

衣霉素诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡

邢俊丽, 冯若, 李海春, 王亚强, 许培仁, 张钦宪

邢俊丽, 王亚强, 许培仁, 河南大学淮河医院检验科 河南省开封市 475000

冯若, 张钦宪, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450052

李海春, 河南中医学院第一附属医院 河南省郑州市 450001
作者贡献分布: 此课题由张钦宪、冯若及邢俊丽设计; 研究过程由邢俊丽、李海春及许培仁操作完成; 数据分析由邢俊丽与王亚强完成; 本论文写作由邢俊丽完成。

通讯作者: 邢俊丽, 475000, 河南省开封市, 河南大学淮河医院检验科. xingjunli1982@126.com

电话: 0378-3906398

收稿日期: 2009-10-10 修回日期: 2010-01-09

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-04-08

Tunicamycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823

Jun-Li Xing, Ruo Feng, Hai-Chun Li, Ya-Qiang Wang, Pei-Ren Xu, Qin-Xian Zhang

Jun-Li Xing, Ya-Qiang Wang, Pei-Ren Xu, Department of Clinical Laboratory, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China

Ruo Feng, Qin-Xian Zhang, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Hai-Chun Li, Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Correspondence to: Jun-Li Xing, Department of Clinical Laboratory, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China. xingjunli1982@126.com

Received: 2009-10-10 Revised: 2010-01-09

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate whether tunicamycin (TM) induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823.

METHODS: BGC-823 cells were treated with 10 mg/L of TM for 0, 24, 36 and 48 h. After treatment, apoptosis was evaluated by using annexin V-propidium iodide staining, and the expression of C/EBP-homologous protein (CHOP) mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: The apoptotic rates of BGC-823 cells treated with TM for 0, 24, 36 and 48 h were 0%,

11.8%, 16.3% and 20.4%, respectively, showing a time-dependent increase ($P < 0.01$). RT-PCR and Western blot results showed that the expression levels of CHOP mRNA and protein were significantly higher in cells treated with TM than in untreated cells. The expression levels of CHOP mRNA and protein increased with the prolongation of treatment duration (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: TM may induce endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823.

Key Words: BGC-823 cell; Tunicamycin; Apoptosis; Endoplasmic reticulum stress; C/EBP-homologous protein

Xing JL, Feng R, Li HC, Wang YQ, Xu PR, Zhang QX. Tunicamycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(10): 1037-1040

摘要

目的: 观察衣霉素(tunicamycin, TM)诱导胃癌BGC-823细胞发生内质网应激介导的细胞凋亡。

方法: 以浓度为10 mg/L的TM分别处理胃癌BGC-823细胞0、24、36和48 h, Annexin V-PI染色法检测细胞凋亡, 应用RT-PCR、Western blot检测CHOP的表达水平。

结果: PI染色法检测凋亡细胞且随时间增加凋亡细胞增多, 细胞凋亡率分别为0.0%、11.8%、16.3%、20.4%, 具有时间依赖性($P < 0.01$)。RT-PCR及Western blot结果显示, CHOP的表达明显高于对照组, 随着处理时间的增加表达量呈上调趋势, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

结论: TM可诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡。

关键词: BGC-823细胞; 衣霉素; 凋亡; 内质网应激; C/EBP同源蛋白

邢俊丽, 冯若, 李海春, 王亚强, 许培仁, 张钦宪. 衣霉素诱导胃

■背景资料

衣霉素(TM)是一种天然的核苷抗生药, 也是N-糖链抑制剂, 可通过抑制蛋白糖基化途径中十四糖二磷酸长萜醇的生成, 使糖链加工受阻, 形成脱糖蛋白, 阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰, 介导细胞凋亡。国内外研究证明了TM在神经系统、胰腺细胞等中可以通过ERS介导细胞凋亡, 但尚未有胃癌细胞中ERS介导细胞凋亡的报道。本实验就TM能否诱导胃癌BGC-823细胞ERS介导的细胞凋亡进行了研究。

■同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

■相关报道

Okamoto等通过对CHOP野生型小鼠和CHOP缺陷型小鼠灌喂乙醇的实验发现, CHOP野生型小鼠的肝细胞发生了凋亡, 一些与凋亡相关基因也出现了变化, 如: Gadd45与组织蛋白酶B的上调和Jun D与Bcl-xL的下调, 而这些在CHOP缺陷型小鼠中并未观察到, 进一步说明了CHOP基因在ERS诱导细胞凋亡中的重要作用, 但其分子机制尚不清楚。

癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1037-1040

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1037.asp>

0 引言

衣霉素(tunicamycin, TM)是一种天然的核苷抗生素, 也是N-糖链抑制剂, 可通过抑制蛋白糖基化途径中十四糖二磷酸长萜醇的生成, 使糖链加工受阻, 形成脱糖蛋白, 阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰, 介导细胞凋亡, 内质网中钙离子紊乱和未折叠蛋白质蓄积可引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS), 引起具有保护作用的未折叠蛋白反应发生^[1]. ERS直接影响应激细胞的转归, 如: 修复、损伤或凋亡. 正常情况下, 凋亡促进因子CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白即C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)表达量极低, 但是在ERS的情况下, 其表达量则显著增加, 所以CHOP是判断ERS的一个金标准^[2]. 国内外研究证明了TM在神经系统、胰腺细胞等中可以通过ERS介导细胞凋亡^[3], 但尚未有胃癌细胞中ERS介导细胞凋亡的报道. 本实验就TM能否诱导胃癌BGC-823细胞ERS介导的细胞凋亡进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 TM, 购于美国Sigma公司, 使用时用无水乙醇配制, 再用培养液配成10 mg/L浓度备用; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒, 购于美国BIPEC; CHOP一抗和HRP标记的二抗购于Santa Cruz公司; CHOP引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 胃癌BGC-823细胞培养及分组: BGC-823细胞(本教研室保存)培养于100 mL/L灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中, 在37℃、50 mL/L CO₂条件下贴壁生长. 取对数期细胞, 分为实验组和对照组. 实验组细胞用10 mg/L的TM分别处理24、36及48 h, 对照组补充等体积的培养液. 分别于相应的时间, 离心收集细胞.

1.2.2 Annexin V-PI染色法检测胃癌的细胞凋亡: 相应时间处理并设立阴性对照组; 对贴壁细胞进行胰酶消化, 1 000 r/min, 离心5 min, 收集脱壁细胞于EP管里; 然后用PBS洗涤细胞2次, 2 000 r/min, 离心5 min并收集 $(1-5) \times 10^5$ 细胞; 加入400 μ L的Binding Buffer悬浮细胞; 然后加入5 μ L Annexin V-FITC混匀后, 再加入5 μ L Propidium

Iodide, 混匀; 室温、避光反应5-15 min; 于1 h内, 进行荧光显微镜的观察、照相(Annexin V-FITC荧光信号呈绿色, PI荧光信号呈红色). 高倍镜随机取5个视野(每个视野不少于50个细胞, 绿色荧光细胞为凋亡细胞), 凋亡率 = 5个视野凋亡细胞数的总和/5个视野细胞总数 $\times 100\%$.

1.2.3 RT-PCR方法检测TM诱导前后胃癌BGC823细胞CHOP表达水平的变化: 提取总的RNA, 参照GenBank中CHOP序列引物设计, 序列如下, 上游: 5'-AGGTCCTGTCTTCAGATGA A-3', 下游: 5'-GTCAATCAGAGCTCGGCGAG TC-3', 扩增产物长度为404 bp. 以 β -actin为内参照, 引物序列为: 5'-TCCTGTGGCATCCACGA AACT-3; 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'. PCR扩增反应条件为: 94℃预变性3 min, 共30个循环: 94℃变性30 s, 54.8℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 最后72℃总延伸5 min, 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.2.4 Western blot法检测胃癌细胞中CHOP蛋白的表达: 低温离心收集蛋白, SDS-PAGE电泳、转膜等步骤参照文献[4]进行, 检测按北京中山金桥生物技术有限公司的ECL发光试剂说明书进行.

统计学处理 实验数据采用SPSS13.0统计软件进行统计处理.

2 结果

2.1 Annexin V-PI染色检测胃癌细胞凋亡 对照组和实验组的细胞凋亡率分别是0.0%、11.8%、16.3%、20.4%, 结果显示对照组凋亡率明显低于实验组(图1), 随着处理时间增加实验组凋亡率逐渐增加, 差异具有统计学意义($P < 0.01$).

