论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2414-04

多沙唑嗪通过转录因子激活蛋白-2α诱导HeLa细胞凋亡

甘 露,丁振华 (南方医科大学公共卫生与热带医学学院放射医学系,广州 510515)

摘 要:目的 研究α1-肾上腺素受体拮抗剂多沙唑嗪对HeLa细胞凋亡的影响以及转录因子激活蛋白-2α(activator protein-2α, AP-2α)在多沙唑嗪诱导HeLa细胞凋亡中发挥的作用。**方法** HeLa细胞经过多沙唑嗪处理、过表达AP-2α或反义寡核苷酸干扰AP-2α表达后,通过流式分析检测凋亡;以相对定量PCR和Western blot分析检测AP-2α和caspase-3的表达。**结果** 多沙唑嗪以剂量依赖性方式增加HeLa细胞的凋亡率和总细胞死亡率,上调AP-2α和caspase-3的表达。AP-2α的过表达导致多沙唑嗪诱导的HeLa细胞的凋亡率和总细胞死亡率增加,增强caspase-3的表达;而反义AP-2α却导致多沙唑嗪诱导的HeLa细胞的凋亡率和总细胞死亡率降低,部分地阻断了多沙唑嗪对caspase-3表达的增强效应。**结论** 多沙唑嗪以剂量依赖性方式诱导HeLa细胞凋亡,转录因子AP-2α在多沙唑嗪诱导的HeLa细胞凋亡中发挥了作用。

关键词: 激活蛋白-2α;α1-肾上腺素拮抗剂;凋亡;宫颈癌;多沙唑嗪; HeLa细胞;转录因子

中图法分类号: R73-36;R737.33;R977 **文献标识码:** A

Doxazosin induces HeLa cell apoptosis *via* transcription factor activator protein-2α

GAN Lu, DING Zhen-hua (Faculty of Radiation Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the pro-apoptotic effects of an α1-adrenergic inhibitor, doxazosin, in HeLa cells and the role of transcription factor activator protein-2α (AP-2α) in the process. Methods The HeLa cells were treated with doxazosin (0, 10, 40 or 60 μmol/L) for 16 h, and cell apoptosis was detected by flow cytometric analysis. After doxazosin (60 μmol/L) treated the HaLa cells, the cells transfected with AP-2α overexpressing constructs or an antisense oligonucleotide against AP-2α for 16 h, the apoptosis was analyzed with FCM. The expression of AP-2α and caspase-3 in above 3 groups of cells was detected by relative quantitative RT-PCR and Western blot analysis, respectively. Results Doxazosin increased the apoptotic rate and total cell death rate of the HeLa cells, and upregulated the expressions of AP-2α and caspase-3 in a dose-dependent manner. Overexpressing AP-2α improved the increased apoptotic rate and total cell death rate induced by doxazosin, and enhanced the increased expression of caspase-3. Whereas doxazosin-induced apoptosis and the total cell death in HeLa cells were decreased by antisense AP-2α, and antisense AP-2α in part abolished the increased effects of doxazosin on caspase-3 expression. Conclusion Doxazosin induces apoptosis in HeLa cells in a dose-dependent manner, and transcription factor AP-2α is functionally involved in this process.

Key words: activator protein-2α; α1-adrenergic inhibitor; apoptosis; cervical cancer; doxazosin; HeLa cells; transcription factors

多沙唑嗪(doxazosin)是一类长效α1-肾上腺素受体拮抗剂,其化学结构与普拉唑嗪(prazosin)、特拉唑嗪(terazosin)类似。目前临床上主要应用于抗高血压和良性前列腺增生症的治疗。最近,大量研究证实多沙唑嗪还具有潜在的抗肿瘤效应,能诱导前列腺癌细胞凋亡,明显降低前列腺癌的发生[1,2]。然而,目前尚不清楚多沙唑嗪在宫颈癌细胞中是否具有同样的致凋亡效应。转录因子激活蛋白-2α(activator protein-2α, AP-2α)已被证实作为肿瘤抑制因子参与到多种肿瘤的发生发展[3-5],但AP-2α是否与宫颈癌细胞凋亡相关,尚不清楚。本研究检测多沙唑嗪对宫颈癌细胞系HeLa细胞凋亡的影响,进而探讨转录因子AP-2α在多沙唑嗪诱导的HeLa细胞凋亡中所起的作用。

