

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.010

IKK16 对人胶质母细胞瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响

黄明火

(湖北省黄冈市中心医院神经外科,湖北黄冈 438000)

[摘要] 目的 探讨 I κ B 激酶(IKK) 抑制剂 IKK16 对人胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响,并探讨其可能作用机制。方法 将体外培养的人胶质母细胞瘤 U87 细胞分为 4 组:空白组(未予干预处理),对照组(1%二甲亚砜),IKK16 低剂量组(70 nmol/L IKK16)和 IKK16 高剂量组(200 nmol/L IKK16),使用二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)法检测 IKK16 对人胶质母细胞瘤 U87 增殖的抑制作用,Western blot 法检测加药后 48 h 细胞内 p65、Caspase-3、Bcl-2 和 CyclinD1 的表达。结果 空白组与对照组 U87 细胞增殖率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组比较,IKK16 可以显著抑制人胶质母细胞瘤 U87 细胞的增殖,同时显著降低细胞核内 p65 的表达($P<0.05$),抑制 CyclinD1 和 Bcl-2 的表达,增加 Caspase-3 的表达量($P<0.05$),并呈剂量依赖性。结论 IKK16 可以抑制人胶质母细胞瘤 U87 细胞增殖并促进凋亡。

[关键词] 神经胶质瘤;I κ B 激酶;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R651

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)12-1617-03

Effect of IKK16 on proliferation and apoptosis of human glioblastoma cell line U87

Huang Minghuo

(Department of Neurosurgery, Huanggang Municipal Central Hospital, Huanggang, Hubei 438000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of I κ B kinases(IKK) inhibitor IKK16 on the proliferation and apoptosis of human glioblastoma cell line U87 and its possible mechanism. **Methods** Human glioblastoma cell line U87 was cultured in vitro and divided into 4 groups: blank group (without intervention treatment), control group (1% dimethyl sulfoxide), low dose IKK group (70 nmol/L IKK16) and high dose IKK group (200 nmol/L IKK16). The MTT assay was used to detect the effect of IKK16 on the proliferation of U87 cells at the low concentration and the high concentration. Western blot was used to investigate the effect of IKK16 on the expression of p65, cyclinD1, caspase-3 and bcl-2. **Results** The U87 proliferation rate had no statistical difference between the blank group and the control group ($P>0.05$). Compared with the control group, IKK16 could significantly suppress the proliferation of U87 cells ($P<0.05$). At the same time, IKK16 significantly reduced the expression of p65, CyclinD1 and Bcl-2, and increased the expression of caspase-3 ($P<0.05$) with a dose-dependent manner. **Conclusion** IKK16 could suppress the proliferation of human glioblastoma cell line U87 and promote the apoptosis.

[Key words] glioma; i-kappa B kinase; cell proliferation; apoptosis

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤^[1],在中国胶质瘤的发病率较高^[2],目前临床上对于胶质瘤的治疗主要手段是采取以手术为主辅以化疗的综合性治疗^[3-5],由于现有化疗药物对人脑胶质瘤细胞缺乏特异性的杀伤性,因此研究新型的、特异性更高的化疗药物对于脑胶质瘤的治疗具有重要意义,以往研究证实核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)在胶质瘤的发生、侵袭和化疗产生的耐药性中发挥重要的作用^[6],NF- κ B 活性主要靠蛋白激酶(I κ B kinase, IKK)的调节,IKK16 是一种新型的 IKK 特异性抑制剂^[7],本文通过探讨 IKK16 对人胶质母细胞瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响,以期临床为胶质瘤的治疗寻找新的治疗药物。

1 材料与方

1.1 材料 细胞:人胶质母细胞瘤 U87 细胞由中科院上海细胞所提供。试剂:DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司,细胞总蛋白(P0013)、核蛋白与浆蛋白提取试剂(P0028)和 ECL 发光液(P0018)购自碧云天生物技术公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗鼠 IgG 二抗(sc-2020)、Bcl-2、组蛋白 H3、CyclinD1、Caspase-3(sc-7148)、p65(sc-109)和 H3(sc-8654), β -肌动蛋白(β -actin, sc-7210)的一抗均购自美国 Santa Cruz 公司,二苯基溴化四氮唑蓝(MTT,

M2128)购自美国 Sigma 公司,IKK16(2639)购自 Tocris bio-science 公司。

1.2 方法

1.2.1 人胶质母细胞瘤 U87 细胞的培养 人胶质母细胞瘤 U87 细胞复苏后接种于培养瓶中,培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养,2~3 d 传代 1 次,取处于对数生长期的细胞进行药物干预实验。

