DOI:10.16016/j.2097-0927.202109162

沙蟾毒精激活 Rho A/ROCK1 信号通路诱导急性白血病细胞凋亡的分子机制研究

李志强,姜秀星,胡金娇,丁 鑫,雷 令,高 宁 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系生药学与中药学教研室

[摘要] **目的** 研究沙蟾毒精(arenobufagin, ARE)对急性白血病细胞的凋亡诱导作用及可能的分子机制。**方法** 急性白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 经不同浓度(0、10、20、40、80 nmol/L)ARE 作用 24 h,80 nmol/L ARE 作用不同时间(0、6、12、18、24 h)或 ROCK1 抑制剂 Y-27632(20 μmon/L)预处理 1 h 后 80 nmol/L ARE 作用 24 h,采用 MTT 检测 ARE 抑制急性白血病细胞增殖的能力;采用流式细胞术检测 ARE 诱导急性白血病细胞凋亡的能力;采用 Western blot 和 CoIP 实验检测急性白血病细胞经 ARE 作用后细胞中凋亡相关蛋白和 Rho A/ROCK1 信号通路相关蛋白的变化情况。**结果** ARE 对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞的抑制增殖作用呈剂量依赖性和时间依赖性($P<0.01$),对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞凋亡诱导作用亦呈剂量和时间依赖性($P<0.01$);Western blot 检测结果显示:ARE 可激活 ROCK1 信号通路,促进 BAX 移位至线粒体,Cytochrome c (Cyto c)和 AIF 由线粒体释放入细胞质,增加 Caspase 3 和 Caspase 7 剪切激活,增加 PARP1 剪切,并减少 XIAP 表达,其上述作用具有剂量依赖性和时间依赖性($P<0.01$);使用 Y-27632 抑制 ROCK1 信号通路可明显阻断 ARE 诱导的 BAX 移位至线粒体、Cyto c 和 AIF 向细胞质的释放、Caspase 3 和 Caspase 7 的剪切激活、PARP1 的剪切、XIAP 表达的下调以及细胞凋亡($P<0.01$)。**结论** ARE 通过激活 Rho A/ROCK1 信号通路有效诱导急性白血病细胞(Jurkat、MV-4-11)发生凋亡。

[关键词] 沙蟾毒精;急性白血病;Rho 因子相关激酶 1;细胞凋亡
[中图法分类号] R733.7; R966; R996.3 [文献标志码] A

Arenobufagin induces apoptosis in acute leukemia cells by activating Rho A/ROCK1 signaling pathway

LI Zhiqiang, JIANG Xiuxing, HU Jinjiao, DING Xin, LEI Ling, GAO Ning Department of Pharmacognosy and Traditional Chinese Medicine, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the apoptosis-inducing effect of arenobufagin (ARE) on acute leukemia cells and explore its possible molecular mechanism. **Methods** Acute leukemia cell lines Jurkat and MV-4-11 were treated with different concentrations of ARE (0, 10, 20, 40 or 80 nmol/L) for 24 h, or with 80 nmol/L ARE for different durations (0, 6, 12, 18 or 24 h), or with 80 nmol/L ARE for 24 h after being pretreated with 20 μmol/L Y-27632 (inhibitor of ROCK1) for 1 h, respectively. Then, MTT assay and flow cytometry were used to respectively detect the effect of ARE on cell proliferation and apoptosis in acute leukemia cells; Western blotting and co-immunoprecipitation (CoIP) assay were performed to determine the expression of apoptosis-related and Rho A/ROCK1 pathway-related proteins in the acute leukemia cells after ARE treatment. **Results** ARE inhibited the proliferation and induced apoptosis of acute leukemia cells in dose- and time-dependent manners ($P<0.01$). Western blotting results showed that ARE activated ROCK1 signaling pathway, facilitated the translocation of BAX from cytoplasm to mitochondria, promoted the release of mitochondrial proteins (Cytochrome c, AIF), increased the cleavage/activation of Caspase 3 and Caspase 7 as well as the degradation of Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), and then reduced the expression of X-linked

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31571425)
[通信作者] 高 宁,E-mail:gaoning59@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

inhibitor of apoptosis (XIAP). The above effects presented dose- and time-dependence ($P<0.01$). Interruption of ROCK1 pathway by the pharmacological inhibitor Y-27632 significantly attenuated ARE-mediated mitochondrial translocation of BAX, reduced cytosolic release of Cytochrome c and AIF from mitochondria, suppressed the activation of Caspase 3 and Caspase 7, the degradation of cleavage of PARP1, and down-regulated XIAP expression as well as blocked apoptosis ($P<0.01$). **Conclusion** ARE effectively induces apoptosis of acute leukemia cells (Jurkat, MV-4-11) through the activation of Rho A/ROCK1 signaling pathway.

[**Key words**] arenobufagin; acute leukemia; Rho-associated kinase 1; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31571425). Corresponding author: GAO Ning, E-mail: gaoning59@163.com

白血病作为全球癌症的主要负担之一,其发病率和病死率均位于前列[1]。因此,针对白血病的特效药研究显得尤为重要。蟾蜍毒素从中华蟾蜍或黑眶蟾蜍的耳后和皮肤腺体分泌的毒液中分离提取所得,其中沙蟾毒精(arenobufagin ARE)是一种蟾蜍二烯醇化物,为新近发现的蟾蜍毒液的主要有效成分,可以阻断血管内皮生长因子介导的血管生成,从而抑制肿瘤的恶性增殖和转移[2]。前期文献报道提示:ARE 对多种肿瘤细胞具有明确的杀伤作用,且毒副作用甚微[3],然而,ARE 对白血病细胞的影响目前国内外均鲜有报道。

内源性凋亡途径的激活主要源自不同刺激导致的 BCL-2 蛋白家族中促进凋亡和抑制凋亡成分之间平衡的失调,如药物等诱导 BAX 转位至线粒体,在线粒体膜上聚合形成孔道,使线粒体膜通透性增加,细胞色素 c(Cytochrome c)由线粒体释放入细胞质,酶解激活 Caspase 家族(Caspase 3、Caspase 7 等),最终导致细胞发生凋亡;此外,IAP 家族可以负性调节作为凋亡执行者的 cleaved-Caspase 3 活性,从而抑制细胞凋亡的最终执行过程[4-6]。

Rho 家族小 GTP 酶(Rho A 等)将信号从质膜上的受体转导到调节细胞形态等的激酶,Rho 相关激酶 ROCK1 和 ROCK2 已被证实为 Rho 因子的效应蛋白[7]。据报道,Rho A/ROCK1 信号通路广泛参与多种细胞生理和病理活动,如细胞转录、细胞动力、增殖等[8],甚至包括肿瘤细胞的增殖和凋亡;ROCK1 结构相对保守,且活化的 Rho A-GTP 形式与 ROCK1 的结合为 ROCK1 活化所必需[9-10]。有研究指出:相较于 ROCK2,ROCK1 在血液系统细胞中呈现明显高表达,提示在白血病的治疗中 ROCK1 信号通路可以作为治疗策略研究的靶点[11-12]。本研究旨在考察不同浓度不同作用时间下 ARE 对白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 增殖和凋亡的影响,并初步探索可能的分子作用机制,为开发治疗白血病新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养方法

人急性淋巴细胞白血病细胞 Jurkat、人急性单核细胞白血病细胞 MV-4-11 均购自美国 ATCC 细胞库,采用 RPMI1640 培养基(含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗),在 37 ℃、5%CO_2 及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养,每 2~3 天换液传代。

