

抑制 ERK 和 Akt 激酶对曲古柳菌素诱导的卵巢癌细胞凋亡的影响

张莉 郝权 包乐纹 付欣

摘要 目的:探讨抑制胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和蛋白激酶B(Akt)对曲古柳菌素(TSA)诱导的卵巢癌细胞凋亡的影响。**方法:**常规培养OVCAR-3卵巢癌细胞株,分为对照、TSA、TSA+PD98059和TSA+Y294002四组,其中TSA组为TSA 2.5 μM 处理24 h, TSA+PD98059组和TSA+Y294002组采用5 μM PD98059或Y294002预处理1 h后,2.5 μM TSA处理24 h。MTT法分析各组细胞生存情况,Western blot法检测P53及细胞色素C蛋白的表达,分光光度法检测Caspase-9, Caspase-8和Caspase-3活性。**结果:**MTT分析结果显示,与对照组比较,TSA处理后显著降低OVCAR-3细胞的存活率($P<0.05$);与TSA单独处理比较,采用5 μM PD98059或Y294002预处理可以进一步降低OVCAR-3细胞的存活率($P<0.05$)。Western blot分析结果显示TSA处理可以显著增加OVCAR-3细胞中P53及细胞色素C蛋白的表达,增加OVCAR-3细胞Caspase-9, Caspase-8和Caspase-3活性;对比TSA单独处理,TSA和Y294002联合应用可以增加OVCAR-3细胞中P53及细胞色素C蛋白的表达,提高Caspase-9, Caspase-8和Caspase-3的活性($P<0.05$),而TSA和PD98059联合应用无这种效果。**结论:**TSA可以诱导卵巢癌OVCAR-3细胞凋亡,其机制可能与上调P53及细胞色素C蛋白表达,激活Caspase-9、Caspase-8、Caspase-3和线粒体凋亡途径有关。抑制Akt可以通过以上机制进一步促进TSA诱导的细胞凋亡。

关键词 ERK Akt 曲古柳菌素 卵巢癌 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.12.003

Effect of ERK and Akt Inhibition on Trichostatin A-induced Apoptosis of Ovarian Cancer Cells

Li ZHANG, Quan HAO, Lewen BAO, Xin FU

Correspondence to: Li ZHANG; E-mail: zhangli2334@hotmail.com

Department of Gynecologic Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin, Tianjin 300060, China

Abstract Objective: To explore the effect of ERK and Akt inhibition on trichostatin A (TSA)-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells. **Methods:** OVCAR-3 cells were divided into four groups as follows: control group, TSA treatment group, TSA + PD98059 group, and TSA + Y294002. The cells were pretreated with PD98059 or Y294002 for 1 h, and then treated with TSA for 24 h. The cell viability was assayed via MTT. The apoptotic-related proteins were detected by Western blot. The activities of the caspases were determined using the caspase assay kits according to the manufacturer's instructions. **Results:** Compared with that of the control groups, the cell viability decreased in the TSA treatment group. The pretreatment with PD98059 or Y294002 further decreased the cell viability. The result of the Western blot indicated that the TSA treatment increased the expression of cytochrome C and P53 and the expression of caspase-8, caspase-9, and caspase-3. The inhibition of Akt promoted the TSA-induced apoptosis and the activation of apoptosis-related proteins and caspases. However, the inhibition of ERK did not yield the same results. **Conclusion:** TSA can induce the apoptosis of OVCAR-3 cells by increasing the protein expression of cytochrome C and P53 and promoting the activation of caspase-8, caspase-9, and caspase-3. Moreover, TSA enhanced the mitochondria-mediated apoptotic pathways. The inhibition of Akt may increase the apoptotic effect of TSA through the biological mechanisms mentioned above.

