论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1696-03

PD98059通过诱导PUMA表达增强肠癌LoVo细胞对奥沙利铂的敏感性

王新颖,宋卫兵,李 霆,姜 泊 (南方医科大学南方医院消化内科,广州 510515)

提 要:目的 体外实验探讨MEK1特异性抑制剂PD98059对奥沙利铂药物治疗作用的影响及PUMA在这一过程中的作用。**方法** MTT法检测转染MEK1 active质粒后及不同药物处理后对LoVo细胞增殖率的影响;Western blot检测奥沙利铂和/或PD98059处理后PUMA蛋白的表达和ERK的活性;利用表达反义PUMA基因的细胞克隆抑制PUMA的表达后检测对PD98059和奥沙利铂诱导凋亡作用的影响。**结果** 在肠癌LoVo细胞中,ERK的激活增加细胞的增殖率;奥沙利铂可以抑制ERK的活性,并呈剂量依赖关系;PD98059可以协同奥沙利铂抑制细胞增殖率的作用;奥沙利铂和PD98059可以协同诱导PUMA的表达;抑制PUMA的表达可以减弱奥沙利铂和PD98059诱导的LoVo细胞的凋亡。**结论** PD98059通过诱导PUMA表达增强肠癌LoVo细胞对奥沙利铂的敏感性。

关键词:奥沙利铂;PUMA;大肠癌;凋亡;PD98059

中图法分类号:R73-361;R735.34;R979.19 **文献标识码**:A

PD98059 enhancing the effects of oxaliplatin on colorectal cancer cells mediated by PUMA expression

WANG Xin-ying, SONG Wei-bing, LI Ting, JIANG Bo (Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of MEK1 specific inhibitor PD98059 on oxaliplatin-treated colorectal cancer cells and the potential mechanism. **Methods** Cell proliferation was assessed by MTT assay after transfecting MEK1 active plasmid into LoVo cells. LoVo cells were treated with oxaliplatin or PD98059, and the proliferation was assessed by MTT assay. PUMA expression and ERK activity were determined by Western blot. Apoptosis was assessed by Hoechst 33258 dye after PUMA expression was suppressed. **Results** Increasing activity of ERK enhanced the proliferation of LoVo cells. The activity of ERK was suppressed by oxaliplatin. PD98059 and oxaliplatin decreased the proliferation rate of LoVo cells synergistically. PUMA expression increased after PD98059 and oxaliplatin treatment. The suppression of PUMA expression by stably transfecting PUMA anti-sense vector decreased apoptosis induced by oxaliplatin and PD98059. **Conclusion** PD98059 enhances the effects of oxaliplatin on colorectal cancer cells mediated by PUMA expression.

Key words: oxaliplatin; PUMA; colon cancer; apoptosis; PD98059

细胞外信号调节激酶(extra-cellular signal-regulated kinase, ERK1/2)级联是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)通路中的重要成员,与细胞的增殖、分化、凋亡关系密切[1,2],但其在化疗药物诱导肠癌细胞凋亡过程中的作用尚存在争议。PUMA(p53 up-regulate modulator of apoptosis)是2001年由Nakano等[3]克隆出的Bcl-2家族新成员,受转录因子p53等的调控,在氧化应激、化疗药物等多种应激诱导的肿瘤细胞凋亡的过程中均具有重要作用[4]。我们之前的研究也表明其在奥沙利铂诱导肠癌细胞的凋亡过程中具有一定的作用。本研究旨在体外实验探讨MEK1特异性抑制剂PD98059对奥沙利铂治疗肠癌作用的影响并初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株、质粒及主要试剂

大肠癌LoVo细胞株为南方医院消化病研究所细胞培养室保存,稳定表达反义PUMA基因的细胞克隆LoVo puma$^{(-/-)}$细胞为我所所构建;MEK1 active质粒、pcDNA3.1 V5/His C空载体为香港大学Wo-Shing Au博士赠送;细胞培养试剂为Invitrogen公司产品;兔抗人磷酸化ERK、PUMA、actin多克隆抗体及

作者简介:王新颖(1973-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士研究生,主治医师,主要从事大肠癌信号传导机制方面的研究。电话:(020)61641530,E-mail:sunwingwxy@163.com

