000, Santa Cruz)孵育2 h,与辣根过氧化物酶标记的II抗(1:7 500, Immunoresearch)孵育1 h。每次孵育后,均用含0.02% Tween 20 PBS洗脱3次,用ECL(Amersham)系统检测信号。β-actin蛋白作为内参照。

6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用t检验对caspase-3抑制剂组与DMSO对照组之间进行统计学处理。

结 果

1 长春碱能诱导 pro-caspase-3 酶原的降解

以不同浓度的长春碱与Bcap37乳腺癌细胞作用48 h后,分离细胞总蛋白做蛋白免疫印迹,可观察到Bcap37细胞的pro-caspase-3受到降解,见图1。

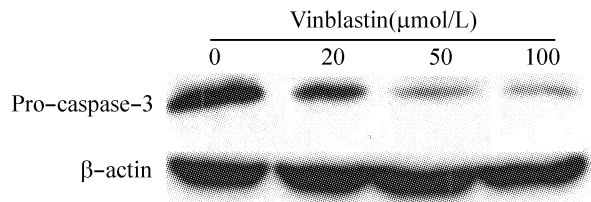


Fig 1 Degradation of pro-caspase-3 protein of Bcap37 cells treated with different concentrations of vinblastine for 24 h. n = 3.

图1 不同浓度长春碱处理Bcap37细胞24 h后诱导pro-caspase-3酶原的降解

2 DEVD-CHO能提高细胞生存率

经MTT检测,在“DMSO+长春碱”组,随着药物

浓度的增加,生存率降低、抑制率增加。DMSO + 长春碱组、DEVD - CHO + 长春碱组之间经统计学检验,DEVD - CHO 能明显提高细胞生存率 ($P < 0.01$),其 IC_{50} 分别为 $56.8 \mu\text{mol/L}$ 和 $87.4 \mu\text{mol/L}$,见图 2。故在后面的实验中,均采用 $50 \mu\text{mol/L}$ 长春碱处理 Bcap37 细胞。

3 DEVD - CHO 能抑制长春碱诱导的“DNA 梯状凋亡条带”

以 20、50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 长春碱作用 Bcap37 细胞 48 h,抽提 DNA,在琼脂糖凝胶电泳可见“DMSO + 长春碱”组能诱导 Bcap37 细胞出现典型的“180 - 200 bp 及其倍数的 DNA 梯状凋亡条带”,随着浓度增加其梯形条带更清晰;在“DEVD - CHO + 长春碱”组,caspase - 3 抑制剂 DEVD - CHO 能明显抑制不同浓度的长春碱所诱导出现的梯状凋亡条带,见图 3。

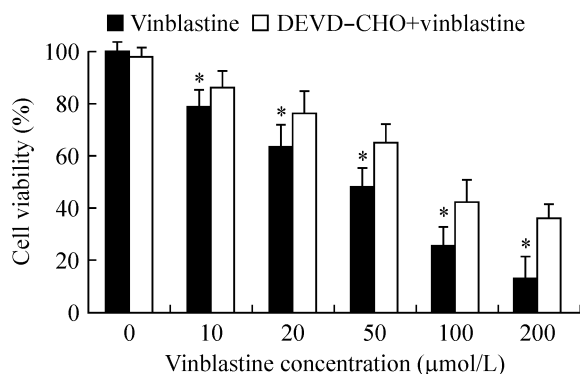


Fig 2 The cell viability (%) of Bcap37 breast cancer cells treated with different concentrations of vinblastine pretreatment with DMSO or DEVD - CHO detected by MTT assay. $\bar{x} \pm s$. $n = 9$. * $P < 0.05$ vs DEVD - CHO + vinblastine.

图 2 Caspase - 3 抑制剂 DEVD - CHO 影响长春碱对 Bcap37 细胞生长的抑制 (MTT 法)

Vinblastine									
($\mu\text{mol/L}$)	0	20	50	100	0	20	50	100	
DEVD-CHO	-	-	-	-	+	+	+	+	

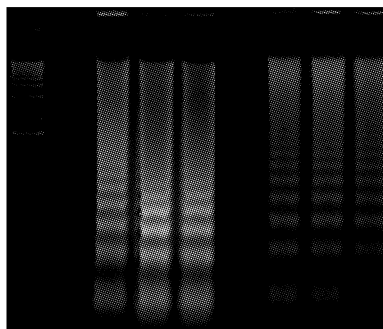


Fig 3 DNA laddering of Bcap37 cells treated with different concentrations of vinblastine pretreatment with DMSO or DEVD - CHO for 48 h. $n = 3$.

