

· 临床研究 ·

吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对喉癌 Hep-2 细胞增殖和凋亡的影响

曹雪秋

(湖北民族学院附属民大医院耳鼻喉头颈外科,湖北恩施 445000)

摘要:目的 研究吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)对喉癌 Hep-2 细胞增殖和凋亡的影响。方法 体外培养 Hep-2 细胞,细胞分为 3 个组:对照组、实验分为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)实验检测不同浓度 PDTC 对 Hep-2 细胞生长的抑制作用;流式细胞术检测 PDTC 对 Hep-2 细胞凋亡的影响;实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 PDTC 对 Hep-2 细胞 Bcl-xL 和 XIAP 的 mRNA 表达的影响;蛋白印迹(Western-blot 法)检测 p-I κ B、Bcl-xL 及 XIAP 的蛋白表达及活化。结果 PDTC 对 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Hep-2 细胞生长抑制与对照组比较,差异有统计学意义,PDTC 的浓度越大,抑制效果越明显($P < 0.05$)。Hep-2 细胞经 PDTC 处理 24 h 后,50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率分别为(25.1 \pm 2.18)%和(35.4 \pm 2.62)%,与对照组(3.12 \pm 1.07)%比较,差异有统计学意义。PDTC 能导致 Hep-2 细胞生长抑制和凋亡增加且呈量效关系。结论 PDTC 能够通过阻断 Hep-2 细胞 NF- κ B 的活化,降低与抗凋亡相关基因 Bcl-xL 及 XIAP 的表达,抑制 Hep-2 细胞增殖并促进凋亡。

关键词:喉肿瘤;吡咯烷二硫代氨基甲酸盐;Hep-2 细胞;增殖;凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.09.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)09-1002-03

Effects of PDTC to proliferation and apoptosis of Hep-2 cells

Cao Xueqiu

(Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Minda Hospital, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: Objective To observe the effects of ammonium pyrrolidinedithiocarbamate(PDTC) to apoptosis and proliferation of Hep-2 cells. **Methods** Hep-2 cells were cultured in vitro. The control group and PDTC treatment groups were established according to the experimental requirements. The methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to measure the growth inhibition rate of Hep-2 cells. The flow cytometry assay was used to determine the apoptosis in Hep-2 cells. Bcl-xL and XIAP mRNA levels were measured by real time PCR in untreated Hep-2 cells and cells treated for varying amounts of PDTC. Western-blot analysis was used to determine the protein levels of p-I κ B, Bcl-xL and XIAP in Hep-2 cells. **Results** The 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ PDTC groups inhibited the growth of Hep-2 cells, difference compared with the control group showing statistical significance. The greater the PDTC concentration was, the more significant the inhibition effect was($P < 0.05$). After 24 h treating by PDTC, the apoptosis rate of Hep-2 cells in the 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ PDTC groups were(25.1 \pm 2.18)% and(35.4 \pm 2.62)% respectively, difference compared with the control group[(3.12 \pm 1.07)%] showing statistical significance. PDTC could lead to the growth inhibition of Hep-2 cells and the increase of apoptosis with the dose-effect relationship. **Conclusion** PDTC inhibits the proliferation of Hep-2 cells and promotes their apoptosis by blocking the NF- κ B activation of Hep-2 cells and reducing the expression of Bcl-xL and XIAP.

