

## 2,3-吡啶醌诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 凋亡及周期阻滞

宋金莲, 岳旺, 侯琳, 葛银林

### Effects of Isatin on Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y

SONG Jin-Lian, YUE Wang, HOU Lin, GE Yin-Lin

青岛大学医学院  
生物化学与分子生物学教研室,  
山东 青岛 266021

*Department of Biochemistry and  
Molecular Biology,  
Medical College,  
Qingdao University,  
Qingdao, Shandong, 266021,  
P. R. China*

通讯作者: 侯琳

Correspondence to: HOU Lin

Tel: 86-532-82991029

Fax: 86-532-83801449

E-mail: qdhoulin@yahoo.com

基金项目: 山东省科技厅资助项  
目(No. 2002BB1CBA1)

**Grant:** Sci-Tech Program  
Foundation of Shandong Province  
(No. 2002BB1CBA1)

收稿日期: 2007-08-14

修回日期: 2007-10-30

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** Isatin (ISA) is a natural material that exists in mammalian body fluids and tissues. ISA could inhibit the growth of tumors, but the mechanism remains unclear. This study aimed to explore the effects of ISA on the cell cycle and apoptosis of neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **METHODS:** Fluorescent staining, flow cytometry, and Western blot were performed to analyze the cell cycle arrest and apoptosis of SH-SY5Y cells after treatment of ISA at different concentrations (0, 100, 200, 400  $\mu\text{mol/L}$ ). **RESULTS:** When treated with 400  $\mu\text{mol/L}$  ISA for 48 h, SH-SY5Y cells showed typical apoptotic morphologic changes including chromatin condensation and DNA fragment. Along with the increase of ISA concentration, Bcl-2 expression was decreased, the ratio of Bcl-2 to Bax was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). When treated with ISA (100, 200, 400  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, the positive rates of activated Caspase-3 in SH-SY5Y cells were significantly higher than that in control SH-SY5Y cells (19.28%, 25.88%, and 33.43% vs. 10.58%,  $P < 0.05$ ). Moreover, inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD), the substrate of Caspase-3, was degraded. In addition, the proportion of SH-SY5Y cells at  $G_1$  phase was significantly increased with an apparent  $G_1$  phase arrest when treated with ISA (100, 200, 400  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h. In the progress of cell cycle arrest induced by ISA, phosphorylated ERK and CDK1 expression were down-regulated ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** ISA can induce apoptosis and  $G_1$  phase arrest in SH-SY5Y cells, possibly by decreasing Bcl-2/Bax, activating Caspase-3 and down-regulating the expression of phosphorylated ERK and CDK1.

**KEYWORDS:** Isatin; Neuroblastoma; SH-SY5Y cell; Bcl-2/Bax; Caspase-3; Apoptosis; Cell cycle arrest

**【摘要】** 背景与目的: 2,3-吡啶醌(isatin, ISA)是存在于哺乳动物体液及组织中的一种天然物质,已发现其对肿瘤细胞的生长有抑制作用,但具体作用机制尚不明。本研究以人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为靶细胞,观察 ISA 对 SH-SY5Y 细胞的作用及其机制。方法: 采用荧光染色、流式细胞术(flow cytometry, FCM)及 Western blot 等方法检测不同浓度 ISA(0、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ )诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用机制。结果: 400  $\mu\text{mol/L}$  ISA 作用 48 h 后,在荧光显微镜下观察到 SH-SY5Y 细胞出现核固缩、DNA 断裂等典型的凋亡形态学改变。Western blot 结果显示,随 ISA 浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达下降、Bax 蛋白表达无明显改变,Bcl-2/Bax 下降。100、200、400  $\mu\text{mol/L}$  ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h,活化 Caspase-3 的表达率分别为 19.28%、25.88%、33.43%,明显高于对照组( $P < 0.05$ )。Western blot 进一步检测到其下游底物 Caspase 激活的脱氧核糖核酸酶抑

