

神经生长因子 ^{125}I 偶联物诱导人胶质瘤 U251 细胞 G_2 期阻滞

封云, 陈曦, 梁炜, 杨勇, Gulshan ELAHI

江苏大学基础医学与医学技术学院药理系, 江苏镇江 212013

摘要 观察 ^{125}I -NGF(神经生长因子)对 U251 细胞 DNA 的损伤作用,探讨 ^{125}I -NGF 的抗肿瘤作用机制。应用微核测试和单细胞电泳等方法观察 U251 细胞 DNA 的变化,Western Blotting 法检测细胞蛋白水平的变化,RT-PCR 法检测 Cyclin B1 mRNA 水平的变化,微核测试和单细胞电泳等方法观察到 ^{125}I -NGF 对 U251 细胞 DNA 的损伤作用。细胞周期检测及 MPM-2/PI 复染实验表明 ^{125}I -NGF 诱导了 U251 细胞 G_2 期阻滞。Western Blotting 检测表明, ^{125}I -NGF 可能通过活化 ATM 和 ATR 途径发挥抗肿瘤作用。 ^{125}I -NGF 以剂量依赖性的模式减少了 U251 细胞 Cyclin B1 蛋白表达水平,但没有改变其 mRNA 的表达水平。在 U251 细胞中,磷酸化 Chk1, Chk2 和 Cdc25c 蛋白水平提高,而 p53 和 p21 水平保持不变。阐明了 ^{125}I -NGF 通过对 U251 细胞 DNA 的损伤作用活化 ATM 和 ATR 通路,使多种蛋白的表达水平发生了改变,从而发挥其抗肿瘤的作用。

关键词 神经生长因子; ^{125}I ; 胶质瘤; 偶联物; 细胞周期阻滞

中图分类号 R9

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.12.004

^{125}I -NGF Induces the G_2 Arrest in Glioma U251 Cell Line

FENG Yun, CHEN Xi, LIANG Wei, YANG Yong, ELAHI Gulshan

Department of Pharmacology, School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Abstract The DNA-damage process of the U251 cells after being treated with ^{125}I -NGF is observed to show the antitumor mechanism of ^{125}I -NGF. The cell cycle arrest and the Western Blotting analysis were adopted to display the inherent mechanism. The micronucleus test and the single cell gel electrophoresis methods were used to observe DNA-damage changes of the U251 cells. The mechanisms involve the activation of ATM and ATR pathways by ^{125}I -NGF, which perhaps explains some of its anticancer activities related with nuclear transportations. In a dose-dependent manner, ^{125}I -NGF reduces the Cyclin B1 expression protein level rather than mRNA level in human cell lines of glioma. In U251 cells, phosphorylated Chk1, Chk2 and Cdc25c protein levels are elevated, whereas p53 and p21 levels remain unchanged. In summary, this study demonstrates that ^{125}I -NGF plays a role in glioma cancer growth via DNA-damage, ATM and ATR activation mechanisms and multiple proteins involved in the process.

Keywords nerve growth factor; ^{125}I ; glioma; conjugate; cell cycle arrest

0 引言

肿瘤靶向治疗是提高肿瘤治疗选择性、减轻毒性的重要途径之一。靶向治疗能否成功的关键在于:靶向载体对肿瘤细胞的选择性;载体的内化及内化后“弹头”部分的释放;“弹头”的抗肿瘤作用。已有研究表明放射性同位素 ^{125}I 发生电子俘获和内转化衰变,可以产生射程仅为 10nm 的俄歇电子,由

于其射程超短,只有当 ^{125}I 在细胞核内发生衰变时才能有效地杀伤细胞打断 DNA 链,诱导靶细胞的凋亡,所以 ^{125}I 的副作用极小,是理想的“弹头”^[1-3]。选择何种载体将 ^{125}I 运送到肿瘤细胞核内是肿瘤治疗获得成功的关键。前期的工作发现神经生长因子(Nerve Growth Factor,NGF)可以通过胶质瘤细胞膜表面高表达的受体 TrkA 介导的胞吞作用共转位到细胞核

