

· 基础研究 ·

二硫代氨基甲酸吡咯烷联合卡铂对 U251 神经胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响

王文新¹, 邱建武^{2△}

(辽宁医学院附属: 1. 研究生学院; 2. 第一医院神经外科, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 探讨二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)联合卡铂(CBP)对 U251 神经胶质瘤细胞增殖与凋亡的影响。方法 将传代生长状态良好的 U251 神经胶质瘤细胞随机分为 4 组: 对照组加常规培养液, 实验 A 组加 PDTC(0.1 mg/mL)0.01 mL, 实验 B 组加 CBP(1 mg/mL)0.01 mL, 实验 C 组加 PDTC(0.1 mg/mL)0.01 mL+CBP(1 mg/mL)0.01 mL。比较 4 组 U251 神经胶质瘤细胞的增殖和凋亡的细胞形态。结果 培养 12、24、36 h, 对照组 U251 神经胶质瘤细胞的抑制率[(4.28±0.021)%、(9.34±0.023)%、(13.86±0.025)%]、实验 A 组[(10.63±0.019)%、(15.06±0.041)%、(28.34±0.032)%]、实验 B 组[(24.16±0.025)%、(33.71±0.053)%、(39.42±0.041)%]和实验 C 组[(32.15±0.016)%、(40.82±0.046)%、(45.27±0.031)%]比较差异有统计学意义($P<0.05$); 对照组细胞凋亡率(0.8±0.3)%、实验 A 组(29.1±1.5)%、实验 B 组(38.7±3.2)%、和实验 C 组(61.3±2.7)%比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 PDTC 联合 CBP 可抑制 U251 神经胶质瘤细胞增殖, 并诱导其凋亡。

关键词:神经胶质瘤; 二硫代氨基甲酸吡咯烷; 卡铂; 增殖; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)07-0768-03

Influence of pyrrolidine dithiocarbamate combined with carboplatin on U251 glioma cells proliferation and apoptosis

Wang Wenxin, Qiu Jianwu[△]

(1. Graduate School; 2. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To explore the influence of pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC) combined with carboplatin(CBP) on the U251 glioma cells proliferation and apoptosis. **Methods** The U251 glioma cells with good passage growth status were divided into four groups randomly. The conventional nutrient solution was added to the control group, PDTC(0.1 mg/mL) 0.01 mL to the experimental group A, CBP(1 mg/mL) 0.01 mL to the experimental group B and PDTC(0.1 mg/mL) 0.01 mL+CBP(1 mg/mL) 0.01 mL to the experimental group C. The cell morphologies of U251 glioma cell proliferation and apoptosis were compared among 4 groups. **Results** After 12, 24, 36 h culture, the U251 glioma cell inhibitory rates were (4.28±0.021)%, (9.34±0.023)%, (13.86±0.025)% in the control group, (10.63±0.019)%, (15.06±0.041)% and (28.34±0.032)% in the experimental group A, (24.16±0.025)%, (33.71±0.053)% and (39.42±0.041)% in the experimental group B, (32.15±0.016)%, (40.82±0.046)% and (45.27±0.031)% in the experimental group C, respectively, showing statistical difference among them($P<0.05$). The cell apoptosis rates in the control group, the experimental A, the experimental B and the experimental C were (0.8±0.3)%, (29.1±1.5)%, (38.7±3.2)% and (61.3±2.7)%, respectively, the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** PDTC combined with CBP can restrain the proliferation of U251 glioma cells and also induce their apoptosis.

Key words: glioma; pyrrolidine dithiocarbamate; carboplatin; proliferation; apoptosis

核转录因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是一类广泛存在于细胞中的多显性核转录因子,可以调控多种基因的转录和表达,与肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡关系密切,在肿瘤的发生、发展中起重要作用^[1]。异常的 NF- κ B 活性在人类恶性胶质瘤的局灶性坏死形成中至关重要, NF- κ B 活性的抑制或 NF- κ B 调节基因被证明能促进脑肿瘤生长、发病和血管转移^[2-3]。NF- κ B 的异常激活表达与多种疾病的发生有关^[4-5]。研究表明,多种抗肿瘤药物能引起 NF- κ B 的活化^[6]。吡咯烷二硫代氨基甲酸(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)可抑制 NF- κ B 的亚单位,并具有金属螯合作用,是 NF- κ B 特异性阻断剂,可抑制其活性,具有多靶点高效的抗癌作用。现将 PDTC 联合卡铂(carboplatin, CBP)对 U251 神经胶质瘤细胞增殖与凋亡的影响报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 U251 神经胶质瘤细胞,达氏修正依氏培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM),磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS), pH 7.2~7.4, 10% 胎牛血清