制剂(inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD)被降解。细胞周期分析表明,经 100、200、400  $\mu\text{mol/L}$  ISA 处理 48 h 后,  $G_1$  期 SH-SY5Y 细胞数明显增加, 呈明显的  $G_1$  期阻滞; 磷酸化的 ERK 蛋白及 Cyclin D1 (CDK1) 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.05$ )。结论: ISA 能明显诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡和细胞周期  $G_1$  期阻滞, 该作用可能与 Bcl-2/Bax 降低、Caspase-3 激活, 以及下调磷酸化 ERK 和细胞周期因子 CDK1 表达有关。

关键词: 2,3-吡啶酮; 神经母细胞瘤; SH-SY5Y 细胞; Bcl-2/Bax; Caspase-3; 凋亡; 细胞周期阻滞

中图分类号: R735.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2008)03-0283-06

随着长春碱、长春新碱在临床上的应用, 吡啶类化合物的抗肿瘤作用日益引起人们的关注。2,3-吡啶酮(isatin, ISA) 是维持龙虾生存所必需的一种内源性吡啶, 是我国独创的 I 类抗癌药物——靛玉红的先导化合物, 也存在于哺乳动物体内<sup>[1]</sup>。最初作为单胺氧化酶 B 的强抑制因子应用于帕金森症的治疗研究<sup>[2]</sup>。本课题组首次报道了 ISA 可以拮抗环境毒素造成的正常神经细胞死亡<sup>[3]</sup>, 近年来又发现 ISA 能抑制部分恶性肿瘤细胞的增殖并诱导其发生凋亡<sup>[4]</sup>。已有研究证明, ISA 能诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本文在此工作基础上进一步探讨 ISA 诱导细胞凋亡及周期阻滞的机制, 旨在为最终将 ISA 开发成具有我国独立知识产权的 I 类抗癌新药奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

ISA 购自上海元吉化工有限公司, 少量 DMSO 溶解, 母液浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  保存, 实验时用无血清培养基稀释至实验浓度 (DMSO 浓度控制在  $< 1\%$ ); Bcl-2、Bax、ICAD 和  $\beta$ -actin 的抗体购自北京博奥森公司; ERK 抗体购自美国 Sigma 公司; ECL 发光试剂购于北京普利莱公司; 藻红蛋白 (PE) 结合的单克隆活化的 Caspase-3 抗体凋亡试剂盒 (PE-conjugated monoclonal active Caspase-3 antibody apoptosis KIT) 购自 BD PharMingen 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、Hoechst33258 及碘化丙啶 (PI) 购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 细胞株及其培养

神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自中国协和医科大学基础学院细胞中心, 人正常成纤维细胞

为原代培养 (来源: 人胚胎), 用含 15% 胎牛血清 (杭州四季青生物公司) 的 H-DMEM 培养基 (Gibco 公司产品), 在 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}\text{C}$  饱和湿度条件下培养。

### 1.3 MTT 法检测 ISA 对人成纤维细胞增殖活性的影响

取对数生长期的成纤维细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^8/\text{L}$ , 接种于 96 孔板中, 每孔细胞数为  $1 \times 10^4$  个, 接种 24 h 后换新培养液, 实验组加入 ISA 使其终浓度分别为 100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ , 同时设立空白对照组及阴性对照组 (不加 ISA)。每孔体积为 200  $\mu\text{L}$ , 每个浓度设 8 个复孔, 培养 48 h 后, 每孔加入新鲜配制的 MTT (10 g/L) 10  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后, 去除培养液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解结晶 30 min, 用自动酶标仪 (Rayto 2100C 酶标仪) 于 490 nm 处测定吸光度值 (A 值)。重复 3 次, 取平均值, 以 A 值大小来反映细胞的增殖活性。