收稿日期:2011-10-08;修回日期:2012-02-18

基金项目:国家自然科学基金项目(30701031);江苏大学高层次人才启动基金(06jdg045);江苏大学大学生科研立项 2012

作者简介:封云(中国科协所属全国会员个人会员登记号:M111140327M),讲师,研究方向为肿瘤分子靶向治疗,电子信箱:fengyun76@126.com

内^[3-7]。本文选择 ¹²⁵I 作为“弹头”偶联 NGF,利用 NGF 及其受体 p-TrkA(活化 TrkA)复合物内吞作用进入细胞核内,这就确保了 ¹²⁵I-NGF 在有效靶向杀伤胶质瘤细胞的同时对周围正常脑组织的损伤极小。¹²⁵I-NGF 有望开发成神经胶质瘤的靶向治疗药物,本文的研究对其他抗肿瘤药物核靶向制剂的开发也有借鉴作用。

在先前的工作^[8]中笔者制备了 ¹²⁵I 与 NGF 的偶联物 ¹²⁵I-NGF 并确定了其稳定性和纯度;同时观察了偶联物的核转位能力、体内体外抗肿瘤活性。在研究中发现偶联物有 DNA 损伤作用,进一步假设偶联物对人脑胶质瘤 U251 细胞有细胞周期阻滞作用,同时检测相关蛋白水平以阐明药物的作用机制,为寻找新的靶点、临床合理应用 ¹²⁵I-NGF 及阐明胶质瘤的发生发展机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 放射性核素和试剂

高放射性核纯度无还原剂的 Na¹²⁵I 购自上海欣科公司进口分装,β-NGF 购买自 Sigma 公司。¹²⁵I-NGF 偶联方法如前^[8]所述,1mCi Na¹²⁵I 和 50μg NGF 偶联。产率(¹²⁵I-NGF/Na¹²⁵I×100%)大于 75%。放射化学纯度超过 95%。比活度为 16mCi/mg。

硫酸长春新碱(VCR)购自杭州民生药业集团。Cyclin B1, Cdc2, Cdc25c, p53, p21 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。Chk1, p-Chk1, Chk2, p-Chk2 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。Cycletest plus DNA reagent kit (Becton Dickinson 公司), 彗星试剂盒(南宁拜康生物公司), SuperScript One-Step RT-PCR kit (Invitrogen 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞系和细胞培养

U251 细胞系购自中国科学院上海细胞中心(ATCC 细胞系号:99522)。U251 细胞培养液:RPMI 1640(Gibco)加 10%热灭活的胎牛血清(Sigma 公司)、100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素,37℃、5%CO₂ 恒温孵箱中培养。

1.2.2 微核测试

取对数生长期细胞按照 1×10⁷孔的密度接种预先铺有圆玻片的 24 孔培养板,37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养 4h 后换液,¹²⁵I-NGF (5μCi/mL)、NGF (1μg/mL) 或者 ¹²⁵I (5μCi/mL) 处理 24h,4%多聚甲醛固定 1h,Hoechst-33342 染色 3min 后荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 单细胞凝胶电泳

取对数生长期细胞按照 1×10⁷孔的密度接种 6 孔培养板。分别给予 1μCi/mL¹²⁵I-NGF,1μg/mL NGF 及 15μCi/mL ¹²⁵I 溶液。37℃、5%CO₂ 饱和湿度继续培养 36h。按照彗星试验试剂盒提供的说明书及试剂,先在有孔载玻片上制作第一层正常熔点琼脂糖凝胶(NMA),并使其凝固备用。融化低熔点琼脂糖(LMA)溶液,并置于 37℃保温。消化收集细胞并将细胞

稀释成 5×10⁶/mL 的细胞悬液,取 20μL 细胞悬液与 75μL LMA 混合均匀,铺至第一层 NMA 凝胶上,4℃下使其凝固,将铺制好的载玻片置于新鲜配制的裂解液中 4℃避光裂解过夜,室温避光解旋 20min,25V 恒压电泳 25min,双蒸水漂洗 2 遍,避光染色 10min 后于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期分布

