基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0321-03

大肠癌细胞 PARG、PARP 与 AKT 磷酸化状态的关系

李巧转,王娅兰,李 娴

(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,重庆 400016)

【摘 要】目的:聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose) glycohydrolase,PARG]可通过影响聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]和蛋白激酶 B[protein kinase B,AKT]磷酸化在炎症中发挥重要作用,但在肿瘤中的作用却不清楚。本研究则对大肠癌细胞系 LOVO 中 PARG、PARP、NF-κB 和 AKT 磷酸化的相互关系进行了初步探讨。方法:Western blot 法检测 LOVO 细胞 PARG、PARP、NF-κB、AKT 和 PI-AKT^{473} 的蛋白表达。以丹宁酸为 PARG 抑制剂。结果:PARG 抑制剂丹宁酸处理组 LOVO 细胞 PARG、PARP、NF-κB 表达降低,而 PI-AKT^{473} 表达则增强,较对照组(无丹宁酸处理组)比较差异均具有显著意义(P=0.006 8,P<0.000 1,P <0.05,P=0.000 8)。且 PARG 和 PARP 蛋白的表达呈正相关(r=0.823 8,P<0.05),PARG 和 PI-AKT^{473} 的蛋白表达呈负相关(r=-0.819 0,P<0.05)。结论:在大肠癌细胞株中,抑制 PARG 可以下调 PARP 和 NF-κB,并可增强 AKT 的磷酸化。其在肿瘤浸润转移中,可能具有重要作用。

【关键词】PARG;PARP;大肠癌 ;AKT 磷酸化

【中国图书分类法分类号】R363.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-04

The relation between poly(ADP-ribose) glycohydrolase, poly(ADP-ribose) polymerase and AKT phosphorylation in colorectal carcinoma cell

LI Qiao-zhuan, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Poly(ADP-ribose) glycohydrolase(PARG) plays an important role in the inflammation via regulating Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and AKT phosphorylation, but it is not clear that how it in tumour. The current study was desiged to study the relationship between PARG, PARP, NF-κB and AKT phosphorylation in colorectal carcinoma cell lines LOVO. *Methods*: Western blot was used to test the expression of PARG, PARP, NF-κB, AKT and PI-AKT^{473}.Gallotannin(GLTN) was served as PARG inhibitor. *Results*: The expression of PARG, PARP and NF-κB in gallotannin-treated LOVO was weaker than that in the control groups (gallotannin-untreated groups)(P=0.0068,P<0.0001,P<0.05). While the expression of PI-AKT^{473} was increased in gallotannin-treated groups (P=0.0008).A positive correlation was found between PARG expression and PARP expression (r=0.8238,P<0.05). But the expression of PARG was independently and inversely correlated with PI-AKT^{473} expression (r=-0.8190,P<0.05). *Conclusion*: The data suggest that PARG inhibition may downregulate PARP, NF-κB and enhance AKT phosphorylation in colorectal carcinoma cells. PARG probably plays a role in the infiltration and metastasis in tumour.

【Key words】Poly(ADP-ribose) glycohydrolase; Poly(ADP-ribose) polymerase; Colorectal carcinoma; AKT Phosphorylation

生理状态下,细胞内大多蛋白质的聚(腺苷二磷酸核糖)[Poly(ADP-ribose),PAR]化过程中,聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose) glycohydrolase,PARG]和聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[Poly(ADP-ribose) polymerase,PARP]具有重要作用。PARP 是普遍存在于真核细胞核内的单体蛋白酶,活化后可以通过催化 NAD^+ 上的腺苷二磷酸核糖基团转移聚合成 PAR,从而对细胞内蛋白质进行翻译后修饰作用。而在这一过程中,PAR 对 PARP 活性具有负反馈调节作用。而 PARG 能很快水解 PAR,使 PARP 保持活化状态。

目前研究显示,在炎症中 PARP 与 PARG 有协同作用,药物抑制 PARP 或 PARG 均能降低缺血对大脑的损伤,也能同步降低缺血再灌注引起的肠组织炎症性损伤[1]。而我们先前的研究则表明,PARP 与大肠癌的发生发展有着密切的关系[2]。但大肠癌中 PARP 与 PARG 关系尚不清楚。