图 3 不同浓度长春碱或 DEVD - CHO 处理 Bcap37 细胞 48 h 后 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

4 DEVD - CHO 能抑制长春碱诱导肿瘤细胞出现亚二倍体峰及凋亡

在用长春碱作用 Bcap37 细胞 48 h,收集细胞 PI 染色、流式细胞仪检测细胞 DNA 含量,可观察到长春碱可诱导 Bcap37 细胞出现亚二倍体峰 (Sub - G_1 峰,即凋亡峰)。以 DEVD - CHO 预处理 3 h 则能显著抑制由长春碱所诱导的亚二倍体峰,见图 4。

5 DEVD - CHO 能抑制由长春碱诱导的细胞浆内的 I κ B - α 蛋白磷酸化降解

以 $50 \mu\text{mol/L}$ 长春碱药物处理 Bcap37 细胞 2 h、4 h、6 h、24 h 及 48 h,提取细胞蛋白,经蛋白免疫印迹后证实长春碱能诱导细胞浆内 I κ B - α 蛋白磷酸化降解。而用 DEVD - CHO 预处理 3 h 后,再加入长春碱作用相应时间后,结果表明,DEVD - CHO 能显著抑制长春碱所诱导的细胞 I κ B - α 蛋白降解,见图 5。

讨 论

通过本研究证实,长春碱诱导的肿瘤细胞凋亡及抑制 I κ B - α 蛋白降解,使用 caspase - 3 抑制剂阻断 caspase - 3 途径后,可显著抑制长春碱诱导的肿瘤细胞凋亡及抑制 I κ B - α 蛋白降解。这表明在长春碱诱导肿瘤细胞凋亡过程中,caspase 途径起着重要的作用。

长春碱类化疗药物在治愈性和姑息性化疗方案中的广泛应用^[1],激起了人们对以微管作为化疗靶点的浓厚兴趣。与其它抗微管类化疗药物如泰素不同,长春类生物碱能在受体部位与纺锤微管蛋白结合,形成高度规则的结晶体从而影响微管蛋白装配,使细胞阻滞于 G_2/M 期。本研究证实长春碱可诱导乳腺癌细胞出现特异性的约为 180 bp 整数倍大小 DNA 凋亡梯状条带 (DNA ladder) 和特有的凋亡形态变化,这与国外多个实验室的结果相一致^[5,6]。这些结果表明,除了经典的抗微管和诱导细胞周期阻滞之外,它们还可通过诱导细胞凋亡进而杀伤肿瘤细胞。长春碱可能通过多条信号途径诱导细胞凋亡^[3,7],但由长春碱类药物诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制及其信号转导途径尚不完全清楚。

NF - κ B 是一序列特异性的 DNA 结合蛋白,它与细胞内抑制物 I κ B - α 结合参与介导或调节多种生物应答,如炎症、免疫应答、细胞增生以及细胞凋亡等^[8,9]。更多的证据表明根据细胞类型及刺激物的不同,NF - κ B 激活可诱导或阻滞凋亡的发生^[10]。本研究证实了长春碱可诱导肿瘤细胞 I κ B - α 蛋白磷酸化降解 (图 5)。另外,caspase - 3 是凋亡过程中激活的关键激酶,也是凋亡的主要效应因子。多种

