基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0174-04

GSK-3β 参与抑制肺癌细胞增殖的实验研究

刘 翩[1,2],蒋幼凡[1],岳 秀[1,2],刘 晓[1,2]

(1. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010;2. 重庆医科大学基础研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨糖原合成酶激酶-3β(Glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)对肺癌 A549 细胞增殖的影响及可能机制。方法:MTT 法检测不同浓度曲古抑菌素 A(TSA)和联合 GSK-3β 抑制剂 SB216763 对 A549 细胞增殖的影响;Western Blot 法检测各组细胞中 GSK-3β 和磷酸化 GSK-3β(pGSK-3β)蛋白表达的变化;流式细胞仪分析细胞周期;免疫细胞化学法检测 p27 蛋白水平。结果:TSA 以剂量依赖性抑制 A549 细胞生长,使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期,用 SB216763 预处理后明显减弱了 TSA 对 A549 细胞的生长抑制作用和细胞周期阻滞。TSA 对细胞 GSK-3β 蛋白表达无明显影响,却降低了 pGSK-3β 蛋白水平,p27 蛋白表达增加;抑制剂 SB216763 使 pGSK-3β 表达增加,下调 p27 蛋白水平。结论:GSK-3β 参与并促进了 TSA 对肺癌细胞的生长抑制和细胞周期阻滞效应,其机制可能与 GSK-3β 对 p27 蛋白的调节有关。

【关键词】糖原合成酶激酶-3β;肺癌;曲古抑菌素 A;p27

【中国图书分类法分类号】R734.2;R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-26

Glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) involved in the inhibitory effect on proliferation of lung carcinoma cells in vitro

LIU Pian, et al

(*Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of Glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) on cell proliferation in human lung adenocarcinoma cell line A549 and its potential mechanisms. *Methods*: MTT assay was employed to evaluate the effects of trichostatin A (TSA) and pretreatment with SB216763 (a specific inhibitor of GSK-3β) on the proliferation of A549 cells. Western Blot was employed to analyze the protein levels of GSK-3β and phosphorylated GSK-3β (pGSK-3β). Cell life cycle was examined by flow cytometry analysis. The immunocytochemical method was employed to analyze the protein levels of p27. *Results*: TSA could inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner and the cell cycle was arrested in G_0/G_1 phase in A549 cells treated with TSA. While pre-treatment of A549 cells with SB216763 attenuated TSA induced growth inhibiting and cell cycle arrest. TSA did not alter the levels of GSK-3β but decreased pGSK-3β expression and up-regulated p27 expression. As expected, SB216763 increased the levels of pGSK-3β, consistent with inhibition of GSK-3β activity. Inhibition of GSK-3β activity down regulated p27 protein level. *Conclusion*: GSK-3β was involved in the inhibition of effect induced by TSA on lung carcinoma cells proliferation process. GSK-3β may exert this effect by stabilization of p27 which may be one of the downstream molecules.

【Key words】Glycogen synthase kinase-3β; Lung carcinoma; Trichostatin A; p27

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率和病死率都有明显增高的趋势,然而治疗效果在近十年中没有显著的提高。其中主要原因是肺癌生物学特性十分复杂,恶性程度高,在治疗上容易出现耐药。近年来开展这方面的多种研究,其中就有糖原合成酶激酶-3(Glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)。GSK-3β 是一种多功能的蛋白激酶,是细胞内多种信号转导通路中的重要成分,不仅参与细胞内糖代谢过程而且还参与细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡等多种重要生理过程[1,2],其 Ser9 残基被磷酸化后活性被抑制[3]。已有实验证实,通过对 GSK-3β 的调节可促进肿瘤细胞的生长或凋亡,Farago 等[4]研究表明在乳腺上皮中 GSK-3β 的突变或药理学上的活性下调能促进乳腺肿瘤的发生。本研究以曲古抑菌素 A(Trichostatin A,TSA)抑制肺癌 A549 细胞的增殖并用 GSK-3β 特异性小分子抑制剂抑制GSK-3β 活性,初步探讨 GSK-3β 在肺癌中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

