

ICI118,551 诱导胰腺癌细胞凋亡及其机制的实验研究

徐军¹⁾, 彭波²⁾, 穆维靖¹⁾, 王铮¹⁾, 张东¹⁾, 马清涌¹⁾

(1) 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科; 2) 急诊科, 陕西 西安 710061)

[摘要] **目的** 研究 ICI118, 551 通过调控细胞信号通路抑制抗凋亡分子的表达所产生的促凋亡效应及其机制. **方法** 应用 $\beta 2$ 受体阻滞剂 ICI118, 551 和 $\beta 1$ 受体阻滞剂美托洛尔干预胰腺癌细胞, 通过电镜检测细胞凋亡、Hoechst 33324 荧光染色检测细胞凋亡、流式细胞仪检测细胞凋亡、Western blot 等技术检测 $\beta 2$ 受体阻滞剂对 ERK 和 Akt 磷酸化改变, 调节细胞凋亡和细胞周期下游相关分子 caspase-3、caspase-9、Bcl-2 及 Bax 的表达. **结果** ICI118, 551 可显著诱导胰腺癌细胞凋亡, 细胞凋亡率显著大于美托洛尔组 ($P < 0.05$); ICI118, 551 干预组抑制 Akt 和 ERK 的磷酸化, 并激活 Bax、caspase-3 和 caspase-9 活性片段的表达, 同时抑制 Bcl-2 的表达. **结论** $\beta 2$ 受体阻滞剂可以阻断相关细胞通路而进一步抑制下游相关促侵袭和抗凋亡分子的表达, 并产生促凋亡效应.

[关键词] $\beta 2$ 受体阻滞剂 ICI118, 551; 凋亡; G₁/S 期阻滞

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 08 - 0021 - 06

The Apoptosis of Human Pancreatic Cancer induced by ICI118, 551 and Its Mechanism of Action

XU Jun¹⁾, PENG Bo²⁾, MU Wei-jing¹⁾, WANG Zheng¹⁾, ZHANG Dong¹⁾, MA Qing-yong¹⁾

(1) Dept. of Hepatobiliary Surgery; 2) Dept. of Emergency, The 1st Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shangxi 710061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ICI118, 551 on pancreatic cancer cell apoptosis and its action mechanism. **Methods** The apoptotic index was determined by the flow cytometry assay. The cell morphology of apoptosis was observed by electron microscope and Hoechst 33324 fluorescein stain. The expression of ERK, Akt, caspase-3, caspase-9, Bcl-2 and Bax was analysed by Western blot. **Results** ICI118, 551 significantly induced apoptosis compared with $\beta 1$ -adrenergic antagonist metoprolol in MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines. ICI118, 551 affected the expression of ERK, Akt, caspase-3, caspase-9, Bcl-2 and Bax. **Conclusion** $\beta 2$ adrenoceptor antagonist can block related cell signal pathways, then inhibit the expression of pro-invasive and anti-apoptotic factors in the downstream, and finally induce the apoptosis of pancreatic cancer cell.

[Key words] ICI118, 551; Apoptosis; G₁/S phase arrest

胰腺癌是吸烟相关性肿瘤, 其恶性程度高, 早期诊断困难, 是易于局部浸润、早期转移的消化道实体瘤^[1-3]. NNK 作为烟草中的化学致癌物, 是由尼古丁经体内代谢的衍生物, 可高效地结合并刺激 $\beta 2$ 受体及其相关分子信号通路, 刺激胰腺癌的发生和发展^[4]. 而且, NNK 还可刺激早期胰腺癌细胞

发生 k-ras 基因的突变, 促进胰腺癌的发展^[5]. 课题组前期研究已经证实胰腺癌 MIA PaCa-2 与 BxPC-3 细胞中 2 种 β 受体亚型均有表达, 其中 $\beta 2$ 受体的表达在 mRNA 及蛋白水平高于 $\beta 1$ 受体约 2 倍^[6]. 本研究应用多种实验技术在体外阐明 $\beta 2$ 受体特异性阻滞剂 ICI118, 551 和 $\beta 1$ 受体特

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81172195)

[作者简介] 徐军 (1964~), 男, 河南济源市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事胰腺疾病的相关研究工作.