1.2 药物及试剂

ARE 购自 MedChemExpress (MCE)公司,RPMI 1640 培养基购自生工生物工程股份有限公司,胎牛血清(FBS)购自 Bio-Basic 公司,Western blot 及 CoIP 相关试剂[IgG 抗体和琼脂糖珠子(A+G)等]购自碧云天生物技术有限公司,GAPDH、COX Ⅳ、cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 7、PARP1、Rho A、ROCK1、AIF、BAX、Cytochrome c(Cyto c)、Tom 20 抗体均购自 Abcam 公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 细胞分组及药物处理

细胞培养后按照 ARE 作用浓度(0、10、20、40、80 nmol/L)和作用时间(0、6、12、18、24 h)分组,量效组(以 ARE 作用浓度分组)细胞经对应浓度 ARE 处理后继续培养 24 h,时效组(以 ARE 作用时间分组)细胞经 80 nmol/L ARE 作用后继续培养相应时间后,收集细胞进行检测。

1.4 MTT 检测细胞活力

取对数生长期细胞,计数后种植于 96 孔板中,每孔 90 μL 细胞液,1.0×10^4 细胞/孔,培养 24 h。对应组加入 10 μL 用完全培养基配制的梯度浓度 ARE(0、100、200、400、800 nmol/L),按照不同时间(6、12、18、24 h)继续培养。待达到药物作用时间后,96 孔板中每孔加入 20 μL 0.5% MTT 工作液,37 ℃避光孵育 4 h 后,每孔加入三联液(5 mL 异丙醇、10 g SDS、100 μL 分析纯盐酸混溶于 100 mL 双蒸水中配制而成)100 μL,37 ℃避光孵育过夜。酶标仪 595 nm 波长处检测光密度,计算细胞相对存活率。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞以 3.0×10^5/mL 密度种植于 12 孔板中,每孔 1 mL 细胞悬液,按 1.3 方法分组处理并收集细胞于离心管内,1 000 r/min,4 ℃离心 5 min,去除上清,细胞

再经 PBS 洗 2 遍,每管中加入 100 μL 1×binding buffer、2 μL Annexin Ⅴ-FITC 及 5 μL 50 μg/mL PI,涡旋混匀细胞,避光冰上染色 15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.6 Western blot 检测

细胞以 3.0×10^5/mL 密度种植于 100 mm 培养皿中,细胞悬液体积 10 mL,按 1.3 方法分组处理后,提取全细胞蛋白(碧云天 P0013 蛋白提取试剂盒)、线粒体蛋白以及细胞质蛋白(碧云天细胞线粒体分离试剂盒)并测定蛋白浓度(碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒增强型),蛋白液加入 5×loading buffer,96 ℃金属浴 10 min,保存于-20 ℃冰箱。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,450 mA 恒流 3~4 h 转印至 PVDF 膜上,再用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,一抗(1∶1 000)于 4 ℃摇床上孵育过夜,1×TBST 洗涤 10 min/次×3 次,加入二抗(1∶50 000)室温下孵育 2 h,1×TBST 洗涤 30 min/次×3 次,暗室曝光显影。

1.7 JC-1 方法检测线粒体膜电位

细胞以 3.0×10^5/mL 密度种植于 12 孔板中,每孔 1 mL 细胞悬液,按 1.3 方法分组处理并收集细胞于 1.5 mL EP 管中,1 000 r/min,4 ℃离心 5 min,重悬细胞于 0.5 mL 细胞培养液中,并加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,轻柔颠倒数次混匀,细胞培养箱中 37 ℃避光孵育 20 min 后,600×g,4 ℃离心 3~4 min 以沉淀细胞,弃上清;JC-1 染色缓冲液(1×)洗涤细胞 2 次,弃上清,再用 100 μL JC-1 染色缓冲液(1×)重悬细胞后,流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位变化情况。

1.8 免疫共沉淀实验(CoIP)检测

细胞以 3.0×10^5/mL 密度种植于 100 mm 培养皿中,细胞悬液体积 10 mL,按对照组和加药处理组(80 nmol/L ARE)分组处理,37 ℃细胞培养箱继续培养 24 h 后,提取总蛋白,测蛋白浓度。蛋白样品分为 3 份,1 份用于全蛋白直接制样(约 100 μg),另 2 份分为 IP 组和阴性对照(IgG)组(蛋白体积约 300 μL,浓度不低于 3 μg/μL),IP 组加入 Tom 20(抓手蛋白)抗体约 2 μg,IgG 组加入与 IP 组 Tom 20 同种属 IgG 抗体约 2 μg,4 ℃缓慢振摇过夜。离心后沉淀加入 30 μL 琼脂糖珠子(A+G),4 ℃缓慢振摇 3~4 h,珠子经 PBS 洗涤 5 次后制样,采用 Western blot 检测相关蛋白变化情况。

1.9 统计学分析

流式细胞术检测数据采用 FlowJo V10.6.2 软件进行分析。采用 GraphPad Prism 9.0 软件或 SPSS 26.0 进行统计学分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本组间比较采用独立样本 t 检验,多个样本组间比较采用单因素或两因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

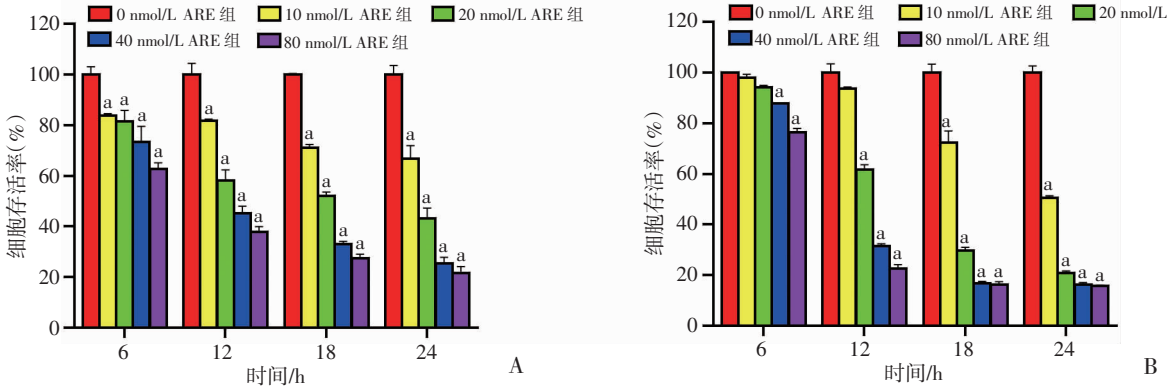
2 结果

2.1 ARE 抑制白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 的细胞增殖

采用 MTT 实验检测 ARE 对白血病细胞存活率的影响,结果显示:ARE 作用于 Jurkat 和 MV-4-11 细胞后,显著降低了这两种白血病细胞的存活率($P<0.01$),并呈现一定的剂量依赖性和时间依赖性(图 1),ARE 作用 24 h,对 Jurkat 细胞 IC_{50} 为(17.360±3.740)nmol/L,对 MV-4-11 细胞 IC_{50} 为(8.627±0.352)nmol/L。采用 ARE 同等剂量梯度作用 24 h,目前白血病临床一线用药阿糖胞苷和柔红霉素对 Jurkat 和 MV-4-11 无明显抑制增殖作用(图 2)。以上结果提示:ARE 以 20 nmol/L 浓度作用 12 h 后即可抑制 Jurkat 和 MV-4-11 细胞存活率达到 40%左右。

