

ABT-737 诱导秀丽线虫生殖腺细胞凋亡及机制研究

齐晓静^{1,2} 陈 斌^{1,2} 赵国平¹

摘要 目的 探讨 ABT-737 在秀丽线虫活体水平对生殖腺细胞凋亡的作用及机制研究。方法 荧光染料法检测不同浓度处理下野生型秀丽线虫生殖腺细胞凋亡的变化,同时利用检测活性氧自由基(ROS)的荧光线虫品系和多种基因突变线虫品系明确 ABT-737 在活体水平诱导凋亡的机制。结果 在浓度为 0、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABT-737 处理后,野生型秀丽线虫凋亡细胞数目从(2.31 \pm 0.06) 个增加至(4.02 \pm 0.09)、(4.40 \pm 0.08) 个。然而,在有丝分裂原活化蛋白激酶通路(MAPK/JNK 通路, *mek-1/jnk-1*) 以及 DNA 损伤应答途径(*egl-1*、*hus-1*、*cep-1*) 基因突变品系中凋亡未有变化。此外,ABT-737 导致 SOD3 荧光品系秀丽线虫的荧光强度增加,即线虫 ROS 水平上升。结论 ABT-737 在活体动物水平以剂量依赖的方式诱导秀丽线虫生殖腺细胞凋亡;氧化应激、DNA 损伤应答通路及 MAPK/JNK 信号通路参与凋亡过程的发生。

关键词 ABT-737; 秀丽线虫; 生殖腺细胞凋亡; 机制

中图分类号 R96

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1194-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.009

ABT-737 是美国 Idun 实验室和 Abbott 实验室研发的一种与 Bcl-2 同源结构域 3(Bcl-2 homology 3, BH3) 结构类似的模拟物,抑制 B 细胞淋巴瘤 2 基因(B-cell lymphoma gene 2, Bcl-2) 家族抗凋亡蛋白 Bcl-xL、Bcl-2 和 Bcl-w 的活性。已有实验数据表明 ABT-737 是有效的凋亡诱导剂^[1]。但是,针对 ABT-737 的研究主要集中在体外培养的细胞,这具有生理受限的缺点。目前,仍然不清楚 ABT-737 在活体动物细胞触发的凋亡中所涉及的关键途径。秀丽线虫作为模式动物,是许多人类疾病和药物研究的有用模式动物。秀丽线虫生殖腺细胞凋亡是正常卵子发生期间或在细胞质胁迫下发生在性腺环路区域的

重要生物学事件,其中的调控因子从线虫至人进化保守。根据先前研究报道,秀丽线虫的生殖腺细胞对外部刺激因子极为敏感,是一种有价值的研究体内凋亡信号通路的生物学模型^[2-3]。该实验利用秀丽线虫作为多细胞真核活体动物模型,深入研究 ABT-737 对秀丽线虫生殖腺细胞凋亡的影响及其作用机制,为今后对 ABT-737 和秀丽线虫的研究提供进一步实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用线虫品系均购自美国秀丽线虫遗传中心。实验中涉及到的线虫品系如下:野生型秀丽线虫: N2 Bristol。凋亡基因 *egl-1* 突变品系: MT1082: *egl-1* (*n487*)。DNA 损伤检验点突变品系: WS2277: *hus-1* (*op241*)。p53 同源蛋白 *cep-1* 突变品系: VC172: *cep-1* (*gk138*)。活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 水平检测品系: CF1553: *muls84* [(pAD76) *sod-3p::GFP + rol-6* (*su1006*)]。MAPK/JNK 通路突变品系: VC8: *jnk-1* (*gk7*)、FK171: *mek-1* (*ks54*); *sek-1* (*qd127*)。

1.2 主要实验试剂 ABT-737 购自美国 Med Chem Express 公司。吖啶橙(acridine orange, AO)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、琼脂粉、蛋白胨、胆固醇均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。叠氮化钠(NaN_3) 购买自北京索莱宝科技有限公司。氯化钠、氯化钙、硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、氢氧化钠等均购自上海国药集团化学试剂有限公司。

