

双糖链蛋白聚糖对大肠癌细胞增殖抑制作用及其机制研究

The Anti-Proliferative Effect of Biglycan on Colon Cancer Cells and Its Mechanism
XING Xiao-jing, GU Xiao-hu

邢晓静,谷小虎

(辽宁省肿瘤医院,辽宁中医药大学博士后流动站,辽宁 沈阳 110042)

摘要: [目的] 探讨双糖链蛋白聚糖 Biglycan 对大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 增殖抑制作用及其机制。[方法] 采用 Brd U 法和细胞克隆形成实验检测 Biglycan 对大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 的增殖能力影响;Hoechst 染色检测细胞凋亡情况;Western Blot 法检测加药处理前后细胞内细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、CyclinA、p21 和 p27 表达变化。[结果] Biglycan 呈剂量依赖性的抑制大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 生长,100nmol/L Biglycan 和 50 nmol/L Biglycan 浓度作用即可诱导 HT-29、SW480 细胞凋亡。经 Biglycan 处理后,细胞内 CyclinD1 和 CyclinA 表达出现下调趋势,p21 和 p27 表达有所增加。[结论] Biglycan 可能抑制大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 增殖,诱导细胞凋亡、下调 CyclinD1 和 CyclinA 表达和上调 p21 和 p27 表达。

关键词: 大肠癌;双糖链蛋白聚糖;增殖

中图分类号: R735.3⁴ **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)09-0706-04

大肠癌(colorectal cancer)是世界第三大恶性肿瘤,尽管近年来在手术、放疗、化疗等方面已经取得了很大的进展,但大肠癌患者的5年生存率也仅为40%左右^[1],所以,对大肠癌的有效治疗及作用机制研究尤为重要。本研究通过外源添加双糖链蛋白聚糖 Biglycan 处理大肠癌细胞系 HT-29 和 SW480,检测 Biglycan 对 HT-29 和 SW480 细胞增殖能力的影响,并探讨相关分子生物学机制,旨在初步阐明 Biglycan 在大肠癌发生发展中的作用,为确立 Biglycan 作为肿瘤治疗的新靶点提供更充分的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司;大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 购自中科院上海细胞库;Biglycan 购自 Sigma 公司;Cell Proliferation ELISA, BrdU 试剂盒购自 Roche 公司;Hoechst33258 染色液

购自碧云天生物技术研究, Cyclin D1、Cyclin A、p21、p27 和 GAPDH 抗体购自 Santa cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养。

1.2.2 Brd U 法检测 Biglycan 对大肠癌细胞增殖能力的影响

将大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 以每孔 200μl 接种于 96 孔培养板,细胞密度为每孔 2×10⁴ 个,培养 12h,使其充分贴壁,然后换液为终浓度分别为 0、10、20、50、100nmol/L Biglycan 的 DMEM 培养液培养,每个浓度设 5 个复孔,置 CO₂ 培养箱中孵育 12、24、48h,采用 Brd U-ELISA 方法检测各组细胞增殖情况,用酶标仪测定 450nm 处吸光度(A)值,计算 Biglycan 对大肠癌细胞的增殖抑制率,增殖抑制率(%)=(正常孔 A 值-加药实验孔 A 值)/正常孔 A 值×100%。

1.2.3 细胞克隆形成实验检测 Biglycan 对大肠癌细胞增殖能力的影响

将大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 分别以 1 000

收稿日期:2012-03-28;修回日期:2012-07-02

基金项目:辽宁省百千万人才工程项目资助(2011921026);

辽宁省科技厅自然科学基金项目资助(201102111)

E-mail:jingq40567@tom.com

个/孔接种于6孔培养板,培养过夜使其充分贴壁,然后换液为终浓度分别为0、10、20、50、100nmol/L Biglycan的DMEM培养液培养,每个浓度设4个复孔,5~6d换液1次,培养20d,形成细胞集落,70%甲醇固定、结晶紫染色,计数细胞克隆数并计算克隆形成率:克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数×100%。

1.2.4 Hoechst染色法检测 Biglycan 处理前后大肠癌细胞凋亡情况

取 5×10^4 个 HT-29 和 SW480 细胞分别接种于含盖玻片的细胞培养板中,以0、100 nmol/L Biglycan 处理大肠癌细胞 HT-29,以0、50 nmol/L Biglycan 处理大肠癌细胞 SW480 24h 后,行 Hoechst33258 染色,共聚焦显微镜下观察细胞核形态变化,检测 Biglycan 处理前后大肠癌细胞凋亡情况。

