中国肿瘤生物治疗杂志 Chin J Cancer Biother 2005 Sep; 12(3): 202 ~ 205

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0202-04

JNK/SAPKs 信号转导通路在榄香烯抗肝癌效应中的作用

郭连英, 杨 泷, 施广霞, 任含平, 沈 洁, 钱振超(大连医科大学病理生理学教研室, 大连 116027)

[摘 要] **目的:** 探讨 JNK/SAPKs 信号转导通路在榄香烯抗肝癌效应中的作用,为阐明榄香烯抗癌效应的分子机制提供参考。**方法:** 气相色谱法检测榄香烯在 Hca-F 肝癌细胞内的分布。透射电镜观察 SMMC7721 凋亡细胞的超微结构变化。利用 Western-blotting 对榄香烯处理的 HepG2 肝癌细胞 JNK/SAPKs 进行的活性分析。利用 RT-PCR 检测榄香烯处理的 SMMC7721 肝癌细胞的 DAXX 基因表达。**结果:** 榄香烯标准品在 8.42 min 时出现洗脱峰。榄香烯处理 3 h 后,SMMC7721 细胞开始发生具有凋亡特征的变化。榄香烯处理组 HepG2 细胞的 JNK/SAPKs 激酶活性次于热休克处理组,高于对照组。榄香烯处理的 SMMC7721 细胞组未见 DAXX 基因的表达。**结论:** 榄香烯能够进入细胞内。其引起的肿瘤细胞凋亡可能是通过活化 JNK/SAPKs 来诱导的。DAXX 传入途径在榄香烯诱导的 JNK/SAPKs 活化过程中可能不起主要作用。
[关键词] 信号转导 JNK/SAPK; 榄香烯; 肝癌细胞; DAXX
[中图分类号]:R730.5 [文献标识码] A

The Role of JNK/SAPK Signaling-Transduction Pathway in the Effect of Elemene Against Hepatocarcinoma

GUO Lian-ying, YANG Long, SHI Guang-xia, REN Han-ping, QIAN Zhen-chao (Pathophysiology of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[**Abstract**] **Objective**: To find out the role of JNK/SAPK signaling-transduction pathway in the effect of elemene against hepatocarcinoma, offering the clue to ilustrate the molecular mechanisms of antitumor effects of elemene. **Methods**: The detection of the distribution of elemene in Hca-F cells was detected by gas chomatography and apoptotic changes in elemene treated. SMMC7721 cells were examined by TEM. After elemene treatment, the activation of JNK/SAPK in HepG2 cellls and the DAXX gene expression in SMMC7721 cells were detected by Western blotting and RT-PCR respectively. **Results**: Gas chomatography showed that elemene was detected at 8.42 minute. The SMMMC7721 cells treated by elemene for 3 hours began to show typical apoptotic changes . The JNK/SAPK activity in HepG2 cell treated with heat shock was the highest of all groups and the group treated with elemene was the next and the control group is the lowest one. There was no DAXX gene expression in SMMC7721 cells treated with elemene. **Conclusion**: Elemene can diffuse into cells. Tumor cell apoptosis treated with elemene may be induced by JNK/SAPK activating and DAXX signal pathway may not play key role in JNK/SAPK activation induced by elemene.
[**Key words**] signal transduction; JNK/SAPK; elemene; hepatocarcinoma cell; DAXX

榄香烯是从姜科植物温郁金挥发油中提取的有效成份。研究表明以榄香烯为主药制备的榄香稀复合瘤苗能够提高肿瘤细胞的免疫原性,从而使机体产生主动特异性免疫预防和免疫杀伤效应[1-2];经榄香烯处理的肿瘤细胞的细胞周期发生变化,并出现明显的细胞毒效应及细胞凋亡现象[3]。

有丝分裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路普遍存在于真核细胞之中。已知 MAPKs 至少含有 6 个亚家族,其中 JNK/SAPK 的活化被认为与细胞应激和细胞凋亡有

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目资助(39730440 - Ⅱ);辽宁省普通高等学校中青年学科带头人辽教办发[2001-44]号;优秀青年骨干教师选拔工程
[作者简介] 郭连英(1962-),女,实验师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: guolianying@163.com
[通讯作者] 施广霞, E-mail: shiguangxia@hotmail.com

