论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0240-04

罗格列酮激活 p38MAPK 通路调控 p53 及 p21 影响人肝癌 HepG2 细胞周期

张 萌,彭 利,乔治斌,何宏涛,周 烨 (050011 石家庄,河北医科大学第四医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)通路及相关蛋白在罗格列酮引发的人肝癌 HepG2 细胞周期阻滞过程中的作用。**方法** MTT 法检测罗格列酮对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响,流式细胞术检测细胞周期分布,Western blot 检测 p38MAPK 通路相关蛋白的表达变化。**结果** 罗格列酮可抑制 HepG2 细胞的增殖,并引发 G_0/G_1 期阻滞($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示罗格列酮可激活 p38MAPK 通路,上调 HepG2 细胞中磷酸化 p53 蛋白及 p21 蛋白的表达水平($P<0.05$);而 ERK1/2 及 JNK 的磷酸化程度没有明显变化。p38MAPK 通路抑制剂 SB203580 可明显减弱罗格列酮对 HepG2 细胞的增殖抑制及周期阻滞作用;并且 SB203580 可部分逆转由罗格列酮引发的磷酸化 p53 及 p21 蛋白的表达变化。**结论** 罗格列酮可通过激活 p38MAPK 通路引发人肝癌 HepG2 细胞周期阻滞,其机制可能与 p38MAPK 通路激活后参与对磷酸化 p53 蛋白及 p21 蛋白的调控有关。

[关键词] 罗格列酮;肝细胞癌;细胞周期;p38 丝裂原活化蛋白激酶; p53;p21
[中图法分类号] R73-361; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Rosiglitazone induces cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 *via* p38MAPK/p53/p21 pathway

Zhang Meng, Peng Li, Qiao Zhibin, He Hongtao, Zhou Ye (Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050011, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of p38MAPK signaling pathway in rosiglitazone (ROZ)-induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Methods** HepG2 cells were treated with different concentrations of ROZ. The proliferation inhibitory rates were analyzed by MTT assay. Cell cycle distributions were detected by flow cytometry (FCM). Western blotting was used to detect the expression of proteins related to p38MAPK signaling pathway. **Results** ROZ significantly inhibited proliferation of HepG2 cells, and induced an increase in the percentage of G_0/G_1 phase cells and a decrease in the percentage of S phase cells accompanied by the change in DNA ploidy ($P<0.05$). ROZ increased p38MAPK phosphorylation but not ERK1/2 or JNK phosphorylation, and up-regulated the protein expression levels of p-p53 and p21 in HepG2 cells ($P<0.05$). In addition, the ROZ-induced cell proliferation inhibition and cell cycle arrest were partly blocked by p38MAPK inhibitor SB203580, as well as the changes of p-p53 and p21 proteins. **Conclusion** ROZ inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in G_0/G_1 stage of HepG2 cells by the activation of p38MAPK pathway, which may be mediated by the p38MAPK/p53/p21 signaling axis.

[**Key words**] rosiglitazone;hepatocellular carcinoma;cell cycle;p38MAPK;p53;p21

Supported by the Project of Key Specific Discipline From Colleges and Universities of Hebei Province(2005-52) and the Project of Hebei Provincial Department of Health(06142). Corresponding author:Peng Li, Tel:86-311-86095340

恶性肿瘤的发生、发展与细胞周期调控紊乱引发的细胞无限增殖密切相关。近期研究发现,噻唑烷二酮类药物可通过多条细胞内信号通路,引发肿瘤细胞周期阻滞、诱导凋亡、抑制肿瘤细胞增殖,但具体机制尚不清楚[1]。丝裂原活化蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞内主要的信号转导系统之一,在细胞的增殖、分化及凋亡等进程中发挥重要作用[2]。由于其参与介导肿瘤细胞周期的调节,成为目前研究的热点[3-4]。噻唑烷二酮类药物是否可以通过 MAPKs 家族影响肝癌细胞的细胞周期及增殖,目前尚不清楚。本实验通过观察噻唑烷二酮类典型药物罗格列酮(rosiglitazone,ROZ)对体外培养的人肝癌 HepG2 细胞

[基金项目] 河北省高校强势特色学科资助项目(2005-52);河北省卫生厅资助课题(06142)
[通信作者] 彭 利,电话:(0311)86095340
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2215.021.html(2013-12-19)

