

探索·发现

PKC δ 与JNK共同调控喜树碱诱导的白血病细胞凋亡李 慧^{1*} 韩 冰²(¹上海健康医学院, 上海 201318; ²复旦大学附属闵行医院, 上海 201199)

摘要 采用流式细胞术、蛋白质免疫印迹法检测了喜树碱诱导白血病细胞凋亡过程中蛋白激酶C δ (protein kinase C δ , PKC δ)与c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)的作用。结果发现, 50 nmol/L喜树碱诱导处理U937细胞24、36或48 h后, 细胞发生明显凋亡, 并且PKC δ 和JNK均被激活。用化学抑制剂rottlerin抑制PKC δ 的活化可以降低喜树碱诱导细胞凋亡过程中JNK的磷酸化, 进而抑制细胞凋亡; 而用化学抑制剂SP600125抑制JNK的磷酸化也会降低PKC δ 的剪切活化, 进而一定程度地阻断细胞凋亡; 同时, JNK抑制剂SP600125也可以阻断过表达PKC δ 活性片段诱导的细胞凋亡。这些结果提示, PKC δ 和JNK介导的信号通路可以相互调控, 共同促进细胞凋亡。该研究对理解细胞凋亡的精细调控机制以及肿瘤的治疗都有一定的借鉴意义。

关键词 白血病; 细胞凋亡; 喜树碱; PKC δ ; JNK

PKC δ and JNK Mediates Camptothecin-induced Apoptosis in Leukemia Cell Line U937Li Hui^{1*}, Han Bing²(¹Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China;²Minhang Hospital, Fudan University, Shanghai 201199, China)

Abstract The flow cytometry and Western blot were used to investigate the effect of PKC δ and JNK during camptothecin-induced apoptosis in leukemia cell line U937. The results demonstrated that under 50 nmol/L camptothecin treatment for 24 h, 36 h or 48 h, U937 cells underwent apoptosis, and PKC δ and JNK proteins were obviously activated. In addition, the pretreatment of PKC δ -specific inhibitor rottlerin significantly inhibited phosphorylation of JNK during camptothecin-induced cell death. Mostly, SP600125, a phosphorylation of JNK inhibitor, greatly blocked proteolytic cleavage of PKC δ and camptothecin-induced cell death. Accordingly, SP600125 significantly suppressed cell death in U937 cells which stably transfected with pTRE2hyg-PKC δ -CF grown in tetracycline-free medium. PKC δ and JNK may mediate camptothecin-induced cell death. These results may provide new mechanisms for camptothecin-induced cancer cell death and novel therapeutic clues for cancer treatment.

Keywords leukemia; apoptosis; camptothecin; PKC δ ; JNK

收稿日期: 2015-10-22 接受日期: 2015-12-31

上海医药高等专科学校教育科研基金项目(批准号: 2014zr003)、上海医药高等专科学校2014和2015年度“飞跃计划”项目[批准号: FY(14)703-A5-1-02、FY(15)(1-7)03-A6-1-02]资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65882667, E-mail: li_hui9@sina.com

Received: October 22, 2015 Accepted: December 31, 2015

This work was supported by the Major Specialty Construction Project for Shanghai Institute of Health Sciences (Grant No.2014zr003), the Special Fund for National Demonstration Vocational College and the “Feiyue Program” of Shanghai Institute of Health Sciences in 2014 and 2015 [Grant No.FY(14)703-A5-1-02, FY(15)(1-7)03-A6-1-02]

*Corresponding author. Tel: +86-21-65822667, E-mail: li_hui9@sina.com

网络出版时间: 2016-02-18 17:26:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160218.1726.004.html>

