维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0136-04

PARP 抑制与小鼠结肠癌 CT26 细胞生长活性的关系

蔡 莉,王娅兰,林 晓

(重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 PARP 抑制与结肠癌 CT26 细胞生长活性的关系。方法:采用 PARP 抑制剂 5-氨基异喹啉酮(5-aminoisoquinolinone,5-AIQ)处理小鼠结肠癌 CT26 细胞,MTT 法检测 CT26 细胞离体生长,免疫荧光双标、激光共聚焦检测结肠癌 CT26 细胞核内 PARP 与 NF-κB p65 的表达。结果:不同浓度的 5-AIQ 处理组(0.1mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L)结肠癌 CT26 细胞生长抑制率分别为 17.52%、27.63%和 39.93%,抑制率随 5-AIQ 浓度的增加而增加,差异具显著性($P<0.05$)。PARP 与 NF-κB p65 在 CT26 细胞核内存在共表达,且呈正相关($P<0.05$)。5-AIQ 处理组与 5-AIQ 未处理组相比,PARP 与 NF-κB p65 的表达均减弱,差异具显著性($P<0.05$),PARP 与 NF-κB p65 亦呈正相关($P<0.05$)。结论:PARP 抑制剂 5-AIQ 可以抑制结肠癌 CT26 细胞生长活性。其可能与 PARP 抑制,使 NF-κB 活性降低有关。PARP 在结肠癌生长过程中可能具有重要作用。

【关键词】PARP;5-AIQ;生长;结肠癌

【中国图书分类法分类号】R363.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-05

Relationship between PARP inhibition and the growth activity of murine colon carcinoma CT26 cell lines

CAI Li,et al

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

【Abstract】*Objective*:To investigate the relationship between poly (ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibition and the growth activity of murine colon carcinoma CT26 cell lines in vitro. *Methods*:The murine colon carcinoma CT26 cell lines were treated with PARP inhibitior 5-AIQ in vitro. MTT assay was used to determine the growth activity of CT26 cells. The expressions of PARP and NF-κB p65 in the nuclei of CT26 cells were investigated by double labelling immunofluorescence and laser scanning cofocal microscope. *Results*:The inhibitory rates of the growth in 5-AIQ-treated colon carcinoma CT26 cell groups were 17.52%、27.63% and 39.93%, respectively. The inhibitory rate increased with the raising of the 5-AIQ concentration (0.1mmol/L,0.5mmol/L,and1.0mmol/L),and the difference was significant($P<0.05$). There was a co-expression and positive correlation of PARP and NF-κBp65 in the nuclei of colon carcinoma CT26 cells($P<0.05$). The expressions of PARP and NF-κB p65 were attenuated in 5-AIQ-treated CT26 cell groups, and the correlation of PARP and NF-κB p65 was also positive($P<0.05$). *Conclusion*:PARP inhibitior 5-AIQ can inhibit the growth activity of colon carcinoma CT26 cells in vitro, and this may be through inhibiting PARP to reduce the activity of NF-κB. PARP may play an important role in the proliferation of colon carcinoma.

【Key Words】PARP;5-AIQ;Growth;Colon carcinoma

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 [Poly(ADP-ribose) polymerase,PARP] 存在于多数真核细胞中,是一种能够利用尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide,NAD^+),把 ADP-核糖转移到蛋白质的谷氨酸残基上,参与聚 ADP 糖基化过程的细胞核酶。PARP 在 DNA 修复、基因转录、细胞周期进程、细胞死亡等方面发挥着重要作用,参与多种疾病的发生、发展。有研究表明,在缺血性再灌注损害和炎症反应过程中,PARP 抑制剂可通过抑制 PARP 活性,抑制 ICAM-1 和 P-selectin 的表达,从而减轻炎症反应[1~3]。而 PARP 抑制剂对粘附分子表达的抑制,被认为与 PARP 抑制后,NF-κB 活性降

作者介绍:蔡 莉(1979-),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:重庆市自然科学基金(基金编号 CSCT2006BB5288),
重庆医科学大学创新基金(基金编号 CX200527)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