作者介绍:刘 翩(1983-),女,硕士,研究方向:肺癌的诊断与治疗。

通讯作者:蒋幼凡,女,教授,E-mail:zengzuo1992@sina.com。

肺腺癌细胞株 A549 购自中科院上海细胞库；RPMI1640 培养基、小牛血清购自美国 Hyclone 公司；PBS、0.25%胰酶等由重庆医科大学基础研究所提供；细胞裂解液购自上海申能博彩生物公司；一抗兔抗人磷酸化 GSK-3β 购自 Cell Signaling 公司，鼠抗人 GSK-3β 购自北京博奥森生物公司，鼠抗人 P27 抗体购自武汉博士德公司，鼠抗人 β-actin 购自 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG、S-P 免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物公司；MTT、DMSO、TSA 购自美国 Sigma 公司；GSK-3β 抑制剂购自 BIOS OURCE 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌细胞株 A549 用含 10%的小牛血清，100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液置于 37℃、5%CO_2 孵箱内传代培养，待细胞生长至对数生长期进行药物干预。

1.2.2 MTT 法检测加酶抑制剂前后 TSA 对细胞增殖的影响 收集对数生长期细胞，用 0.1%胰蛋白酶消化，用含 10%小牛血清的培养基制成单细胞悬液，调整为 1×10^4 个/ml 的细胞浓度以每孔 200 μl 接种于 96 孔板中，加入 TSA（用 DMSO 溶解，4℃冰箱保存备用）使其终浓度为 125 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L；TSA 与 GSK-3β 抑制剂 SB216763 共同作用分析：细胞与 10 μmol/L 的 SB216763 共育 3 h 后再加入 TSA[5]，使其终浓度为 12.5 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L，对照组不加药及酶抑制剂，另设空白对照（只加培养基和溶剂，不加细胞），每组设 5 个复孔，培养 24 h 后每孔加入 MTT 溶液（5 mg/ml）20 μl 孵育 4 h，终止培养，吸弃孔内上清液。每孔加入 150 μl DMSO，570 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。实验重复 3 次，取均值。计算细胞增殖抑制率 =（A_{570} 对照组－A_{570} 实验组）/A_{570} 对照组 ×100%。

1.2.3 细胞周期检测 实验分 4 组：对照组，TSA（25 μg/L）组，TSA（25 μg/L）+SB216763（10 μmol/L）组，SB216763（10 μmol/L）组。对数生长期的细胞用无血清的 RPMI1640 培养 24 h 同步化后，分组干预 24 h。收集不同处理组细胞，磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 2 次，PBS 重悬细胞，70%的冰乙醇固定 4℃过夜，再用 PBS 洗涤细胞 1 次，加碘化丙啶染液 0.5 ml，37℃孵育 30 min 上流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 Western blot 法测定各组细胞中 GSK-3β 和 pGSK-3β 蛋白表达的变化 TSA 及酶抑制剂作用 24 h 后，细胞用冷 PBS 轻洗 3 次晾干，加细胞裂解液 +PMSF 置冰上完全裂解后，4℃离心，上清即为细胞总的蛋白溶解成分。40 μl 蛋白样品加入上样 Buffer 10 μl，100℃煮沸 5 min 使之变性。经聚丙烯酰胺凝胶（10%的分离胶、5%的堆积胶）电泳，然后以 250 mA 转移到 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭后，分别加入 GSK-3β（1∶500）及 pGSK-3β（1∶1 000）一抗及内参 β-actin（1∶1 000）4℃过夜。TBST 液洗膜后，再与辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶1 000）反应 2 h，TBST 液洗膜后 ECL 显色，成像。结果以 Quantity One 图像分析系统进行条带光密度分析，目的蛋白与内参 β-actin 条带灰度的比值作为蛋白表达的相对含量。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 p27 蛋白表达变化 分组同细胞周期检测。药物干预后的细胞接种在放有盖玻片的 24 孔板中，制成细胞爬片，继续培养 24 h 备用。4%多聚甲醛固定后，按 SP 免疫组化试剂盒步骤处理，DAB 显色，苏木精复染，中性塑胶封片，自动图象分析仪随机计数 200 个细胞，得到平均光密度值（MOD）。阳性细胞均呈细胞浆或胞核棕黄色染色，以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.6 统计方法 应用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验，所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，取 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSA 及联合 SB216763 对 A549 细胞增殖的影响