关[4]。用榄香烯刺激肿瘤细胞后,细胞能做出类似应激的反应,可以发生肿瘤细胞的凋亡,因此,它与 JNK/SAPK 信号转导通路的活化可能存在着某种相关性。本实验期望通过对 JNK/SAPK 信号转导通路的研究为寻找榄香烯抗癌作用的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

榄香烯(大连金港制药有限公司),MEM 培养基和 RPMI-1640 培养基:GIBCO 公司产品。胎牛血清和小牛血清:杭州四季青公司。化学发光法 JNK/SAPK Assay Kit:Cell Signaling Technology 公司。Trizol:GIBRO-BRL。二乙基焦碳酸盐:美国 Sigma 公司。RT-PCR Assay Kit 和琼脂糖:Takala 公司。

1.2 动物

Balb/c 系小鼠,引自中国医学科学院北京药物研究所,由本研究室自行繁殖提供。实验用小鼠 8 ~ 12 周龄,体重 20 ± 5 g,雌雄各半。

1.3 Hca-F 细胞悬液的制备

将传代保种的 Hca-F 腹水型肝癌细胞(本院病理学教研室提供)接种于小鼠腹腔内,0.2 ml/只,收集第 7 天的腹水,HS 液破除红细胞,Hanks′液洗 3 次,计活细胞数,调细胞数至所需浓度。

1.4 细胞培养

HepG2 细胞(上海第二军医大学提供)常规培养于含 10% 胎牛血清的 MEM 完全培养基(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml,谷氨酰胺 100 μg/ml)中,于 37℃,5% CO_2 孵箱中孵育;SMMC7721 细胞(复旦大学肝癌研究所赠送)常规培养于含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中,于 37℃,5% CO_2 孵箱中孵育。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。

1.5 气相色谱法检测榄香烯在 Hca-F 细胞内的分布

Hca-F 细胞,分为 3 组,每组 2×10^9 个。分别用 20 ml(浓度为 50 μg/ml)榄香烯处理 15 min 和 1 h,对照组用等体积的 PBS 处理;PBS 清洗 3 次(每次 20 ml,1 000 g 离心 5 min,弃上清液),用 20 ml PBS 重悬细胞;将细胞悬液用超声碎细胞仪破碎后,100 000 g 超速离心 3 h,取上清液,用正己烷等体积萃取 3 次(每次萃取 10 min,5 000 g 离心 10 min,再将正己烷相移出);将萃取液置于 70℃ 恒温水浴箱中浓缩;最后用气相色谱仪检测(GC-TAG 气相色谱仪系统)。

1.6 透射电镜观察 SMMC7721 凋亡细胞的超微结构变化

SMMC7721 细胞,分为 3 组,每组 1×10^6 个/ml。分别用 5 ml(浓度为 50 μg/ml)榄香烯处理 1 h 和 3 h,对照组用等体积的 PBS 处理;PBS 清洗 3 次;收集细胞,以固定,包埋,超薄超片,铀-铅双染色,进行观察。

1.7 用 Western blotting 对榄香烯处理的 HepG2 细胞 JNK/SAPKs 进行活性分析

Hep G2 细胞分成 3 组,分别用榄香烯(50 μg/ml,37℃,30 min、热休克 42℃,30 min)处理或不处理用作对照。按试剂盒提供的说明书操作。

1.8 用 RT-PCR 检测榄香烯处理的 SMMC7721 细胞 DAXX 基因的表达

榄香烯(50 μg/ml),TNF-α(1 000 IU/ml)处理 SMMC7721 细胞,Trizol 提取总 RNA,上游 PCR 引物序列:5′TCC TCT GTG GAG ACG GAC ATT T3);下游 PCR 引物序列:5′AGA AGG GGA GGC AGT TAA TCA G3′,逆转录反应合成第一链,PCR 反应扩增特异片段:按以下条件进行 PCR 反应。94℃,2 min;94℃,30 s;50℃,45 s,循环 28 次;75℃,1.5 min;72℃ 7 min,停止温度 4℃。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物;凝胶成像系统分析并保存实验结果。

