

## 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

王娜, 侯琳, 祝兆怡, 张金玉, 鞠传霞, 葛银林, 岳旺  
(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)

中国图书分类号: R 329.25; R 345.9; R 39.2; R 73-351; R 730.264; R 977.3

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)05-0680-05

**摘要:** 目的 研究 2,3-吡啶酮 (2,3-dioxoindoline, ISA) 对人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 凋亡和端粒酶表达的影响。方法 体外培养人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞, 将 SH-SY5Y 细胞随机分为对照组和 ISA 不同浓度 (0, 100, 200, 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理组, 采用 Hoechst 33258 荧光染色和琼脂糖凝胶电泳分析细胞凋亡; 采用 Western blot 检测凋亡抑制基因 bcl-2, 凋亡基因 bax 蛋白表达的变化; 采用 RT-PCR 检测加药后 SH-SY5Y bcl-2, bax 及端粒酶逆转录酶 (hTERT) mRNA 表达水平的变化。结果 100, 200, 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后, 荧光染色可观察到明显的细胞凋亡的核浓缩、核碎裂形态; bcl-2 mRNA 及蛋白表达逐渐减少 ( $P < 0.05$ ), 各组间比较差别有统计学意义; bax mRNA 及蛋白表达水平未见变化 ( $P > 0.05$ ); hTERT mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), 各组间差异比较有统计学意义; 200, 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h, 琼脂糖凝胶电泳可见 DNA 梯带。结论 2,3-吡啶酮可能通过下调 bcl-2 和 hTERT 表达诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, 并在一定浓度范围内呈浓度依赖关系。

**关键词:** 2,3-吡啶酮; SH-SY5Y; bcl-2; bax; 端粒酶逆转录酶; Hoechst

2,3-吡啶酮 (2,3-dioxoindoline, ISA) 系天然存在于自然界的吡啶类化合物, 是维持龙虾生存所必需的海洋活性物质, 既具有抗生素的活性, 又具有抗自由基抗癌和保护正常细胞活性。近年来多项研究显示, 2,3-吡啶酮具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[1,2]</sup>, 而对正常细胞无明显的毒副作用, 但其分子机制尚不完全清楚。本实验选用人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞进行体外培养, 用不同浓度 2,3-吡啶酮处理后, 观察 2,3-吡啶酮对人神经母细胞瘤的促进凋亡作用, 并从凋亡调节基因及端粒酶表达水平的变化探讨其可能的作用机制, 从而为临床应用 2,3-吡啶酮治疗人神经母细胞瘤提供理论和实验依据。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 2,3-吡啶酮购于上海元吉化工有限公司; DNA 抽提试剂盒购于碧云天公司; bcl-2, bax 和  $\beta$ -actin 的抗体购于北京博奥森公司; ECL 发光试剂购于北京普利莱公司; RT-PCR 检测试剂盒购于日本 TOYOBO 公司; 引物由上海生工合成。

**1.2 细胞培养** SH-SY5Y 细胞株购自中国协和基础学院细胞中心, 用含 15% 胎牛血清 (天津灏洋产品)、青霉素 ( $10^8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ )、链霉素 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 DMEM 培养基 (Gibco 公司产品), 在 5%  $\text{CO}_2$ 、37 饱和湿度条件下培养。

收稿日期: 2006-10-25, 修回日期: 2007-01-28

基金项目: 山东省科技厅资助项目 (No 02-01-kchhh-42)