12.5 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L 的 TSA 作用 24 h 明显抑制 A549 细胞生长，此效应呈剂量依赖性（$P<0.05$）。从 25 μg/L 组起，用 10 μmol/L SB216763 预处理后再加入 TSA 与单用 TSA 相比，抑制率明显下降（$P<0.05$），SB216763 能减弱 TSA 对 A549 细胞的生长抑制作用。见图 1。经观察，选用 12.5 μg/L、25 μg/L、50 μg/L 的 TSA 作用 A549 细胞检测 GSK-3β 蛋白的变化。

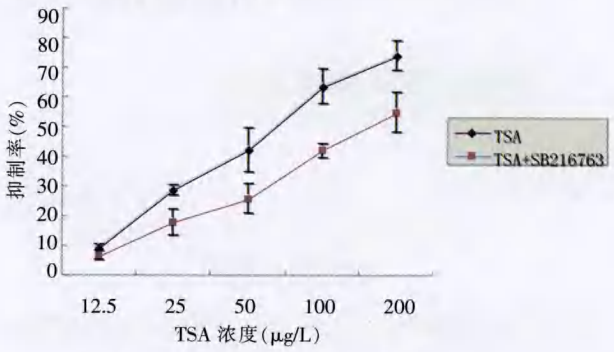


图 1 TSA 及联合 SB216763(10 μmol/L) 对 A549 细胞增殖的影响

2.2 TSA 及联合 SB216763 对肺癌 A549 细胞周期的影响

25 μg/L 的 TSA 作用 A549 细胞 24 h，G_0/G_1 期细胞增加，S 期细胞减少，与对照组相比，差异有显著性（$P<0.05$）；用 SB216763 预处理后与单用 TSA 组相比 G_0/G_1 期细胞减少，S 期细胞增加（$P<0.05$）；SB216763 组较正常组 G_0/G_1 期细胞减少（$P<0.05$），S 期细胞无明显差异（$P>0.05$），各组细胞 G_2/M 期变化不显著（$P>0.05$）。见表 1。

2.3 Western blot 免疫印迹法测蛋白表达的变化

2.3.1 不同浓度的 TSA 对 GSK-3β 和 pGSK-3β 蛋白表达的影响 从 25 μg/L 组起，随着 TSA 浓度的增

加，pGSK-3β 蛋白表达减少，差异有显著性（$P<0.05$），GSK-3β 蛋白表达无显著变化（$P>0.05$）。见图 2。

2.3.2　TSA 及联用 SB216763 对 GSK-3β 和 pGSK-3β 蛋白表达的影响　加入 GSK-3β 特异性抑制剂后，磷酸化的 GSK-3β 蛋白水平较对照组增加（$P<0.05$），联合用药组也比单用 TSA 组表达增加（$P<0.05$），而各组细胞中 GSK-3β 蛋白表达无显著变化（$P>0.05$）。见图 3。

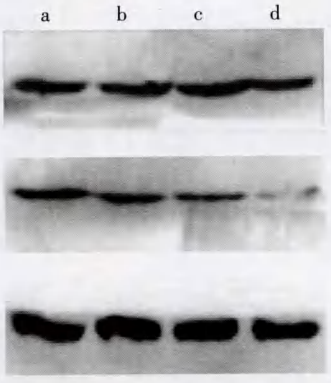
2.4　免疫细胞化学法检测不同处理组中 p27 蛋白表达的变化

12.5 μg/L TSA 作用 A549 细胞 24 h 后，与对照组相比，p27 蛋白表达增加（$P<0.05$），SB216763 降低了 p27 蛋白水平（$P<0.05$）。见表 2。

表 1　TSA 及联合 SB216763 对肺癌 A549 细胞周期的影响（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	66.10 ± 5.37	23.78 ± 1.48	10.12 ± 3.90
TSA 组	85.69 ± 3.13*	3.55 ± 0.98*	10.63 ± 2.45
SA+SB216763 组	70.75 ± 2.13**	12.89 ± 2.83**	16.36 ± 4.50
SB216763 组	57.63 ± 4.25*	28.00 ± 4.99	14.67 ± 1.55

