

# 硼替佐米对HCT8细胞增殖、凋亡及黏附能力的影响

陶海云, 李克, 樊青霞

## ■背景资料

硼替佐米是一种特异性选择26S蛋白酶体的蛋白酶体抑制剂, 可抑制蛋白酶体的活性。主要用于多发性骨髓瘤的治疗, 近年已有将其用于其他血液肿瘤或实体瘤的报道, 但用于治疗结肠癌的研究很少。

陶海云, 李克, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

河南省卫生厅创新人才基金资助项目, No. 2003013

作者贡献分布: 陶海云与青霞对此文所做贡献均等; 此课题由陶海云与樊青霞设计; 研究过程由陶海云操作完成; 研究用试剂由樊青霞提供; 数据分析由陶海云与李克完成; 数据分析及论文写作由陶海云, 樊青霞及李克共同完成。

通讯作者: 樊青霞, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院肿瘤科, fqx2243@yahoo.com.cn

电话: 0371-66862243

收稿日期: 2008-11-12 修回日期: 2008-12-13

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-18

## Effects of bortezomib on the proliferation, apoptosis and adhesive ability of HCT8 cells

Hai-Yun Tao, Ke Li, Qing-Xia Fan

Hai-Yun Tao, Ke Li, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Innovation Projects for Health Department of Henan Province, No. 2003013

Correspondence to: Dr. Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fqx2243@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-12 Revised: 2008-12-13

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-18

## Abstract

**AIM:** To study the effect of bortezomib on growth arrest, proliferation and adhesive ability of HCT8 cells *in vitro*.

**METHODS:** The growth arrest by bortezomib at different concentration was determined using MTT. After exposure of HCT8 cells to a lower concentration of bortezomib (25 nmol/L) for 48 h, cell cycle and the apoptosis were assessed by FCM; and the expressions of E-cadherin,  $\beta$ -catenin, cyclinD1 and NF- $\kappa$ B were detected using Western blot.

**RESULTS:** The inhibitory effect of bortezomib on the proliferation of HCT8 cells showed a time- and dose-dependent relationship. Compared with control group, bortezomib induced apoptosis significantly after 48 h treatment at the concentration of 25 nmol/L, and the apop-

totic rate was 12.3% ( $P < 0.05$ ); the expressions of E-cadherin and  $\beta$ -Catenin were increased, whereas the expressions of NF- $\kappa$ B and cyclinD1 were down-regulated.

**CONCLUSION:** Bortezomib inhibits the proliferation of HCT8 cells, induces cell apoptosis, and increases cell-to-cell adhesion. The mechanism may be related to its inhibition on the NF- $\kappa$ B pathway.

**Key Words:** Bortezomib; HCT8; Methyl thiazolyl tetrazolium; Flow cytometer; Apoptosis

Tao HY, Li K, Fan QX. Effects of bortezomib on the proliferation, apoptosis and adhesive ability of HCT8 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(2): 190-193

## 摘要

**目的:** 观察硼替佐米对HCT8细胞增殖、凋亡及黏附能力的影响。

**方法:** 不同浓度梯度(12.5-200 nmol/L)的硼替佐米作用于HCT8细胞后, 用MTT检测细胞增殖抑制作用; 25 nmol/L的硼替佐米作用48 h后, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率; Western blot检测E-cadherin、 $\beta$ -catenin、cyclinD1和NF- $\kappa$ B表达。

**结果:** 硼替佐米对HCT8细胞的增殖抑制作用有时间和浓度的依赖性。25 nmol/L的硼替佐米作用48 h诱导细胞的凋亡, 凋亡率为12.3%, 显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 上调了E-cadherin和 $\beta$ -catenin蛋白的表达, 下降了NF- $\kappa$ B和cyclinD1蛋白的表达。