作者简介: 王娜 (1980-), 女, 硕士, 研究方向: 肿瘤药理学, Tel: 0532-83812413, E-mail: puplerain0925@sina.com;  
侯琳 (1962-), 女, 博士生, 教授, 肿瘤药理学, 通讯作者, Tel: 0532-82722993, E-mail: qingyi001@126.com;  
岳旺 (1954-), 男, 教授, 博士生导师, 通讯作者, Tel: 0532-83812449, E-mail: yuew777@yahoo.com.cn

of ADM to cells was determined by MTT assay. The intracellular concentration of ADM was detected by HPLC. The expression of P-glycoprotein (P-gp) was examined by flow cytometric (FCM). **Results** The maximum non-toxic dose Cino ( $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) increased the sensitivity of ADM in MCF-7/ADM, decreased the  $\text{IC}_{50}$  of ADM in MCF-7/ADM from  $38.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $12.93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and significantly increased the intracellular concentration of ADM in MCF-7/ADM and re-

duced the expression of P-glycoprotein. **Conclusion** The results showed that Cino can partially reverse multidrug resistance (MDR) of MCF-7/ADM cells and the mechanism might be associated with the increase of intracellular accumulation of ADM and the reduced expression of P-glycoprotein (P-gp) in MCF-7/ADM cells

**Key words:** cinobufacine; MCF-7/ADM; adriamycin; multidrug resistance

**1.3 荧光染色** 将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞消化后,调节细胞浓度为  $5 \times 10^7$  个  $\cdot L^{-1}$  接种于 6 孔板中,同时放入包被了多聚赖氨酸的盖玻片。37、5% (体积分数)  $CO_2$  条件下孵育 24 h 后换新培养液,并加入 2,3 吡啶醌,使其终浓度分别为 0、100、200、400  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ,继续培养 48 h 后取出培养板后弃培养基,用甲醇-冰醋酸 (3:1) 在 4 固定 5 min,磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗,终浓度  $5 mg \cdot L^{-1}$  的 Hoechst 33258 避光染色 10 min, PBS 漂洗后封片,荧光显微镜观察。每个实验重复 3 次。

**1.4 琼脂糖凝胶电泳** 将对数生长期的细胞消化后以  $1 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$  的密度接种于培养瓶,分别用 0、100、200、400  $\mu mol \cdot L^{-1}$  ISA 处理 48 h,将各组细胞收集于 1.5 ml Eppendorf 管中,用 PBS 洗涤 3 次后,采用碧云天提供的 DNA Ladder 抽提试剂盒提取 DNA,取 5  $\mu l$  DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (75 V, 60 min), EB 染色后,凝胶成像系统照相。每个实验重复 3 次。

**1.5 蛋白提取及 Western blot** 将对数生长期的细胞消化后以  $1 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$  的密度接种于培养瓶中,贴壁后分别用 0、100、200、400  $\mu mol \cdot L^{-1}$  2,3 吡啶醌处理 48 h,4 收集细胞, PBS 洗涤 2 次后,每孔加入 100  $\mu l$  细胞裂解液 (50 mmol  $\cdot L^{-1}$  Tris-HCl, 150 mmol  $\cdot L^{-1}$  NaCl, 5 mmol  $\cdot L^{-1}$  EDTA, pH 8.0, 1% NP40, 0.05% RSMF, 2 mg  $\cdot L^{-1}$  Aprotinin, 0.5 mg  $\cdot L^{-1}$  Leupeptin), 4 12 000  $\times g$  离心 5 min,收集上清液,紫外分光光度法测定蛋白质浓度。蛋白质样品与上样 buffer 按 4:1 混匀,煮沸 5 min。每孔上样 50  $\mu g$ , 12.0% SDS-PAGE 分离样品。于室温 30 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,将膜与溶于封闭液中的一抗 (兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体 1:200; 兔抗人 Bax 单克隆抗体 1:200) 室温孵育 2 h, TBST 洗 15 min  $\times 3$  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 1 h, TBST 洗 15 min  $\times 4$  次,将膜装入可热密封的塑料袋中,加入 ECL 试剂,暗室曝光,显影,定影,对 X 光底片拍照,永久保存并对结果进行光密度分析。每个实验重复 3 次。

