

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.12.012

倍半萜烯内酯诱导 WEHI-3 细胞凋亡的实验

易雪¹, 刘芳², 邹萍², 肖娟², 程辉¹

Experimental on Apoptosis in Leukemia Cells Induced by Thapsigargin

YI Xue¹, LIU Fang², ZOU Ping², XIAO Juan², CHENG Hui¹

1. Wuhan Integrated TCM and Western Medicine Hospital, Wuhan 430022, China; 2. Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Corresponding Author: LIU Fang, E-mail: snowjam@163.com

Abstract: Objective To investigate apoptosis in mouse leukemia cell (WEHI-3) induced by Thapsigargin and its mechanism. **Methods** Apoptosis induced by Thapsigargin was examined by flow cytometry and Agarose gel electrophoresis of DNA and TUNEL staining. Free calcium($[Ca^{2+}]_i$) was determined by Fura-2 fluorescein load technique. RT-PCR was used to analyze the mRNA of Caspase-12. **Results** After exposure to Thapsigargin of 0.5, 1 and 2 $\mu\text{mol/L}$, WEHI-3 cells were induced to apoptosis. The apoptotic index was examined by Annexin-V/PI double-stained, Agarose gel electrophoresis of DNA and TUNEL. The results showed that the apoptotic index of the experimental groups was significantly higher than that of the control group (For example; the apoptotic index of the experimental groups determined by Annexin-V/PI double-stained were $(25.3 \pm 3.2)\%$, $(46.7 \pm 3.9)\%$ and $(70.2 \pm 2.3)\%$, respectively, which were significantly higher than the apoptotic index of the control group which was $(7.6 \pm 0.4)\%$ ($F = 26.52, P < 0.01$); and the apoptotic index was in dose dependent manner. After exposure to Thapsigargin, that $[Ca^{2+}]_i$ in the experimental group was significantly higher than that of the control group [(156.5 ± 10.3) nmol/L, (180.3 ± 15.6) nmol/L and (210.7 ± 15.3) nmol/L vs. (78.3 ± 11.2) nmol/L ($F = 21.26, P < 0.01$)]. The mRNA expression of Caspase-12 increased with an increase in Thapsigargin concentration. **Conclusion** Thapsigargin can induce the WEHI-3 to apoptosis by Endoplasmic reticulum stress of $[Ca^{2+}]_i$ overload, Ca^{2+} may play a promising target for cancer therapy.

Key words: Thapsigargin; Cell apoptosis; $[Ca^{2+}]_i$; Caspase-12

摘要:目的 探讨内质网 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂 Thapsigargin 的抗白血病作用机制。**方法** 利用 Annexin-V/PI 双染实验和琼脂糖凝胶电泳、TUNEL 染色测定鼠白血病细胞株 (WEHI-3) 细胞凋亡, Fura-2 荧光负荷技术检测细胞内游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$), 并检测在此过程中 Caspase-12 的表达。**结果** 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ Thapsigargin 作用于 WEHI-3 细胞后, 分别用 Annexin-V/PI 双染实验、琼脂糖凝胶电泳、TUNEL 法测定 WEHI-3 凋亡率结果均较对照组显著升高 (如 Annexin-V/PI 双染实验测定凋亡率分别为 $(25.3 \pm 3.2)\%$ 、 $(46.7 \pm 3.9)\%$ 、 $(70.2 \pm 2.3)\%$ 较对照组 $(7.6 \pm 0.4)\%$ 显著升高 ($F = 26.52, P < 0.01$)), 且凋亡率呈剂量依赖性。Thapsigargin 作用后 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 (156.5 ± 10.3) nmol/L、 (180.3 ± 15.6) nmol/L 和 (210.7 ± 15.3) nmol/L, 均较对照组 (78.3 ± 11.2) nmol/L 显著升高 ($F = 21.26, P < 0.01$)。Caspase-12 mRNA 的表达随着 Thapsigargin 作用剂量增加而增加。**结论** Thapsigargin 通过 Ca^{2+} 超载后诱发内质网应激诱导了 WEHI-3 细胞凋亡, Ca^{2+} 可能成为抗肿瘤药物作用新靶点。

