

# 长春新碱诱导肝癌细胞自噬性凋亡过程中泛素与 bcl-2 的变化

彭心昭<sup>1</sup>, 朴英杰<sup>2</sup>

Changes of Ubiquitin and bcl-2 During Autophagic Apoptosis of HepG2 Cells Induced by Vincristine

PENG Xin-zhao<sup>1</sup>, PIAO Ying-jie<sup>2</sup>

1. Department of Oncology, No.421 Hospital of PLA, Guangzhou 510318, China; 2. Central Laboratory, Southern Medical University

**Abstract :Objective** To study the changes of ubiquitin during vincristine (VCR) mediated autophagic apoptosis of Hep G2 cells, and determine the influences of inhibiting ubiquitin-proteasome pathway on this apoptosis and bcl-2. **Methods** To induce autophagic apoptosis of Hep G2 cells treated with VCR. The apoptosis and the expression of ubiquitin were detected with flowcytometry (FCM) and the expression of bcl-2 was examined by RT-PCR technique. **Results** VCR could significantly increase ubiquitin level in Hep G2 cells that underwent autophagic apoptosis ( $P < 0.01$ ). There are higher apoptosis rate ( $P < 0.01$ ) and lower expression of bcl-2 in the cells by using VCR combined with lactacystin (a proteasome inhibitor) than that in the cells treated with VCR alone. **Conclusion** Ubiquitin-proteasome pathway is involved in the VCR-induced autophagic apoptosis of hep G2 cells and in regulating the levels of bcl-2, which might have a role in mediating autophagic apoptosis in Hep G2 cells. The inhibition of Ubiquitin-proteasome pathway can enhance VCR-induced apoptosis in Hep G2 cells.

**Key words:** Vincristine; Ubiquitin-proteasome pathway; Hepatoma cell; Apoptosis; bcl-2

**摘要:**目的 探讨长春新碱(VCR)诱导 Hep G2 肝癌细胞自噬性凋亡过程中泛素表达的变化及阻断泛素-蛋白酶体通路对此凋亡和 bcl-2 表达的影响。方法 应用 VCR 诱导 Hep G2 细胞自噬性凋亡,采用流式细胞仪检测凋亡及泛素的表达;以 RT-PCR 检测 bcl-2 的表达。结果 VCR 处理后发生自噬性凋亡的 Hep G2 细胞中泛素含量增加( $P < 0.01$ )。加用蛋白酶体特异抑制剂乳胞素后的乳胞素 + VCR 组凋亡率明显比单用 VCR 组高( $P < 0.01$ ),而 bcl-2 表达则比单用 VCR 组更低。结论 泛素-蛋白酶体通路参与了 VCR 诱导的 Hep G2 细胞自噬性凋亡及对 bcl-2 蛋白的调控。对蛋白酶体功能的抑制可以促进 VCR 诱导的 Hep G2 细胞凋亡。

**关键词:** 长春新碱;泛素-蛋白酶体通路;肝癌细胞;凋亡;bcl-2

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)11-0677-03

## 0 引言

新近的研究显示泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway,简称泛素通路)是细胞凋亡调控的主要机制之一,这种机制可能是肿瘤等疾病治疗的一个独特靶点,有关研究认为泛素通路参与凋亡的调控是通过对 bcl-2 蛋白的调节而发挥作用的<sup>[1]</sup>。长春新碱(vincristine, VCR)是一种常用的抗癌药物。本研究中,作者先用 VCR 诱导了人肝癌细胞系 Hep G2 细胞自噬性凋亡,在此凋亡模型<sup>[2]</sup>基础上,特定研究了 VCR 诱导的 Hep G2 细胞自噬性

凋亡过程中泛素通路及 bcl-2 表达的有关变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及培养

人肝癌细胞系 Hep G2 细胞(购自上海中科院细胞所)用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液(Gibco BRL 公司)培养。

### 1.2 细胞分组与加药处理

未加药对照组仅加等体积生理盐水。VCR 处理组的药物处理基本同文献[2](VCR 为 sigma 公司产品),即于培养液中加入 1 $\mu$ g/mL 的 VCR 去诱导。在药物作用不同时间后用 0.125% 胰蛋白酶-EDTA 消化收获细胞行以下实验。

### 1.3 泛素的定量检测

分别将对照组、VCR 作用 4h 组、VCR 作用 16h

收稿日期:2005-01-17;修回日期:2005-03-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870382)

作者单位:1. 510318 广州,解放军 421 中心医院肿瘤科;2. 南方医科大学(原第一军医大学)中心实验室

组的 Hep G2 细胞经固定、漂洗后加 1 200 的抗泛素 (博士德公司), 4 过夜, 加 1 64 的 IgG-FITC (Sigma 产品) 于室温作用 30 分钟后用 Elite 流式细胞仪 (COULTER 公司) 分别检测各组平均荧光强度。