基金项目: 南方医科大学公共卫生与热带医学学院院长基金(GW200806)
Supported by the Director Foundation of School of Public Health and Tropical Medicine of Southern Medical University (GW200806)

作者简介: 甘 露,女,重庆市人,博士,讲师,主要从事肿瘤和心血管疾病的转录调控方面的研究,发表论文10余篇。电话:(020)62789131, E-mail:gan_lu@yahoo.com.cn

通信作者: 丁振华,电话:(020)61648315,E-mail: dingzh@fimmu.com

收稿日期: 2009-05-19;**修回日期:** 2009-06-16

1 材料与方法

1.1 仪器设备

荧光显微镜Axioskop 2 plus为Zeiss公司产品,5810R/

5810、5414D 冷冻离心机,温度梯度 PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产品,流式细胞仪为美国 Becton Dickinson FACSCalibur,荧光实时定量 PCR 仪为 Applied Biosystems 公司产品。

1.2　质粒构建、寡核苷酸合成以及药品

AP-2α 全长编码序列由 PCR 扩增得到,T 载体克隆后酶切连入 pCMV-Myc 真核表达载体,构建成 pCMV-Myc-AP-2α,在细胞转染后表达 Myc-AP-2α。为干扰 AP-2α 的转录,按照参考文献[6]报道的序列合成针对 AP-2α 的反义寡核苷酸 ODNAP-2α 和对照寡核苷酸 COAP-2α(均经全硫代修饰):CGTCAATTTC-CAAAGCATTTTCATGGATCGG(ODNAP-2α)和 CAAAGTCTTG-CATTATTCGGTCATAATGGCC(COAP-2α)。甲磺酸多沙唑嗪购于美国 Sigma 公司。

1.3　细胞培养和瞬时转染

HeLa 细胞在 37 ℃、5% CO_2、90% 相对湿度培养箱中用 DMEM 培养基(补加 10% 新生牛血清、2 mmol/L L-谷氨酸、青霉素和链霉素)培养。细胞长至 80% 以 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)转染。

1.4　流式细胞仪分析

按照深圳晶美提供的 Annexin V-FITC 试剂盒说明书进行实验:用去离子水按 1∶4稀释结合缓冲液(4 ml 结合缓冲液 + 12 ml 去离子水);用 4 ℃预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用 250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其浓度为 1×10^6/ml;取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl 20 μg/ml 的碘化丙锭溶液;混匀后于室温避光孵育 15 min;在反应管中加 400 μl PBS,流式细胞仪分析。

1.5　RNA 抽提和相对定量 RT-PCR

用 Trizol (Invitrogen,USA)提取细胞总 RNA,按 Promega 的反转录试剂盒(Promega,USA)说明书进行反转录。在定量 PCR 仪(7900 HT Fast Real-time PCR System)上进行 PCR 反应,反应所用的试剂盒为 SYBR GREEN PCR Master Mix。PCR 引物序列如下:AP-2α 正义链 5′-GCTGGGCACTGTAGGTCAA-TC-3′与反义链 5′-TTCAGGCTGTAGGGGTCGTT-3′;caspase-3 正义链 5′-GCTCTGGTTTTCGGTGGGT-3′与反义链 5′-GAGTCCAT-TGATTCGCTTCCA-3′;β-actin 正义链 5′-GGCGGCAACACCAT-GTACCCT-3′ 与反义链 5′-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3′。

1.6　Western blot 分析

收集细胞以 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解,蛋白定量后,配制 12% SDS-PAGE 胶,上样电泳,然后转 PVDF 膜。所用的一抗为 AP-2α (3B5) 鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz)或 caspase-3 兔多克隆抗体(美国 Santa Cruz)。最后用 DAB 显色或化学发光法显色。