1.2.5 Western Blot 法检测细胞内 Cyclin D1、Cyclin A、p21 和 p27 蛋白表达水平

以0、100 nmol/L Biglycan 处理大肠癌细胞 HT-

29,以0、50nmol/L Biglycan 处理大肠癌细胞 SW480 24h 后,胰蛋白酶消化收集细胞,BCA 法进行蛋白质浓度测定,取20 μ g 等量蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),免疫印迹法检测目标蛋白,采用凝胶成像及分析系统测定细胞内 Cyclin D1、Cyclin A、p21 和 p27 灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Biglycan 对大肠癌细胞的体外增殖抑制作用

Biglycan 对大肠癌细胞的增殖抑制影响如图1和图2所示,Biglycan 作用于大肠癌细胞后,细胞增殖能力明显受到抑制。Brd U 结果显示,100nmol/L

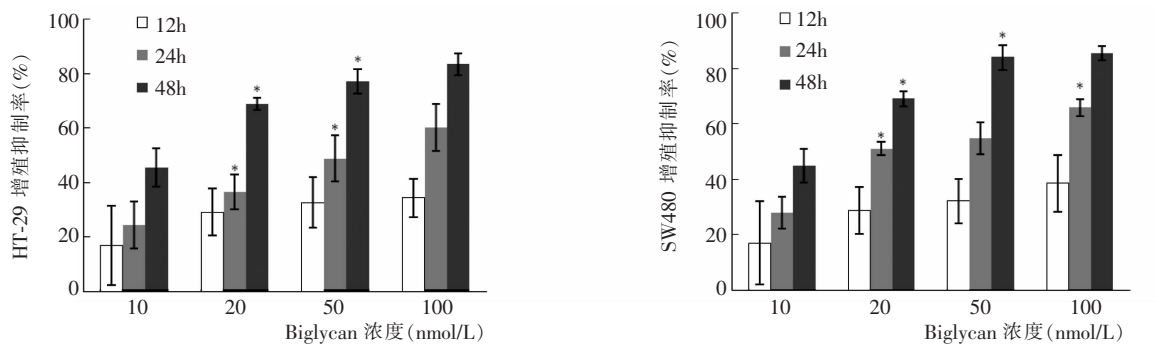


图1 Brd U 法检测 Biglycan 对大肠癌细胞增殖能力的影响 (n=5)

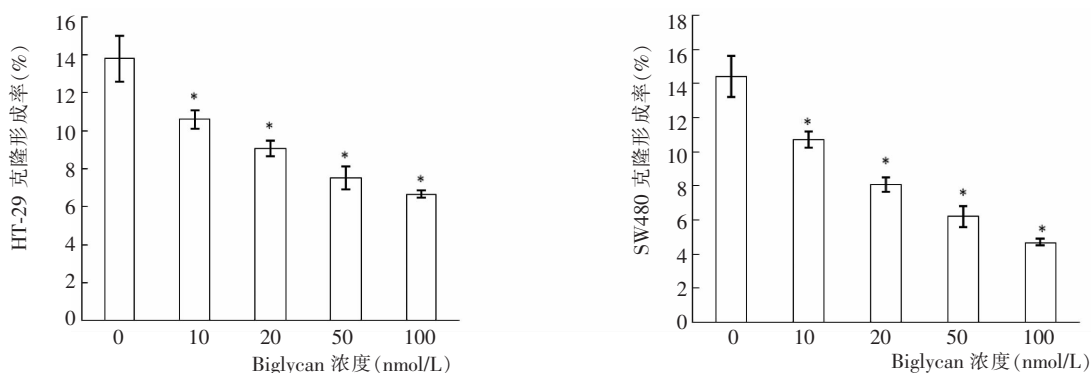


图2 克隆形成法检测 Biglycan 对大肠癌细胞增殖能力的影响 (n=4)

Biglycan 作用 HT-29 细胞 24h 时,增殖抑制率为 60.31%,而 50nmol/L Biglycan 作用 SW480 细胞 24h 时,增殖抑制率即达到 54.81%。随着药物浓度的增加,增殖抑制率均呈上升趋势,Biglycan 处理 HT-29 细胞 24h 时,不同浓度作用组增殖抑制率比较差异有显著性 ($F=18.42, P<0.001$);Biglycan 处理 SW480 细胞 24h 时,不同浓度作用组增殖抑制率比较差异有显著性 ($F=62.88, P<0.001$)。同 Brd U 实验结果相一致,克隆形成率实验结果表明,随着 Biglycan 浓度的增加,大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 克隆形成率均呈下降趋势 (HT-29: $F=71.43, P<0.001$; SW480: $F=83.85, P<0.001$)。

2.2 Biglycan 处理前后大肠癌细胞凋亡情况

经 Biglycan 加药处理后,HT-29 和 SW480 细胞均出现细胞核固缩现象 (图 3),表现为 Hoechst33258 染色着色较深,呈现致密浓染,说明在