通讯作者:姜 泊,E-mail:drjiang@163.com

收稿日期:2006-10-08;修回日期:2007-03-29

Hoechst 33258、MTT、奥沙利铂、PD98059 均购自 Sigma 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞处理　实验分为无处理组，奥沙利铂处理 LoVo 细胞组，PD98059 处理 LoVo 细胞组，奥沙利铂和 PD98059 联合处理组。接种 LoVo 细胞于 6 孔板中，每孔约 5×10^5 个细胞，RPMI1640 培养液中含 10% 胎牛血清、无抗生素，待细胞贴壁后，给予无血清、无抗生素培养液 12 h 培养同步化后，予 0.6、1.2、2.4、4.8、8.4 μmol/L 的奥沙利铂处理，对照为无处理组。24 h 后提取细胞总蛋白，Western blot 检测磷酸化 ERK1/2 蛋白的表达，以总的 ERK 做为参照。PD98059（20 μmol/L）于奥沙利铂处理前 1 h 加入。

1.2.2　MEK1 active 质粒的体外瞬时转染　转染前将 LoVo 细胞接种于含 10% 胎牛血清、无抗生素的 RPMI1640 培养液的 6 孔板中（每孔含 500 μl 培养液和 2×10^5 个细胞）。待细胞达到 70% ~80% 融合时准备转染，同时设转染 pcDNA3.1 V5/His C 空质粒组做为对照。6 μl Lipofectamine™ 2000 混于 100 μl Opti-MEM 中，室温 5 min，溶 1.0 μg 的质粒于 100 μl Opti-MEM 中，混合两者，于室温放置 20 min 后加入 6 孔板（总量为 1 000 μl）。24 h 后换液。

1.2.3　蛋白印迹法（Western blot）检测 ERK 蛋白的表达　按文献[5]的方法提取细胞总蛋白，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶浓度为 12%，积层胶浓度为 5%，每孔上样量为 15 μg；采用恒流电泳，每板电流为 20 ~40 mA，电泳时间约2 h；恒流电转印于聚偏氟乙烯膜上，每张膜电流为 42 mA，转膜时间为 3.5 h。加入一抗、二抗孵育，ECL 法显影。

1.2.4　四甲基偶氮唑盐（MTT）比色法检测细胞增殖　接种单细胞悬液于 96 孔板中，每孔加 200 μl RPMI1640 培养液和 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^5$ 个细胞。分组后每组 3 ~6 复孔，分别于处理 24、48、72 h 后吸去上清，加入 30 μl MTT 溶液（浓度为 0.65 mg/ml）继续培养 4 h 后弃上清，加入二甲基亚砜溶液 200 μl，30 min 后在 570 nm 波长下，酶联免疫分析仪测定各孔吸光度值[$D(570)$]，记录结果，以时间为横轴，细胞增殖率为纵轴绘制细胞生长曲线，细胞增殖率 = D_X/D_{24}（DX 为各个时间点的 D 值，D_{24} 为 24 h 的 D 值），实验重复 3 次。

1.2.5　Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞凋亡　接种 LoVo 细胞及 LoVo puma$^{(-/-)}$ 于 6 孔板中，分为 LoVo 细胞组，LoVo 细胞奥沙利铂和 PD98059 处理组，LoVo puma$^{(-/-)}$ 细胞组，LoVo puma$^{(-/-)}$ 细胞奥沙利铂和 PD98059 组。待细胞完全贴壁后，采用无血清、无抗生素培养液培养 12 h 使其同步化。PD98059 于奥沙利铂（4.8 μmol/L）处理前 1 h 加入。每孔约 5×10^5 个细胞，细胞处理 24 h 后 1 × PBS 充分冲洗 3 次，每孔加入冰预冷的甲醇 500 μl，于冰上放置 10 min，再以 1 × PBS 再次充分冲洗至少 3 次，1 μmol/L Hoechst 33258 室温染色10 min，1 × PBS 再次充分冲洗 3 ~5 次。荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核，凋亡小体颜色加深呈深蓝色或形状不规则。200 倍光镜下连续数 3 个视野，每个视野计数 200 个细胞中阳性染色细胞数，取其平均值，实验重复 3 次。

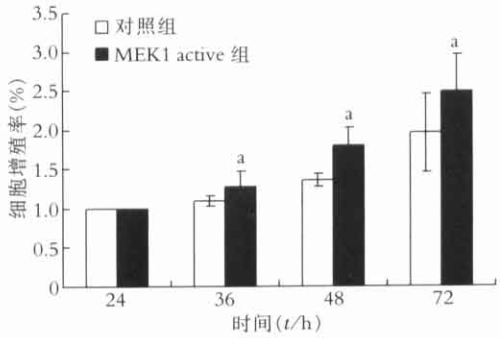
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，组间比较采用 Student's t 检验，两组百分率比较用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　细胞外调节蛋白激酶 1/2（ERK 1/2）活性对 LoVo 细胞增殖的影响

