论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412235

蛋白激酶CK2抑制剂四溴苯三唑可促进卵巢癌CAOV3细胞凋亡

闫 威,任丽莉,孟智超,郭 淼,刘乙蒙,刘 超,肖建英 (121001 辽宁 锦州,辽宁医学院生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 观察蛋白激酶CK2抑制剂四溴苯三唑(4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole,TBB)对卵巢癌CAOV3细胞增殖、凋亡及细胞凋亡调控因子Bcl-2、Bax表达的影响,进一步探讨TBB促进卵巢癌CAOV3细胞凋亡的作用机制。**方法** 体外培养CAOV3细胞,将其分为对照组、DMSO组和TBB组(终浓度为12.5、25、50、75 μmol/L)。MTT测定各组细胞增殖情况;流式细胞仪检测各组卵巢癌CAOV3细胞凋亡;Western blot检测各组CAOV3细胞CK2α及凋亡相关因子Bcl-2、Bax的表达。**结果** 与对照组[(92.00±4.36)%]比较,TTB各浓度组细胞增殖率分别为(73.00±2.76)%、(67.00±3.51)%、(52.00±2.83)%和(40.00±1.75)%,随着TBB浓度的增加,其对CAOV3细胞增殖的抑制呈剂量依赖性增强($P<0.01$);细胞凋亡比例也呈剂量依赖性增加;与对照组比较,CK2α的表达逐渐降低,Bcl-2蛋白表达减少,Bax蛋白表达增加($P<0.01$)。**结论** TBB可通过抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达和促进促凋亡蛋白Bax的表达而促进卵巢癌CAOV3细胞凋亡。

[关键词] CK2α;四溴苯三唑;卵巢肿瘤;CAOV3细胞;细胞凋亡
[中图法分类号] R73-361;R730.23;R737.31 [文献标志码] A

Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole promotes apoptosis of human ovarian cancer CAOV3 cells

Yan Wei, Ren Lili, Meng Zhichao, Guo Miao, Liu Yimeng, Liu Chao, Xiao Jianying (Department of Biochemisty and Molecular Biology, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning Province, 121001, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer CAOV3 cells and on the expression of Bcl-2 and Bax, and explore the possible mechanism. **Methods** CAOV3 cells were cultured *in vitro* and divided into a control group, a dimethyl sulfoxide (DMSO) group, and four TBB groups treated with different concentrations (12.5, 25, 50 and 75 μmol/L, respectively) of TBB. The proliferation of CAOV3 cells was measured by MTT assay, and the cell apoptosis was determined by flow cytometry. The changes of Bcl-2 and Bax proteins were detected by Western blotting. **Results** MTT assay showed that the proliferation rates of CAOV3 cells were (73.00±2.76)%, (67.00±3.51)%, (52.00±2.83)% and (40.00±1.75)%, respectively, in the 4 TBB groups, while that of the control group was (92.00±4.36)%. The cell proliferation inhibitory effect and cell apoptosis rate were increased as TBB concentration was increased ($P<0.01$). The expression of Bcl-2 and CK2α proteins in CAOV3 cells treated with different concentrations of TBB were decreased, while Bax protein was increased as compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusion** TBB can induce apoptosis of ovarian cancer CAOV3 cells by down-regulating Bcl-2 protein and up-regulating Bax protein.

[**Key words**] CK2α; 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole; ovarian cancer; CAOV3 cells; apoptosis

Supported by the Project of Science and Technology Plan of Liaoning Province (2013225305). Corresponding author: Xiao Jianying, E-mail: xiaojianying@lnmu.edu.cn

[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2013225305)
[通信作者] 肖建英,E-mail:xiaojianying@lnmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150514.1137.009.html(2015-05-14)

