

PKC-ERK 通路在热损伤诱导单核细胞凋亡中的作用

张璐 张琳^{1*} 姜勇 刘怒云² 赵克森

(南方医科大学病理生理学教研室, 广东省功能蛋白质组学重点实验室, 重大疾病的转录组与蛋白质组学教育部重点实验室, 广州 510515; ¹南方医科大学组织学与胚胎学教研室, 广州 510515; ²南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

摘要 应用流式细胞检测术、Western 印迹、激酶活性测定等技术, 检测 PKC 与 ERK 在热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 细胞凋亡中的作用。结果显示热损伤导致 PKC 短暂激活, PKC 激活剂佛波脂(PMA)与热损伤联合作用导致 PKC 持续活化; 并且 PKC 的持续激活抑制热损伤诱导的 Raw264.7 细胞凋亡, 而 PKC 的抑制可促进细胞凋亡; ERK 活性检测显示热损伤抑制 ERK 磷酸化, 而 PMA 激活 ERK 磷酸化活化, 并且这种激活作用通过 PKC; 进一步细胞凋亡检测显示 ERK 抑制剂 PD098059 可解除 PMA 对热损伤诱导 Raw264.7 细胞凋亡的抑制作用, 从而提示 PKC 通过 ERK 负调控热损伤诱导的 Raw264.7 细胞凋亡。

关键词 热损伤; PKC; 细胞凋亡; ERK

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一组丝/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞的信息传递中起重要作用, 被激活后可以产生较为广泛的生物学效应, 如诱导细胞增殖分化, 活化核转录因子和细胞表面受体, 促进肿瘤形成等^[1,2]。同时, 研究表明 PKC 亦参与对细胞凋亡的调控^[3,4]。促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK) 包括细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 及 ERK5, 是信号从细胞表面转导到细胞核内部的重要传递者^[5-7]。ERK 通路可以通过多条途径被激活, 包括受体酪氨酸激酶、Ca²⁺ 及 PKC。该通路在细胞的生长、增殖与分化中起重要的调控作用。另外 ERK 通路亦参与对细胞凋亡的调控, 它与 MAPK 的其他两个亚族 p38 与 JNK 协同调控细胞凋亡^[8]。业已证明, 在外界应激刺激, 如热损伤、UV、高渗、炎性因子等作用下, MAPK 通路被磷酸化活化。

热损伤作为一项外界应激刺激, 其对组织细胞产生的生物学效应已有广泛的研究, 并主要集中于以下几方面: 细胞在不同热损伤温度下的生长繁殖功能的完整性; 细胞生长对其生长条件的依赖性; 细胞在热损伤下亚细胞结构的改变。其中热损伤诱导细胞凋亡的研究引人注目。我们先前的研究表明热损伤可以诱导单核细胞株 Raw264.7 细胞凋亡, 并且 p38 通路在其中起正调控作用^[9]。为进一步探讨热损伤诱导细胞凋亡的信号转导机制, 本研究拟观察 PKC-ERK 通路在热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 凋亡中

的作用。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

PKC 激活剂佛波脂(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、碘化丙锭(PI)购自 Sigma 公司; RNA 酶为 Promega 公司产品; PKC 活性检测试剂盒、硝酸纤维素膜为 Gibco BRL 公司产品; ERK 磷酸化活性检测试剂盒为 Cell Signaling 公司产品。

1.2 细胞培养与热损伤反应

单核细胞株 Raw264.7 由美国 Scripps 研究所惠赠。将 1×10^6 个细胞接种在含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养。实验分组: 第一组为单纯热损伤组, 将细胞置于温度为 43 °C 的水浴中温育 30 min, 然后置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度条件下继续培养; 第二组为热损伤 + PMA 组, 预先加入 100 μmol/L PMA, 温育 3 h, 然后进行热损伤; 第三组热损伤 + 星形孢菌素(PKC 抑制剂), 加入星形孢菌素预温育 30 min 后进行热损伤; 第四组热损伤 + 星形孢菌素 + PMA 组, 加入星形孢菌素预温育 30 min, 然后加入 100 μmol/L PMA 温育 3 h 并进行热损伤反应; 第五组为 PD09859 (ERK 抑制剂)组, 预先加入 20 μmol/L PD09859, 温育 30 min, 然后进行热损伤; 第六组为 PD09859 + PMA