2.2 ARE 增加白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 的凋亡率

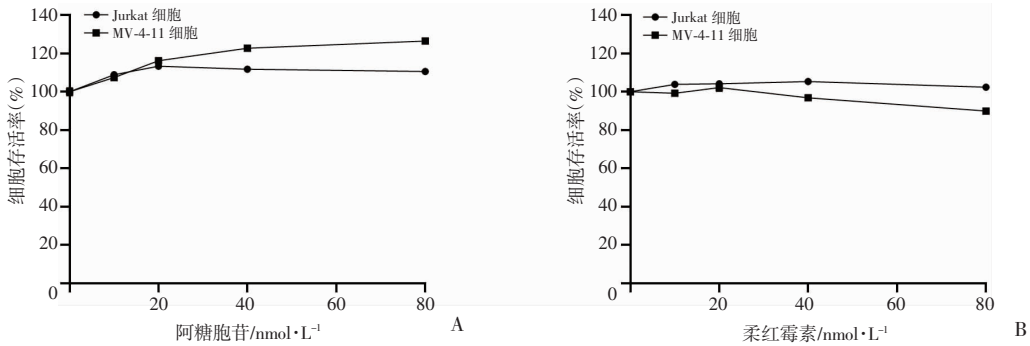
流式细胞术检测及半定量分析结果显示:ARE 可显著增加 Jurkat 和 MV-4-11 的细胞凋亡率,且具有一定的剂量依赖性和时间依赖性,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图 3。



a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组比较

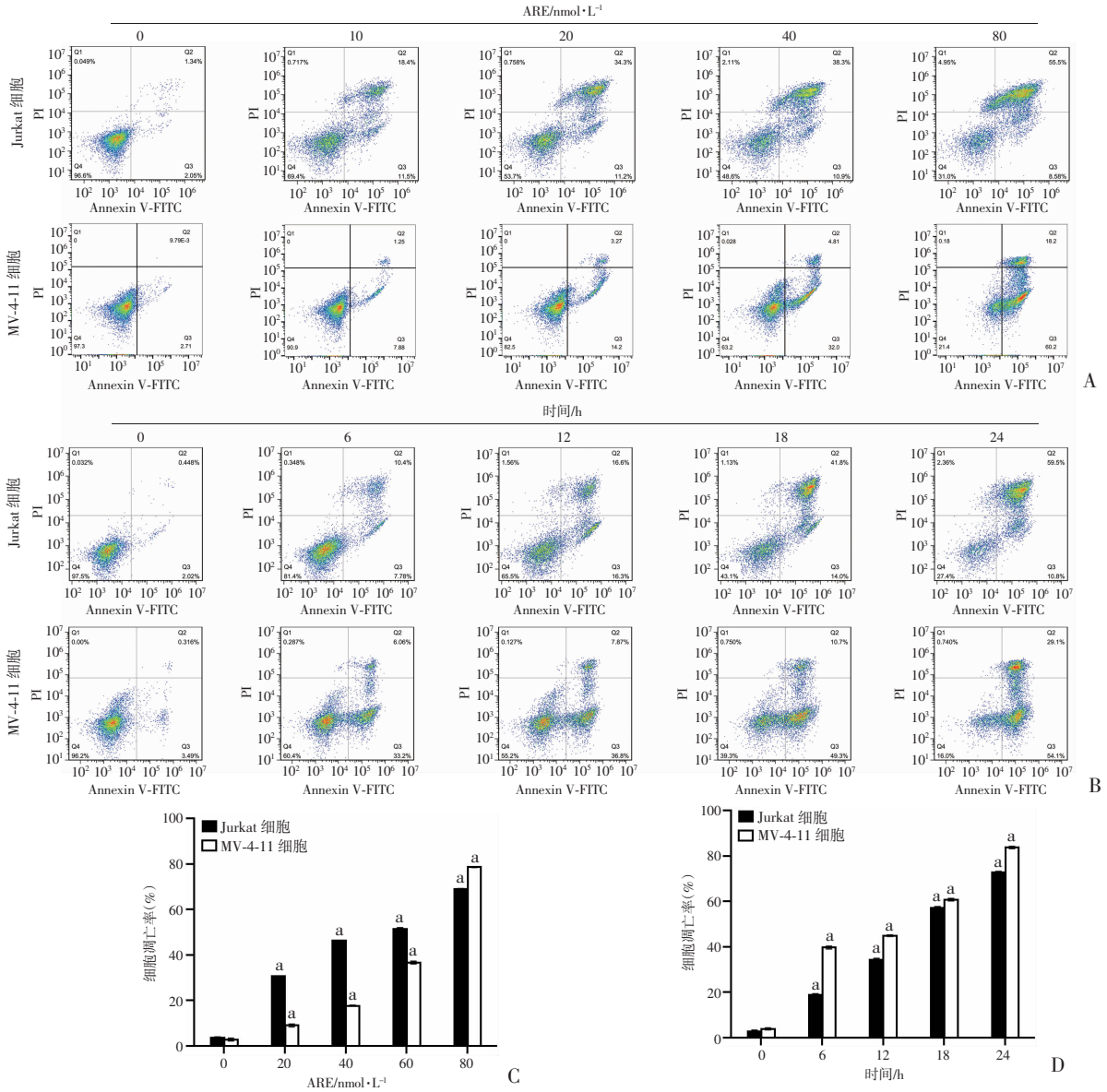
A:ARE 抑制 Jurkat 细胞增殖;B:ARE 抑制 MV-4-11 细胞增殖

图 1 ARE 对白血病细胞存活率的影响



A:不同浓度阿糖胞苷作用 24 h 对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞存活率的影响;B:不同浓度柔红霉素作用 24 h 对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞存活率的影响

