短篇论著

文章编号:1000-5404(2009)14-1410-03

PsL5F诱导人未分化甲状腺癌FRO细胞凋亡与细胞内ROS水平对JNK信号通路的影响

刘智敏,李 梨,朱小云,宋方洲 (重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

摘 要:目的 研究半边旗5F(*Pteris semipnnata L* 5F,PsL5F)对人未分化甲状腺癌FRO细胞的凋亡诱导及其与细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)激活的关系。**方法** MTT法测定PsL5F对FRO细胞的生长抑制作用;流式细胞术与Annexin V-FITC/PI标记法联用检测PsL5F对FRO细胞的凋亡诱导;用ROS特异反应试剂CM-H_2DCFDA标记在流式细胞仪上分析PsL5F对FRO细胞内ROS水平的影响;Western blot法分析PsL5F处理对FRO细胞ERK、JNK和p38MAPK磷酸化水平的影响。**结果** PsL5F对FRO细胞具有显著的生长抑制作用,且呈剂量-时间依赖性;在PsL5F 100 mg/L浓度下,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻细胞的比例呈时间依赖性逐渐增加;用PsL5F处理FRO细胞,在1 h时细胞内ROS水平就表现出明显的升高,GSH可抑制PsL5F诱导的细胞内ROS水平升高和细胞凋亡到对照水平;PsL5F处理可使FRO细胞ERK、JNK和p38MAPK磷酸化而被激活,JNK抑制剂Dicumarol可减轻PsL5F诱导的细胞凋亡,ERK和p38MAPK的抑制剂PD098059和SB203580加剧PsL5F诱导的细胞凋亡。**结论** PsL5F对FRO细胞的生长抑制作用是通过诱导细胞凋亡进行的;细胞内ROS水平升高起到了非常重要的作用;PsL5F处理可导致FRO细胞MAPKs信号通路激活,其中JNK信号通路是促凋亡信号,而ERK和p38MAPK作为生存信号被激活来对抗PsL5F诱导的细胞凋亡。

关键词: 半边旗5F;未分化甲状腺癌;细胞凋亡;活性氧;丝裂原蛋白激酶

中图法分类号: R394.3;R730.23;R736.1 **文献标识码:** A

未分化甲状腺癌是恶性程度最高预后最差的恶性肿瘤之一,虽然仅占甲状腺癌的10%,但其中位生存率仅几个月[1,2]。外科手术、放疗、常规化疗都不能明显提高其生存率。因此,对于未分化甲状腺癌迫切需要寻求新的治疗方案和开发新的治疗药物。

半边旗是一种中草药,属凤尾蕨科植物。半边旗5F(*Pteris semipinnata L* 5F,PsL5F)是从半边旗中分离出来的一种二萜类化合物,化学名为11α-羟基-15-氧-16-烯-对映贝壳杉烷-19酸,具有显著的体内外抗肿瘤活性,且毒副作用小[3,4],但它在甲状腺癌治疗及其细胞凋亡诱导机制方面的研究鲜有报道。本研究以人未分化甲状腺癌FRO细胞为模型,探讨PsL5F对FRO细胞增殖、凋亡的影响以及细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)和MAPKs信号通路在其中所起的作用。

作者简介:刘智敏,女,四川省成都市人,博士,教授,主要从事细胞增殖、凋亡及其信号转导方面的研究,发表论文40余篇。E-mail: liuzm9999@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-09-24;修回日期:2008-11-06

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人未分化甲状腺癌细胞株FRO由香港中文大学Chen教授惠赠,半边旗二萜类化合物PsL5F(分子式$C_{20}H_{28}O_4$,相对分子质量332)由广东医学院梁念慈教授提供,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、Dicumarol购于Sigma公司,ERK和p38MARK的抑制剂PD098059和SB203580购于Promega公司,CM-H_2DCFDA、Annexin V-FITC/PI试剂盒购于Molecular Probes公司,RPMI1640培养基、小牛血清为Gibco公司产品,鼠抗磷酸化JNK1/2、ERK1/2和p38MAPK为Cell Signaling公司产品,羊抗β-actin、HRP标记的羊抗鼠、鼠抗羊二抗为Santa Cruz公司产品。