磷脂酰肌醇 -3- 羟基激酶/丝氨酸,苏氨酸激酶(Phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B,PI3K/AKT)通路是膜受

作者介绍:李巧转(1984-),女,硕士,研究方向:肿瘤病理。

通讯作者:王娅兰,女,教授,E-mail:wangyalan074@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30870946)。

体信号向细胞内转导的重要途径，广泛存在于细胞中，参与细胞的生长、增值、分化和调节。有文献报道，在人类多种肿瘤中如非小细胞肺癌、前列腺癌、肠癌、乳腺癌等，PI3K/AKT 常显示过表达和持续活化。在乳腺癌中，AKT 异常活化与其侵袭迁移行为高度相关，提示 AKT 的抑制能够阻碍肿瘤的演进[3]。应用 PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 作用于卵巢癌细胞系，细胞的转移和侵袭明显受到抑制[4]。亦有研究表明，在氧化应激中，抑制 PARP 可以活化 AKT 发挥细胞保护作用[5]。同时，PARP 不足亦可激活 AKT/GSK 通路减少纤维母细胞样滑膜细胞（Fibroblast-like synoviocytes，FLS）的凋亡[6]。然而在肿瘤中，抑制 PARP 是否能够影响 AKT 的磷酸化尚不清楚。

本研究应用 Western blot 法，以低分化的人大肠癌细胞珠 LOVO 为研究对象，采用丹宁酸(Gallotannin，GLTN)抑制 PARG，直接观察人大肠癌细胞 PARG 抑制前后 PARP，NF-κB 和 AKT 的磷酸化变化，初步探讨大肠癌中 PARG 和 PARP 的相互关系以及 PARG 对大肠癌 AKT 磷酸化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠癌细胞株 LOVO(重庆医科大学 汤为学教授惠赠)，抗 PARG 抗体购于 Abcam，抗 PARP、NF-κB、AKT、AKT^{473} 抗体均购于 Santa Cruz。抗 β-Actin 和 HRP 标记的兔抗羊和羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉生物技术公司。丹宁酸购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大肠癌细胞 LOVO 于含有 10%小牛血清，100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中，37℃，5%CO_2 条件下培养。

1.2.2 人大肠癌 LOVO 细胞 PARP 和 AKT 磷酸化检测 采用 Western blot 法进行检测。其主要步骤为，参照文献[7,8] LOVO 细胞按 100 μmol/L 加入丹宁酸培养 8 h，未加丹宁酸为对照组。收集细胞离心沉淀后，提取细胞蛋白，并用 BCA 法测定蛋白浓度。8%变性聚丙烯酰氨凝胶垂直电泳，将蛋白质半干转法转移至硝酸纤维素膜上，5%脱脂奶粉封闭，分别加入抗 PARG、PARP、NF-κB、β-actin、AKT、PI-AKT473 一抗，4℃ 过夜，加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 或兔抗羊 IgG(根据不同的一抗)，室温下摇床孵育 1 h，采用 ECL 试剂盒进行化学发光显影。凝胶成像仪照相，目的条带用图像分析软件(Quantity One)进行光密度积分值分析，结果以目的条带与 β-Actin 光密度积分值的比值作为蛋白表达相对含量。

1.3 统计学方法

计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SAS 9.0 统计分析软件对数据进行 Pearson 相关分析和 t 检验，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大肠癌 LOVO 细胞丹宁酸处理前后 PARG、PARP 和 NF-κB 变化

如图 1 和表 1 所示，丹宁酸处理组 PARG、PARP 和 NF-κB 表达明显弱于未处理组细胞。t 检验分析，差异有统计学意义(P=0.006 8，P<0.000 1，P<0.05)。