NGM 固体培养基: 取 17 g 琼脂粉、2.5 g 蛋白胨、3 g 氯化钠溶于 975 ml 超纯水中,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌,冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$,在无菌环境中,加入 1 ml 经过灭菌的 1 mol/L 氯化钙、1 mol/L 硫酸镁、5 g/L 胆固醇(乙醇为溶剂)以及 25 ml 的 1 mol/L 磷酸钾缓冲液(3.56 g 磷酸氢二钾和 10.83 g 磷酸二氢钾溶于 100 ml 超纯水中,高温灭菌后使用),混匀后倒入培养皿中,待其冷却凝固后,上铺一层经 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 14 h 左右的 OP50 菌液,将 NGM 板烘干即可使用。

2020-01-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31870845)

作者单位: ¹ 中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所,合肥 230031

² 中国科学技术大学,合肥 230026

作者简介: 齐晓静,女,硕士研究生;

赵国平,男,研究员,博士生导师,责任作者, E-mail: gpz@ipp.ac.cn

M9 缓冲液: 取 3.0 g 磷酸二氢钾、6.0 g 磷酸氢二钠、5.0 g 氯化钠溶于 1 L 超纯水中, 121 °C 高压灭菌, 灭菌后加入 1 ml 无菌的 1 mol/L 硫酸镁, 混匀分装。

1.3 线虫培养及同步化 所有线虫在 20 °C 恒温避光培养, 以尿嘧啶缺陷型大肠杆菌 OP50 为食物, 培养基为 NGM 固体培养基或 M9 液体培养基。同步化处理: 将处于产卵期的成虫用 M9 缓冲液冲洗至离心管中, 将 M9 线虫缓冲液、次氯酸钠溶液和 5 mol/L 的氢氧化钠溶液以 7 : 2 : 1 的体积比混合均匀, 待虫体裂解后, 离心去上清, 反复冲洗沉淀后, 将所得受精卵均匀分散至 3 ml 的 M9 缓冲液中, 20 °C 避光培养 (≥18 h) 即可得到 L1 期的幼虫。将上述所得幼虫接种到平铺 OP50 的 NGM 板上培养, 就可得到同步化生长的线虫。

1.4 ABT-737 处理液配置 ABT-737 用 DMSO 溶解配制成浓度为 50 mmol/L 的储存液, 取部分储存液稀释成 5、10、20 mmol/L 的处理液, -20 °C 保存待用。实验时用 M9 缓冲液稀释至实验所需要的浓度 5、10、20 μmol/L。DMSO 在总体积中含量为 1%。

1.5 生殖腺细胞凋亡检测 将同步化的秀丽线虫培养至 L4 期后, 将线虫在 Control 组 (1% 的 DMSO) 和实验组 (不同浓度的 ABT-737 处理) 条件下液体培养 24 h, 从 24 孔板中收集线虫, 以 20 mg/L 的吖啶橙 20 °C 避光染色 1 h。染色结束后, 将线虫转移至新的含有 OP50 的 NGM 板上恢复 45 min, 使肠道内及表皮上的吖啶橙清除干净。之后, 用 NaN₃ 麻醉线虫并通过 Leica 正置荧光显微镜 (DM4B) 观察凋亡细胞, 凋亡细胞呈致密的亮黄色。

1.6 活性氧水平检测 CF1553 线虫是超氧化物歧化酶 3 (SOD3) 的绿色荧光品系, 超氧化物歧化酶 (SOD) 是线虫体内清除 ROS 的首要物质, 线虫体内 SOD 水平的高低与 ROS 水平直接相关, SOD3 是其中表达变化最明显的, 因此利用荧光品系 CF1553 线虫进行 ROS 水平的检测^[4]。同步化处理后培养至 L4 期的 CF1553 线虫经 ABT-737 处理 24 h 后, 挑取线虫至载玻片上, 并用 NaN₃ 麻醉线虫。使用 Leica 正置荧光显微镜的常规绿色荧光观察, 在同一设置条件下对线虫进行图像摄取, 摄取的图像用软件 ImageJ 测量每条线虫的相对荧光, 统计线虫的平均相对荧光。

