文章编号:1000-5404(2007)05-0393-03

论著

细胞外信号调节激酶抑制剂协同蟾蜍灵诱导 K562 细胞凋亡

王　甦,张晓晶,刘云鹏,侯科佐,罗　颖,刘世洲　(中国医科大学附属第一医院肿瘤内科,沈阳 110001)

提　要:目的　观察细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)抑制剂 PD98059 与蟾蜍灵(bufalin)协同诱导 K562 细胞凋亡作用并探讨其分子机制。**方法**　采用台盼蓝拒染法测定细胞增殖活力;采用形态学观察和流式细胞仪检测细胞凋亡;Western blot 方法检测 bcl-2 蛋白表达。**结果**　25～100 μmol/L 的 PD98059 与蟾蜍灵单独或联合应用可抑制 K562 细胞增殖,并诱导细胞凋亡,在此过程中下调 bcl-2 蛋白表达,且二者具有协同作用。**结论**　PD98059 协同蟾蜍灵诱导 K562 细胞凋亡,其机制可能与下调 bcl-2 蛋白表达有关。

关键词: 细胞外信号调节激酶;白血病;蟾蜍灵
中图法分类号: R282.74; R345; R733.7　　**文献标识码:** A

ERK inhibitor synergistic with bufalin induces K562 cells' apoptosis

WANG Su, ZHANG Xiao-jing, LIU Yun-peng, HOU Ke-zuo, LUO Ying, LIU Shi-zhou (Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective　To observe the synergistic effects of extracellular signal regulated kinase (ERK) inhibitor PD98059 and bufalin on the apoptosis of K562 cells. **Methods**　The percentage of viable cells was determined by trypan blue exclusion. Cell apoptosis was examined by morphology and flow cytometry, and the bcl-2 protein was measured by western blot analysis. **Results**　ERK inhibitor alone inhibited the proliferation of cells, downregulated bcl-2 protein and induced apoptosis of K562 cells; bufalin was proved to have synergistic effect on the PD98059-induced apoptosis, and downregulated bcl-2 protein markedly. **Conclusion**　PD98059 has synergistic effect with bufalin to induce the apoptosis of K562 cells, probably by the mechanism of bcl-2 protein downregulation.

Key words: mitogen-activated protein kinases; leukemia; bufalin

细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导家族中的成员,参与多种细胞事件如细胞增殖、凋亡和分化等过程的调控,在多数急性髓性白血病患者中该途径常被激活,并促进白血病细胞增殖[1]。最近研究表明,ERK 特异抑制剂可选择性诱导白血病细胞凋亡,并能够协同某些药物诱导肿瘤细胞凋亡,而对骨髓正常造血干/祖细胞无抑制作用[2,3]。蟾蜍灵为中药"蟾酥"中的活性成分,能诱导白血病细胞凋亡[4,5]。本研究以人类白血病 K562 细胞系为模型,观察 ERK 抑制剂 PD98059 与蟾蜍灵在诱导细胞凋亡过程中的协同作用,并探讨其机制。

1　材料与方法

1.1　实验材料

RPMI1640 和 Trizol 购于 Gibco 公司;鼠抗人 bcl-2 单克隆抗体和碱性磷酸酶标记的马抗鼠 IgG 抗体均购于北京中山生物技术有限公司;NBT/BCIP 显色试剂盒和 RT-PCR 试剂盒均购于华美生物技术有限公司;蟾蜍灵(bufalin)购于 Sigma 公司,按说明书用无水乙醇溶解配制; PD98059 购于 Promega 公司,按说明书用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制。

1.2　细胞系来源及培养条件

人白血病细胞株 K562 由 Ueda 教授提供(日本 Fukui Medical University),细胞生长于含 10% 灭活胎牛血清,12 U/ml 庆大霉素的 RPMI1640 培养液中,置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱内传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.3　细胞生长抑制的检测

将对数生长期的 K562 细胞浓度调至 1×10^5 个/ml, 接种于 24 孔培养板中,蟾蜍灵以终浓度 0.25、0.5 μmol/L,PD98059 以终浓度 25、50、100 μmol/L 分别单独或联合加入培养体系中,以不加任何处理因素的 K562 细胞作为对照组,每组药物浓

基金项目:辽宁省自然科学基金(20022077);辽宁省教育厅基金(20122152)
Supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (20022077) and the Foundation of Education Department of Liaoning Province (20122152)