**1.6 RT-PCR** 将对数生长期的细胞消化后以  $10^9$  个  $\cdot L^{-1}$  的密度接种于培养瓶,贴壁后分别用 0、100、200、400  $\mu mol \cdot L^{-1}$  ISA 处理 48 h,将各组细胞收集于 1.5 ml Eppendorf 管中,用 PBS 洗涤 3 次后,采用天泽基因公司的总 RNA 提取试剂盒,按操作程序提取总 RNA,采用 TOYOBO 公司的逆转录试剂

盒,按其操作程序逆转录合成 cDNA,按如下引物和条件在 PCR 仪上行 PCR 扩增,引物按参考文献<sup>[3,4]</sup>由上海生工合成。hTERT 扩增引物为:上游:5'-CGGAAGAGTGCTCTGGAGCAA-3',下游:5'-GGATGAA-GCGGAGTCTGGA-3',扩增片断长度 145 bp; GAPDH 扩增引物为:上游:5'-ACCACAGTCCA TGCCA TCAC-3',下游:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGGTA-3',扩增片断长度 450 bp,扩增条件:94 预变性 2 min, 35 个循环, 94、5 min, 60、30 s, 72、60 s, 最后一个循环后 72 延伸 10 min。Bcl-2 扩增引物为:上游:5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3',下游:5'-CCGCA TGCTGGGGCCGTACAGTTC-3'; bax 扩增引物为:上游:5'-TCCACCAAGAA GCTGAGCGAG-3',下游:5'-GTCCAG CCCATGATGGTCT-3'; GAPDH 扩增引物为:上游:5'-CGTGGAAGGACTCATGAC-CA-3',下游:5'-TCCAGGGGICTTACTCTTG-3',片段长度分别为 318 bp, 257 bp 和 512 bp, PCR 反应条件依据文献<sup>[5]</sup>并加以改进,具体条件为: bcl-2: 94 5 min, 94 45 s, 64 45 s, 72 2 min, 35 个循环, 最后 72 延伸 7 min。 bax: 94 7 min, 94 1 min, 60 45 s, 72 45 s, 35 个循环, 最后 72 延伸 10 min。内参照用上述几个条件均可。PCR 产物电泳:取 PCR 反应产物 5  $\mu l$ , 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,对照分子量标准检测扩增结果。凝胶紫外摄影系统中照相并运用天能分析软件对条带进行光密度扫描,检测各组 PCR 产物与其对应的内参 GAPDH mRNA PCR 产物 A 值,然后将  $A_{hTERT} / A_{GAPDH}$ 、 $A_{bcl-2} / A_{GAPDH}$ 、 $A_{bax} / A_{GAPDH}$  的比值进行统计分析。每个实验重复 3 次。

**1.7 统计学分析** 实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,对照组和处理组间差异采用 SPSS12.0 for Windows 统计软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 Hoechst 33258 荧光染色结果** ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h,在荧光显微镜下,经紫外光激发,可见典型的凋亡形态学改变:核染色质聚集、核碎裂、胞质浓缩 (B)。而正常对照组细胞核呈均匀的蓝色荧光 (A)。

**2.2 琼脂糖凝胶电泳结果** 见 Fig 2。Fig 2 可见正常对照组仅见离点样孔不远的基因组 DNA,而 200、400  $\mu mol \cdot L^{-1}$  ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 可见清晰的 DNA 梯带。

**2.3 Western blot 结果** 如 Fig 3 所示,用 0、100、200、400  $\mu mol \cdot L^{-1}$  的 2,3 吡啶醌处理 SH-SY5Y 细胞 48 h,对照组细胞表达一定量的 Bcl-2 蛋白,随着

Tab 1 The effects of ISA on the gene expression of hTERT bcl-2 and bax of SH-SY5Y cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Group	hTERT mRNA (ratio)	bcl-2 mRNA (ratio)	bax mRNA (ratio)
Control	0.5343 $\pm$ 0.0268	1.0143 $\pm$ 0.0017	0.5551 $\pm$ 0.0002
ISA 100 $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.2415 $\pm$ 0.0202*	0.9380 $\pm$ 0.0047*	0.5587 $\pm$ 0.0052
ISA 200 $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.1836 $\pm$ 0.0096*	0.7071 $\pm$ 0.0007*	0.5562 $\pm$ 0.0014
ISA 400 $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.1092 $\pm$ 0.0048*	0.5928 $\pm$ 0.0007*	0.5552 $\pm$ 0.0032