(fetal bovine serum, FBS), 四甲基偶氮唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT), 台盼蓝染色,膜联蛋白-V 型-异硫氰酸荧光素(annexin-V-fluorescein isothiocyanate, annexin V-FITC)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染色试剂盒。PDTC, CBP, 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

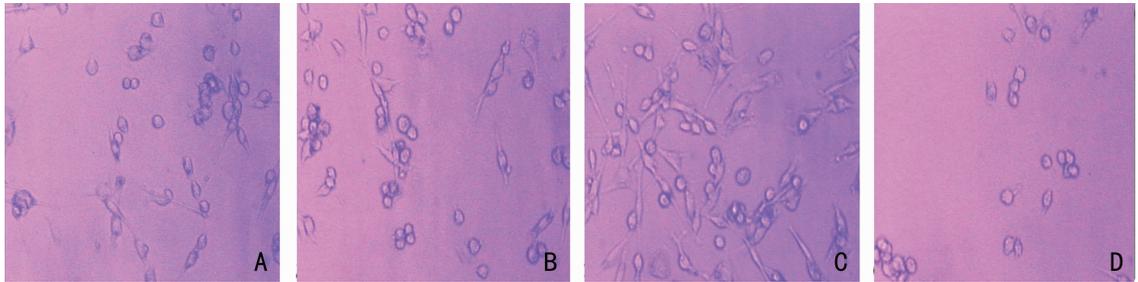
1.2 方法

1.2.1 U251 神经胶质瘤细胞培养与分组 U251 神经胶质瘤细胞在 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和含有 10% 灭活 FBS 的高糖 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 相对湿度 95% 的恒温培养箱内培养细胞贴壁生长,每 1 天换液 1 次,2~3 d 以 1:3 传代 1 次,用 0.125% 胰蛋白酶消化传代培养。将 PDTC 和 CBP 用无菌蒸馏水调整为 20 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C 冰箱避光冷藏。将传代 2 次后的 U251 神经胶质瘤细胞随机分 4 组,对照组加常规培养液,实验 A 组加 PDTC(0.1 mg/mL)0.01 mL,实验 B 组加 CBP(1 mg/mL)0.01 mL,实验 C 组加 PDTC(0.1 mg/mL)0.01 mL 和 CBP(1 mg/mL)0.01 mL,置于

表 1 4 组不同时间 U251 神经胶质瘤细胞生长抑制率和凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞抑制率			细胞凋亡率
	12 h	24 h	36 h	
对照组	4.28±0.021 [△]	9.34±0.023 [△]	13.86±0.025 [△]	0.80±0.300 [△]
实验 A 组	10.63±0.019* [△]	15.06±0.041* [△]	28.34±0.032* [△]	29.10±1.500* [△]
实验 B 组	24.16±0.025* [△]	33.71±0.053* [△]	39.42±0.041* [△]	38.70±3.200* [△]
实验 C 组	32.15±0.016*	40.82±0.046*	45.27±0.031*	61.30±2.700*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; [△]: $P < 0.05$, 与实验 C 组比较。



A: 对照组; B: 实验 A 组; C: 实验 B 组; D: 实验 C 组。

图 1 显微镜下 4 组 U251 神经胶质瘤细胞形态(台盼蓝染色, $\times 200$)

37 °C、5% CO₂、相对湿度 95% 的恒温培养箱内培养。

1.2.2 U251 神经胶质瘤细胞增殖情况观察 采用 MTT 法生长抑制率(CGIR), 抑制率越低, 表示细胞增殖越高。将各组细胞悬液浓度调整为 1×10^4 /mL, 加入 96 孔培养板中, 每孔 200 μ L, 每组设 3 个平行孔。调零孔放对照组细胞悬液, 对照孔分别放实验 A、B、C 组的细胞悬液。继续分别培养 12、24、36 h, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 在培养箱内孵育 4 h 后, 终止培养, 小心吸尽孔内上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 震荡 10 min, 混匀后用酶联免疫检测仪检测 490 nm 波长处各组细胞的光密度值(optical density, OD), 抑制率 = 1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值。

1.2.3 U251 神经胶质瘤细胞凋亡率测算 采用流式细胞仪检测按对照组和实验 A、B、C 组置孔, 每组设置 6 个复孔, 取各组细胞, 将细胞收入 10 mL 离心管中, 1 500 r/min 离心 3 min, PBS 液漂洗离心 1 次, 弃去上清液。100 μ L PBS 液冲悬细胞, 轻轻吹匀成单细胞悬液。annexin-V-FITC、PI 各加入 5 μ L, 室温避光染色 30 min, 用流式细胞仪检测, 取每组 6 个数值, 进行统计分析, 得出每组细胞的凋亡率。

