文章编号:1000-5404(2010)04-0349-04

论著

受体作用蛋白在异硫氰酸苯乙酯诱导人急性白血病细胞凋亡中的作用

姚 婕,高 宁 (400038 重庆,第三军医大学医学检验系暨药学院生药学教研室)

[摘要] **目的** 探讨受体作用蛋白(receptor-interaction proteins, RIP)在异硫氰酸苯乙酯(phenethylisothiocyanate, PEITC)诱导人白血病细胞凋亡中的作用。**方法** 将0、2、4、6、8 μmol/L异硫氰酸苯乙酯作用于U937细胞3、6 h,观察量效关系。用8 μmol/L异硫氰酸苯乙酯作用U937细胞1、3、6、9、12、24 h,观察时效关系。采用Annexin V/PI染色和流式细胞仪检测细胞凋亡。用Western blot法检测细胞凋亡相关蛋白蛋白聚ADP核糖聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]、Caspasep-3、Caspasep-8及RIP的表达。**结果** 异硫氰酸苯乙酯在2、4、6、8 μmol/L作用于U937细胞3 h分别引起9%、25%、44%和56%的细胞发生凋亡,6 h分别引起16%、28%、51%和82%的细胞发生凋亡,呈明显的量效关系。8 μmol/L的异硫氰酸苯乙酯作用U937细胞1、3、6、9、12、24 h分别引起12%、57%、79%、86%、90%和91%的细胞发生凋亡,呈明显的时效关系。Western blot结果表明,异硫氰酸苯乙酯引起凋亡蛋白酶Caspase-3、Caspase-8的降解/活化增加,促进凋亡作用底物PARP的降解增加。异硫氰酸苯乙酯还可引起受体作用蛋白表达降低及RIP降解增加。**结论** 异硫氰酸苯乙酯可引起人白血病细胞发生凋亡,其分子机制可能与死亡受体途径有关,其中受体作用蛋白的降解可能在异硫氰酸苯乙酯诱导细胞凋亡中起着重要作用。

[关键词] 异硫氰酸苯乙酯; 白血病; 细胞凋亡; 受体作用蛋白
[中图法分类号] R733.71;R966;R977.6 **[文献标志码]** A

Role of receptor-interaction proteins in phenethylisothiocyanate-induced apoptosis in human leukemia cells *in vitro*

Yao Jie, Gao Ning (Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To explore the role of receptor-interaction proteins (RIP) in phenethylisothiocyanate (PEITC)-induced apoptosis in human leukemia cells. Methods U937 cells were exposed to PEITC at various concentrations of 0, 2, 4, 6 and 8 μmol/L for 3 and 6 h, or at 8 μmol/L for different time intervals of 1, 3, 6, 9, 12 and 24 h. Cells were stained with Annexin V/PI, and apoptosis was determined by using flow cytometry. Total protein extracts were prepared and subjected to Western blot assay using antibodies against poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), Caspase-3, Caspase-8, and RIP. β-actin was used to ensure equivalent loading. Results After exposure to PEITC at concentrations of 2, 4, 6 and 8 μmol/L for 3 h, U937 cells showed an increase in cell apoptosis (9%, 25%, 44% and 56% respectively). While when the time expanded to 6 h, the amount of apoptotic cells was increased to 16%, 28%, 51% and 82% respectively. A dose-dependent manner was seen when U937 cells were exposure to PEITC at different concentrations. When U937 cells were treated by PEITC at concentration of 8 μmol/L for 1, 3, 6, 9, 12, and 24 h, the apoptotic cells covered 12%, 57%, 79%, 86%, 90%, and 91% of all cells respectively, indicating a time-dependent manner. Western blot assay showed that PEITC caused the activation/cleavage of Caspase-3 and -8, and improved the PARP cleavage, and also decreased the expression of RIP. PEITC-induced apoptosis was proceeded by degradation of RIP. Conclusion Our results indicate that PEITC induces the apoptosis in human leukemia cells through a process that involves death receptor pathway, and RIP may play an important role in the apoptosis.