100nmol/L 和 50nmol/L Biglycan 作用下,HT-29 细胞和 SW480 细胞均有凋亡情况发生。

2.3 Cyclin D1、Cyclin A、p21 和 p27 表达水平

Western Blot 结果如图 4 所示,Biglycan 处理大肠癌细胞后,细胞周期蛋白 CyclinD1 和 CyclinA 的蛋白表达均明显降低,与对照组比较,Biglycan 处理 HT-29 细胞后,CyclinD1 和 CyclinA 蛋白表达量分别下降了 70% ($F=8739.21, P<0.001$) 和 49% ($F=2184.92, P<0.001$);Biglycan 处理 SW480 细胞后,CyclinD1 和 CyclinA 蛋白表达量分别下降了 50% ($F=53.86, P<0.001$) 和 61% ($F=891.69, P<0.001$)。而 Biglycan 处理后,细胞周期依赖性激酶抑制蛋白 p21 和 p27 表达有所增加,HT-29 细胞 p21 和 p27 的蛋白表达分别增加为对照组的 1.88 倍 ($F=253.78, P<0.001$) 和 2.37 倍 ($F=219.28, P<0.001$),SW480 细胞 p21 和 p27 的蛋白表达分别增加为对照组的 3.53 倍 ($F=86.43, P<0.001$)

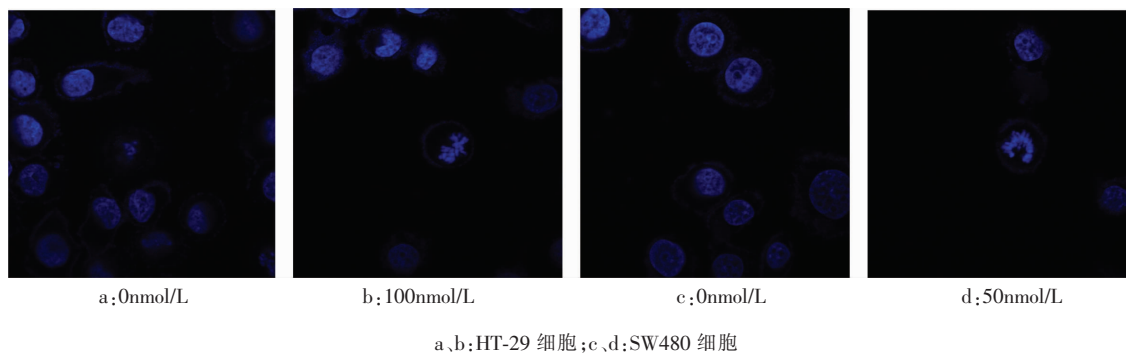


图 3 Biglycan 对大肠癌细胞凋亡影响 ($\times 1000$)