### 1.4 MTT 法测定 ISA 作用于 SH-SY5Y 细胞的半数抑制浓度

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^8/\text{L}$ , 接种于 96 孔板中, 每孔  $1 \times 10^4$  个细胞, 接种 24 h 后换新培养液, 实验组加入 ISA 使其终浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320、640、1280  $\mu\text{mol/L}$ , 同时设立空白对照组及阴性对照组 (不加 ISA)。每孔体积为 200  $\mu\text{L}$ , 每个浓度设 6 个复孔, 培养 48 h 后, 每孔加入新鲜配制的 MTT (10 g/L) 10  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后, 去除培养液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解结晶 30 min, 用自动酶标仪 (Rayto 2100C 酶标仪) 于 490 nm 处测定 A 值。细胞增殖抑制率 =  $(1 - \text{加药组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ , 实验重复 3 次。正规单位几率法<sup>[6]</sup>计算  $\text{IC}_{50}$  值。

### 1.5 Hoechst33258 荧光染色检测细胞凋亡的形态学改变

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞消化后, 调节细胞密度为  $5 \times 10^4/\text{mL}$ , 接种于 6 孔板中, 同时放入包被了多聚赖氨酸的盖玻片。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  (体积分数) 条件下孵育 24 h 后换新培养液, 并加入 ISA, 将 SH-SY5Y 细胞随机分为对照组 (不含 ISA) 及不同浓度 ISA 处理组 (100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ ), 继续培养 48 h 后取出培养板并弃培养基, 用甲醇:冰醋酸 (3:1) 在 4 $^{\circ}\text{C}$  固定 5 min, 磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗, 终浓度 5 mg/L 的 Hoechst33258 避光

染色 10 min, PBS 漂洗后封片, 荧光显微镜下观察。每个实验重复 3 次。

### 1.6 Western blot 检测 Bcl-2, Bax 蛋白表达

4℃ 条件下将对照组及不同浓度 ISA 处理组细胞收集于 1.5 mL 的 EP 管中, PBS 洗涤 2 次后, 每管加入 150 μL 细胞裂解液在冰上裂解 30 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。蛋白质样品与上样 Buffer 按 4:1 的比例混匀, 煮沸 3 min。每孔上样 40 μg, 12% SDS-PAGE 分离样品。于室温恒流 40 mA 1.5 h 将蛋白转至 PVDF 膜上, 用封闭液 (5% 脱脂奶粉, 溶于 TBS) 室温封闭 2 h, 将膜与溶于一抗稀释液 (1% 脱脂奶粉, 溶于 TBS 中) 的一抗 (兔抗人 β-actin 抗体 1:300, 兔抗人 Bcl-2 抗体 1:300, 兔抗人 Bax 抗体 1:300) 封于塑胶袋中, 4℃ 过夜后, 室温孵育 2 h, TBS 洗 15 min×3 次, 将膜与溶于二抗稀释液 (1% 脱脂奶粉, 溶于 TBS 中) 中的二抗室温孵育 3 h, TBST 洗 15 min×3 次, 将膜包在保鲜膜中, 加入 ECL 发光试剂, 暗室曝光, 显影, 定影, 对 X 光底片扫描, 永久保存并对结果进行光密度分析。每个实验重复 3 次。

### 1.7 活化 Caspase-3 及其底物的检测

用藻红蛋白 (PE) 结合的单克隆活化 Caspase-3 抗体凋亡试剂盒检测表达活化 Caspase-3 的细胞数。检测方法按试剂盒说明书进行, 标记了 PE 的抗体只与活化 Caspase-3 结合, 不与酶原形式的 Caspase-3 结合, 应用流式细胞仪进行检测即能分辨出表达活化 Caspase-3 的细胞; 采用 Western blot 法检测 Caspase-3 下游底物 ICAD 蛋白表达量的变化, Western blot 检测方法同前。一抗为兔抗人 ICAD 抗体, 1:300 稀释; 兔抗人 β-actin 抗体为内参照。每个实验重复 3 次。