**结论:** 硼替佐米可以抑制HCT8细胞的增殖, 诱导细胞凋亡。抑制NF- $\kappa$ B通路的激活有可能为其作用机制之一; 并有可能增加细胞之间的黏附, 降低肿瘤的远处转移。

**关键词:** 硼替佐米; HCT8; 四甲基偶氮唑盐比色法; 流式细胞仪; 细胞凋亡

陶海云, 李克, 樊青霞. 硼替佐米对HCT8细胞增殖、凋亡及黏附能力的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(2): 190-193  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/190.asp>

## ■同行评议者

李瑗, 教授, 广西  
肿瘤研究所

## 0 引言

结肠癌严重威胁着人类的生命, 随着化疗方案的改进, 结肠癌的缓解率虽然有所提高, 但晚期结肠癌患者的预后仍然较差. 因此开发出新型的抗肿瘤药物仍然十分必要. 目前有代表性的是蛋白酶体抑制剂. 硼替佐米(万柯, 最初被命名为PS-341)是一种蛋白酶体抑制剂, 主要用于治疗多发性骨髓瘤<sup>[1]</sup>, 有研究用于治疗实体瘤取得了良好的疗效<sup>[2]</sup>, 但硼替佐米对结肠癌作用的研究文献却较少. 为此, 本研究通过选用不同浓度梯度的硼替佐米作用于人结肠癌HCT8细胞株, 观察其对HCT8细胞增殖、细胞周期、凋亡率的影响, 并用Western blot检测与硼替佐米作用机制相关的NF- $\kappa$ B分子、细胞周期蛋白分子cyclinD1, 以及与细胞黏附、迁移相关且经泛素化途径代谢的E-cadherin和 $\beta$ -catenin蛋白表达水平的变化, 初步探讨了硼替佐米对结肠癌的作用及其可能机制, 从而为今后硼替佐米对结肠癌的临床应用奠定一定的理论基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 硼替佐米购自西安杨森制药公司, 用生理盐水配制, 4℃保存不超过8 h.  $\beta$ -actin抗体(兔抗人多克隆抗体)、E-cadherin抗体(兔抗人多克隆抗体)、 $\beta$ -catenin抗体(小鼠抗人多克隆抗体)、cyclinD1抗体(兔抗人多克隆抗体)及辣根过氧化物酶标记的二抗均购自Santa Cruz公司, NF- $\kappa$ B抗体(小鼠抗人多克隆抗体)购自美国Cell Signaling公司. 人结肠腺癌HCT8细胞系由本院肿瘤中心提供.

### 1.2 方法

1.2.1 MTT试验: 实验分为四组: 对照组、12.5 nmol/L组、25 nmol/L组、100 nmol/L组、200 nmol/L组. 方法参见文献[3], 在酶标仪上测定570 nm吸光度值.

1.2.2 流式细胞仪检测: 分别收集空白对照组及25 nmol/L硼替佐米作用48 h后HCT8细胞, 70 mL/L冷乙醇固定, RNase消化, 碘化丙锭(PI)染色, 流式细胞仪检测.

1.2.3 Western blot: 取35  $\mu$ g细胞总蛋白, 用10% SDS-PAGE分离胶分离. 将蛋白转移至硝酸纤维素膜. 用5%脱脂奶粉的TBS-T封闭膜, 然后加入用封闭液稀释的一抗, 4℃震荡过夜, TBST洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温结合1 h. TBST洗膜后, 加发光剂Immobilon Western<sup>TM</sup>(Millipore)作用1 min后, 曝光.

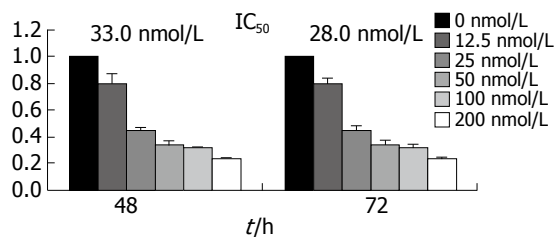


图1 不同浓度梯度的硼替佐米作用于HCT8细胞的MTT结果及IC<sub>50</sub>值.