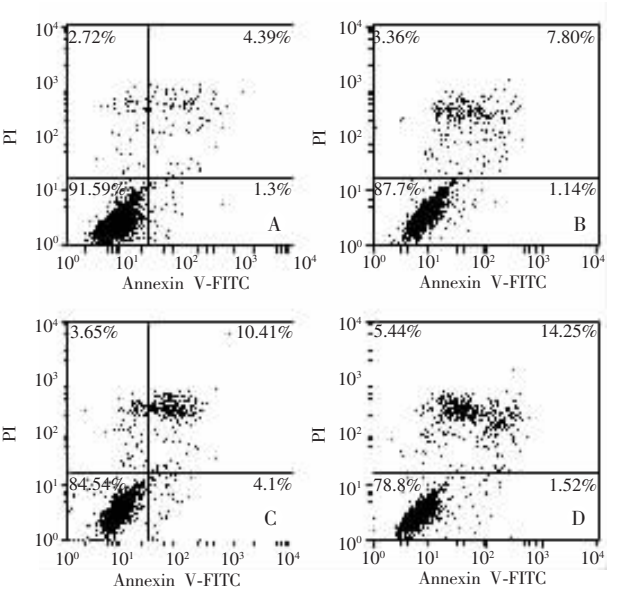
1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　多沙唑嗪以剂量依赖性方式诱导 HeLa 细胞凋亡

为检测多沙唑嗪对 HeLa 细胞凋亡的影响,当 HeLa 细胞长至 80% 时,分别处理以 0 ~ 60 μmol/L 的多沙唑嗪,16 h 后收获细胞,以 Annexin V-FITC/PI 双染色,流式细胞仪检测凋亡。图 1 结果显示,随着多沙唑嗪剂量从 0 ~ 60 μmol/L 增加,凋亡细胞总数从 4.39% 增高到 14.25%,总细胞死亡从 8.41% 增高到 21.2%,提示多沙唑嗪以剂量依赖性方式诱导 HeLa 细胞凋亡。



A:多沙唑嗪 0 μmol/L; B: 多沙唑嗪 10 μmol/L; C: 多沙唑嗪 40 μmol/L; D: 多沙唑嗪 60 μmol/L

图 1　多沙唑嗪以剂量依赖性方式诱导 HeLa 细胞凋亡

2.2　AP-2α 参与多沙唑嗪诱导的 HeLa 细胞凋亡

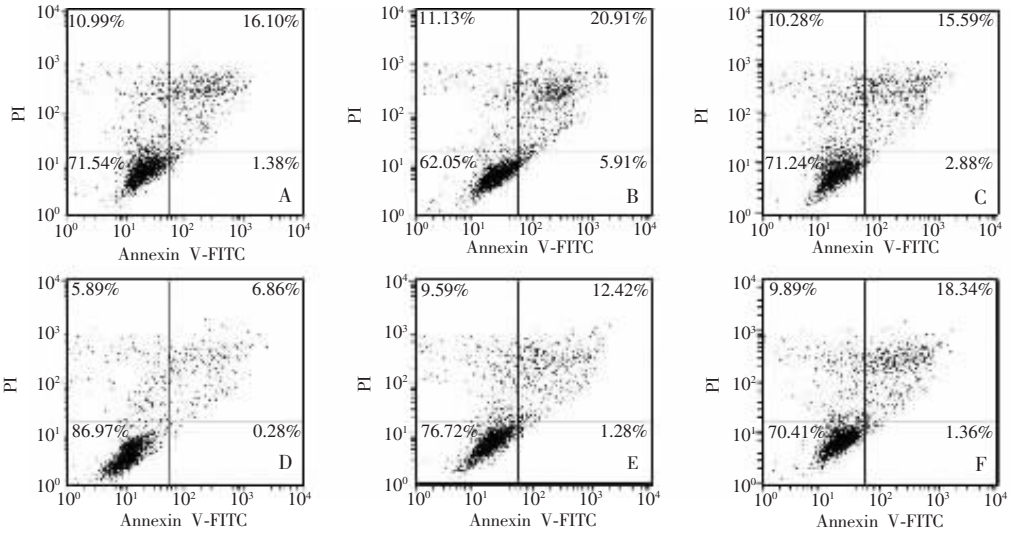
为了检测多沙唑嗪诱导的 HeLa 细胞凋亡是否与 AP-2α 有关,AP-2α 过表达的质粒和 AP-2α 反义寡核苷酸被分别转染入 HeLa 细胞,然后以 60 μmol/L 多沙唑嗪处理,16 h 后收集细胞经 Annexin V-FITC/PI 双染色以流式细胞仪分析凋亡效应。图 2 结果显示,无论 AP-2α 过表达还是 AP-2α 被干扰时,与其相应的不加多沙唑嗪的对照组相比较,60 μmol/L 多沙唑嗪的处理均会导致总细胞死亡和凋亡(特别是晚期凋亡)明显增加,提示多沙唑嗪诱导 HeLa 细胞凋亡,与图 1 的结果相吻合。进一步分析发现,当处理以 60 μmol/L 多沙唑嗪时,与转空质粒组相比较,AP-2α 过表达导致 HeLa 细胞的凋亡率从 18.47% 增长到 26.82%,总细胞死亡从 62.05% 增长到 71.24%;同时,与转正义寡核苷酸相比较,转反义寡核苷酸组导致 HeLa 细胞凋亡率从 19.70% 降低到 13.70%,总细胞死亡从 29.59% 降低到 23.29%,提示 AP-2α 能增强多沙唑嗪诱导的 HeLa 细胞凋亡,而反义干扰 AP-2α 能部分阻断多沙唑嗪诱导的 HeLa 细胞凋亡。