[Key words] phenethylisothiocyanate; leukemia; apoptosis; receptor-interaction proteins

Supported by the Starting Funds for Personnel Returning from Overseas of Third Military Medical University (2008). Corresponding author: Gao Ning, Tel: 86-23-68753736, E-mail: gaoning59@yahoo.com.cn

[基金项目] 第三军医大学回国人员启动基金(2008)
[通信作者] 高 宁,电话:(023)68753736,E-mail: gaoning59@yahoo.com.cn

十字花科蔬菜富含芥子油甙及其水解产物如吲哚和异硫氰酸酯类化合物。人们日常食用的许多蔬菜

(如白菜、菜花、卷心菜、甘蓝等)都属于十字花科。流行病学研究及实验研究发现十字花科蔬菜具有显著的抗癌作用,高摄入十字花科蔬菜可降低一些癌症如肺癌、肠癌等发生的危险性[1,2]。起主要作用的是其中以芥子油甙为前体存在的异硫氰酸酯类化合物(Isothiocyanates, ITCs)[3]。异硫氰酸苯乙酯(phenethylisothiocyanate,PEITC)是ITCs的有效成分之一。

近年来研究报道,PEITC诱导肿瘤细胞凋亡是其抗肿瘤作用的主要机制。PEITC诱导多种肿瘤细胞如:乳腺癌[4]、肺癌[5]、前列腺癌[6]、直肠癌[7]、卵巢癌[8]等细胞发生凋亡。PEITC也可诱导人白血病细胞发生凋亡[9],但其作用机制尚不清楚。本研究中,我们将PEITC作用于U937急性白血病细胞,检测细胞凋亡及其相关蛋白,旨在阐明PEITC诱导细胞凋亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

U937人急性白血病细胞株从美国菌种保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA)获得。细胞于RPMI1640培养基中培养,培养液中补充加入丙酮酸钠,碳酸氢钠,非必需氨基酸, L-谷氨酰胺,青霉素,链霉素,和10%胎牛血清(FBS)。

1.2 主要试剂

异硫氰酸苯乙酯(phenethylisothiocyanate,PEITC)购自美国LKTlabs公司。碘化丙啶(propidium iodide,PI)荧光染料及二甲基亚砜(DMSO)均购自美国Sigma公司。Cleaved-caspase-3(C-caspase-3)抗体购自美国Cell Signaling公司。Annexin V-FITC荧光染料和RIP、caspase-8抗体购自美国PharMingen公司。PARP抗体购自Biomol公司。β-actin抗体购自Santa Cruz公司。蛋白测定试剂盒购自Pierce公司。

1.3 Annexin V/PI双荧光染色法和流式细胞仪检测细胞凋亡

人急性白血病细胞经PEITC处理,细胞收集后经离心、PBS缓冲液洗涤3次,悬浮于100 μl结合缓冲液(10 mmol/L HEPES,pH 7.4,140 mmol/L NaOH,2.5 mmol/L $CaCl_2$),加入AnnexinV-FTTC 5 μl,PI 10 μl(终浓度为5 μg/μl),振荡混匀,室温避光染色15 min,再加入100 μl结合缓冲液,用流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA)检测细胞凋亡。细胞凋亡率(%)以早期凋亡细胞(Annexin V-positive, PI-negative)率和晚期凋亡细胞(Annexin V-positive and PI-positive)率之和计算。

1.4 Western blot分析

采用美国Invitrogen公司NuPAGE Bis-Tris电泳系统进行Western blot分析。细胞收集后经离心、PBS缓冲液洗涤,用1×NuPAGE LDS细胞裂解液(含50 mmol/L二硫苏糖醇, DTT)裂解细胞后,采用考马斯亮蓝法测定总细胞提取液中的蛋白浓度。取30 μg经SDS-PAGE电泳分离,然后转移至醋酸纤维素膜上,5%无脂牛奶封闭2 h,加一抗在4 ℃过夜孵育,TBS缓冲液洗涤3次,二抗室温孵育2 h,化学发光法检测蛋白表达。

