论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0262-05

鞘氨醇激酶2与蛋白激酶D参与调控丁酸钠诱导的人肝癌细胞凋亡

肖 敏[1],李 琛[1],袁汉尧[1],刘云岗[2] (524001 广东 湛江,广东医学院附属医院检验科[1];510515 广州,南方医科大学公共卫生与热带医学学院毒理学系[2])

[摘要] **目的** 探讨蛋白激酶D(PKD)与鞘氨醇激酶2(SphK2)参与调控丁酸钠诱导的人肝癌HepG2细胞凋亡的分子机制。**方法** 采用流式细胞仪检测不同浓度丁酸钠作用48 h后人肝癌HepG2细胞的凋亡率,以及干扰或过表达PKD或SphK2对丁酸钠诱导人肝癌HepG2细胞凋亡率的影响;并且在分别干扰PKD或SphK2后以免疫印迹法检测其对丁酸钠诱导另一蛋白激活(磷酸化)的影响。**结果** 丁酸钠能明显诱导HepG2细胞凋亡($P<0.01$),且具有浓度依赖性;而在PKD或SphK2被干扰后,丁酸钠诱导细胞凋亡率比未干扰细胞明显增高($P<0.01$),而过表达PKD或SphK2的细胞在丁酸钠作用下其凋亡率比空质粒对照组细胞明显下降($P<0.01$),并且干扰PKD可阻断丁酸钠诱导的SphK2激活($P<0.01$),而干扰SphK2则对PKD的激活无影响($P<0.01$)。**结论** PKD和SphK2均可负性调控丁酸钠诱导的HepG2细胞凋亡。

[关键词] 丁酸钠;HepG2细胞;蛋白激酶D;鞘氨醇激酶2;凋亡
[中图法分类号] R345; R73-361; R735.7 [文献标志码] A

Protein kinase D and sphingosine kinase 2 are involved in sodium butyrate-induced apoptosis in human liver cancer HepG2 cells

Xiao Min[1], Li Chen[1], Yuan Hanyao[1], Liu Yungang[2] ([1]Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong Province, 524001; [2]Department of Toxicology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the roles of protein kinase D (PKD) and sphingosine kinase 2 (SphK2) in sodium butyrate-induced apoptosis of human liver cancer HepG2 cells. **Method** Using flow cytometry, the percentage of apoptotic HepG2 cells was examined after treatment with sodium butyrate of different concentrations. The effects of down-regulation and over-expression of SphK2 or PKD on sodium butyrate-induced apoptosis were analyzed. With Western blotting, the changes in the activated (phosphorylated) forms of SphK2 or PKD induced by sodium butyrate with or without interference of the other enzyme were detected. **Results** Sodium butyrate induced apoptosis of HepG2 cells significantly ($P<0.01$) in a concentration-dependent manner. After the down-regulation of PKD or SphK2, the sodium butyrate-induced apoptosis was obviously potentiated, as compared to the non-interfered control cells ($P<0.01$). On the contrary, the apoptosis of the cells with PKD or SphK2 overexpressed was significantly prohibited, in comparison with the vehicle plasmid-transfected cells ($P<0.01$). Moreover, the interference of SphK2 did not affect activation of PKD by sodium butyrate ($P<0.01$), while PKD down-regulation resulted in the absence of SphK2 activation ($P<0.01$). **Conclusion** Both SphK2 and PKD negatively regulate apoptosis of HepG2 cells induced by sodium butyrate.