[通讯作者] 彭波. E-mail: pengboxjtu@163.com

异性阻滞剂美托洛尔通过阻断 Ras 介导的细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 磷酸化, 而进一步调节细胞凋亡下游相关分子的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 与 BxPC-3 购自美国 ATCC 细胞中心, 于西安交通大学医学院中心实验室保存; 高糖 DMEM 培养基及小牛血清购自 Gibco 公司; SYBR Green Master Mix 购自 Takara 公司; Hoechst 33342 试剂、 β 2 受体阻滞剂 ICI118, 551 和 β 1 受体阻滞剂美托洛尔购自 Sigma 公司; PI 试剂、Annexin V-FITC/PI 试剂购自 BD 公司; Anti-caspase-3、Anti-caspase-9、Anti-Bcl-2、Anti-Bax 及 Anti- β -actin 购自 ABCAM 公司; Anti-ERK、Anti-pERK、Anti-Akt、Anti-pAkt 购自 Cell Signal 公司。

1.2 细胞培养

MIA PaCa-2 与 BxPC-3 应用含 100 mL/L 小牛血清及双抗 (青霉素、链霉素) 的高糖 DMEM 培养液在 37 °C、50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中培养。利用 100 μ mol/L 的 ICI118, 551 和美托洛尔培养液分别干预 MIA PaCa-2 与 BxPC-3 细胞 24 h^[7], 分为对照组、美托洛尔干预组和 ICI118, 551 干预组。

1.3 透射电镜检测细胞凋亡

细胞干预后离心形成沉淀块, 浸入 25 mL/L 戊二醛溶液, 用 1 mmol/L PBS Buffer pH 7.2 冲洗 3 次后加入 10 mL/L 锇酸处理 1 h 到样品变黑, 再次冲洗 3 次后脱水, 并将包埋剂逐步渗入组织细胞内, 在超薄切片机上利用玻璃刀切片 0.5 mm \times 0.3 mm 后置于铜网上。应用透射电镜观察细胞形态变化, 并拍照。

1.4 Hoechst 33342 荧光检测细胞凋亡

将多聚甲醛处理过的盖玻片置于 24 孔板中, 接种 5×10^4 个对数生长期的细胞, ICI118, 551 干预细胞 24 h 后用 10 μ g/mL Hoechst 33342 染料孵育细胞并 4 °C 过夜, 在荧光显微镜下观察 6 个视野, 统计凋亡细胞和总细胞数后计算凋亡率, 照相。

1.5 流式细胞仪 Annexin V-FITC 和 PI 双标法检测细胞凋亡

ICI118, 551 和美托洛尔干预细胞 24 h 后, 收获细胞, 加入 100 μ L 染色缓冲液, 并将细胞吹打

开加入 Annexin V-FITC 5 μ L, 避光孵育 15 min, 每管加 PI 10 μ L, 避光孵育 15 min 后, 上机检测。

1.6 Western blot 检测 ERK、Akt 以及凋亡相关分子

RIPA 裂解液提取 ICI118, 551 和美托洛尔各 100 μ mol/L 干预 24 h 后细胞总蛋白, BCA 蛋白质定量试剂盒测定总蛋白浓度。SDS 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转至 NC 膜, Anti-ERK、Anti-pERK、Anti-Akt、Anti-pAkt、Anti-caspase-3、Anti-caspase-9、Anti-Bcl-2、Anti-Bax 及 Anti- β -actin 检测各自目的蛋白, ECL 发光剂暗室内曝光, 常规方法显影定影, 利用全自动凝胶成像系统对结果进行分析并拍照。

1.7 统计学处理

使用 SPSS 统计软件进行数据分析。Hoechst 33342 荧光检测细胞凋亡数据以均数 \pm 标准差表示, 应用 *t* 检验进行统计检验, 数据符合正态性及方差齐性; 流式细胞仪检测细胞凋亡及 Western blot 检测蛋白表达时, 对照组、美托洛尔组和 ICI118, 551 组间的比较应用单因素方差分析进行统计检验, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 法, 数据符合正态性及方差齐性; 所有假设检验的检验水准 α 设定为 0.05, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞凋亡的形态学