1.7 统计学处理 实验数据采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析。所有数据均由 3 个独立实

验的 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间使用 Student *t* 检验进行分析, 多组间使用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。秀丽线虫正常卵子发生期间生殖腺凋亡细胞数为 2~3 个, 即 Control 组凋亡细胞数为 2~3 个。

2 结果

2.1 ABT-737 诱导线虫生殖腺细胞凋亡 将同步化的 N2 野生型线虫培养至 L4 期, 暴露于含 0、5、10、20 μmol/L 的 ABT-737 液体环境中 24 h 后, 探究 ABT-737 对秀丽线虫生殖腺细胞凋亡的影响。在浓度为 10、20 μmol/L 的 ABT737 处理 N2 线虫后, 野生型线虫 N2 的凋亡细胞数目从 (2.31 ± 0.06) 个增加至 (4.02 ± 0.09)、(4.40 ± 0.08) 个, 见图 1A。与 Control 组比较, ABT-737 处理线虫后凋亡细胞数目增加 ($P < 0.05$), 表明 ABT-737 以剂量依赖的方式诱导秀丽线虫生殖腺细胞凋亡。

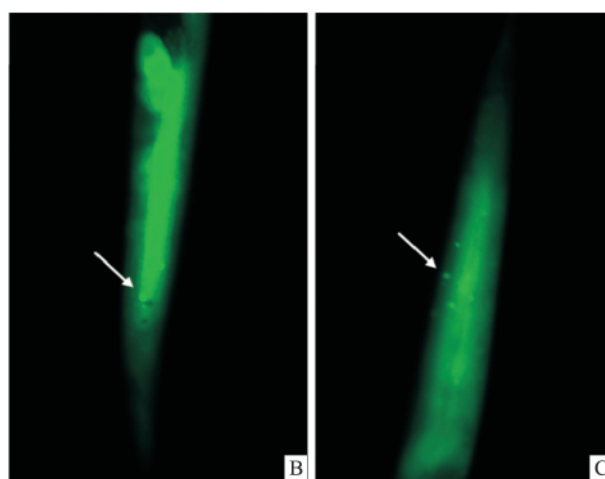
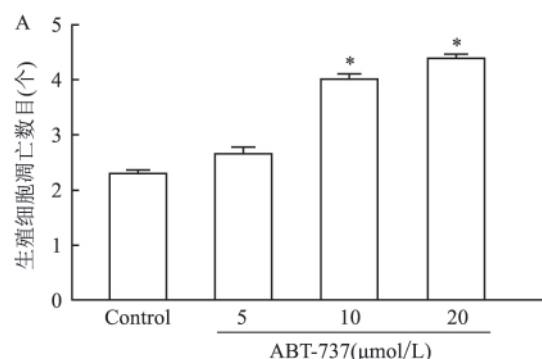


图1 ABT-737 诱导线虫生殖腺细胞凋亡

A: 0、5、10、20 μmol/L ABT-737 处理后线虫的凋亡细胞数, 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; B: 荧光显微镜下拍摄的 Control 组线虫 × 20; C: 荧光显微镜下拍摄的 20 μmol/L 组线虫 × 20; 白色箭头指示凋亡细胞

2.2 ABT-737 通过调控 ROS 来诱导生殖腺细胞

凋亡 本实验利用 SOD3 的荧光强度来检测 ROS 的产生,探讨 ROS 在 ABT-737 诱导的生殖腺细胞凋亡中的作用。对荧光品系 CF1553 线虫进行 20 μmol/L ABT-737 药物处理 24 h,将 Control 组相对荧光强度设为 1,与 Control 组比较 20 μmol/L ABT-737 处理线虫后 CF1553 线虫的荧光强度增加,相对荧光强度上升至 Control 组的(1.30 ± 0.02)倍($P = 0.0016$) ,即说明 ROS 水平上升。见图 2。