关键词: 倍半萜烯内酯; 细胞凋亡; 游离钙离子浓度; Caspase-12**中图分类号:** R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)12-1389-04**收稿日期:** 2011-01-10; **修回日期:** 2011-09-27**作者单位:** 1. 430022 武汉, 武汉市中西医结合医院; 2. 华中科技大学同济医学院血液病研究所**通信作者:** 刘芳, E-mail: snowjam@163.com**作者简介:** 易雪 (1977-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事骨髓移植及移植后抗宿主病的研究

0 引言

倍半萜烯内酯 (Thapsigargin, TG) 是一种肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂, 可通过打开细胞膜 Ca^{2+} 通道致细胞内 Ca^{2+} 池释放, 从而使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 引起细胞凋亡。本实验用 TG 作用于鼠粒细胞单核白血病细胞株 WEHI-3, 旨在研究 TG 是

否可诱导白血病细胞的凋亡,探讨其促白血病细胞凋亡的作用机制以及 Ca^{2+} 是否能作为抗肿瘤潜在的新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

WEHI-3 鼠粒细胞单核白血病细胞株(华中科技大学同济医学院免疫教研室惠赠),Thapsigargin 为美国 Sigma 公司的产品。Annexin-V-FITC 试剂盒购自晶美生物公司。Trizol 试剂为美国 Gibco BRL 公司产品;PT-PCR 反转录试剂盒系 MBI 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和诱导凋亡 Thapsigargin(TG)溶于 DMSO,配制成浓度为 10^{-5} mol/L 的母液。根据 TG 浓度实验设 4 个组:(1)TG₁ 组终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$;(2)TG₂ 组终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$;(3)TG₃ 组终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$;(4)对照组。将不同体积的母液加入等条件培养的各组培养瓶中(对照组不加),以满足各组 TG 终浓度,与含有 15% 小牛血清的 DMEN-HG 完全培养液在 37℃、5%CO₂、相对湿度 95% 的培养箱中继续培养 24 h 后,进行以下检测:

1.2.1.1 Annexin-V/PI 双染实验 每个样本取 2×10^6 个细胞,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,加标记液 100 μl (2 μl 荧光标记的 Annexin-V,1 μl 碘化丙啶,97 μl 10 mmol/L Hepes 缓冲液),混匀,37℃ 孵育 15 min,然后加 0.4 ml 孵育缓冲液,流式细胞仪检测。

1.2.1.2 细胞 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳 将 2×10^6 个细胞置于 1.5 ml EP 管离心,加 400 μl 细胞裂解液,充分摇匀后,置 65℃ 水浴消化;加 75 μl 8 mol/L 醋酸钾,4℃ 15 min 冰浴,再加 750 μl 氯仿,剧烈混匀,离心 5000 r/min 10 min 后,取上清液加入另一 EP 管;加入与上清等体积的异丙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗 DNA 2 次;加 50 μl 无菌双蒸水,37℃ 2 h 溶解 DNA。取适量 DNA 行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果并照相。

1.2.1.3 TDT 介导的脱氧尿苷三磷酸末端标记 (TUNEL)法 室温下用 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定细胞 30 min,加 0.1% TritonX-100/枸橼酸盐溶液 4℃ 作用 2~5 min,再按 TUNEL 试剂盒(德国 Roche 公司)说明进行操作,显色后光学显微镜下观察,核呈棕褐色者为阳性细胞,计数阳性细胞百分率。

1.2.2 细胞内钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)测定 加入终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fura-2/AM(晶美生物产品),以一定量 Hanks 平衡盐溶液终止反应,细胞终浓度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$,37℃ 测 340 nm、380 nm 的荧光强度(F)