蛋白激酶 CK2 是一种真核细胞中普遍存在,并且高度保守的信使非依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞生长、转化、生存、增殖、凋亡和肿瘤发生过程中都发挥重要作用[1-3]。CK2 是由催化亚基 α、α′和调节亚基 β、β′组成的四聚体,其中蛋白激酶 CK2α 具有癌基因作用,它的磷酸化底物可能涉及许多蛋白的调节[4-6]。在许多实体瘤如结肠癌、乳腺癌、肾癌、非小细胞肺癌和急、慢性髓性白血病细胞中,蛋白激酶 CK2 活性均增高[7-8]。研究表明:在某些肿瘤组织中,CK2 活性的增高可能与其肿瘤细胞的分化程度及侵袭、转移等有关[9]。Pallares 等[10]发现,通过组织生化分析或免疫组织化学法,在头部及颈部肿瘤中,CK2 的水平与肿瘤的分级、分期和临床结果等密切相关。CK2 的抑制剂对卵巢癌细胞增殖有抑制作用,能诱导细胞凋亡[11-12],但作用机制尚不清楚。因此,本研究使用不同浓度的 CK2 抑制剂四溴苯三唑(4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole,TBB)作用卵巢癌 CAOV3 细胞,观察下调 CK2α 表达后,其对人卵巢癌细胞增殖、凋亡及细胞凋亡调控因子(Bcl-2、Bax)表达的影响,进一步探讨其可能的作用机制,为卵巢癌的靶向治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TBB [T0826-10MG, ≥98% (HPLC), Sigma 公司];DMEM/F12 培养液(11330-032, 500 mL,Gibco 公司);胎牛血清(PAA 公司);CK2α(C-18, sc-6479)、抗体(Bcl-2、Bax, CST 公司); MTT、Western 细胞裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京碧云天生物技术公司);卵巢癌 CAOV3 细胞株(中国医学科学院肿瘤研究所)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 对冻存卵巢癌细胞进行复苏,培养基为 DMEM/F12,含 10% 的胎牛血清,100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 的链霉素,在饱和湿度、温度为 37 ℃的 CO_2 孵箱中培养,当细胞汇合至培养瓶底面积 80% 左右时进行传代培养。实验分为 6 组:①对照组:未加处理因素卵巢癌细胞组;②溶剂 DMSO 组:二甲基亚砜最终浓度低于体积分数的 0.1% (该浓度对细胞生长无影响);③12.5 μmol/L TBB 组;④25 μmol/L TBB 组;⑤50 μmol/L TBB 组;⑥75 μmol/L TBB 组。

1.2.2 MTT 测定细胞增殖 取 96 孔板中对数生长期 CAOV3 细胞,弃去上清液,按实验分组分别加入不同浓度 TBB,DMSO 组加入等体积 DMSO 的培养基,对照组加入等体积的培养基,各浓度组 6 个复孔,继续培养 24 h,20 μL MTT(5 g/L)孵育 4 h。弃去培养液,加入 150 μL 二甲基亚砜,振荡 15 min,使沉淀物充分溶解。酶联免疫检测仪测定各孔光密度值,计算各组细胞增殖率。每组实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将各实验组 CAOV3 细胞制成单细胞悬液,离心 5 min,弃上清。用 4 ℃预冷的 70% 冷乙醇固定,4 ℃过夜。调整细胞浓度为 10^6/mL,取 1 mL 细胞悬液,用 PBS 洗 3 次,细胞重悬于 1 mL PI 染液中,37 ℃孵育 30 min 即可进行流式分析。PI 染液终浓度为 50 μg/mL,RNase A 终浓度为 20 μg/mL。CellQuest 分析软件分析各组细胞凋亡比例。

1.2.4 Western blot 检测各组细胞 CK2α 及凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 的表达 收取各实验组 CAOV3 细胞,RIPA 裂解液裂解细胞,超声进一步粉碎细胞,冰上静置 30 min,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,用酶标仪在 570 nm 波长下测光密度值。样品上样后,10% 分离胶电泳,转膜,将 PVDF 膜放到 3% BSA 封闭液中封闭 2 h,取出后的滤膜分别与一抗 CK2α、Bcl-2 和 Bax 及 β-actin(稀释比为 1∶1 000)在 4 ℃孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,HRP 偶联的 IgG 作为二抗(稀释比为 1∶5 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次后,ECL 发光显色。Image J 分析灰度值。