图 2　阿糖胞苷和柔红霉素对白血病细胞存活率的影响



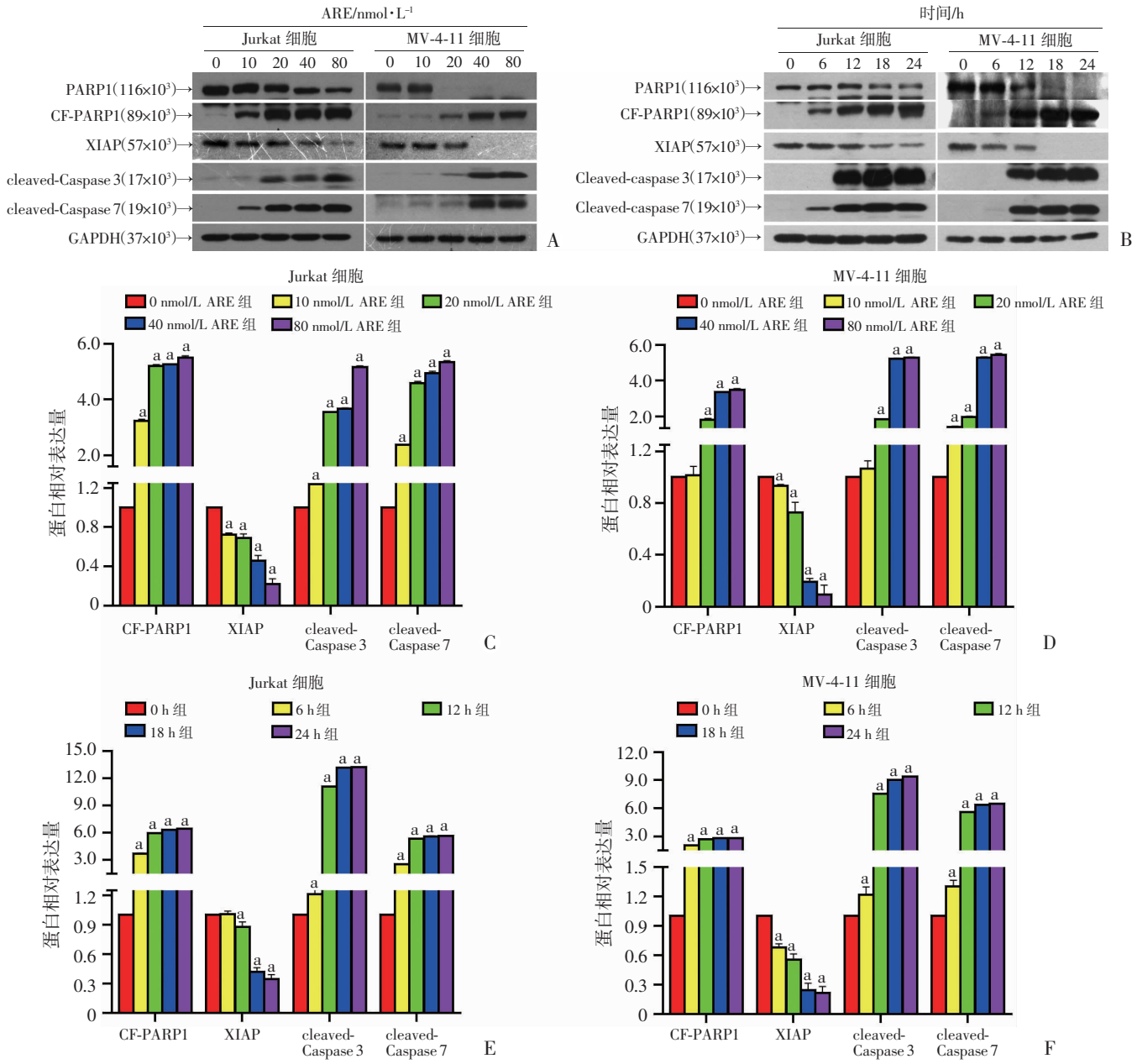
a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组或 0 h 组比较

A:量效组细胞凋亡检测;B:时效组细胞凋亡检测;C:量效组细胞凋亡率;D:时效组细胞凋亡率

图 3　ARE 对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞凋亡的影响

2.3 ARE 可激活白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 的细胞凋亡信号通路

采用 Western blot 对 Jurkat 和 MV-4-11 两种细胞凋亡相关蛋白表达进行检测,结果显示:ARE 可明显导致两种细胞中凋亡相关蛋白 cleaved-PARP1(CF-PARP1)、cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 7 表达升高,凋亡抑制蛋白 XIAP 表达降低,且具有剂量依赖性和时间依赖性($P<0.01$),提示 ARE 可有效诱导白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 发生凋亡(图 4)。



a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组或 0 h 组比较

A:量效组 Western blot 检测;B:时效组 Western blot 检测;C:Jurkat 细胞量效组 Western blot 半定量分析;D:MV-4-11 细胞量效组 Western blot 半定量分析;E:Jurkat 细胞时效组 Western blot 半定量分析;F:MV-4-11 细胞时效组 Western blot 半定量分析

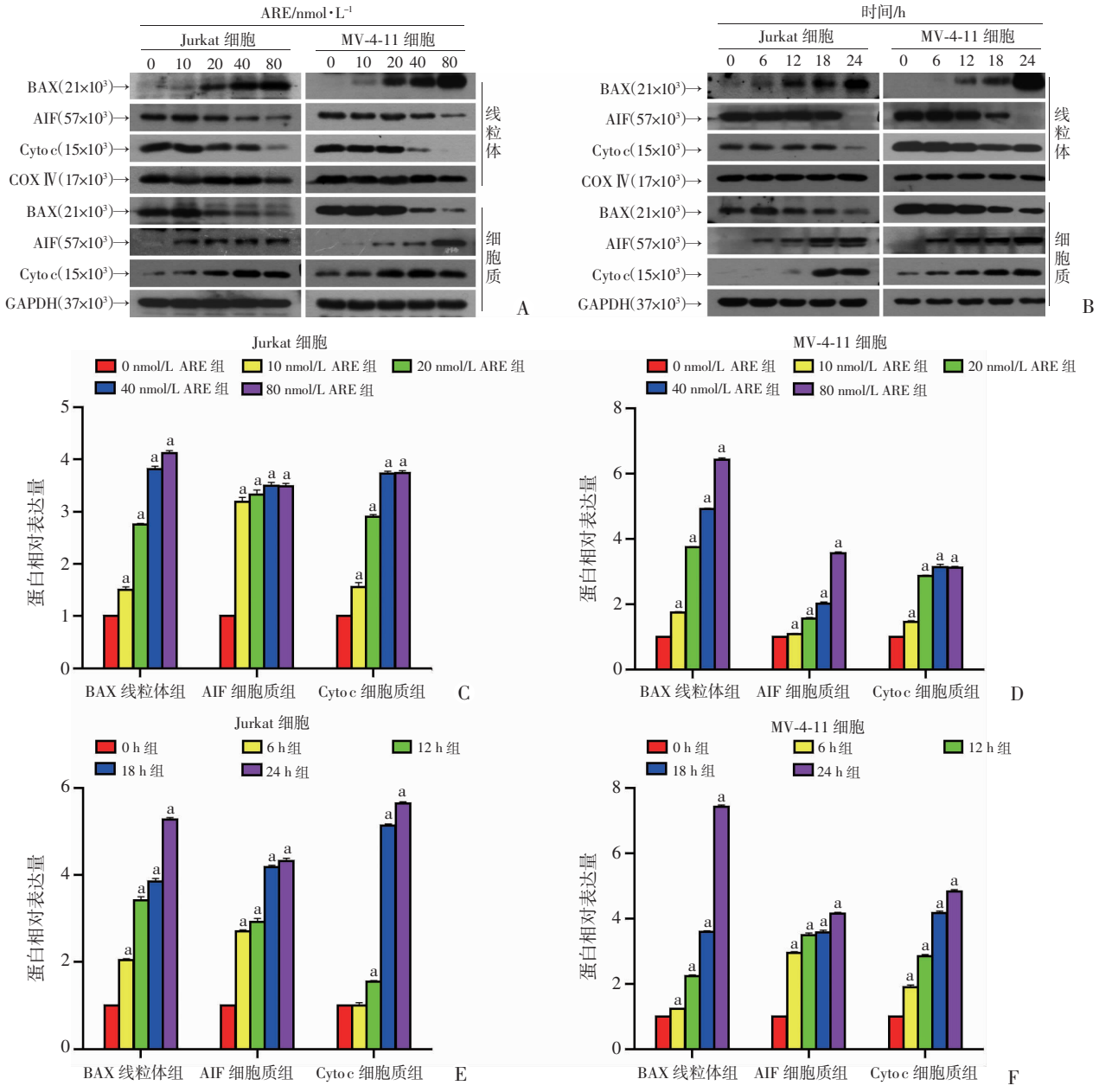
图 4 Western blot 检测 Jurkat 和 MV-4-11 细胞经 ARE 作用后凋亡相关蛋白的表达

2.4　ARE 引发 Jurkat 和 MV-4-11 细胞线粒体损伤

采用 Western blot 对 Jurkat 和 MV-4-11 两种细胞线粒体损伤相关蛋白表达变化情况进行检测,结果显示:ARE 可明显增加两种细胞中 BAX 从细胞质转移至线粒体,AIF 和 Cytochrome c 从线粒体释放至细胞质,且具有剂量依赖性和时间依赖性($P<0.01$),提示 ARE 可使白血病细胞线粒体发生损伤,进而诱导细胞发生内源性凋亡(图 5)。以线粒体外膜受体 Tom 20 为抓手蛋白进行免疫共沉淀(CoIP)实验,结果证实 ARE 诱导 BAX 发生线粒体转位($P<0.01$,图 6),与前述实验结果一致。