LoVo 细胞分为转染 MEK1 active 组和转染 pcDNA3.1 V5/His C 空载体组（对照组），转染后分别于 24、36、48、72 h 后利用 MTT 法测定细胞增殖率。结果提示，在转染了 MEK1 active 的 LoVo 细胞中，36、48、72 h 的细胞增殖率均较对照组明显增加（$P < 0.05$）（图 1）。提示 ERK1/2 的激活可以提高肠癌细胞的增殖率。



a：$P < 0.05$，与对照组比较

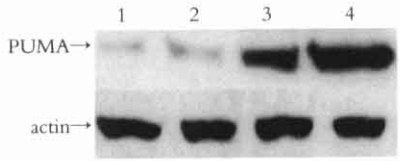
图 1　在肠癌细胞中 ERK 活性的增高可以提高肠癌细胞的增殖率

2.2　奥沙利铂对细胞外调节蛋白激酶 1/2（ERK1/2）的影响

予 0.6、1.2、2.4、4.8、8.4 μmol/L 奥沙利铂刺激肠癌 LoVo 细胞，24 h 后 Western blot 检测磷酸化 ERK 的表达，以总的 ERK 做对照，各组灰度值与阴性对照组灰度值的比值（设阴性对照组为 100）分别为：（86 ± 3.47）、（74 ± 10.26）、（75 ± 4.32）、（30 ± 14.21）、（22 ± 6.32）。提示在肠癌 LoVo 细胞中，奥沙利铂可以抑制 ERK1/2 的激活，并呈剂量依赖关系，在奥沙利铂浓度为 8.4 μmol/L 时这种作用达到高峰，与对照组相比，差别有显著性意义（$t = 5.976$，$P < 0.05$）。

2.3　PD98059 和奥沙利铂对 PUMA 表达的影响

24 h 后 Western blot 检测 PUMA 蛋白的表达。结果提示奥沙利铂可以诱导 PUMA 的表达，PD98059 可以加强奥沙利铂对 PUMA 表达的诱导（图 2）。



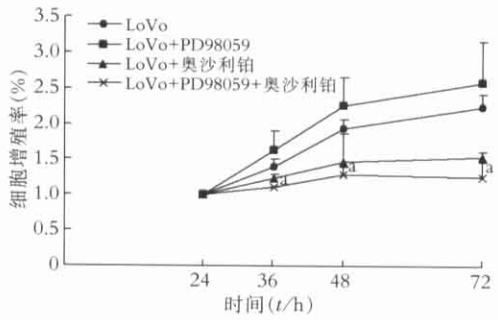
1：对照组；2：PD98059 处理组；3：奥沙利铂（4.8 μmol/L）处理组；4：PD98059 和奥沙利铂联合处理组

图 2　PD98059 和奥沙利铂可以协同增强 PUMA 的表达

2.4　PD98059 对肠癌 LoVo 细胞对奥沙利铂的影响

分别于 24、36、48、72 h 后 MTT 法测定细胞增殖率做为衡量肠癌细胞对奥沙利铂和 PD98059 敏感性的指标。结果提示，

奥沙利铂和 PD98059 联合处理组细胞增殖率较奥沙利铂和 PD98059 单纯处理组明显减弱，差别显著（$P<0.05$），见图 3。提示奥沙利铂和 PD98059 可以协同抑制肿瘤细胞的增殖率，加强肠癌 LoVo 细胞对奥沙利铂的敏感性。



a：$P<0.05$，与 LoVo＋PD98059 和 LoVo＋奥沙利铂比较

图 3 PD98059 能增强大肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性

2.5 抑制 PUMA 的表达减弱 PD98059 与奥沙利铂协同诱导凋亡的作用

细胞分为 LoVo 细胞组，奥沙利铂处理 LoVo 细胞组，LoVo puma$^{(-/-)}$细胞组，奥沙利铂处理 LoVo puma$^{(-/-)}$细胞组。24 h 后 Hoechst 33258 染色检测对细胞凋亡的影响。结果显示，LoVo puma$^{(-/-)}$细胞奥沙利铂与 PD98059 联合处理组 24 h 后，肠癌细胞的凋亡较 LoVo 细胞奥沙利铂与 PD98059 联合处理组明显减少[分别为（28.00±0.57）和（45.00±3.00），$P<0.05$]，提示在 PUMA 的表达受到抑制后奥沙利铂和 PD98059 联合用药后肠癌细胞的凋亡明显减少。提示 PUMA 的表达在 PD98059 和奥沙利铂协同诱导肠癌 LoVo 细胞凋亡的过程中具有一定作用，其表达的降低可以影响二者的协同作用。