2.3　多沙唑嗪上调 AP-2α 在 HeLa 细胞内的表达

图 3 显示了多沙唑嗪以剂量依赖性方式上调 AP-2α 的 mRNA 和蛋白水平,提示多沙唑嗪致 HeLa 细胞凋亡的效应与 AP-2α 相关。

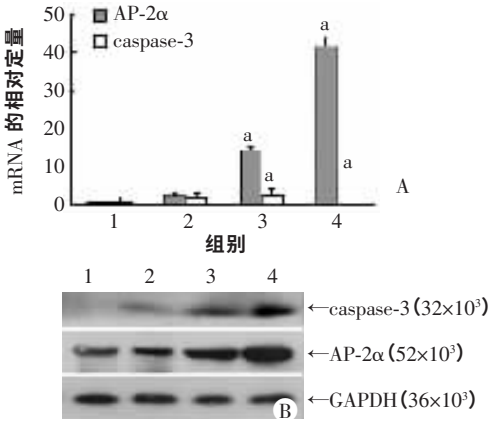
2.4　多沙唑嗪在 HeLa 细胞内通过 AP-2α 影响 caspase-3 路径

HeLa 细胞被分别转染以图 4 中标示的 DNA,10 h 后换液,处理以 60 μmol/L 的多沙唑嗪,继续培养 16 h 后收集细胞进行检测。结果显示,过表达的 AP-2α 导致 caspase-3 的 mRNA 水平和蛋白水平同步上升,而反义 AP-2α 部分地破坏了多沙唑嗪诱导下的 caspase-3 表达上调的效应。提示在多沙唑嗪通过 AP-2α诱导 HeLa 细胞凋亡的过程中,caspase-3 路径参与其中。



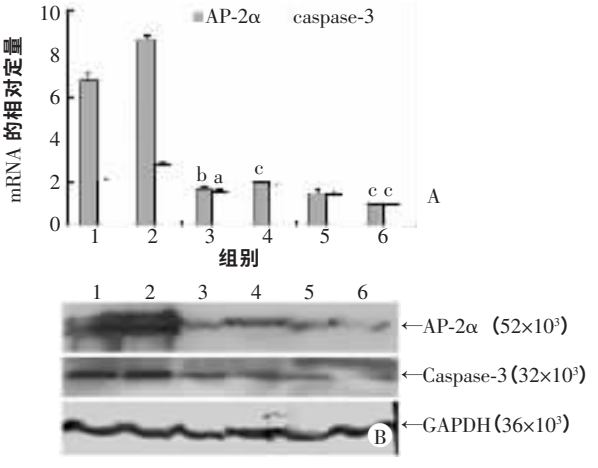
A：多沙唑嗪 0 μmol/L，Myc-AP-2α；B：多沙唑嗪 60 μmol/L，Myc-AP-2α；C：多沙唑嗪 60 μmol/L，Myc；D：多沙唑嗪 0 μmol/L，ODNAP-2α；E：多沙唑嗪 60 μmol/L，ODNAP-2α；F：多沙唑嗪 60 μmol/L，COAP-2α