收稿日期: 2006-11-17 接受日期: 2007-03-12

国家自然科学基金(No.30100031, No.30672565), 广东省自然科学基金(No.40204411, No.06024380)资助项目

* 通讯作者。Tel: 020-61648205, E-mail: zllzyh@126.com

组, 预先加入 20 $\mu\text{mol/L}$ PD09859, 温育 30 min, 然后加入 100 $\mu\text{mol/L}$ PMA, 温育 3 h 并进行热损伤反应; 第七组为对照(control)组别, 即不加任何刺激的细胞。于不同时间点收集细胞。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集上述不同组别热损伤后 12 h 的细胞, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 70% 乙醇固定 24 h 以上, 50 mg/ml RNA 酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h, 100 mg/ml PI 染色 1 h, 流式细胞仪进行细胞周期分析, 低于 G_1 期 DNA 含量出现二倍体峰的细胞为凋亡细胞。

1.4 细胞总蛋白样品的制备

收集热损伤后不同时间的细胞, PBS 漂洗, 加入细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 0.5% Triton X-100, 25 $\mu\text{g/ml}$ 抑蛋白酶肽), 冰浴 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集细胞上清液。用蛋白质分析试剂盒对蛋白质浓度进行定量(Bio-Rad 公司)。

1.5 PKC 磷酸化活性检测

按 PKC 活性测定试剂盒(Gibco BRL 公司产品)操作说明书进行, 测定底物 Ac-MBP 的磷酸化程度。在 40 ml 的反应体积中含有 50 $\mu\text{mol/L}$ Ac-MBP, 20 mmol/L ATP, 1 mmol/L MgCl_2 , 4 mmol/L Tris (pH 7.5), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3 000 Ci/mmol/L), 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 取 25 μl 点于 Whatman 膜, 依次用 1% H_3PO_4 , H_2O 漂洗, 置于液闪瓶, 测定仪记数 ^{32}P 掺入活性。

1.6 ERK 活性分析

按照试剂盒说明进行。取 200 μl 细胞裂解液上清液, 加入 15 μl (1:100) p44/p42(ERK1/ERK2)单克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育 24 h, 分别用 500 μl 细胞裂解液与激酶反应缓冲液清洗 2 次。将免疫沉淀物重悬于 50 μl 激酶反应缓冲液, 其中含 200 $\mu\text{mol/L}$ ATP, 2 μg Elk-1 融合蛋白(ERK 底物), 30 $^{\circ}\text{C}$, 温育 30 min。取 30 μl 样品进行 10%SDS-PAGE。用磷酸化 Elk-1 抗体及化学荧光检测系统测定 Elk-1 的磷酸化程度。

2 结果

2.1 热损伤和 PMA 作用下 PKC 磷酸化活性的变化

本研究应用 Ac-MBP 作为 PKC 的特异性底物, 检测热损伤前后 Raw264.7 细胞中 PKC 磷酸化活性的变化。结果显示, 热损伤后 5 min, PKC 的磷酸化活性即明显升高, 30 min 时达最高水平, PKC 活性约为刺激前的 2 倍; 此后 PKC 的磷酸化活性逐渐下降, 2 h

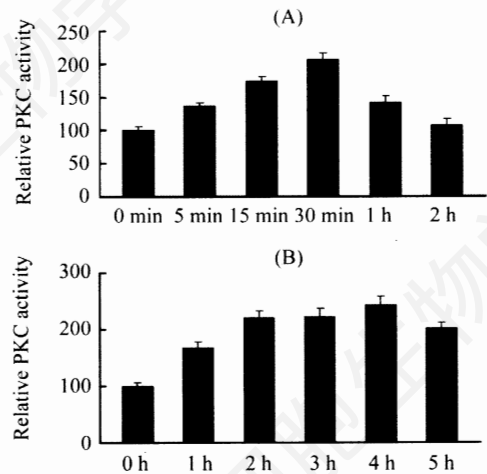


Fig.1 Time course of PKC activity in Raw264.7 cells treated with heat in the absence (A) or presence (B) of PMA

Raw264.7 cells were treated with 100 nmol/L PMA 3 h before heat. PKC activity was measured by the incorporation of ^{32}P onto myelin basic protein. Results are triplicate determination and data represent mean \pm SD.