作者简介:王　甦(1964－),女,辽宁省锦州市人,博士研究生,副主任医师,主要从事白血病治疗及白血病细胞分化和凋亡信号转导机制方面的研究。电话:(024)83282312
通讯作者:刘云鹏,电话:(024)83282312,E-mail:Liuyunpeng@csco.org.cn

收稿日期:2006-04-05;修回日期:2006-08-31

度设3个平行孔，培养后即刻定为第1天，第1、2、3天各取样进行台盼蓝染色，光镜下计数活细胞数。

1.4 形态学观察

实验设对照组（不加任何处理因素的K562细胞）、蟾蜍灵作用组（BU1：0.25 μmol/L蟾蜍灵；BU2：0.5 μmol/L蟾蜍灵）、PD98059作用组（PD1：25 μmol/L PD98059；PD2：50 μmol/L PD98059；PD3：100 μmol/L PD98059），不同浓度的PD98059与蟾蜍灵共同作用组（即PD98059与细胞孵育1 h后再加入蟾蜍灵）。将上述各组细胞制成细胞涂片，Wright-Giemsa染色，光镜下观察细胞形态改变。

1.5 流式细胞术分析细胞周期

实验分组同上。收集细胞，用体积分数为70% 的乙醇固定24 h以上，检测前PBS洗2次，加RNase（100 mg/L）50 μl，37 ℃孵育30 min，再加入碘化丙啶（50 mg/L）500 μl，4 ℃避光染色30 min，进行流式细胞仪检测，CELLQuest软件进行细胞周期分析。

1.6 Western blot检测bcl-2蛋白表达

实验分组同上。收集2×10^7个细胞，裂解于含有1 mmol/L的蛋白酶抑制剂PMSF和2 μg/ml的Aprotinin的RIPA裂解液中（含0.1% 的SDS，1% 的脱氧胆酸钠，1% Triton-100，150 mmol/L的NaCl，1 mmol/L的EDTA，10 mmol/L的Tris-HCl），冰浴下超声粉碎后，4 ℃裂解40 min，以10 000×g、4 ℃、离心20 min，取上清，Lowry法测蛋白浓度。提取的蛋白质样品经变性、电泳、转膜及封闭后，加入一抗，二抗，NBT/BCIP显色，GDS8000成像分析仪分析图像。

1.7 统计学分析

结果以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 PD98059协同蟾蜍灵抑制K562细胞生长

25、50、100 μmol/L的PD98059单独处理和0.25、0.5 μmol/L蟾蜍灵单独处理细胞0～72 h皆可抑制K562细胞生长；50、100 μmol/L的PD98059与蟾蜍灵合用时具有协同抑制作用（$P<0.05$），其中以50 μmol/L PD98059的协同作用最明显（表1）。

表1 PD98059协同蟾蜍灵抑制K562细胞增殖[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
PD1	3.9±0.4	6.2±1.1	10.4±0.9
PD2	5.5±1.9	8.5±0.8	13.8±2.1
PD3	8.0±3.4	11.0±6.5	15.0±4.3
BU1	21.5±10.4	45.0±9.4	65.5±8.9
PD1+BU1	22.5±7.6	48.0±12.9	68.0±6.5
PD2+BU1	50.0±4.4[a]	65.0±3.9[a]	85.5±25.8[a]
PD3+BU1	52.5±16.4[a]	68.5±15.3[a]	88.0±20.4[a]
BU2	55.0±14.1	85.0±19.8	96.5±24.5
PD1+BU2	55.5±11.6	88.0±10.4	96.0±23.5
PD2+BU2	72.0±14.4[b]	95.0±23.9[b]	99.5±20.4[b]
PD3+BU2	70.0±15.3[b]	96.5±25.8[b]	100.0±26.7[b]

a：$P<0.05$，与BU1组比较；b：$P<0.05$，与BU2组比较

2.2 PD98059协同蟾蜍灵诱导K562细胞凋亡

25 μmol/L PD98059和0.25 μmol/L蟾蜍灵单独处理K562细胞0～72 h，未见明显细胞凋亡。50、100 μmol/L的PD98059处理细胞24 h时可见凋亡；0.5 μmol/L的蟾蜍灵处理随着作用时间的延长，凋亡率增加。当50、100 μmol/L PD98059与之合用时，细胞凋亡率明显增加（$P<0.05$）。值得一提的是，当50、100 μmol/L PD98059与0.25 μmol/L蟾蜍灵合用时，明显促进细胞凋亡（$P<0.05$）（表2）。