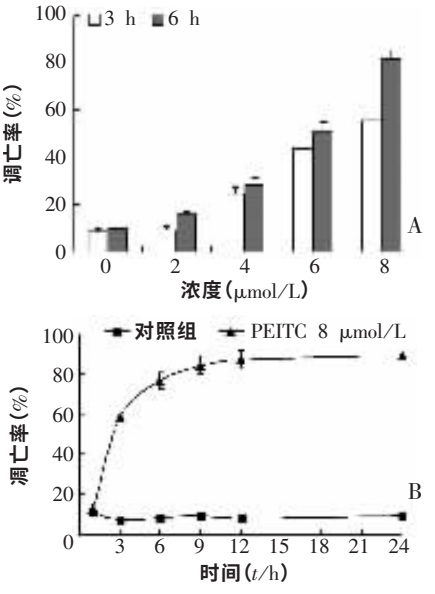
1.5 统计学处理

细胞凋亡结果数据以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Student's t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 PEITC诱导人急性白血病U937细胞发生凋亡并呈明显的量效和时效关系

剂量反应关系研究结果表明(图1A、图2),低剂量(2 μmol/L)的PEITC作用于U937细胞6 h后,引起约15%的细胞发生凋亡;4 μmol/L的PEITC作用细胞3 h和6 h,分别引起25%和35%的细胞发生凋亡;而高浓度(8 μmol/L)的PEITC作用细胞3 h和6 h后,则分别导致约60%和85%的细胞凋亡,呈明显的剂量反应关系。时间反应关系研究结果表明(图1B),8 μmol/L PEITC作用U937细胞3 h就引起约60%的细胞凋亡,6 h后就有约85%的细胞发生凋亡,24 h PEITC引起的细胞凋亡达到饱和,提示PEITC能有效地引起人急性白血病U937细胞发生凋亡并呈明显的时间反应关系。

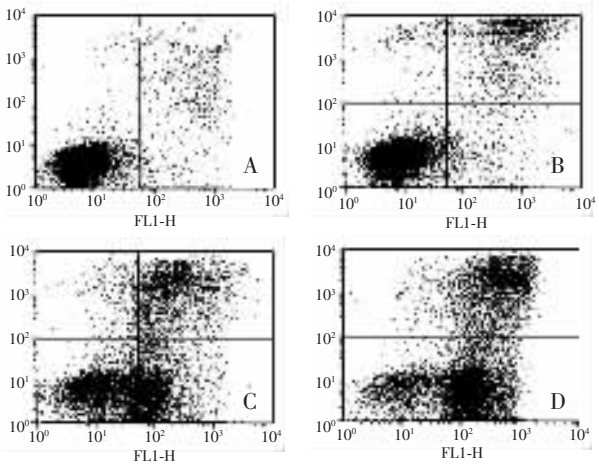


A:以0、2、4、6、8 μmol/L PEITC作用U937细胞3、6 h; B:以8 μmol/L PEITC作用U937细胞1、3、6、9、12、24 h

图1 流式细胞仪检测不同浓度PEITC作用不同时间诱导U937细胞凋亡情况

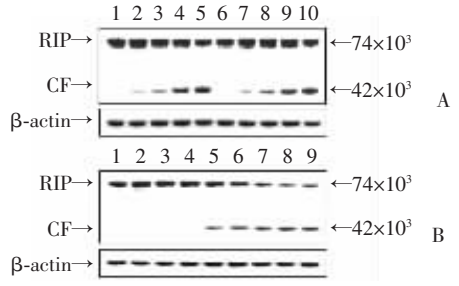
2.2 PEITC能抑制受体作用蛋白RIP的表达及RIP的降解增加

不同剂量PEITC分别作用于U937细胞3 h和6 h后,可引起受体作用蛋白(RIP, 74×10^3)表达逐渐减少,裂解片段(cleaved fragment,CF, 42×10^3)逐渐增多,并呈明显的剂量反应关系(图3A)。8 μmol/L PEITC作用于U937细胞3 h就开始引起RIP表达逐渐减少,并出现CF。随着作用时间的增加,这种作用也随之增加,24 h后则达到最大值(图3B),呈现明显的时间反应关系。以上结果显示PEITC通过诱导U937细胞RIP的降解和CF的活化而导致细胞凋亡发生。