1.2.4 台盼蓝染色观察 培养 24 h 后从 4 个组中随机各取 1 瓶培养瓶, 用 0.125% 胰酶消化贴壁细胞, 制备细胞悬液, 并作适当稀释。然后将购买的成品 0.4% 台盼蓝与细胞悬液以 1:9 混合混匀(终浓度 0.04%)。接着在 3 min 内, 倒置相关显微镜下观察, 死细胞被染成明显的蓝色, 而活细胞拒染呈无色透明状。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行处理分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

4 组 U251 神经胶质瘤细胞生长抑制率和凋亡率见表 1。台盼蓝染色在倒置相关显微镜下细胞形态见图 1。

3 讨 论

脑神经胶质瘤来源于神经上皮的肿瘤, 是颅内最常见的恶性肿瘤, 约占全部的颅内肿瘤的 40%~50%。预后差, 尤其是恶性肿瘤, 平均生存期不超过 1 年。目前治疗方法主要以手术切除为主, 但由于其具有肿瘤浸润性生长的特点, 难以完全切

除, 术后复发率高, 因此, 常需要加以放疗、化疗及生物治疗等辅助治疗。NF- κ B 广泛存在于机体细胞中, 是一类能与多基因启动子部位的 κ B 位点特异结合并促进转录的 DNA 结合蛋白总称。在静止细胞中, 由于 I κ K 蛋白与 NF- κ B 结合, 使 NF- κ B 以无活性状态存在于胞质中。当细胞受到外界刺激时, I κ K 蛋白可以被 I κ K 激酶复合体磷酸化而导致降解, 从而激活 NF- κ B, 使 NF- κ B 自由从胞质进入细胞核, 与核内的靶序列结合, 调控相关基因的转录, 控制细胞增殖、死亡和迁移。NF- κ B 作为转录因子, 通过上调一些促生存基因如 Bcl-x 1、TRAF 1、TRAF2、SOD 等或凋亡蛋白抑制物的水平或直接诱导抗凋亡基因而发挥抗凋亡作用, 可阻止由肿瘤坏死因子和其他遗传毒性作用等引起的细胞凋亡^[7]。有研究显示, 以肿瘤坏死因子诱导 NF- κ B 的表达使乳腺癌细胞对放化疗的抵抗力增加, 姜黄素通过抑制 NF- κ B 而诱导凋亡^[8-9]。有研究表明, 在健康人脑组织细胞中仅存在无活化的 NF- κ B 的表达, 而在胶质瘤细胞中则可以检测到活化的 NF- κ B 蛋白^[1]。Xiong 等^[10] 研究发现, 抑制前列腺癌细胞中 NF- κ B 的活性, 可下调血管生成因子 VEGF 和 IL-8, 减少肿瘤血管形成, 从而限制肿瘤的生长和转移。最近, Lavon 等^[11] 报道, 在人脑胶质瘤细胞株中, NF- κ B 可以诱导 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶蛋白的表达, 导致细胞株对烷化剂耐药。NF- κ B 在肿瘤细胞中有明确的抗凋亡作用, 抑制 NF- κ B 的表达可以增加肿瘤坏死因子引起的细胞凋亡及增加肿瘤细胞对放疗、化疗的敏感性^[12-13]。人们已逐渐认识到 NF- κ B 在肿瘤中所起的作用, NF- κ B 的抑制剂可成为恶性肿瘤治疗潜在的靶点。亚硝胺类药物是治疗脑肿瘤的常用药, CBP 为第 2 代铂类化合物, 与顺铂同属细胞周期非特异性药物。由于抗肿瘤活性较强, 消化道反应及肾毒性较低, 因而是临床治疗各种实体肿瘤的常用药。其主要作用 DNA 的鸟嘌呤的 N7 和 O6 原子上, 引起 DNA 链间和链内交联, 破坏 DNA 分子, 阻止其螺旋解链, 干扰 DNA 合成, 而产生细胞毒作用^[14-15]。所以本实验选用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 联合卡铂作用 U251 神经胶质瘤细胞。实验结果表明, PDTC 联合卡铂治疗组较单一组治疗细胞抑制作用增强, 细胞凋亡率增高。这表明 NF- κ B 抑制剂 PDTC 可以提高肿瘤细胞对卡铂的敏感性, 二者具有协同作用。其可能机制是 NF- κ B 表达被特异性