\*  $P < 0.05$  vs control

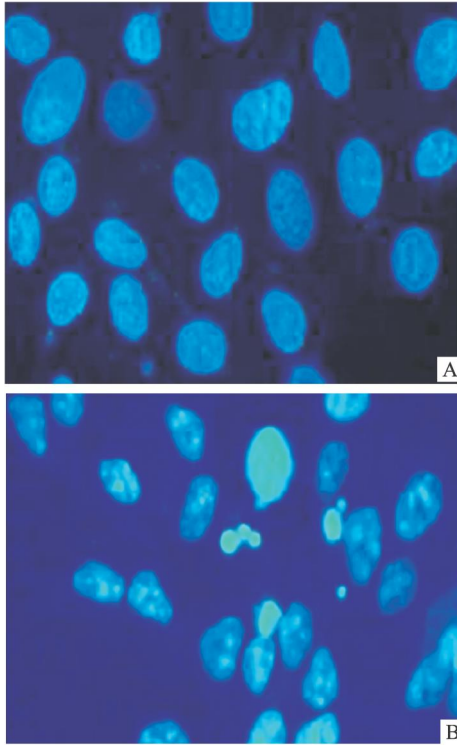


Fig 1 Cytomorphological changes of SH-SY5Y cells

A: Control; B: ISA effected ( $n=3$ )

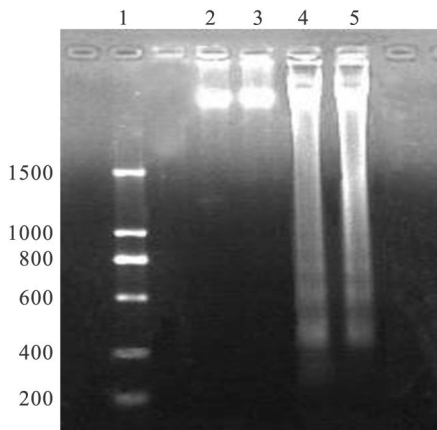


Fig 2 DNA ladder assay of different groups

1: Marker; 2: Control; 3: ISA 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; 4: ISA 200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; 5: ISA 400  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ( $n=3$ )

ISA浓度的增大, Bcl-2蛋白表达量逐渐减少, 用药组与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而2,3-吡啶酮对 Bax蛋白表达没有明显影响, 说明随

着药物浓度的增加, Bax的蛋白表达无明显变化 ( $P > 0.05$ )。

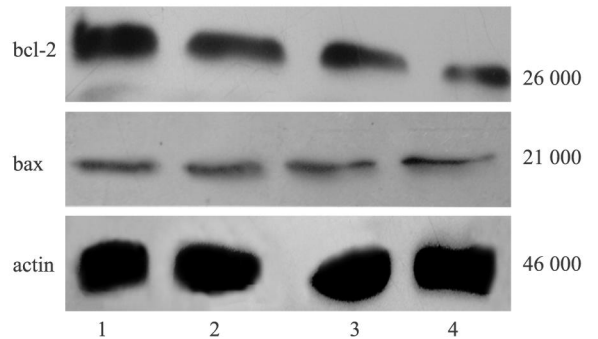
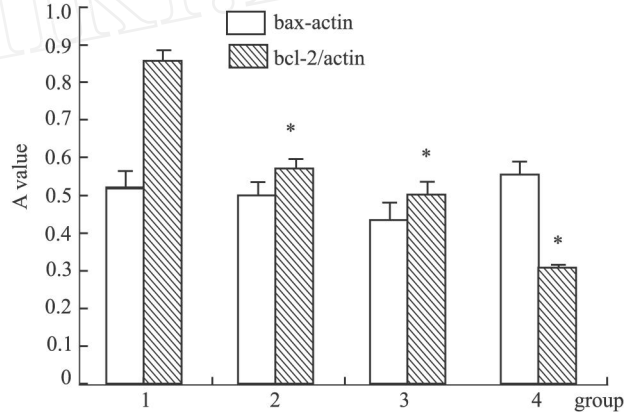