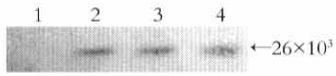
表2 PD98059协同蟾蜍灵诱导K562细胞凋亡[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
对照组	2.5±0.9	3.2±1.1	5.0±2.3
PD1	3.0±1.4	3.5±1.9	7.5±1.4
PD2	5.8±2.1	8.0±3.6	10.5±2.9
PD3	7.0±1.3	10.2±2.9	14.0±5.6
BU1	3.5±0.6	4.2±0.4	6.0±1.3
PD1+BU1	3.0±0.5	5.5±1.4	7.2±2.4
PD2+BU1	9.0±6.9[a]	15.5±10.9[a]	24.0±14.4[a]
PD3+BU1	10.0±7.5	14.0±6.4	28.0±10.5
BU2	18.0±3.4	32.5±11.5	55.0±21.5
PD1+BU2	17.0±11.3	35.0±15.6	56.0±20.9
PD2+BU2	31.5±15.5[b]	48.0±22.6[b]	72.0±24.5[b]
PD3+BU2	32.0±11.4	50.0±10.9	75.0±28.3

a：$P<0.05$，与BU1组比较；b：$P<0.05$，与BU2组比较

2.3 PD98059协同蟾蜍灵下调bcl-2蛋白表达

25 μmol/L的PD98059和0.25 μmol/L蟾蜍灵单独处理K562细胞0～72 h，bcl-2蛋白表达未见明显下调。而诱导凋亡浓度的PD98059和蟾蜍灵单独应用时可下调bcl-2蛋白表达，当二者合用时bcl-2蛋白表达的下调更明显（图1）。



1：PD2+BU2组；2：BU2组；3：PD2组；4：对照组

图1 PD98059与蟾蜍灵分别和协同处理K562细胞24 h后bcl-2蛋白表达

3 讨论

MAPKs信号转导系统包括ERK、JNK（C-JUN氨基末端激酶，c-jun N-terminal kinases）和p38丝裂原激活蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinases）3个主要成员。该信号系统是细胞外信号引起核反应的细胞信息传递的共同通路，是一族细胞内广泛分布的含有丝氨酸/苏氨酸残基的蛋白激酶，多种细胞外刺激（应激、细胞因子及某些药物等）或是通过G蛋白偶联受体或是通过酪氨酸蛋白激酶的活化，均可将信号传至细胞内，引起MAPKs系统激酶连锁磷酸化，最终通过调节转录因子，参与转录和翻译，调控多种细胞事件如细胞增殖、分化和凋亡的进程。ERK信号主要参与细胞增

殖的调控,JNK 和 p38 主要参与应激事件的调控。

K562 细胞由于存在 t(9;22) 易位而形成具有酪氨酸激酶活性的 bcr/abl 蛋白,导致其下游信号 Ras→Raf1→MEK→ERK 被构建性激活,是 K562 细胞耐受凋亡的主要原因,阻断或抑制该途径可诱导 K562 细胞凋亡[6-8]。我们研究发现,ERK 抑制剂 PD98059 能抑制 K562 细胞增殖,并诱导细胞凋亡。最近研究表明,ERK 特异抑制剂可协同某些药物诱导肿瘤细胞凋亡[2,3],我们也观察到 PD98059 与蟾蜍灵在抑制 K562 细胞增殖和诱导细胞凋亡方面具有协同作用。

为了探讨 PD98059 与蟾蜍灵协同作用的分子机制,我们检测了 bcl-2 蛋白表达情况。研究表明,bcr/abl 蛋白抗凋亡机制与 bcl-2 蛋白有关,bcl-2 作为 Ras 的下游分子,由于 Ras 的激活而被诱导表达,从而发挥抗凋亡作用[9]。我们的实验结果表明,蟾蜍灵在诱导 K562 细胞凋亡过程中下调 bcl-2 蛋白表达,这与 Masuda 等[4] 报道的结果相似。同时,我们还观察到 PD98059 与蟾蜍灵合用时,bcl-2 蛋白的下调更明显,推测二者协同作用的机制可能与 bcl-2 蛋白的下调有关。

参考文献:

[1] Milella M, Kornblau S M, Estrov Z, *et al*. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia [J]. J Clin Invest, 2001, 108(6): 851-859.