周期与增殖的影响,检测 MAPKs 家族及相关蛋白 p53 和 p21 的表达变化,探讨其具体机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞系 HepG2 由河北医科大学第四医院科研中心提供。罗格列酮购自北京上草生物科技有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO)后过滤除菌,-20 ℃保存。β-actin、p-p53 和 p21 鼠抗人单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔抗人细胞外信号调节激酶 1/2(extra cellular signal-regulated protein kinase, ERK1/2)、p-ERK1/2、c-Jun 氨基末端蛋白激酶(c-Jun NH_2-terminalprotein kinase,JNK)和 p-JNK 多克隆抗体及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinases, p38MAPK)、p-p38MAPK 单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling 公司。p38MAPK 通路抑制剂 SB203580 购自美国 Sigma 公司。细胞蛋白提取试剂盒、Bradford 法蛋白定量试剂盒及 DAB 检测试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞置于 5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中,培养基为含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640。每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 将 HepG2 细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板,孵育 24 h 后加入不同浓度的罗格列酮(终浓度分别为 1、10、100 μmol/L)、10 μmol/L SB203580 及 100 μmol/L 罗格列酮 + 10 μmol/L SB203580,每组设 6 个复孔,设阴性对照组(只加等量 DMSO)及空白组(只加培养液)。培养 12、24、36 h 后,加入 20 μL(5 mg/mL) MTT,孵育 4 h,弃上清液,加入 100 μL DMSO,振荡 10 min 至结晶充分溶解,于酶标仪 490 nm 波长处测定每孔光密度值[D(490)]。实验重复 3 次。

细胞增殖抑制率 = [对照组 D(490) - 实验组 D(490)]/[对照组 D(490) - 空白组 D(490)] × 100%

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布 取 HepG2 细胞(5×10^5 个/培养瓶),按照以上方法进行细胞培养和分组,24 h 后收获细胞。经 70% 冰乙醇固定 12 h 后离心弃固定液,PBS 重悬 5 min 后 500 目筛网过滤成单细胞悬液,加入 DNA 染色液 4 ℃避光 30 min 后上机检测。依据 DNA 细胞周期拟合分析所得组方图,计算出各时相分布的百分比。实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达变化 按照以上方法细胞培养和分组,收获细胞,按照试剂盒说明提取细胞总蛋白并检测蛋白浓度。取 50 μg 样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h,分别加入 1∶200 稀释的 β-actin 和 p-p53 抗体、1∶500 稀释的 ERK1/2 和 p-ERK1/2、JNK 和 p-JNK、p38MAPK 和 p-p38MAPK 抗体、1∶150 稀释的 p21 单克隆抗体,4 ℃过夜;加入相应二抗,37 ℃孵育 2 h,DAB 试剂盒显色,β-actin 为内参照。条带进行光密度值分析,将目标条带与 β-actin 条带的光密度值之比作为其蛋白表达水平的参数。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较行方差分析,其中两两比较行 S-N-K 检验,两组均数比较行 t 检验。

2 结果

2.1 罗格列酮对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

MTT 结果显示,罗格列酮能够明显抑制 HepG2 细胞的增殖。1 μmol/L 罗格列酮作用 12 h 后,HepG2 细胞的增殖抑制率为(4.58 ± 1.62)%,较对照组有显著提高($P<0.05$),而 100 μmol/L 罗格列酮作用 24 h 后抑制率可达到(40.32 ± 3.15)% ($P<0.05$),10 μmol/L SB203580 单独作用对 HepG2 细胞的增殖无明显影响,但可以减弱 100 μmol/L 罗格列酮的增殖抑制作用($P<0.05$)。见表 1。

表 1 罗格列酮作用不同时间对 HepG2 细胞的增殖抑制作用($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	36 h
对照组	0	0	0
10 μmol/L SB203580 组	0.12 ± 0.84	0.10 ± 0.85	0.05 ± 0.91
ROZ 组			
1 μmol/L	4.58 ± 1.62[a]	13.01 ± 1.26[ad]	15.72 ± 2.07[ade]
10 μmol/L	7.34 ± 1.98[ab]	15.87 ± 2.71[abd]	31.15 ± 3.09[abde]
100 μmol/L	16.04 ± 2.21[abc]	40.32 ± 3.15[abcd]	49.38 ± 2.11[abcde]
100 μmol/L ROZ + 10 μmol/L SB203580 组	9.35 ± 2.38[f]	20.14 ± 3.29[f]	32.75 ± 3.41[f]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 1 μmol/L ROZ 组比较;c:$P<0.05$,与 10 μmol/L ROZ 组比较;d:$P<0.05$,与 12 h 比较;e:$P<0.05$,与 24 h 比较;f:$P<0.05$,与 100 μmol/L ROZ 组比较