Fig 3 Effects of ISA on expression of bcl-2 and bax protein in SH-SY5Y cells for 48 h

1: Control; 2: ISA 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; 3: ISA 200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; 4: ISA 400  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. \*  $P < 0.05$  vs control

2.4 RT-PCR结果 用 0, 100, 200, 400  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 2,3-吡啶酮作用于 SH-SY5Y细胞 48 h后 端粒酶 hTERT mRNA 和 bcl-2 mRNA 表达水平随浓度增大而开始下降, 条带亮度减弱 ( $P < 0.05$ )。但对 bax 基因的 mRNA 表达水平无明显影响 ( $P > 0.05$ )。见 Fig 4, Tab 1。

### 3 讨论

神经母细胞瘤在儿童恶性实体瘤的发病率中占第 2 位, 转移早、恶性程度高, 目前临床治疗主要是手术治疗加辅助化疗, 但完全缓解率和长期无病生存率很低, 因此, 寻找新的药物对改善 NB 患儿预后具有重要临床意义。2,3-吡啶酮是一种天然的化学

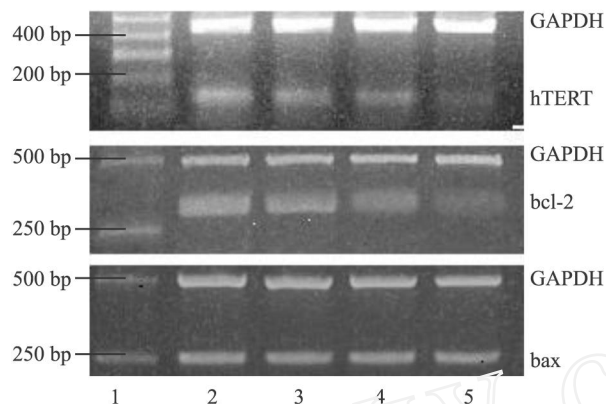


Fig 4 The effects of ISA on the gene expression of hTERT bcl-2 and bax of SH-SY5Y cells for 48 h

1: Marker; 2: Control; 3: ISA  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 4: ISA  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5: ISA  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

物质,近年有研究报道<sup>[1,2]</sup>, 2,3-吡啶酮可以抑制 N1E-115、BALB/c3T3、BBC、PC12、HL60和神经母细胞瘤的增殖,诱发凋亡,其具体的机制一直在研究中。本实验研究了与调控细胞凋亡密切相关的基因 bcl-2、bax mRNA和蛋白的表达以及端粒酶逆转录酶 hTERT mRNA的表达。

Bcl-2是研究最为深入的一个抗凋亡蛋白,其可在各种细胞类型中发挥作用。bax基因、bcl-2基因均属于原癌基因 bcl-2基因家族。其中 bax促进细胞凋亡;而 bcl-2能抑制细胞凋亡。bcl-2抑制细胞凋亡作用机制可能是通过以下几个途径:抑制氧自由基;抑制细胞内细胞器的  $\text{Ca}^{2+}$  内流;阻止 p53诱导的凋亡和生长停止;拮抗原癌基因 c-myc作用。目前普遍认为,bax基因的表达并不立即导致细胞凋亡,而是仅在细胞接受死亡信号之后 bax才可以开始发挥作用,通过抑制 bcl-2的作用而导致细胞凋亡。Oltvai等<sup>[6]</sup>研究发现细胞凋亡的发生与 bcl-2/bax比值有关,比值高,细胞存活率高,比值低,则细胞凋亡率高。本实验研究发现:用不同浓度 2,3-吡啶酮 ( $0, 100, 200, 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 SHSY5Y细胞 48 h后,bcl-2 mRNA和蛋白量随浓度增高表达减少,而且正常对照组与加药组之间差异有统计学意义;而 bax mRNA和蛋白表达量未见明显变化,bcl-2/bax比值降低,细胞凋亡率高,此外细胞凋亡程度也可以通过荧光染色和琼脂糖凝胶的结果看出,因此 2,3-吡啶酮可能通过下调 bcl-2基因的表达来达到诱导细胞凋亡的作用。