对照组 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞在电镜下呈现出正常的肿瘤细胞超微结构, 即具有保持良好的绒毛状的细胞膜, 具有细微颗粒状并均匀一致分散染色质, 具有任意分布的细胞器和致密电子颗粒的细胞质。当 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞经 ICI118, 551 干预 24 h 后, 出现细胞核的进行的边集, 邻近核膜的皱缩及浓集, 出现核断裂、核碎裂和核碎片, 出现细胞质的皱缩 (见图 1)。Hoechst 33342 荧光可观察到对照组的 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞呈现出正常肿瘤细胞核, 未见强的荧光染色; 利用 ICI118, 551 干预细胞 24 h, 与对照组细胞凋亡数 (MIA PaCa-2 $2.5 \pm 0.8\%$; BxPC-3 $2.7 \pm 1.1\%$) 比较, ICI118, 551 干预组 (MIA PaCa-2 $13.2 \pm 1.8\%$; BxPC-3 $17.5 \pm 2.3\%$) 细胞凋亡数明显增加, 与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

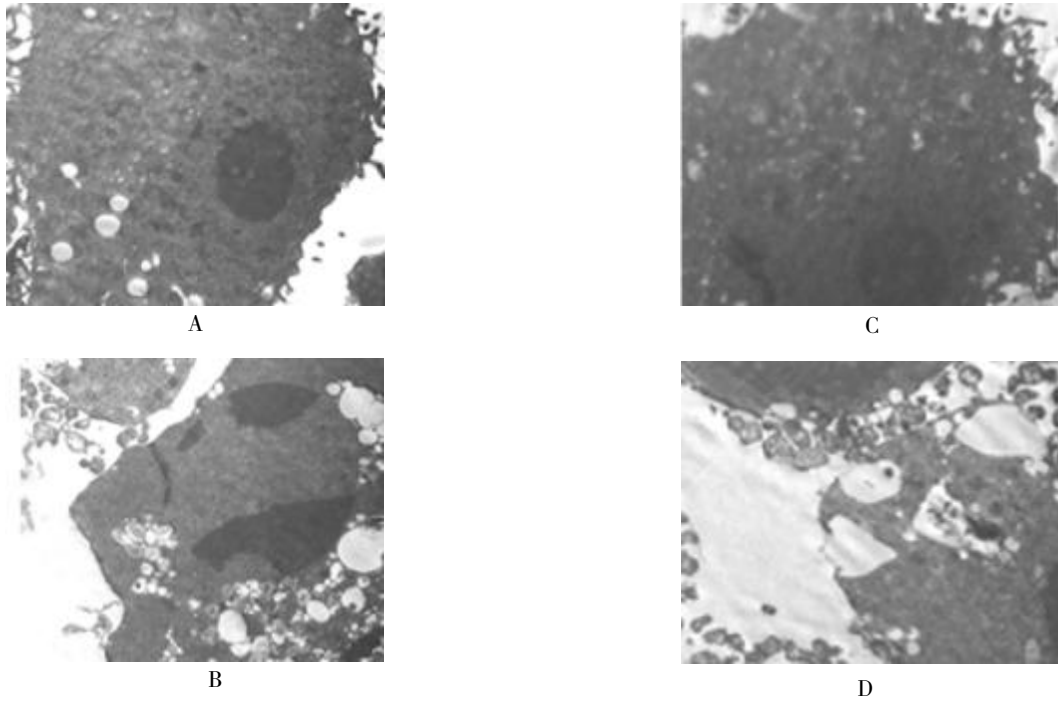


图 1 透射电镜检测胰腺癌细胞凋亡 (5000 ×)

Fig. 1 The cell morphology of apoptosis was observed by electron microscope (5000 ×)

A:MIA PaCa-2 细胞对照组; B:MIA PaCa-2 细胞 ICI118,551 干预组; C:BxPC-3 细胞对照组; D:BxPC-3 ICI118,551 干预组.