2.2 罗格列酮对 HepG2 细胞周期分布的影响

流式细胞术检测结果显示,罗格列酮作用后,HepG2 细胞 G_0/G_1 期比例显著升高,S 期细胞比例显著降低,且呈现明显的浓度依赖性($P<0.05$)。10 μmol/L SB203580 单独作用对 HepG2 细胞周期分布无明显影响,但可以减弱 100 μmol/L 罗格列酮引发的细胞周期阻滞($P<0.05$)。见表 2。

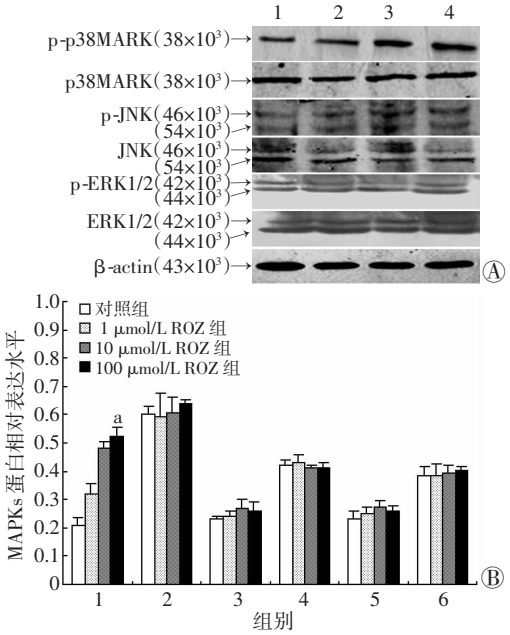
表 2 罗格列酮和 SB203580 对 HepG2 细胞周期分布的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	27.53 ± 2.12	63.61 ± 1.34	8.86 ± 0.84
10 μmol/L SB203580 组	29.07 ± 1.53	62.95 ± 2.17	7.98 ± 0.63
ROZ 组			
1 μmol/L	38.43 ± 2.66[a]	53.20 ± 3.08[a]	8.37 ± 1.39
10 μmol/L	44.91 ± 2.46[ab]	45.11 ± 2.77[ab]	9.98 ± 1.82
100 μmol/L	63.92 ± 3.15[abc]	27.36 ± 1.37[abc]	8.72 ± 0.97
100 μmol/L ROZ + 10 μmol/L SB203580 组	50.84 ± 1.60[d]	40.21 ± 1.36[d]	8.95 ± 0.61

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 1 μmol/L ROZ 组比较;c:$P<0.05$,与 10 μmol/L ROZ 组比较;d:$P<0.05$,与 100 μmol/L ROZ 组比较

2.3 罗格列酮对 HepG2 细胞中 MAPKs 家族相关蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示:随着罗格列酮浓度的增加,HepG2 细胞中 p-p38MAPK 蛋白的表达水平显著升高($P<0.05$),但 p38MAPK、JNK 和 p-JNK、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白水平均无明显变化(图 1)。

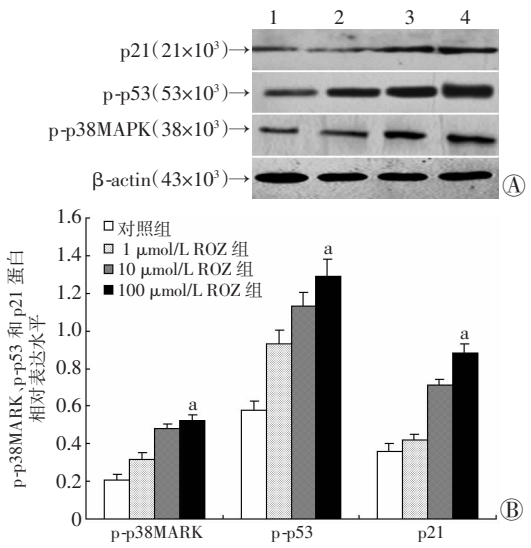


A:Western blot 检测结果 1:对照组;2:1 μmol/L ROZ 组;3:10 μmol/L ROZ 组;4:100 μmol/L ROZ 组;B:半定量分析结果 1:p-p38MAPK;2:p38MAPK;3:p-JNK;4:JNK;5:p-ERK1/2;6:ERK1/2 a:$P<0.05$,与对照组比较