1.2 细胞培养

人未分化甲状腺癌FRO细胞贴壁培养于含10%小牛血清、100 U/ml的青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI1640培养基中,置37 ℃,5% CO_2饱和湿度孵箱常规传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT法测定细胞增殖抑制率

以5×10^4 ml^{-1}活细胞数接种于96孔培养板中,每孔200 μl。

待其完全贴壁后,更换含不同浓度 PsL5F(0、50、100、150 mg/L)的 RPMI1640 完全培养基,药物作用一定时间(0、6、12、24 h)后,按常规 MTT 法测定细胞增殖抑制率(inhibition rate,IR)。实验重复 3 次。

1.4　细胞膜 PS 外翻、凋亡和坏死细胞的测定

在分析 PsL5F 诱导 FRO 细胞死亡的时间效应时,将 5×10^3 ml^{-1} 活细胞接种于 6 孔培养板,用 100 mg/L 的 PsL5F 分别处理 FRO 细胞 0、6、12、24 h,按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒操作说明进行 Annexin V 及 PI 标记,流式细胞仪检测。实验重复 3 次,所得数据用 Quest 软件收集、储存和分析,计算细胞膜 PS 外翻凋亡、坏死及总死亡细胞的百分比。结果判定 Annexin V(-)/PI(-)为正常细胞,Annexin V(+)/PI(-)为细胞膜 PS 外翻、凋亡细胞,Annexin V(+)/PI(+)为坏死细胞,总死亡细胞为凋亡细胞与坏死细胞之和。在分析 ROS 抑制剂 GSH,以及 JNK、ERK 和 p38MAPK 抑制剂 Dicumarol、PD098059 和 SB203580 对 PsL5F 诱导 FRO 细胞死亡的影响时,FRO 细胞分别用 1 mmol/L GSH 预处理 1 h,75 μmol/L Dicumarol、40 μmol/L PD098059 和 40 μmol/L SB203580 预处理 2 h,然后与 PsL5F 组一同用 100 mg/L 的 PsL5F 处理 24 h,同上 Annexin V -FITC/PI 标记-流式细胞法测定总的死亡细胞。对照组为同体积 DMSO(PsL5F 和上述各种抑制剂的溶剂)处理的 FRO 细胞。

1.5　细胞内 ROS 水平的测定

用 10 μmol/L ROS 特异反应试剂 CM-H_2DCFDA 荧光标记 PsL5F 处理的 FRO 细胞 45 min,收集细胞,流式细胞仪上测定细胞内 ROS 水平。实验重复 3 次,所得数据经 Quest 软件收集、储存和分析。

1.6　Western blot 检测蛋白水平

按 RIPA 方案提取 PsL5F 处理细胞的总蛋白,Bradford 法测定蛋白质浓度。取细胞总蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h 后,一抗室温孵育 2 h,二抗室温孵育 1 h, ECL 显色,X 线片感光,以 β-actin 作为对照。

1.7　统计学处理

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　PsL5F 对 FRO 细胞生长的影响

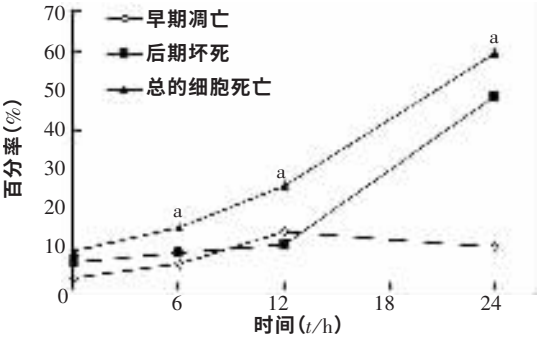
不同浓度的 PsL5F(0、50、100、150 mg/L)处理 FRO 细胞 24 h,MTT 法检测其对细胞增殖的 IR 分别为 0、(43.38±2.43)%、(62.39±2.32)%、(74.25±2.35)%,PsL5F 抑制 FRO 细胞增殖具有明显的剂量依赖性;100 mg/L 的 PsL5F 处理 FRO 细胞 0、6、12、24 h,MTT 法检测其对细胞增殖的 IR 分别为 0、(9.93±2.58)%、(47.09±2.27)%、(62.39±2.32)%,PsL5F 抑制 FRO 细胞增殖具有明显的时间依赖性。