统计学处理 采用SPSS10.0医学统计软件的 $\chi^2$ 检验和概率分析. 检验水准为 $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$ 为差异显著.

## 2 结果

2.1 硼替佐米对HCT8细胞的增殖抑制作用 随着时间及药物浓度的增加, 硼替佐米对HCT8细胞的增殖抑制作用就越明显( $P < 0.05$ , 图1). 硼替佐米作用48 h和72 h的IC<sub>50</sub>值分别为33 nmol/L和28 nmol/L.

2.2 硼替佐米对细胞周期的影响 48 h后, 对照组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期和G<sub>2</sub>/M期细胞比例分别为38.21%, 23.42%, 38.37%, 细胞无明显的凋亡峰; 而25 nmol/L组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期和G<sub>2</sub>/M期细胞比例分别为24.18%, 62.60%, 和13.22%, 出现了明显的凋亡峰, 凋亡率为12.3%( $P < 0.05$ , 图2).

2.3 硼替佐米对不同蛋白分子水平的影响 25 nmol/L硼替佐米作用于HCT8细胞48 h后, 上调了E-cadherin和 $\beta$ -catenin蛋白表达, 下调了NF- $\kappa$ B和cyclinD1蛋白的表达(图3).

## 3 讨论

硼替佐米是第一个被美国食品及药物管理局(FDA)批准用于临床治疗的蛋白酶体抑制剂, 主要通过干扰泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP), 促进多种与肿瘤细胞增殖、分化、存活和凋亡相关的蛋白代谢发生紊乱, 诱导肿瘤细胞的凋亡.

NF- $\kappa$ B是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子, 在机体的免疫应答、炎症反应、细胞生长分化和凋亡等方面的重要作用已经被广泛接受. 在静息状态下, NF- $\kappa$ B通常与NF- $\kappa$ B抑制因子I $\kappa$ B(inhibitory protein of NF- $\kappa$ B)结合成三聚体, 并覆盖了核定位信号, 使NF- $\kappa$ B锚定于胞质中, 处于失活状态. 近年来研究发现NF- $\kappa$ B的激活与肿瘤的发生、发展和浸润转移有关<sup>[4-6]</sup>. 目前为止, NF- $\kappa$ B激活途径有两种: 有

### ■ 创新盘点

本文首先观察了硼替佐米对HCT8细胞增殖、凋亡的影响, 然后又检测了硼替佐米作用前后HCT8细胞中E-cadherin、 $\beta$ -catenin、NF- $\kappa$ B和cyclinD1蛋白表达的改变, 并对硼替佐米影响HCT8凋亡的可能分子机制进行了初步探讨.