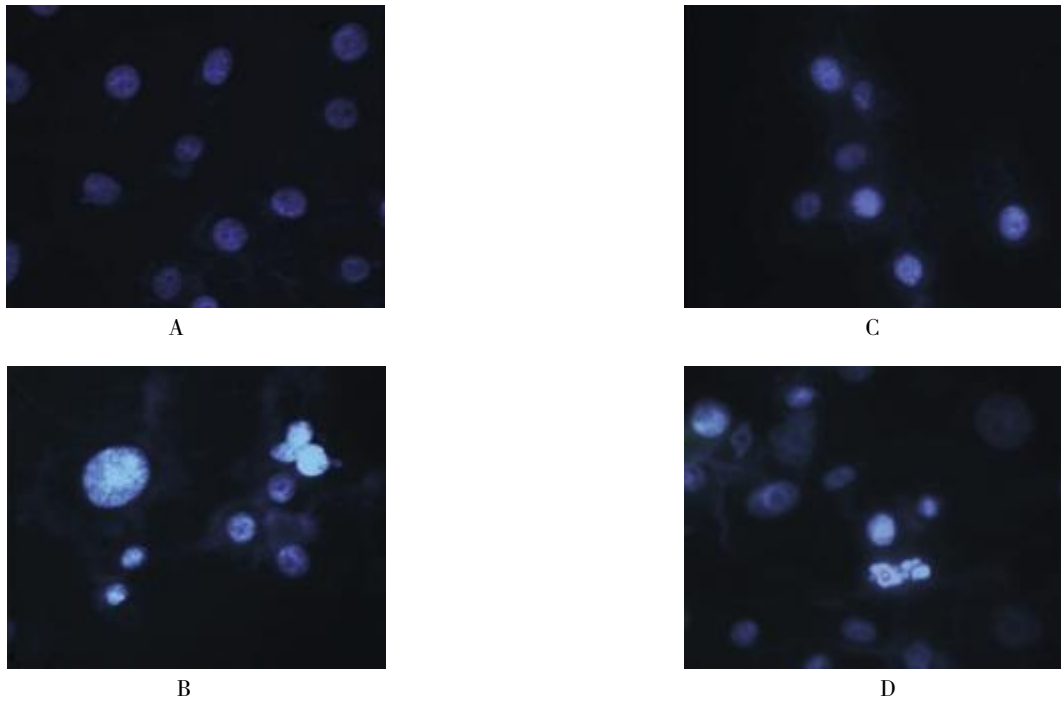


图 2 Hoechst 33324 荧光检测胰腺癌细胞凋亡 (400 ×)

Fig. 2 The cell morphology of apoptosis was observed by Hoechst 33324 fluorescein stain

A:MIA PaCa-2 细胞对照组; B:MIA PaCa-2 细胞 ICI118,551 干预组; C:BxPC-3 细胞对照组; D:BxPC-3 ICI118,551 干预组.

2.2 细胞凋亡比例检测

使用流式细胞仪 Annexin V-FITC 和 PI 双标法检测胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 与 BxPC-3 细胞凋亡。如图 3A 所示, 其中左下象限代表正常细胞, 右下象限代表早期凋亡细胞, 左上象限代表死亡细胞, 而右上象限代表晚期凋亡细胞。本研究显示 β 受体阻滞剂干预 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 两株细胞, 美托洛尔和 ICI118, 551 组与对照组比较, 不同程度上增加了胰腺癌细胞早期凋亡的比值 ($P < 0.05$), 晚期凋亡细胞和死亡细胞所占比例较小, 说明 β 受体阻滞剂干预胰腺癌细胞后主要是发生早期凋亡, 并且干预剂量的毒性效应较小。ICI118, 551 诱导早期凋亡的比值显著高于美托洛尔 ($P < 0.05$, 图 3B)。在两株细胞之间, ICI118, 551 对胰腺癌细胞株 BxPC-3 的早期凋亡诱导效应要显著高于 MIA PaCa-2 ($P < 0.05$)。