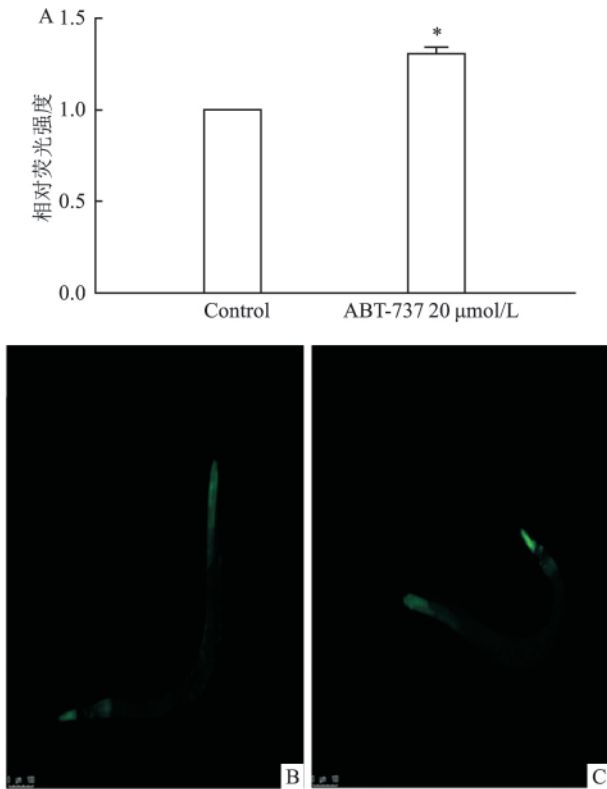


图 2 ABT-737 通过调控 ROS 来诱导生殖腺细胞凋亡

A: 0、20 μmol/L ABT-737 处理后线虫的相对荧光强度,与 Control 组比较: * $P < 0.05$; B: 荧光显微镜下拍摄的 Control 组线虫 × 10; C: 荧光显微镜下拍摄的 20 μmol/L 组线虫 × 10; 绿色荧光为标记的 SOD3 蛋白

2.3 ABT-737 通过 JNK 通路调控生殖腺细胞凋亡

本实验利用 *mek-1*、*jnk-1* (JNK 通路中的作用因子) 这 2 种缺陷型线虫品系验证 JNK 通路是否参与细胞凋亡。20 μmol/L ABT-737 处理 24 h 后 *mek-1* 和 *jnk-1* 这 2 种缺陷型品系线虫的凋亡细胞数未有增加,见图 3。结果表明, JNK 通路参与调控 ABT-737 诱导的生殖腺细胞凋亡。

2.4 DNA 损伤应答途径参与 ABT-737 诱导生殖腺细胞凋亡 为了检查 DNA 损伤应答途径与 ABT-737 诱导的细胞凋亡的关系,将 L4 期的 *hus-1*、*cep-1*、*egl-1* 缺陷型线虫品系暴露于 20 μmol/L ABT-737

中 24 h。与 Control 组比较 20 μmol/L ABT-737 处理未能引起这 3 种线虫品系的生殖腺细胞凋亡的增加,见图 4。这些数据表明,这些 DNA 损伤应答基因对 ABT-737 诱导的生殖细胞凋亡是不可缺少的, DNA 损伤应答途径参与 ABT-737 诱导的生殖细胞凋亡。