细胞凋亡是多细胞生物消除有害细胞的重要生理机制, 它的异常在许多疾病如肿瘤、神经退行性疾病、自身免疫性疾病等的发病学上具有重要作用^[1-3]。细胞凋亡是个复杂的网络系统, 除了经典的内源性和外源性凋亡通路外, 还涉及很多其他信号通路, 在不同的细胞组织中, 受不同的凋亡刺激, 以不同的形式发生活化, 触发不同的信号通路, 诱导凋亡效应的发生。在过去的二十年中, 有关细胞凋亡的发生、发展及其分子调控机制的研究已经取得了十分瞩目的进展, 然而信号通路之间的相互调控依然不甚清晰^[2-3]。众多蛋白激酶是参与细胞信号转导及其调控的重要分子^[4-8], 本文在研究喜树碱诱导细胞凋亡中意外发现, 蛋白激酶C δ (protein kinase C δ , PKC δ)与c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)可以相互调控, 形成正反馈, 共同促进细胞凋亡。该研究对于深入理解细胞凋亡的精细调控机制以及肿瘤的治疗均有一定的借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640培养基(Sigma-Aldrich公司)、G418(Calbiochem公司)、四环素(tetracycline, Sigma-Aldrich公司)、camptothecin(Selleckchem公司)、Rottlerin(BiomolMOL公司)、SP600125(Selleckchem公司)、抗PKC δ 抗体(Santa Cruz公司, sc-937)、抗PARP抗体(Santa Cruz公司, sc-8007)、抗caspase-3抗体(Cell Signaling公司, 9662)、抗actin抗体(Sigma-Aldrich公司)、辣根过氧化物酶(HRP)二抗(Cell Signaling公司)和SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate Kit试剂盒(Pierce公司)。

1.2 细胞培养

U937细胞系由Daniel G Tenen博士惠赠(Harvard Medical School)。细胞培养(除特殊说明外)用含10% FBS的RPMI-1640培养基于37 °C、含有5% CO₂的培养箱中培养。细胞用计数仪和台盼蓝(trypan-blue)染色分析, 细胞活力保持在95%以上。

用于PCR扩增PKC δ -CF的上下游引物分别是, 上游引物: 5'-ATG GAT CCG CCA CCA TGA AGA TCT GGG AGG GG-3'; 下游引物: 5'-TAA CGC GTT TAA ATG TCC AGG AAT TGC TC-3'。产物插入到pGEM-T easy vector(Promega公司)中, 接着亚克隆进真核表达载体pTRE2hyg(BD Clontech公司), 形成

pTRE2hyg-PKC δ -CF。应用电转方法建立稳转细胞U937TPKC δ -CF, 电转后的细胞转移到RPMI-1640培养液中继续培养, 24 h后加入四环素(1 μ g/mL), 筛选稳定转染细胞。撤除四环素后, 用Western blot验证PKC δ -CF的表达。

1.3 Western blot

收集细胞, 并加入等体积的2 $\times$ SDS裂解液, 100 °C 5 min, 冰上5 min, 重复3次, 充分裂解细胞; 将细胞裂解液于4 °C、12 000 r/min离心10 min, 上清液为抽取的总蛋白; 蛋白定量后, 将同等总蛋白量的不同处理样品进行10%或12%聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电泳后转移蛋白至NC膜。转好后的NC膜先用TBS(Tris buffered saline)配制的5%脱脂奶粉于室温封闭2 h; 然后用所检测蛋白的一抗于4 °C孵育过夜; 再用辣根过氧化物酶标记的对应种属的二抗孵育; 最后用SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate Kit检测蛋白质水平变化。

1.4 流式细胞术分析

细胞先用1 $\times$ PBS洗1遍, 之后取2 $\times$ 10⁵的细胞重悬在100 μ L的1 $\times$ Binding Buffer中。分别用5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L碘化丙啶(propidium iodide, PI)标记, 室温下暗处反应15 min, 再加300 μ L 1 $\times$ Binding Buffer。用流式细胞仪(Beckman Coulter)检测Annexin V和PI阳性的细胞。