低有关。有文献报道,在多种恶性肿瘤(如结肠癌、皮肤基底细胞癌、骨髓瘤、宫颈癌、恶性淋巴瘤等)PARP 表达均较各自正常对照组织明显增强。前期的研究也显示,PARP 在大肠癌组织中的活性明显高于正常组织[4]。最近研究发现 5-AIQ 等 PARP 抑制剂可使 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞的生长受到抑制[5],但对肿瘤细胞的生长是否有影响,未见文献报道。本研究拟以小鼠结肠癌 CT26 细胞为研究对象,观察 PARP 抑制剂 5-AIQ 对结肠癌 CT26 细胞生长活性的影响,并用免疫荧光双标、激光共聚焦检测 5-AIQ 对 CT26 细胞核内 PARP 和NF-κB p65 表达的影响,以探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药物 5-AIQ 由英国 Threadgill 教授惠赠。

1.1.2 细胞株 小鼠结肠癌 CT26 细胞株由四川大学华西医学院肿瘤中心魏于全教授惠赠。

1.1.3 主要试剂 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)均为 Sigma 公司产品;兔抗小鼠 PARP、山羊抗小鼠 NF-κB p65 多克隆抗体、FITC 标记牛抗兔 IgG、TR 标记驴抗山羊 IgG 均购自美国 Santa Cruz。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞离体生长的影响 小鼠结肠癌 CT26 细胞置于含 10%小牛血清 RPMI1640,37℃、5%CO_2 培养箱中常规培养。取上述处于对数生长期的细胞,以 3×10^4 个/ml 细胞悬液 190μl/孔接种于 96 孔培养板中。将其分为 4 组,即对照组(无 5-AIQ 处理)、实验组 1(5-AIQ 0.1mmol/L)、实验组 2(5-AIQ 0.5mmol/L)、实验组 3(5-AIQ 1mmol/L)。每组设 3 个复孔,常规培养 12h,待细胞贴壁后,实验组各孔分别加入 5-AIQ,使其终浓度分别为 0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L,对照组加入不含 5-AIQ 的等体积生理盐水。培养 20h 后,每孔加入 20μl MTT 溶液继续培养 4h;常温离心 2 000r/min×3min,每孔加入 150μl DMSO,自动酶标读数仪在波长 630nm 时测定每孔吸光度(A)值。该实验重复 3 次。按下列公式计算 5-AIQ 对结肠癌 CT26 细胞生长的抑制率:

抑制率(%)=(1-实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

1.2.2 细胞免疫荧光双标染色、激光共聚焦显微镜观察 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞 PARP、NF-κB p65 表达的影响。

1.2.2.1 细胞爬片 将多聚赖氨酸处理后的无菌小盖玻片预置于 24 孔培养板内,取对数生长期的结肠癌 CT26 细胞,以每孔 1ml(3×10^4 个/ml)接种于 24 孔培养板中。将其分为 2 组:对照组(无 5-AIQ 处理)、实验组(5-AIQ 0.1mmol/L)。培养 12h 后实验组加入 5-AIQ,终浓度为 0.1mmol/L,对照组加入不含 5-AIQ 的等体积生理盐水。20h 后取出盖玻片,PBS 洗涤 2 次,冷丙酮 4℃固定 10min,自然风干后备用。

1.2.2.2 免疫荧光双标染色 (1)0.2% Triton 室温孵育 15min,PBS 洗 3 次;(2)5%BSA 封闭,室温孵育 15min,勿洗;第一Ⅰ抗(山羊抗小鼠 NF-κB p65 多克隆抗体,1∶100),4℃孵育过夜;(3)PBS 洗,第一Ⅱ抗(TR 标记驴抗山羊 IgG,1∶50),室温避光孵育 40min;(4)PBS 洗,第二Ⅰ抗(兔抗小鼠 PARP 多克隆抗体,1∶50),4℃ 孵育过夜;(5)PBS 洗,第二Ⅱ抗(FITC 标记牛抗兔 IgG,1∶50),室温避光孵育 40min;(6)PBS 洗,50%缓冲甘油封片。以 PBS 替代第一Ⅰ抗和第二Ⅰ抗作为阴性对照。