### 1.8 PI 染色流式细胞仪 (FCM) 分析细胞周期

收集对照组及不同浓度 ISA 处理组细胞, PBS 洗涤 2 次后, PBS 重悬, 逐滴注入预冷的 70% 乙醇中, 30℃ 固定 24 h 以上, 1 000 r/min 离心 5 min, 去除乙醇, PBS 清洗 1 次, 离心弃 PBS, 加 50 μg/mL PI 0.5 mL (含 10 μg/mL RNaseA) 于避光处染色 30 min, 用流式细胞仪进行检测。每个实验重复 3 次。

### 1.9 Western blot 分析磷酸化的 ERK, Cyclin D1 (CDK1) 蛋白变化

Western blot 检测方法同前, 一抗分别为兔抗人磷酸化 ERK 抗体 (1:1 000 稀释) 和兔抗人

Cyclin D1 抗体 (1:300 稀释)。兔抗人 β-actin 抗体为内参照。每个实验重复 3 次。

### 1.10 统计学分析方法

结果采用 SPSS11.5 统计学软件进行方差分析, 比较各药物浓度处理组与对照组的差异,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ISA 对人正常成纤维细胞增殖活性的影响

MTT 检测 100、200、400 μmol/L ISA 处理人成纤维细胞 48 h 的  $A$  值分别为  $0.7588 \pm 0.0906$ 、 $0.7547 \pm 0.0714$ 、 $0.7354 \pm 0.0611$ , 与阴性对照组的 ( $0.7602 \pm 0.0984$ ) 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞的 $IC_{50}$ 值

ISA 作用 48 h 对 SH-SY5Y 细胞的  $IC_{50}$  为  $306.14 \mu\text{mol/L}$ 。不同浓度 ISA 对 SH-SY5Y 细胞的抑制率间比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 0.324$ ,  $P > 0.05$ ), 说明曲线拟合良好。

### 2.3 ISA 处理后细胞形态学变化

400 μmol/L ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后, 荧光显微镜下观察到典型的凋亡形态学改变: 胞体缩小、胞质浓缩、核染色质聚集, 并有 DNA 碎片。而对照组细胞核呈均匀的蓝色荧光。见图 1。

### 2.4 ISA 处理后细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的变化

经 0、100、200、400 μmol/L ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h, 对照组细胞表达一定量的 Bcl-2 蛋白。随着 ISA 浓度的增大, Bcl-2 蛋白表达量逐渐减少 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达没有明显改变 ( $P > 0.05$ ), Bcl-2/Bax 逐渐下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.5 ISA 处理后细胞中活化的 Caspase-3 及其底物的表达

利用流式细胞仪检测不同浓度 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 表达活化 Caspase-3 的细胞数, 表达活化 Caspase-3 的细胞数随药物浓度的增大逐渐增多, 而表达未活化 Caspase-3 的 SH-SY5Y 细胞数则相应减少 (见表 1)。同时采用 Western blot 检测到 Caspase-3 的下游底物 ICAD 被降解 (见图 3)。提示 ISA 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的过程中, 可促进 Caspase-3 的活化。

### 2.6 不同浓度 ISA 对 SH-SY5Y 细胞周期的影响

如表 2 所示, 100、200、400 μmol/L ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后, 随着药物浓度升高  $G_1$  期细