降至基线水平(图 1A)。同时, 检测了热损伤与 PMA 联合作用下 PKC 磷酸化活性的变化, 结果显示 PMA 可以使 PKC 磷酸化活性增高, 持续时间较长, 5 h 仍约为正常对照组的 200% (图 1B)。上述结果提示热损伤导致 PKC 短暂激活, 而热损伤与 PMA 联合作用导致 PKC 持续活化。

2.2 PMA 与抑制剂对热损伤诱导凋亡的影响

同时, 应用流式细胞仪观察 PMA 与抑制剂对热损伤诱导凋亡的影响, 结果显示, 热损伤(43 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)后 12 h, 单纯热损伤组显示典型的凋亡细胞群特征: DNA 含量低于 G_1 期细胞, 出现亚二倍体峰, 其凋亡率约为(40.3 \pm 2.5)%; PMA 温育 3 h 后进行热损伤, 与单纯热损伤相比, 细胞凋亡明显受到抑制, 其凋亡率为(8.6 \pm 1.2)%; 加入星形孢菌素 30 min 后进行热损伤, 与单纯热损伤相比, 细胞凋亡增加, 凋亡率为(55.4 \pm 4.8)% (图 2)。上述结果显示, PKC 的持续激活可抑制热损伤诱导的 Raw264.7 细胞凋亡, 而 PKC 的抑制可促进细胞凋亡, 这提示 PKC 在热损伤诱导的细胞凋亡中起负调控作用。

2.3 热损伤诱导单核细胞凋亡过程中 PKC 与 ERK 的活化关系

为了进一步探讨 PKC 是否通过 ERK 负调控细胞凋亡, 首先检测了热损伤作用下 ERK 活性变化, 结果显示热损伤作用下, 与未加任何刺激的对照组相比, ERK 活性明显降低, 提示热损伤抑制 ERK1/ERK2 磷

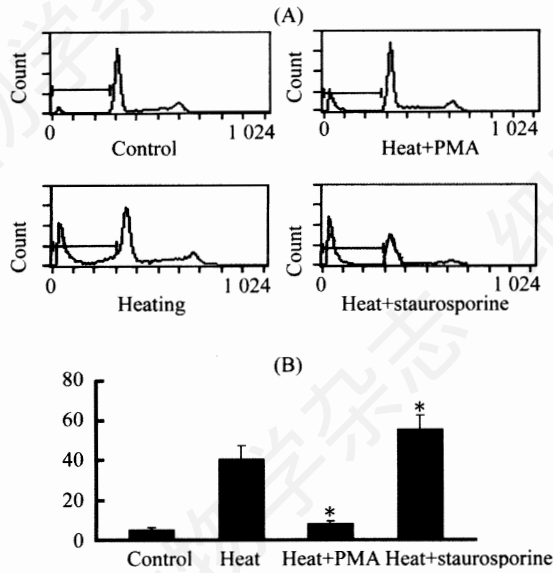


Fig.2 Effect of PKC activator and inhibitor on heat-induced Raw264.7 cell apoptosis

Treatment of cells with 100 nmol/L PMA was performed 3 h before heat, while cells with 500 nmol/L staurosporine was performed 30 mins before heat. The number of apoptotic cells 12 h after heat was determined by flow cytometric analysis. The picture shown here is representative of three independent experiment (A) The data represent mean values from a minimum of three separate experiments (B) * $P < 0.05$ vs heat group.

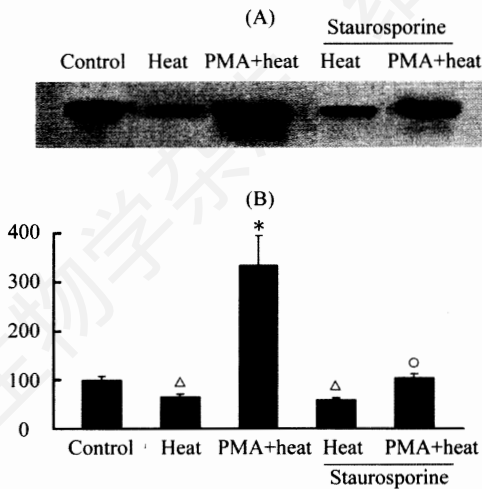


Fig.3 Analysis of the activity of ERK in Raw264.7 cells under different conditions

ERK activity was determined 30 min after heat treatment by an immunocomplex kinase assay. Cells were treated with different treatments. A representative autoradiograph of the immunocomplex kinase assay is shown (A). The quantity of Elk-1 phosphorylation was done by phosphorImager. The data represent mean values from a minimum of three separate experiments (B). Δ $P < 0.05$ vs control group, * $P < 0.05$ vs heat group, \circ $P < 0.05$ vs PMA+heat group.

