文章编号:1000-5404(2011)14-1451-04

论著

PARG 抑制对小鼠结肠癌 CT26 细胞 VEGF-C 蛋白表达调控的初步研究

吴伟强,王娅兰,颜佳欣,潘 娟 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 初步探讨多聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[poly-(ADP-ribose)glycohydrolase,PARG]抑制对小鼠结肠癌 CT26 细胞 VEGF-C 蛋白表达影响。**方法** 分为实验组(GLTN 处理)与对照组(GLTN 未处理),采用 Western blot 法检测 2 组小鼠结肠癌 CT26 细胞的 PARG、PARP-1、NF-κB 及 VEGF-C 的蛋白表达变化;RT-PCR 分析实验组与对照组的 VEGF-C mRNA 水平变化;ELISA 法检测 2 组小鼠结肠癌 CT26 细胞上清液 VEGF-C 蛋白表达变化。**结果** PARG 抑制后小鼠结肠癌 CT26 细胞表达的 PARG 和 NF-κB 蛋白较对照组下降($P<0.01$),PARP-1 和 VEGF-C 蛋白较对照组降低($P<0.01$)。RT-PCR 结果显示,实验组 CT26 细胞株 VEGF-C mRNA 表达[相对灰度值为(0.39±0.08)]较对照组[相对灰度值为(0.63±0.04)]显著下降($P<0.01$)。实验组小鼠结肠癌 CT26 细胞分泌的 VEGF-C 蛋白量[(95.86±5.43)pg/ml]较对照组[(1 99.32±0.75)pg/ml]明显降低($P<0.05$)。**结论** 在小鼠结肠癌 CT26 细胞中,抑制 PARG 可下调 PARP-1 和 NF-κB 的表达,从而使 VEGF-C 表达下降,这可能在抑制肿瘤淋巴管形成中起重要作用。

[关键词] 多聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶;多聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶;NF-κB;血管内皮生长因子 C;肿瘤淋巴管形成

[中图法分类号] R735.35;R394.3;R730.23 [文献标志码] A

Effect of PARG inhibition on VEGF-C expression in mice colon cancer CT26 cells

Wu Weiqiang, Wang Yalan, Yan Jiaxin, Pan Juan (Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibition in the regulation of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) expression in colon cancer cell CT26 in mice. **Methods** CT26 cells were divided into an experimental group and a control group. CT26 cells in the experimental group were treated with PARG inhibitor gallotannin (GLTN). The expression levels of PARG, PARP-1, NF-κB and VEGF-C were detected by Western blotting. The VEGF-C mRNA level changes of the two groups were detected by RT-PCR. The VEGF-C protein level changes in the supernatants of cultured CT26 cells in the two groups were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Western blot results showed that the PARG, PARP-1, NF-κB, and VEGF-C protein levels in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). The VEGF-C mRNA level (0.39±0.08) and the VEGF-C protein level (95.86±5.43) pg/ml in the experimental group were significantly lower than that (0.63±0.04) in the control group ($P<0.01$) and that (199.32±0.75) pg/ml in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** In mouse colon cancer cell CT26, PARG inhibition dramatically reduces VEGF-C expression by down-regulating PARP-1 and NF-κB expression in the nuclear factor NF-κB signaling pathway. PARG inhibition may have an anti-lymphangiogenc effect and contribute to the prevention of metastatic dissemination via lymph system.

[**Key words**] poly-(ADP-ribose)glycohydrolase; poly(ADP-ribose) polymerase; nuclear factor-κB; vascular endothelial growth factor C; tumor lymphangiogenesis

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30870946). Corresponding author: Wang Yalan, E-mail: wangyalan074@126.com

肿瘤细胞浸润和转移在肿瘤的恶性发展中起重要作用。因此,对恶性肿瘤的治疗主要目标之一就是防止肿瘤的转移。淋巴结转移是上皮来源恶性肿瘤细胞

[基金项目] 国家自然科学基金(30870946)