Keywords ERK; Akt; Trichostatin A; Ovarian cancer; Apoptosis

曲古柳菌素(Trichostatin A, TSA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,研究认为组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以通过调节胞外信号调节激酶(ERK)和蛋白激酶B(Akt)通路促进肿瘤细胞的凋亡,但抑制ERK和Akt后在不同的肿瘤细胞中发生不同的效应,可以是增生或凋亡^[1-4]。本研究将采用OVCAR-3卵巢癌细胞株,研究TSA与ERK或Akt抑制剂的同时作用

后,能否进一步促进卵巢癌细胞凋亡,并探讨其作用的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ERK抑制剂PD98059, Akt抑制剂Y294002, TSA和3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)购自美国sigma公司;Caspase-9, Caspase-8和

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院妇科,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

通信作者:张莉 zhangli2334@hotmail.com

Caspase-3活性检测试剂盒购自美国R&D公司;小鼠抗人细胞色素C抗体,小鼠抗人P53抗体和 β -actin抗体以及羊抗小鼠二抗均购自美国Santa cruz公司。

1.2 细胞培养及实验分组

OVCAR-3卵巢癌细胞株购自美国ATCC公司,常规培养于含10%胎牛血清的RPMI培养液中,37℃、5% CO₂饱和湿度条件下培养。所有实验均在细胞处于指数生长期进行。实验分为4组:对照组、TSA组、TSA+PD98059组和TSA+Y294002组,其中TSA组采用2.5 μ M TSA处理24 h,TSA+PD98059组和TSA+Y294002组采用5 μ M PD98059或Y294002预处理1 h后,2.5 μ M TSA处理24 h。

1.3 细胞生存分析

96孔板各孔加入MTT 20 μ L,继续培养4 h,吸出培养液,加入DMSO 150 μ L,振荡10 min。在570 nm波长处,读取OD值,设置只加培养液的空白孔,用于调零。对照为未加任何处理的心肌细胞,细胞生存率通过公式:细胞生存率=(对照组A值-处理组A值)/对照组A值 \times 100%。空白对照即为未加任何处理的细胞。

1.4 蛋白印迹分析(Western-blot)实验

分别取各处理组OVCAR-3卵巢癌细胞,加入适当的裂解液,提取细胞蛋白,用考马斯亮兰蛋白定量试剂盒测定各组样本蛋白浓度。各取40 μ g蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后转膜、室温封闭2 h;分别孵育对应的一抗(细胞色素C:1:1 000、P53 1:1 000和actin:1:1 000)4℃过夜;室温孵育对应HRP二抗(1:5 000)1 h后采用ECL发光法检测蛋白的表达情况。

1.5 Caspase-9, Caspase-8和Caspase-3活性检测

收集各组细胞,PBS洗涤2次,2 000 r/min离心5 min,收集 $3\times 10^6\sim 5\times 10^6$ 个细胞,用60 μ L冰冷Lysis Buffer悬浮细胞,-20℃放置20 min,4℃,10 000 rpm离心3 min,测定细胞裂解液上清蛋白浓度,并调整蛋白浓度为1.8 μ g/ μ L。每孔吸取50 μ L,同时取50 μ L Lysis Buffer作空白对照。每50 μ L 2 \times Reaction Buffer

加入0.5 μ L DTT,每孔吸取50 μ L已配制2 \times Reaction Buffer,再加入5 μ L Caspase-3、Caspase-8或Caspase-9底物,37℃避光孵育1 h,酶标仪测定A₄₀₅。

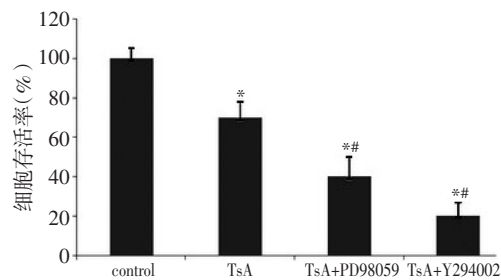
1.6 统计分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制ERK和Akt对TSA诱导的细胞凋亡的影响

MTT分析结果显示与对照组比较,TSA可以显著降低OVCAR-3细胞的生存率($P<0.05$);与单独采用TSA处理比较,采用5 μ M PD98059或Y294002预处理可以进一步降低卵巢癌OVCAR-3细胞的存活率($P<0.05$)。本实验结果提示了抑制ERK和Akt对TSA诱导的细胞凋亡可能产生协同作用(图1)。



