

(R)-Roscovitine 诱导 Hela 细胞凋亡的分子机制

张均平^{1,2}, 刘会杰^{1,2}, 杨洋^{1,2}, 许瑞安^{1,2}

(1. 华侨大学 分子药物研究院, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 分子药物教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 以 Hela 细胞为模型, 探讨细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(R)-roscovitine 对 Hela 细胞凋亡诱导的可能途径, 进一步了解其诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制. 结果显示:(R)-roscovitine 明显抑制 Hela 细胞的增殖, 在 $17.5 \sim 140.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作用 12, 24, 48 h 后, Hela 细胞的增殖抑制率分别为 8.48%~33.76%, 25.19%~86.41% 和 47.90%~88.08%; 典型凋亡的 DNA ladder 被诱导, 且凋亡率随药物浓度的增加而升高; 经半胱天冬酶-3(caspase-3)特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 或半胱天冬酶泛抑制剂 Z-VAD-FMK 处理后, (R)-roscovitine 对 Hela 细胞凋亡的诱导被抑制约 20%, 说明半胱天冬酶依赖的途径参与了(R)-roscovitine 对 Hela 细胞凋亡的诱导; (R)-roscovitine 诱导凋亡诱导因子(AIF)从线粒体释放细胞核中, 且 Ac-DEVD-CHO 和 Z-VAD-FMK 没有抑制 AIF 的释放, 这意味着(R)-roscovitine 能够诱导 Hela 细胞凋亡, 其机制是通过 caspase 与非 caspase 依赖两种途径.

关键词: (R)-roscovitine; 细胞周期蛋白依赖性激酶; 细胞凋亡; 凋亡诱导因子; 半胱天冬酶

中图分类号: 730.231; R735.2

文献标志码: A

(R)-roscovitine 是一个 2,6,9-三元取代的嘌呤类似物, 选择性抑制 CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin B, CDK2/cyclin E 和 CDK5/p35^[1]. 其对肿瘤细胞的毒性具有广谱性, 能抑制多种肿瘤细胞如乳腺癌、前列腺癌、肺癌等的增殖, 使细胞周期停滞于各个时期, 但对正常细胞的毒性却很小^[2-4]. (R)-roscovitine 诱导细胞凋亡机制复杂, 与细胞类型、细胞的分子遗传背景及细胞所处的周期时相有关. (R)-roscovitine 可以通过独立于 p53 凋亡途径诱导 L1210, By-2 和 B-CCL 细胞死亡^[5-7], 也可以抑制 RNA 合成, 再通过 p53 凋亡途径诱导成纤维细胞凋亡, 但这两种方式都依赖半胱天冬酶-3(caspase-3)的激活^[8]. Gao 等^[9]用泛 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 和 caspase-3 特异性抑制剂 Z-DEVD-FMK 处理 PC-12 细胞后, 发现由(R)-roscovitine 所诱导的 PC-12 细胞死亡仅部分被阻断, 这说明还可能非 caspase 依赖途径参与(R)-roscovitine 对细胞凋亡的诱导. 凋亡诱导因子(AIF)是线粒体内膜间隙中的一种水溶性蛋白质, 其介导的细胞凋亡途径不依赖 caspase 家族效应因子的激活^[10]. (R)-roscovitine 对肿瘤细胞凋亡的诱导作用是否也经过了 AIF 途径尚不清楚. 本实验主要研究细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(R)-roscovitine 对人宫颈癌 Hela 细胞凋亡的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

人宫颈癌细胞株 Hela, 购自中国科学院上海生命科学院细胞库, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基, 在 37 °C, 5% 的 CO₂, 饱和湿度的恒温培养箱中培养, 1~2 d 换液 1 次, 约 80% 满瓶时传代.