取对数生长期细胞按照 1×10⁶孔的密度接种 6 孔培养板,药物处理后,细胞用冰冷的 70%乙醇固定并用 PBS 清洗,离心收集细胞,倒去上清液,将管口倒扣在吸水纸上轻轻扣干,向细胞沉淀中加入 250μL 试剂盒中的 A 液(Cycletest plus DNA reagent kit),手指轻弹管底使成细胞悬液,室温静置 10min,加入 200μL 试剂盒中的 B 液,手指轻弹管混匀,室温静置 10min,加入 200μL 预冷的试剂盒中的 C 液,手指轻弹管混匀,冰箱内染色 10min,将细胞悬液经孔径 5μm 的尼龙网过滤后使用流式细胞仪检测各细胞周期细胞比例。

MPM-2/PI 双参数流式细胞染色法:1μCi/mL ¹²⁵I-NGF 及 15μCi/mL ¹²⁵I 处理细胞 24h 或者 48h;或者 250nmol/L VCR 处理细胞 24h。收集细胞,PBS(含 0.05%Tween-20 和 1%FBS)洗 2 遍,70%乙醇固定过夜;PBS(含 0.05%Tween-20 和 1% FBS)洗 2 遍,加入 MPM-2 抗体(终浓度为 1μg/mL),4℃放置 1h;PBS 洗 2 遍,加入 FITC 标记的二抗(终浓度为 5—10μg/mL),室温避光放置 1h;PBS 洗 2 遍,用含有 5μg/mL PI 和 50μg/mL RNase A 的染色液 37℃避光染色 30min;流式细胞仪测定 FITC 荧光强度。

1.2.5 Western Blotting 分析

¹²⁵I 及各种浓度的 ¹²⁵I-NGF 处理细胞后,裂解细胞。裂解液 4℃ 20min,12000g 离心 12min。使用上海碧云天生物技术有限公司生产的 Western 及细胞裂解液,配套使用其 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。Bradford 法测定蛋白浓度。等量的裂解液(40μg)进行 SDS-PAGE 电泳,转膜(Millipore 公司)。脱脂牛奶封闭非特异位点 2h,不同抗体 4℃过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗(Santa Cruz Biotechnology 公司)。用增强的化学发光剂显色观察拍照。

1.2.6 RT-PCR

总 RNA 抽提使用 SuperScript One-Step RT-PCR kit (Invitrogen 公司)。引物:Cyclin B1 P1,5'-AAGA GCTTTAAA-CTTTGGTCTGGG-3';Cyclin B1 P2,5'-CTTTGTAAAGTCCTTG-ATTT ACCATG-3';β-actin P1,5'-CCCAGGCACCAGGGCG-TGATGGT-3';β-actin P2,5'-GGACTCCATGCCAGG AAGG-AA-3'。反转录 55℃ 15min,变性和扩增 95℃ 30s,25 个循环。每次循环 95℃ 15s,退火 55℃ 30s,延伸 72℃ 40s。PCR 扩增后,2%琼脂糖凝胶电泳分析^[9]。

1.3 统计学分析

采用 Student's *t* 检验对数据进行分析。Cyclin B1 蛋白水平表达为均数±标准差。治疗组和对照组之间的比较进行 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ¹²⁵I-NGF 对 U251 细胞的 DNA-损伤作用

微核形成实验结果表明, ¹²⁵I-NGF 处理的 U251 细胞出现微核现象, 而 NGF 游离 ¹²⁵I 处理组无微核现象(图 1(a))。单

细胞凝胶电泳实验表明, ¹²⁵I-NGF 处理的 U251 细胞出现彗星现象(图 1(b))。这些现象表明 ¹²⁵I-NGF 进入核内后导致了 DNA 的损伤作用。