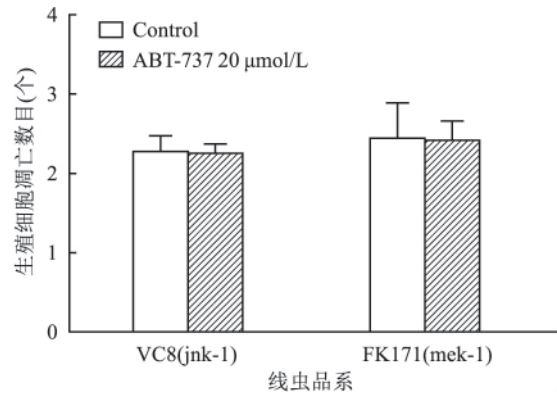


图 3 ABT-737 通过 JNK 通路调控生殖腺细胞凋亡

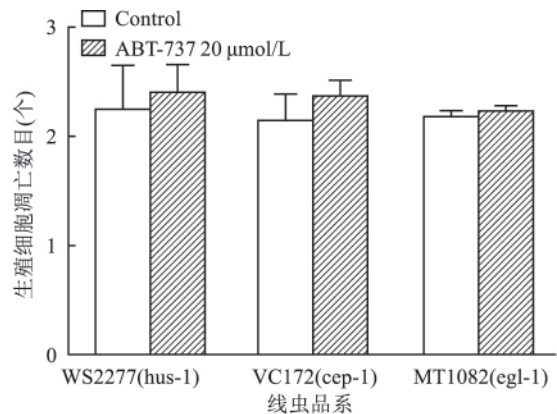


图 4 DNA 损伤应答途径参与 ABT-737 诱导生殖腺细胞凋亡

3 讨论

ABT-737 作为一种 BH3 结构类似的模拟物,是 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w 的一种强有力的抑制剂,ABT-737 对许多肿瘤细胞的生存至关重要,能够诱导体外培养的肿瘤细胞凋亡。但是,越来越多的证据表明^[5-6],在体外细胞培养系统中研究潜在的候选药物的生物学效应具有生理机制的局限性,比如无法模拟体内环境对药物生物学效应的影响。为了克服体外细胞培养研究的缺点,且由于秀丽线虫的基因组与人的基因组有 40% ~ 60% 的相似性,本研究以秀丽线虫作为多细胞真核生物模型,探究 ABT-737 在活体生物上对线虫内源性生殖腺细胞凋亡的影响及其作用机制。

在先前细胞研究中, ABT-737 通过与 Bcl-2 的结合从而降低正常状态的 Bcl-2/Bax 异质二聚体, 激活 Bax 活性, 从而改变线粒体膜通透性, 激活细胞内源性凋亡通路, 并且 ABT-737 还会诱导产生 ROS, 并激活 JNK 通路, 进而诱导肿瘤细胞凋亡^[7-8]。在本研究中, ABT-737 与在细胞中的作用相同, 可以诱导线虫生殖腺细胞凋亡, 且产生 ROS。ROS 水平上升触发的主要信号传导途径是 DNA 损伤反应途径^[9]。在秀丽线虫中, *hus-1* 是 DNA 损伤诱导细胞凋亡所必需的检查点基因, DNA 损伤反应被认为是秀丽线虫生殖腺细胞中应激诱导的细胞凋亡的重要触发因素。作为抑癌蛋白 p53 的同源物, *cep-1* 对秀丽线虫中 DNA 损伤剂诱导的凋亡也至关重要。*hus-1* 将 DNA 损伤应答信号传输到 *cep-1*, *cep-1* 随后通过促进靶基因 *egl-1* 的转录来促进凋亡信号^[10-13]。本研究的结果验证了这一通路中的 3 种作用因子在 ABT-737 诱导的线虫生殖腺细胞凋亡中起作用。在秀丽线虫和哺乳动物中, JNK 通路具有保守性, *mek-1* 和 *jnk-1* 这 2 个基因是 JNK 通路中的作用因子, 在激活 JNK 通路中起重要作用。其中 *mek-1* 与人 MAP2K7 基因同源, *jnk-1* 与人 MAPK10 基因同源, 在 *mek-1* 和 *jnk-1* 缺陷型线虫中发现这 2 种基因参与 ABT-737 诱导的线虫生殖腺细胞凋亡。以上这些结果初步说明, ABT-737 能使秀丽线虫产生大量 ROS, 激活氧化应激反应进而会触发 JNK/MAPK 通路和 DNA 损伤应答途径, 诱导最终凋亡的发生。