[**Key words**] sodium butyrate; HepG2 cell line; protein kinase D; sphingosine kinase 2; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2012010008922) and the Starting Project for Doctorial Program of Guangdong Medical College (B2012032). Corresponding author: Liu Yungang, E-mail: yungliu@126.com

[基金项目] 广东省自然科学基金(S2012010008922);广东医学院博士启动项目(B2012032)
[通信作者] 刘云岗,E-mail:yungliu@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131203.0953.004.html(2013-12-03)

肝癌是一种发病率和病死率都很高的恶性肿瘤，在亚洲地区尤其高发。目前治疗上面临的重要挑战就是肝癌细胞对各类化疗药普遍不敏感。细胞凋亡是一种细胞主动参与的程序性死亡方式，其不仅与肿瘤的发生、发展有着密切的关系，而且与肿瘤的治疗效果直接相关。现已明确大多数化疗药都可通过诱导细胞凋亡的方式杀死肿瘤细胞，从而达到治疗目的[1-2]。丁酸钠是人体肠道中天然存在的一种小分子脂肪酸盐，已被证实抑制多种肿瘤细胞株的增殖，并且诱导肿瘤细胞凋亡[3]。已有研究表明丁酸钠具有诱导肝癌细胞（HepG2）凋亡的作用[4]，但迄今尚不清楚其确切的作用机制。我们的前期研究表明，细胞外信号调节激酶、蛋白激酶 D（PKD）和鞘氨醇激酶 2（SphK2）对丁酸钠诱导结肠癌细胞凋亡均具有负调控作用，且此 3 个蛋白分子的信号转导流向为依上述顺序由上到下[5-6]。本研究拟探讨 PKD 及 SphK2 在丁酸钠诱导的 HepG2 细胞凋亡中的作用，以探索影响肝癌细胞对化疗敏感性的细胞内蛋白调控分子，旨在提高化疗敏感度的药物作用新靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂

丁酸钠购自 Sigma 公司，Annexin V 试剂盒购自 BD 公司，胎牛血清、DMEM（高糖）培养基、胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司，PKD 抗体、磷酸化 PKD 抗体均购自 CST 公司，SphK2 抗体购自 Abcam 公司，磷酸化 SphK2 抗体购自 Assay Biotechnology 公司，脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司，PKD 的干扰片段（正义链：5′-CAAUCCUCAUUGUUUCGAAAT-3′和反义链：5′-UUCGAAACAAUGAGGAUUGGC-3′）及 SphK2 的干扰片段（正义链：5′-GCUGGGCUGUCCUUCAACCU-3′和反义链：5′-AGGUUGAAGGACAGCCCAGC-3′）由上海吉玛公司合成，PKD 的表达质粒由哈佛大学医学院 Toker 教授赠送，SphK2 的表达质粒由日本神户大学的 Nakamura 教授赠送，其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2（购自中科院上海生命科学院）置于含 10% 胎牛血清的 DMEM（高糖）培养基中（每毫升含 100 U 青霉素及 100 μg 链霉素），在含有 5% CO_2、37 ℃温度、饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.3 siRNA 与表达质粒的细胞转染

参照文献[5]，取对数生长期细胞接种于 6 孔板中，贴壁后分别加入阴性干扰片段（空质粒）、PKD 或 SphK2 的干扰 RNA 片段（PKD 或 SphK2 的表达质粒）与脂质体充分反应的复合物，继续培养 24 h 或48 h；然后收集细胞。PKD 或 SphK2 的干扰或过表达效率采用 Western blot 方法分析[5]。

1.4 流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测 HepG2 细胞凋亡

取对数期生长的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中，细胞贴壁后分别加入不同浓度的丁酸钠（1、3、5、7 mmol/L）处理 48 h 后收集细胞，以 Annexin V/PI 双染法处理细胞，流式细胞仪检测细胞凋亡率。选择一个最佳浓度作为后续研究浓度，参照文献[5]，转染对数生长期细胞后，加入最佳浓度的丁酸钠，作用 48 h 后收集细胞，后期处理方法如上所述。