2 结 果

2.1 榄香烯在 Hca-F 细胞内的分布

气相色谱仪检测结果:榄香烯标准品在 8.42 min 时出现洗脱峰;榄香烯处理 15 min 和 1 h 组分别在 8.437 min、8.318 min 时出现洗脱峰;而对照组在 8.42 min 附近未见任何洗脱峰。表明 Hca-F 肝癌细胞不生产榄香烯,且榄香烯能够进入细胞内。

2.2 榄香烯诱导的 SMMC7721 凋亡细胞的超微结构变化

在透射电镜下,正常 SMMC7721 细胞形态规则,有绒毛,染色质分布均匀,核完整(图 1A)。榄香烯处理 1 h 的 SMMC7721 细胞与正常的 SMMC7721 细胞相比,在形态上没有明显的变化;榄香烯处理 3 h 后,SMMC7721 细胞开始发生变化,表现为细胞体积变小,绒毛消失,细胞核固缩,形态多样,染色质边集于细胞核膜处,分界清楚等凋亡特征(图 1B)。

2.3 榄香烯诱导的 HepG2 细胞 JNK/SAPKs 活性的分析

榄香烯处理组、热休克处理组及对照组 HepG2 细胞的 JNK/SAPKs 都有激酶活性;热休克处理组 HepG2 细胞的 JNK/SAPKs 激酶活性与其它组相比最强,榄香烯处理组 HepG2 细胞的 JNK/SAPKs 激酶活性次之,对照组 HepG2 细胞的 JNK/SAPKs 激酶活性最弱(图 2)。以上结果表明:热休克作用比榄香烯活化 JNK/SAPKs 的能力强。此外,HepG2 细胞中的 JNK/SAPKs 具有一定的基础活性。

2.4　榄香烯诱导 SMMC7721 细胞 DAXX 基因的表达

榄香烯和 TNF-α 分别处理的 SMMC7721 细胞组及 SMMC7721 细胞的对照组均有内参基因 β-actin(片段长度为 275 bp)的表达,但未见 DAXX 基因(片段长度为 327 bp)的表达(图 3)。

图 1　榄香烯处理的 SMMC7721 凋亡细胞的超微结构变化

Fig. 1　Changes of morphology resulted from elemene treatment in SMMC7721 cells

A: Untreated SMMC7721 cells;

B: Treated SMMC7721 cells with elemene

图 2　榄香烯诱导的 HepG2 细胞 JNK/SAPKs 活性的分析

Fig. 2　Assay of activity of JNK/SAPKs induced by elemene in HepG2 cells

3　讨　论

肿瘤细胞经榄香烯处理后出现细胞周期阻滞(在 G1 期以及 S 期与 G2 期交界处增殖抑制与细胞凋亡,后者可能与 bcl-2 下调有关[3, 5-6]。

本实验利用透射电镜观察榄香烯处理的肝癌 SMMC7721 细胞发现了 SMMC7721 细胞凋亡的形态学证据。然而,榄香烯诱导细胞凋亡的刺激信号是通过哪个信号转导路径传递的呢? 本室曾用基因芯片技术对热休克榄香烯处理的 HepG2 细胞基因表达谱进行检测发现 NGFR,DAXX 基因表达上调而金属蛋白酶抑制剂基因表达下调[7]。NGFR 做为 TNFR 家族的一员,与 TNFR,Fas 有高度的同源性。在神经细胞上,它接受生长因子的刺激信号,但在其他细胞上,则能接受凋亡信号[8]。DAXX 没有死亡结构域,但可以直接与 Fas 死亡结构域结合,并通过一系列的信号传递来激活 JNK/SAPKs,引起细胞凋亡[9]。本实验发现 HepG2 细胞中的 JNK/SAPKS 具有一定的基础活性而热休克榄香烯确能使 JNK/SA 活性增强。本实验榄香烯和 TNF-α 单独刺激的 SMMC7721 细胞,发现 DAXX 均无表达,提示 DAXX 在榄香烯诱导的 JNK/SAPKs 活化过程中可能并不起主要作用。同时也不能排除不同细胞类型 DAXX 基因表达水平差异的影响。