1.2.2.3 激光共聚焦显微镜观察 激光共聚焦显微镜激发波长为 488nm,发射波长为 540~560nm,数值孔径为 0.70。FITC 标记的抗体在 490nm 光波激发下呈绿色荧光,TR 标记的抗体在 596nm 光波激发下呈红色荧光,两者共表达表现为黄色荧光。选择细胞较为密集的区域,每高倍视野随机选取 20 个肿瘤细胞,利用 Leica confocal software 软件,在增益相同(PMT=699.882 767)的情况下检测荧光强度。该部分实验重复进行 3 次,通过计算每个细胞平均荧光强度了解该蛋白的表达量。

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 SPSS10.0 统计分析软件对数据进行单因素方差分析(one way ANOVA)或 t 检验,$P<0.05$ 具统计学意义。

2 结 果

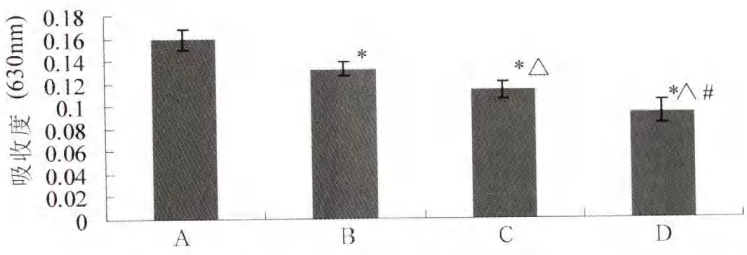
2.1 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞离体生长的影响

各实验组细胞 A 值见图 1,均明显低于对照组(无 5-AIQ 处理组),各实验组(5-AIQ 0.1mmol/L、5-AIQ 0.5mmol/L、5-AIQ 1.0mmol/L)细胞生长抑制率分别为 17.52%、27.63%和 39.93%。随 5-AIQ 浓度增加,A 值逐渐下降,细胞生长的抑制率逐渐增加。经单因素方差分析,组间差别具显著性($P<0.05$)。

2.2 激光共聚焦显微镜观察 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞 PARP、NF-κB p65 表达的影响

FITC 标记的 PARP 呈绿色荧光,位于 CT26 细胞胞核、胞浆(见图 2,A1);TR 标记的 NF-κB p65 呈红色荧光,位于细胞浆和细胞核(见图 2,A2);PARP 与 NF-κB p65 同时在同一细胞共表达时,表现为黄色荧光,胞核、胞浆均有分布(见图 2,A4)。

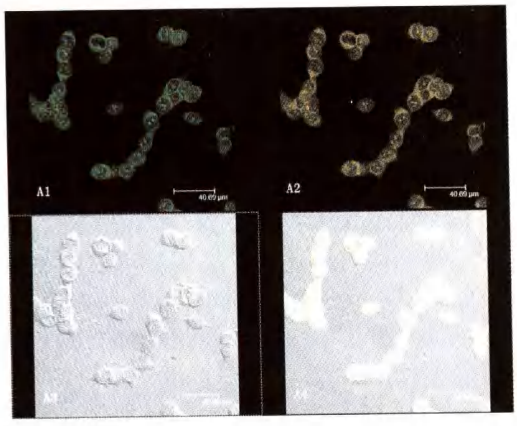
维普资讯 http://www.cqvip.com



A.5-AIQ 未处理组；B.5-AIQ 处理组(0.1mmol/L)；C.5-AIQ 处理组(0.5mmol/L)；D.5-AIQ 处理组(1.0mmol/L)

*：$P<0.05$，与 5-AIQ 未处理组比较；△：$P<0.05$，与 5-AIQ(0.1mmol/L)处理组比较；#：$P<0.05$，与 5-AIQ(0.5mmol/L)处理组比较

