维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0482-04

细胞外信号调节激酶通路激活抑制δ氨基酮戊酸-光动力疗法对SW480细胞的细胞毒作用

郑江华[1],时 德[1],赵 渝[1],陈祖林[2]

(1 重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016;2 第三军医大学附属新桥医院普外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:探讨 δ 氨基酮戊酸 - 光动力疗法(ALA-PDT)诱导 SW480 细胞后的细胞外信号调节激酶(ERK)通路以及阻断此通路对细胞毒作用的影响。方法:将 SW480 细胞分为空白对照组、激光照射组、ALA 组、ALA-PDT 组(又分为 30、60、90min 组)及 PD98059 组,Western 蛋白印迹检测各组细胞 MEK 和 ERK1/2 蛋白产物及磷酸化蛋白产物的表达;用 MTT 比色法分别检测各组细胞在不同时间段的光密度值,计算各组细胞存活率。结果:ALA-PDT 后 SW480 细胞的 ERK 通路激活;阻断 ERK 通路后 ALA-PDT 对 SW480 细胞的细胞毒作用增强。结论:ERK 通路的激活对 ALA-PDT 后 SW480 细胞起着保护作用;不同水平阻断 ERK 通路,可能成为增强 ALA-PDT 杀伤结肠癌细胞的新靶点。

【关键词】δ氨基酮戊酸;光动力疗法;SW480;细胞外信号调节激酶通路

【中国图书分类法分类号】Q27 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-13

Activation of extracelluar signal-regulated kinase pathway inhibits cytotoxic effect of SW480 cell in response to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy

ZHENG Jianghua, et al

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To investigate extracelluar signal-regulated kinase(ERK) pathway and cytotoxic effect after block of this pathway after 5-aminolevulinic acid(ALA) -based photodynamic therapy (PDT) on SW480 cell. *Methods:* SW480 was divided into control group, light group, ALA group, ALA-PDT group and PD98059 group. Western blot was used to detect the expression of protein products and phosphorylation protein products of MEK and ERK1/2. Optical density value and survival rate of each group were obtained at different time by MTT. *Results:* ERK pathway of SW480 cell was activated and block of this pathway increased cytotoxic effect of SW480 cell after ALA-PDT. *Conclusions:* Activation of ERK pathway protects SW480 cell from ALA-PDT. Block of ERK pathway at different levels may become a new target, which will enhance cytotoxic effect of ALA-PDT on colon carcinoma.

【Key words】ALA; PDT; SW480; ERK pathway

结肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤,在欧美国家肿瘤患者的死亡原因中列第 3 位,在我国也逐渐呈高发趋势,但目前治疗手段单一,手术、放疗和化疗都不能取得理想效果,迫切需要寻找新的治疗途径[1]。光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)作为一种新的肿瘤治疗方法近年来倍受重视,迄今为止,加拿大、美国、法国、荷兰、德国和日本等国家已先后批准 PDT 用于一些恶性肿瘤[2]。细胞外信号调节激酶(extracelluar signal-regulated kinase, ERK)通路在其他领域的研究越来越深入,但关于 ERK 通路在 δ 氨基酮戊酸(ALA)—PDT 作用后对结肠癌细胞生存的可能作用知之甚少,研究 ERK 通路有助于寻找增强 PDT 杀伤作用新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

δ 氨基酮戊酸(ALA, Sigma 公司);培养液 RPMI1640(Hyclone 公司);D-Hanks (Hyclone 公司);Hepes (Sigma 公

作者介绍:郑江华(1975-),男,博士生,
主要研究方向:血管外科及肿瘤综合治疗。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30271481)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

司）；胰蛋白酶（北京赫国生物技术公司）；小牛血清（成都哈里公司）；磷酸化 MEK 和 ERK 单克隆抗体（Cell Signaling Technology）；MEK 和 ERK 单克隆抗体（Cell signaling technology）；GAPDH 单克隆抗体（Cell signaling technology）；PVDF 膜（Roche）；蛋白质分子 Maker（MBI）；RIPA（上海申能博彩生物科技有限公司）；DTT（Gibco）；二甲基亚砜（DMSO，Sigma 公司）；SW480(第四军医大学动物实验中心提供)

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含青霉素和链霉素分别为 100U/ml，含 10%小牛血清 RPMI1640 培养液培养，37℃，5% CO_2，饱和湿度，单层贴壁生长。