1.2 主要试剂

(R)-roscovitine, 纯度 ≥ 98%, HPLC 级, 美国 Sigma 公司; 用 DMSO 溶解(R)-roscovitine, 母液

收稿日期: 2013-01-23

通信作者: 许瑞安 (1948-), 男, 教授, 主要从事分子药物、分子医学、海洋与基因工程药物的研究. E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072578)

质量浓度为 $10.0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用; RPMI-1640 培养基, 美国 Invitrogen 公司; 小牛血清, 美国 Hyclone 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), DMSO, 碘化丙啶 (PI), 美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit, 德国 Merck 公司; 细胞凋亡阳性对照试剂盒, 凋亡细胞 DNA Ladder 检测试剂盒, 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒, caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK, caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO, 兔抗人 AIF 抗体, 兔抗人 Histone H2A 抗体, 小鼠抗人 Actin 抗体, HRP 标记的羊抗兔二抗和羊抗小鼠二抗, 均来自上海碧云天生物技术研究所以。

1.3 MTT 法

将 8.0×10^3 个 Hela 细胞接种于 96 孔板中, 培养 12 h 后加入不同浓度的 (R)-roscovitine 溶液, 使药物终浓度分别为 0, 17.5, 35.0, 70.0 和 $140.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设有空白对照组和 0.5% 的 DMSO 处理组, 每组 6 个复孔。继续培养 6, 12, 24 和 48 h 后检测细胞增殖情况。每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 在培养箱内继续孵育 4 h 后, 弃上清液, 每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 的 DMSO, 室温下震荡 10 min, 待紫色结晶完全溶解后, 以 630 nm 作为参比波长, 用酶标仪测定 550 nm 波长吸光度 (D)。增殖抑制率 $\eta = [1 - D_{\text{exp}}/D_{\text{c}}] \times 100\%$, 计算细胞增殖抑制率为 50% 时的药物浓度 (IC_{50} 值), 实验重复 3 次。其中: D_{exp} , D_{c} 分别为实验组和对照组的吸光度值。

1.4 倒置显微镜

将 1.0×10^5 个 Hela 细胞接种于 24 孔板中, 培养 12 h 后, 分别加入 (R)-roscovitine 溶液, 药物终浓度为 $70.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 孵育 24 h 后在光镜下观察细胞形态变化。

1.5 碘化丙啶染色-流式细胞术

将 2.0×10^5 个 Hela 细胞接种于 6 孔板中, 培养 12 h 后, 加入不同浓度的 (R)-roscovitine 溶液, 作用 24 h 后, 收集细胞。经 PBS 洗涤后, 用 75% 预冷乙醇 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 18 h; PBS 洗涤 3 次, 调整细胞浓度为 1.0×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 将细胞重悬于 $500\text{ }\mu\text{L}$ 含有 $40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A 的 PBS 中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化 RNA 30 min。加入 PI (碘化丙啶) 使其质量浓度达到 $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 室温避光染色 30 min 后上流式细胞仪测定, 每个样品检测 20 000 个细胞。在激发波长 488 nm 时, 统计发射光波长在 620 nm 以上的细胞, 利用 CELLQuest 软件分析凋亡细胞 (亚二倍体细胞), 凋亡率数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 实验重复 3 次。

1.6 琼脂糖凝胶电泳

用不同浓度的 (R)-roscovitine 处理 Hela 细胞 24 h 后, 收集细胞, 调整每组细胞数量为 2.0×10^6 个, 进行 DNA 提取, 具体操作按 DNA Ladder 检测试剂盒说明书。在 1% 的琼脂糖凝胶, 50 V 下电泳 1 h, 利用凝胶成像分析仪观察并记录结果。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双染-流式细胞术

用 Caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK ($100.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 Caspase-3 特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO ($100.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 Hela 细胞 1 h, 再加入终浓度为 $70.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 (R)-roscovitine 溶液, 继续孵育 24 h, 用 Annexin V-FITC/PI 染色-流式细胞仪检测细胞凋亡。具体操作见 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书。每个样品检测 20 000 个细胞, 实验重复 3 次。其中: Annexin V-/PI- 为活细胞, Annexin V+/PI- 细胞为早期凋亡细胞, Annexin V+/PI+ 为凋亡晚期细胞, Annexin V-/PI+ 为死亡细胞。