图 3　榄香烯诱导 SMMC7721 细胞 DAXX 基因的表达

Fig. 3　Expression of DAXX induced by elemene in SMMC7721 cells

1: Control; 2: Elemene; 3: TNF-α; 4: Marker

JNK/SAPKs 中能通过抑制 CDC2 的磷酸化来抑制 CDC2 的活性[10];基因芯片检测显示与 CDC25 同族的人类 CDC25Hu 家族的 CDC25Hu2 基因表达下调。由此可见,榄香烯有可能是通过激活 JNK/SAPKs 和抑制 CDC25Hu2 基因的表达,阻滞肿瘤细胞进入有丝分裂期。活化的 JNK/SAPKs 能通过翻译后的磷酸化修饰稳定 P21 的活性[11-12],本室利用基因芯片又检测出早反应基因 c-fos 表达下调。因此,榄香烯也可能是在蛋白质水平上通过活化后的 JNK/SAPKs 来稳定 P21 的活性从而抑制 CDK2 的活化,同时在转录水平上通过降低早反应基因 c-fos 的表达来抑制迟反应基因编码的 CDK2 的表达,这就解释了为什么榄香烯可以引起肿瘤细胞停滞在 G1 期以及处于 S 期的细胞被阻滞在 S 期与 G2 期交界处。

本实验利用 RT-PCR 技术、Western blotting 和气相色谱检测技术分别对 JNK/SAPK 信号转导通路、JNK/SAPKs 酶活性及榄香烯在细胞内分布进行了研究,再结合本室基因芯片的检测结果,对 JNK/SAPK 信号转导通路在榄香烯诱导的细胞凋亡及抑制细胞增殖作用中的分子机制和作用机理进行了初步的分析和探讨,为寻找榄香烯抗肿瘤作用的靶点提供了某些新的线索。

[参 考 文 献]

[1]　钱振超, 刘金友, 赵肃荣, 等. 莪术瘤苗的主动免疫保护效

应—莪术抗肿瘤原理的探讨[J]. 药学学报, 1981, 16(12): 892-896.

[2] 钱振超, 王大庆, 金成纲, 等. 瘤苗特异主动免疫治疗及其机制的实验研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1995, 2(2): 120-126.

[3] 金　梅, 施广霞, 钱振超, 榄香烯对肿瘤细胞生物学特性的确影响及其瘤苗免疫效应机制的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1996, 3(3): 219.

[4] Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E. Signaling by dual specificity kinases[J]. Oncogene, 1998, 17(11 Reviews): 1447-55

[5] 袁　静, 顾振纶. 榄香烯诱导人白血病 K562 细胞凋亡及调控 bcl-2 蛋白的表达[J]. 中国药理学报, 1999, 20(2): 103-106.

[6] 周锡建, 于祥生, 王立祥, 等. 榄香烯乳对 Hlmeg 细胞系增殖抑制和诱导凋亡的作用[J]. 中华血液杂志, 1997, 18(5): 263-264.

[7] 高志红, 沈　洁, 郭连英, 等. 热休克处理对人肝癌细胞 HepG2 基因表达谱的影响[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(8): 505-506.

[8] Chang HY, Nishitoh H, Yang X, *et al*. Activation of apoptosis signal-regulating kanase 1(ASK1) by the adapter protein daxx [J]. Science, 1998, 281(5384): 1860-1863.

[9] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, *et al*. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis [J]. Science, 1995, 270 (5240): 1326-1331.

[10] Okayama H, Nagata A, Igarashi M, *et al*. Mammalian G2 regulatory genes and their possible involvement in genetic instability in cancer cells [J]. Princess Takamatsu Symp, 1991, 22: 231-238.

[11] John M, Kyriakis, Joseph Abruch. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. Physiolog Rev, 2001, 81(2): 807-869.

[12] Kim GY, Mercer SE, Ewton DZ, *et al*. The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21 (Cip1) by phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 29792-29802.

[收稿日期] 2005 - 01 - 18　　**[修回日期]** 2005 - 03 - 20

[本文编辑] 韩　丹