2.5　ARE 导致 Jurkat 和 MV-4-11 细胞线粒体膜电位下降

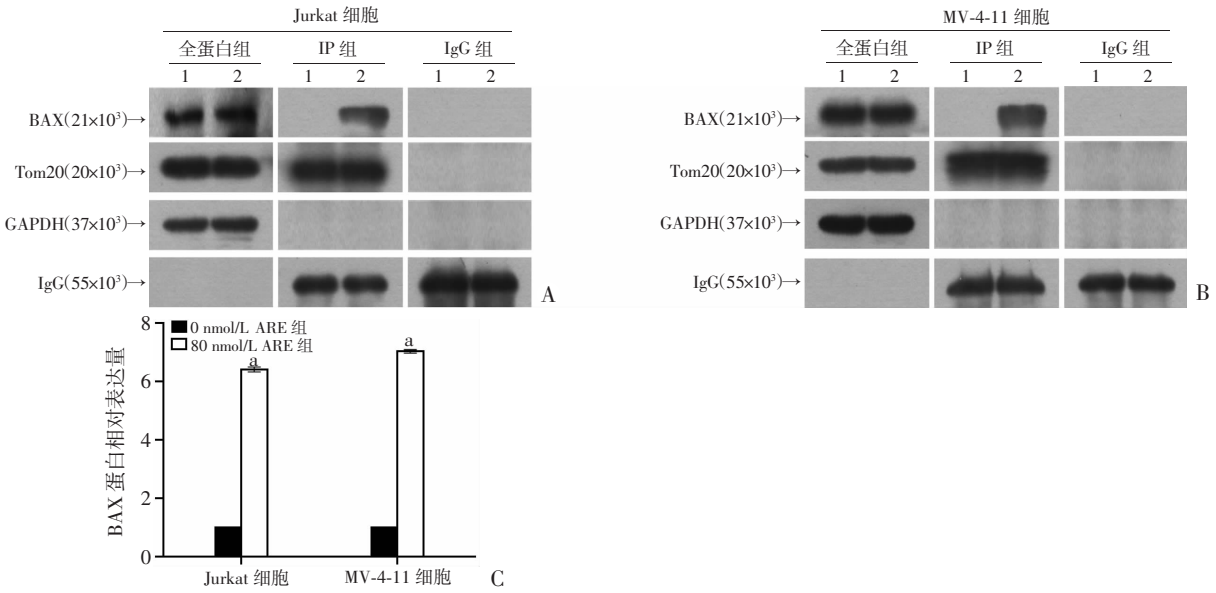
采用流式细胞术检测不同浓度 ARE 作用 24 h 后 Jurkat 和 MV-4-11 细胞线粒体膜电位的相对水平,结果显示:ARE 可使 Jurkat 和 MV-4-11 细胞的线粒体膜电位明显下降,提示线粒体膜通透性增加(图 7A),与前述实验结果一致。半定量分析结果显示:ARE 降低线粒体膜电位具有一定的剂量依赖性,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 7B、C)。



a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组或 0 h 组比较

A:量效组 Western blot 检测;B:时效组 Western blot 检测;C:Jurkat 细胞量效组 Western blot 半定量分析;D:MV-4-11 细胞量效组 Western blot 半定量分析;E:Jurkat 细胞时效组 Western blot 半定量分析;F:MV-4-11 细胞时效组 Western blot 半定量分析

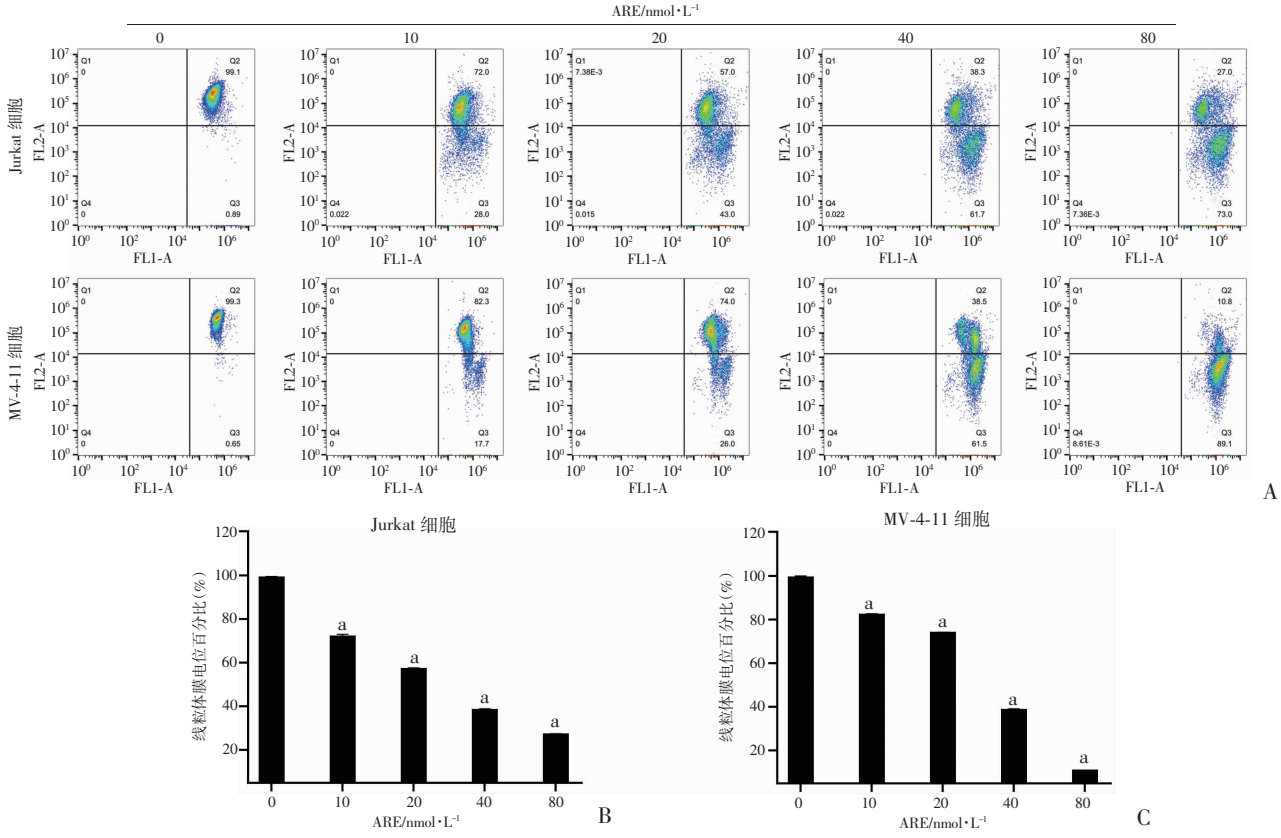
图 5　Western blot 检测 Jurkat 和 MV-4-11 细胞经 ARE 作用后线粒体损伤相关蛋白的表达



1:0 nmol/L ARE 组;2:80 nmol/L ARE 组;a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组比较

A:CoIP 证实 80 nmol/L ARE 增加 Jurkat 细胞中 BAX 和线粒体的结合;B:CoIP 证实 80 nmol/L ARE 增加 MV-4-11 细胞中 BAX 和线粒体的结合;C:CoIP 实验结果半定量分析