A：对照组凋亡率 4.28%；B：2 μmol/L 凋亡率 15.5%；C：6 μmol/L 凋亡率 61.3%；D：8 μmol/L 凋亡率 85.8%　左下象限 AnnexinV$^+$/PI$^+$ 细胞为活细胞，右下象限 AnnexinV$^+$/PI$^+$ 细胞为早期凋亡细胞，右上象限 Annexin V$^+$/PI$^+$ 细胞为晚期凋亡细胞，左上象限 PI$^+$ 细胞为坏死细胞

图 2　Annexin V-FITC/PI 双染法检测不同浓度 PEITC 诱导 U937 细胞凋亡情况

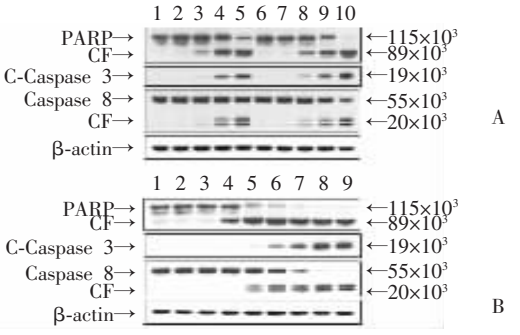


A：不同浓度的 PEITC 作用 U937 细胞 3、6 h　1～5：分别为 0、2、4、6、8 μmol/L PEITC 作用 3 h；6～10：分别为 0、2、4、6、8 μmol/L 作用 6 h；B：8 μmol/L PEITC 作用 U937 细胞不同时间点观察 1～9：分别为 0、0.5、1、2、3、4、6、12、24 h

图 3　Wester blot 检测 PEITC 诱导 U937 细胞 RIP 降解

2.3　PEITC 引起 U937 细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 的降解/活化及 PARP 的降解

为了进一步证明 PEITC 能有效地诱导细胞凋亡，我们采用 Western blot 分析了 PEITC 对 U937 细胞凋亡相关蛋白如凋亡作用底物 PARP 和凋亡蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-8 表达的影响。结果表明（图 4A），低剂量的 PEITC（4 μmol/L）作用 3 h 和 6 h，开始引起起始凋亡蛋白酶 Caspase-8（55×10^3）表达的降低，并出现了降解片段（cleaved fragment，CF，20×10^3），这种效应则随着作用剂量的增加而增加。PEITC 也可引起效应凋亡蛋白酶降解片段 cleaved-Caspase-3（19×10^3）的表达增加，及凋亡作用底物 PARP 的表达（115×10^3）降低和裂解片段（cleaved fragment，CF，89×10^3）增多，呈明显的剂量反应关系。时间反应关系研究结果表明（图 3B），PEITC（8 μmol/L）作用 U937 细胞，2 h 就开始引起 PARP 的表达降低和降解片段 CF 增加，并在 3 h 引起 Caspase-3 和 Caspase-8 降解/活化增加。随着作用时间的增加，PEITC 引起的 PARP 的降解和 Caspase-3 和 Caspase-8 降解/活化也逐渐增加，呈明显的时间反应关系。



A：不同浓度的 PEITC 作用 U937 细胞 3、6 h　1～5：分别为 0、2、4、6、8 μmol/L PEITC 作用 3 h；6～10：分别为 0、2、4、6、8 μmol/L 作用 6 h；B：8 μmol/L PEITC 作用 U937 细胞不同时间点观察 1～9：分别为 0、0.5、1、2、3、4、6、12、24 h