1.8 蛋白质印迹

Caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK ($100.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 Hela 细胞 1 h, 再加入终浓度为 $70.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 (R)-roscovitine 溶液, 继续孵育 24 h, 收集细胞。用单去污剂裂解液 (2.5 mL , $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris $\cdot \text{HCl}$, pH=8.0; 0.438 g 的 NaCl; 0.5 mL 的 Triton X-100; 加含 PMSF 蒸馏水至 50 mL) 裂解细胞, 抽提细胞总蛋白; 按细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒操作说明抽提细胞核蛋白和细胞质蛋白。BCA 法定量后进行 SDS-PAGE 电泳, 分离后的蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜, $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 1:1 000 稀释的兔抗人 AIF 抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:500), 室温孵育 2 h, 洗涤后用 ECL 显色液显色, 凝胶电泳分析系统拍照, 用 Quantity One 软件分析结果, 以 Histone H2A 与 β -Actin 分别作为细胞核与细胞质的内参照。

2 结果与讨论

2.1 (R)-roscovitine 抑制 HeLa 细胞的增殖

(R)-roscovitine 处理 HeLa 细胞 6, 12, 24 和 48 h 后, HeLa 细胞的增殖能力随着 (R)-roscovitine 浓度的增加及作用时间的延长而降低, 如图 1 所示. 从图 1 可知: 作用时间为 6 h 时, 不同浓度 (R)-roscovitine 溶液对 HeLa 细胞活性没有明显影响; 作用时间为 12~24 h 时, HeLa 细胞活性明显下降且呈时间、剂量依赖效应; 作用时间延长至 48 h 时, 浓度为 35.0, 70.0, 140.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 (R)-roscovitine 溶液对 HeLa 细胞的增殖抑制作用 (64.33%, 82.63%, 88.08%) 与 24 h (60.94%, 79.74%, 86.41%) 时并没有明显区别 ($P > 0.05$). 此外, 24 h 时的半抑制率 (IC_{50}) 为 30.77 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 结果表明: (R)-roscovitine 能明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 且呈剂量、时间依赖效应; 当作用时间达到 24 h, 再延长药物作用时间也不能明显增加药物效果.

2.2 (R)-roscovitine 诱导 HeLa 细胞凋亡

通过倒置显微镜观察观察不同浓度 (R)-roscovitine 对 HeLa 细胞形态的影响, 结果如图 2 所示. 从图 2 可知: 对照组 HeLa 细胞活性高, 生长均匀, 形状规则呈梭形, 贴壁牢固, 相邻细胞生长融合成片; 0.5% 的 DMSO 组与对照组比较, 细胞形态无明显区别; (R)-roscovitine 处理组细胞数量减少, 体积缩小变圆, 细胞间连接消失, 细胞由贴壁逐渐脱落, 且随着药物浓度的增加, 这种变化趋势越明显. 这意味着细胞发生了凋亡的形态学变化.

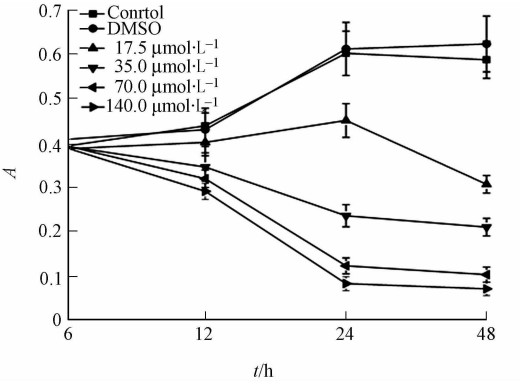
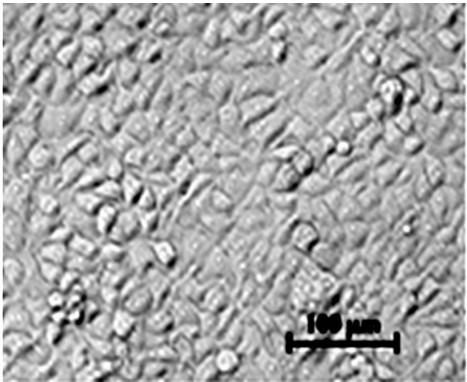
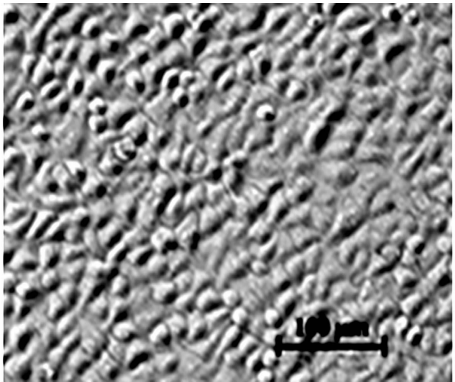


