中国肿瘤生物治疗杂志
Chin J Cancer Biother 2003 Mar; 10(1): 48 ~ 50

[文章编号] 1007-385X(2003)01-0048-03

全反式维甲酸通过磷酸化 JNK 抑制视网膜母细胞瘤细胞生长

闵红波[1], 王建文[2], 孙继虎[2], 步世忠[2], 余永伟[3](1. 解放军第 455 医院眼科 上海 200052; 2. 第二军医大学生理教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

[摘 要] **目的:** 研究全反式维甲酸(ATRA)抑制视网膜母细胞瘤(Rb)细胞生长的作用及信号转导机制。**方法:** 应用^{3}H-胸腺嘧啶掺入分析法观察 ATRA 对细胞生长的抑制作用,用流式细胞仪分析 ATRA 对 Y79 细胞周期的影响,用 Western blot 分析 c-jun 氨基末端激酶(JNK)的磷酸化。**结果:** ATRA 可明显地抑制 Y79 细胞的生长,10^{-6} mol·L^{-1} ATRA 处理 36 h 时,^{3}H-胸腺嘧啶掺入率下降达 40%,此条件下,Y79 细胞被阻滞于 G_0/G_1 期,并出现 Sub-G_1 峰;此生长抑制过程可被 JNK 的阻断剂 Curcumin 阻断;在此过程中,JNK 被激活,磷酸化。**结论:** ATRA 可抑制 Y79 细胞生长,其过程是由磷酸化的 JNK 介导。提示,ATRA 可能是一种潜在的抗视网膜母细胞瘤治疗药物。

[关键词] 全反式维甲酸; 视网膜母细胞瘤; 信号转导; Y79; 生长抑制
[中图分类号] R730.5; R979.1 [文献标识码] A

All Trans Retinoid Acid Inhibit Cell Growth in Human Retinoblastoma Cells Via Phosphorylation of JNK

MIN Hong-bo[1], *WANG Jian-wen*[2], *SUN Ji-hu*[2], *BU Shi-zhong*[2], *YU Yong-wei*[3](*1. Department of Ophthalmology, 455 Hospital, PLA., Shanghai 200052, China; 2. Department of Physiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pathology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate all trans retinoid Acid (ATRA) inhibition of cell growth in human retinoblastoma Y79 cells, and its mechanism. **Methods**: Antiproliferation effects of ATRA on Y79 cells were determined by ^{3}H-thymidine incorporation. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry. JNK phosphorylation was analyzed by Western blot analysis. **Results**: After 36 h treatment with 10^{-6}mol·L^{-1} ATRA, ^{3}H-thymidine incorporation decreased to 40%, under the same condition, Y79 cells were arrested in G_0/G_1 and Sub-G_1 peak appeared. Curcumin, JNK blocker, blocked the growth inhibition by ATRA. JNK was phosphorylated in 10 to 20 min. **Conclusion**: JNK-phosphorylating mediated ATRA inhibition of apoptosis in Y79 cells. These results suggested that ATRA might have clinical application for treatment of retinoblastoma.

[**Key words**] all trans retinoid acid; JNK; growth inhibition; Y79

* 视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)是恶性程度很高的眼部肿瘤,一旦发现,目前唯一的治疗方法是患眼摘除。维甲酸在机体生长、发育、分化和凋亡过程中起着重要作用[1],全反式维甲酸(all trans retinoid acid, ATRA)是维甲酸的衍生物,在许多肿瘤细胞系的研究中发现 ATRA 具有抑制瘤细胞生长,诱导细胞分化甚至凋亡作用,临床上 ATRA 最早用于白血病的治疗[1],近来陆续有报道维甲酸能抑制多种肿瘤细胞的生长,如乳腺癌、肺癌等[2]。本研究以 Rb 细胞株 Y79 为实验对象,观察 ATRA 抑制细胞生长作用及信号转导机制。以期寻找 Rb 有效的药物治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

ATRA 溶解于无水乙醇,上海第六制药厂产品。Curcumin (CUR),美国 Sigma 公司产品。HRP 标记的兔抗人(jun N-terminal kinases, JNK)和磷酸化(pJNK)

[作者简介] 闵红波(1963-),女,武汉人,副主任医师,医学硕士,主要从事视网膜疾病及眼肿瘤的治疗及研究。E-mail: minhongbo314@yahoo.com.cn

抗体,HRP 标记的羊抗兔抗体购于美国 Sigma 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养

Y79 细胞引自中国科学院上海细胞所细胞库,Y79 细胞浓度为 10^6 ml^{-1},在 37℃,5% 的 CO_2 培养箱中培养。

1.2.2　^{3}H-胸腺嘧啶掺入分析[3]