端粒酶有在多种恶性肿瘤中激活并维持细胞无限增殖的能力。端粒酶活性阳性表达与肿瘤的发生发展、分化程度等密切相关。端粒酶是一种特殊的

逆转录酶,有文章报道<sup>[7]</sup>神经母细胞瘤中端粒酶的活性强,而端粒酶一个重要的作用就是维持了端粒的长度而使细胞永生或成为癌细胞。它的活性可以通过调控端粒酶的 RNA成分或(和)蛋白质成分来实现,对端粒酶活性起调控作用的是蛋白组分,其中 hTERT为催化亚单位,作用最为重要<sup>[8]</sup>,其异常激活可使端粒酶活性增强。许多转录因子如 c-myc, p53等,通过调节 hTERT转录水平从而调节端粒酶活性<sup>[9]</sup>。本实验通过 RT-PCR发现用 2,3-吡啶酮 ( $0, 100, 200, 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 SH-SY5Y细胞 48 h后可见端粒酶 hTERT mRNA表达减弱,并与药物浓度呈一定的量效关系。提示 2,3-吡啶酮可能是一种有效的端粒酶活性抑制剂。肿瘤细胞端粒酶活性受抑后,端粒继续缩短,则可直接导致肿瘤细胞死亡。

端粒酶 hTERT mRNA表达下降的同时伴随着细胞凋亡的增加,提示端粒酶表达可能与细胞凋亡有一定联系。目前关于肿瘤细胞端粒酶与细胞凋亡的关系有两种观点。大多数学者认为,肿瘤细胞端粒酶调控与凋亡调控有相互关系。端粒酶活性与端粒长度的稳定可以增加细胞抗凋亡的能力。端粒酶活性下调先于凋亡信号的改变,提示端粒酶可能有调控凋亡的作用。端粒酶调控与凋亡调控可能在空间和时间上存在密切的联系,端粒酶活性改变可能是激发细胞凋亡机制之一。相反的观点是端粒酶调控与凋亡调控无关。本实验中用不同浓度 2,3-吡啶酮 ( $0, 100, 200, 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理细胞后随着凋亡的增加端粒酶的表达呈下降趋势。由上推测,端粒酶调控、凋亡调控可能构成更为复杂的网络调控系统,这些相互关系如何?不同类型细胞的调控机制是否一样?这些相互关系是否受不同药物作用的影响?这些问题的解决对解释以上不同观点及深入探索凋亡启动信号可能具有重要意义。我们的实验只观察了 2,3-吡啶酮对端粒酶 hTERT mRNA水平的改变,2,3-吡啶酮是否在蛋白水平影响端粒酶尚有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Agne's C, Marie-Claude T, Denis B, et al The endogenous oxindoles 5-Hydroxyoxindole and isatin are antiproliferative and proapoptotic[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(1): 379-84.
- [2] Igosheva N, Lorz C, O'Conner E, et al Isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, triggers a dose- and time-dependent switch from apoptosis to necrosis in human neuroblastoma cells [J]. *Neurochem Int*, 2005, 47(3): 216-24.