## ■应用要点

本文对硼替佐米作用于人结肠癌HCT8细胞株进行了研究,发现硼替佐米可以抑制HCT8细胞的增殖,诱导细胞的凋亡,为以后的临床研究提供理论基础。

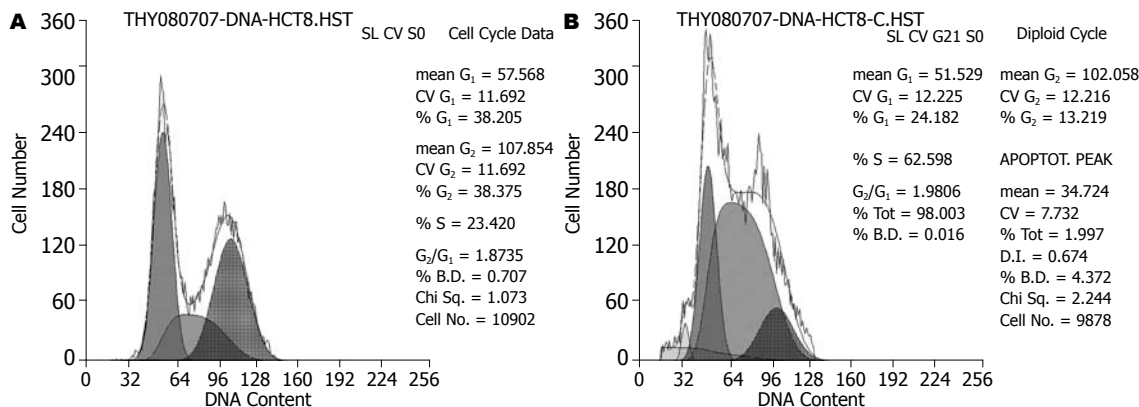


图2 25 nmol/L硼替佐米作用48 h的DNA含量分析(%). A: 空白对照; B: 25 nmol/L硼替佐米。

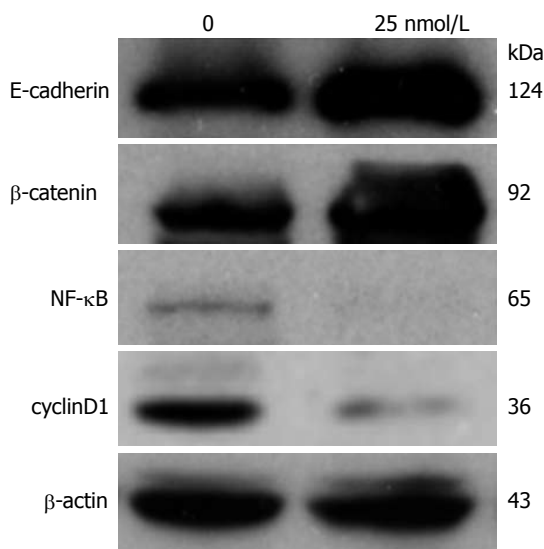


图3 25 nmol/L硼替佐米作用于HCT8细胞48 h后对不同分子表达水平的影响。

经典途径和替代途径。我们了解较多的是经典的NF-κB途径的促肿瘤作用。当细胞外有刺激因素(如肿瘤坏死因子、细胞因子以及病毒感染等)存在时,可激活IκB激酶(IKK)复合物,从而导致IκB磷酸化、泛素化, IκB的泛素化修饰触发26S蛋白酶体快速降解IκB,从而暴露了NF-κB核定位序列, NF-κB进入细胞核中与靶基因结合<sup>[7]</sup>,启动这些基因的转录,抑制细胞的凋亡,刺激肿瘤细胞的增生,促进血管的生成和浸润转移<sup>[4]</sup>。最近的动物学实验也提供了直接的遗传学证据,支持NF-κB在促进肿瘤发展中所扮演的关键角色<sup>[8]</sup>。反之,如果抑制NF-κB的激活可抑制肿瘤的持续增生状态,诱导细胞的凋亡。本研究中,用Western blot检测硼替佐米可以下调NF-κB蛋白的表达,从而提示:在人结肠癌细胞系中,硼替佐米可能通过下调NF-κB的表达,抑制NF-κB通路的激活,进而促进肿瘤细胞的凋亡。

细胞的增生依赖于细胞周期的顺利进行。而真核生物细胞周期进程由周期素(cyclin)和周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, Cdk)共同驱动,当某一时相表达充分后可适时转入下一个时相。目前研究证实了UPP介导的蛋白降解是调控细胞周期基础的普遍机制,周期素及周期素抑制物都是通过泛素化降解的。有研究表明cyclinD1在结肠癌中的表达高于正常的结肠组织。起初,研究细胞株的专家不认为cyclinD1是结直肠癌发病的重要因素,但最近的研究发现他的过表达不仅是肿瘤进展中的重要事件,而且cyclinD1的表达与结肠癌临床分期和淋巴结的转移有关。本研究中硼替佐米改变肿瘤细胞周期的分布,促进肿瘤细胞的凋亡,有可能与硼替佐米下调了cyclinD1蛋白表达有关。