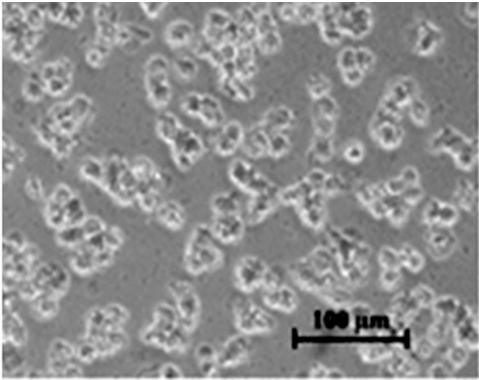
图 1 (R)-roscovitine 对 HeLa 细胞增殖的影响
Fig. 1 Effects of (R)-roscovitine on HeLa cell proliferation



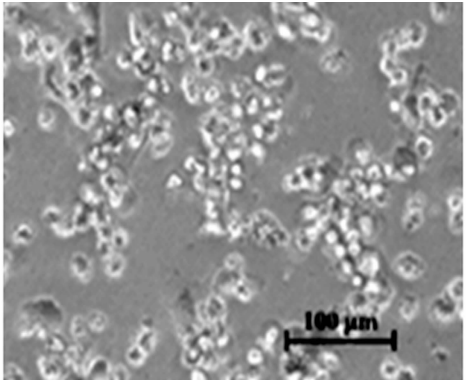
(a) 对照组



(b) 0.5% 的 DMSO 组



(c) 35.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (R)-roscovitine 处理组



(d) 70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (R)-roscovitine 处理组

图 2 不同浓度 (R)-roscovitine 对 HeLa 细胞形态的影响

Fig. 2 Morphological changes of HeLa cells induced by the different concentrations of (R)-roscovitine

细胞凋亡晚期时, DNA 会被核酸酶在核小体连接处切断, 产生约 180 ~ 200 bp 或者其整数倍大小的 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳时呈现有规则的梯形条带, 这是细胞凋亡的最典型特征, 也是区分凋亡和坏死的重要标志^[11]. (R)-roscovitine 对 Hela 细胞晚期凋亡的影响, 如图 3 所示.

从图 3 可知: 对照组只有一条 DNA ladder, 而 (R)-roscovitine (17.5 ~ 70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理组, 可见多条明显的 DNA ladder, 且随着药物浓度增加, 条带越趋明显, 这与流式细胞仪检测结果一致(图 4), 说明 (R)-roscovitine 诱导 Hela 细胞凋亡呈剂量依赖效应.

2.4 (R)-roscovitine 经 caspase 与非 caspase 依赖途径诱导 Hela 细胞凋亡

利用 MTT 法研究不同 caspase 抑制剂对 (R)-roscovitine 诱导 Hela 细胞增殖的影响, 结果如图 5 所示. 图 5 中: 横坐标 a~h 分别代表对照组, Ac-DEVD-CHO (100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Z-VAD-FMK (100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (R)-roscovitine (70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (R)-roscovitine (70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ac-DEVD-CHO (50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (R)-roscovitine (70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ac-DEVD-CHO (100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (R)-roscovitine (70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Z-VAD-FMK (50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (R)-roscovitine (70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Z-VAD-FMK (100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

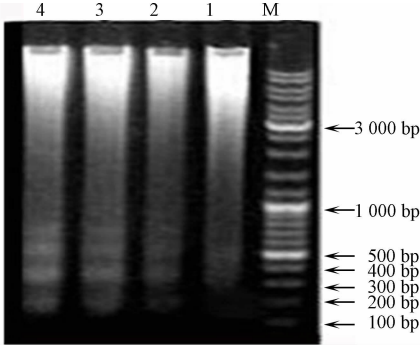
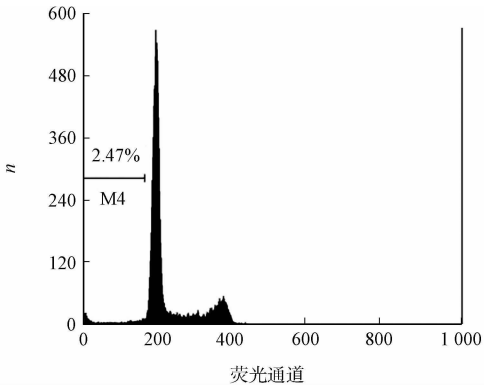
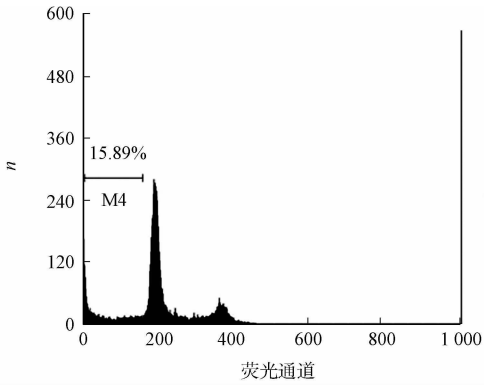