[通信作者] 王娅兰, E-mail: wangyalan074@126.com

扩散的主要途径,而且常常会影响患者的预后。最近研究表明,肿瘤诱导淋巴管生成是促进肿瘤细胞淋巴结转移的一种重要因素[1]。血管内皮生长因子C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)是淋巴管生成的最重要因子之一,可与淋巴管内皮细胞受体VEGFR-3结合,促进淋巴管生成。因此,抑制VEGF-C的表达有助于抑制肿瘤淋巴管的生成。

在细胞多聚(腺苷二磷酸核糖)[poly(ADP-ribose),PAR]化过程中,多聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]和多聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[poly(ADP-ribose) glycohydrolase, PARG]发挥着重要的作用。PARG是目前发现唯一的PAR化过程中的水解酶,主要分布于细胞质。PAR由PARP合成后,具有活性的PARG可迅速通过核浆穿梭机制进入细胞核,将其水解成二磷酸腺苷(ADP)核糖单体和一磷酸腺苷(AMP)。PARP也可作为受体蛋白与PAR结合而失活,但通过PARG的水解作用,PARP又能恢复活性,重新投入PAR化的循环当中[2]。PARG对PARP的活性起着重要的调节作用。我们的前期研究发现PARG抑制可通过下调血管形成相关因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达而抑制肿瘤微血管的形成[3]。那么PARG抑制是否会影响肿瘤侵袭转移过程中淋巴管的形成呢?

本研究采用PARG抑制剂单宁酸(gallotannin, GLTN)处理小鼠结肠癌CT26细胞后,采用Western blot法观察PARG、PARP-1、NF-κB及VEGF-C的蛋白表达变化,采用RT-PCR方法检测VEGF-C mRNA的水平变化,采用ELISA法观察小鼠结肠癌CT26细胞分泌的VEGF-C的蛋白表达变化。通过PARG抑制对VEGF-C蛋白表达调控进行初步研究,旨在探讨PARG抑制在肿瘤淋巴管形成中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

小鼠结肠癌CT26细胞株由四川大学华西医院魏于全教授惠赠,GLTN购自Sigma公司,RPMI1640购自Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,SDS-PAGE试剂盒和蛋白浓度检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所,核及胞质蛋白裂解液购自Pierce公司,PVDF膜购自Millipore公司,PARP-1多克隆抗体,NF-κB单克隆抗体和β-actin多克隆抗体购自Santa Cruz公司,PARG多克隆抗体,VEGF-C抗体购自Abcam公司,RNAiso Plus试剂盒和PrimeScript Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自TaKaRa公司,ELISA试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司。引物由上海生物工程公司设计和合成。

1.2 细胞培养

小鼠结肠癌CT26细胞株于含10%胎牛血清,青霉素(100 U/ml),链霉素(100 μg/ml)RPMI1640培养基,5% CO_2,37 ℃培养箱培养。将处于对数生长期的CT26细胞3×10^5/ml细胞培养24 h后,实验组加入最终浓度为100 μmol/L的PARG抑制剂GLTN,对照组加入不含GLTN的等体积生理盐水,再继续培养6 h后,做后续试验。

1.3 Western blot检测PARG、PARP-1、NF-κB和VEGF-C蛋白的表达

当实验组CT26细胞用100 μmol/L的GLTN预处理6 h后,将实验组与对照组CT26细胞用PBS洗涤3次,再根据蛋白提取试剂盒说明提取蛋白。采用Bradford方法检测蛋白浓度。等量的蛋白(25 μg)进行聚丙烯酰胺凝胶(8%)电泳,采用半干法将凝胶内的蛋白质转至PVDF膜上,用含5%脱脂牛奶的TBST溶液室温封闭1.5 h左右,再分别与兔抗鼠多克隆抗体PARG(1∶300)、兔抗鼠多克隆抗体PARP-1(1∶300)、小鼠抗小鼠NF-κB的单克隆抗体(1∶500)、兔抗鼠VEGF-C的(1∶200)和兔抗鼠β-actin(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,与二抗生物素化兔抗兔IgG或兔抗鼠IgG(稀释度皆为1∶1 000)室温孵育1 h,与ECL试剂反应。采用Bio-Rad凝胶成像仪拍摄凝胶图像,并用Quantity One软件分析灰度值,以目的蛋白与其对应的β-actin灰度值之比来比较目的蛋白表达量。