[2] Lunghi P, Tabilio A, Dall'Aglio P P, *et al*. Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukemia blasts[J]. Leukemia, 2003, 17(9): 1783-1793.

[3] Sebolt-Leopold J S, Dudley D T, Herrera R, *et al*. Blockade of the MAP Kinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 810-816.

[4] Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, *et al*. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells[J]. Leuk Res, 1995, 19(8): 549-556.

[5] 刘云鹏,曲秀娟,王萍萍,等. 蟾蜍灵诱导 K562 细胞分化和凋亡过程中 WT1 表达的下调[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(7): 356-359.

[6] Woessmann W, Mivechi N F. Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells[J]. Exp Cell Res, 2001, 264(2): 193-200.

[7] Kang C D, Yoo S D, Hwang B W, *et al*. The Inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells[J]. Leuk Res, 2000, 24(6): 527-534.

[8] Cortez D, Stoica G, Pierce J H, *et al*. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway[J]. Oncogene, 1996, 13(12): 2589-2594.

[9] Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras [J]. J Mol Biol, 1997, 267(2): 225-228.

(编辑　薛国文)

(上接 383 页)

3　讨论

实验模型的研究结果显示:周围神经损害能激发和保持中枢敏感化,可能解释 TN 的发病机制。伽玛刀治疗 TN 的确切机制尚未明确,因为多数患者术后三叉神经的功能依然存在,所以推测可能与放射后造成神经突触间传导阻滞而未造成神经元损伤有关。具有创伤小、定位精确、有效率高、安全性高、术后无不良反应、并发症极少等优点。伽玛刀治疗需注意以下几点:(1)照射靶点的选择:Lindquist 等[2] 选择三叉神经感觉根桥脑进入区作为照射靶点,有效率提高到 86%~89%,且无任何并发症发生。由于可在 MRI 上直接辨识三叉神经感觉根近桥脑处,这就大大提高了疗效[1,3,4]。故三叉神经根是伽玛刀治疗的有效、安全和理想的靶点。本组均选择三叉神经根作为靶点,为能更好地提高疗效,本组在其近桥脑端设置 1 个靶点后,沿三叉神经走行在其远端增加 1 个靶点,有效率达到 92%,仅有 1 例患者出现面部感觉减退或麻木,疼痛缓解后的复发率为 8%,与文献[4]报道相符。采用伽玛刀双靶点治疗 TN[5],能否明显提高有效率,降低并发症发生率和疼痛复发率,还需进一步观察。(2)准确定位靶点:①消除人为误差:②MRI 定位:0.5T MRI 定位扫描,除行 T1 加权扫描外均加行 3D-SPGR 扫描,使三叉神经能清晰显示。伽玛刀的机械精确度高,误差小于 0.1 mm,为精确治疗提供了保证。(3)剂量选择:本组治疗 25 例患者,中心剂量为 75~85 Gy,有效率为 92%,疗效显著。

本组结果表明,伽玛刀双靶点治疗原发性三叉神经痛,因定位精确,有效率高,创伤小,并发症很少取得良好的疗效。当然采用双靶点治疗时其放射性生物学效应机制会有何变化,长期的效果如何,都有待进一步研究。

关键词:伽玛刀;双靶点治疗;三叉神经痛

中图法分类号:R745.11　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Zheng J G, Xu D S, Kang C S, *et al*. Stereotactic radiosurgery for primary trigeminal neuralgia using the Leksell Gamma unit[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 2001, 76(1): 29-35.

[2] Lindquist C, Kihlstrom L, Hellstrand E. Functional neurosurgery—a future for the Gamma Knife?[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 1991, 57(1-2): 72-81.

[3] 赵洪洋,章劳塘,赵沃华. 原发性三叉神经痛的伽玛刀双靶点治疗[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(4): 216-219.

[4] Cheuk A V, Chin L S, Petti J H, *et al*. Gamma knife surgery for trigeminal neuralgia: outcome, imaging, and brainstem correlates[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60(2): 537-541.

[5] Friedman D P, Morales R E, Goldman H W. Role of enhanced MRI in the follow-up of patients with medically refractory trigeminal neuralgia undergoing stereotactic radiosurgery using the gamma knife: initial experience[J]. J Comput Assist Tomogr, 2001, 25(5): 727-732.

(编辑　龙　亮)