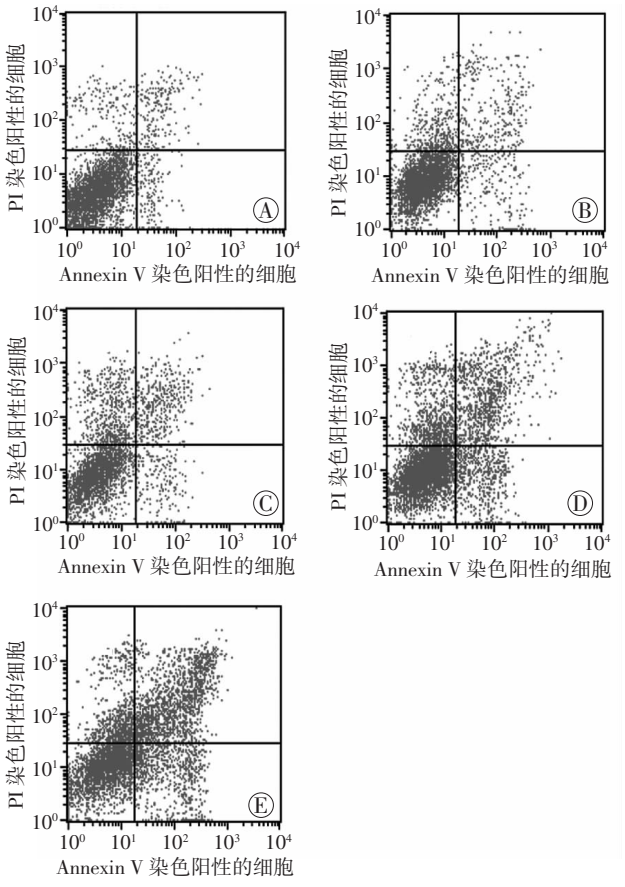
1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，两组间比较采用两独立样本 t 检验，多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 丁酸钠对 HepG2 细胞诱导凋亡的作用

如图 1 所示，HepG2 细胞经 1、3、5、7 mmol/L 浓度的丁酸钠处理 48 h 后，细胞凋亡率分别为（7.42 ± 0.36）%、（14.73 ± 0.12）%、（21.46 ± 1.55）%、（39.00 ± 0.97）%，均高于对照组［（1.78 ± 0.58）%，$P < 0.01$］。表明丁酸钠可诱导 HepG2 细胞凋亡，且其作用呈浓度依赖性。拟选用一个作用较温和的 5 mmol/L 浓度作为以下凋亡分子调控机制的研究。

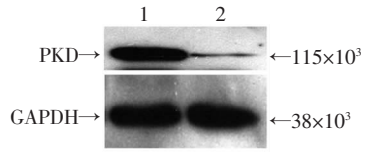


A：对照组细胞；B～E：经 1、3、5、7 mmol/L 丁酸钠处理 48 h 后的细胞

图 1 流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡

2.2 干扰 PKD 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡作用的影响

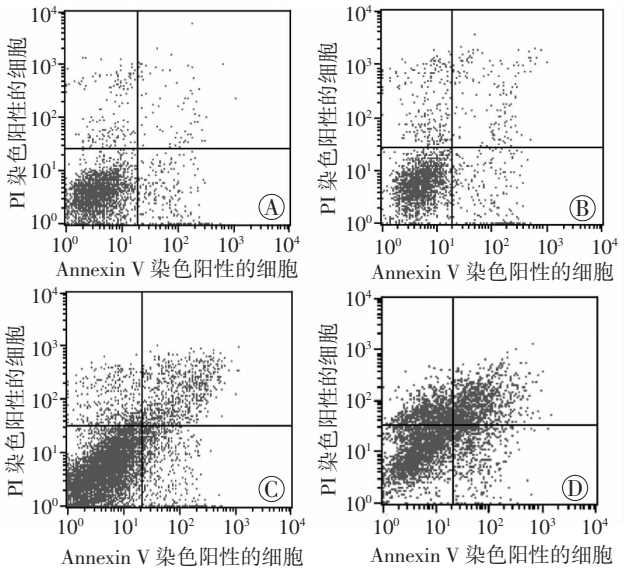
Western blot 检测结果显示，干扰 PKD 组（相对表达量为 0.12～0.15）中 PKD 的表达量较阴性对照组（相对表达量为 1）明显降低，干扰效率达 85% 以上（$P<0.01$，图 2）。