注：* 为与对照组相比 $P<0.05$，** 为与 TSA 组相比 $P<0.05$



a. 对照组；b. 12.5 μg/L 组；c. 25 μg/L 组；d. 50 μg/L 组

图 2　不同浓度的 TSA 对 GSK-3β，pGSK-3β 蛋白表达的影响

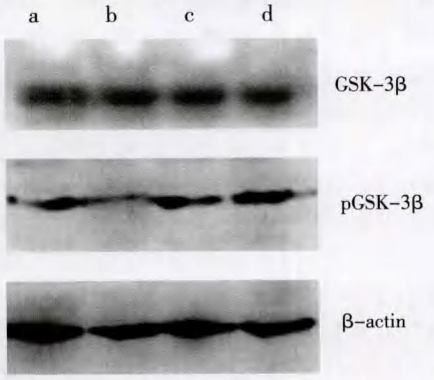
表 2　TSA 及联用 SB216763 对 A549 细胞 p27 蛋白的影响（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	MOD 值
正常组	0.53 ± 0.04
TSA 组	0.67 ± 0.04*
TSA+SB216763 组	0.55 ± 0.06
SB216763 组	0.41 ± 0.03*

注：* 为与对照组相比 $P<0.05$。

3　讨　论

各种肿瘤的发生往往存在乙酰化的紊乱，组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰化酶共同调控组蛋白的乙酰化状态。曲古抑菌素 A 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂，具有强大、特异的肿瘤杀伤效应而成为抗癌药物研究热点[6]。在乳腺癌 MCF-7 细胞株中曲



a. 对照组；b. TSA 组；c. TSA+SB216763 组；d. SB216763 组

图 3　TSA 及联用酶抑制剂对 GSK-3β，pGSK-3β 蛋白表达的影响

古抑菌素 A 可通过使 AKT 脱磷酸化而失活从而引起 GSK-3β 活性增加[7]。

近年来，GSK-3β 在肿瘤发生发展及治疗中的作用引起越来越广泛的关注，GSK-3β 磷酸化是调控其功能状态的主要机制，其上游的蛋白激酶（如 AKT）可以通过磷酸化其 9 位氨基酸而抑制 GSK-3β 的活性[8]。

本研究中，不同浓度的 TSA 对肺癌 A549 细胞的生长抑制作用具有剂量依赖性，将细胞周期阻滞于 G_1 期。虽然 Western Blot 法检测细胞中 GSK-3β 蛋白表达无显著性改变（$P>0.05$），但 9 位点磷酸化 GSK-3β 蛋白表达随 TSA 浓度增加而减少（$P<0.05$），说明 TSA 并未引起 GSK-3β 蛋白合成增多，导致总的 GSK-3β 水平的升高，而是通过使其去磷酸化使活性抑制形式的蛋白（pGSK-3β）表达减少而上调GSK-

3β 的活性，说明 GSK-3β 可能参与了 TSA 对肺癌 A549 细胞的抑制作用。并且，用 GSK-3β 特异性的小分子抑制剂预先处理后能明显减弱不同浓度的 TSA 的生长抑制作用($P<0.05$)，也影响了 TSA 诱导的细胞周期阻滞($P<0.05$)，证实了 GSK-3β 参与调节 TSA 对肺癌 A549 细胞的细胞毒性效应。

最近一些研究也表明，持续的 GSK-3β 抑制是肿瘤发生的一个标志，在几种不同的人肿瘤细胞株如肝癌、肺癌、乳腺癌中，抑制 GSK-3β 的活性明显地减少了化疗药物诱导的凋亡[9]，而复活 GSK-3β 能增加肝癌细胞对化疗诱导的凋亡的敏感性[10]，表明 GSK-3β 活性抑制可能是肿瘤细胞化学耐药的一种机制。