Key words: laryngocarcinoma; PDTC; Hep-2 cells; proliferation; apoptosis

喉癌是头颈部肿瘤中的高发病,占全身恶性肿瘤的 5.7%~7.6%,占耳鼻咽喉恶性肿瘤的 7.9%~35%,也是呼吸道仅次于肺癌的第二位高发癌^[1]。其发病可能与吸烟、饮酒、空气污染、病毒感染及激素水平等多种因素有关。核因子 κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B)作为一种核转录因子广泛存在于多种真核细胞内,参与细胞的炎症反应和免疫应答,调控细胞增殖与凋亡,在肿瘤细胞的发生、发展中起着重要的作用^[2-3]。吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)是一种可以通透细胞膜的 NF- κ B 活化抑制剂,可以在多种细胞中抑制 NF- κ B 的激活^[4]。本研究拟通过体外细胞实验来探讨 PDTC 对喉癌 Hep-2 细胞的凋亡和增殖的影响,为进一步发掘有效治疗喉癌的药物和阐明相关机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 喉癌 Hep-2 细胞购自中科院上海细胞所。1640 培养基和胎牛血清(美国 Hyclone 公司),PDTC(中国碧云天

生物科技研究所),MTT 试剂(中国碧云天生物科技研究所),Trizol(美国 Invitrogen 公司),RNA 反转录试剂盒(宝生物工程大连有限公司),核酸染料(美国 Bio-Rad 公司),p-I κ B 单克隆抗体、Bcl-xL 单克隆抗体、XIAP 单克隆抗体(美国 Sigma 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),CFX 96TM PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Hep-2 细胞接种于 50 mL 细胞培养瓶,用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养细胞。培养瓶置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中。细胞贴壁生长后 2 d 换液 1 次,细胞融合至 80% 左右时消化传代。

1.2.2 Hep-2 细胞的分组及培养 取对数生长期细胞配制成浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的 Hep-2 细胞悬液,每孔加入 200 μL 细胞悬液,将细胞接种于 96 孔板。细胞分为 3 个组:对照组、实验分为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组。每组设 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱内培养。细胞贴壁后实验组加入

PDTC 处理细胞,对照组加入磷酸盐缓冲液。各组分别培养 24 h 后,每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L 继续培养 4 h,小心吸弃孔内液体,加入 150 μ L 二甲亚砜,酶标仪 A490 nm 测定各孔 OD 值。

1.2.3 Hep-2 细胞凋亡的流式细胞术检测 50、100 μ mol/L 组处理细胞 24 h 后,0.125% 的胰蛋白酶消化后离心,将细胞转入流式管,用结合缓冲液重悬细胞至 5×10^5 /mL,取 195 μ L,加入 FITC 标记的 Annexin-V 5 μ L,室温避光反应约 10 min,离心后用 190 μ L 结合缓冲液重悬细胞,再加入浓度为 50 μ g/mL 的 PI 10 μ L,避光反应 5 min 后,加入 200 μ L 缓冲液,立即用 FACSscan 进行流式细胞术定量检测。对照组不加任何试剂。

1.2.4 RT-PCR 检测 Bcl-xL 及 XIAP 的表达 对照组、50 μ mol/L 组、100 μ mol/L 组的 Hep-2 细胞接种于 6 孔板。处理细胞 12 h 后,用 Trizol 法提取细胞总 mRNA,逆转录试剂盒转为 cDNA。引物采用 Primer 5 软件设计,引物由上海生工生物工程公司合成,Bcl-xL 引物上游序列:5'-GTG GCC GGC GTG GTT-3',下游序列:5'-GAG GGT AGA GTG GAT GGT CAG TGT-3';XIAP 引物上游序列:5'-TTT TTC CCC TGT CCC TTT GA-3',下游序列:5'-ACA CAG GGC CAA ATC ACA TTA TAT AC-3'。RT-PCR 反应条件为预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min;变性 95 $^{\circ}$ C 10 s;退火 60 $^{\circ}$ C 30 s;返回 95 $^{\circ}$ C 10 s,扩增 39 个循环;65~95 $^{\circ}$ C,每 0.5 $^{\circ}$ C 5 s 梯度递增;终止反应。采用荧光定量 PCR 分析软件 Bio-Rad CFX manager 分析结果。

1.2.5 p-I κ B、Bcl-xL 及 XIAP 的蛋白表达的 Western-blot 检测 3 组细胞处理 12 h 后,分别加入适量的 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解细胞,提取总蛋白。按照碧云天公司 BCA 试剂盒进行蛋白定量。取 50 μ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,浓缩胶电压 60 V,分离胶电压 80 V。电泳结束