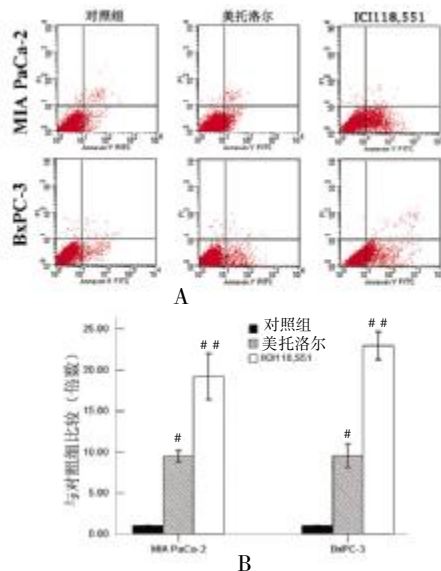


图 3 流式细胞仪 Annexin V-FITC 和 PI 双标法检测细胞凋亡

Fig. 3 The apoptosis of cancer cell was detected by the flow cytometry

A: 细胞凋亡检测图; B: 细胞凋亡率统计图; 与对照组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ 。

2.3 ERK 和 Akt 的磷酸化蛋白表达

与对照组相比, 在两株细胞中 β 受体阻滞剂有效地减低了 ERK 和 Akt 的磷酸化蛋白表达, 其中 ICI118, 551 的抑制效率要高于美托洛尔 ($P < 0.05$, 图 4)。在检测 ERK 的结果中提示, $\beta 2$ 受体阻滞剂对胰腺癌细胞株 BxPC-3 的 ERK 的磷酸化抑制效应要高于 MIA PaCa-2 ($P < 0.05$)。

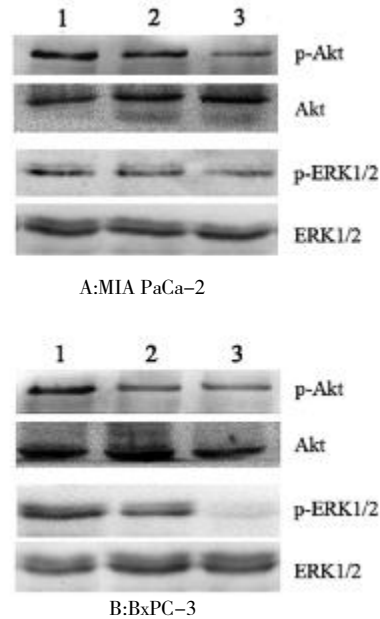


图 4 Western Blot 检测 ERK 和 Akt 的磷酸化蛋白表达
Fig. 4 The expression of ERK, Akt, p-ERK and p-Akt was analysed by Western blot

1: 对照组; 2: 美托洛尔干预组; 3: ICI118, 551 干预组。

2.4 细胞凋亡相关指标检测

与对照组相比, 在两株细胞中 β 受体阻滞剂有效地增加了 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9 及 Bax 蛋白的表达, 其中 ICI118, 551 的抑制效率要高于美托洛尔 ($P < 0.05$)。在检测 Bcl-2 的结果中提示, ICI118, 551 抑制了胰腺癌细胞株 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$)。 $\beta 2$ 受体阻滞剂对胰腺癌细胞株 BxPC-3 的 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9 的促表达效应要高于 MIA PaCa-2 ($P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

实验数据显示 ICI118, 551 有效地诱导了胰腺癌 MIA PaCa-2 与 BxPC-3 细胞凋亡, 从细胞水平和分子水平都得到了有意义的验证。这一效应可能是通过抑制 Ras/ERK/MAPKs 通路和 PI3K/Akt 通路实现的。

$\beta 1$ 受体阻断剂美托洛尔诱导凋亡的效率要弱于 $\beta 2$ 受体阻断剂 ICI118, 551。这个结果支持了 $\beta 2$ 受体在调节胰腺癌细胞周期和凋亡中, 发挥主要的调节作用。课题组前期研究发现胰腺癌 Panc-1、BxPC-3、PC-2 和 PC-3 细胞中也存在 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 受体的表达, $\beta 2$ 受体在 mRNA 和蛋白水平的表达高于 $\beta 1$ 受体^[9]。另外, 尼古丁衍生物