恶性肿瘤的侵袭、转移是肿瘤治疗的难点之一,肿瘤的侵袭转移是一个十分复杂的生物学现象,包括肿瘤细胞黏附于基质-蛋白水解酶降解基质-肿瘤细胞移行等过程;其关键步骤是癌细胞脱离原发灶并附着转移部位,细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)是黏附功能的执行者。CAM又分为钙黏蛋白家族(cadherin)、整合素蛋白家族(integrins)、免疫球蛋白超家族和选择素家族等四大类<sup>[9]</sup>。其中上皮钙黏连素E-cadherin普遍存在于各类上皮细胞中,介导同种细胞间黏附。E-cadherin通常与连接蛋白(β-catenin)形成E-钙黏附蛋白/连接蛋白复合体,由β-catenin与细胞骨架的肌动蛋白分子相连接<sup>[10]</sup>,从而介导上皮细胞间的黏附。当E-cadherin及β-catenin表达减低或缺失会破坏粘着连接,使肿瘤细胞间的黏附性减弱,易于脱离和迁移,侵入周围组织和血管<sup>[11]</sup>。我们知道而E-cadherin和β-catenin均通过泛素化途径降解。近来有研究显示,硼替佐米可以增加细胞间的

黏附性. 本研究中, Western blot检测发现硼替佐米可以上调E-cadherin和 $\beta$ -catenin的表达, 提示硼替佐米可能通过抑制蛋白酶体对E-cadherin和 $\beta$ -catenin的降解, 从而增加细胞之间的黏附性.

总之, 本研究显示, 硼替佐米可以抑制HCT8细胞的增殖, 诱导其凋亡, 其可能的作用机制为下调NF- $\kappa$ B和cyclinD1蛋白的表达; 上调了E-cadherin和 $\beta$ -catenin蛋白的表达, 有可能通过增加细胞之间的黏附, 而降低结肠癌的远处转移.

#### 4 参考文献

- 1 Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1157-1165
- 2 Ryan DP, O'Neil BH, Supko JG, Rocha Lima CM, Dees EC, Appleman LJ, Clark J, Fidas P, Orlowski RZ, Kashala O, Eder JP, Cusack JC Jr. A Phase I study of bortezomib plus irinotecan in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 2006; 107: 2688-2697
- 3 Voortman J, Chęcinska A, Giaccone G, Rodriguez JA, Kruijt FA. Bortezomib, but not cisplatin, induces mitochondria-dependent apoptosis accompanied by up-regulation of noxa in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1046-1053
- 4 Lee SH, Lee CW, Lee JW, Choi MS, Son DJ, Chung YB, Lee CK, Oh KW, Moon DC, Kwon BM, Hong JT. Induction of apoptotic cell death by

2-hydroxycinnamaldehyde is involved with ERK-dependent inactivation of NF-kappaB in TNF-alpha-treated SW620 colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1147-1157

- 5 Lee CW, Lee SH, Lee JW, Ban JO, Lee SY, Yoo HS, Jung JK, Moon DC, Oh KW, Hong JT. 2-hydroxycinnamaldehyde inhibits SW620 colon cancer cell growth through AP-1 inactivation. *J Pharmacol Sci* 2007; 104: 19-28
- 6 Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS, Xu XM, Li JH. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3255-3260
- 7 Lorch JH, Thomas TO, Schmoll HJ. Bortezomib inhibits cell-cell adhesion and cell migration and enhances epidermal growth factor receptor inhibitor-induced cell death in squamous cell cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 727-734
- 8 Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 1999; 18: 6888-6895
- 9 Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68: 4-17
- 10 Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 660-669
- 11 Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008; 27: 6920-6929

#### ■同行评价

本研究探讨硼替佐米对人结肠癌细胞系HCT8的作用机制, 对该药应用于结肠癌的治疗有一定意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

**本刊讯** 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-18)