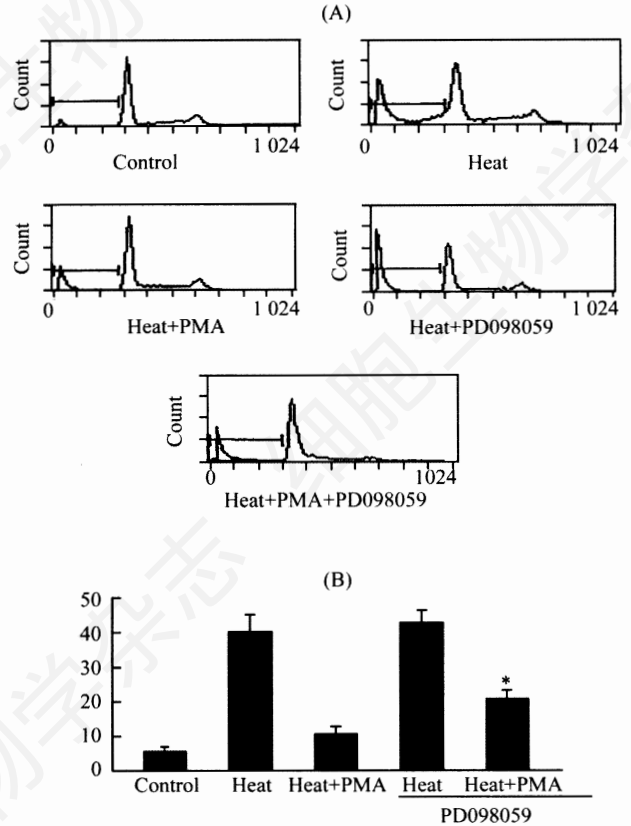


Fig.4 Effect of PMA and PD098059 on heat-induced Raw264.7 cell apoptosis

Cells were treated with different treatments. The number of apoptotic cells 12 h after heating was determined by flow cytometric analysis. The picture shown here is representative of three independent experiments (A). The data represent mean values from a minimum of three separate experiments (B). * $P < 0.05$ vs heat+PMA group.

酸化活化(图 3)。同时检测了 PKC 激活剂与抑制剂作用下 ERK 的活性变化, 结果显示 PMA 作用下 ERK 磷酸化活性明显升高, 而星形孢菌素明显抑制 PMA 诱导的 ERK 的激活(图 3)。上述结果显示 PMA 可激活 ERK, 并且这种激活作用通过 PKC, 即 PMA 通过 PKC 而激活 ERK。

2.4 PD098059 对热损伤诱导凋亡的影响

进一步, 应用流式细胞仪检测 ERK 在细胞凋亡中的作用。结果显示热损伤(43 °C, 30 min)后 12 h, 单纯热损伤组凋亡率约为(40.3±2.5)%; 加入 PMA 温育 3 h 后进行热损伤, 凋亡率为(8.6±1.2)%; PD098059 组别, 加入 20 μmol/L PD098059 温育 30 min 后进行热损伤反应, 其凋亡率为(42.6±3.0)%; PD098059+PMA 组别, 细胞凋亡被部分抑制, 其凋亡率为(25.4±2.2)% (图 4), 上述结果表明 PD098059 可解除 PMA 的抑制

凋亡作用,提示PMA作用下,PKC通过ERK负调控细胞凋亡。

3 讨论

细胞凋亡是细胞接受某些信号或受到某些因素刺激后一种主动的由基因调控的细胞消亡过程。PKC是一组丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞的信息传递中起重要作用。关于PKC在细胞凋亡中作用的研究引人注目。既往有许多研究者在研究PKC对细胞凋亡调控时,得出不一致甚至相反的结论。例如有研究发现,PMA可以诱导表达PKC α 的乳腺癌细胞MCF-7^[10]及持续表达PKC ζ 的单核细胞株U937凋亡^[11];但抑制白介素撤除诱导的CTLL细胞^[12]及VP16诱导的DU145细胞凋亡^[4]。上述结果的不一致性可能有两方面原因:一是细胞种属及刺激因素的差异性,另一与PKC亚型在不同细胞中表达的特异性有关。迄今,关于PKC在细胞凋亡中的作用尚未完全阐明。