1.2.2 药物处理及分组 按每孔 100 μ L 1×10^4 的密度接种至 96 孔板中,每组 19 个副孔,另加 100 μ L 的培养液,实验分为 4 组:空白组,对照组[1%二甲亚砜(DMSO)],IKK16 低剂量组(70 nmol/L IKK16)组,IKK16 高剂量组(200 nmol/L IKK16),IKK16 处理组的 DMSO 终浓度均控制在 1%。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖 将加药后的培养板置入细胞培养箱中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养分别培养至 24、48、72 h,终止培养前 4 h 各孔加入 20 μ L MTT 溶液,终止培养时吸尽各孔内上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(A),结果取 6 个副孔的均值,并计算细胞增殖抑制率=(对照组 A 值-干预组 A 值)/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Western blot 检测 p65、CyclinD1、Bcl-2 和 Caspase-3 的

表达 收集 IKK16 处理 48 h 后的胶质瘤细胞与对照组细胞 PBS 洗 2 遍后,3 000 r/min 离心 15 min,使用核蛋白提取试剂提取核蛋白,用于 p65 的检测;使用细胞总蛋白提取试剂提取总蛋白用于 CyclinD1、Caspase-3 和 Bcl-2 的表达检测,二喹啉甲酸(BCA)检测法蛋白定量,取蛋白样品 35 μ g,电泳后转膜,5%的脱脂奶粉封闭 1 h,H3、p65、CyclinD1、 β -actin、Caspase-3 和 Bcl-2 抗体用 5%牛奶稀释(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜,5%的牛奶稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗,洗膜,按照 ECL 说明书,1:1 配置发光工作液,凝胶成像仪成像,Image J 软件进行灰度分析。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IKK16 抑制细胞的增殖 空白组与对照组 U87 细胞增殖率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),因此在下面的机制研究中,仅在对照组、IKK16 低剂量组和 IKK16 高剂量组 3 组之间进行比较。与对照组比较,IKK16 低、高剂量组在 48 h 可以显著降低 U87 细胞的增殖($P < 0.05$);在 72 h,IKK16 低、高剂量组抑制 U87 细胞的增殖作用更明显,且呈剂量依赖性,浓度越高抑制作用越明显($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组不同时间点对 Eca109 细胞的增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=10, \%$)

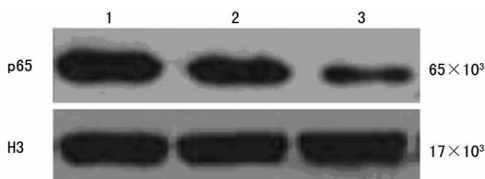
时间	对照组	IKK16 低剂量组	IKK16 高剂量组
24 h	0.01 \pm 0.03	19.5 \pm 2.38 ^a	48.2 \pm 3.58 ^{ab}
48 h	0.09 \pm 0.04	34.9 \pm 2.69 ^a	63.3 \pm 4.19 ^{ab}
72 h	0.13 \pm 0.09	46.7 \pm 3.04 ^a	91.5 \pm 6.55 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 IKK16 低剂量组比较。

2.2 IKK16 对细胞核内 p65 表达的影响 IKK16 干预后 48 h,与对照组和 IKK16 低剂量组比较,IKK16 高剂量组明显抑制细胞核 p65 的表达($P < 0.05$),见图 1、表 2。

2.3 IKK16 对凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响

IKK16 干预后 48 h,与对照组和 IKK16 低剂量组比较,IKK16 高剂量组可以显著抑制 CyclinD1 的表达($P < 0.05$),明显增加 Caspase-3 的表达($P < 0.05$)。与对照组比较,IKK16 高、低剂量组均可抑制 Bcl-2 的表达($P < 0.05$);但 IKK16 高、低剂量组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 2。



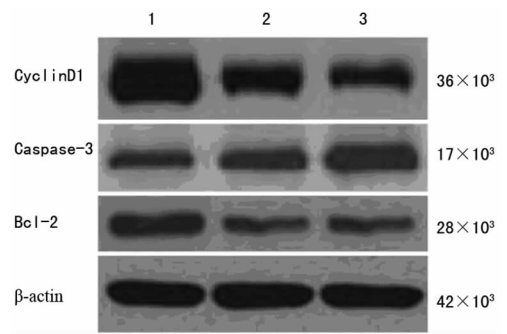
1:对照组;2:IKK16 低剂量组;3:IKK16 高剂量组。

图 1 Western blot 法检测 IKK16 对 p65 的影响

表 2 各组 p65、CyclinD1、Caspase-3 等灰度分析比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{蛋白/内参}$)