- [3] 朱忠超,刘志苏,艾中立,孙 权. 表没食子儿茶素没食子酸酯对肝癌细胞端粒酶逆转录酶和 c-myc 基因表达的调控作用[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22 (6): 683 - 5.
- [3] Zhu Z C, Liu Z S, Ai Z L, Sun Q. Regulatory effect of telomerase reverse transcriptase and c-myc expression of hepatoma cells by (-) epigallocatechin-3-gallate[J]. *Chin J Exp Surg*, 2005, 22 (6): 683 - 5.
- [4] 秦成坤,张启华,徐 健,刘素侠. 肝癌组织端粒酶逆转录酶 hTERT 基因及 GGT mRNA-H 亚型表达与肝癌早期诊断的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2005, 8 (3): 151 - 3.
- [4] Qin C K, Zhang Q H, Xu J, Liu S X. Clinical impact of telomerase reverse transcriptase and the subtype of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase messenger RNA-H on early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Chin Curr Adv Gener Surg*, 2005, 8 (3): 151 - 3.
- [5] 张桂英,段晓明,袁伟建. 吡喹酮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 - 8.
- [5] Zhang G Y, Duan X M, Yuan W J. Study of apoptosis induced by indomethacin in colon cancer[J]. *Chin J Digest*, 2000, 20 (4): 267 - 8.
- [6] Oltrai 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*, 1993, 74 (4): 609 - 19.
- [7] 刁恩英,阎晓辉. 端粒、端粒酶与肿瘤[J]. 中国城乡企业卫生, 2005, 3: 19.
- [7] Diao E Y, Yan X H. Telomerase, telomeres and cancer[J]. *Chin J Urban Ind Hyg*, 2005, 3: 19.
- [8] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. *Cell*, 1997, 90 (4): 785 - 95.
- [9] 周咏明,薛克营,陈艳红,刘 隽. 曲古菌素 A 抑制 HL260 细胞端粒酶活性及亚单位 hTERT 的表达并诱导凋亡[J]. 中国药理学通报, 2006, 22 (2): 171 - 4.
- [9] Zhou Y M, Xue K Y, Chen Y H, Liu J. Inhibitive effects of trichostatin A on telomerase activity of HL-60 cells and expression of subunit hTERT during apoptosis[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, 22 (2): 171 - 4.

## Effect of 2, 3-dioxindoline on apoptosis and human telomerase reverse transcriptase mRNA in SH-SY5Y cells

WANG Na, HOU Lin, ZHU Zhao-yi, ZHANG Jin-yu, JU Chuan-xia, GE Yin-lin, YUE Wang

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong 266021, China)

**Abstract:** **Aim** To investigate the effect of 2, 3-dioxindoline on apoptosis and human telomerase reverse transcriptase mRNA in SH-SY5Y cells. **Methods** Change of nucleolus stained with Hoechst 33258 was observed under fluorescent microscope; DNA fragment was observed with agarose gel electrophoresis; the expression levels of bcl-2 and bax protein were analyzed by Western blotting; the levels of hTERT mRNA, bcl-2 mRNA and bax mRNA were examined by RT-PCR. **Results** After cells were treated with ISA of different concentrations (0, 100, 200, 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 48 h, Hoechst 33258 staining demonstrated apoptotic and normal cells. DNA ladder was found in cells treated with 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ISA by agar-

ose gel electrophoresis. The expressions of bcl-2 protein and mRNA were decreased as compared with that of the control ( $P < 0.05$ ). However, the expressions of bax protein and mRNA kept constant ( $P > 0.05$ ); and the expression level of hTERT mRNA, the key subunit of telomerase, decreased after 2, 3-dioxindoline treatment compared with that of the control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** 2, 3-dioxindoline induces apoptosis of SH-SY5Y cells in a dose-dependent manner, which possibly results from the decreased expression of bcl-2 and hTERT.

**Key words:** 2, 3-dioxindoline; SH-SY5Y; bcl-2; bax; human telomerase reverse transcriptase; Hoechst

《中国药理学通报》投稿信箱: zgylxb8@163.com, 投稿后会自动回复给您《论文投送调查表》; 修回稿信箱: zgylxb88@163.com, 请在主题中写清作者姓名和稿号, 不要重复发。稿件查询信箱: zgylxb@163.com。