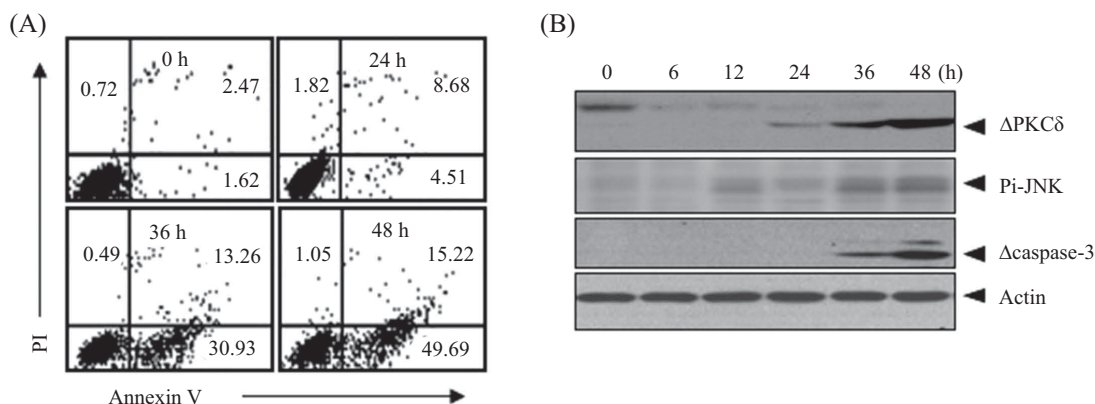
2 结果

2.1 PKC δ 和JNK在喜树碱诱导的细胞凋亡中被激活

PKC δ 的蛋白质结构是由N-端调节区域和C-端催化区域及两者间的一短链接片段所组成, 细胞凋亡中可以被蛋白酶水解剪切产生41 kDa的C-端催化片段和38 kDa的N-端调节片段^[6], C-端催化片段脱离了N-端假底物区域的抑制, 并导致PKC δ 持续活化^[7-8]。在细胞凋亡过程中, JNK被磷酸化而活化^[9]。用50 nmol/L喜树碱处理白血病细胞U937, 诱导细胞发生凋亡(图1A)。收集喜树碱处理不同时间点的细胞提取蛋白质, Western blot分析发现, 在caspase-3活化的U937细胞中同时存在PKC δ 的蛋白质剪切片段及JNK的磷酸化形式(图1B)。

2.2 JNK的磷酸化依赖于PKC δ 的剪切活化

为了探索PKC δ 和JNK在喜树碱诱导细胞凋亡中的相互关系, 用PKC δ 的抑制剂rottlerin与喜树碱共

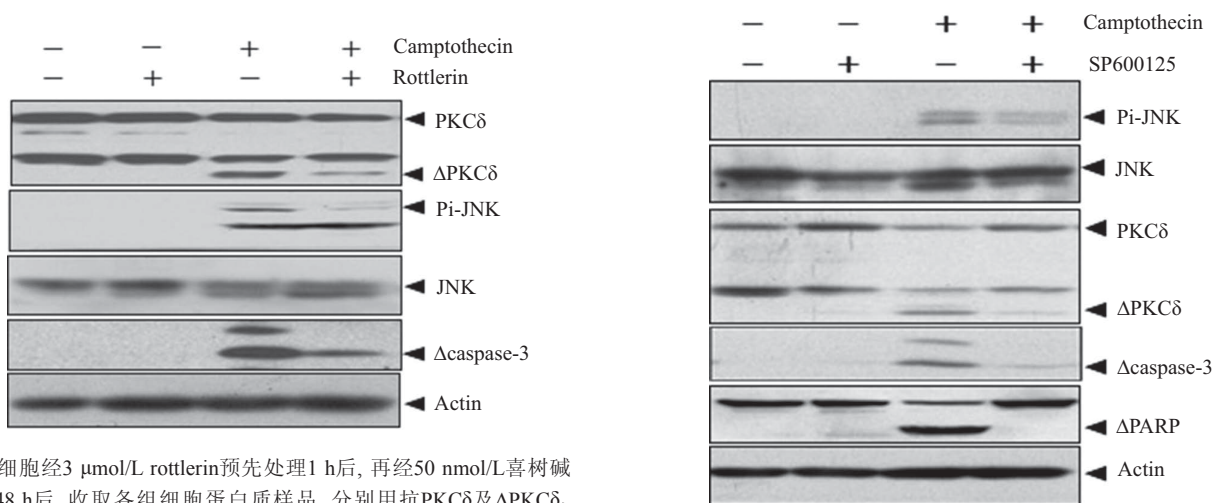


A: U937细胞不处理或经50 nmol/L喜树碱分别处理24、36或48 h后, Annexin-V和PI标记细胞, 流式细胞术检测细胞死亡情况, 方框中显示Annexin-V阳性或PI阳性细胞的比例。B: U937细胞不处理或经50 nmol/L喜树碱分别处理不同时间后, 收取各个时相的细胞蛋白样品, 分别用PKC δ 、JNK磷酸化、 Δ caspase-3和actin抗体进行Western blot检测分析, 其中actin作为内参。

A: U937 cells were treated with or without 50 nmol/L camptothecin for 24 h, 36 h or 48 h. Annexin-V/PI double-stained cells were measured by flow cytometry. Panels show percentages of Annexin-V⁺ or PI⁺ cells; B: U937 cells were treated with or without 50 nmol/L camptothecin for the indicated time. Proteins PKC δ , phosphorylated JNK and Δ caspase-3 were detected by Western blot, with actin as an internal control.