值,最大 $F(F_{\max})$ 由加入终浓度为 0.2% 的 TritonX-100 测得,最小 $F(F_{\min})$ 由加入终浓度为 8 mmol/L (pH>8.5)的 EGTA 测得,细胞胞浆游离钙离子浓度: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) F_{f2}/F_{b2}$ 。其中平衡常数 K_d 在 37℃ 时为 224 nmol/L; R 为 340 nm、380 nm 荧光强度比值($R = F_{340}/F_{380}$)。校正参数分别为游离时形成的最大、最小荧光比值, F_{f2} 与 F_{b2} 分别为游离与饱和 380 nm 荧光强度。

1.2.3 RT-PCR 测定 Caspase-12 按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞 RNA。引物序列 Caspase-12 (450bp) 上游:5'-AAC ACG TCT GGC TCT CAT CA-3'和下游:5'-ACA CGT TCC TCA TCT GTA TC-3'。 β -actin(610bp) 上游:5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3';下游:5'-TGG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3'。由上海博亚公司合成,按 RT-PCR 试剂盒进行逆转录和 PCR 扩增反应。用图像分析仪测定电泳照片上各条带的密度值,计算 Caspase-12/ β -actin 比值。

1.3 统计学方法

所有数据应用 SPSS10.0 软件进行统计学处理,根据实验资料要求,选用 LSD- t 、SNK- q 检验进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Thapsigargin 诱导 WEHI-3 细胞凋亡

2.1.1 Annexin-V/PI 双染实验显示,0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ Thapsigargin 作用 24 小时后均可诱导 WEHI-3 细胞出现典型凋亡征象,经 Annexin-V/PI 双染实验测定凋亡率分别为 $(25.3 \pm 3.2)\%$ 、 $(46.7 \pm 3.9)\%$ 、 $(70.2 \pm 2.3)\%$ 较对照组 $(7.6 \pm 0.4)\%$ 显著升高($F = 26.52, P < 0.01$)。凋亡率呈剂量依赖性,见图 1。

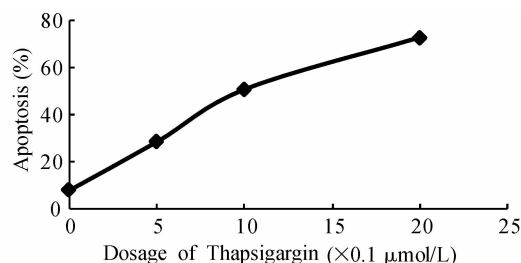


图1 Annexin-V/PI 双染实验测定 Thapsigargin 作用 24 h 后细胞的凋亡率

Figure 1 The apoptosis rate of WEHI-3 cells induced by Thapsigargin for 24 h measured by Annexin-V/PI double-stained

2.1.2 琼脂糖凝胶电泳 DNA 梯形条带 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ Thapsigargin 作用 WEHI-3 细胞 24 h

后, DNA 凝胶电泳上均可见到典型 DNA 梯形条带, 随着药物作用时间延长, DNA 梯形条带亦趋明显, 亮度增加, 见图 2。

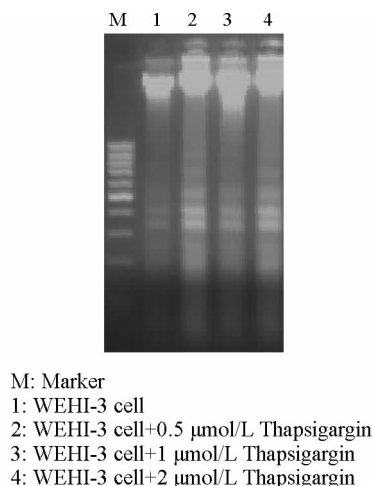


图 2 Thapsigargin 诱导 WEHI-3 细胞凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of DNA of apoptosis in WEHI-3 cell induced by Thapsigargin