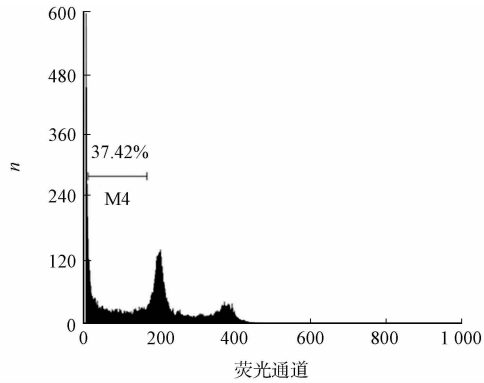
图 3 (R)-roscovitine 对 Hela 细胞晚期凋亡的影响
Fig. 3 Effects of (R)-roscovitine on late apoptosis of Hela cells



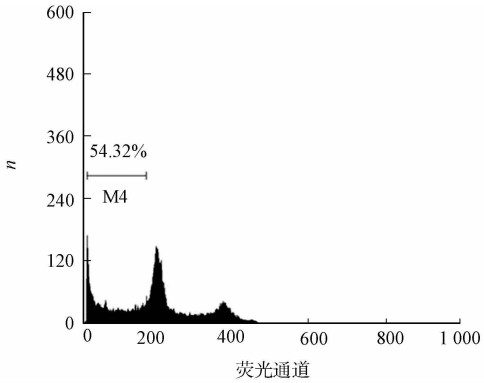
(a) 对照组



(b) 17.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (R)-roscovitine



(c) 35.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (R)-roscovitine



(d) 70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (R)-roscovitine

图 4 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞晚期凋亡

Fig. 4 Assessment of late apoptotic cells by DNA fragment assay

从图 5 可知: 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 和 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK 对 Hela 细胞的生长没有影响; 70.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (R)-roscovitine 作用细胞 24 h 后, 能显著抑制 Hela 细胞的增殖能力 ($P < 0.01$), 而当 Ac-DEVD-CHO 和 Z-VAD-FMK 存在时, (R)-roscovitine 对 Hela 细胞生长的抑制作用减弱. 说明, 这两种抑制剂部分阻止了 (R)-roscovitine 对 Hela

的增殖抑制作用.

在细胞凋亡早期, 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面, 暴露在细胞外环境中. Annexin V 是一种分子量为 35~36 kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 能与磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合. 碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但在细胞凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染成红色. 将 Annexin V-FITC 作为荧光探针与 PI 匹配使用, 利用流式细胞仪可检测早期凋亡、晚期凋亡及死细胞.

采用 Annexin V-FITC/PI 双染检测不同 caspase 抑制剂对(R)-roscovitine 对 Hela 细胞凋亡的影响, 结果如图 6 所示. 图 6 中:(R)-roscovitine 及抑制剂 Ac-DEVD-CHO, Z-VAD-FMK 浓度分别为 $70.0, 100.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 从图 6 可知:与单独(R)-roscovitine 处理组比较, 当 caspase-3 特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 或 caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK 存在时, Hela 细胞早期凋亡率从 27.19%下降到 23.23%和 19.22%; 晚期凋亡率从 24.24%下降到 11.50%和 11.92%. 这表明(R)-roscovitine 诱导 Hela 细胞凋亡部分依赖 caspase 的活性, 还有非 caspase 依赖途径也参与了细胞凋亡.