图 4　PEITC 对 PARP 降解和 Caspase-3、Caspase-8 降解/活化的影响

3　讨论

细胞凋亡是一种在基因控制下的主动死亡过程，是一系列生化级联反应的结果，以形态和生化上出现一定的改变为特征。近年来的研究显示，细胞凋亡主要有两条信号转导通路：线粒体依赖性途径和死亡受体途径。近年实验研究显示，线粒体在细胞凋亡中发挥着关键作用。某些与凋亡相关的基因产物（蛋白质和酶）均可定位于细胞线粒体。当细胞发生凋亡时，线粒体可释放一些蛋白质如细胞色素 C 进入细胞质，在 ATP 或 dATP 协同作用下，与凋亡蛋白酶活化因子-1（Apaf -1）结合使其分子变构，激活 Caspase-9，进而激活效应凋亡蛋白酶 Caspase-1 或 Caspase-3 等酶系以导致细胞凋亡[10]。死亡受体途径则是另一条细胞凋亡的主要途径。其机制主要是通过与细胞表面的死亡受体结合，启动 caspase 的级联反应，使起始凋亡蛋白酶 Caspase-8 激活，导致效应凋亡蛋白酶 Caspase-3 的降解/活化，随后降解胞内结构蛋白和功能蛋白，最终导致细胞凋亡[11]。本实验结果显示不同剂量的 PEITC 作用于人急性白血病细胞可导致细胞凋亡发生，并呈现良好量效关系和时效关系。8 μmol/L PEITC 作用 U937 细胞后 3 h，就可观察到细胞凋亡，并观察到 Caspase-8 和凋亡作用底物 PARP 表达降低，及其裂解片段增加。同时，PEITC 还可引起 cleaved-Caspase-3 的表达增加，提示 PEITC 可能是通过死亡受体途径而导致急性白血病细胞发生凋亡[8]。

本研究结果还发现，PEITC 作用于人急性白血病 U937 细胞，引起受体作用蛋白的表达降低，及其裂解片段增加，提示 RIP 的降解可能在 PEITC 诱导细胞凋亡中发挥重要作用。RIP 是近年来在研究凋亡信号转导的 NF-κB 途径过程中发现的一种受体作用蛋白，其表达可以抑制 caspase-8 的活化、激活 NF-κB 途径进而

促进细胞增殖[12]。RIP是一个分子量为74×10^3的是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，它由一个酪氨酸蛋白激酶有同源性的结构域，一个死亡域和一个Spacer域组成。其C端具有死亡结构域，与肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)的死亡域有同源性，故可以利用其死亡域与TNFR相关死亡蛋白(TARDD)和Fas相关死亡蛋白(FADD)相互作用而转导凋亡信号，也有研究发现其死亡结构域(DD)与TRADD作用后可使IKK激酶复合体中重要组成成员IKKβ磷酸化，从而激活转录因子NF-κB促进细胞增殖[13]。O'Donnell等[14]研究表明，RIP是一个双功能分子，既可以通过活化核NF-κB启动增殖信号，也能引起死亡，依据它的泛肽化状态的不同或促增殖或促死亡，它是在TNF信号早期独立于NF-κB的细胞死亡之开关。其机制之一是caspase-8可以分裂RIP1产生C末端片段，此片段可以活化死亡诱导信号复合体，减弱NF-κB的活化，因此可以扩大caspase-8引发的下游细胞凋亡事件，然而未分裂RIP1可以促使NF-κB的活化，而抗TNF诱导的细胞凋亡[15]。