1.4 RT-PCR测定VEGF-C mRNA表达

用RNAiso Plus试剂盒提取实验组与对照组CT26细胞总RNA,操作按试剂盒说明书进行。琼脂糖凝胶电泳实验检测RNA完整性,用紫外分光光度计测定其浓度和纯度,计算样品总RNA浓度。根据GenBank中小鼠VEGF-C基因序列,利用Primer Premier 5.0软件按照测序引物设计的一般原则,设计1对引物,其特异性在NCBI数据库中做BLAST对比。按照Prime Script Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书进行逆转录聚合酶链式反应实验。反应体系扩增条件:94 ℃变性45 s、60 ℃复性30 s、72 ℃延伸45 s,共33个循环,最后72 ℃再延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,由Bio-Rad凝胶成像仪拍摄PCR产物凝胶图像,并用Quantity One软件进行相对定量分析。以目的条带和内参β-actin的灰度比值来判断VEGF-C mRNA表达高低。见表1。

表1 RT-PCR实验中合成的引物序列及预期产物长度

基因	引物序列	产物长度(bp)
VEGF-C	上游:5′-TTCTCGGAAGCGGAGCCCGA-3′	153
	下游:5′-GCCTTTCCGCAGCTGGCACT-3′	
β-actin	上游:5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′	593
	下游:5′-GCCAGGATAGAGCCACCATA-3′	

1.5 ELISA法检测培养细胞上清液VEGF-C蛋白

当实验组CT26细胞用100 μmol/L的GLTN预处理6 h后,分别收集实验组与对照组CT26细胞的上清液。采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测CT26细胞分泌的VEGF-C蛋白表达量,操作步骤按照试剂盒说明书操作进行。测量D(450)值(15 min内),按照标准品曲线换算为相应的含量(pg/ml)。

1.6 统计学分析

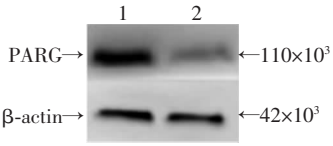
实验均重复3次,数据以$\bar{x}\pm s$表示,SPSS 13.0统计软件

进行单因素方差分析,组间差异行 t 检验。

2 结果

2.1 GLTN 对 PARG 蛋白表达的影响

实验组蛋白相对灰度值(0.20±0.02)与对照组(0.97±0.04)比较,表达显著减弱($P<0.01$),说明 PARG 的蛋白表达显著低于对照组。见图1。

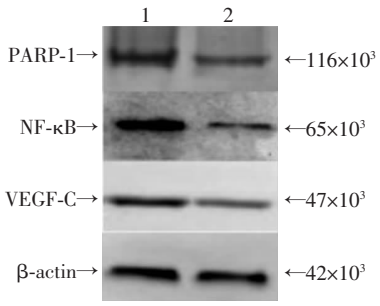


1:对照组;2:实验组

图1 Western blot 检测 PARG 蛋白在实验组和对照组细胞中的表达

2.2 PARG 抑制对 PARP-1、NF-κB 和 VEGF-C 蛋白表达的影响

与对照组[PARP-1(0.72±0.04)、NF-κB(0.83±0.03)、VEGF-C(0.56±0.02)]比较,实验组 PARP-1(0.27±0.01)、NF-κB(0.21±0.02)、VEGF-C(0.22±0.01)的蛋白表达显著下降($P<0.01$)。说明 PARG 抑制对 PARP-1、NF-κB 和 VEGF-C 的蛋白表达有明显的抑制作用。见图2。

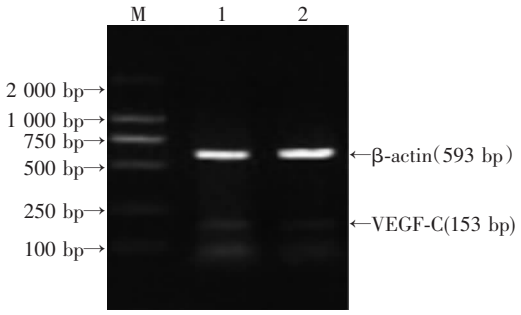


1:对照组;2:实验组

图2 Western blot 检测 PARP-1、NF-κB 和 VEGF-C 蛋白在实验组和对照组细胞中的表达

2.3 PARG 抑制对 VEGF-C mRNA 表达水平的影响

RT-PCR 结果显示,实验组 VEGF-C mRNA 表达[相对灰度值为(0.39±0.08)]较对照组[相对灰度值为(0.63±0.04)]显著下降($P<0.01$)。见图3。