本研究证实 ABT-737 在秀丽线虫活体水平上诱导生殖腺细胞凋亡发生。研究结果对活体动物内源性细胞中 ABT-737 触发的信号传导途径有了新的认识, 为今后对 ABT-737 和秀丽线虫的研究提供了进一步的实验数据。

参考文献

[1] Timucin A C, Basaga H, Kutuk O. Selective targeting of anti-

- apoptotic BCL-2 proteins in cancer[J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(1): 146-75.
- [2] Du H, Wang M, Dai H, et al. Endosulfan isomers and sulfate metabolite induced reproductive toxicity in *Caenorhabditis elegans* involves genotoxic response genes [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(4): 2460-8.
- [3] Guo X, Li Q, Shi J, et al. Perfluorooctane sulfonate exposure causes gonadal developmental toxicity in *Caenorhabditis elegans* through ROS-induced DNA damage [J]. *Chemosphere*, 2016, 155: 115-26.
- [4] Doonan R, Mc Elwee J J, Matthijssens F, et al. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(23): 3236-41.
- [5] Ghanemi A. Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations [J]. *Saudi Pharm J*, 2015, 23(4): 453-4.
- [6] Gillet J P, Varma S, Gottesman M M. The clinical relevance of cancer cell lines [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(7): 452-8.
- [7] Ni Z, Wang B, Dai X, et al. HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 70: 194-203.
- [8] Choo Z, Loh A H P, Chen Z X. Destined to die: apoptosis and pediatric cancers [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): E1623.
- [9] Jena N R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair [J]. *J Biosci*, 2012, 37(3): 503-17.
- [10] Craig A L, Moser S C, Bailly A P, et al. Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabditis elegans* germ line [J]. *Methods Cell Biol*, 2012, 107: 321-52.
- [11] O'Neil N, Rose A. DNA repair [J]. *Worm Book*, 2006, 13: 1-12.
- [12] Derry W B, Bierings R, Van Iersel M, et al. Regulation of developmental rate and germ cell proliferation in *Caenorhabditis elegans* by the p53 gene network [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4): 662-70.
- [13] Chen B, Cao X, Lu H, et al. N-(3-oxo-acyl) homoserine lactone induced germ cell apoptosis and suppressed the over-activated RAS/MAPK tumorigenesis via mitochondrial-dependent ROS in *C. elegans* [J]. *Apoptosis*, 2018, 23(11/12): 626-40.

The mechanism of ABT-737-induced apoptosis of gonadal cells in *Caenorhabditis elegans*

Qi Xiaojing^{1,2}, Chen Bin^{1,2}, Zhao Guoping¹

(¹Institute of Technical Biology and Agriculture Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031; ²University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of ABT-737-mediated apoptosis in *Caenorhabditis*