近年来研究表明，CARP2是一种含泛素蛋白连接酶的环形域，它是一种肿瘤坏死因子(TNF)诱导NF-κB活化的负调节蛋白。CARP2通过与内在化TNF受体复合物相互作用，引起RIP泛素华和蛋白降解，从而减弱TNF诱导的NF-κB的活化，导致细胞发生凋亡[16]。另据报道，锌指蛋白A20也是NF-κB的负调节蛋白，而受体作用蛋白(RIP)是A20的关键靶分子。A20主要通过赖氨酸48连接的泛素华促使RIP蛋白降解，最终抑制NF-κB的活化[17]。本研究结果表明，RIP的降解可能在PEITC诱导人白血病细胞凋亡中起关键作用，但是PEITC是通过哪一种机制引起RIP的下调和蛋白降解的，受体作用蛋白是否在PEITC诱导人急性白血病细胞凋亡中发挥作用需更进一步的研究加以证实。因此，本研究工作为进一步研究PEITC诱导RIP下调和蛋白降解的作用机制，以及研究RIP是否通过下调NF-κB的转录活性来调控PEITC诱导人白血病细胞发生凋亡提供了前期工作基础。我们将深入研究PEITC诱导RIP下调和蛋白降解的作用机制，并研究其对RIP下游相关的信号转导通路如NF-κB的影响，最终阐明PEITC诱导人白血病细胞发生凋亡的分子机制。

参考文献：

[1] Miller A B, Altenburg H P, Bueno-de-Mesquita B, *et al*. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition [J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 269-276.

[2] Benito E, Obrador A, Stiggelbout A, *et al*. A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors [J]. Int J Cancer, 1990, 45(1): 69-76.

[3] Zhang Y, Yao S, Li J. Vegetable-derived isothiocyanates: anti-proliferative activity and mechanism of action[J]. Proc Nutr Soc, 2006, 65(1): 68-75.

[4] Kang L, Wang Z Y. Breast Cancer Cell Growth Inhibition by Phenethyl Isothiocyanate is Associated with Downregulation of Estrogen Receptor-alpha36[J]. J Cell Mol Med, 2009, [Epub ahead of print].

[5] Balansky R, Ganchev G, Iltcheva M, *et al*. Prevention of cigarette smoke-induced lung tumors in mice by budesonide, phenethyl isothiocyanate, and N-acetylcysteine[J]. Int J Cancer, 2009, 126(5): 1047-1054.

[6] Gong A, He M, Krishna-Vanaja D, *et al*. Phenethyl isothiocyanate inhibits STAT3 activation in prostate cancer cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(7): 878-886.

[7] Cheung K L, Khor T O, Yu S, *et al*. PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway[J]. AAPS J, 2008, 10(2): 277-281.

[8] Satyan K S, Swamy N, Dizon D S, *et al*. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) inhibits growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis: role of caspase and MAPK activation[J]. Gynecol Oncol, 2006, 103(1): 261-270.

[9] Johnson C R, Chun J, Bittman R, *et al*. Intrinsic cytotoxicity and chemomodulatory actions of novel phenethylisothiocyanate sphingoid base derivatives in HL-60 human promyelocytic leukemia cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 309(2): 452-461.

[10] Martinou J C, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria : all or nothing[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(3): E41-E43.

[11] Goke R, Goke A, Goke B, *et al*. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by transcription factors[J]. Cell Immunol, 2000, 201(2): 77-82.

[12] Stanger B Z, Leder P, Lee T H, *et al*. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death[J]. Cell, 1995, 81(4): 513-523.

[13] Reinhard C, Shamoon B, Shyamala V, *et al*. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2 [J]. EMBO J, 1997,16(5): 1080-1092.

[14] O'Donnell M A, Legarda-Addison D, Skountzos P , *et al* . Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling[J]. Curr Biol, 2007, 17(5): 418-424.

[15] Kim J W, Choi E J, Joe C O. Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP[J]. Oncogene, 2000, 19(39): 4491-4499.

[16] Liao W, Xiao Q, Tchikov V, *et al*. CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin ligase for RIP and regulates TNF-induced NF-kappaB activation [J]. Curr Biol, 2008, 18(9): 641-649.

[17] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al*. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling [J]. Nature, 2004, 430(7000): 694-699.

(**收稿**:2009-10-28;**修回**:2009-12-17)

(编辑　邓强庭)