M:DNA 标准(DL 2000);1: 对照组;2:实验组

图3 RT-PCR 检测实验组和对照组中 VEGF-C mRNA 的表达

2.4 PARG 抑制对 CT26 细胞分泌的 VEGF-C 蛋白影响

ELISA 检测结果显示:与对照组 CT26 细胞分泌的 VEGF-C 蛋白量[(199.32±0.75)pg/ml]相比,实验组[(95.86±5.43)pg/ml]显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

在细胞内动态的 PAR 化过程中,存在着两种重要的酶,即 PARP 和 PARG。小鼠单个 PARG 基因能编码2个 PARG 蛋白,分别为长链的核浆亚型(110×10^3)和短链的胞浆亚型(65×10^3)。PARG 的水解活性主要为前者[4]。PARP 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)为底物,生成尼克酰胺和 ADP-核糖,并使后者形成 PAR 聚合物,共价结合到相关的核蛋白受体和其自身。但 PAR 由 PARP 合成后,几乎立即被具有活性的 PARG 水解,分解成 AMP 和 ADP 核糖单体。PARP 本身可作为受体蛋白与 PAR 结合,与 PAR 结合后的 PARP 失活,但通过 PARG 的水解作用,PARP 能恢复活性,重新进入 PAR 化的循环当中[2]。文献[4-5]报道:在炎症和肿瘤性疾病中,PARG 基因沉默或药物抑制可下调 PARP 的活性。我们先前的研究显示 PARG 与 PARP 在大肠癌中表达呈正相关,PARG 抑制后,PARP 的活性降低[6]。可见,PARG 对 PARP 的活性起着重要的调节作用。

文献[7-8]报道:敲除 PARG 基因或药物抑制 PARG 后,可增强细胞的毒性和早期胚胎死亡,可下调 ICAM-1、P-selectin、VCAM-1 等因子的表达。我们先前的研究也发现,PARG 表达与大肠癌微血管形成相关因子 VEGF 和 bFGF 成正相关,抑制 PARG 可抑制肿瘤微血管的形成[3]。VEGF-C 被认为在肿瘤诱导淋巴管生成的关键调控因子之一。VEGF-C 诱导淋巴管生成主要是通过结合位于淋巴管内皮细胞的 VEGFR-3 实现的。文献[9-10]报道:VEGF-C 的过表达可促进乳腺癌肿瘤淋巴管生成和增强区域淋巴结转移;抑制 VEGF-C 蛋白表达,可抑制肿瘤淋巴管生成,肿瘤的生长和区域淋巴结转移,从而抑制肿瘤生长和淋巴结转移。根据文献[11]和我们前期采用 GLTN 对大肠癌细胞 PARG 抑制研究结果[3,6],选用 GLTN 效果最明显的剂量及作用时间为本研究的作用剂量及时间,对小鼠结肠癌 CT26 细胞中的 PARG 进行抑制,结果显示,实验组中 PARG 较对照组显著降低,VEGF-C 的表达也较对照组明显降低,差异具有显著性。我们推测,在结肠癌中,PARG 对 VEGF-C 的表达有调控作用。