2.2 大肠癌 LOVO 细胞丹宁酸处理前后 AKT，PI-AKT^{473} 变化

如图 2 和表 2 所示，与对照组相比，丹宁酸处理组 AKT 磷酸化增强。t 检验分析，差异有统计学意义(P=0.000 8)。

2.3 大肠癌 LOVO 细胞 PARG、PARP 关系

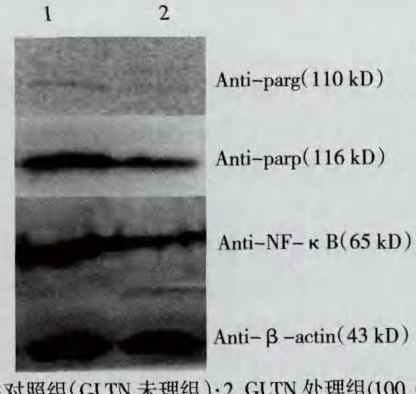
丹宁酸处理后，PARG、PARP 表达都明显降低(见表 1)，经 Pearson 相关分析，PARG 和 PARP 的表达呈正相关的趋势(r=0.8238，P<0.05)。

2.4 大肠癌 LOVO 细胞 PARG 与 AKT 磷酸化关系

丹宁酸处理组 PARG 表达明显弱于未处理组，而与对照组相比，丹宁酸处理组 AKT 磷酸化增强(见表 1 和 2)。经 Pearson 相关分析，两者的表达呈负相关的趋势(r=-0.819 0，P<0.05)。

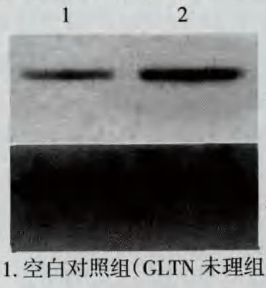
3 讨 论

PARG 是细胞 PAR 化过程中极其重要的一种水解酶，在细胞的 PAR 化过程之后，可以瞬间降解 PAR，使失去活性的 PARP 恢复其活性，重新进入细胞 PAR 化的循环中，从而对 PARP 的活性起着重要的调节作用。Tikoo 等在建立家兔肾毒性模型的试验研究中发现，应用 PARG 抑制剂丹宁酸不仅可



1. 空白对照组(GLTN 未理组)；2. GLTN 处理组(100 μmol/L)

图 1 丹宁酸处理组和未处理组大肠癌细胞 PARG、PARP、NF-κB 的表达



1. 空白对照组(GLTN 未理组)；2. GLTN 处理组(100 μmol/L)

图 2 丹宁酸处理组和未处理组大肠癌细胞 AKT 磷酸化的检测

表 1 丹宁酸处理前后蛋白 PARG,PARP, NF-κB 的表达($\bar{x}\pm s$)

分组	PARG	PARP	NF-κB
空白对照组	0.003 0 ± 0.000 3	0.490 8 ± 0.012 6	0.576 8 ± 0.026 4
GLTN 处理组	0.001 9 ± 0.000 1*	0.122 3 ± 0.028 7*	0.235 3 ± 0.033 2*

注:与空白对照组比较,*P<0.05

表 2 丹宁酸处理前后 AKT,PI-AKT^{473} 的表达($\bar{x}\pm s$)

分组	AKT	PI-AKT^{473}
空白对照组	0.261 8 ± 0.037 4	0.030 0 ± 0.003 1
GLTN 处理组	0.227 4 ± 0.046 9	0.064 5 ± 0.007 2*

注:t-tests 与空白对照组比较,*P=0.0008

以降低 PARG 的含量,同时也可降低 PARP 的含量[9]。有研究[1]表明,在敲除 PARG 基因的小鼠肠炎模型实验研究中,或药物抑制 PARG 之后,肠组织炎症过程明显受到抑制,这与 PARP 活性降低,下调 NF-κB 转录活性,进而下调 P-selectin、VCAM-1、ICAM-1 等的表达相关。

在本实验中,我们对丹宁酸处理前后的人大肠癌细胞中的 PARG 的表达及其与 PARP 的关系进行了观察。结果显示,用丹宁酸处理后,PARG 受到抑制,同时 PARP 的表达量也降低。从而推测在大肠癌中,PARG 与 PARP 的关系与炎症过程类似,即 PARG 抑制可以下调 PARP 的活性。