2.1.3 TUNEL 结果示经染色后, 凋亡细胞的核呈棕色或棕褐色, 形态呈碎点状, 不规则, 而非凋亡细胞无此改变, 见图 3。随着 Thapsigargin 作用浓度的增加, 细胞凋亡数量增加。0.5、1、2 μmol/L Thapsigargin 作用 24 h 后细胞凋亡率分别为 $(23.2 \pm 2.1)\%$ 、 $(39.6 \pm 1.2)\%$ 和 $(72.3 \pm 2.8)\%$ 较对照组 $(6.2 \pm 0.8)\%$ 显著升高 ($P < 0.01$), 见图 4。



图 3 TUNEL 示凋亡的 WEHI-3 细胞核呈棕色改变 (2 μmol/L Thapsigargin)

Figure 3 Brown change happened in nucleus of apoptotic WEHI-3 cells measured by TUNEL assay (2 μmol/L Thapsigargin)

2.2 Thapsigargin 对细胞内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的影响

0.5、1、2 μmol/L Thapsigargin 作用 24 h 后 WEHI-3 细胞胞内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 $(156.5 \pm 10.3) \text{ nmol/L}$ 、 $(180.3 \pm 15.6) \text{ nmol/L}$ 和 $(210.7 \pm 15.3) \text{ nmol/L}$ 。均较对照 $(78.3 \pm 11.2) \text{ nmol/L}$ 显著升高 ($F = 21.26, P < 0.01$), 见图 5。

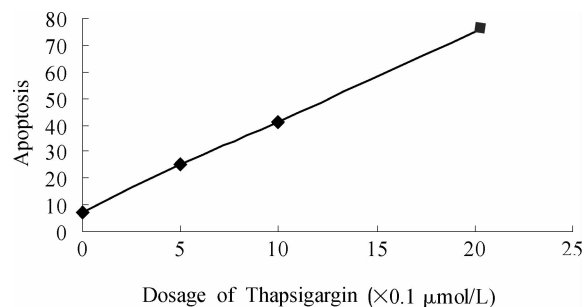


图 4 TUNEL 示 Thapsigargin 作用 24 h 后 WEHI-3 细胞的凋亡率

Figure 4 Apoptosis rate in WEHI-3 cells induced by Thapsigargin (Measured by TUNEL assay)

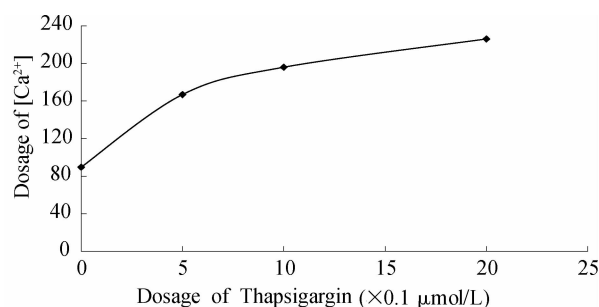


图 5 Thapsigargin 作用 24 h 后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度

Figure 5 Obvious increase in intracellular free calcium concentration induced by Thapsigargin after 24 h

2.3 RT-PCR 分析

特异性扩增的 Caspase-12 长度为 450 bp。内参 β-actin 长度为 610 bp, WEHI-3 细胞株经 0.5、1、2 μmol/L Thapsigargin 作用 24 h 后 Caspase-12/β-actin 比值明显增高, 且研究证实其表达与 Thapsigargin 的浓度相关, 随着 Thapsigargin 浓度增加, Caspase-12 mRNA 表达量增加, 见图 6。