图 2　AP-2α 对多沙唑嗪诱导 HeLa 细胞凋亡的影响



1～4：多沙唑嗪浓度分别为 0、10、40、60 μmol/L　A：相对定量 PCR 结果　a：$P<0.01$，与多沙唑嗪 0 μmol/L 组比较；B：Western blot 结果

图 3　多沙唑嗪上调 AP-2α 和 caspase-3 在 HeLa 细胞内的表达



1：多沙唑嗪 0 μmol/L，Myc-AP-2α；2：多沙唑嗪 60 μmol/L，Myc-AP-2α；3：多沙唑嗪 0 μmol/L，Myc；4：多沙唑嗪 60 μmol/L，COAP-2α；5：多沙唑嗪 60 μmol/L，ODNAP-2α；6：多沙唑嗪 0 μmol/L，ODNAP-2α

A：相对定量 PCR 结果　a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与第 2 组对应值比较；c：$P<0.05$，与第 5 组对应值比较；B：Western blot 结果

图 4　AP-2α 对 caspase-3 在 HeLa 细胞内表达的影响

3　讨论

尽管以前有研究报道 AP-2 与肿瘤性疾病相关，并通过诱导肿瘤细胞周期停滞和凋亡而发挥抑制肿瘤的作用[7-9]。但 AP-2 在 HeLa 细胞中的作用有待探讨。在本研究中，我们调查了 α1-肾上腺素受体拮抗剂多沙唑嗪对 HeLa 细胞表达 AP-2α 的影响，结果发现多沙唑嗪以剂量依赖性方式上调 AP-2α 的 mRNA 水平和蛋白水平，并且多沙唑嗪以剂量依赖性方式诱导 HeLa 细胞凋亡。我们还发现，多沙唑嗪致 HeLa 细胞凋亡的效果似乎与 AP-2α 的功能有关，AP-2α 过表达导致 HeLa 细胞凋亡率增加，而反义 AP-2α 导致HeLa 细胞凋亡率降低，提示多沙唑嗪通过上调 AP-2α 诱导 HeLa 细胞凋亡。

caspases 是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的半胱氨酸蛋白酶家族，包括 caspase-1～caspase-14。其中 caspase-3 是细胞凋亡过程中的一个关键酶，在细胞核凋亡过程中起到了关键作用，包括染色质固缩、DNA 片段化等[10-13]。研究报道多沙唑嗪通过激活 caspase-3 来诱导前列腺癌细胞凋亡[14]，本实验结果提示：在多沙唑嗪通过 AP-2α 诱导 HeLa 细胞凋亡的过程中，caspase-3 路径参与了其中。

此外，本结果还提示：在多沙唑嗪与 AP-2α 之间可能存在极其复杂的相互作用。当用不同浓度的多沙唑嗪处理 HeLa 细胞，60 μmol/L 多沙唑嗪导致 HeLa 细胞的晚期凋亡率从 4.39% 增长到 14.25%，增长了约 3 倍（图 1）；但在 AP-2α 过表达的前提下，60 μmol/L 多沙唑嗪仅使 HeLa 细胞的晚期凋亡率增长了约 1.3 倍（从 16.1% 增长到 20.91%，图 2）。这些结果显示，

AP-2α 的过表达部分地抑制了多沙唑嗪诱导的凋亡。caspase-3 的表达也呈现出相似的趋势:60 μmol/L 多沙唑嗪可导致 caspase-3 的表达明显增加(图 3),但在 AP-2α 过表达时,60 μmol/L 多沙唑嗪诱导的 caspase-3 的表达增长却并不明显(图 4)。在此,对于多沙唑嗪通过 AP-2α 诱导 HeLa 细胞发生凋亡的过程,我们提出一个设想:在多沙唑嗪与 AP-2α 之间可能存在复杂的相互作用,一定浓度范围内的多沙唑嗪可在一定阈值内上调 AP-2α,然后通过上调的 AP-2α 对 caspase-3 的调节作用诱导 HeLa 细胞凋亡;然而,当 AP-2α 过表达时,超过阈值的 AP-2α 就可能通过某种负反馈机制部分地抑制多沙唑嗪诱导的凋亡。由于 AP-2α 是一调节多种基因的转录因子,由 AP-2α 调控的其他基因也可能参与了其中,以上设想有待于进一步探讨研究。

参考文献:

[1] Harris A M, Warner B W, Wilson J M, *et al*. Effect of alpha1-adrenoceptor antagonist exposure on prostate cancer incidence: an observational cohort study[J]. J Urol, 2007, 178(5): 2176 - 2180.