图1 罗格列酮作用24 h对HepG2细胞MAPKs家族各蛋白表达的影响

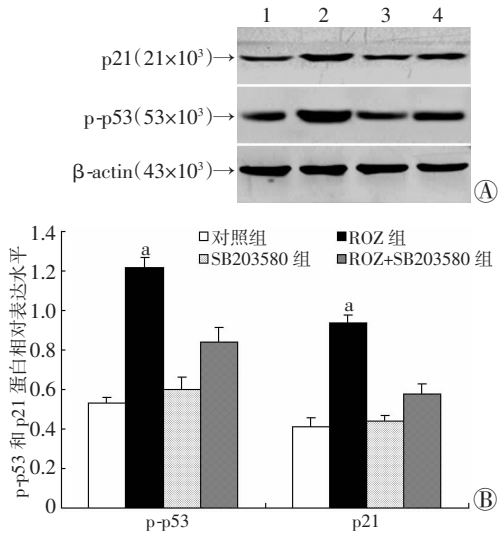
2.4 罗格列酮和SB203580对HepG2细胞中p-p53及p21蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示:随着罗格列酮浓度的增加,HepG2细胞中p-p53和p21蛋白表达水平均显著升高(图2)。SB203580单独作用对HepG2细胞中p-p53和p21蛋白的表达无明显影响,但与罗格列酮联用后可明显减弱罗格列酮引发的p-p53和p21蛋白表达变化($P<0.05$)。见图3。



A:Western blot 检测结果 1:对照组;2:1 μmol/L ROZ 组;3:10 μmol/L ROZ 组;4:100 μmol/L ROZ 组;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较

图2 罗格列酮作用24 h对HepG2细胞p-p38MAPK、p-p53和p21蛋白表达的影响



A:Western blot 检测结果 1:对照组;2:ROZ 组;3:SB203580 组;4:ROZ + SB203580 组;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与 ROZ + SB203580 组比较

图3 罗格列酮联合SB203580对HepG2细胞p-p53和p21蛋白表达的影响

3 讨论

噻唑烷二酮类药物在临床上广泛使用于治疗2型糖尿病,罗格列酮是其典型代表。近期研究表明,罗格列酮具有一定的抑癌作用。Shen等[5]在体内外实验中均发现罗格列酮可抑制人肝癌MHCC97L、BEL-7404细胞的侵袭和转移;陈家炜等[6]也发现罗格列酮可通过调控PTEN的表达抑制人胰腺癌PANC-1细胞的增殖。本实验检测证实,罗格列酮可显著抑制HepG2细胞的增殖并引发G_0/G_1期阻滞。众所周知,细胞增殖是通过细胞周期来实现的,细胞周期的运行处于一系列检验点的严格检控下,其中以G_1/S检测点最为重要,控制细胞由静止状态进入DNA合成期。罗格列酮引发HepG2细胞G_0/G_1期阻滞,使细胞不能跨越G_1期检测点进展到S期,从而抑制细胞的增殖。

MAPKs可通过高度保守的"瀑布样"磷酸化级联反应将细胞外刺激与细胞内基因表达和胞质功能活动连接起来,参与调节细胞的多种生命活动。p38MAPK通路、ERK1/2通路以及c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路是MAPKs家族中3个最重要的组成部分[7]。本实验检测罗格列酮作用后上述通路的变化,发现仅有p-p38MAPK蛋白的表达水平显著提高,而ERK1/2及JNK通路相关蛋白未见明显变化。进一步研究发现,p38MAPK通路特异性抑制剂SB203580可减弱罗格列酮对HepG2细胞的增殖抑制并缓解其引发的细胞周期阻滞,说明罗格列酮是通过

激活 p38MAPK 通路而非 ERK1/2 及 JNK 通路引发 HepG2 细胞周期阻滞的。不同的细胞外刺激可激活不同的 MAPKs 通路,且各通路都具有相对独立的功能。p38MAPK 通路不仅在细胞炎症反应和免疫调节中发挥重要作用,并且可作用于细胞周期的多个检测点,参与细胞增殖、分化和凋亡的调节[8]。Ye 等[9]发现响尾蛇毒素可经 p38MAPK 通路引发肺癌细胞的 G_1 期阻滞;而 Fujita 等[10]研究发现,曲格列酮(噻唑烷二酮类药物)可通过激活 p38MAPK 通路在体外诱导肾癌细胞的凋亡,并引发细胞 G_2/M 期阻滞。