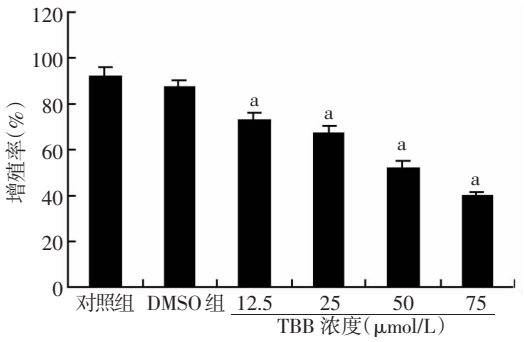
1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 MTT 检测各组细胞的增殖率

与对照组比较,12.5、25、50、75 μmol/L TBB 分别作用 CAOV3 细胞 24 h 后,各组细胞增殖率随着药物浓度的升高而降低($P<0.01$,图 1)。

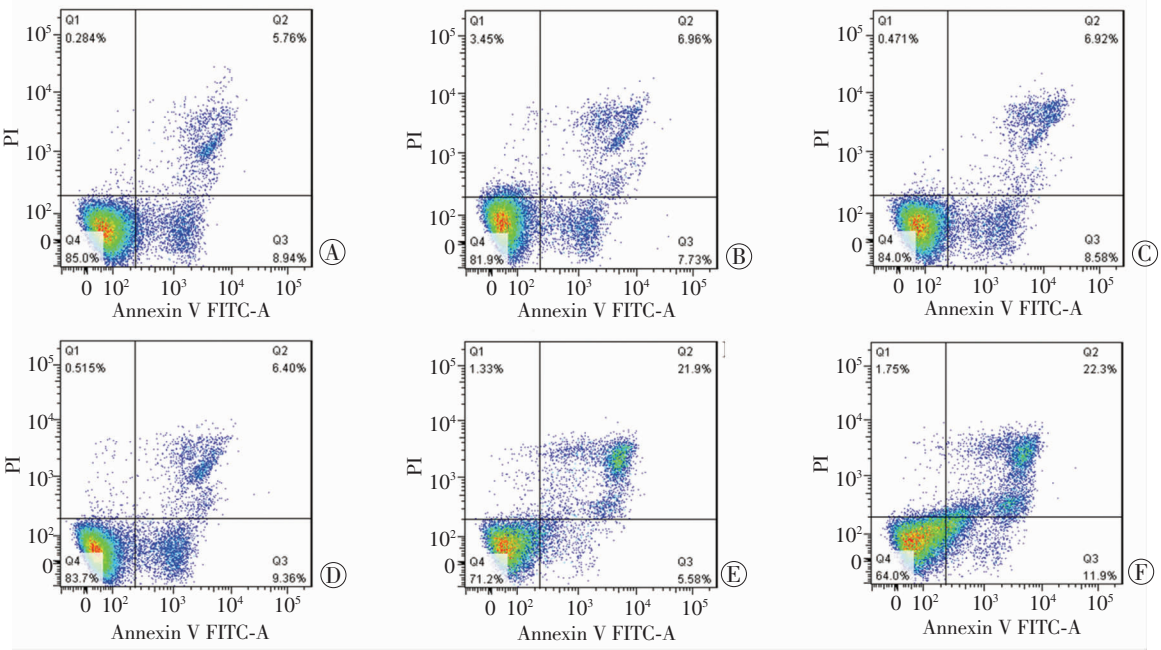


a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 不同浓度 TBB 对 CAOV3 细胞增殖率的影响

2.2 TBB 对卵巢癌 CAOV3 细胞凋亡的影响

不同浓度 TBB 作用 CAOV3 细胞后,当 TBB 浓度增加到 50、75 μmol/L 时,凋亡细胞所占比例逐渐增加(图 2)。



A:对照组;B:DMSO组;C~F:分别为12.5、25、50、75 μmol/L TBB组

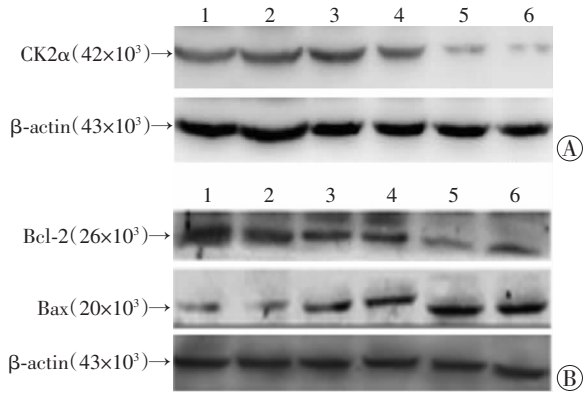
图2 流式细胞仪检测不同浓度TBB处理后CAOV3细胞凋亡

2.3 各组CAOV3细胞蛋白激酶CK2α蛋白表达

与对照组比较,TBB各浓度组CAOV3细胞CK2α蛋白表达减少($P<0.01$),并呈剂量依赖性(图3,表1)。

2.4 各组CAOV3细胞Bcl-2和Bax蛋白表达

与对照组比较,TBB各浓度组CAOV3细胞抗凋亡蛋白Bcl-2蛋白表达减少($P<0.01$),且随剂量增加表达量逐渐减少;促凋亡蛋白Bax蛋白表达则增加($P<0.01$),且随剂量增加表达量逐渐增加;Bcl-2/Bax比率明显降低(图3,表1)。



1:对照组;2:DMSO组;3~6:分别为12.5、25、50、75 μmol/L TBB组

图3 Western blot检测各组CAOV3细胞CK2α(A)、Bcl-2和Bax蛋白(B)表达

表1 各组CAOV3细胞的CK2α、Bcl-2和Bax蛋白表达

($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	CK2α	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
对照组	0.411±0.029	0.911±0.017	0.128±0.007	7.117±1.026
DMSO组	0.393±0.011	0.903±0.012	0.119±0.006	7.588±1.263
TBB组				
12.5 μmol/L	0.358±0.011[a]	0.532±0.014[a]	0.376±0.011[a]	1.415±0.014[a]