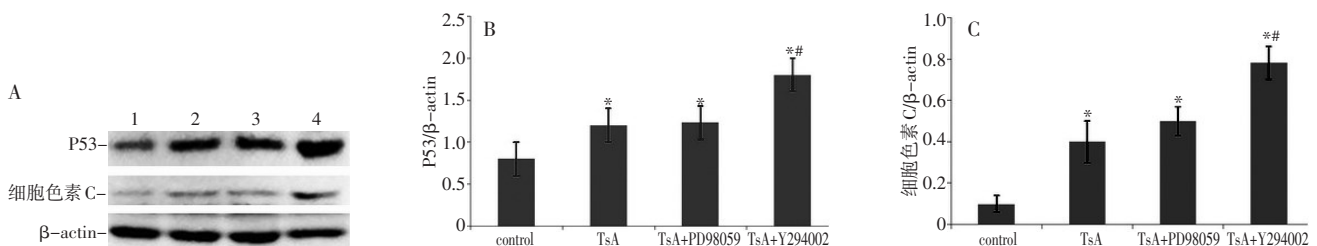
*:与control组比较, $P<0.05$;#:与TSA组比较, $P<0.05$

图1 各处理组细胞存活率

Figure 1 Comparison of the cell viability among four treatment groups

2.2 抑制ERK和Akt对凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot分析结果显示TSA可以显著增加OVCAR-3细胞的P53及细胞色素C蛋白的表达(图2A)。与TSA单独处理组比较,联合应用TSA和PD98059后OVCAR-3细胞中P53及细胞色素C蛋白的表达并无明显增加($P>0.05$),但联合应用TSA和Y294002后,OVCAR-3细胞中P53及细胞色素C蛋白的表达明显增加($P<0.05$,图2B、2C)。



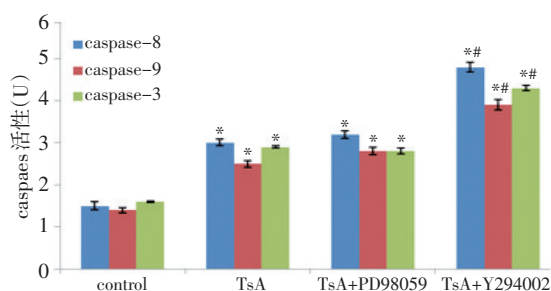
A. Western blot 检测卵巢癌OVCAR-3细胞P53和细胞色素C蛋白表达情况(1.对照组;2. TSA组;3. TSA+PD98059;4. TSA+Y294002);B. 各处理组P53半定量分析结果(*:与control组比较, $P<0.05$;#:与TSA组比较, $P<0.05$);C. 各处理组细胞色素C半定量分析结果(*:与control组比较, $P<0.05$;#:与TSA组比较, $P<0.05$)

图2 Western blot检测各处理组凋亡相关蛋白的表达

Figure 2 Expression of apoptosis-related protein in the four treatment groups by Western blot

2.3 抑制 ERK 和 Akt 对 Caspase-9, Caspase-8 和 Caspase-3 活性的影响

TSA 处理后可以显著增加 OVCAR-3 细胞 Caspase-9, Caspase-8 和 Caspase-3 活性;与 TSA 单独处理组比较,联合应用 TSA 和 PD98059 后 OVCAR-3 细胞的 Caspase-9, Caspase-8 和 Caspase-3 活性并无明显增加 ($P>0.05$),但联合应用 TSA 和 Y294002 后 OVCAR-3 细胞的 Caspase-9, Caspase-8 和 Caspase-3 活性均进一步增加 ($P<0.05$,图3)。



*: 与 control 组比较, $P<0.05$; #: 与 TSA 组比较, $P<0.05$

图3 各处理组 Caspase-9, Caspase-8 和 Caspase-3 活性的比较

Figure 3 Comparison of the activities of caspase-9, caspase-8 and caspase-3 among the four treatment groups