1：干扰对照细胞；2：干扰 PKD 的细胞

图 2 Western blot 检测干扰 PKD 的效率

如图 3 所示，干扰对照细胞与 PKD 干扰的细胞经丁酸钠处理 48 h 后细胞凋亡率分别为（20.75 ± 1.13）% 和（45.15 ± 0.97）%，分别高于其未经丁酸钠处理的对照组［（2.33 ± 0.19）%、（3.54 ± 0.08）%，$P<0.01$］。与干扰对照细胞相比，干扰 PKD 的细胞对丁酸钠诱导细胞凋亡的效应约增强 1 倍（$P<0.01$）。结果提示 PKD 对丁酸钠诱导的 HepG2 细胞凋亡具有负调控作用。

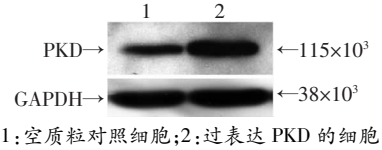


A：阴性干扰细胞；B：干扰 PKD 细胞；C：阴性干扰细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h；D：干扰 PKD 细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h

图 3 干扰 PKD 对丁酸钠诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响

2.3 过表达 PKD 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡作用的影响

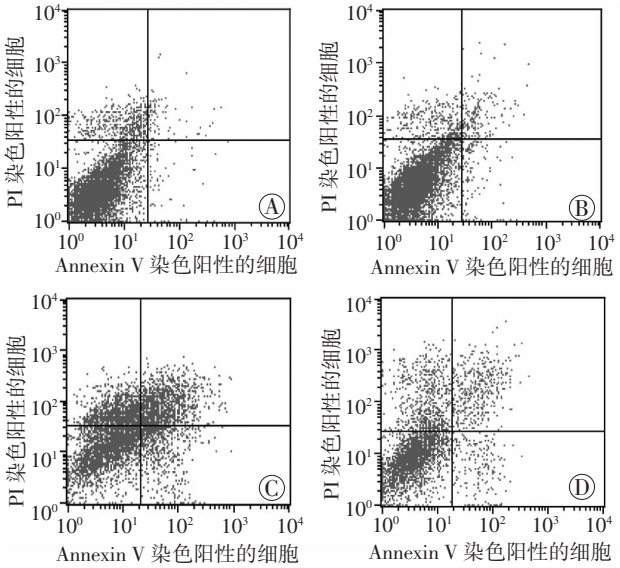
Western blot 检测结果显示，过表达 PKD 组（相对表达量为 2.4～2.6）中 PKD 的表达量约为空质粒对照组（相对表达量为 1）的 2.5 倍（$P=0.01$，图 4）。



1：空质粒对照细胞；2：过表达 PKD 的细胞

图 4 Western blot 检测 PKD 的过表达效率

如图 5 所示，空质粒处理的对照细胞与过表达 PKD 的细胞暴露于丁酸钠（5 mmol/L）48 h 后细胞凋亡率分别为（29.24 ± 1.31）% 和（11.09 ± 0.81）%，均高于相应的丁酸钠未处理组［（2.37 ± 0.46）%、（3.76 ± 0.41）%，$P<0.01$］。相较于空质粒转染的细胞，过表达 PKD 的细胞对丁酸钠诱导细胞凋亡的效应明显下降（$P<0.01$）。这进一步表明 PKD 负性调控丁酸钠诱导的 HepG2 细胞凋亡。

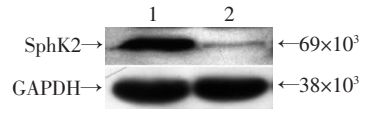


A：空质粒对照细胞；B：过表达 PKD 对照细胞；C：空质粒对照细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h 后；D：过表达 PKD 细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h 后

图 5 过表达 PKD 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡的影响

2.4 干扰 SphK2 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡作用的影响

Western blot 检测结果显示，干扰 SphK2 组（相对表达量为 0.10～0.12）中 SphK2 的表达量较干扰对照组（相对表达量为 1）明显降低，干扰效率达 85% 以上（$P<0.01$，图 6）。