25 μmol/L	0.317±0.009[a]	0.517±0.013[a]	0.519±0.012[a]	0.996±0.017[a]
50 μmol/L	0.284±0.008[a]	0.214±0.005[a]	0.536±0.021[a]	0.399±0.011[a]
75 μmol/L	0.258±0.008[a]	0.308±0.009[a]	0.524±0.019[a]	0.588±0.012[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

蛋白激酶CK2对细胞生长及凋亡等的控制主要是通过其在细胞核中的信号转导来实现。细胞核中,尤其是核质和染色体是蛋白激酶CK2优先作用的靶点,在增殖细胞和实体瘤细胞以及某些造血系统的恶性肿瘤细胞中,可检测到CK2在核中的含量及活性比正常细胞高许多[13]。蛋白激酶CK2可通过多种信号转导途径调节细胞的生长、增殖、分裂及分化,甚至影响癌变进程。CK2的致癌潜能一方面可能是与其催化亚基α和α′为原癌基因有关;另一方面可能是因为其底物众多[1-3]。TBB是蛋白激酶CK2的特异性抑制剂,ATP结合位点的竞争性抑制剂和磷酸供体底物类似物,应用比较广泛[14]。

本研究应用TBB作用CAOV3细胞后,发现其可剂量依赖性抑制卵巢癌CAOV3细胞增殖并促进细胞

凋亡。为探讨 TBB 诱导卵巢癌细胞发生凋亡的可能机制,本研究观察了经 TBB 处理后 CAOV3 细胞中蛋白激酶 CK2α、抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的表达水平,结果显示,TBB 呈剂量依赖性抑制 CK2α、Bcl-2 蛋白表达,增加 Bax 蛋白表达,Bcl-2/Bax 比值显著降低,表明 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白的比值变化是 TBB 作用卵巢癌 CAOV3 细胞后引起的。TBB 呈剂量依赖性抑制 CK2α 的表达,提示 CK2α 可能是通过抑制细胞凋亡途径而诱发肿瘤发生,CK2 可通过对多种凋亡相关蛋白的磷酸化而发挥其抗凋亡作用。细胞凋亡的始动及进行过程受多种蛋白酶和机体的精确调控,细胞凋亡主要有外部和内部途径(内质网信号通路、线粒体信号通路)两条通路,通路间彼此联系,相互依赖,共同调节细胞凋亡[15]。TBB 诱导 CAOV3 细胞发生凋亡的机制可能是 TBB 抑制了蛋白激酶 CK2 对抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的磷酸化修饰[16],从而使凋亡抑制因子和凋亡激活因子的活性失去平衡所致。近年也有研究表明,Bcl-2 家族成员的 Puma 基因可通过激活细胞内 Caspase-9 的活性,促使 Bax 从胞质转移至线粒体 促进细胞凋亡信号传导而诱导细胞凋亡,从而抑制卵巢癌细胞增殖[17]。