后转膜至聚偏二氟乙烯膜。5% 脱脂奶粉封闭后,加入一抗 p-I κ B、Bcl-xL 及 XIAP(抗体稀释度为 1:500),内参为 GAPDH(抗体稀释度为 1:500),置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜,复温后用 TBST 洗膜,加入二抗为辣根过氧化物(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔 IgG(抗体稀释度为 1:1000)孵育 1.5 h。电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒检测信号,凝胶成像仪采集图像,结果采用 Quantity One 软件进行条带灰度分析,实验重复 3 次。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

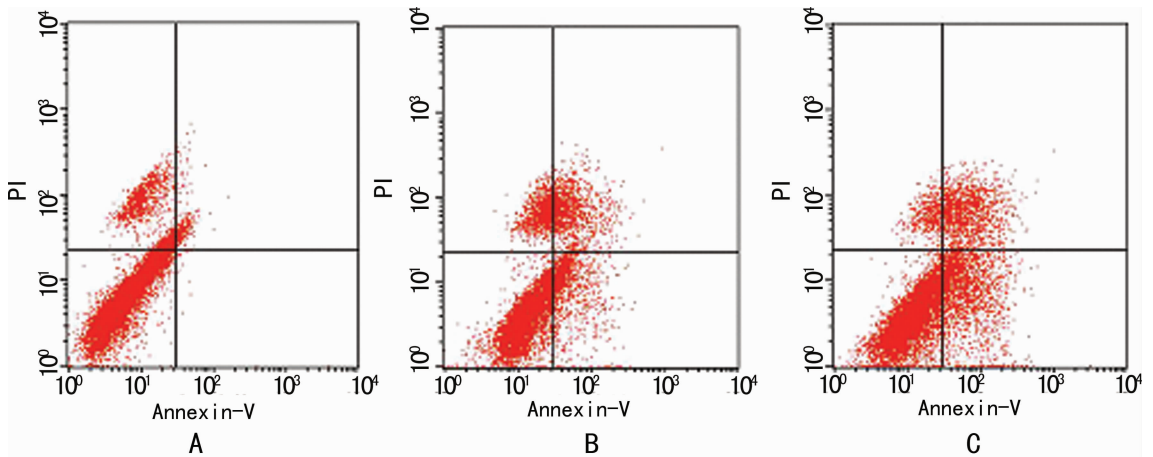
2.1 PDTC 对 Hep-2 细胞的生长抑制作用 PDTC 对 50 μ mol/L 组和 100 μ mol/L 组的 Hep-2 细胞生长抑制与对照组比较,差异有统计学意义,PDTC 的浓度越大,抑制效果越明显($P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组 Hep-2 细胞增殖的 MTT 法检测结果比较

组别	OD 值
对照组	1.05 \pm 0.07
50 μ mol/L 组	0.86 \pm 0.06 *
100 μ mol/L 组	0.66 \pm 0.06 * Δ

*: $P < 0.05$,与对照组比较; Δ : $P < 0.05$,与 50 μ mol/L 组比较。

2.2 PDTC 对 Hep-2 细胞凋亡的影响 流式细胞术结果见图 1。Hep-2 细胞经 PDTC 处理 24 h 后,50 μ mol/L 组和 100 μ mol/L 组细胞凋亡率分别为 (25.1 \pm 2.18)% 和 (35.4 \pm 2.62)%,与对照组 (3.12 \pm 1.07)% 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: 50 μ mol/L 组; C: 100 μ mol/L 组。