将 Y79 细胞置于 96 孔培养板,每孔加 100 μl 细胞悬液,再加 74 kBq ^{3}H-胸腺嘧啶(特异活性为 8.14 × 10^{12} Bq · mol^{-1};中科院上海原子核研究所提供)作 ATRA 对^{3}H-胸腺嘧啶掺入影响的剂量依赖性和时间依赖性分析。

1.2.3　细胞周期分析

按文献[4]方法,所用流式细胞仪为 Epics Elite(美国),汞激光激发波长为 488 nm。结果分析软件为 Elite 4.0 和 DNA Multicycle。经 ATRA 处理及对照组细胞各 10^6 ml^{-1},PBS 洗涤,以 70% 冷乙醇 4℃ 固定 4 h,离心(500 r/min,5 min)去除乙醇,加入磷酸-枸橼酸钠 40 μl 悬浮细胞,室温置 30 min,离心(500 r/min,5 min),PBS 100 μl 悬浮沉淀细胞,加入 RNase A 溶液 1 μl(1∶1),37℃ 孵育 30 min,加入碘化丙锭溶液 50 μl(1∶1)混合,置暗室 30 min 染色。用流式细胞仪测定细胞周期及凋亡细胞数。

1.2.4　Western blot

蛋白质提取和印迹免疫检测参照文献[5]进行。10^6 细胞经冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次,溶于 1.0 ml 细胞溶解液中[2% SDS, 0.15 mol · L^{-1}/NaCl, 10 μmol · L^{-1} Tris(pH7.5), 1 mmol · L^{-1} EDTA],然后置于冰上 30 min。蛋白浓度测定用总蛋白诊断盒(Sigam)和分光光度仪测定波长为 578 nm。每孔蛋白含量为 40 μg,煮沸变性 5 min,分别经 10% SDS-PAGE 电泳,然后电转移至 PVDF 膜上。该膜用含 5% 脱脂牛奶 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h,与 JNK 和 pJNK(1∶1 000)单抗室温孵育 3 h,TBS-T 缓冲液洗涤 30 min,再与结合有辣根过氧化酶的抗兔 IgG 抗体(1∶5 000, Amersham)室温孵育 1 h,洗涤 30 min。应用增强的化学放射发光法检测(enhanced chemoluminescence, ECL),与 ECL A 和 ECL B 混合液反应 1 min,干燥,显影在 X 光片上。

1.2.5　统计学方法

采用 t 检验。

2　结　果

2.1　ATRA 对 Y79 细胞^{3}H-胸腺嘧啶掺入率的影响

经 ATRA 处理后的 Y79 细胞^{3}H-胸腺嘧啶掺入率明显下降,并呈剂量和时间依赖性(图 1),ATRA 处理时间为 36 h 时,^{3}H-胸腺嘧啶掺入率随剂量增加而下降,10^{-6} mol · L^{-1} ATRA 时^{3}H-胸腺嘧啶掺入率下降最明显,达 40%($P<0.01$, *vs*. 10^{-7} mol · L^{-1})。在 10^{-6} mol · L^{-1}剂量不变的条件下,随处理时间的延长^{3}H-胸腺嘧啶掺入率逐渐下降,36 h 掺入率下降最明显,达 40%($P<0.01$, *vs* 24 h)。以上实验均重复 3 次。

图 1　ATRA 对^{3}H-胸腺嘧啶掺入的影响

Fig. 1　Effect of ATRA on ^{3}H-thymidine incorporation in Y79 cells

* $P<0.01$, *vs* 24 h; ** $P<0.01$, *vs* 10^{-7} mol · L^{-1}

2.2　ATRA 对 Y79 细胞周期的影响

细胞周期各期的 DNA 含量分析见附表 1,Y79 细胞经 10^{-6} mol · L^{-1} ATRA 处理 6 h 后,Sub-G_1 期细胞开始逐渐增加,至 36 h 时达 32.4%,并出现明显的 Sub-G_1 凋亡峰(图 2)。S 期和 M 期细胞无明显变化(表 1)。

表 1　ATRA 对不同细胞周期 Y79 细胞 DNA 含量的影响(%)

Tab. 1　Influence of ATRA on DNA content of different cell cycle in Y79 cells

Cell cycle	ATRA (10^{-7} mol · L^{-1})					
	0	3	6	12	24	36 (h)
Sub-G_1	1.5	1.2	3.2	5.2	14.7	32.4
G_0/G_1	50.3	56.7	44.1	40.3	30.8	18.7
S	37.0	27.3	38.3	40.9	39.2	35.3
G_2/M	11.2	14.4	14.7	13.6	15.5	13.6