1.2.2 细胞的 PDT 处理[14] 将增殖期 SW480 细胞按照适当浓度接种于不同种类的培养板，待其贴壁后，吸出含血清的培养液，D-Hanks 液轻轻漂洗后弃去，ALA 组和 ALA-PDT 组在暗室按预定时间加入 ALA（40 μg/ml），严格避光条件下继续孵育 4 h，弃去含有 ALA 的培养液，PD98059（MEK 抑制剂）干预组再加入终浓度 75 μg 的 PD98059（DMSO 配制）孵育 2h，D-Hanks 液轻轻漂洗后，加入新鲜培养液，空白对照组不加 ALA 且不受激光照射，ALA 组加入 ALA 不受激光照射，激光照射组、ALA-PDT 组及 PD98059 干预组使用半导体激光仪（西南师范大学激光所，波长 532 nm，距光斑 3 cm 处输出功率 12 mW，能量密度 9J/cm²）垂直照射培养板 30 min，然后将细胞置于培养箱中继续培养到实验设计的时间，再进行其它处理及检测。

1.2.3 Western 蛋白印迹检测 ERK1/2 和 MEK 蛋白表达 取对数生长期 5×10^5 个细胞接种到 6 孔培养板中，分别为空白对照组、激光照射组、ALA 组、ALA-PDT 后 30min、60min、90min 组及 PD98059 干预组。细胞培养 48h 后经 PDT 处理，按照设计时间继续孵育或即刻抽提细胞总蛋白。按照 RIPA 使用说明，每孔细胞加入 300 μl RIPA 提取细胞总蛋白，考马斯亮蓝 250 染色法测总蛋白浓度后 -20℃保存。调整各组总蛋白浓度使每孔上样量一致，10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离后通过半干电转仪将蛋白转到 PVDF 膜。用含 0.1%Tween-20 的 5%脱脂奶粉室温下封闭 PVDF 膜 1h 后，再用含 0.1%Tween-20 的 Tris 缓冲液（TBS/T）洗 3 次，每次 5min；一抗 1∶1000 稀释，4℃过夜，TBS/T 洗 3 次，每次 5min；按照 1∶2000 稀释浓度加入抗兔或小鼠的 HRP-IgG1h，TBS/T 洗 3 次，每次 5min；加入 DAB 显色，凝胶成像系统上摄像并分析灰度值，以积分光密度 OD×面积表示（OD×mm²），分别计算目的条带的积分光密度值（IOD 值）。

1.2.4 PD98059 增强 ALA-PDT 对 SW480 的细胞毒作用 调整细胞密度为 1.0×10^4 个/ml，每孔 200 μl 接种于 96 孔板，实验分为 5 组：空白对照组、单独激光照射组、ALA 组、ALA-PDT 组及 PD98059 干预组，每组复 24 孔。置于培养箱中培养 24h 后经 PDT 处理，继续孵育 12h，24h，36h，48h，60h，72h，用四唑盐（MTT）比色法分别检测各时间段细胞的光密度值（OD）。根据以下公式计算细胞的存活率。

细胞存活率 = 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 × 100%

1.3 统计学处理

数据 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 ALA-PDT 诱导 SW480 细胞 ERK 通路激活

ALA-PDT 造成 SW480 细胞 ERK 通路的快速激活。磷酸化 ERK1/2 在空白对照组、激光照射组及 ALA 组表达较弱，PDT 后 30~90 min 细胞表达显著高于空白对照组、激光照射组及 ALA 组（$P<0.05$），其中 PDT 后 30 min 细胞表达最强，PDT 后 60、90 min 表达稍低；总 ERK1/2 在各组细胞中的表达无显著差异（$P>0.05$，见图 1，2）；磷酸化 MEK 在空白对照组、激光照射组及 ALA 组表达较弱，PDT 后 30~90 min 细胞表达显著高于空白对照组、激光照射组及 ALA 组（$P<0.05$），其中 PDT 后 60、90min 细胞表达最强，PDT 后 30 min 表达稍低；总 MEK 在各组细胞中的表达无显著差异（$P>0.05$，见图 3~4），DMSO 组磷酸化 ERK1/2 表达无显著变化，细胞 ERK1/2 磷酸化显著减低（$P<0.001$，见图 5、6），说明 MEK 是 ERK 通路的上游激活物。

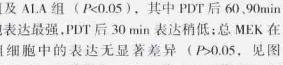


图 1 ALA-PDT 作用 SW480 细胞后 ERK1/2 蛋白表达

1.PDT 后 90min；2.PDT 后 60min；3.PDT 后 30min；4.空白对照组；5.激光照射组；6.ALA 组

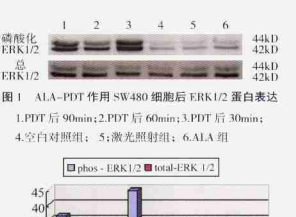


图 2 ALA-PDT 作用 SW480 细胞后 ERK1/2 蛋白表达变化图

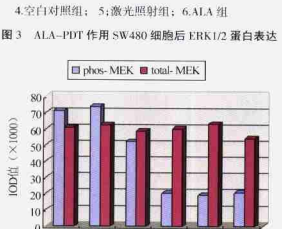
1.PDT 后 90min；2.PDT 后 60min；3.PDT 后 30min；4.空白对照组；5.激光照射组；6.ALA 组