图 6 免疫共沉淀(CoIP)证实 ARE 增加 Jurkat 和 MV-4-11 细胞中 BAX 和线粒体的结合



a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组比较

A:流式细胞术检测不同浓度 ARE 作用于 Jurkat 和 MV-4-11 细胞 24 h 后线粒体膜电位水平;B:Jurkat 细胞线粒体膜电位半定量分析;C:MV-4-11 细胞线粒体膜电位半定量分析

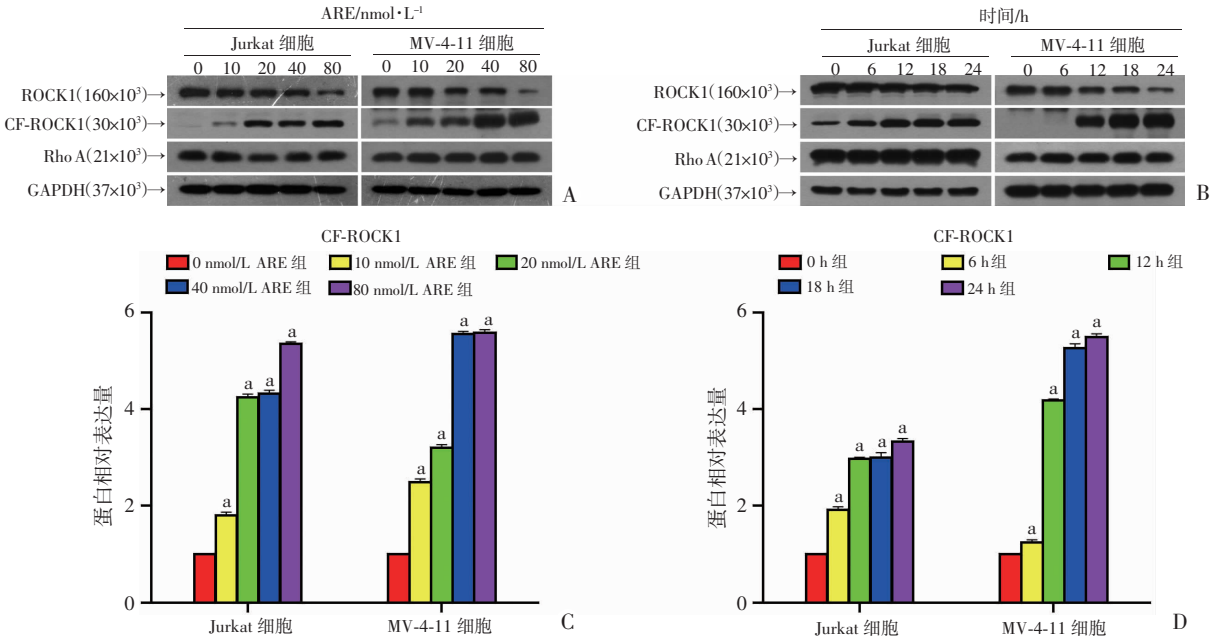
图 7 ARE 对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞线粒体膜电位的影响

2.6　ARE 通过 Rho A/ROCK1 信号通路诱导 Jurkat 和 MV-4-11 细胞发生凋亡

Western blot 检测结果显示:Jurkat 和 MV-4-11 细胞经 ARE 作用后,Rho A 蛋白总水平无明显变化,但 ROCK1 全蛋白水平减少,cleaved-ROCK1(CF-ROCK1)蛋白水平增加,且具有剂量依赖性和时间依赖性($P<0.01$,图 8)。

2.7　抑制 ROCK1 阻断 ARE 诱导的 Jurkat 和 MV-4-11 凋亡发生

流式细胞术检测结果显示:细胞经 Y-27632 预处理后,与 ARE(80 nmol/L)处理组比较,细胞凋亡率明显降低($P<0.01$,图 9、10);Western blot 检测结果显示:细胞经 Y-27632 预处理后抑制了 ARE 导致的 Caspase 3、Caspase 7 的裂解激活以及 PARP1 的剪切,阻断了 ARE 诱导的 BAX 线粒体转位以及 Cytochrome c 和 AIF 由线粒体向细胞质的释放,并减弱了 ARE 所致的 XIAP 表达下调(图 11)。



a:$P<0.01$,与对应 0 nmol/L ARE 组或 0 h 组比较

A:量效组 Western blot 检测结果;B:时效组 Western blot 检测结果;C:量效组 Western blot 半定量分析;D:时效组 Western blot 半定量分析

图 8　Western blot 检测 Jurkat 和 MV-4-11 细胞经 ARE 作用后 Rho A/ROCK1 信号通路蛋白的表达

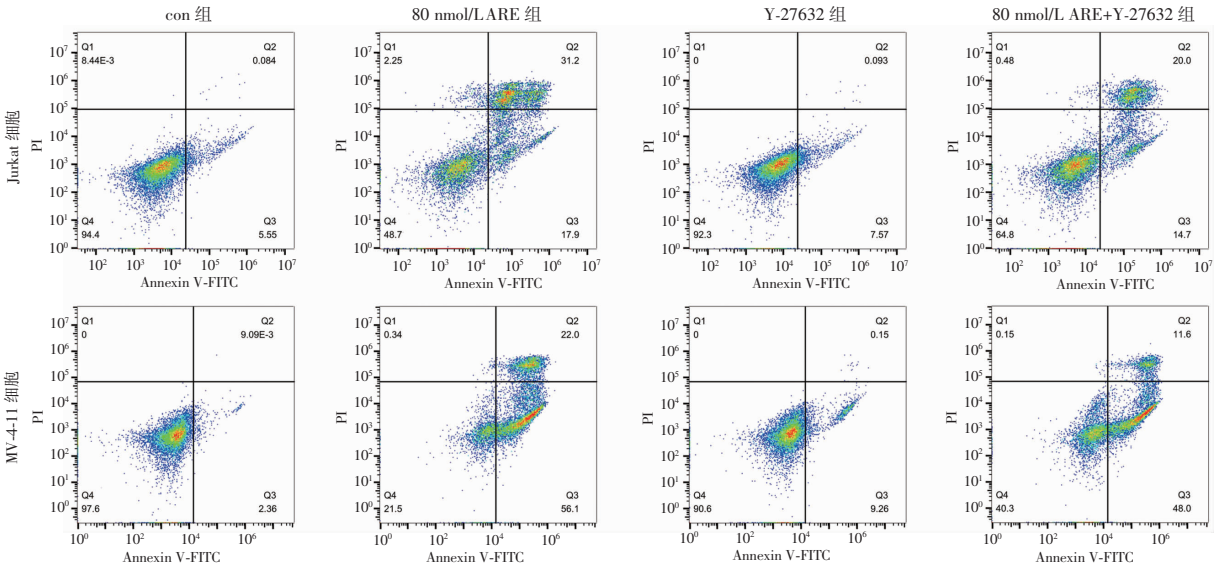
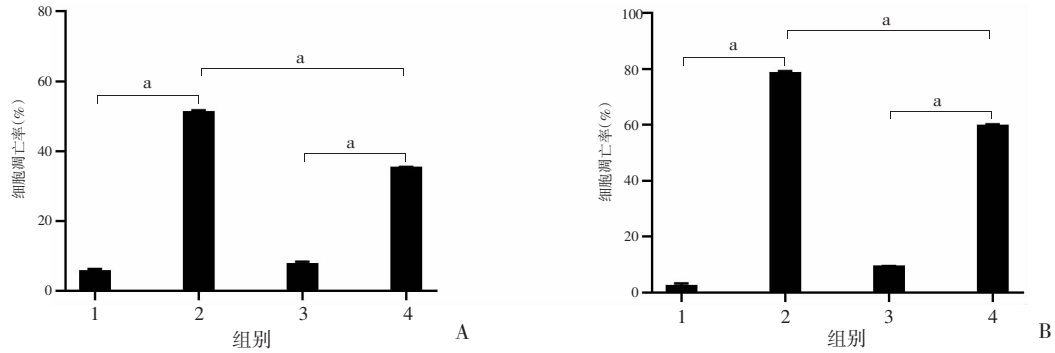