p38MAPK 通路发挥生物细胞学效应是通过调控下游多种酶及转录因子的基因表达活性实现的[11]。p53 基因是与肿瘤发生、发展关系最为密切的抑癌基因,其活性的调节主要发生在转录后水平,即 p53 蛋白的磷酸化激活,磷酸化 p53 蛋白通过引发细胞周期阻滞及诱导凋亡等途径发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用[12]。细胞周期依赖性激酶抑制因子 p21 是细胞周期负性调节因子,可通过抑制 CDK2 和 CDK4 的活性,使细胞停滞于 G_0/G_1 期,抑制细胞的过度增殖[13]。本实验结果显示,罗格列酮在引发细胞周期阻滞的过程中,可上调 HepG2 细胞内 p-p53 和 p21 蛋白的表达水平;而抑制 p38MAPK 通路后,罗格列酮对上述蛋白的调控作用被部分逆转。因此,我们推测罗格列酮通过激活 p38MAPK 通路,活化 p53 蛋白,并上调 p21 蛋白表达水平,最终引发 HepG2 细胞的 G_0/G_1 期阻滞及增殖抑制。同时本实验也证实 p38MAPK 通路参与了对 p53 和 p21 蛋白的调控。有研究表明,在肝细胞癌中,Tax1 结合蛋白 2(TAX1BP2)可通过激活 p38MAPK/p53/p21 信号轴发挥抑癌作用[14];Gan 等[15]也发现 p38MAPK/p53/p21 信号轴的激活参与调节前列腺癌细胞对多西他赛的敏感性;而 Kumari 等[16]在研究抑制极光激酶 B 活性引发的肿瘤细胞 G_1 期阻滞时发现,激活 p38MAPK 通路可直接提高 p21 基因的转录延伸,此过程不需要 p53 的介导。有关 p38MAPK/p53/p21 信号轴的内在机制仍需深入研究。

综上所述,罗格列酮可引发人肝癌 HepG2 细胞周期阻滞及增殖抑制,其机制可能与 p38MAPK/p53/p21 信号轴的激活有关。但 p38MAPK 通路抑制剂并未完全逆转罗格列酮的上述抑癌效应,提示我们可能有其他信号通路参与其中,仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Reka A K, Goswami M T, Krishnapuram R, *et al*. Molecular cross-regulation between PPAR-γ and other signaling pathways: implications for lung cancer therapy[J]. Lung Cancer, 2011, 72(2): 154 - 159.

[2] Klein A M, Zaganjor E, Cobb M H. Chromatin-tethered MAPKs[J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(2): 272 - 277.

[3] Sun Y, Tang S, Jin X, *et al*. Opposite effects of JNK and p38 MAPK signaling pathways on furazolidone-stimulated S phase cell cycle arrest of human hepatoblastoma cell line [J]. Mutat Res, 2013, 755(1): 24 - 29.

[4] Wang Y, Liu J, Cui J, *et al*. ERK and p38 MAPK signaling pathways are involved in ochratoxin A-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells[J]. Toxicol Lett, 2012, 209(2): 186 - 192.

[5] Shen B, Chu E S, Zhao G, *et al*. PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases *in vitro* and in mice[J]. Br J Cancer, 2012, 106(9): 1486 - 1494.

[6] 陈家炜, 任跃忠. PPARγ 对人胰腺癌细胞中抑癌基因 PTEN 表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(8): 828 - 829.

[7] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions[J]. Methods Mol Biol, 2010, 661: 3 - 38.

[8] del-Barco-Barrantes I, Nebreda A R. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis [J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(1): 79 - 84.

[9] Ye B, Xie Y, Qin Z H, *et al*. Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(11): 1397 - 1401.

[10] Fujita M, Yagami T, Fujio M, *et al*. Cytotoxicity of troglitazone through PPARγ-independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma [J]. Cancer Lett, 2011, 312(2): 219 - 227.

[11] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(4): 396 - 405.

[12] Taira N, Yoshida K. Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets [J]. Histol Histopathol, 2012, 27(4): 437 - 443.

[13] Warfel N A, El-Deiry W S. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after[J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(1): 52 - 58.

[14] Lai W L, Hung W Y, Wong L L, *et al*. The centrosomal protein Tax1 binding protein 2 is a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma regulated by cyclin-dependent kinase 2[J]. Hepatology, 2012, 56(5): 1770 - 1781.

[15] Gan L, Wang J, Xu H, *et al*. Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling[J]. Prostate, 2011, 71(11): 1158 - 1166.

[16] Kumari G, Ulrich T, Gaubatz S. A role for p38 in transcriptional elongation of p21 (CIP1) in response to Aurora B inhibition[J]. Cell Cycle, 2013, 12(13): 2051 - 2060.

(**收稿**:2013-08-17;**修回**:2013-10-23)

(编辑 汪勤俭)