维普资讯 http://www.cqvip.com



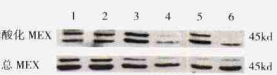
1.PDT 后 90min;2.PDT 后 60min;3.PDT 后 30min;
4.空白对照组; 5;激光照射组; 6.ALA 组

图 3 ALA-PDT 作用 SW480 细胞后 ERK1/2 蛋白表达



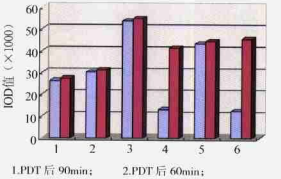
1.PDT 后 90min;2.PDT 后 60min;3.PDT 后 30min;
4.空白对照组; 5;激光照射组; 6.ALA 组

图 4 ALA-PDT 作用 SW480 细胞后 MEK 蛋白表达变化图



1.PDT 后 90min; 2.PDT 后 60min;
3.PDT 后 30min; 4. PD98059 干预组 30min;
5;DMSO 组; 6. PD98059 干预组 90min

图 5 PD98059 抑制 ALA-PDT 作用 SW480 细胞后 ERK1/2 蛋白表达



1.PDT 后 90min; 2.PDT 后 60min;
3.PDT 后 30min; 4. PD98059 干预组 30min;
5;DMSO 组; 6. PD98059 干预组 90min

图 6 PD98059 抑制 ALA-PDT 作用 SW480 细胞后 ERK1/2 蛋白表达图

2.2 PD98059 增强 ALA-PDT 对 SW480 的细胞毒作用结果

ALA-PDT 组在 12,24,36,48,60 及 72h 细胞存活率分别为 87.20% ± 6.20%,75.35% ± 5.92%、63.78% ± 5.73%,58.25% ± 5.88%,52.21% ± 5.32% 和 57.31% ± 4.97%,均显著低于空白对照组、单独激光照射组及 ALA 组,$P < 0.001$。PD98059 干预组在 12,24,36,48,60 及 72h 细胞存活率分别为 73.34 ± 5.81%,64.35% ± 4.87%、52.26% ± 4.92%,41.12% ± 3.53%,28.62% ± 4.06% 和 15.43% ± 3.11%, 显著低于空白对照组、单独激光照射组及 ALA 组,$P < 0.001$;PD98059 干预组在 60h 和 72h 的细胞存活率也显著低于 ALA-PDT 组,$P < 0.001$;PD98059 干预组在 PDT 后 72h 的细胞存活率显著低于 PDT 后 60h,$P < 0.05$,见图 7。

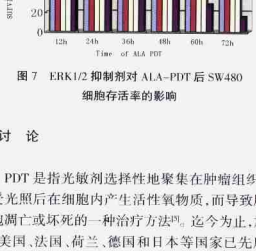


图 7 ERK1/2 抑制剂对 ALA-PDT 后 SW480 细胞存活率的影响

3 讨 论

PDT 是指光敏剂选择性地聚集在肿瘤组织中,接受光照后在细胞内产生活性氧物质,而导致肿瘤细胞凋亡或坏死的一种治疗方法[1]。迄今为止,加拿大、美国、法国、荷兰、德国和日本等国家已先后批准 PDT 用于一些恶性肿瘤[2]。但现有的 PDT 有几大缺点:(1)光敏剂如血卟啉(HpD),光敏素Ⅱ等在皮肤中排泄慢,滞留时间长,易产生皮肤光敏反应,治疗期间至少应避光 20 天以上;(2)静脉给 HpD 可达全身,在肝、肾、脾内较多,影响机体代谢;(3)常规 PDT 治疗肿瘤时,激光照射仅限于表浅或内腔道内包块,深部包块因激光穿透作用表浅,杀伤作用有限。ALA-PDT 是利用 ALA 诱导肿瘤细胞内产生 PP Ⅸ来进行的 PDT,因 ALA 代谢快、毒副作用小等