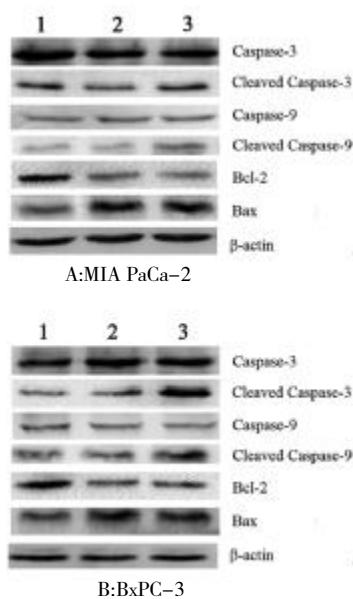


图 5 Western Blot 检测细胞凋亡和细胞周期相关指标
Fig. 5 The expression of caspase-3, caspase-9, Bcl-2 and Bax was analysed by Western blot

1:对照组; 2:美托洛尔干预组; 3:ICI118, 551 干预组.

NNK 是一种高效的 $\beta 2$ 受体激动剂, 并且可以诱导 k-ras 基因突变, 通过作用于 $\beta 2$ 受体可以增进激活 Ras 和 Src 酪氨酸激酶依赖的 MAPKs 通路. 所以阻断 $\beta 2$ 受体不但可以抑制 cAMP/PKA 通路, 同时还可以抑制 Ras 和 Src 酪氨酸激酶依赖的 MAPKs 通路, 刺激 Akt 去磷酸化, 抑制细胞复制, 易发生细胞凋亡^[7-10].

在本实验中, ICI118, 551 诱导胰腺癌细胞凋亡, 促使 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9 的激活片段表达升高; 另外, Bax 的表达明显上调和 Bcl-2 表达的下调说明了 ICI118, 551 诱导胰腺癌细胞凋亡可能是通过激活了内源性凋亡通路实现的. $\beta 2$ 受体激动剂可以刺激 Ras/ERK/MAPKs、Ras/PI3K/Akt 和核转录因子 NF- κ B 通路, 而阻断剂可以抑制此通路并且刺激 ERK 和 Akt 去磷酸化, 抑制核转录因子 NF- κ B 的活性^[11]. Akt 是蛋白激酶 B, 可维持细胞抗凋亡. 通过抑制 ERK 和 Akt 可以诱导 caspase-9 的激活, 促使线粒体释放细胞色素 C, 进一步激活 caspase-3 及 caspase 介导的级联反应通路, 产生细胞凋亡作用. 另外, 抑制 ERK、Akt 和 NF- κ B 还可使 Bad 去磷酸化, 从而减少 Bcl-2 的释放, 无法维持线粒体膜的完整性, 故增加了细胞色素 C 的释放, 促使细胞凋亡^[12,13]. ICI118, 551 干预胰腺癌细胞后, Ras/ERK/MAPKs、Ras/PI3K/Akt 和核转录因子 NF- κ B 信号通路的抑

制, 下调了抗凋亡效应分子并激活 caspase-3 和 caspase-9, 使胰腺癌细胞产生凋亡效应.

Ras 通路在胰腺癌中是普遍存在的, 是胰腺癌发生发展的重要信号通路, 在胰腺癌的发生的早期存在着 k-ras 基因的点突变, 突变后的 Ras 信号通路处于持续性激活状态, 逃逸了其他调节分子的调控, 使胰腺癌细胞的增殖能力增强. NNK 可诱导 k-ras 基因的点突变, 这也是吸烟可以导致胰腺癌发生的重要原因, NNK 可通过 $\beta 2$ 受体调节胰腺癌的发生及发展^[4,5]. 在本实验中, MIA PaCa-2 细胞为 k-ras 基因突变型, 而 BxPC-3 为 k-ras 基因野生型^[4], 通过 2 种细胞株凋亡的比较, 可以得出 ICI118, 551 诱导细胞凋亡效应在 BxPC-3 细胞中较为显著, 这可能与 k-ras 基因的表现型相关. 因此, k-ras 基因和 Ras 是 $\beta 2$ 受体调节胰腺癌细胞凋亡调控中的关键分子^[15].