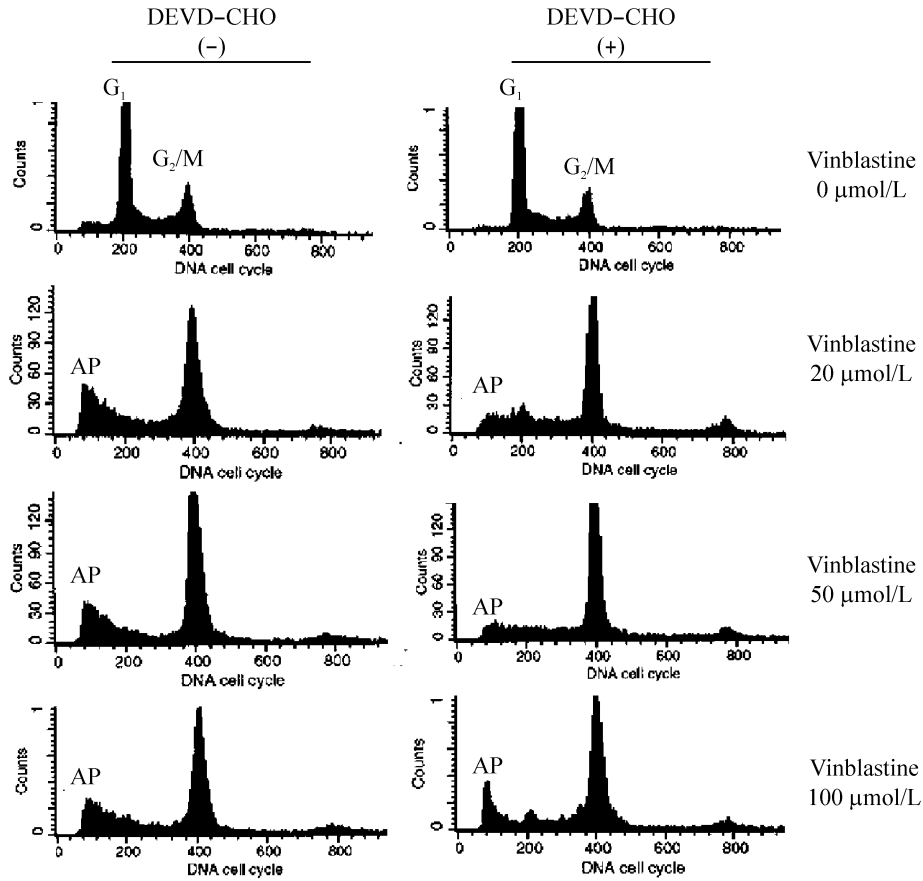


Fig 4 Sub - G₁ peak of PI staining of Bcap37 cells treated with different concentrations of vinblastine pretreatment with DMSO or DEVD - CHO for 48 h. AP stands for apoptosis peak. *n* = 3.

图 4 不同浓度长春碱或 DEVD - CHO 处理 Bcap37 细胞 48 h 后 PI 染色检测亚二倍体峰

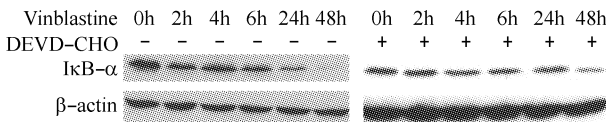


Fig 5 Effect of DEVD - CHO on the inhibition of 50 μmol/L vinblastine - induced phosphorylated degradation of IκB - α in Bcap37 breast cancer cells. *n* = 3.

图 5 DEVD - CHO 能抑制由 50 μmol/L 长春碱诱导的 Bcap37 细胞浆内的 IκB - α 蛋白磷酸化降解

刺激因子通过触发凋亡的信号转导途径,激活启动子 caspase - 8、9、10,最终触生效应器 caspase - 3、6、7。Pro - caspase - 3 本身无活性,受到上游信号后可裂解而被激活,其底物有核层蛋白、IL - 1β 前体、PRAP、DNA - PK、MEKK/IKK 途径等^[11,12]。本实验证实长春碱可诱发 Pro - caspase - 3 裂解(图 1)。阻断 caspase - 3 是否会影响 IκB - α/NF - κB 信号转导途径呢?

Caspase - 3 特异性抑制剂 DEVD - CHO 是根据 caspase - 3 所特异性识别的底物 4 肽序列设计的竞争性抑制剂。本实验证实 DEVD - CHO 能抑制长春

碱所诱导的 Bcap37 细胞的凋亡,能显著减弱但不能完全阻止长春碱诱导肿瘤细胞凋亡的发生(图 2、3、4),这与 Kolenko 等^[13]的研究结果一致。本实验证实 DEVD - CHO 能抑制长春碱所诱导的乳腺癌细胞 IκB - α 蛋白磷酸化降解,表明阻断 caspase - 3 可以截断 RelA 和 IκB - α,使它们失去活性,从而确保抗凋亡基因被抑制,凋亡过程受到抑制。肿瘤细胞体内信号转导途径错综复杂,如 Osborn 等^[14]首次证实长春碱可通过 JNK 信号转导途径诱导 KB - 3 细胞凋亡,Kolomeichuk 等^[15]证实 c - Jun siRNA 可以抑制长春碱所诱导 KB - 3 细胞内的 caspase - 3 激活和细胞凋亡。根据细胞类型及刺激物不同,IκB - α/NF - κB 途径在诱导细胞凋亡中的作用也有所不同,NF - κB 受到激活后,转移至胞核内,进一步调控包括下游多达 150 种靶基因的表达(包括凋亡和抗凋亡基因在内)。另外,我们前期的部分研究工作还证实羟基喜树碱通过激活 NF - κB 诱导人乳腺癌 Bcap - 37 细胞凋亡^[16],给予 caspase - 3 抑制剂后可抑制羟基喜树碱对人乳腺癌 Bcap37 细胞 NF - κB 的激活^[17]。提示

caspase 信号转导途径和 I κ B - α /NF - κ B 参与多种化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡过程。