图 1 结肠癌 CT26 细胞 A630nm 值随 5-AIQ 浓度增加的变化



A1.CT26 细胞 PARP 的表达(绿色)；A2.CT26 细胞 NF-κB p65 的表达（红色)；A3.CT26 细胞的传输图像；A4.CT26 细胞 PARP 与 NF-κBp65 的共表达(黄色)
A.5-AIQ 未处理结肠癌 CT26 细胞 PARP 与 NF-κB p65 的共表达



B1.CT26 细胞 PARP 的表达(绿色)；B2.CT26 细胞 NF-κB p65 的表达（红色)；B3.CT26 细胞的传输图像；B4.CT26 细胞 PARP 与 NF-κB p65 的共表达(黄色)
B.5-AIQ 处理结肠癌 CT26 细胞 PARP 与 NF-κB p65 的共表达

图 2 5-AIQ 处理组与未处理组结肠癌 CT26 细胞 PARP 与 NF-κB p65 的共表达

Pearson 相关分析显示，PARP 与 NF-κB p65 的表达呈正相关($P<0.000\ 1$)。

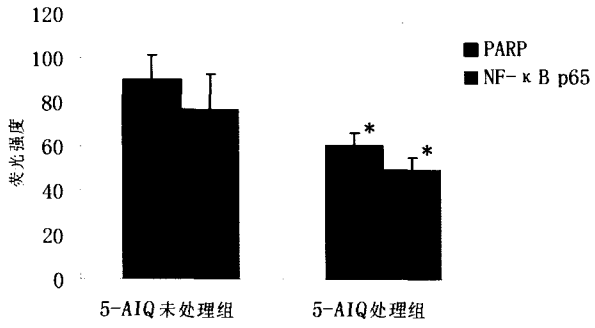
5-AIQ 处理后两种蛋白在细胞核内的表达均低于 5-AIQ 未处理组，t 检验分析，差别具显著性($P<0.000\ 1$)；Pearson 相关分析显示，PARP 与 NF-κB p65 的表达呈正相关（$P=0.000\ 6$)。见图 2A，2B 及图 3。

3 讨 论

PARP 抑制剂有多种，其中，5-AIQ 抑制作用强大，且为水溶性，在炎症及缺血性再灌注损伤中发挥着重要作用。Rajesh 等的研究表明，5-AIQ 可抑制 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞的生长，但 5-AIQ 能否直接抑制肿瘤细胞生长，未见文献报道。本研究结果首次显示，5-AIQ 在 0.1～1.0mmol/L 范围内可使结肠癌 CT26 细胞的生长活性降低，且呈剂量依赖关系($P<0.05$)，提示 5-AIQ 对结肠癌 CT26 细胞的生长活性有抑制作用。

有文献报道，在缺血再灌注引起的结肠、肝、肺等器官损伤中，5-AIQ 抑制 PARP 活性，可下调 I-CAM-1 和 P-selectin 的表达，并认为与NF-κB 活性降低有关[1-3]。另有实验表明，PARP 可与NF-κB 结合形成复合物，使 NF-κB DNA 结合位点暴露并转位于细胞核，上调细胞粘附分子等依赖 NF-κB 基因的转录，使其表达增加[6,7]。Tiziana Genovese 等[8]研究亦显示，5-AIQ 能通过抑制 PARP，抑制 NF-κB 活性，从而减少脊髓创伤导致的炎症反应和组织损