图 1 3 组 Hep-2 细胞凋亡的流式细胞术检测

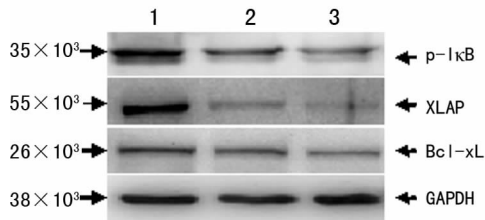
表 2 3 组 Hep-2 细胞 Bcl-xL 及 XIAP 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-xL 相对表达量	XIAP 相对表达量
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
50 μ mol/L 组	0.83 \pm 0.09 *	0.78 \pm 0.07 *
100 μ mol/L 组	0.66 \pm 0.05 * Δ	0.59 \pm 0.11 * Δ

*: $P < 0.05$,与对照组比较; Δ : $P < 0.05$,与 50 μ mol/L 组比较。

2.3 PDTC 对 Hep-2 细胞的 Bcl-xL 及 XIAP 的 mRNA 表达的影响 50 μ mol/L 组和 100 μ mol/L 组 Bcl-xL mRNA 与 XIAP mRNA 表达比对照组低($P < 0.05$)。100 μ mol/L PDTC 比 50 μ mol/L PDTC 作用更为明显($P < 0.05$),见表 2。

2.4 PDTC 对 Hep-2 细胞的 p-I κ B、Bcl-xL 及 XIAP 的蛋白表达的影响 Western-blot 结果见图 2。50 μ mol/L 组和 100 μ mol/L 组 p-I κ B、Bcl-xL 与 XIAP 蛋白表达比对照组低($P < 0.05$)。



1:对照组;2:50 $\mu\text{mol/L}$ 组;3:100 $\mu\text{mol/L}$ 组。

图2 3组 Hep-2 细胞 p-I κ B、Bcl-xL 与 XIAP 蛋白的表达

3 讨论

IKK/NF- κ B 信号通路被证实多种肿瘤中异常激活,促进肿瘤细胞增殖、抗凋亡、转移侵袭、血管生成和炎症反应等^[5]。经典的 IKK/NF- κ B 信号通路途径^[6]主要影响的是 NF- κ B 家族中的 RELA 和 p50 成员,无刺激信号时胞质中 RelA:p50 与抑制因子 I κ B 结合而处于静止状态,当刺激信号出现时胞质中 I κ B 激酶(I κ B kinase complex, IKK)激活使与 RelA:p50 结合的 I κ B 磷酸化激活而从三聚体脱落降解,RelA:p50 二聚体则进入核内启动或增强相关靶基因转录。Hideshima 等^[7]通过 I κ B 抑制剂阻断 NF- κ B 信号通路,发现能够降低 IGF-1H 和 IL-6 的分泌,抑制多发性骨髓瘤细胞在体内外的生长和增殖。通过抑制肿瘤细胞增殖促进凋亡发生已经成为目前肿瘤的研究和治疗中重要的策略^[8]。

PDTC 是一种抗氧化剂,为 NF- κ B 的特异性抑制剂,其功能一方面能够阻止 NF- κ B 亚基 p65 的激活,另一方面可通过抑制 I κ B 的降解而减少 NF- κ B 的核转位,从而阻断 IKK/NF- κ B 信号通路的激活^[9]。Liu 等^[10]研究发现,PDTC 能抑制卵巢癌细胞的增殖,减少促炎性细胞因子的分泌,促进凋亡的发生。但其对喉癌细胞的影响的研究还鲜有报道。本实验通过 MTT 实验显示随 PDTC 药物浓度的增加,喉癌细胞的增殖水平明显下降。RT-PCR 及 Western-blot 结果显示 PDTC 处理 Hep-2 细胞后,p-I κ B 表达水平降低,表明 PDTC 能够阻断 I κ B 的活化。