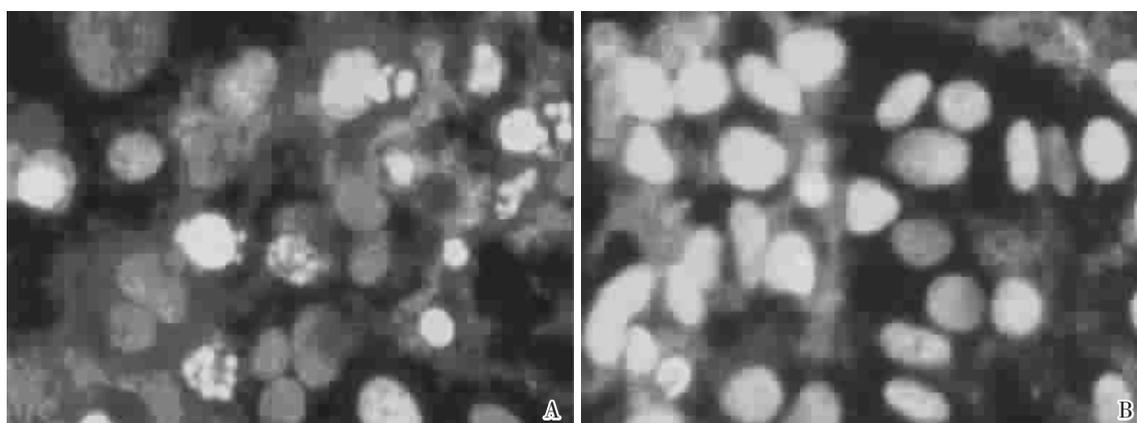


图 1 荧光显微镜下 ISA 作用 48 h 后 SH-SY5Y 细胞核的变化 (Hoechst33258 ×400)

Figure 1 Morphology of SH-SY5Y cells after 48-hour treatment of isatin (400 μmol/L) observed under fluorescence microscope (Hoechst33258 ×400)

DNA fragment and chromatin condensation are observed in ISA-treated SH-SY5Y cells (A), but not in untreated cells (B).

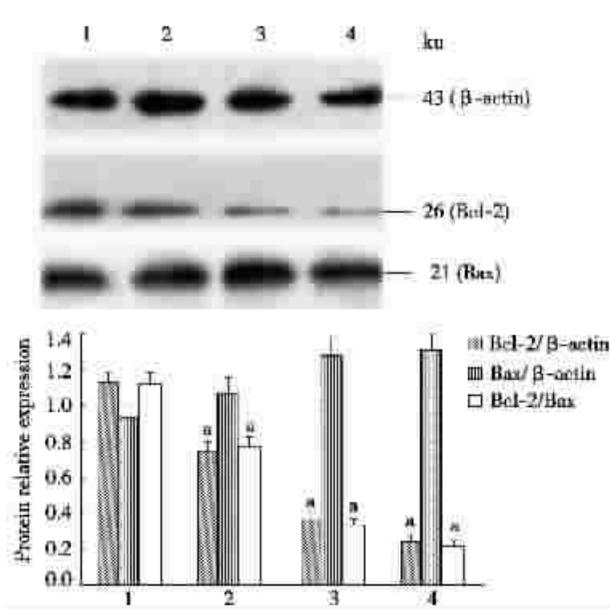


图 2 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后 Bcl-2, Bax 蛋白表达的变化

Figure 2 Expression of Bcl-2 and Bax in SH-SY5Y cells after 48-hour treatment of isatin detected by Western blot Lane 1: control cells; lanes 2-4: SH-SY5Y cells treated with 100, 200, and 400 μmol/L ISA, respectively. \**P*<0.05, vs. control.

表 1 流式细胞仪检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞中表达活化 Caspase-3 的影响

Table 1 Effect of isatin on Caspase-3 activity in SH-SY5Y cells measured by flow cytometry

Group	Positive rate (%)	
	Unactivated Caspase-3	Activated Caspase-3
Control	89.45±0.75	10.58±0.73
ISA 100 μmol/L	80.75±0.41 <sup>a</sup>	19.28±0.58 <sup>a</sup>
200 μmol/L	75.95±1.54 <sup>a</sup>	25.88±4.42 <sup>a</sup>
400 μmol/L	69.13±0.47 <sup>a</sup>	33.43±0.50 <sup>a</sup>

All values are presented as mean ± SD of one experiment performed in triplicate. <sup>a</sup>*P*<0.05, vs. control.