2.2　PsL5F 对 FRO 细胞凋亡和坏死的诱导

用 Annexin V-FITC/PI 标记在流式细胞仪上测得 100 mg/L 的 PsL5F 能明显诱导 FRO 细胞 PS 外翻、早期凋亡,且在 12 h 时达到最大值;而坏死细胞、总的死亡细胞随着 PsL5F 作用时间增加而增加,见图 1。100 mg/L 的 PsL5F 诱导 FRO 细胞 PS 外翻、早期凋亡、后期坏死、总的细胞死亡均具有明显的时间依赖性($P<0.01$)。

2.3　细胞内 ROS 水平升高在 PsL5F 诱导 FRO 细胞死亡中的作用

用 ROS 特异反应试剂 CM-H_2DCFDA 标记在流式细胞仪上测得 100 mg/L 的 PsL5F 处理 FRO 细胞 1 h 时,就能使 FRO 细胞内 ROS 水平明显升高,细胞内 ROS 的升高可被 ROS 抑制剂 GSH 抑制。用 Annexin V-FITC/PI 标记-流式细胞法测得 PsL5F 处理组的细胞死亡率为(59.18±2.70)%,而 GSH 预处理再 PsL5F 处理组为(10.89±1.17)%,即 GSH 预处理几乎使 PsL5F 诱导的细胞死亡率降低到对照水平[(9.11±0.55)%]。

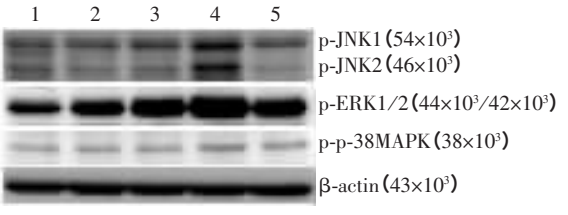


a: $P<0.01$,与前一个时间点比较

图 1　100 mg/L 的 PsL5F 诱导 FRO 细胞死亡的时间效应关系

2.4　MAPKs 信号通路在 PsL5F 诱导 FRO 细胞死亡中的作用

Western blot 及抗磷酸化 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK1/2 的抗体分析结果显示,100 mg/L 的 PsL5F 处理使 FRO 细胞内 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK1/2 磷酸化而被激活(图 2)。Annexin V-FITC/PI 标记-流式细胞法测得:PsL5F 处理组的细胞死亡率为(59.18±2.70)%,PsL5F + Dicumarol 组为(23.59±1.57)%,PsL5F + SB203580 组为(67.34±2.39)%,PsL5F + PD098059 组为(80.98±2.71)%,即 ERK 和 p38MAPK 抑制剂 PD098059 和 SB203580 预处理 FRO 细胞可增强 PsL5F 诱导的细胞死亡;而 JNK 抑制剂 Dicumarol 预处理可减轻 PsL5F 诱导的细胞死亡。



1: 0 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h

图 2　Western blot 检测 PsL5F 诱导不同时间后 FRO 细胞内 MAPKs 的激活

3 讨论

肿瘤细胞都存在凋亡抑制现象,通过诱导细胞凋亡治疗肿瘤已成为肿瘤治疗的新途径。本研究结果显示,PsL5F 呈剂量-时间依赖性地抑制人未分化甲状腺癌 FRO 细胞增殖。用 Annexin V-FITC/PI 标记 100 mg/L 的 PsL5F 处理不同时间的 FRO 细胞,在流式细胞仪上测得 PsL5F 能明显诱导 FRO 细胞 PS 外翻、早期凋亡,且在 12 h 时达到最大值,而坏死细胞和总的死亡细胞随着 PsL5F 作用时间增加而增加,呈现明显的时间依赖性,即 PsL5F 通过诱导细胞凋亡而对 FRO 细胞起到了生长抑制作用。