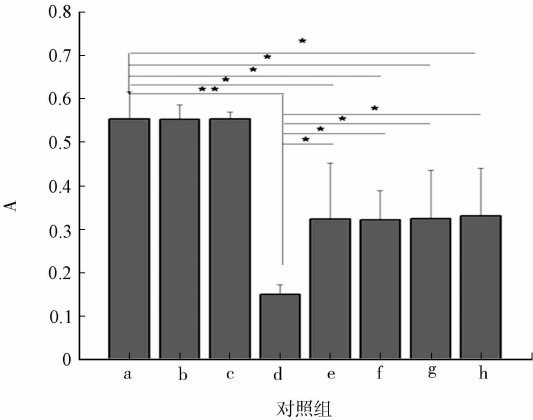


图 5 不同 caspase 抑制剂对(R)-roscovitine 诱导 Hela 细胞增殖的影响
Fig. 5 Effects of different caspase inhibitors on proliferation induced by (R)-roscovitine in Hela cells

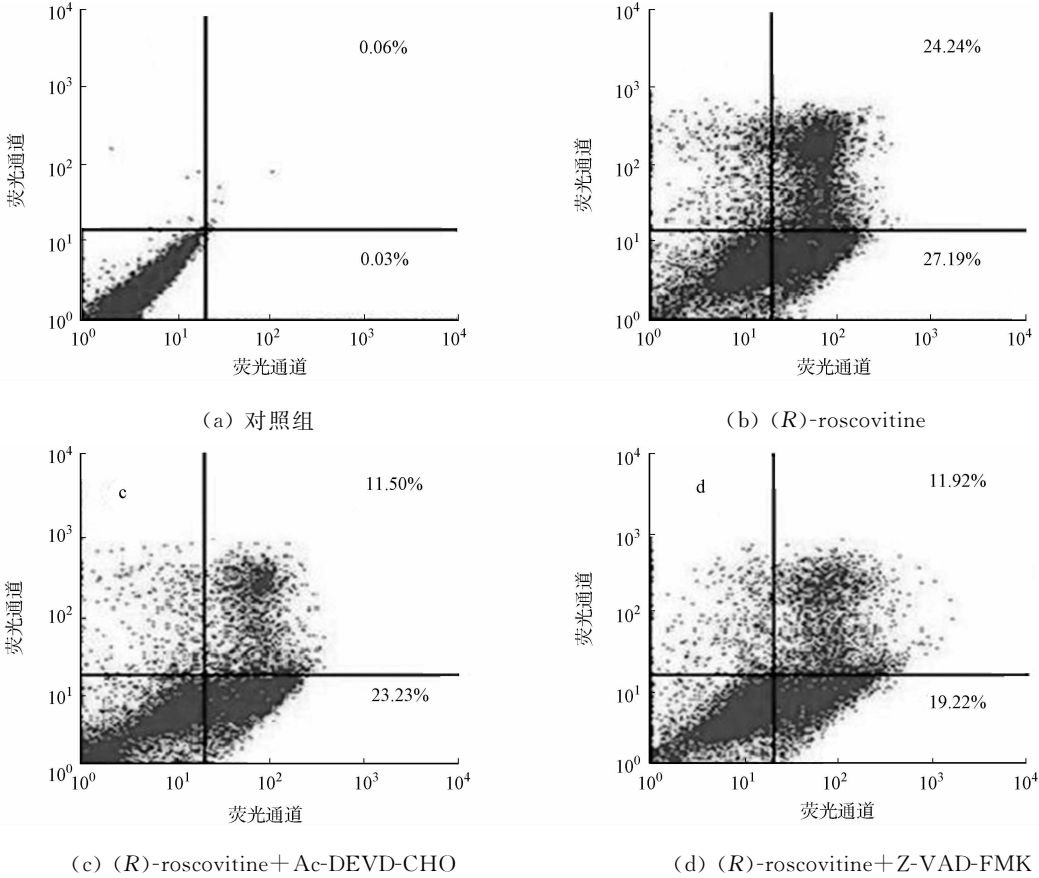


图 6 不同 caspase 抑制剂对(R)-roscovitine 对 Hela 细胞凋亡的影响

Fig. 6 Apoptotic changes of Hela cells induced by different caspase inhibitors and (R)-roscovitine

采用蛋白印迹(western blotting)检测凋亡诱导因子(AIF) 在不同细胞器中的表达, 如图 7 所示. 从图 7 可知:在 caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK 处理前后, (R)-roscovitine 都诱导了 Hela 细胞线粒体

中的 AIF 经细胞浆转位到细胞核中, 并且细胞核中 AIF 表达量没有明显变化, 说明 caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK 没有抑制 AIF 从线粒体中的释放.