维普资讯 http://www.cqvip.com



*: $P<0.05$,与 5-AIQ 未处理组比较

图 3 5-AIQ 处理组与未处理组结肠癌 CT26 细胞核中 PARP 与 NF-κB p65 的表达

伤。先前的实验也表明,5-AIQ 对大肠癌 HT29 细胞 PARP 活性具有抑制作用,对NF-κB 依赖性基因 P-selectin 和 ICAM-1 的表达也有抑制作用。而 NF-κB 在大肠癌的发生、发展中具重要作用,其可通过调控癌基因如 c-myc 的转录促进大肠癌的发生,或通过上调环氧合酶 2(COX-2)表达促进大肠癌的增殖,也可上调 ICAM-1、VEGF、MMP-9 等的表达促进大肠癌的转移[9-13]。NF-κB 主要由 p65 和p50 组成,p65 参与基因转录的起始调节,并可促进 p50 与 DNA 结合,其在细胞核内的表达一定程度上反映 NF-κB 的活性。本研究用免疫荧光双标和激光共聚焦检测了小鼠结肠癌 CT26 细胞核内 PARP、NF-κB p65 的表达及其相互关系。结果显示,NF-κB p65 在结肠癌 CT26 细胞的胞浆、胞核均有表达,这与多数文献报道一致。PARP 也在胞核、胞浆均有表达,这与 Ertsey[14]报道类似,原因尚待进一步研究。PARP 与 NF-κB p65 在结肠癌 CT26 细胞核内存在共表达,且呈正相关。经 5-AIQ 处理后,细胞核内 PARP 与 NF-κB p65 的表达均减少,亦呈正相关($P<0.05$)。提示 5-AIQ 可抑制结肠癌 CT26 细胞核内 PARP 与 NF-κB p65 的共表达,也就是说,5-AIQ 在抑制结肠癌 CT26 细胞 PARP 的同时,抑制了 NF-κB 的活性。

因此我们认为,PARP 抑制剂 5-AIQ 可抑制结肠癌 CT26 细胞的生长活性,其可能与 5-AIQ 抑制 PARP,降低 NF-κB 的活性有关。PARP 在结肠癌增殖过程中可能具有重要作用。其详尽分子机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Cuzzocrea S,Mazzon E,Di Paola R,et al. 5-Aminoisoquinolinone reduces colon injury by experimental colitis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2004;370(6):464-473.

[2] Mota-Filipe H,Sepodes B,McDonald M,et al. The novel PARP inhibitor 5-aminoisoquinolione reduces the liver injury caused by ischemia and reperfusion in the rat[J]. Med Sci Monit,2002;8(11):BR444-453.

[3] Cuzzocrea S,McDonald MC,Mazzon E,et al. Effects of 5-aminoisoquinolione,a water-soluble,potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase,in a rodent model of lung injury[J]. Biochem Pharmacol,2002;63(2):293-304.

[4] 郝兰香,王娅兰,李圆圆.大肠癌 PARP 表达与 P-selectin 和 I-CAM-1 表达的相关性[J]. 基础医学与临床,2006;26(8):882-887.

[5] Rajesh M,Mukhopadhyay P,Godlewski G,et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2006;350(4):1056-1062.

[6] 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.

[7] Kitamura T,Sekimata M,Kikrchi SI,et al. Involvement of poly (ADP-ribose)polymerase 1 in ERBB2 expression in rheumatoid synovial cells[J]. Am J Physiol cell Phsysiol,2005;289(1):C82-C83.

[8] Genovese T,Mazzon E,Muia C,et al. Inhibitors of poly (ADP-Ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma[J]. JPET,2005;312(2):449-457.

[9] 吴 斌,时 德,杨国凯.大肠癌组织中核因子-κB、C-myc 和 ICAM-1 的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2004;11(2):102-105.

[10] 李治国,王继见. 核转录因子在大肠癌中的研究进展[J]. 现代医药卫生,2005;21(19):2621-2622.

[11] Yu LL, Yu HG,Yu JP,et al. Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human colorectal carcinoma tissue[J]. Eksp Onkol,2004;26(1):40-47.

[12] Greten FR,Eckmann L,Greten TF. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer[J]. Cell,2004;118(3):285-296.

[13] 高 静,王娅兰.大肠癌核基质蛋白变化与其生物学行为的关系[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(3):302-306.

[14] Ertsey R,Chapin CJ, Kitterman JA,et al. Ontogeny of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 in lung and developmental implications [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2004;30(6):853-861.

(责任编辑:关蕴良)