图1 在喜树碱诱导细胞凋亡中蛋白激酶PKC δ 和JNK的活化

Fig.1 PKC δ and JNK activation in apoptosis induced by camptothecin



U937细胞经3 μ mol/L rottlerin预先处理1 h后, 再经50 nmol/L喜树碱作用48 h后, 收取各组细胞蛋白质样品, 分别用抗PKC δ 及 Δ PKC δ 、JNK及JNK磷酸化、 Δ caspase-3和actin抗体进行Western blot检测分析, 其中actin作为内参。

U937 cells were preincubated with 3 μ mol/L rottlerin for 1 h, then treated with or without 50 nmol/L camptothecin for 48 h. Proteins PKC δ , Δ PKC δ , JNK, phosphorylated JNK, Δ caspase-3 and actin were detected by Western blot, with actin as an internal control.

图2 JNK的磷酸化依赖于PKC δ 的活化

Fig.2 Phosphorylation of JNK is dependent on PKC δ activation

同处理白血病细胞U937。如图2所示, 单纯用PKC δ 的抑制剂rottlerin处理时, U937细胞中PKC δ 和JNK均无变化; 当用喜树碱处理时, U937细胞中PKC δ 总蛋白有减少, 并出现活化的剪切片段 Δ PKC δ , 磷酸化的JNK明显增多, 而JNK总蛋白水平无明显改变; 在rottlerin与喜树碱共同处理白血病细胞U937时, 剪切片段 Δ PKC δ 明显减少, JNK磷酸化也明显减少, 并伴

随caspase-3的剪切活化片段的减少, 提示JNK的磷酸化依赖于PKC的剪切片段 Δ PKC δ 。

U937细胞经1 μ mol/L SP600125预先处理1 h后, 再经50 nmol/L喜树碱作用48 h后, 收取各组细胞蛋白质样品, 分别用抗PKC δ 及 Δ PKC δ 、JNK及磷酸化JNK、 Δ caspase-3、 Δ PARP和actin抗体进行Western blot检测分析, 其中actin作为内参。

U937 cells were preincubated with 1 μ mol/L SP600125 for 1 h, then treated with or without 50 nmol/L camptothecin for 48 h. Proteins PKC δ , Δ PKC δ , JNK, phosphorylated JNK, Δ caspase-3, Δ PARP and actin were detected by Western blot, with actin as an internal control.

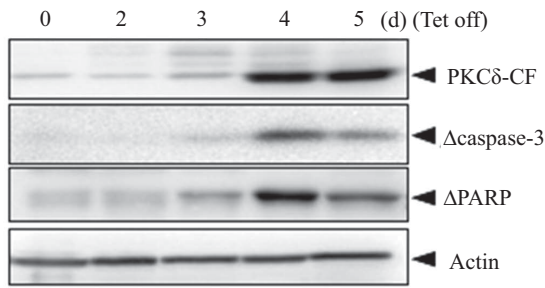
图3 JNK的磷酸化促进PKC δ 的剪切活化

Fig.3 Phosphorylation of JNK promotes PKC δ activation

随caspase-3的剪切活化片段的减少, 提示JNK的磷酸化依赖于PKC的剪切片段 Δ PKC δ 。

2.3 JNK磷酸化促进PKC δ 的剪切活化

应用JNK的抑制剂SP600125与喜树碱共同处理白血病细胞U937。如图3所示, 单纯用SP600125处理时, U937细胞中PKC δ 和JNK均无变化; 当用喜树碱



U937细胞中转染PKCδ的C-端催化结构域PKCδ-CF, 撤除四环素后, 收取第0、2、3、4、5 d的细胞蛋白质样品, Western blot检测分析PKCδ-CF、caspase-3及其底物PARP的剪切情况, 其中actin作为内参。U937 cells stably transfected with pTRE2hyg-PKCδ-CF. After grown in medium with or without tetracycline for 2, 3, 4, 5 d, U937 cells were collected respectively. Western blot analysis of PKCδ-CF, caspase-3 and PARP cleavage served as apoptotic markers, with actin as an internal control.