因此, caspase 信号转导途径和 I κ B - α /NF - κ B、JNK/c - Jun 信号转导途径的关系还有待于进一步研究。通过深入研究抗微管类化疗药物诱导细胞凋亡的机制,将为阐明细胞生长、分化和凋亡提供理论基础;同时也可探索新的化疗增效方案及肿瘤治疗途径,消除肿瘤多药耐药。

[参 考 文 献]

- [1] Rowinsky EK, Donehower RC. Vinca alkaloids and epipodophyllotoxins [A]. The chemotherapy source book [M]. Williams & Wilkins; Baltimore, 1998. 387 - 423.
- [2] Haskell CM. Antineoplastic agents: cancer treatment [M]. 4th ed. Saunders Company; Philadelphia, 1995. 78 - 165.
- [3] Huang Y, Fang Y, Wu JM, et al. Regulation of vinca alkaloid - induced apoptosis by NF - κ B/I κ B pathway in human tumor cells [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(3): 271 - 277.
- [4] Kim KW, Kim BJ, Chung CW, et al. Caspase cleavage product lacking amino - terminus of I κ B α sensitizes resistant cells to TNF - α and TRAIL - induced apoptosis [J]. J Cell Biochem, 2002, 85(2): 334 - 345.
- [5] Kolomeichuk SN, Terrano DT, Lyle CS, et al. Distinct signaling pathways of microtubule inhibitors - vinblastine and taxol induce JNK - dependent cell death but through AP - 1 - dependent and AP - 1 - independent mechanisms, respectively [J]. FEBS J, 2008, 275(8): 1889 - 1899.
- [6] Huang Y, Fang Y, Dziadyk JM, et al. The possible correlation between activation of NF - kappa B/I kappa B pathway and the susceptibility of tumor cells to paclitaxel - induced apoptosis [J]. Oncol Res, 2002, 13(2): 113 - 122.
- [7] Fan M, Goodwin ME, Birrer MJ, et al. The c - Jun NH₂ - terminal protein kinase/AP - 1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine [J]. Cancer Res, 2001, 61(11): 4450 - 4458.
- [8] Baldwin AS Jr. The NF - kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights [J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14(1): 649 - 683.
- [9] Brown K, Park S, Kanno T, et al. Mutual regulation of the transcriptional activator NF - κ B and its inhibitor, I κ B - α [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2532 - 2536.
- [10] Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, et al. Role of NF - κ B in p53 - mediated programmed cell death [J]. Nature, 2000, 404(4): 892 - 896.
- [11] Kim KW, Kim BJ, Chung CW, et al. Caspase cleavage product lacking amino - terminus of I kappa B alpha sensitizes resistant cells to TNF - alpha and TRAIL - induced apoptosis [J]. J Cell Biochem, 2002, 85(2): 334 - 345.
- [12] Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor - kappa B, Bax and Bcl - 2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells [J]. Oncogene, 2002, 21(23): 3727 - 3738.
- [13] Kolenko V, Bloom T, Rayman P, et al. Inhibition of NF - κ B activity in human T - lymphocytes induces caspase - dependent apoptosis without detectable activation of caspase - 1 and - 3 [J]. J Immunol, 1999, 163(1): 590 - 598.
- [14] Osborn MT, Chambers TC. Role of the stress - activated/ c - Jun NH₂ - terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs [J]. J Biol Chem, 1996, 271(48): 30950 - 30955.
- [15] Kolomeichuk SN, Bene A, Upreti M, et al. Induction of apoptosis by vinblastine via c - Jun autoamplification and p53 - independent down - regulation of p21WAF1/CIP1 [J]. Mol Pharmacol, 2008, 73(1): 128 - 136.
- [16] 叶孟, 林蕾, 方勇, 等. 羟基喜树碱通过激活 NF - κ B 诱导人乳腺癌 Bcap - 37 细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(1): 146 - 150.
- [17] 叶孟, 林蕾, 潘宏铭, 等. Caspase - 3 抑制剂抑制羟基喜树碱对人乳腺癌 Bcap37 细胞 NF - κ B 的激活 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(8): 1508 - 1511.