项目	对照组	IKK16 低剂量组	IKK16 高剂量组
p65	0.92 \pm 0.15	0.73 \pm 0.11 ^a	0.09 \pm 0.02 ^{ab}
CyclinD1	2.32 \pm 0.58	1.03 \pm 0.15 ^a	0.34 \pm 0.13 ^{ab}
Caspase-3	0.12 \pm 0.09	0.49 \pm 0.07 ^a	0.98 \pm 0.25 ^{ab}
Bcl-2	0.59 \pm 0.09	0.21 \pm 0.71 ^a	0.19 \pm 0.83 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 IKK16 低剂量组比较。



1:对照组;2:IKK16 低剂量组;3:IKK16 高剂量组。

图 2 IKK16 对 CyclinD1、Caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响

3 讨论

近年来,尽管治疗胶质瘤的新手段、新技术不断出现,但是胶质瘤患者的预后仍然较差,究其原因主要在于胶质瘤具有高度的侵袭性,术中难以完全切除肿瘤组织,术后残存浸润的肿瘤细胞极易产生复发,有研究表明,采用单纯手术治疗的患者平均生存时间约为 18 周,手术联合放疗中位生存时间约为 37 周,采用手术联合化疗三联方案治疗的患者平均生存时间可以达到术后 52 周左右^[8],因此术后联合化疗、生物免疫等综合性治疗已经成为临床上胶质瘤治疗的专家共识^[9]。然而,由于目前放疗对胶质瘤细胞缺少特异性,在杀灭肿瘤细胞的同时往往会造成正常脑组织的损害,引发脑水肿和颅内高压,给患者带来额外的痛苦,严重影响患者的生活质量。因此,研发新型有效、不良反应少的化疗药已经成为胶质瘤治疗的重点和热点,大量研究表明 NF- κ B 信号通路很有潜力成为一种新型化疗药物的作用靶点。NF- κ B 最初是作为 B 淋巴细胞中 κ B 轻链基因表达的调控因子而被发现的,随着研究的不断深入,大量研究证实 NF- κ B 在多种肿瘤组织中表达增加,在中枢神经系统胶质瘤中,与正常脑组织相比,NF- κ B 在所有的星形细胞瘤和高级别星形细胞瘤系组织中表达量均异常增加^[10],选择性降低 NF- κ B 的活性可以显著抑制胶质瘤细胞的生长和侵袭,此外下调 NF- κ B 的活性可以增强胶质瘤细胞对于化疗和放疗的敏感性,提高治疗的有效性^[11],一项临床前期的动物体内实验发现,柳氮磺吡啶可以通过抑制 NF- κ B 的活性显著降低裸鼠体内 U87 细胞的生长和增殖,因此,靶向性抑制 NF- κ B 的活性对于胶质瘤细胞的治疗具有重要的临床应用前景。

NF- κ B 主要包括 2 个亚单位:Rel (cRel) 和 p65 (RelA),二者组成的异源二聚体在绝大多数细胞中以非活性形式存在于细胞质中^[12];当细胞受细胞外信号刺激后,IKK 接受上游调节蛋白的磷酸化,并被激活,激活后的 IKK 使 I κ B 磷酸化,并发生泛素化降解,失去 I κ B 阻碍作用的 p65 迅速移位到细胞核,与特异性 NF- κ B 位点结合,诱导相关基因转录。IKK 是 NF- κ B 激活的关键性酶,主要由一个大的蛋白激酶复合体组成,其中包括具有催化活性的 IKK α 、IKK β 和一个有调节功能的 IKK γ 3 个亚单位。IKK α 通过使 I κ B α 上 Ser32 和 Ser36 磷酸化,而 IKK β 不仅可以使 I κ B α 上 Ser32 和 Ser36 磷酸化,还能使 I κ B β 上的 Ser19、Ser23 磷酸化。有研究证实 NF- κ B 在肿瘤中的作用主要是抑制凋亡蛋白的表达,以及促进抗凋亡蛋白的表达,此外,NF- κ B 还可以促进转移相关因子 MMP9 的转录,增强肿瘤细胞的侵袭性^[13]。在胶质瘤细胞中,CyclinD1 蛋白是受 NF- κ B 调节的一种重要的细胞周期蛋白,它与细胞周期蛋白依赖性激酶结合,促使胶质瘤细胞从 G₁ 期顺利进入 S 期^[14],使细胞发生分裂与增殖,NF- κ B 的激活还可以通过抑制