1：阴性干扰对照细胞；2：干扰了 SphK2 的细胞

图 6 Western blot 检测干扰 SphK2 的效率

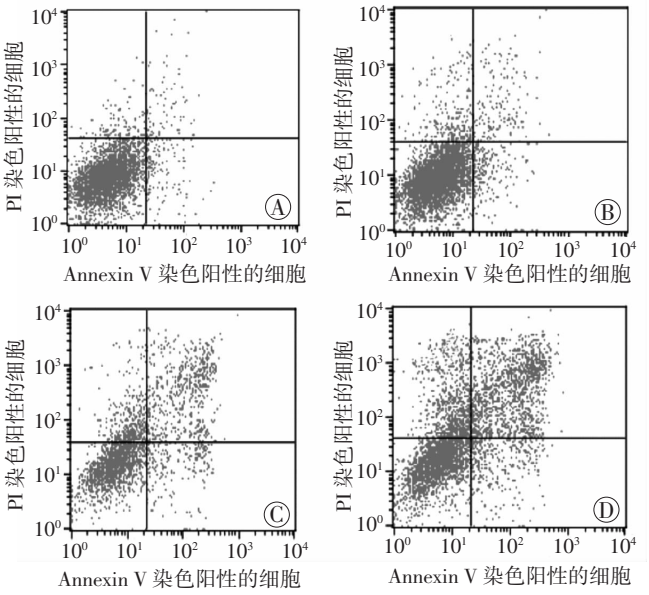
经阴性干扰和 SphK2 干扰的 HepG2 细胞在丁酸钠（5 mmol/L）处理 48 h 后，细胞凋亡率分别为（21.60 ± 0.32）% 和（42.00 ± 0.80）%，分别高于其未暴露丁酸钠的对照组［（1.98 ± 0.24）%、（93.68 ± 0.44）%，$P<0.01$，图 7］。与阴性干扰的细胞比较，干扰 SphK2 细胞对丁酸钠诱导凋亡的效应约增强 1 倍（$P<0.01$）。结果提示 SphK2 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡具有负调控作用。

2.5 过表达 SphK2 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡作用的影响

Western blot 检测结果显示，过表达 SphK2 组（相对表达量为 1.9～2.1）中 SphK2 的表达量约为空质粒对照组（相对表达量为 1）的 2 倍（$P<0.01$，图 8）。

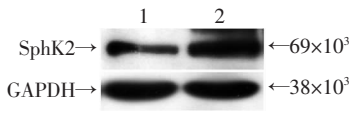
经空质粒处理或过表达 SphK2 的 HepG2 细胞在暴露于丁酸钠（5 mmol/L）48 h 后，细胞凋亡率分别为（25.42 ± 0.40）% 和（11.39 ± 0.82）%，均高于相应的对照组［（2.43 ± 0.37）%、

(3.44 ± 0.45)%, $P<0.01$, 图 9]。相较于空质粒处理细胞,过表达 SphK2 的细胞由丁酸钠诱导的细胞凋亡率明显下降($P<0.01$)。这进一步表明 SphK2 可负性调控丁酸钠诱导 HepG2 细胞的凋亡。



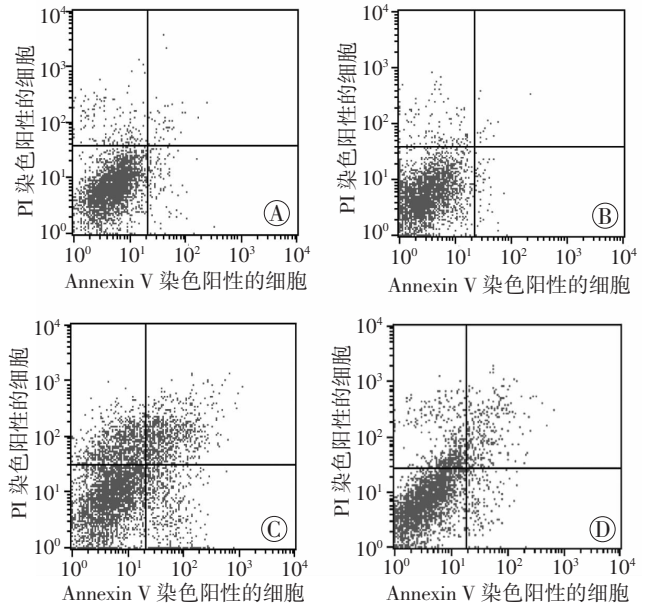
A:阴性干扰对照细胞;B:干扰 SphK2 对照细胞;C:阴性干扰细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h;D:干扰 SphK2 细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h