β 受体阻断剂已经在心血管系统疾病的治疗中广泛应用. 当前的研究已明确吸烟、饮酒、高血脂和心理应激已成为胰腺癌发生的危险因素, 而这些危险因素也和心血管系统疾病密切相关^[6], 或许应用 β 受体阻断剂可能对胰腺癌的预防和治疗起一定作用.

[参考文献]

- [1] HUANG Z Q, BUCHSBAUM D J. Monoclonal antibodies in the treatment of pancreatic cancer [J]. Immunotherapy, 2009, 1 (2): 223 - 239.
- [2] MUDERS M H, BARETTON G B, AUST D E, et al. GIPC: a new target for therapy in pancreatic adenocarcinoma [J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2007, 91: 286 - 293.
- [3] KUNNUMAKKARA A B, DIAGARADJANE P, ANAND P, et al. Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model [J]. Int J Cancer, 2009, 125 (9): 2187 - 2197.
- [4] SCHULLER H M. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2 (6): 455 - 463.
- [5] WEDDLE D L, TITHOFF P, WILLIAMS M, et al. β -adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas [J]. Carcinogenesis, 2001, 22 (3): 473 - 479.
- [6] HU H T, MA Q, ZHANG D, et al. HIF-1 α , an interesting link between β -adrenoceptor agonists and pancreatic cancer [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31 (1): 102 - 110.
- [7] ZHANG D, MA Q, SHEN S, et al. Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation by propranolol occurs through

- apoptosis induction: the study of beta-adrenoceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cell[J]. *Pancreas*, 2009, 38 (1): 94 - 100.
- [8] 马清涌, 张东, 沙焕臣. 肾上腺素能受体与胰腺癌发生发展关系的研究进展[J]. *西安交通大学学报医学版*, 2010, 31(3): 261 - 264.
- [9] SCHULLER H M. Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis [J]. *Prog Exp Tumor Res*, 2007, 39: 45 - 63.
- [10] ASKARI M D, TSAO M S, SCHULLER H M. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131 (10): 639 - 648.
- [11] MADDIKA S, ANDE S R, PANIGRAHI S, et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy [J]. *Drug Resist Update*, 2007, 10 (1): 13 - 29.
- [12] MOON D O, PARK C, HEO M S, et al. PD98059 triggers G1 arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through downregulation of Akt signal pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7 (1): 36 - 45.
- [13] PRUITT K, JDER C. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2001, 171 (1): 1 - 10.
- [14] GARDNER-THORPE J, ITO H, ASHLEY S W, et al. Differential display of expressed genes in pancreatic cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293 (1): 391 - 395.
- [15] AL-WADEI H A, SCHULLER H M. Nicotinic receptor-associated modulation of stimulatory and inhibitory neurotransmitters in NNK-induced adenocarcinoma of the lungs and pancreas[J]. *J Pathol*, 2009, 218 (4): 437 - 445.
- [16] ANTONI M H, LUTGENDORF S K, COLE S W, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6 (3): 240 - 248.

(2012 - 05 - 24 收稿)

(上接第 16 页)

- [6] BYRD N, BECKER S, MAYE P, et al. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis [J]. *Development*, 2002, 129(2): 361 - 372.
- [7] VOKES S A, YATSKIEVYCH T A, HEIMARK R L, et al. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis [J]. *Development*, 2004, 131 (17): 4 371 - 4 380.
- [8] DAVEY M G, JAMES J, PATON I R, et al. Analysis of *taipid3* and wild-type chicken embryos reveals roles for hedgehog signalling in development of the limb bud vasculature[J]. *Developmental Biology*, 2007, 301 (1): 155 - 165.
- [9] KANDA S, MOCHIZUKI Y, SUEMATSU T, et al. Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (10): 8 244 - 8 249.

(2012 - 05 - 14 收稿)