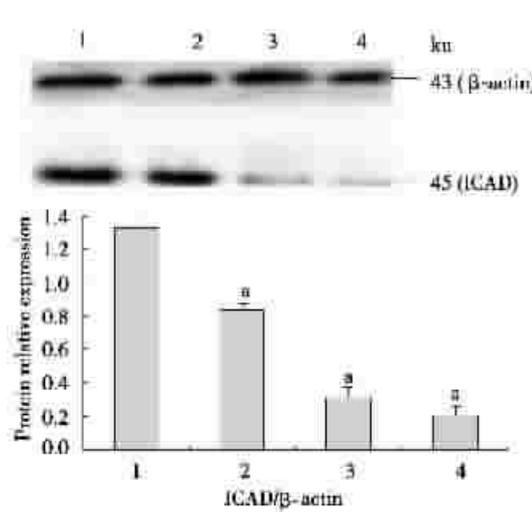


图 3 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后 ICAD 蛋白的表达

Figure 3 Expression of ICAD protein in SH-SY5Y cells after 48-hour treatment of isatin detected by Western blot Lane 1: control cells; lanes 2-4: SH-SY5Y cells treated with 100, 200, and 400 μmol/L ISA, respectively. \**P*<0.05, vs. control.

表 2 流式细胞术检测 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后细胞周期的变化

Table 2 Cell cycle of SH-SY5Y cells treated with isatin for 48 h determined by flow cytometry

Group	Cell proportion (%)		
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
Control	54.18±0.47	36.16±0.64	9.66±1.12
ISA 100 μmol/L	66.23±0.51 <sup>a</sup>	28.76±0.91 <sup>a</sup>	5.01±1.04
200 μmol/L	67.40±0.17 <sup>a</sup>	28.98±0.68 <sup>a</sup>	3.62±0.51
400 μmol/L	73.39±2.12 <sup>a</sup>	17.68±0.78 <sup>a</sup>	8.92±1.71

All values are presented as mean ± SD of one experiment performed in triplicate. <sup>a</sup>*P*<0.05, vs. control.

胞增加,S 期细胞所占的比例随之下降。与对照组比较,这种改变以 400  $\mu\text{mol/L}$  ISA 处理组最为明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.7 ISA 处理后细胞中磷酸化 ERK, Cyclin D<sub>1</sub> (CDK1) 的表达水平

磷酸化的 ERK 及周期蛋白 CDK1 是与细胞周期密切相关的两种蛋白,二者的表达量增加可促进细胞增殖。本实验采用 Western blot 检测到不同浓度 (0、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ ) ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h,磷酸化 ERK 及 CDK1 蛋白表达量均逐渐减少,差异有统计学意义(见图 4)。

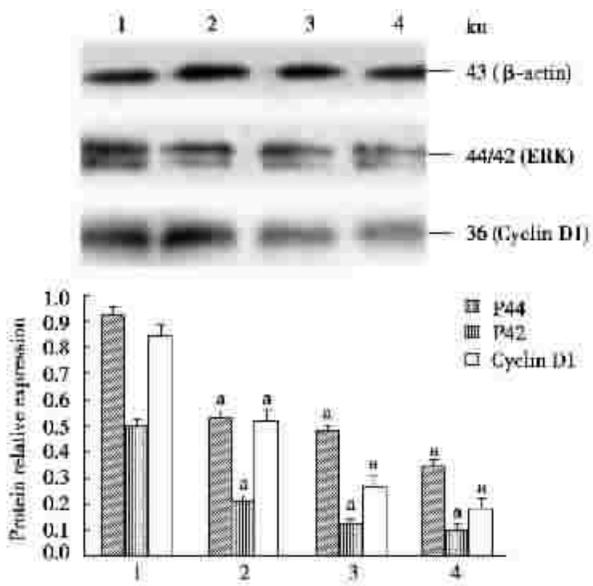


图 4 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后磷酸化的 ERK、Cyclin D1 蛋白的表达

Figure 4 Expression of ICAD and Cyclin D1 in SH-SY5Y cells after 48-hour treatment of isatin detected by Western blot Lane 1: control cells; lanes 2-4: SH-SY5Y cells treated with 100, 200, and 400  $\mu\text{mol/L}$  ISA, respectively. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. control.