有文献报道艾力替新(Ellipticine)能够抑制肺癌细胞 A549 的生长,且此过程与 PARP 的降低和 AKT 的活化增强有关[10]。亦有文献报道,PARP 可以通过促分裂原活化蛋白激酶级联反应和 PI3K/AKT 信号转导途径,调节 NF-κB 的转录活性,进一步下调 NF-κB 依赖性基因的表达[11]。Balazs 等在建立小鼠败血病模型的试验研究中发现,用 PARP 抑制剂 4-Hydroxyquinazoline(4-HQN)可以激活 PI3K/AKT 通路,并使其小鼠的肝脏和肺脏组织中 NF-κB 活性降低,推测 AKT 的激活可以抑制 NF-κB 的活性,并具有一定的组织特异性[12]。而众多研究已表明,NF-κB 在肿瘤的发生发展中具有重要作用。在大肠癌中,NF-κB 可上调 ICAM-1、VEGF、MMP-2 等的表达,从而促进大肠癌的转移[13]。

我们既往研究也表明,抑制大肠癌细胞 PARP,可抑制癌细胞 NF-κB 活性及大肠癌转移相关的 NF-κB 依赖性基因的表达,同时可抑制癌细胞侵袭转移能力[14]。

而本实验也观察到,用 100 μmol/L 的丹宁酸处理后,LOVO 细胞 PARG, PARP 和 NF-κB 的表达均受到抑制,而 PI-AKT^{473} 的表达增强,提示在大肠癌细胞株中,抑制 PARG 可以下调 PARP 和 NF-κB,并可增强 AKT 的磷酸化。鉴于 AKT、NF-κB 在肿瘤转移中的作用,及 PARP 与大肠癌侵袭转移的关系,我们推测,在大肠癌瘤浸润转移中,PARG 可能具有重要作用。但其详尽机制还有待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] 蔡 莉,王娅兰,林 晓. PARP 抑制与小鼠结肠癌 CT26 细胞生长活性的关系[J].重庆医科大学学报, 2008,33(2):136-139.

[3] Sliva D, Jedinak A, Kawasaki J, et al. Phellinus linteus suppresses growth, angiogenesis and invasive behaviour of breast cancer cells through the inhibition of AKT signaling[J]. Br J Cancer, 2008, 98(8):1348-1356.

[4] Shukla S,Maclennan G T,Marengo S R,et al. Constitutive activation of PI3K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model[J]. Prostate, 2005,64(3): 224-239.

[5] Tapodi A, Debreceni B, Hanto K, et al. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42):35767-75.

[6] García S, Mera A, Conde C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase suppression protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis[J].Rheumatology (Oxford),2009,48(5):483-489.

[7] 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.

[8] 顾海涛,王继见,李 洋.siRNA 干扰对乳腺癌(MCF-7)ATX 表达和侵袭力的影响[J].重庆医科大学学报,2009,34(5):554-557.

[9] Tikoo K, Bhatt D K, Gaikwad, et al. Differential effects of tannic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats[J]. FEBS Lett, 2007, 581(10):2027-2035.

[10] Fang K, Chen S P,Lin C W, et al. Ellipticine-induced apoptosis depends on Akt translocation and signaling in lung epithelial cancer cells[J]. Lung Cancer, 2009, 63(2): 227-234.

[11] Nakajima H, Nagaso H,Kakui N, et al. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in nuclear factor-kappaB dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells [J].J Biol Chem,2004,279(41): 42774-42786.

[12] Veres B, Radnai B, Gallyas F, et al. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly (ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitor,4-hydroxyquinazoline,in lipopolysaccharide-Induced inflammation in mice[J].Pharmacol Exp Ther, 2004 ,310(1):247-55.

[13] Williams A C, Smartt H, H-Zadeh A M,et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF-kappaB[J].Cell Death Differ, 2007,14(1):137-45.

[14] 蔡 莉, 王娅兰, 林 晓. PARP 抑制剂 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞 PARP/NF-κB 复合物和 NF-κB 活性的影响[J].基础医学与临床, 2008,28(11):1156-1159.

(责任编辑:冉明会)