NF-κB 参与多种生理和病理过程,如免疫、炎症、细胞增殖、凋亡或胚胎的发育。激活的 NF-κB 含有

NF-κB/Rel转录因子家族成员二聚体结合区。文献[12]报道:PARP-1在许多炎症疾病中是1个NF-κB的共同激活因子。有学者推测:PARP-1的p300/CREB-binding蛋白乙酰化在依赖NF-κB的转录基因表达方面起着至关重要的调控作用[13]。我们先前研究表明:PARP抑制可显著减弱其与NF-κB结合的活性[14]。本研究应用PARG抑制剂GLTN后,NF-κB表达也降低,与我们先前的研究一致[15]。有研究表明,NF-κB可结合到VEGF-C的启动子中NF-κB序列区[16]。NF-κB还调控Heregulin-β-1诱导的人乳腺癌细胞分泌的VEGF-C的表达[17]。在卵巢上皮癌中,Her-2/neu因子过表达可通过激活NF-κB信号通路使VEGF-C蛋白表达上调[18]。炎症细胞因子(如IL-1β)也可通过激活NF-κB信号通路上调VEGF-C的表达,促进炎症反应的淋巴管生成[19]。本研究结果也显示,PARG抑制可下调VEGF-C的表达,同时也抑制了NF-κB的表达,推测PARG抑制可能通过NF-κB信号通路调控VEGF-C的表达,在肿瘤淋巴管生成中发挥作用,但详尽机制尚有待进一步研究。

在本研究中,我们也注意到PARG抑制同时抑制了PARP的表达,推测其可能是由于抑制NF-κB活性,反馈抑制了PARP的表达有关[20],确切机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Ou J, Li J, Pan F, *et al*. Endostatin suppresses colorectal tumor-induced lymphangiogenesis by inhibiting expression of fibronectin extra domain A and integrin α9 [J]. J Cell Biochem, 2011, 4. doi: 10.1002/jcb. 23130.

[2] Woon E C, Threadgill M D. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition where now? [J]. Curr Med Chem, 2005, 12(20): 2373 - 2392.

[3] 林玲, 林晓, 王娅兰. 大肠癌组织中PARG与血管生成相关因子的关系[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2010, 36(3): 439 - 442.

[4] Cortes U, Tong W M, Coyle D L, *et al*. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(16): 7163 - 7178.

[5] Lu X C, Massuda E, Lin Q, *et al*. Post-treatment with a novel PARG inhibitor reduces infarct in cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 2003, 978(1/2): 99 - 103.

[6] 李佳, 林玲, 王娅兰. 大肠癌中聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶对聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶的调节作用及意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(5): 420 - 422.

[7] Koh D W, Lawler A M, Poitras M F, *et al*. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(51): 17699 - 17704.

[8] Cuzzocrea S, Mazzon E, Genovese T, *et al*. Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the development of inflammatory bowel disease in mice[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(1): 90 - 105.

[9] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, *et al*. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192 - 198.

[10] Zhang D, Li B, Shi J, *et al*. Suppression of tumor growth and metastasis by simultaneously blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-C with a receptor-immunoglobulin fusion protein[J]. Cancer Res, 2010, 70(6): 2495 - 2503.

[11] Rapizzi E, Fossati S, Moroni F, *et al*. Inhibition of poly(ADP-Ribose) glycohydrolase by gallotannin selectively up-regulates expression of proinflammatory genes[J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 890 - 898.

[12] Zheng L, Szabo C, Kern T S. Poly (ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy *via* regulation of nuclear factor-kappaB[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2960 - 2967.

[13] Hassa P O, Haenni S S, Buerki C, *et al*. Acetylation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription[J]. J Biol Chem, 2005, 280(49): 40450 - 40464.

[14] Li M, Threadgill M D, Wang Y, *et al*. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition down-regulates expression of metastasis-related genes in CT26 colon carcinoma cells[J]. Pathobiology, 2009, 76(3): 108 - 116.

[15] 李巧转, 王娅兰, 李娴. 慢病毒PARG-shRNA转染降低大肠癌lovo细胞基质黏附、运动和侵袭能力[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(3): 237 - 241.

[16] Zhang Q, Lu Y, Proulx S T, *et al*. Increased lymphangiogenesis in joints of mice with inflammatory arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(6): R118.

[17] Tsai P W, Shiah S G, Lin M T, *et al*. Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 5750 - 5759.

[18] Hsieh C Y, Chen C A, Chou C H, *et al*. Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF-kappa B: implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis[J]. J Biomed Sci, 2004, 11(2): 249 - 259.

[19] Watari K, Nakao S, Fotovati A, *et al*. Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis: Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF-kappaB activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(3): 826 - 831.

[20] Bharti A C, Donato N, Singh S, *et al*. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis[J]. Blood, 2003, 101(3): 1053 - 1062.

(**收稿**:2010-12-15;**修回**:2011-01-17)

(编辑　吴培红)