2.2 CHOP mRNA在胃癌BGC823细胞中的表达 RT-PCR法扩增出CHOP基因片段约404 bp, 对照组未见相应的条带(图2). 用SPSS13.0统计软件分别对对照组和实验组的条带进行灰度扫描, CHOP/ β -actin灰度比值结果分别是 0.32 ± 0.04 、 0.51 ± 0.03 、 0.63 ± 0.03 , 方差分析结果显示不同TM作用时间存在显著性差异($P < 0.05$), 有统计学意义.

2.3 胃癌细胞CHOP蛋白的表达 Western blot结果显示, 对照组细胞中出现相对分子质量约2.7 kDa的条带, 对照组未出现(图3). 用SPSS13.0统计软件分别对对照组和实验组的条带进行灰度扫描, CHOP/ β -actin灰度比值结果分别是 0.32 ± 0.02 、 0.59 ± 0.04 、 0.68 ± 0.03 , 方差分析结果

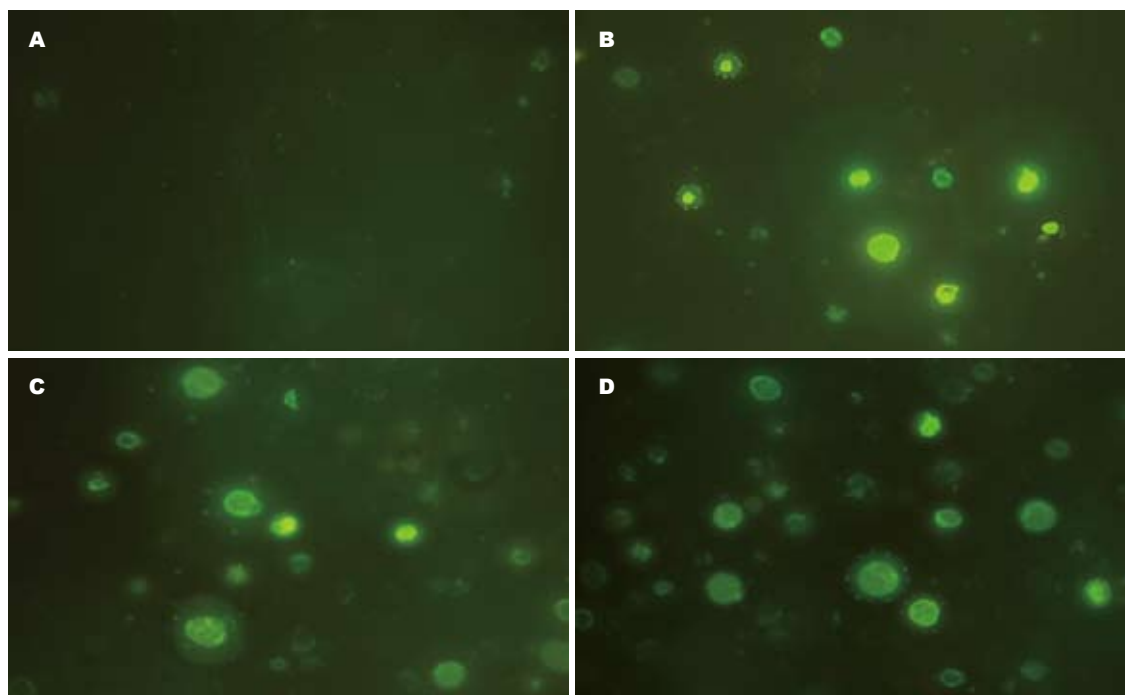


图 1 Annexin V-PI染色检测胃癌细胞凋亡. A: 0 h; B: 24 h; C: 36 h; D: 48 h.

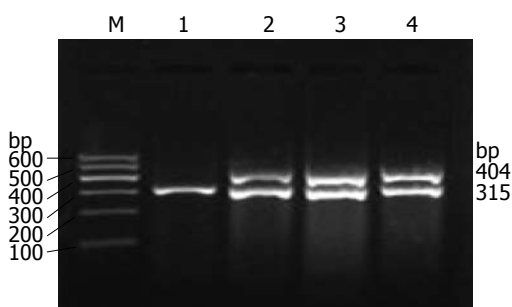


图 2 RT-PCR法检测胃癌细胞CHOP的表达. M: DNA Marker; 1: 对照组; 2: 24 h; 3: 36 h; 4: 48 h.

显示不同TM作用时间存在显著性差异($P < 0.05$), 有统计学意义.