Caspase-3 的产生以及增加 Bcl-2 的表达,从而抑制胶质瘤细胞凋亡的发生^[15]。本研究发现,IKK 的选择性抑制剂 IKK16 可以明显抑制人胶质瘤细胞 U87 的增殖,其机制可能是通过抑制 p65 向细胞核内的转运从而抑制 NF- κ B 介导的下游因子 CyclinD1 的转录和表达相关,Caspase-3 作为凋亡下游的关键执行者,IKK16 可以明显增加 Caspase-3 促凋亡蛋白的表达,减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,这可能是 IKK16 促进胶质瘤细胞凋亡和抑制增殖的主要机制,此外,IKK16 在动物实验中发现可以通过口服吸收,一旦进入临床可以大大简化给药方式,为了进一步验证其临床有效性,下一步需要进行动物体内实验,从而为临床实验打下坚实的理论基础。

综上所述,IKK 的抑制剂 IKK16 可以抑制胶质瘤细胞的增殖并促进胶质瘤细胞的凋亡,IKK16 未来可能成为治疗胶质瘤的一种新型药物,具有潜在的临床应用前景。

参考文献

- [1] Solomon IH, Ramkissoon SH, Milner DA Jr, et al. Cytomegalovirus and glioblastoma: a review of evidence for their association and indications for testing and treatment [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(11):994-998.
- [2] 李亮,边寰,张伟,等. 中枢神经系统神经上皮细胞肿瘤的流行病学研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2013, 12(5):435-438.
- [3] 朱海波. 低级别胶质瘤的手术治疗进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(13):1338-1340.
- [4] 毛德强,潘玲,戴勤弼,等. 术后放疗联合替莫唑胺治疗高级别胶质瘤的近期临床疗效及安全性观察[J]. *重庆医学*, 2013, 42(1):21-23.
- [5] Olson JJ, Nayak L, Ormond DR, et al. The role of targeted therapies in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline[J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(3):557-599.
- [6] Nogueira L, Ruiz-Ontanon P, Vazquez-Barquero A, et al. The NF κ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(8):646-653.

- [7] Waelchli R, Bollbuck B, Bruns C, et al. Design and preparation of 2-benzamido-pyrimidines as inhibitors of IKK [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(1):108-112.
- [8] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review[J]. *JAMA*, 2013, 310(17):1842-1850.
- [9] Munson J, Bonner M, Fried L, et al. Identifying new small molecule anti-invasive compounds for glioma treatment [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(14):2200-2209.
- [10] Atkinson GP, Nozell SE, Benveniste ET. NF-kappaB and STAT3 signaling in glioma: targets for future therapies [J]. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10(4):575-586.
- [11] Robe PA, Bentires-Alj M, Bonif M, et al. In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(16):5595-5603.
- [12] Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, et al. Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10):1939-1948.
- [13] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(12):86.
- [14] Wang J, Wang Q, Cui Y, et al. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells [J]. *J Neurooncol*, 2012, 106(3):473-484.
- [15] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity [J]. *Brain Res*, 2010(1352):255-264.

(收稿日期:2014-09-28 修回日期:2015-01-26)

(上接第 1616 页)

- ADR 及 MCF-7/ADR 的多药耐药研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(1):21-23.
- [4] 陈好,娄世锋. 急性髓系白血病干细胞研究进展[J]. *重庆医学*, 2008, 37(4):429-432.
- [5] She M, Niu X, Chen X, et al. Resistance of leukemic stem-like cells in AML cell line KG1a to natural killer cell-mediated cytotoxicity [J]. *Cancer Lett*, 2012, 318(2):173-179.
- [6] 郭坤元,姚开泰. 以肿瘤干细胞为靶的免疫治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4):343-347.
- [7] Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology [J]. *Haematologica*, 2012, 97(7):966-974.
- [8] Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, et al. Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin

and FOLFOX [J]. *Transl Oncol*, 2009, 2(4):321-328.

- [9] Yogosawa S, Yamada Y, Yasuda S, et al. Dehydrozingerone, a structural analogue of curcumin, induces cell-cycle arrest at the G2/M phase and accumulates intracellular ROS in HT-29 human colon cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(12):2088-2093.
- [10] 宛传丹,温占朝,顾勇劲. 姜黄素单体影响肝癌 BEL-7402 细胞凋亡及其周期蛋白 D 表达的研究[J]. *重庆医学*, 2011, 40(23):2300-2302.
- [11] Royt M, Mukherjee S, Sarkar R, et al. Curcumin sensitizes chemotherapeutic drugs via modulation of PKC, telomerase, NF-kappaB and HDAC in breast cancer [J]. *Ther Deliv*, 2011, 2(10):1275-1293.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-02-18)