细胞的增殖受到细胞周期的精密控制，其中任何环节出现障碍都可导致细胞周期失控而异常增殖，最终可能发展为肿瘤。p27 是一种重要的细胞周期负调控因子，被认为是一种抑癌基因，其基因突变在人类肿瘤中罕见，在肿瘤细胞中的改变主要表现为蛋白量远低于正常细胞水平，p27 蛋白表达量的变化与肺癌的发生、发展及预后密切相关[11]。许多胞外的抗增殖信号可诱导 p27 蛋白表达，阻止细胞由 G1 期进入 S 期，从而抑制细胞增殖。p27 是 GSK-3β 的直接底物之一，p27 蛋白上存在 2 个 GSK-3β 磷酸化位点，GSK-3β 磷酸化 p27 蛋白而增加其稳定性[5]。TSA 处理 A549 细胞后，p27 蛋白表达增加($P<0.05$)，GSK-3β 的上游重要效应分子 AKT，也可以从基因和蛋白水平调节 p27 的表达，但 GSK-3β 抑制剂处理 A549 细胞后，p27 蛋白表达减少($P<0.05$)，细胞增殖能力部分恢复，表明 p27 蛋白增加部分参与了 TSA 引起的细胞生长抑制，且这一作用可能受 GSK-3β 调节。

本实验显示了在肺癌 A549 细胞中，GSK-3β 具有抗肿瘤作用，这与 Sithanandam 等[12,13]的研究结果一致，他们发现表皮生长因子受体家族的一个成员 ErbB3 通过活化 AKT 使 GSK-3β 失活，稳定 CyclinD1 参与肺腺癌的生长，而且这一信号通路在维持肺腺癌的存活和侵袭中必不可少[14]。

综上所述，GSK-3β 抑制肺癌细胞生长，其机制可能与 GSK-3β 对 p27 的调节有关，提示了增加GSK-3β 活性的药物可有助于治疗肺癌，同时也为进一步深入了解 GSK-3β 在肺癌的发病机制和治疗中的生物学特性奠定了基础。另外，GSK-3β 的抑制剂在临床上用于治疗糖尿病等，应该注意到这些药物可能促进肿瘤的发生或增加化疗药物的耐药性。

参 考 文 献

[1] Cross D A, Culbert A A, Chalmers K A, et al. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death[J]. J Neurochemistry, 2001, 77(1): 94-102.

[2] Jope R S, Johnson G V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3[J]. Trends in Biochemical SciencesTrends, 2004, 29(2): 95-102.

[3] Hetman M, Cavanaugh J E, Kimelman D, et al. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal [J]. J Neuroscience, 2000, 20(7): 2567-2574.

[4] Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, et al. Kinase inactive glycogen synthase kinase 3beta promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis[J]. Cancer Research, 2005, 65(13): 5792-5801.

[5] Surjit M, Lal S K. Glycogen synthase kinase-3 phosphorylates and regulates the stability of P27kip1 protein [J]. Cell Cycle, 2007, 6 (5): 580-588.

[6] Choi Y H. Induction of apoptosis by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, is associated with inhibition of cyclooxygenase-2 activity in human non-small cell lung cancer cells [J]. International journal of oncology, 2005, 27(2): 473-479.

[7] Alao J P, Stavropoulou A V, Lam E W, et al. Role of glycogen synthase kinase 3 beta(GSK3beta) in mediating the cytotoxic effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) in MCF-7 breast cancer cells[J]. Molecular Cancer, 2006, 5:40.

[8] Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity[J]. Nature, 2003, 421 (6924): 753-756.

[9] Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eggelpoul M J, et al. GSK-3beta inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression[J]. Experimental cell research, 2004, 300(2): 354-364.

[10] Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eggelpoel M J, et al. GSK-3beta reactivation with LY294002 sensitizes hepatoma cells to chemotherapy-induced apoptosis [J]. International journal of oncology, 2005, 27 (1): 215-222.

[11] Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, et al. Prognostic significance of p27KIP1 protein and ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers[J]. Clinical Cancer Research, 2000, 6(10): 4073-4081.

[12] Sithanandam G, Smith G T, Masuda A, et al. Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. Carcinogenesis, 2003, 24 (10): 1581-1592.

[13] Sithanandam G, Smith G T, Fields J R, et al. Alternate paths from epidermal growth factor receptor to Akt in malignant versus nontransformed *lung epithelial cells*[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2005, 33 (5): 490-499.

[14] Sithanandam G, Fornwald L W, Fields J, et al. Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and blocks growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549[J]. Oncogene, 2005, 24(11): 1847-1859.

（责任编辑：关蕴良）