### 3 讨论

近年来,天然吡啶类化合物成为人们研究抗癌药物的热点,尽管越来越多的吡啶类化合物被证明有抗肿瘤作用<sup>[7,8]</sup>,但具体的抗肿瘤机制尚不明了。本实验在用 MTT 法检测 ISA 对人成纤维细胞增殖活性无明显影响的基础上,选用人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 作为靶细胞,研究 ISA 诱导凋亡及周期阻滞的作用,并探讨其作用机制。

肿瘤的生成是细胞增殖和凋亡调控失衡的结果,通过诱导肿瘤细胞凋亡来消除肿瘤已成为一

种有效的肿瘤治疗途径和战略。因此抑制肿瘤生长,一方面是通过诱导肿瘤细胞凋亡来实现的,而 Bcl-2 家族蛋白和半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 与细胞凋亡密切相关<sup>[9]</sup>。Bcl-2/Bax 降低可引起线粒体膜电位的改变<sup>[10]</sup>,进一步激活 Caspase-3 诱导细胞发生凋亡。本课题组已报道 ISA 作用于 SH-SY5Y 细胞后,抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达明显下降,促凋亡基因 Bax 未发现明显改变。本实验选用 Western blot 进一步检测 Bcl-2、Bax 蛋白的变化,同时观察 Caspase-3 及其下游底物 ICAD 的改变。结果表明:与对照组相比较,不同药物浓度处理组的 Bcl-2/Bax 明显下降 ( $P < 0.05$ ),与前期报道的 mRNA 水平变化一致。在凋亡的信号传递中,Caspase-3 处于凋亡诱导信号传递、Caspase 级联反应、下游效应因子作用这一凋亡过程中的中心位置,它是细胞凋亡性死亡的最终执行者。激活的 Caspase-3 可以水解包括细胞调节、细胞信号转导、DNA 修复等环节中重要的蛋白,从而使细胞表现为凋亡特有的形态学及生化特征。正常情况下 Caspase-3 以无活性的酶原形式存在于细胞浆中,当 Caspase-3 被上游的 Caspase 激活后,生成活化的 Caspase-3 亚基,同时水解其下游底物,最终有规律地切断 DNA。本实验通过荧光染色观察到 400  $\mu\text{mol/L}$  ISA 处理组细胞出现典型的凋亡形态学改变:胞体缩小、核染色质聚集,并有 DNA 碎片。而且表达活化 Caspase-3 的细胞数随药物浓度的升高逐渐增加,其下游作用底物 ICAD 的蛋白表达量逐渐下降 ( $P < 0.05$ )。由此推测 ISA 作用于 SH-SY5Y 细胞可能通过降低 Bcl-2/Bax 比值来改变线粒体膜电位,启动细胞色素 C 的释放,细胞色素 C 与 Caspase-9、Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) 结合成复合物,激活 Caspase-9,最终将信号转导到下游的 Caspase-3,促进 Caspase-3 活化,触发凋亡。罗非君等<sup>[11]</sup>的研究也证实药物在通过 Caspase-3 途径诱导细胞凋亡的过程中,可促进 Caspase-3 的活化。

抑制肿瘤生长的另一个机制是通过影响肿瘤细胞生长周期。已有研究证实,在细胞增殖周期中,G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub> 期之间存在着影响细胞周期的调控点<sup>[12]</sup>,而药物可能通过影响这些调控点来影响细胞的增殖,不同的药物可影响细胞周期的不同阶段。本实验采用流式细胞仪检测细胞周期变化,100、200、400  $\mu\text{mol/L}$  ISA 处理组显示明显的 G<sub>1</sub> 期阻滞,与对照组相比较有显著性差异 ( $P <$