维普资讯 http://www.cqvip.com

优点，近年来受到广泛重视，但其作用的分子机制还不甚清楚。

有研究表明 PDT 过程中产生的反应氧物质（reactive oxygen species, ROS）能导致细胞细胞凋亡或坏死[6]。ROS（包括 PDT 诱导产生的 ROS）能有效启动大量的细胞信号通路[7]。光敏素 -PDT 能诱导早期反应基因（c-jun, c-fos 和 c-Myc）[8]和几种应急蛋白的表达[9]，前者涉及细胞增生、分化及生存，后者作为保护信号。ALA-PDT 诱导 SW480 细胞游离钙浓度增加[10]；在用几种不同光敏剂处理的几种不同细胞模型的研究表明 PDT 能激活有丝分裂原蛋白激酶（mitogen activated protein kinases, MAPKs）[11]，然而 PDT 诱导 MAPKs 的生物学作用存在争议，其作用与光敏剂和 / 或细胞类型相关[12]。MAPK 家族主要包括 3 个成员：细胞外信号调节激酶（extracelluar signal-regulated kinase, ERK）、c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase, JNK）和 p38MAPK。ERK 主要介导生长、分化及存活，JNK 和 p38MAPK 主要介导细胞的应急反应，它们的激活促进细胞凋亡。导致 MAPK 激活最具有特征的通路是生长因子介导的 ERK 通路，生长因子结合酪氨酸激酶受体，导致连续的 ras、raf、MEK 以及 ERK 激活。ERK 通路在其他领域的研究越来越深入，但关于 ERK 通路在 ALA—PDT 作用后对结肠癌细胞生存的可能作用知之甚少，我们的实验结果表明 ALA—PDT 后 SW480 细胞的 ERK 通路激活。由于 ERK 通路采用高度保守的三级激酶级联传递信号，细胞外刺激对苏氨酸和酪氨酸双位点磷酸化激活 ERK 通路，所以 ERK 通路存在多种抑制剂，可以在不同水平进行阻断。本实验使用磷酸化 MEK 的抑制剂 PD98059 处理 SW480 细胞，ALA-PDT 后细胞的 ERK 蛋白表达明显减少，细胞的生存率显著降低，提示 MEK 是 ERK1/2 的上游激活物，ERK 的激活增强 SW480 细胞对 ALA-PDT 的抵抗作用。有人用 ERK 的显负性突变体（dominant negative mutant）或 MEK 抑制剂 PD98059 抑制细胞增生[13]，增强 cisplatin 治疗的敏感性[14]，增加阿拉伯糖苷胞核嘧啶诱导的细胞凋亡[15]。因此有望通过对此通路的某个位点进行抑制从而增强 ALA-PDT 对结肠癌细胞的杀伤作用。

（通讯作者：陈祖林，Tel：023-68774605; E-mail: chenzulin@163.com）

参 考 文 献

[1] Van custsem E. A glimpse of future. new directions in the treatment of colorectal cancer[J]. Eur J caner, 1996; 32 (5): 23-27.

[2] Johansen LS. Photodynamic therapy. A new method for the treatment of cancer [J]. Ugeskr-Laeger, 1999; 161(12): 3992-3995.

[3] Zulin Chen, Jianmin Tang, Zhitang Shan, et al. Effects of materials of cell culture on transmittance[J]. SPIE, 1998; 3344: 256-263.

[4] Peng Q, Warloe T, Moan, et al. Antiumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the the use of a low dose if photofrin in human tumor xenografts[J]. Cancer Res, 2001; 61 (15):5824-5832.

[5] Niedre M, Patterson MS, Wilson BC. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo[J]. Photochem Photobiol, 2002; 75(4): 382-391.

[6] Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents[J]. Faseb J, 2001; 15(3): 612-617.

[7] Gabbita SP, Robinson KA, Stewart CA, et al. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction [J]. Arch Biochem Biophys, 2000; 376(1): 1-13.

[8] Kick G., Messer G., Plewig G., et al. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy [J]. Br J Cancer, 1996; 74(1): 30-36.

[9] Gomer CJ, Ryter SW, Ferrario A, el al. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins[J]. Cancer Res, 1996; 56(10): 2355-2360.

[10] 郑江华，时 德，陈祖林. δ 氨基酮戊酸 - 光动力疗法对人结肠癌细胞 SW480 游离钙浓度的影响[J]. 中华实验外科杂志，2005; 22 (2): 250.

[11] Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W, et al. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin[J]. J Biol Chem, 1999; 274(13): 8788-8796.

[12] Xue L, He J,Oleinick NL. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by stress kinases [J]. Cell Death Differ, 1999; 6 (9): 855-864.

[13] Thrane EV, Schwarze PE, Thoresen GH, et al. Persistent versus transient map kinase (ERK) activation in the proliferation of lung epithelial type 2 cells[J]. Exp Lung Res, 2001; 27(4): 387-400.

[14] Cui W, Yazlovitskaya EM, Mayo MS, et al. Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal- regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines[J]. Mol Carcinog, 2000; 29(4): 219-228.

[15] Anderson CN ,Tolkovsky AM. A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside [J]. J Neurosci, 1999; 19(2): 664-673.