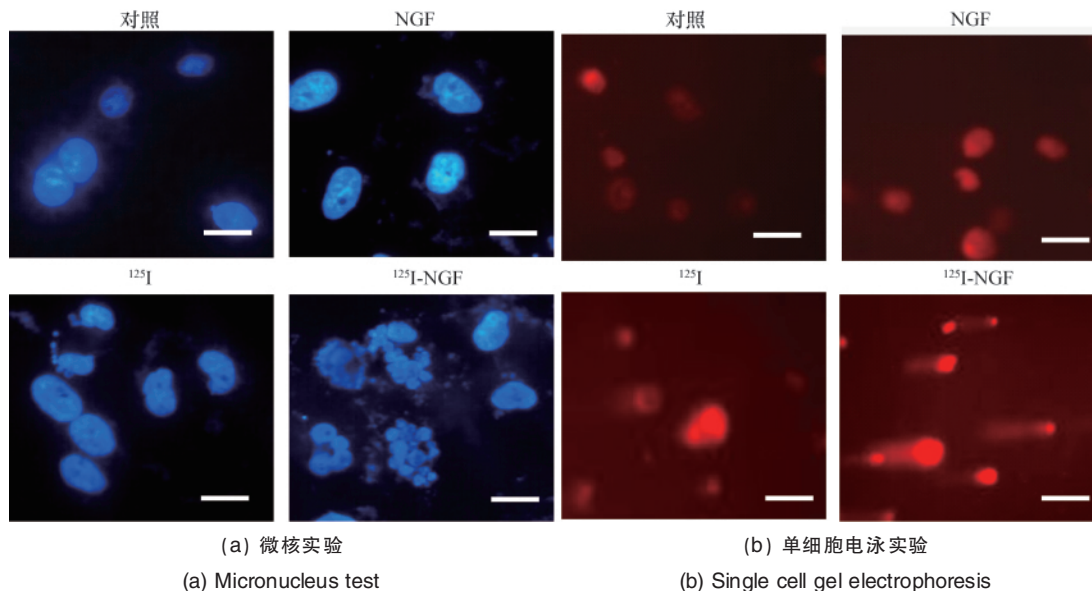


图 1 U251 的 ¹²⁵I-NGF 的 DNA 损伤作用

Fig. 1 DNA-damaging effect of ¹²⁵I-NGF in U251 cells illustrated by micronucleus test and single cell gel electrophoresis

注: (a) 微核实验中, U251 细胞用 5μCi/mL ¹²⁵I 及 5μCi/mL ¹²⁵I-NGF 处理 24h。¹²⁵I-NGF 显示出微核形成作用(标尺 5μm)。(b) 单细胞电泳试验中采用同样的处理方法, ¹²⁵I-NGF 显示出彗星效应(标尺 10μm)。倒置显微镜下拍摄, 放大倍数 400×。

Notes: (a) In micronucleus test, U251 cells were exposed to various agents (5μCi/mL ¹²⁵I and 5μCi/mL ¹²⁵I-NGF) for 24h. It was ¹²⁵I-NGF that showed the micronucleus forming activities rather than free ¹²⁵I (scale bars: 5μm). (b) During single cell gel electrophoresis, by using the same treatment protocol, photos show the comet effect of ¹²⁵I-NGF (scale bars: 10μm). Photos were taken under inverted microscope with the 400× magnification, and within the same group the magnification of each photo is the same.

2.2 ¹²⁵I-NGF 诱导 U251 细胞 G₂ 阻滞

U251 为 p53 突变型多药耐药细胞。由于 p53 为细胞周期的重要调节蛋白, 所以着重观察了 ¹²⁵I-NGF 对细胞周期的影响。结果表明, 1μg/mL NGF 处理细胞后诱导了细胞 G₁ 期比例升高, 而 ¹²⁵I-NGF 以剂量依赖性的方式诱导胶质瘤 U251 细胞 G₂/M 期阻滞(图 2)。当 5μCi/mL ¹²⁵I-NGF 处理 24h 后, G₂/M 期的比例从 11.4% 增加到 61.5%, 而 M 期细胞从 1% 下降到 0.05%。这些数据表明 ¹²⁵I-NGF 诱导了 p53 突变型 U251 细胞 G₂ 期阻滞(图 3)。