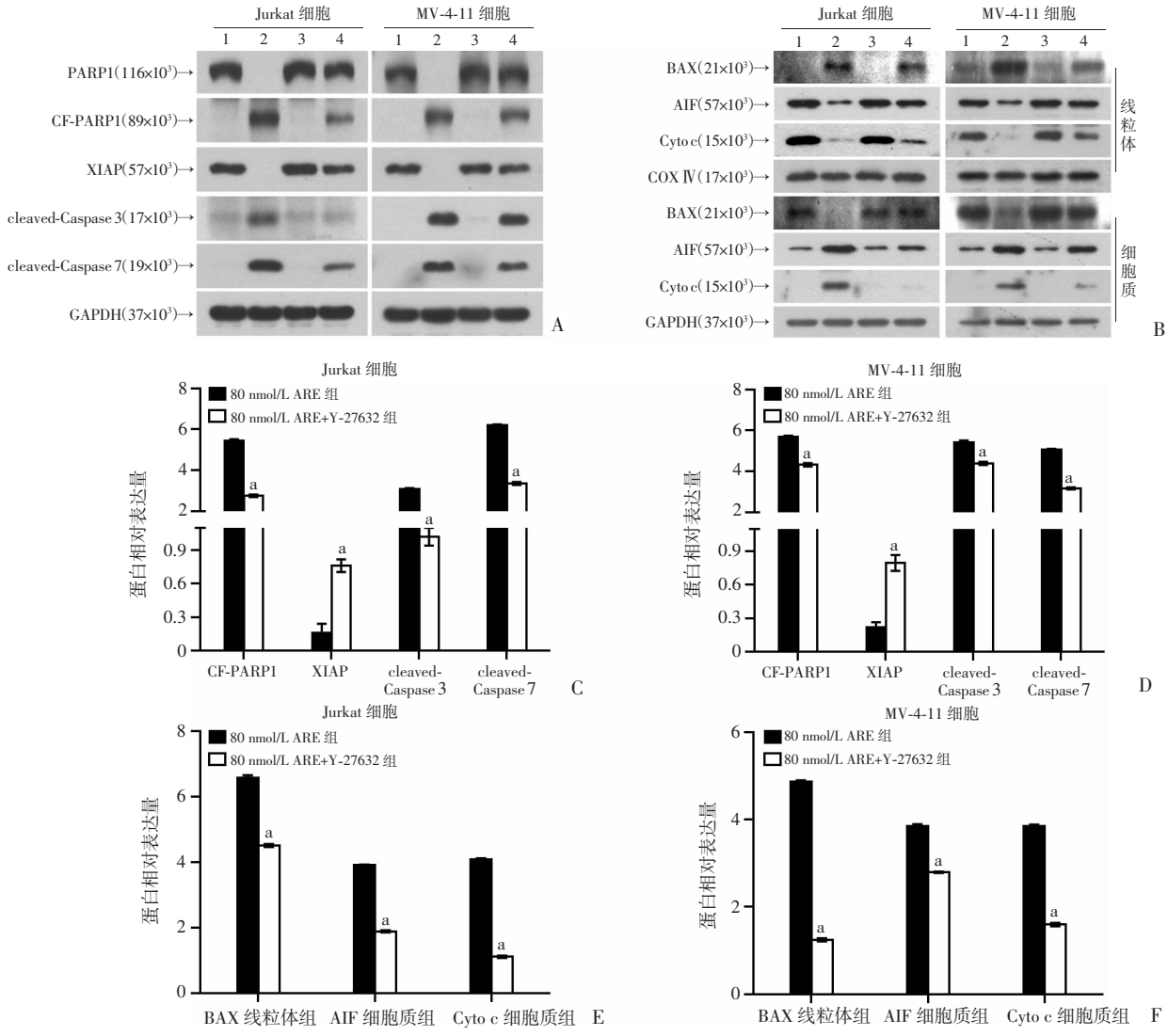
图 9　流式细胞术检测 Jurkat 和 MV-4-11 细胞经 Y-27632 预处理对 ARE 诱导细胞凋亡作用的影响



1:con 组;2:80 nmol/L ARE 组;3:Y-27632 组;4:80 nmol/L ARE+Y-27632 组;a:$P<0.01$

A:Jurkat 细胞凋亡率;B:MV-4-11 细胞凋亡率

图 10 Y-27632 预处理对 ARE 增加 Jurkat 和 MV-4-11 细胞凋亡率的影响



1:con 组;2:80 nmol/L ARE 组;3:Y-27632 组;4:80 nmol/L ARE+Y-27632 组;a:$P<0.01$,与 80 nmol/L ARE 组比较

A:Western blot 检测凋亡相关蛋白表达;B:Western blot 检测线粒体损伤相关蛋白表达;C:Jurkat 细胞凋亡相关蛋白 Western blot 半定量分析;D:MV-4-11 细胞凋亡相关蛋白 Western blot 半定量分析;E:Jurkat 细胞线粒体损伤相关蛋白 Western blot 半定量分析;F:MV-4-11 细胞线粒体损伤相关蛋白 Western blot 半定量分析

图 11 Western blot 检测细胞经 Y-27632 预处理对 ARE 作用的影响

3 讨论

蟾蜍毒素是蟾蜍科动物耳后腺和皮肤腺体的干燥分泌物,在我国应用广泛。ARE 作为蟾蜍毒素活性成分之一,已证实可抑制多种肿瘤细胞增殖和转移,如通过 JNK 信号介导的 Yes 相关蛋白多位点磷酸化促进乳腺癌细胞 MCF-7 发生凋亡[13];通过与 P38 MAPK 抑制剂 SB203580 联合作用明显抑制胶质瘤细胞 U-87 增殖[14];通过下调 β-catenin 表达抑制上皮细胞间充质转化进而抑制前列腺癌细胞 PC3 的增殖转移[15]。本研究证实:ARE 能明显抑制白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11 的活性,并提出 ARE 可能通过损伤线粒体诱导内源性凋亡途径发挥抗癌作用。

近期文献报道,Rho 激酶系统参与细胞内多种信号通路,如炎症、ROS、细胞凋亡等[16],其中凋亡通路中,不仅 ROCK1 在凋亡小体形成过程中发挥重要作用,而且 ROCK1 裂解活化片段可直接或者间接激活内源性凋亡途径,而凋亡执行效应蛋白 cleaved-Caspase 3 可进一步反馈增强 ROCK1 活化,形成正反馈环路,促使细胞凋亡进程不断增强[17-19]。前期研究提示:AT-101 通过激活 Rho A/ROCK1 通路,活化 RTEN 并使 Akt 失活,造成线粒体损伤,导致白血病细胞 U937 等发生凋亡[20];山金车二醇(arnidiol)通过激活 ROCK1 改变 Drp1(Ser 637)和 Cofilin(Ser 3)位点磷酸化状态,促进 Drp1 和 Cofilin 转位至线粒体,导致线粒体过度分裂破碎,使乳腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞发生凋亡[21]。本研究结果显示:ROCK1 在 20 nmol/L ARE 作用 24 h 或者 80 nmol/L ARE 作用 12 h 后开始出现明显剪切,且与凋亡相关蛋白 PARP1、Caspase 3、Caspase 7 等和线粒体损伤相关蛋白 BAX、Cytochrome c 等的变化趋势一致,证实 ARE 可激活 Rho A/ROCK1 通路进而活化经线粒体内源性细胞凋亡途径,最终杀死急性白血病细胞 Jurkat 和 MV-4-11,在提出 ARE 可有效诱导急性白血病细胞发生凋亡的同时,为阐明其可能的分子机制提供了实验依据。