ROS 是细胞有氧呼吸过程中产生的 O_2 代谢产物及其衍生的含氧物质的统称,包括所有的含氧自由基和过氧化物。正常情况下,细胞内 ROS 处于一个相对稳定的水平,但理化和生物因素的刺激可导致细胞内 ROS 大量增加,此时 ROS 水平的升高将作为重要的第二信使启动细胞进入凋亡过程[5-7]。本研究结果显示,PsL5F 处理 FRO 细胞 1 h 时,就能使 FRO 细胞内 ROS 水平明显升高,且细胞内 ROS 水平的升高可被还原型谷胱甘肽 GSH 抑制,GSH 处理可使 PsL5F 诱导的细胞死亡降低到对照水平,说明细胞内 ROS 水平升高在 PsL5F 诱导 FRO 细胞死亡中起着非常重要的作用。

MAPKs 是一个大的蛋白激酶家族,主要成员包括 ERK、JNK 和 p38MAPK。一般而言,ERK 激活与生长因子诱导的细胞增殖有关;而 JNK 和 p38MAPK 的激活与应激反应和细胞因子诱导的细胞分化和凋亡有关。但很多研究都证明,同一作用因素刺激不同种类细胞,或不同因素刺激同一种细胞,MAPKs 家族信号通路可表现出不同的激活,并在细胞凋亡中具有不同的作用[8]。例如,p38MAPK 可通过启动生存信号和 NF-κB 靶基因转录,抑制细胞凋亡的发生[9,10],而 ERK 信号通路的激活也可作为促凋亡信号促进细胞凋亡的发生[11]。本研究结果显示 PsL5F 处理导致 FRO 细胞 JNK1/2、ERK1/2 和 p38MAPK 的激活,PsL5F 诱导的细胞凋亡能被 JNK 抑制剂 Dicumarol 抑制;相反,ERK 抑制剂 PD098059 或 p38MAPK 抑制剂 SB203580 加速 PsL5F 诱导的 FRO 细胞凋亡。说明 PsL5F 诱导的细胞凋亡与 JNK 的激活有关,JNK 信号通路是一促凋亡信号,而 ERK 和 p38MAPK 作为生存信号被激活来对抗 PsL5F 诱导的细胞凋亡。

综上所述,PsL5F 对未分化甲状腺癌 FRO 细胞的生长抑制作用是通过诱导细胞凋亡进行的。其中,细胞内 ROS 水平升高起到了非常重要的作用。PsL5F 处理可导致 FRO 细胞 MAPKs 信号通路激活,其中 JNK 信号通路是一促凋亡信号,而 ERK 和 p38MAPK 作为生存信号被激活来对抗 PsL5F 诱导的细胞凋亡。

参考文献:

[1] Neff R L, Farrar W B, Kloos R T, *et al*. Anaplastic thyroid cancer [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008, 37(2): 525-538, ix.

[2] 白信花, 郝彦勇, 王 帅, 等. 甲状腺未分化癌的临床病理分析[J]. 吉林医学, 2008, 29(22): 2100.

[3] 何太平, 覃燕梅, 莫丽儿, 等. 半边旗二萜类化合物 5F 对高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞中癌相关基因表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 117-122.

[4] 龚先玲, 陈志红, 吕应年, 等. 半边旗抗肿瘤有效成分 5F 的纯化工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1286-1289.

[5] Fruehauf J P, Meyskens F L Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 789-794.

[6] 彭侃夫, 赵洪雯, 余荣杰, 等. 晚期氧化蛋白产物诱导血管平滑肌细胞表达 MCP-1 及其信号转导通路的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 101-103.

[7] Lau A T, Wang Y, Chiu J F. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic[J]. J cell Biochem, 2008, 104(2): 657-667.

[8] Raman M, Chen W, Cobb M H. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3100-3112.

[9] Tsuchiya T, Tsuno N H, Asakage M, *et al*. Apoptosis induction by p38 MAPK inhibitor in human colon cancer cells [J]. Hepatogastroenterology, 2008, 55(84): 930-935.

[10] 李 静, 许 峰, 胡 兰, 等. 高氧对幼鼠肺组织细胞凋亡及 p38MAPK 丝裂原活化蛋白激酶的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1598-1600.

[11] Fei H, Zhao B, Zhao S, *et al*. Requirements of calcium fluxes and ERK kinase activation for glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2008, 315(1-2): 75-84.

(编辑 王小寒)