3 讨论

MEK/ERK 信号转导途径可被广泛的胞外信号如化疗药物、雌激素（E_2）、生长因子（EGF、IGF-1、TGF、PDGF）和细胞因子（IL-3）等激活[6,7]，并产生广泛而复杂的下游效应。其作用的发挥具有细胞选择性的特点，即在不同的肿瘤细胞中其作用也有所不同，存在多种调控机制。PUMA（p53 up-regulate modulator of apoptosis）基因是新近发现的 Bcl-2 家族的重要成员[4]，与细胞凋亡关系密切，在化疗药物等多种应激诱导的肿瘤细胞凋亡的过程中具有重要作用。在我们以往的研究也发现在肠癌细胞中奥沙利铂可以诱导 PUMA 的表达，其机制可能为 PUMA 在 DNA 损伤诱导的凋亡过程中具有重要作用[8]，而奥沙利铂抗肿瘤治疗的主要机制之一就是作用于 DNA 损伤-修复过程，PUMA 在奥沙利铂诱导的肠癌细胞的凋亡过程中具有一定的作用，并且这一过程尚存在除 p53 外的其他调控因素[9]。

在本研究中我们证实在肠癌 LoVo 细胞中 ERK 的激活可以提高肠癌细胞的增殖率，而化疗药物奥沙利铂处理后的 LoVo 细胞中，ERK 的活性下降，采用 ERK 的上游调节基因 MEK1 的特异性抑制剂 PD98059 进一步抑制 ERK 的活性后，LoVo 细胞的增殖率明显降低。提示 ERK 活性的降低是奥沙利铂发挥药物作用的中间步骤之一。

研究表明，ERK1/2 可以激活或灭活其他信号传导途径的关键效应分子以及重要的转录因子，并能调节细胞周期相关因子和凋亡因子的表达。鉴于 ERK 与 Bcl-2 家族其他成员的密切关系以及在本课题组以往的研究中发现 PUMA 在奥沙利铂诱导 LoVo 细胞凋亡的过程中具有一定作用，我们推测 ERK1/2 对 PUMA 的表达也具有调节作用。本研究结果提示，在 LoVo 细胞中奥沙利铂和 PD98059 可以协同诱导 PUMA 的表达，而在 PUMA 表达明显减弱的细胞克隆中，PD98059 与奥沙利铂诱导凋亡的作用明显减弱。提示 PD98059 通过诱导 PUMA 的表达协同奥沙利铂诱导肠癌 LoVo 细胞的凋亡。

本研究在体外证实了 ERK1/2 的抑制剂 PD98059 可以协同奥沙利铂抑制肠癌细胞的增殖率，也可以通过调节 PUMA 的表达协同奥沙利铂的诱导凋亡的作用，从而为大肠癌的辅助治疗提供了新的思路。但具体的调控机制，包括调控的方式、调控的位点以及有哪些基因参与这一过程需深入研究。

参考文献：

[1] 苏踊跃，罗向东，杨宗诚. ERK1/2 信号通路参与 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 表达的调节[J]. 第三军医大学学报，2002，24（10）：1205－1207.

[2] 郑继军，王 阁，邓 婧，等. PD98059 对肝癌 HepG2 细胞 Tec 信号转导作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28（2）：136－139.

[3] Nakano K，Vousden K H. PUMA，a novel proapoptotic gene，is induced by p53[J]. Mol Cell，2001，7（3）：683－694.

[4] Yu J，Zhang L，Hwang P M，*et al*. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells[J]. Mol Cell，2001，7（3）：673－682.

[5] Ruffels J，Griffin M，Dickenson J M. Activation of ERK1/2，JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells：role of ERK1/2 in H2O2-induced cell death[J]. Eur J of Pharmacol，2004，483（2－3）：163－173.

[6] Duan R，Xie W，Burghardt R C，*et al*. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1[J]. J Biol Chem，2001，276（15）：11590－11598.

[7] Lee A V，Cui X，Oesterreich S. Cross-talk among estrogen receptor，epidermal growth factor，and insulin-like growth factor signaling in breast cancer[J]. Clin Cancer Res，2001，7（12 Suppl）：4429s－4435s.

[8] Villunger A，Michalak E M，Coultas L，*et al*. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa[J]. Science，2003，302（5647）：1036－1038.

[9] 王新颖，何美蓉，李 明，等. PUMA 在奥沙利铂治疗大肠癌中作用机制的实验研究[J]. 医学研究生学报，2007，4（120）：366－369.

（编辑 王 红）