3 讨论

ERS是细胞的一种应激反应过程, 糖饥饿、钙平衡紊乱、糖基化抑制或二硫键合成减少等情况下, 内质网的微环境发生改变, 蛋白质的折叠受到影响, 导致大量未折叠或错误折叠的蛋白质堆积于内质网内, 从而引起一系列以分子伴侣和折叠酶表达上调为标志的应答反应, 也称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR). CHOP/GADD153(growth arrest and DNA-damage-inducible gene 153或生长停滞和DNA损伤可诱导基因)是内质网应激特异的转录因子^[5], 属C/EBP转录因子家族成员, 在非应激状态下, 他的表达水平很低, 而当发生ERS时, 其表达量大大增加.

■创新盘点

本研究首次将TM应用于胃癌, 并观察其在胃癌细胞凋亡中的作用.

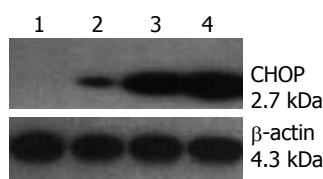


图 3 Western blot法检测胃癌细胞中CHOP蛋白的表达. 1: 对照组; 2: 24 h; 3: 36 h; 4: 48 h.

凋亡促进因子CHOP是ERS时表达增多的一种伴侣分子, 被看做是ERS发生的标志, 在ERS中起着非常重要的作用. CHOP促进细胞凋亡, 因此通过药物干预后研究他们的表达情况可以进一步了解药物对ERS的作用^[6]. Okamoto等^[7]通过对CHOP野生型小鼠和CHOP缺陷型小鼠灌喂乙醇的实验发现, CHOP野生型小鼠的肝细胞发生了凋亡, 一些与凋亡相关基因也出现了变化, 如: Gadd45与组织蛋白酶B的上调和Jun D与Bcl-xL的下调, 而这些在CHOP缺陷型小鼠中并未观察到, 进一步说明了CHOP基因在ERS诱导细胞凋亡中的重要作用, 但其分子机制尚不清楚.

本实验结果发现CHOP参与细胞凋亡, 以浓度为10 mg/L的TM处理胃癌细胞, Annexin V-PI染色法检测结果显示细胞出现凋亡, 且随着作用时间的增加凋亡细胞增多, 呈明显的时间依赖性, 与Okamoto等^[8]和Pérez-Sala等^[9]报道相似. 在本研究中, TM处理24 h后, 部分胃癌细胞变圆形或椭圆形, 继而脱壁, 提示细胞黏附性丧失, 细胞发生凋亡. 实验中除了对照组无凋亡外, 对照组随着处理时间增加, 细胞凋亡率呈增加趋

■同行评价

本文有一定参考价值,内容较新,提供了较可靠的信息,但研究方法一般。

势。随后用TM处理不同时间收集细胞,应用RT-PCR与Western blot技术检测CHOP的表达结果显示, TM处理组出现ERS标志物CHOP的mRNA和蛋白的表达。综合实验结果可以推断TM可以诱导胃癌细胞ERS介导的细胞凋亡。

本研究首次将TM应用于胃癌,并观察其在胃癌细胞凋亡中的作用。结果显示, TM诱导胃癌细胞ERS介导的细胞凋亡,这初步解释了TM与ERS介导的细胞凋亡之间的密切关系,为胃癌的临床防治提供了一条新的途径。

4 参考文献

- 1 战丽彬, 钟军华, 路小光, 隋华, 韦巍. 滋补脾阴方药含药血清对内质网应激神经元损伤的保护作用及机制研究. 中西医结合学报 2007; 5: 445-450
- 2 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展. 中国生物化学与分子生物学报 2004; 20: 283-288
- 3 孙抒, 孙百研, 智慧兰, 许向范, 孙东植. 胃癌及其癌前

病变中细胞凋亡及其调控基因的表达. 中国病理生理杂志 2002; 18: 395-397

- 4 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 226-234
- 5 Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000; 5: 897-904
- 6 Ma YJ, Hendershot LM. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 13792-13799
- 7 Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-389
- 8 Okamoto T, Tsuburaya A, Yanoma S, Yoshikawa T, Cho H, Takanashi Y, Noguchi Y. Inhibition of peritoneal metastasis in an animal gastric cancer model by interferon-gamma and interleukin-2. *Anticancer Res* 2003; 23: 149-153
- 9 Pérez-Sala D, Mollinedo F. Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J Cell Physiol* 1995; 163: 523-531

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第3套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。