1.4 bcl-2 表达的 RT-PCR 检测

1.4.1 被检测细胞分三组: 对照组、VCR 16h 组、乳胞素 + VCR 16h 组。乳胞素 (Lactacystin, CAL-BIOCHEM 公司) 为蛋白酶体的抑制剂, 使用浓度为 10μM<sup>[3]</sup>, 细胞加用乳胞素 8h 后再加用 VCR 处理 16h。

1.4.2 用 Goldkey 软件设计 bcl-2 引物, 由上海生物工程公司分别合成, bcl-2 扩增引物为 sense: 5 GGACAACA TCGCCCTGTG3 (551 ~ 568); antisense: 5 AGTCTTCA GA GAACA GCCA GGA3 (668 ~ 688), 扩增片段为 137bp; 内参照 GAPDH 扩增引物为 sense: 5 GGTGAA GGTCGGTGT-CAACG3; antisense: 5 caaagtgtgcatgcatgacc 3, 扩增片段为 496 bp。

1.4.3 RNA 分离 用 Trizol reagent 总 RNA 分离试剂盒 (Gibco 公司) 从细胞中提取细胞 RNA。

1.4.4 cDNA 合成 用 THERMOSCRIPT RT-PCR System 试剂盒 (Gibco 公司) 将分离的 RNA 逆转录成 cDNA。

1.4.5 PCR 以此 cDNA 为模板行扩增反应。RT-PCR 反应体系: 模板 20μL, 上游引物 (10μmol/L) 和下游引物 (10μmol/L) 各 2μL, dNTP4μL (10mmol/L), 10 ×Taq 多聚酶缓冲液 10μL, TaqDNA 聚合酶 1μL (5u)。PCR 循环参数为 94 , 1.5 min; 52 , 1.5 min; 72 , 2. 5min; 44 个循环后 72 , 20min。

1.4.6 取 PCR 产物行电泳分析 (电泳仪、电泳槽为 Bio-Rad 公司产品)。以 X174-Hinc II digest DNA Marker (Ta KaRa Biotech) 为分子量参照。

1.5 细胞凋亡率的 FCM 检测

分别检测对照组、VCR 4h 组、VCR 16h 组、乳胞素 + VCR 16h 组的细胞凋亡率: 约 1 ×10<sup>6</sup> 个各组细胞经固定、漂洗后加 1 %RNase37 作用 30 分钟, 随后分别加入 PI (50μg/ml) 避光染色; 流式细胞仪测定 DNA 含量。低于 G1 期二倍体 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。各组均测定 10 000 个细胞, 由流式细胞仪计算平均凋亡百分率, 统计处理采用 <sup>2</sup> 检验。

2 结果

2.1 泛素及细胞凋亡率的 FCM 检测 见表 1。

表 1 VCR 各组抗泛素的 FITC 标记荧光平均荧光强度及凋亡率 (x̄ ± s)

组 别	抗泛素-FITC 平均 荧光强度*	细胞凋亡率 (%)**
对照组	2.3 ±0.24	4.1
VCR 4h 组	33.2 ±12.13	13.2
VCR 16h 组	38.7 ±21.57	53.4

\*: 经 F 检验, P < 0.01; \*\*: 经 <sup>2</sup> 检验, P < 0.01

2.2 VCR、乳胞素对 Hep G2 细胞 bcl-2 的 mRNA 水平的影响 两对引物进行 RT-PCR 后获得 137bp (bcl-2) 和 496bp (GAPDH) 两条带 (见图 1), 用凝胶图像分析仪分析电泳结果, 各组 bcl-2 与 GAPDH 的比值分别是: 正常对照组为 0.736, VCR 组为 0.241, 乳胞素 + VCR 组为 0.086。分析结果提示乳胞素 + VCR 组的 bcl-2 mRNA 水平比其他组有明显下降。

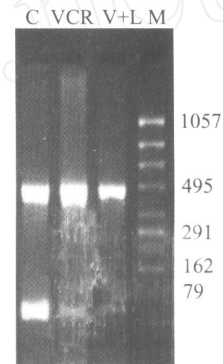


图 1 RT-PCR 半定量分析 VCR 作用 16h 后各组 HepG2 细胞 bcl-2 mRNA 表达情况

C: 对照组; VCR: VCR 组; V + L: VCR + 乳胞素 (Lactacystin) 组; M: marker。GAPDH 为 496bp

2.3 各组 Hep G2 细胞凋亡率 对照组、VCR 16h 组及乳胞素 + VCR 组的细胞凋亡率分别为 4.1 %、53.4 % 及 87.6 %。经 <sup>2</sup> 检验: P < 0.01, 各组间凋亡率差异有非常显著性。

3 讨论

泛素通路是真核细胞内主要的蛋白质降解系统。泛素表达于所有的真核细胞中, 在 ATP 存在时, 泛素与细胞内的底物蛋白共价结合 (蛋白质的泛素化), 通过一系列酶联反应, 最后将需降解的蛋白提呈给蛋白酶体 (proteasome) 而降解。细胞内产生的异常蛋白和短寿命蛋白大部分是通过该途径降解的。蛋白质的泛素化不仅是蛋白质的正常生理更新所需, 而且也可作为细胞内监视系统的一部分, 研究显示泛素通路是细胞凋亡调控的主要机制之一<sup>[4]</sup>。