此外, 通过蛋白印迹检测了 caspase-3 的活性, 如图 8 所示. 由图 8 可知: 当 (R)-roscovitine 处理 Hela 细胞时, caspase-3 被切割, 产生了活化的 caspase-3. 结果表明: (R)-roscovitine 经 caspase 与非 caspase 依赖的 AIF 途径诱导 Hela 细胞凋亡.

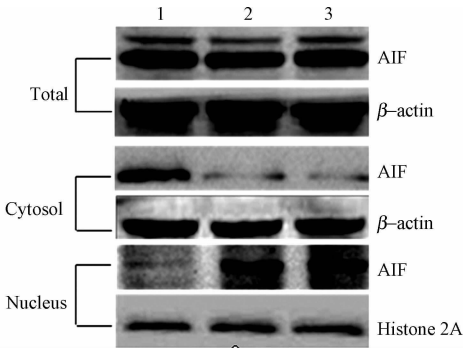


图 7 蛋白印迹检测 (R)-roscovitine 诱导 AIF 蛋白的释放

Fig. 7 AIF protein release induced by in Hela was as (R)-roscovitine sessed by western blotting

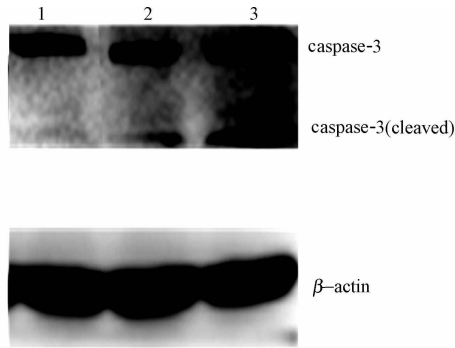


图 8 蛋白印迹检测 (R)-roscovitine 诱导 caspase-3 的切割

Fig. 8 Caspase-3 calaved induced by (R)-roscovitine in Hela was assessed by western blotting

3 结束语

程序性细胞死亡分为两大类: caspase 依赖型和 caspase 非依赖型. AIF 是 caspase 非依赖型细胞死亡的关键执行因子之一^[12]. 当细胞受到凋亡的刺激时, 线粒体膜通透性改变, AIF 从线粒体转位到核内, 与线粒体蛋白质 endonuclease G (Endo G) 一起切割染色体使 DNA 呈大片段化 (~50 kb)^[13]. AIF 引起的细胞死亡不依赖于 caspase 的活性, 但 AIF 和 cytochrome c/caspase/CAD (caspase-activated DNAase) 诱导的凋亡通路直接并不完全独立. 胞浆的 AIF 可以使线粒体释放更多的 cytochrome C, 而活化的 caspase 也能促使线粒体释放 AIF 因子^[14]. (R)-roscovitine 经 caspase 与非 caspase 依赖途径诱导了 Hela 细胞凋亡. Caspase-3 特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 和 caspase 泛抑制剂 Z-VAD-FMK 没有抑制 AIF 的释放, 这进一步表明 AIF 依赖的细胞凋亡是非 caspases 依赖的、在真核细胞中广泛存在并发挥重要作用的一条凋亡途径. (R)-roscovitine 能够诱导细胞凋亡, 表明 CDKs 不仅在细胞周期的运转过程中发挥作用, 还在细胞凋亡中产生作用. 细胞周期与凋亡的关系及其机制十分复杂. 研究发现 CDK2/CyclinE 复合物与转录因子 FOXO1 相互作用, 上调 FasL, TNF 和 APO-2L/Trail 等的表达, 启动 caspase8/10-caspase-3 细胞外源途径诱导细胞凋亡^[15]. 但是细胞周期依赖性蛋白激酶是如何引起线粒体膜电位的变化, 诱导细胞色素 C (cytc) 和 AIF 的释放并导致细胞凋亡的机制并不清楚.