2.3 ¹²⁵I-NGF 诱导细胞周期调节蛋白改变

为了进一步证实 ¹²⁵I-NGF 诱导 U251 细胞 G₂ 期阻滞, 检测了 G₂/M 期相关蛋白的表达。p53 和 p21 表达保持不变, 说明 ¹²⁵I-NGF 诱导的 G₂ 期阻滞和 p53 及 p21 途径无关(图 4(a))。¹²⁵I-NGF 处理的 U251 细胞 Cyclin B1 的表达水平呈剂量依赖性降低, 而 Cyclin B1 是 G₂/M 期转换的正性调节蛋白(图 4(b))。进一步用 RT-PCR 的方法研究了 Cyclin B1 的 mRNA 水平, 结果表明 Cyclin B1 mRNA 水平没有改变(图 4

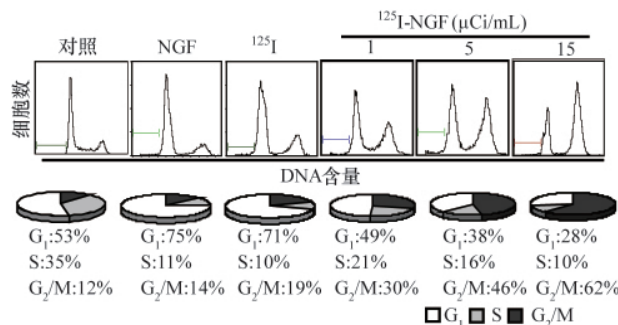


图 2 ¹²⁵I-NGF 对胶质瘤 U251 细胞周期分布的影响

Fig. 2 Activities of ¹²⁵I-NGF on cell cycle distribution in glioma U251 cells

注: U251 细胞用不同浓度的 ¹²⁵I-NGF 处理 24h 后典型的细胞周期分布图, 其中各期所占百分率列在图下方。

Notes: U251 cells were treated with various concentrations of ¹²⁵I-NGF for 24h. The typical cell cycle distribution diagrams are in first line. The cell population in each cell cycle phase is the mean percentage of the total events counted.

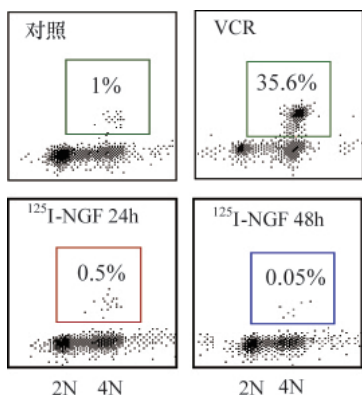


图3 MPM-2/PI 双染后流式细胞术测定 U251 细胞周期分布
Fig. 3 Cell cycle distribution of U251 cells determined by flow cytometry after MPM-2/PI staining

注: 1 μ Ci/mL 125 I-NGF 处理细胞 24h 或者 48h, 或者 VCR 处理 24h (阳性对照)。4N DNA 含量的 M 期细胞用方框表示。

Notes: Cells were treated with 1 μ Ci/mL 125 I-NGF for 24h or 48h or 250nmol/L VCR for 24h, as a positive control. Mitotic cells, with 4N DNA content and elevated MPM-2 signal, are indicated by a box in the dot plots. Data are representative of three independent experiments.

(c)。根据这些结果,假定 125 I-NGF 降低 Cyclin B1 的蛋白水平的原因是促进了 Cyclin B1 的蛋白水解作用。联合应用 125 I-NGF 和 LLnL (钙蛋白酶和 26s 蛋白酶体抑制剂), Cyclin B1 蛋白水平降低被反转 (图 4(d))。这证实了先前的推断: 125 I-NGF 诱导 U251 细胞 Cyclin B1 蛋白降解。同时, Chk1 和 Chk2 的 Western blotting 结果表明磷酸化的 Chk1 和 Chk2 表达增加, 而 Chk1 和 Chk2 蛋白水平保持不变。磷酸化的 p-Cdc25C (Ser216) 显著增加 (图 4(b))。所有这些结果表明, 125 I-NGF 活化了 ATM 和 ATR 通路, 诱导 Chk1 和 Chk2 磷酸化, 然后 Cdc25C 磷酸化, 最终 Cdc2/Cyclin B1 不能激活, 细胞周期阻滞于 G₂ 期。