为了阐明 VCR 诱导的 Hep G2 细胞自噬性凋

亡过程中泛素通路的有关变化,作者在已建立的 VCR 诱导 Hep G2 细胞自噬性凋亡之细胞模型<sup>[2]</sup>基础上进行了上述实验。本研究结果显示 VCR 处理后 Hep G2 细胞中泛素含量增加,而泛素表达水平的提高有利于待分解的蛋白质泛素化,说明有更多的蛋白质与泛素结合而被降解。有认为泛素通路对一些底物的降解可以引起一些凋亡因子从线粒体释放,进而激活 caspase 蛋白酶家族<sup>[5]</sup>。本实验中的 Hep G2 细胞泛素表达水平增高是与 VCR 诱导的 Hep G2 细胞自噬性凋亡有关的,提示泛素依赖的蛋白质降解途径也是自噬性凋亡过程中一些蛋白质降解的一种途径,泛素可能是凋亡的一个蛋白标记物。

在正常活细胞,泛素化的蛋白质可以很快地被蛋白酶体降解,所以,在凋亡细胞中泛素-蛋白质结合物的聚集可能与蛋白酶体功能的障碍有关。蛋白酶体既可以促进细胞生存,也可以促进细胞凋亡,这与细胞的增生状态,受损程度、细胞类型特异性等有关。蛋白酶体活性的抑制可促进生长活跃的细胞凋亡,但是不触发静止的分化的低增殖指数的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本实验结果显示:加用蛋白酶体特异抑制剂乳胞素后的乳胞素 + VCR 组的细胞凋亡率明显比单用 VCR 组高,说明对蛋白酶体功能的抑制可以促进 VCR 诱导的 Hep G2 细胞自噬性凋亡。

泛素通路涉及凋亡调控的详细机理尚不十分清楚,阻断泛素通路可以导致几乎所有 bcl-2 蛋白均被 caspase-3 特异性酶解,提示泛素通路以某种潜在的机制参与了对 bcl-2 蛋白的调控。有研究发现在某些肿瘤细胞系中蛋白酶体的抑制剂可诱导这些细胞发生凋亡<sup>[6]</sup>。从本研究结果中可见加用乳胞素后 bcl-2 的表达比单用 VCR 组的 bcl-2 表达更减少、细胞凋亡率更高,可能的解释是泛素通路参与了对 bcl-2 蛋白的调控,泛素通路被阻断后通过某种机制使 caspase-3 迅速被激活,而致 bcl-2 被特异性酶解掉所致。Cheng 等<sup>[7]</sup>最先发现并报道了 bcl-2 环区

的天冬氨酸(ASP34)是 caspase-3 的酶解位点。bcl-2 的裂解先于其他已知半胱天冬酶-3 底物如 PARP 的裂解,提示 bcl-2 的裂解在凋亡级联的反应中是一个相对早期的事件。

关于凋亡调控机制中两个关键性蛋白—Caspase-3 和 bcl-2 之间如何相互作用的详细生化过程是凋亡信号传导研究中的主要热点问题之一。进一步研究还发现 bcl-2 蛋白是通过抑制线粒体膜的通透性和阻止细胞色素 C 的释放而发挥抗凋亡作用的<sup>[6]</sup>。这些方面的研究在作者系列研究的其他部分也有涉及。

作者的以上实验证实了经 VCR 处理后 Hep G2 细胞中泛素含量增加,提示泛素通路也是 VCR 诱导的 Hep G2 肝癌细胞自噬性凋亡过程中一些蛋白质降解的一种途径。对蛋白酶体功能的抑制可以促进 Hep G2 肝癌细胞的自噬性凋亡,在此凋亡过程中泛素通路参与了对 bcl-2 蛋白的调控。

#### 参考文献:

- [1] Yang Y, Yu X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way [J]. The FASEB Journal, 2003, 17(8): 790-799.
- [2] 彭心昭,陈英,朴英杰,等.长春新碱诱导的自噬性细胞凋亡对线粒体膜电位的影响[J].中国医学物理学杂志,2001,18(1): 37-39.
- [3] Leitch V, Agre P, Landon S, et al. Altered ubiquitination and stability of aquaporin 1 in hypertonic stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5): 2894-2898.
- [4] Roos MP, Sistonen L. The ubiquitin-proteasome pathway [J]. Ann Med, 2004, 36(4): 285-295.
- [5] Lee JC, Peter ME. Regulation of apoptosis by ubiquitination [J]. Immunol Rev, 2003, 193(1): 39-47.
- [6] Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy [J]. Leukemia, 2002, 16(4): 433-443.
- [7] Cheng EH-Y, Kirsch DG. Conversion of bcl-2 to a bax-like death effector by capases [J]. Science, 1997, 278(5345): 1966-1968.

[编辑:贺文]