图 7 干扰 SphK2 对丁酸钠诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响



1:空质粒对照细胞;2:过表达了 SphK2 的细胞

图 8 Western blot 检测 SphK2 的过表达效率

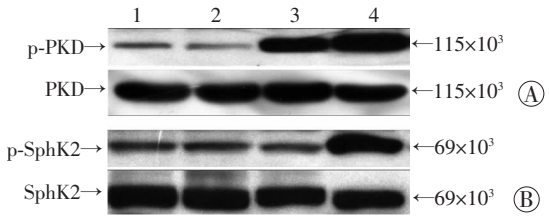


A:空质粒处理对照细胞;B:过表达 SphK2 对照细胞;C:空质粒处理的细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h 后;D:过表达 SphK2 的细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h 后

图 9 过表达 SphK2 对丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡的影响

2.6 分别干扰 SphK2 和 PKD 对彼此蛋白活性的影响

HepG2 细胞在 SphK2 受干扰的条件下,丁酸钠(5 mmol/L)诱导的 PKD 磷酸化未被阻断[与对照组相比,丁酸钠处理的两组磷酸化 PKD 表达水平均增高($P<0.01$,图 10A)],而 PKD 受干扰时 SphK2 的磷酸化被阻断[与对照组及丁酸钠与 PKD 联合干扰组相比,丁酸钠与阴性干扰联合组磷酸化 SphK2 表达水平增高($P<0.01$,图 10B)]。结果提示 PKD 可能与 SphK2 在同一信号通路发挥作用,前者位于后者上游有关。



A:PKD 1:阴性干扰对照细胞;2:干扰 SphK2 对照细胞;3:阴性干扰对照细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h;4:干扰 SphK2 细胞经 5 mmol/L丁酸钠处理 48 h;B:SphK2 1:阴性干扰对照细胞; 2:干扰 PKD 对照细胞;3:干扰 PKD 细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h; 4:阴性干扰对照细胞经 5 mmol/L 丁酸钠处理 48 h

图 10 分别干扰 PKD 或 SphK2 对丁酸钠诱导的 SphK2、PKD 活性的影响

3 讨论

在肝癌的综合治疗中,化疗占据着重要的地位,而常用的化疗药往往在应用一段时间后肝癌细胞就会对其产生耐药性。所以研究肝癌细胞对抗肿瘤药物的耐受机制,寻求有效增加化疗敏感性的治疗靶点具有很重要的科学与应用价值。

在许多肿瘤如结肠癌[9]、前列腺癌[10]等的发生、发展过程中,鞘磷脂的代谢产物神经酰胺、神经鞘氨醇、1-磷酸鞘氨醇发挥着极为重要的作用。它们参与调节细胞的增殖和凋亡。在细胞内,这三者之间构成了一个重要的代谢平衡体,其动态平衡与细胞的生存、死亡和生命活动密切相关。而 SphK2 是维系它们之间代谢平衡的关键酶之一[11]。SphK2 在多种实体肿瘤中均有不同丰度的表达,其通过 SphK2/1-磷酸鞘氨醇信号途径对肿瘤的生长、发展起促进作用,使肿瘤细胞对放化疗产生耐受。

PKD 是一类胞内信使依赖酶,在蛋白质磷酸化过程中起中介和放大作用,并帮助完成细胞内的信号转导过程。它可在各个细胞间的信号转导和调节细胞增殖与存活过程中发挥重要作用[12-13]。肝癌细胞的生