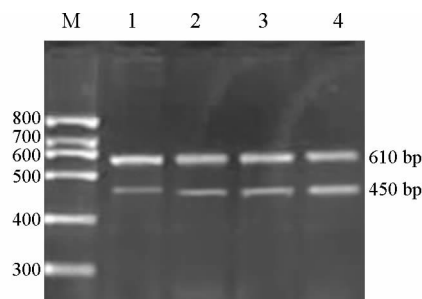


图 6 不同浓度的 Thapsigargin 诱导 WEHI-3 细胞凋亡时 Caspase-12 mRNA 的表达

Figure 6 Expression of Caspase-12 mRNA in apoptotic WEHI-3 cells induced by Thapsigargin with different concentration

3 讨论

内质网应激反应性凋亡的起始信使内质网应激反应性细胞凋亡的确切机制虽然未完全清楚,但是 Ca^{2+} 已被证实为引起内质网应激反应性凋亡的起始信使(initial messenger)^[1]。并且研究证实 Ca^{2+} 信号途径在实体瘤和白血病细胞的恶性表型形成中亦可能是通过内质网异常发挥而作用的^[2]。

倍半萜烯内酯(Thapsigargin, TG)可通过抑制内质网膜上 ATP 依赖性钙泵而使内质网钙释放,当内质网钙释放而细胞外钙离子不能及时补充到内质网,可造成细胞内钙耗竭,导致内质网应激反应性细胞凋亡^[3]。本实验利用不同浓度的 TG 作用于鼠白血病细胞(WEHI-3),之后检测细胞凋亡率和细胞内 Ca^{2+} 浓度,结果发现 WEHI-3 细胞的凋亡率和细胞内 Ca^{2+} 浓度随着 TG 浓度递增而递增。由此可以确定 TG 是通过激发内质网应激反应性凋亡途径发挥促 WEHI-3 白血病细胞凋亡的。

Caspase-12 可能是内质网应激反应性凋亡途径的中心环节^[4]。Caspase-12 是位于内质网上的新发现的促凋亡分子^[5],它只能被内质网应激反应的凋亡信号活化。Caspase 家族在肿瘤细胞凋亡过程中起着重要作用,其中已证明 Caspase-4、Caspase-2 通过内质网应激反应介导慢性淋巴细胞白血病细胞凋亡^[6]。本研究显示 TG 作用于 WEHI-3 细胞后 Caspase-12 的表达明显增加,且表达量随着 TG 的浓度递增而递增。由此推断, TG 诱导肿瘤细胞凋亡的机制可能与内质网钙离子动态平衡破坏时,直接激活位于内质网上的 Caspase-12, 激活的 Caspase-12 可进一步激活 Caspase 家族,从而引发细胞凋亡。

内质网应激反应性凋亡的研究为肿瘤防治提供了新靶点和新思路,已证实部分新型化疗药物通过胞膜 Ca^{2+} 通道和胞内 Ca^{2+} 超载诱导急性髓系白血病和多发性骨髓瘤细胞死亡,从而发挥治疗肿瘤的作用^[7]。本文针对 Ca^{2+} 超载引起细胞凋亡的机制,提出与 Ca^{2+} 有关的药物调控细胞凋亡的作用靶点,以利抗肿瘤药物的研发和应用。

参考文献:

- [1] Shen ZY, Shen WY, Chen MH, et al. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 40-43.
- [2] Arbabian A, Brouland JP, Gélébart P, et al. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer [J]. Biofactors, 2011, 37(3): 139-149.
- [3] Rao RV, Hermel E, Castro-obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation [J]. J Biol Chem, 2001, 276(36): 33869-33874.
- [4] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. Nature, 2000, 403(6765): 98-103.
- [5] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis [J]. J Cell Biol, 2000, 150(4): 887-894.
- [6] Popovic S, Baskic D, Djurdjevic P, et al. Endoplasmic reticulum stress associated with caspases-4 and -2 mediates korbazol-induced B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis [J]. J BUON, 2010, 15(4): 783-790.
- [7] Yanamandra N, Buzzeo RW, Gabriel M, et al. Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca^{2+} influx through plasma membrane Ca^{2+} channels [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 337(3): 636-643.

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]