我们先前的研究表明热损伤可以诱导单核细胞株Raw264.7细胞凋亡,但热损伤诱导细胞凋亡的调控机制尚不清楚。本研究观察了Raw264.7细胞PKC磷酸化活性在热损伤前后的变化,发现热损伤早期PKC活性被迅速激活,持续较短时间,随即下降,而热损伤与PMA联合作用下,PKC磷酸化活性增高,持续时间较长,并且PKC激酶的持续激活可抑制热损伤诱导的Raw264.7细胞凋亡,而PKC激酶的抑制可促进热损伤诱导的细胞凋亡,提示PKC在热损伤诱导的细胞凋亡中起负调控作用。

PKC作为抗凋亡因素可以通过多条通路发挥作用,其中之一是PKC可活化ERK,激活ERK级联反应途径,从而抑制细胞凋亡,促进增殖。为进一步

探讨PKC是否通过激活ERK调控细胞凋亡,我们检测了ERK活性及其在凋亡中的作用,结果显示,PMA可使ERK磷酸化活性显著增加,而星形孢菌素可抑制PMA对ERK的活化作用,提示PMA可以通过PKC而激活ERK;进一步流式细胞仪检测细胞凋亡显示PD098059可解除PKC激活剂PMA的抑制凋亡作用,提示PMA通过激活PKC,进而活化ERK,而负调控细胞凋亡。

在MAPK家族中,p38与JNK通路主要被细胞外应激刺激(UV、热、LPS、高渗)所激活,而ERK通路主要被丝裂原刺激(各种生长因子)所激活。尽管ERK与p38在结构及转导特性上有类似之处,但是它们对外界刺激反应的差异性提示ERK与p38在细胞中执行不同的生理功能。我们前述的研究已证实p38通路参与介导热损伤诱导的细胞凋亡,对细胞凋亡起正调控作用。本实验进一步显示,PKC-ERK通路可以抑制热损伤诱导的细胞凋亡,对细胞凋亡起负调控作用。

参考文献(References)

- [1] Lépiciér P *et al.* *J Pharmacol Sci*, 2006, **102**: 155
- [2] Bright R *et al.* *Stroke*, 2005, **36**: 2781
- [3] Barragan M *et al.* *J Leukoc Biol*, 2006, **80**: 1473
- [4] Rusnak JM *et al.* *Exp Cell Res*, 1996, **224**: 189
- [5] Kelkar N *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 1030
- [6] Garaude J *et al.* *J Immunol*, 2006, **177**: 7607
- [7] Davis RJ. *Cell*, 2000, **103**: 239
- [8] Franklin RA *et al.* *Leukemia*, 2000, **14**: 2019
- [9] Zhang L *et al.* *Chin Med J*, 2000, **113**: 354
- [10] de Vente JE *et al.* *J Clin Invest*, 1995, **96**: 1874
- [11] de Vente JE *et al.* *Cell Growth Differ*, 1995, **6**: 371
- [12] Walker PR *et al.* *Exp Cell Res*, 1993, **207**: 142

The Regulation of PKC-ERK Signaling Pathway on Heat-induced Monocytic Cell Apoptosis

Lu Zhang, Lin Zhang^{1*}, Yong Jiang, Nu-Yun Liu², Ke-Seng Zhao

(*Department of Pathophysiology, the Key Lab of Guangdong Proteome Analysis, the Key Lab for Transcriptomics and Proteomics, Ministry of Education, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ¹Department of Histology and Embryology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*)

Abstract By using a combined methods including flow cytometric analysis, Western blotting and kinase assay, the effect of PKC-ERK signaling pathway on heat-induced apoptosis in monocytic cell line Raw264.7 was studied. The results demonstrated that PKC was transiently activated 5 minutes after heating and returned to basal level 2 hours later, while PKC was persistently activated by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). The persistent activation of PKC can inhibit heat-induced Raw264.7 cell apoptosis, while inhibition of PKC promoted heat-induced Raw264.7 cell apoptosis. Furthermore, kinase analysis showed that heat can suppress the activation of ERK, while PMA can induce ERK activation. The inhibitor of PKC, staurosporine, can attenuate the inhibitory effect of PMA on heat-induced Raw264.7 cell apoptosis. Together, the present results indicate that the PKC-ERK signaling pathway can negatively regulate heat-induced Raw264.7 cell apoptosis.

Key words heat; PKC; apoptosis; ERK

Received: November 17, 2006 Accepted: March 12, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (No.30100031, No.30672565) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.40204411, No.06024380)

*Corresponding authors. Tel: 86-20-61648205, Email: zllilyzh@126.com