0.05),提示细胞处于  $G_1$  期时,某一与细胞增殖有关的途径被阻滞。MAPK 信号转导通路是介导细胞反应的重要信号系统<sup>[13]</sup>,其中磷酸化的 ERK 途径主要介导细胞增殖和分化,当细胞进入  $G_1$  期和 M 期时被激活,接着促使 Rb 蛋白磷酸化,从而导致细胞增殖。有研究者认为,磷酸化 ERK 的持续激活和核内滞留可激活 Cyclin D1(CDK1) 的转录<sup>[14]</sup>,CDK1 在细胞中的功能主要是促进  $G_1$ /S 期的转变进而促进细胞周期,与细胞增殖有关。为此,本实验采用 Western blot 检测磷酸化 ERK 及 CDK1 蛋白表达量的变化,结果显示随着药物浓度的增加,二者的蛋白表达量均逐渐减少( $P < 0.05$ )。本实验结果显示 ISA 能引起明显的  $G_1$  期阻滞,推测其作用可能是通过下调磷酸化 ERK 和 CDK1 的表达来实现的。

本课题组以 SH-SY5Y 细胞为靶细胞,对 2,3-吡啶酮在体外的抗肿瘤作用及其机制做了大量的实验研究,但临床应用 2,3-吡啶酮还需要进一步进行体内实验。

#### [参 考 文 献]

- [1] Glover V, Halket J M, Watkins P J, et al. Isatin: identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin [J]. *J Neurochem*, 1988,51(2):656-659.
- [2] Igosheva N, Lorz C, O'Conner E, et al. Isatin, an endogenous monoamineoxidase inhibitor, triggers a dose- and time-dependent switch from apoptosis to necrosis in human neuroblastoma cells [J]. *Neurochem Int*, 2005,47(3):216-224.
- [3] Yue W, Abe Y. Isatin, an endogenous MAO-B inhibitor, antagonizes the neurotoxic action of MPTP on central dopaminergic system in C57BL/6J mice [J]. *Chin J Neuro Sci*, 2002,18(4):690-693.
- [4] Cane A, Tournaire M C, Barritault D, et al. The endogenous oxindoles 5-hydroxyoxindole and isatin are antiproliferative and proapoptotic [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000,276(1):379-384.
- [5] 王 娜,祝兆怡,张金玉,等. 2,3-吡啶酮对人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 凋亡和端粒酶表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2007,23(5):680-684.
- [6] 赵 斌,葛金芳,朱娟娟,小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中  $IC_{50}$  的计算方法 [J]. *安徽医药*, 2007,11(9):834-835.
- [7] 王红梅,张桂英. 吡啶美辛抑制结肠癌移植瘤生长和微血管形成的实验 [J]. *第一军医大学学报*, 2004,24(2):28-30.
- [8] 张桂英,段晓明,袁伟建,等. 吡啶美辛诱导结肠癌细胞凋亡的分子机制 [J]. *中华消化杂志*, 2000,20(4):267-268.
- [9] 罗 红,糜漫天,张乾勇. 二十碳五烯联合视黄酸对 HL-60 细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2003,19(3):198-200.
- [10] Oltra Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homology, Bax, that accelerate programmed cell death [J]. *Cell*, 1998,74(4):609-619.
- [11] 罗非君,胡 智,邓锡云,等. 茶多酚鼻咽喉癌细胞 Caspase-3 活化 [J]. *癌症*, 2000,19(12):1082-1086.
- [12] Shiff S J, Koutsos M I, Qiao L, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 1996,222(1):179-188.
- [13] Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions [J]. *Biochem J*, 2000,351(2):289-305.
- [14] Zhang Y M, Wang K Q, Zhou G M, et al. Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003,24(6):566-568.

[编辑及校对:张 菊]