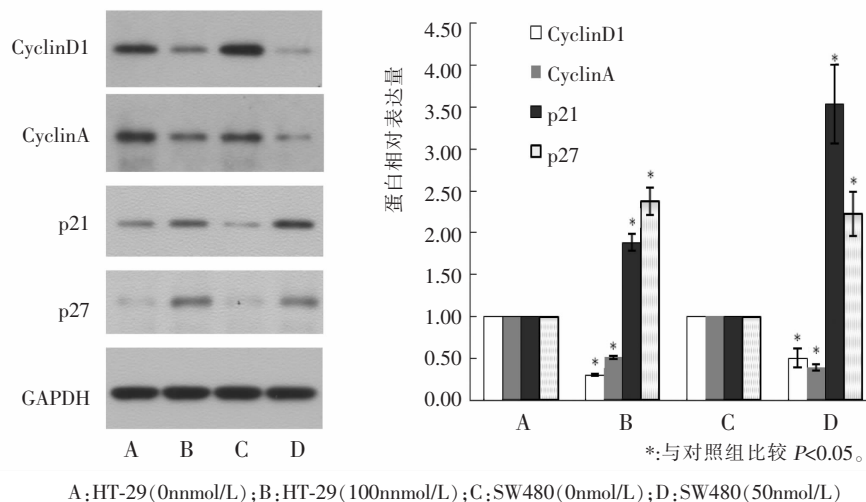


图 4 Western Blot 检测大肠癌细胞周期相关蛋白变化

和 2.22 倍($F=65.33, P<0.001$)。说明经 Biglycan 处理后,大肠癌细胞内周期蛋白调控有所改变。

3 讨 论

双糖链蛋白聚糖 Biglycan 是富含亮氨酸的蛋白聚糖家族成员,它由一个分子量为 38kD 的核心蛋白和葡萄糖氨聚糖共价连接组成^[2]。研究表明, Biglycan 参与骨形成,可以促进骨前体细胞向成骨细胞的分化^[3],并且, Biglycan 与椎间盘疾病的发生发展相关^[4];同时, Biglycan 表达异常与胰腺癌和间皮瘤等疾病密切相关^[5-7],与正常的胰腺组织和慢性胰腺炎组织相比,胰腺癌组织细胞基质外中的 Biglycan 表达显著上调。Coulson 等的研究表明,胶原和 Biglycan 等蛋白聚糖可增加细胞外基质密度,从而抑制大肠癌细胞的迁移和侵袭, Biglycan 表达上调与大肠癌的恶性程度密切相关,可以作为一种新的大肠癌分子标志物^[9,10]。此外,外源性的 Biglycan 可以通过上调 p27 和下调 Cyclin A 将胰腺癌细胞阻滞在 G₁ 期,从而抑制细胞增殖^[5]。近年来, Biglycan 在恶性肿瘤中的作用日益受到关注。

本研究结果显示, Biglycan 可显著抑制大肠癌细胞 HT-29 和 SW480 增殖,同时,在 100nmol/L 和 50nmol/L Biglycan 作用下, HT-29 细胞和 SW480 细胞均有凋亡情况发生。我们对 Biglycan 加药处理后的大肠癌细胞内细胞周期相关蛋白 CyclinD1、CyclinA、p21 和 p27 进行了检测, CyclinD1 即细胞周期素 D₁ 是细胞周期的正调节因子, CyclinD1 蛋白过表达可以加速细胞从 G₁ 期向 S 期转化,促使细胞增殖, CyclinD1 在乳腺癌、肺癌等多种肿瘤中过表达,并且高表达患者的生存率明显低于低表达者,可作为判断肿瘤预后的重要指标^[11,12]。Cyclin A 是一类在哺乳动物细胞 S 期和 G₂/M 期两个节点均有重要作用的蛋白,它的异常表达可导致细胞增殖失控,基因不稳定^[13]; p21 和 p27 属于细胞周期素依赖性激酶抑制因子,通过抑制 CDK 复合物的活性使细胞周期停留在 G₁ 期而抑制细胞增殖^[14,15]。本研究显示, Biglycan 处理后,大肠癌细胞中细胞周期蛋白 CyclinD1 和 CyclinA 出现下调趋势,细胞周期依赖性激酶抑制蛋白 p21 和 p27 的表达有所增加,说明 Biglycan 可能通过下调 CyclinD1 和 CyclinA 的表

达、上调 p21 和 p27 的表达抑制肿瘤细胞增殖,达到肿瘤治疗的目的。

参考文献:

- [1] Shi H, Zhou Y, Liu H, et al. Expression of CIAPIN1 in human colorectal cancer and its correlation with prognosis [J]. BMC Cancer, 2010, 10:477.
- [2] Gotte M, Sofeu Feugaing DD, Kresse H. Biglycan is internalized via a chlorpromazine-sensitive route [J]. Cell Mol Biol Lett, 2004, 9(3):475-481.
- [3] Young MF, Bi Y, Ameye L, et al. Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases [J]. Glycoconj J, 2002, 19(4-5):257-262.
- [4] Brown S, Melrose J, Catterson B, et al. A comparative evaluation of the small leucine-rich proteoglycans of pathological human intervertebral discs [J]. Eur Spine J, 2012, (Suppl 2):s154-s159.
- [5] Weber CK, Sommer G, Michl P, et al. Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G₁-arrest in pancreatic cancer cell lines [J]. Gastroenterology, 2001, 121(3):657-667.
- [6] Chen WB, Lenschow W, Tiede K, et al. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(39):36118-36128.
- [7] Gulyas M, Hjerpe A. Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium [J]. J Pathol, 2003, 199(4):479-487.
- [8] Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteria TF, et al. Colorectal cancer desmoplastic reaction up-regulates collagen synthesis and restricts cancer cell invasion [J]. Cell Tissue Res, 2011, 346(2):223-236.
- [9] Gu X, Ma Y, Xiao J, et al. Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers [J]. Clin Exp Med, 2011 Aug 31. [Epub ahead of print]
- [10] Mikula M, Rubel T, Karczmarski J, et al. Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors [J]. Funct Integr Genomics, 2011, 11:215-224.
- [11] Ikehara M, Oshita F, Ito H, et al. Expression of CyclinD1 but not of CyclinE is an indicator of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung [J]. Oncol Rep, 2003, 10(1):137-139.
- [12] Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, et al. Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients [J]. Int J Cancer, 2002, 98(3):415-418.
- [13] Pascreau G, Eckerdt F, Churchill ME, et al. Discovery of a distinct domain in cyclin A sufficient for centrosomal localization independently of Cdk binding [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7):2932-2937.
- [14] Lin HK, Chen Z, Wang G, et al. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence [J]. Nature, 2010, 464(7287):374-379.
- [15] Serrano M. Cancer: a lower bar for senescence [J]. Nature, 2010, 464(7287):363-364.