2.3　ATRA 对 JNK 磷酸化的影响 Western blot 分析

如图 3 示,10^{-6} mol · L^{-1} ATRA 处理后,10 min 开始出现磷酸化 JNK 条带(p-JNK),其中 p-JNK_1(54 kD)在 40 min 时达高峰,而 p-JNK_2(46 kD)则在 60 min 时达高峰,以后均回落;总 JNK 作为内参照则无明显变化(图 3)。

2.4　CUR 阻断 ATRA 对 Y79 细胞的作用

CUR 是 JNK 信号转导通路的阻断剂[6],本实验中 10 mg · ml^{-1}的 CUR 与 ATRA 同时处理 Y79 细胞,经流式细胞仪分析,Sub-G_1峰消失,生长阻滞被阻断,Sub-G_1期细胞由 ATRA 单独处理的 37% 下降到 11%,而该剂量的 CUR 单独处理细胞,则不出现 Sub-G_1峰,Sub-G_1期细胞为 5%,与空白对照组相似。

图 2　流式细胞仪分析 ATRA 对 Y79 细胞周期的影响

Fig. 2　Flow cytometry analyze the effect of ATRA on cell cycle of Y79 cells

A: Control; B: ATRA

图 3　ATRA 对 Y79 细胞 JNK 磷酸化的影响

Fig. 3　Influence of ATRA on JNK phosphorylation in Y79 cells

0 – S: Osmotic shock

3　讨　论

本文^{3}H-胸腺嘧啶掺入率分析表明 ATRA 可有效地降低 Y79 细胞的^{3}H- 胸腺嘧啶掺入率,以 10^{-6} mol·L^{-1} 处理 36 h 最为明显,其效应呈剂量依赖和时间依赖关系。胸腺嘧啶是细胞增殖中胞核合成所必需的成分,因此,胸腺嘧啶掺入率的降低表明细胞增殖受抑制,所以 ATRA 对 Y79 细胞增殖有明显地抑制作用。本研究显示,10^{-6} mol · L^{-1} ATRA 处理 36 h 后细胞的流式细胞仪分析出现 Sub-G1f 峰,提示 ATRA 有诱导 Y79 细胞凋亡的作用。细胞周期分析表明,G_0/G_1期细胞经历了分裂期阻滞,ATRA 对 G_2/M 细胞没有阻滞作用。表明 ATRA 在抑制细胞生长的同时可诱导 Y79 细胞凋亡,ATRA 诱导 Y79 细胞凋亡发生在 G_0/G_1期细胞阻滞的基础之上。

通过对不同细胞模型的研究发现,JNK 途径的激活参与了不同刺激所致凋亡的启动,凋亡的产生需要 JNK 活化[7]。本研究中,ATRA 处理细胞后,p46-JNK1 和 p54-JNK2 在细胞被刺激 10 min 后开始磷酸化,并在 1 h 以后在出现高峰后回落,其发生的时间远较凋亡出现的 36 h 早。CUR 是 JNK 通路的阻断剂,CUR 与 ATRA 同时处理 Y79 细胞时,ATRA 抑制细胞生长的作用被阻断,同样剂量的 CUR 单独处理 Y79 细胞,经流式细胞仪和 DNA 凝胶电泳分析,对 Y79 细胞无影响,说明 ATRA 对 Y79 细胞生长抑制的作用是经过 MAPK 中的 JNK 通路,即磷酸化的 JNK 介导了 ATRA 对 Y79 细胞生长的阻滞作用。本研究结果提示,ATRA 可能是一种有潜力的视网膜母细胞瘤治疗药物。

[参 考 文 献]

[1] Huang M, Yuchen Y, Shurong C, *et al*. Use of all transretinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1988, 72: 567-573.

[2] Liu R, Takayama S, Zheng Y, *et al*. Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells[J]. J Biol Chem, 1998 273: 16985-16992.

[3] Bu SZ, Yin DL, Ren XH, *et al*. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines[J]. Cancer, 1997, 79(10): 1944-1950.

[4] Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, *et al*. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin *in vitro*.[J] Cancer Res, 1995, 55: 1982-1988.

[5] Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of Taxol-induced G_2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids[J]. Cancer Res, 1997, 57: 2388-2393.

[6] Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin[J]. Oncogene, 1998, 17: 173-178.

[7] Potapova O, Anisimov SV, Gorospe M, *et al*. Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulationrevealed by serial analysis of gene expression[J]. Cancer Res, 2002, 62(11): 3257-3263.

[收稿日期] 2002 – 09 – 01　　[修回日期] 2002 – 11 – 05