[2] Tahmatzopoulos A, Sheng S, Kyprianou N. Maspin sensitizes prostate cancer cells to doxazosin-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2005, 24(34): 5375 - 5383.

[3] Heimberger A B, McGary E C, Suki D, *et al*. Loss of the AP-2alpha transcription factor is associated with the grade of human gliomas[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1): 267 - 272.

[4] Tellez C, McCarty M, Ruiz M, *et al*. Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma[J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46632 - 46642.

[5] Pellikainen J, Naukkarinen A, Ropponen K, *et al*. Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(10): 1485 - 1495.

[6] Fan W H, Karnovsky M J. Increased MMP-2 expression in connective tissue growth factor over-expression vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(12): 9800 - 9805.

[7] Wajapeyee N, Britto R, Ravishankar H M, *et al*. Apoptosis induction by activator protein 2alpha involves transcriptional repression of Bcl-2[J]. J Biol Chem, 2006, 281(24): 16207 - 16219.

[8] Wajapeyee N, Somasundaram K. Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition[J]. J Biol Chem, 2003, 278(52): 52093 - 52101.

[9] Wajapeyee N, Raut C G, Somasundaram K. Activator protein 2alpha status determines the chemosensitivity of cancer cells: implications in cancer chemotherapy[J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8628 - 8634.

[10] Porter A G, Janicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99 - 104.

[11] Chen D, Texada D E, Duggan C, *et al*. Caspase-3 and -7 mediate apoptosis of human Chang's conjunctival cells induced by enterovirus 70[J]. Virology, 2006, 347(2): 307 - 322.

[12] Ramanathan B, Wu H, Ross C R, *et al*. PR-39, a porcine antimicrobial peptide, inhibits apoptosis: involvement of caspase-3[J]. Dev Comp Immunol, 2004, 28(2): 163 - 169.

[13] Yang S A, Paek S H, Kozukue N, *et al*. Alpha-chaconine, a potato glycoalkaloid, induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells through caspase-3 activation and inhibition of ERK 1/2 phosphorylation[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(6): 839 - 846.

[14] Walden P D, Globina Y, Nieder A. Induction of anoikis by doxazosin in prostate cancer cells is associated with activation of caspase-3 and a reduction of focal adhesion kinase[J]. Urol Res, 2004, 32(4): 261 - 265.

(编辑　汪勤俭)

我刊再次被评为“中国百种杰出学术期刊”

2009 年 11 月 27 日,从“2008 年度中国科技论文统计结果发布会”上传来喜讯:《第三军医大学学报》的各项计量指标稳中有升,再次被评为“中国百种杰出学术期刊”。



“中国百种杰出学术期刊”是由中国科技信息所根据中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)收录的 1868 种统计源期刊的各项科学计量指标进行综合评定,遴选出的 100 种优秀期刊,包括各学科、各类型期刊,每年评定 1 次,严格执行淘汰制。《第三军医大学学报》于 2007 年首次进入“中国百种杰出学术期刊”行列。今年再次入选,表明《第三军医大学学报》的办刊质量和水平稳中有升,持续在全国科技期刊阵列中名列前茅。

国家科技部中国科学技术信息研究所每年年底均会在北京举行“中国科技论文统计结果发布会”,公布我国前一年度科技论文统计和中国科技期刊评价结果。2008 年度,《第三军医大学学报》的被引频次为 2447 次(核心版)和 3454 次(扩展版),列 49 种医科大学学报(含综合性院校学报医学版)第 2 位;影响因子为 0.428(核心版)和 0.617(扩展版),列第 6 位,他引率 0.85,基金论文比为 0.42;综合评价排名第二。

本刊编辑部