3 结论

在当前的研究中发现: 125 I-NGF 对 p53 突变型 U251 细胞多种蛋白的表达有调节作用。 125 I-NGF 诱导的 U251 细胞 DNA 损伤导致一些细胞周期蛋白水平显著提高, 包括 p-Chk1、p-Chk2、p-Cdc25C; 而 Cyclin B1 蛋白水平则表现为降低。 Cyclin B1 mRNA 的改变和蛋白水平的改变无相关性, 这是由于 125 I-NGF 诱导的 Cyclin B1 蛋白水平降低可能是促进其降解导致的。蛋白酶抑制剂实验进一步证实了这个结果。

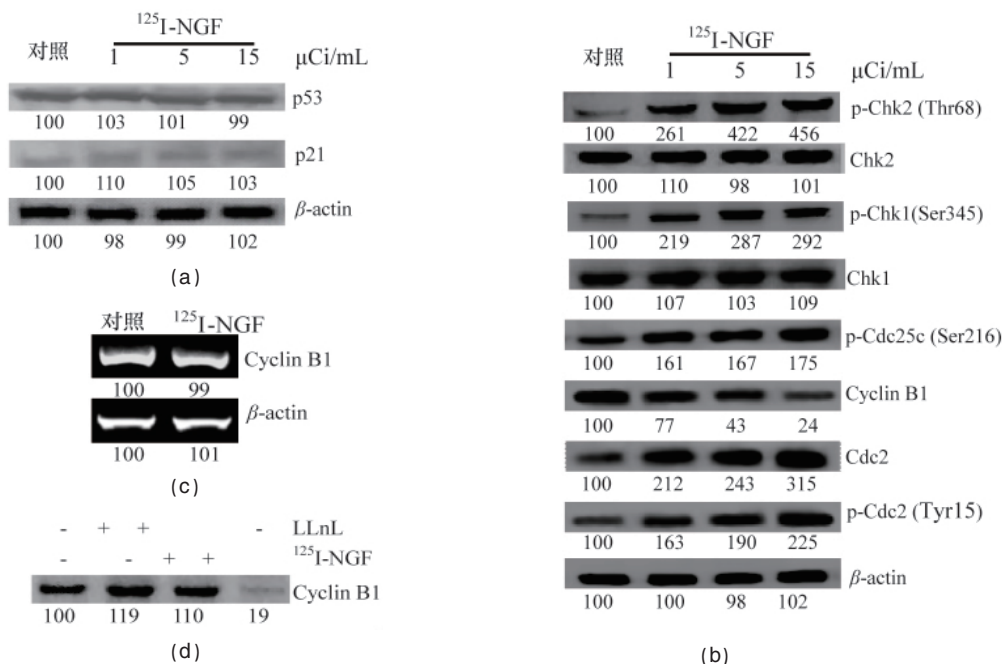


图4 G₁ 和 G₂ 期细胞周期调节蛋白水平变化

Fig. 4 Protein levels of G₁ and G₂ cell cycle regulators

注: Western Blotting 分析蛋白水平变化。每个条带下的数字代表相对于对照条带的百分比, β -actin 的蛋白水平做内参照。U251 细胞用不同浓度的 125 I-NGF 处理 24h ((a) 和 (b))。RT-PCR 分析 Cyclin B1 mRNA 水平 (c)。U251 细胞用 15 μ Ci/mL 125 I-NGF 或者 100 μ mol/L LLnL 共处理 24h (d)。本数据是三次独立实验中的代表性数据。

Notes: Proteins were analyzed by Western blotting. The number under each band is expressed as a percentage of control, normalized by the corresponding β -actin level. U251 cells were treated with various concentration of 125 I-NGF for 24h ((a) and (b)). RT-PCR is for analysis of Cyclin B1 mRNA levels (c). U251 cells were untreated or treated with 15 μ Ci/mL 125 I-NGF or co-treated with 125 I-NGF and 100 μ mol/L LLnL for 24 h (d). Data are representative of three independent experiments.