抑制后, NF- κ B 处于失活状态, 无法从胞质自由进入细胞核, 与细胞核内的靶序列结合, 就不能调控相关基因的转录、控制细胞增殖、死亡、迁移。并且 NF- κ B 抑制剂 PDTC 还能抑制 MG-MT 蛋白的表达, 降低细胞株对化疗药物的耐药性。

因此, NF- κ B 抑制剂 PDTC 联合卡铂可以抑制 U251 神经胶质瘤细胞的增殖并诱导其凋亡。联合 NF- κ B 抑制剂 PDTC 可以提高卡铂对神经胶质瘤细胞的化疗效果, 抑制 NF- κ B 活化为神经胶质瘤化疗提供靶向, 以期延长患者生命。

参考文献:

- [1] 唐万忠, 夏玉军, 孟庆海, 等. NF- κ B 与脑胶质瘤的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2004, 9(1): 79-81.
- [2] Xie TX, Aldape KD, Gong W, et al. Aberrant NF- κ B activity is critical in focal necrosis formation of human glioblastoma by regulation of the expression of tissue factor[J]. Int J Oncol, 2008, 33(1): 5-15.
- [3] Atkinson GP, Nozell SE, Benveniste ET. NF- κ B and STAT 3 signaling in glioma: targets for future therapies[J]. Expert Rev Neurother, 2010, 10(4): 575-586.
- [4] Wang H, Zhang W. Analysis of the activation status of Akt, NF- κ B and Stat3 in human diffuse gliomas[J]. Lab Invest, 2004, 84(8): 941-951.
- [5] 刘玲. 核转录因子的活化在脑缺氧缺血神经细胞凋亡中的调控作用及研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2003, 18(6): 474-476.
- [6] Li Y, Ahmed F, Ali S, et al. Inactivation of nuclear factor kappa B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6934-6942.
- [7] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF- κ B in cancer from innocent bystander to major culprit[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 301-310.
- [8] Braunstein S, Formenti SC, Schneider RJ. Acquisition of

stable inducible up-regulation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor exposure confers increased radiation resistance without increased transformation in breast cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(1): 78-88.

- [9] Freudlsperger C, Greten J, Schumacher U. Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of NF-kappaB[J]. Anticancer Res, 2008, 28(1A): 209-214.
- [10] Xiong HQ, Abbruzzese JL, Lin E. NF- κ B activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells[J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 181-188.
- [11] Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, et al. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8952-8959.
- [12] Hanefner B. NF- κ B: arresting a major culprit in cancer[J]. Drug Discov Today, 2002, 7(12): 653-663.
- [13] Duan L, Aoyagi M, Tamaki M, et al. Impairment of both apoptotic and cytoprotective signalings glioma cells resistant to the combine use of cisplatin and tumor necrosis factor alpha[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1): 234-243.
- [14] Chang JK, Li CJ, Liao HJ, et al. Anti inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts[J]. Toxicology, 2009, 25(8): 148-156.
- [15] Carter DL, Asmar L, Barreca D, et al. Favorable survival observed after carboplatin, paclitaxel, and concurrent accelerated hyperfractionated radiotherapy for treatment of locally advanced head and neck carcinoma[J]. Invest New drugs, 2008, 26(5): 473-481.

(收稿日期: 2012-08-12 修回日期: 2012-10-18)

(上接第 762 页)

- Stable Angina)[J]. Circulation, 2003, 107(1): 149-158.
- [6] Rudolph V, Steven D, Gehling UM, et al. Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(4): 460-465.
 - [7] Alyasin S, Amin R. Intracellular neutrophil myeloperoxidase in myocardial infarction[J]. Iran Med J, 2005, 6(3-4): 611-666.
 - [8] Tang WH, Wu Y, Nicholls SJ, et al. Plasma myeloperoxidase predicts incident cardiovascular risks in stable patients undergoing medical management for coronary artery disease[J]. Clin Chem, 2011, 57(1): 33-39.
 - [9] Eggers KM, Dellborg M, Johnston N, et al. Myeloperoxidase is not useful for the early assessment of patients with chest pain[J]. Clin Biochem, 2010, 43(3): 240-245.
 - [10] McCann CJ, Glover BM, Menown IB, et al. Investigation of a multimarker approach to the initial assessment of pa-

tients with acute chest pain[J]. Adv Ther, 2009, 26(5): 531-534.

- [11] Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes[J]. Circulation, 2003, 108(12): 1440-1445.
- [12] Fred SA, Stephen WS, Lesly AP, et al. Assessment of the multiple-biomarker approach for diagnosis of myocardial infarction in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome[J]. Clin Chem, 2009, 55(1): 93-100.
- [13] Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently health individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 5(2): 159-165.

(收稿日期: 2012-08-22 修回日期: 2012-10-18)