Bcl-xL 可阻断 Bax 对线粒体外膜的破坏而发挥抗凋亡的作用,还可干扰抑制 Caspase-3 和 Caspase-8 的活性、维持线粒体膜电位水平和控制活性氧的毒性而在细胞内发挥抗凋亡作用^[11]。有研究显示,Bcl-xL 在喉癌中存在高表达^[12],Wang 等^[13]通过多基因联合 RNAi 技术沉默 Bcl-xL 基因后,Hoechst 染色和电子显微镜观察喉癌 Hep-2 细胞的凋亡增加,增殖水平明显下降。NF- κ B 介导的抗凋亡作用实质上是依赖于增强凋亡抑制基因的转录实现的,最具代表性的基因如 XIAP、cIAP1、Bcl-xL 等能有效阻止细胞凋亡。XIAP 不仅能抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 还能抑制促凋亡蛋白 JUN 的激活^[14]。XIAP 在喉鳞状细胞癌中相对于正常组织明显升高,与喉癌的临床分期和病理学分期明显相关^[15]。沉默 p65 基因能够明显抑制 XIAP 及 cIAP1 等蛋白的表达^[14]。本实验发现,PDTC 处理 Hep-2 细胞后,细胞凋亡率增加,XIAP mRNA 和蛋白表达水平下降,表明通过抑制 I κ B 的活化能够降低 XIAP 的表达。

综上所述,通过 PDTC 处理人喉癌 Hep-2 细胞后,细胞增殖水平明显受到抑制,流式细胞术显示细胞凋亡增加,RT-PCR 及 Western-blot 结果显示细胞 I κ B 磷酸化激活减少,Bcl-xL、XIAP mRNA 及蛋白表达水平降低。显示 PDTC 能够通过阻断 I κ B 的活化,降低与抗凋亡相关基因 Bcl-xL 及 XIAP 的表达从而抑制增殖促进凋亡,喉癌细胞凋亡增加可能与 NF- κ B

信号转导通路的阻断有关。针对 NF- κ B 信号通路的治疗策略可能会给喉癌的治疗提供新的思路和治疗靶点。

参考文献:

- [1] 吕茵,郑航,王全师,等. F-FDG PET/CT 对喉癌的诊断价值[J]. 南方医科大学学报,2012,32(10):1486-1490.
- [2] 苏剑东,吴灵飞. NF- κ B 与细胞凋亡[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(12):1411-1416.
- [3] 史艳晖,卢圣栋. 转录因子 NF- κ B 的研究现状及其应用前景[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(4):110-114.
- [4] 毛拓华,李竞,刘梦江,等. 抑制 NF- κ B 对糖尿病大鼠肾脏组织 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(8):688-691.
- [5] Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications[J]. Blood, 2007, 109(7):2700-2707.
- [6] Didonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1):379-400.
- [7] Hideshima T, Neri P, Tassone P, et al. MLN120B, a novel I κ B kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19):5887-5894.
- [8] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807(6):735-745.
- [9] 杨季云,张思仲,郭红. 肿瘤坏死因子 α 通过激活 NF- κ B 信号通路加快肝细胞周期进程[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6):604-610.
- [10] Liu GH, Wang SR, Wang B, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB by an antioxidant enhances paclitaxel sensitivity in ovarian carcinoma cell line [J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(5):1777-1782.
- [11] Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipooapoptosis[J]. J Hepatol, 2010, 52(4):586-593.
- [12] 陈始明,王燕,肖伯奎,等. 同时抑制 VEGF、hTERT 和 Bcl-xL 表达对喉癌细胞生长增殖的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(12):991-995.
- [13] Wang Y, Tao ZZ, Chen SM, et al. Application of combination of short hairpin RNA segments for silencing VEGF, TERT and Bcl-xL expression in laryngeal squamous carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(6):896-901.
- [14] Meng Z, Lou S, Tan J, et al. Nuclear factor-kappa B inhibition can enhance apoptosis of differentiated thyroid cancer cells induced by 131I [J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33597.
- [15] Li X, Ma X, Lu X, et al. Expression of inhibitor of apoptosis protein XIAP in laryngeal carcinoma and its clinicopathological significance [J]. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2007, 21(21):973-975.