3 讨论

组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以通过活化细胞表面的死亡受体和增加线粒体膜通透性诱导大部分的肿瘤细胞凋亡^[5]。曲古柳菌素是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可以通过 Caspase 依赖途径诱导细胞凋亡。本研究结果证实了 TSA 可以促进卵巢癌 OVCAR-3 细胞株的凋亡,并且证实 TSA 可以促进 OVCAR-3 细胞的细胞色素 C 的释放,激活 Caspase-9 介导的细胞凋亡途径。有研究结果显示 Caspase-8 可以直接激活 Caspase-3^[6],同样 TSA 可以激活 OVCAR-3 细胞中 Caspase-8 和 Caspase-3 的活性,提示了 TSA 促卵巢癌 OVCAR-3 细胞凋亡作用是通过线粒体凋亡途径和外源性的细胞凋亡途径实现。

ERK 和 Akt 信号通路可以调节细胞的增生、分化和凋亡,然而在不同的肿瘤细胞株中抑制 ERK 或 Akt 后产生的效应并不尽相同^[7-9]。本研究发现联合应用 TSA 和 Akt 抑制剂及 ERK 抑制剂后 OVCAR-3 细胞存活率明显下降,提示了 TSA 与抑制 ERK 和 Akt 信号通路可以存在协同促凋亡作用。但是本研究结果显示与 TSA 单独处理比较,采用 ERK 抑制剂和 TSA 共同处理细胞并不能增加细胞色素 C 蛋白的表达水平,而采用 Akt 抑制剂却能进一步增加细胞色素 C 蛋白的表达。类似情况出现在细胞 Caspase-8, Caspase-9 和 Caspase-3 的活化中。提示了抑制 Akt 可以诱导 OVCAR-3 细胞凋亡,进一步促进 TSA 诱导的细胞凋

亡作用,而 ERK 抑制剂可能仅仅是存在与 TSA 诱导凋亡的协同效应。

P53 的激活可以促发凋亡,研究表明 P53 不仅可以激活线粒体凋亡信号途径和死亡受体凋亡途径,还可以损伤 DNA 和诱发氧化应激促进凋亡^[10]。本研究证实 Akt 抑制剂可以增加 TSA 诱导上调的 P53 表达水平,提示了 Akt 抑制对 TSA 的协同促凋亡作用可能是通过增加 P53 的表达水平实现的。然而,ERK 抑制剂却并无此作用。

本研究结果显示了抑制 Akt 和 ERK 在 TSA 对卵巢癌细胞的促凋亡作用中的影响并不相同。在卵巢癌细胞中, Akt 抑制剂和 TSA 可以产生协同的促凋亡作用,这种作用是通过激活线粒体凋亡途径和死亡受体途径以及上调 P53 表达水平实现的。本研究结果也提示在 TSA 治疗卵巢癌的过程中,同时抑制 Akt 可以带来更大的益处。

参考文献

- Platta CS, Greenblatt DY, Kunnimalaiyaan M, et al. The HDAC inhibitor trichostatin A inhibits growth of small cell lung cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2007, 142(2): 219-226.
- Wu ZQ, Zhang R, Chao C, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induced caspase-independent apoptosis in human gastric cancer cell [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(23): 2112-2118.
- Zhou C, Qiu L, Sun Y, et al. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 269-278.
- Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Inhibition of MEK/ERK signaling synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced growth arrest, apoptosis and acetylation of histone H3 on p21waf1 promoter in acute myelogenous leukemia cell [J]. *Leukemia*, 2008, 22(7): 1449-1452.
- Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(1): 30-37.
- Camins A, Pallas M, Silvestre JS. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2008, 30(1): 43-65.
- Yadav V, Zhang X, Liu J, et al. Reactivation of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway by FGF Receptor 3 (FGFR3)/Ras Mediates Resistance to Vemurafenib in Human B-RAF V600E Mutant Melanoma [J]. *J Biol Chem*, 2012. [Epub ahead of print]
- Im SR, Jang YJ. Aspirin enhances TRAIL-induced apoptosis via regulation of ERK1/2 activation in human cervical cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. [Epub ahead of print]
- Hoekstra AV, Ward EC, Hardt JL. Chemosensitization of endometrial cancer cells through AKT inhibition involves FOXO1 [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(3): 609-618.
- Wiman KG. Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ*, 2006, 13(6): 921-926.

(2012-04-01 收稿)

(2012-05-30 修回)

(本文编辑:郑莉)