ATM 和 ATR 通路的激活为 DNA 损伤提供了证据, 并提示 ^{125}I -NGF 诱导的 DNA 损伤可能是单链损伤或者是双链损伤。

此外, 根据研究数据, U251 细胞 Cyclin B1 的蛋白水平显著降低, 同时 ^{125}I -NGF 诱导 G₂ 期阻滞。这和 U251 细胞本身 p53 突变密切相关。由于 U251 细胞自身 p53 突变, ^{125}I -NGF 断裂 DNA 的同时无法激活 p53 及 p21 通路导致 G₁ 阻滞。G₂ 期的修复成为 U251 细胞受损 DNA 修复的唯一时段, 这也为联合化疗剂的选择提供了依据。由于很大比例的人脑胶质瘤细胞为 p53 突变型, 尤其是多药耐药细胞, 之前研究的结果为多药耐药细胞的联合化疗提供了依据。综上所述, 本文研究了 ^{125}I -NGF 可能存在的抗肿瘤作用机制, 同时也为指导其临床合理应用提供了一定的基础。

参考文献 (References)

- [1] Buchegger F, Perillo-Adamer F, Dupertuis Y M *et al.* Auger radiation targeted into DNA: A therapy perspective [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(11): 1352-1363.
- [2] Comelissen B, Vallis K A. Targeting the nucleus: An overview of Auger-electron radionuclide therapy [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2010, 7(4):

263-279.

- [3] Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, *et al.* Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(1): 119-131.
- [4] Assimakopoulou M, Kondyli M, Gatzounis G, *et al.* Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7(1): 202.
- [5] Riddick G, Fine H A. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(8): 439-450.
- [6] Zhang Z, Yang Y, Gong A. Localization of NGF and TrkA at mitotic apparatus in human glioma cell line U251 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 68-74.
- [7] Gong A, Zhang Z, Xiao D. Localization of phosphorylated TrkA in carrier vesicles involved in its nuclear translocation in U251 cell line [J]. *Sci China C Life Sci*, 2007, 50(2): 141-146.
- [8] Li Q Y, Yang Y, Xu W L, *et al.* Effect of ^{125}I labeled nerve growth factor on glioma cell line U251[J]. *Chin J Exp Surg*, 2010, 27(5): 603-605.
- [9] Liu X, He H W, Feng Y, *et al.* Difference of cell cycle arrests induced by lidamycin in human breast cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(2):173-179.

(责任编辑 陈瑞芳, 马骁骁)

·学术动态·

“第六届超快现象与太赫兹波国际研讨会”征文

“第六届超快现象与太赫兹波国际研讨会”将于 2012 年 10 月 1—2 日在武汉市召开。本次大会由华中科技大学、湖北省科学技术厅、武汉东湖国家自主创新示范区、国际光学委员会、湖北省外专局主办。

征稿范围:超快现象和超短脉冲激光技术发展(超快科学与技术, 阿秒光源, 飞秒, 高功率激光, 强场物理及应用, 物理、化学、生物中的超快现象, 超快诊断、图像处理和数据分析); 太赫兹波科学与技术(太赫兹源, 太赫兹波的探测技术, 太赫兹时域光谱技术, 太赫兹波的传输与探测, 太赫兹波的应用, 太赫兹波、卷置和技术的新理论, 非线性太赫兹现象, 太赫兹光谱与成像, 无损检测与成像, 太赫兹波等离子体光子学与特异材料, 赫兹光子学器件, 太赫兹波与物质的相互作用, 太赫兹辐射相关的新概念及应用)。

论文截稿: 2012 年 6 月 28 日。

联系电话: 027-87792381。

电子邮箱: chengxiao1122@gmail.com。