PHF5A 通过 NF- κ B 通路影响胃癌细胞 MGC803 的增殖和迁移

曹一凡 张如通 苟雅雯 陈乐乐 陈思 张开光

摘要 目的 观察 PHD 锌指结构域蛋白 5A (PHF5A) 基因在胃癌细胞和胃正常细胞中的表达情况, 阐明敲低 PHF5A 基因可能通过影响 NF- κ B 通路抑制胃癌细胞的增殖、克隆形成和迁移。方法 使用 Western blot 和 qPCR 法检测 PHF5A 在胃正常上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞系 MGC803、MKN45、AGS 中的表达情况。设置转染 PLKO.1 空载质粒的 MGC803 细胞为阴性对照, 转染 PLKO.1-ShPHF5A-Sh1 和 PLKO.1-ShPHF5A-Sh2 质粒的作为实验组, 使用两组不同序列在 MGC803 中抑制 PHF5A 的表达。采用克隆形成、细胞增殖计数检测细胞增殖情况, 采用划痕实验检测细胞体外迁移能力变化。用 Western blot 检测阴性对照组和实验组中 NF- κ B P65 (核内)、p-I κ B α 、I κ B α 、Cyclin D1 蛋白表达情况。结果 Western blot 和 qPCR 结果显示胃癌细胞系 MGC803、AGS、MKN45 中 PHF5A 的表达量高于胃正常细胞系 GES-1, 差异有统计学意义。在 MGC803 细胞中抑制 PHF5A 的表达后, PHF5A 蛋白的表达水平降低。与对照组比较, 细胞的增殖和迁移都受到了抑制。同时, 实验组细胞 NF- κ B P65 核内表达降低, I κ B α 磷酸化水平下降, Cyclin D1 表达水平下降 ($P < 0.05$)。结论 PHF5A 在胃癌肿瘤细胞中的表达显示高于正常细胞, 可能通过 NF- κ B 信号通路来影响胃癌细胞 MGC803 的增殖和迁移。

关键词 胃癌; PHF5A; NF- κ B 信号通路; MGC803

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1198-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.010

胃癌是消化系统常见的肿瘤之一, 胃癌的发病率和死亡率均位于我国恶性肿瘤的前五位^[1]。尽管胃癌的诊断和治疗在近年取得较多进展, 但是治疗和诊断的形势依然严峻, 其中主要原因之一就是其发病的分子机制较为复杂, 尚不明确, 这也是目前胃癌研究的热点之一。

PHF5A (plant homodomain finger-like domain-containing protein 5A) 是一种在真核生物中高度保守的蛋白。对于真核细胞, 选择性剪接和肿瘤的发生可能有一定的关系^[2]。早先的研究报道, PHF5A 可与剪接小体中的 U2 snRNP 复合物及依赖 ATP 的解旋酶超家族相互作用, 可能作为不同基因的通用转录调控因子发挥作用^[3-4]。近些年的研究显示 PHF5A 蛋白参与多种肿瘤的发生和发展, 对肿瘤细胞干性、细胞周期调控、代谢、信号转导等生物学过程均有影响^[5-9], 但其表达异常与胃腺癌之间的关系尚无相关研究。该文旨在探究 PHF5A 在胃癌的表达情况及其对胃癌细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 胃癌细胞系 MGC803、MKN45 购自

2020-04-27 接收

基金项目: 安徽省科技计划项目(编号: 1604a0802075)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

作者简介: 曹一凡, 女, 硕士研究生;

张开光, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangkaiguang0097@163.com

elegans (*C. elegans*) of living animals. **Methods** Fluorescent dye method was used to detect the apoptosis of germ cell in wild-type *C. elegans* under different concentrations of treatment. Meanwhile, reactive oxygen species (ROS) fluorescent strain together with different gene mutant strains of *C. elegans* were used to elucidate the mechanism of ABT-737-induced apoptosis. **Results** After treated with ABT-737 at concentrations of 0, 10, and 20 μ mol/L, the number of apoptotic cells in wild-type *C. elegans* increased from 2.31 ± 0.06 to 4.02 ± 0.09 and 4.40 ± 0.08 . However, there was no change of apoptosis in *C. elegans* lacking the expression of the mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK/JNK pathway *mek-1/jnk-1*) and DNA damage response pathway (*egl-1/hus-1/cep-1*) genes. In addition, ABT-737 increased the fluorescence intensity in the SOD3 fluorescent strain, indicating the ROS level was increased in *C. elegans*. **Conclusion** ABT-737 induces apoptosis of *C. elegans* germ cells in a dose-dependent manner at the level of live animals. Oxidative stress, DNA damage response pathway and MAPK/JNK signaling pathway are involved in ABT737-induced apoptotic signaling.

Key words ABT-737; *C. elegans*; germ cell apoptosis; mechanism