综上所述,本研究证实 TBB 抑制 CAOV3 细胞增殖和促进细胞凋亡,其机制可能与改变细胞凋亡关键调节蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达相关。后续我们将进一步研究 CK2α 在卵巢癌中发生的分子机制,为卵巢癌等疾病进行早期诊断治疗提供分子靶点,为找到新型有效的抗肿瘤药物奠定实验基础。

参考文献:

[1] Guo M, Liu C, Qi F J, *et al*. Elevated expression of nuclear protein kinase CK2α as a poor prognosis indicator in lymph node cancerous metastases of human thyroid cancers [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(17): 7425 – 7432.

[2] Litchfield D W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death [J]. Biochem J, 2003, 369(Pt 1): 1 – 15.

[3] Ahmad K A, Wang G, Unger G, *et al*. Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis[J]. Adv Enzyme Regul, 2008, 48: 179 – 187.

[4] Yao K, Youn H, Gao X, *et al*. Casein kinase 2 inhibition attenuates androgen receptor function and cell proliferation in prostate cancer cells [J]. Prostate, 2012, 72(13): 1423 – 1430.

[5] Stolarczyk E I, Reiling C J, Pickin K A, *et al*. Casein kinase 2α regulates multidrug resistance-associated protein 1 function via phosphorylation of Thr 249[J]. Mol Pharmacol, 2012, 82(3): 488 – 499.

[6] Yang M, Sun H, He J, *et al*. Interaction of ribosomal protein L22 with casein kinase 2α: a novel mechanism for understanding the biology of non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 139 – 144.

[7] Hung M S, Xu Z, Chen Y, *et al*. Hematein, a casein kinase II inhibitor, inhibits lung cancer tumor growth in a murine xenograft model [J]. Int J Oncol, 2013, 43(5): 1517 – 1522.

[8] Zhang S, Long H, Yang Y L, *et al*. Inhibition of CK2α down-regulates Notch1 signalling in lung cancer cells[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(7): 854 – 862.

[9] Ryu B J, Baek S H, Kim J, *et al*. Anti-androgen receptor activity of apoptotic CK2 inhibitor CX4945 in human prostate cancer LNCap cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(17): 5470 – 5474.

[10] Pallares J, Llobet D, Santacana M, *et al*. CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation[J]. Am J Pathol, 2009, 174(1): 287 – 296.

[11] Guo C, Yu S, Davis A T, *et al*. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(8): 5992 – 5999.

[12] Pinna L A. Protein kinase CK2: a challenge to canons[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 20): 3873 – 3878.

[13] Deshiere A, Duchemin-Pelletier E, Spreux E, *et al*. Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction[J]. Oncogene, 2013, 32(11): 1373 – 1383.

[14] Moucadel V, Prudent R, Sautel C F, *et al*. Antitumoral activity of allosteric inhibitors of protein kinase CK2[J]. Oncotarget, 2011, 2(12): 997 – 1010.

[15] Adams J M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis [J] Genes Dev, 2003, 17(20): 2481 – 2495.

[16] Son Y K, Lee S M, An W S, *et al*. The role of protein kinase CK2 in cyclosporine-induced nephropathy in rats[J]. Transplant Proc, 2013, 45(2): 756 – 762.

[17] 邹冬玲, 王冬, 刘海霞. Puma 抑制卵巢癌细胞生长及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(14): 1477 – 1480.

(**收稿**:2015-01-17;**修回**:2015-03-17)

(编辑 栗 嘉)