参考文献:

[1] RAYNAUD F I, WHITTAKER S R, FISCHER P M, et al. In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin - dependent kinase inhibitors olomoucine, boheminine and CYC202[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(13): 4875-4887.

[2] DICKSON M A, SCHWARTZ G K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy[J]. Curr Oncol, 2009, 16(2): 36-43.

[3] ALDOSS I T, TASHI T, GANTI A K. Seliciclib in malignancies[J]. Expert Opin Inv Drug, 2009, 18(12): 1957-1965.

[4] MEIJER L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinesis[J]. Trends Cell Biol, 1996, 6(10): 393-397.

[5] MGBONYEBI O P, RUSSO J, RUSSO I H. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(8): 1903-1910.

[6] ALVI A J,AUSTEN B,WESTON V J,et al. A novel CDK inhibitor,CYC202 (*R*-roscovitine) , overcomes the defect in p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival [J]. Blood,2005,105 (11):4484-4491.

[7] APPELEYARD M V,ONEILL M A,MURRAY K E,et al. Seliciclib (CYC202, *R*-roscovitine) enhances the antitumor effect of doxorubicin in vivo in a breast cancer xenograft model[J]. Int J Cancer,2009,124(2):465-472.

[8] LJUNGMAN M,PAULSEN M T. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382[J]. Mol Pharmacol,2001,60(4):785-789.

[9] 高建新,周玉琴,张茹华,等. Caspase-3 在 roscovitine 诱发 PC12 细胞凋亡中发挥重要作用[J]. 生理学报,2005,57(6):755-760.

[10] 于翠娟,王成济,杨安钢. AIF 及 AIF 依赖的凋亡[J]. 医学分子生物学杂志,2003,25(6):351-353.

[11] 赵文丽. 细胞凋亡及其检测技术的进展[J]. 山西职工医学院学报,2004,14(2):68-69.

[12] CANDÉ C,CECCONI F,DESSEN P,et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): Key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? [J]. J Cell Sci,2002,115(24):4727-4734.

[13] SUSIN S A,LORENZO H K,ZAMZAMI N,et al. Molecular characterization of mitochondria apoptosis-inducing factor[J]. Nature,1999,397(6718):441-446.

[14] 陈默,潘敏慧,周恩昆,等. 凋亡诱导因子的研究进展[J]. 细胞生物学杂志,2007,29(6):791-794.

[15] HUANG H,REGAN KM,LOU Z,et al. CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage[J]. Science,2006,314(5797):294-297.

Caspase-Dependent and-Independent Pathways for
(*R*)-Roscovitine-Induced Apoptosis in Hela Cells

ZHANG Jun-ping, LIU Hui-jie, YANG Yang, XU Rui-an

(1. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Hela cells used as a model, investigate that the cell apoptosis pathways induced by cyclin dependent kinase inhibitor (*R*)-roscovitine and further understand that molecular mechanism by which (*R*)-roscovitine induced cell apoptosis. The results showed that the proliferation of Hela cells was significantly inhibited by (*R*)-roscovitine, the cell viability was reduced by 8.48%—33.76%, 25.19%—86.41% and 47.90%—88.08%, respectively, after treatment with (*R*)-roscovitine (17.5—140.0 μmol · L⁻¹) for 12, 24 and 48 h. After treatment of Hela cell with (*R*)-roscovitine for 24 h, the obvious changes in cell morphology occurred by cell shrinkage, round and adherence decrease. Characteristic change of apoptosis with DNA ladder was induced and apoptosis increased with increasing concentration of (*R*)-roscovitine. Moreover, in the presence of caspase-3 special inhibitor Ac-DEVD-CHO or caspase-pan inhibitor Z-VAD-FMK, the (*R*)-roscovitine induced apoptosis was reduced by about 20%, suggesting that caspase dependent pathway participated in the apoptosis induced by (*R*)-roscovitine. (*R*)-roscovitine induced apoptosis inducing factor(AIF), which could release from mitochondria to nuclei, in the presence or absence of Z-VAD-FMK, demonstrating that (*R*)-roscovitine could induce apoptosis and its mechanism by which was through both caspase dependent and independent caspase pathways.

Keywords: (*R*)-roscovitine; cyclin-dependent kinases; apoptosis; apoptosis inducing factor; caspase

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 熊兴泉)