经线粒体的内源性细胞凋亡途径,可由生理性或病理性刺激、药物(尤其是肿瘤化疗药物)等作用所激活,这些刺激将死亡信号传递到线粒体,导致线粒体外膜通透性增加,使促凋亡成分得以释放进入细胞质,活化 Caspase 级联反应,最终引发细胞凋亡[22]。因此,靶向激活经线粒体的内源性凋亡途径在多种疾病的治疗中表现出很好的应用前景,如神经退行性疾病、自身免疫性疾病和恶性肿瘤等。然而,BCL-2 蛋白家族(如 BAX)和线粒体之间的复杂相互作用网络,以及线粒体在细胞凋亡通路中的具体分子作用机制目前仍未完全阐明[23-24]。

本研究通过多项实验证实:ARE 激活 Rho A/ROCK1 信号通路,促进 BCL-2 家族蛋白 BAX 转位至线粒体外膜,在线粒体膜上自我聚合形成通透性孔道,使线粒体膜通透性增加、膜电位下降,促使 Cytochrome c 和 AIF 由线粒体释放入细胞质,进一步酶解活化 Caspase 3 和 Caspase 7 等级联反应,裂解 PARP1,并减少 XIAP 蛋白表达,Jurkat 和 MV-4-11 细胞发生凋亡崩解,被吞噬细胞吞噬清除,彻底杀死恶性白血病细胞。然而,本研究仅限于体外实验,未来还需要动物模型等体内实验进一步证实 ARE 对急性白血病的作用及其分子作用机制;此外,鉴于 ARE 对 Jurkat 和 MV-4-11 细胞促凋亡作用显著,未来可以探索 ARE 对其他类型肿瘤细胞系或者非肿瘤疾病细胞系是否有作用以及是否存在其他分子作用机制。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.

[2] LI M M, WU S, LIU Z, *et al*. Arenobufagin, a bufadienolide compound from toad venom, inhibits VEGF-mediated angiogenesis through suppression of VEGFR-2 signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(9): 1251-1260. DOI:10.1016/j.bcp.2012.01.023.

[3] DENG L J, WANG L H, PENG C K, *et al*. Fibroblast activation protein α activated tripeptide bufadienolide antitumor prodrug with reduced cardiotoxicity[J]. J Med Chem, 2017, 60(13): 5320-5333. DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b01755.

[4] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 678-695. DOI:10.1038/s41580-020-0270-8.

[5] KOREN E, FUCHS Y. Modes of regulated cell death in cancer[J]. Cancer Discov, 2021, 11(2): 245-265. DOI:10.1158/2159-8290.CD-20-0789.

[6] SHI J J, WEI L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007, 55(2): 61-75. DOI:10.1007/s00005-007-0009-7.

[7] GABET A S, COULON S, FRICOT A, *et al*. Caspase-activated ROCK-1 allows erythroblast terminal maturation independently of cytokine-induced Rho signaling[J]. Cell

Death Differ, 2011, 18(4): 678-689. DOI:10.1038/cdd.2010.140.

[8] THUMKEO D, WATANABE S, NARUMIYA S. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals[J]. Eur J Cell Biol, 2013, 92(10/11): 303-315. DOI:10.1016/j.ejcb.2013.09.002.

[9] LU L, YUE S, JIANG L F, *et al*. Myeloid Notch1 deficiency activates the RhoA/ROCK pathway and aggravates hepatocellular damage in mouse ischemic livers[J]. Hepatology, 2018, 67(3): 1041-1055. DOI:10.1002/hep.29593.

[10] GURKAR A U, CHU K, RAJ L, *et al*. Identification of $ROCK_1$ kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2189. DOI:10.1038/ncomms3189.

[11] JULIAN L, OLSON M F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions[J]. Small GTPases, 2014, 5: e29846. DOI:10.4161/sgtp.29846.

[12] WERMKE M, CAMGOZ A, PASZKOWSKI-ROGACZ M, *et al*. RNAi profiling of primary human AML cells identifies $ROCK_1$ as a therapeutic target and nominates fasudil as an antileukemic drug[J]. Blood, 2015, 125(24): 3760-3768. DOI:10.1182/blood-2014-07-590646.

[13] DENG L J, QI M, PENG Q L, *et al*. Arenobufagin induces MCF-7 cell apoptosis by promoting JNK-mediated multisite phosphorylation of Yes-associated protein[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 209. DOI:10.1186/s12935-018-0706-9.

[14] HAN L, YUAN B, SHIMADA R, *et al*. Cytocidal effects of arenobufagin and hellebrigenin, two active bufadienolide compounds, against human glioblastoma cell line U-87[J]. Int J Oncol, 2018, 53(6): 2488-2502. DOI:10.3892/ijo.2018.4567.

[15] CHEN L, MAI W, CHEN M, *et al*. Arenobufagin inhibits prostate cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating β-catenin[J]. Pharmacol Res, 2017, 123: 130-142. DOI:10.1016/j.phrs.2017.07.009.

[16] VEMULA S, SHI J, MALI R S, *et al*. ROCK1 functions as a critical regulator of stress erythropoiesis and survival by regulating p53[J]. Blood, 2012, 120(14): 2868-2878. DOI:10.1182/blood-2011-10-384172.

[17] SHIMOKAWA H, SUNAMURA S, SATOH K. RhoA/rho-kinase in the cardiovascular system[J]. Circ Res, 2016, 118(2): 352-366. DOI: 10.1161/circresaha.115.306532.

[18] TIXEIRA R, PHAN T K, CARUSO S, *et al*. $ROCK_1$ but not LIMK1 or PAK2 is a key regulator of apoptotic membrane blebbing and cell disassembly[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(1): 102-116. DOI:10.1038/s41418-019-0342-5.

[19] CHANG J, XIE M, SHAH V R, *et al*. Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(39): 14495-14500. DOI:10.1073/pnas.0601911103.

[20] LI G, LIU L, SHAN C, *et al*. RhoA/ROCK/PTEN signaling is involved in AT-101-mediated apoptosis in human leukemia cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e998. DOI:10.1038/cddis.2013.519.

[21] HU J, ZHANG H, LI J, *et al*. $ROCK_1$ activation-mediated mitochondrial translocation of Drp1 and cofilin are required for arnidiol-induced mitochondrial fission and apoptosis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 37. DOI:10.1186/s13046-020-01545-7.

[22] DEL RE D P, AMGALAN D, LINKERMANN A, *et al*. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease[J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1765-1817. DOI:10.1152/physrev.00022.2018.

[23] BOCK F J, TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100. DOI:10.1038/s41580-019-0173-8.

[24] LUNA-VARGAS M P A, CHIPUK J E. Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond[J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(12): 906-917. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.07.002.

(收稿:2021-09-22;修回:2021-11-15)

(编辑 张 维)