长受多条信号转导通路的调节,而PKD信号通路是最重要的信号通路之一。

丁酸钠是膳食纤维在肠道中被细菌酵解后产生的一种无毒的四碳短链脂肪酸,它在肠道可以毫摩尔级的高浓度存在,且易经肠道吸收并首先分布到人和哺乳动物的肝脏。本研究观察到丁酸钠对HepG2细胞具有诱导凋亡的能力,在不同浓度丁酸钠作用下HepG2细胞的凋亡呈现浓度依赖性。这一结果与丁酸钠作用于其他肿瘤细胞的发现相符[8]。本研究通过PKD和SphK2分别干扰和过表达状态下丁酸钠诱导细胞凋亡率的变化证实了这两个蛋白分子在丁酸钠诱导HepG2细胞凋亡过程中均起负调控作用。我们的结果与文献[14]相反,例如SphK2选择性地抑制HEK293人胚肾细胞的生长,并诱导其凋亡;同时也与另外一些报道结果相似,例如SphK2能够保护U87恶性神经胶质瘤细胞生存,使其免于凋亡[15]。因此我们推测,在某些肿瘤细胞中SphK2的激活是为了保护肿瘤细胞免于受某些(比如化疗药)外界不利条件的影响。

本研究观察到的PKD和SphK2参与丁酸钠诱导HepG2细胞凋亡的调控,与我们前期发现的该两个蛋白分子对人类结肠癌(HCT116)细胞的作用相似[5]。并且就PKD位于SphK2的上游这个结果看,也与我们在HCT116细胞的发现类似。因本研究为体外实验,不能代替体内实验,故有待开展体内实验进行验证。而且,PKD和SphK2是否普遍参与肿瘤细胞诱导凋亡的负调控尚待更多的研究证实。当然,探寻安全、有效的PKD/SphK2抑制物可能具有一定的临床应用前景,也可能成为肝癌有效治疗的新靶点。

参考文献:

[1] Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, *et al*. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death[J]. Methods Cell Biol, 2011, 103: 55 - 98.

[2] Favaloro B, Allocati N, Graziano V, *et al*. Role of apoptosis in disease [J]. Aging (Albany NY), 2012, 4(5): 330 - 349.

[3] Steliou K, Boosalis M S, Perrine S P, *et al*. Butyrate histone deacetylase inhibitors[J]. Biores Open Access, 2012, 1(4): 192 - 198.

[4] Joachimiak R, Kaznica A, Drewa T. Influence of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma (hepG2) and glioblastoma (C6) cell lines *in vitro*[J]. Acta Pol Pharm, 2007, 64(6): 561 - 563.

[5] Xiao M, Liu Y, Zou F. Sensitization of human colon cancer cells to sodium butyrate-induced apoptosis by modulation of sphingosine kinase 2 and protein kinase D[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(1): 43 - 52.

[6] Hait N C, Bellamy A, Milstien S, *et al*. Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(16):12058 - 12065.

[7] Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, *et al*. Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Cancer, 1998, 76(6): 897 - 902.

[8] Sun B, Liu R, Xiao Z D, *et al*. c-MET protects breast cancer cells from apoptosis induced by sodium butyrate[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30143.

[9] Rawluszko A A, Slawek S, Gollogly A, *et al*. Effect of butyrate on aromatase cytochrome P450 levels in HT29, DLD-1 and LoVo colon cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2012, 66(2): 77 - 82.

[10] Paskova L, Smesny-Trtkova K, Fialova B, *et al*. Different effect of sodium butyrate on cancer and normal prostate cells[J]. Toxicol *In Vitro*, 2013, 27(5): 1489 - 1495.

[11] Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(5): 397 - 407.

[12] Kim M, Jang H R, Kim J H, *et al*. Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(3): 629 - 637.

[13] Stewart J R, Christman K L, O'Brian C A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(9): 1355 - 1359.

[14] Okada T, Ding G, Sonoda H, *et al*. Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(43): 36318 - 36325.

[15] Van-Brocklyn J R, Jackson C A, Pearl D K, *et al*. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2005, 64(8): 695 - 705.

(**收稿**:2013-09-12;**修回**:2013-10-31)

(编辑 吴培红)