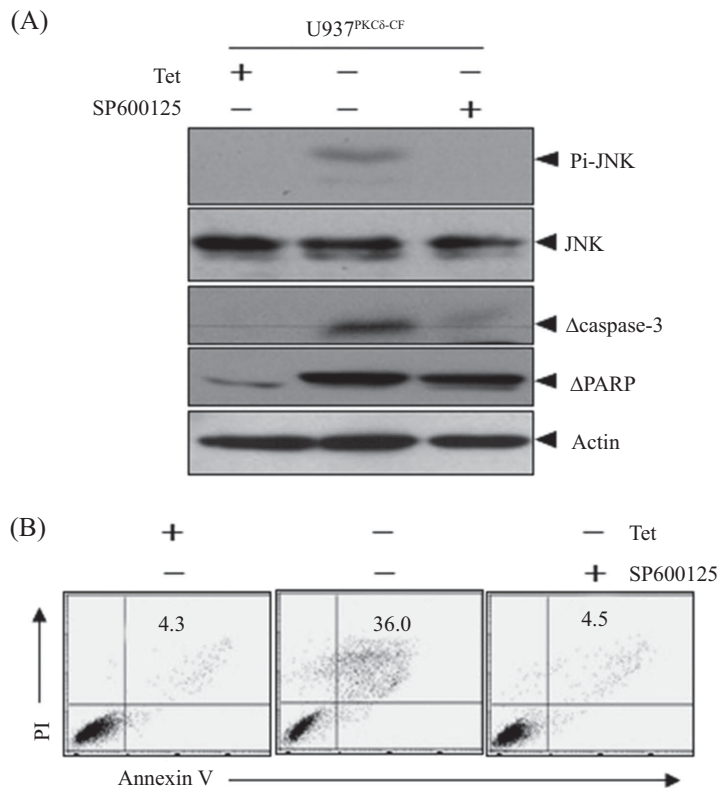
图4 建立诱导表达PKCδ活性片段的细胞

Fig.4 Establishment of the cells expressing activity fragment of PKCδ

处理时, U937细胞中PKCδ总蛋白减少, 并出现活化的剪切片段ΔPKCδ, JNK总蛋白水平无明显改变, 但磷酸化的JNK明显增多, 随之, caspase-3的剪切活化片段及其产物ΔPARP增多; 在SP600125与喜树碱共同处理白血病细胞U937时, JNK总蛋白水平无明显改变, 但磷酸化JNK明显减少, 剪切片段ΔPKCδ明显减少, 并伴随caspase-3的剪切活化片段及其底物ΔPARP的减少, 提示JNK的磷酸化促进PKC的剪切活化。

2.4 PKCδ剪切活化介导的细胞凋亡依赖于JNK的磷酸化

在U937细胞过表达PKCδ的C-端催化区域PKCδ-CF, 随着四环素的撤除, PKCδ-CF在第4 d表达显著增高, 同时出现caspase-3的剪切活化片段及其产物ΔPARP, 表明发生了细胞凋亡(图4)。



A: U937细胞中过表达PKCδ的C-端催化区域PKCδ-CF, 撤除四环素后, 加入1 μmol/L SP600125处理, 收取第5 d的细胞蛋白质样品, 不处理以及单纯四环素处理的细胞作为对照, Western blot检测分析JNK及JNK磷酸化、caspase-3及其底物PARP的剪切情况, 其中actin作为内参。B: 过表达PKCδ-CF的U937细胞, 撤除四环素后, 加入1 μmol/L SP600125处理, 收取第5 d的细胞, 不处理以及单纯四环素处理的细胞作为对照, Annexin V及PI双染, 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。

A: U937 cells stably transfected with pTRE2hyg-PKCδ-CF were grown in medium with or without tetracycline, followed by treatment with or without 1 μmol/L SP600125 for 5 d. Then cells were collected respectively. Western blot analysis of proteolytic activation of JNK, and caspase-3 and PARP cleavage served as apoptotic markers, with actin as an internal control. B: U937 cells stably transfected with pTRE2hyg-PKCδ-CF were grown in medium with or without tetracycline, followed by treatment with or without 1 μmol/L SP600125 for 5 d. Annexin V-positive cells was determined by flow cytometry.

图5 PKCδ剪切活化介导的细胞凋亡依赖于JNK的磷酸化

Fig.5 PKCδ activation induced apoptosis is dependent on phosphorylation of JNK

利用该细胞,在四环素撤除的同时用JNK的抑制剂SP600125处理白血病细胞U937。如图5A所示,检测四环素撤除第5 d的细胞蛋白质水平变化,发现单纯撤除四环素导致JNK磷酸化形式显著增多,伴随caspase-3的剪切活化片段及其产物 Δ PARP出现,同时,流式细胞术检测的Annexin V和PI阳性细胞显著增多(图5B)。而用SP600125同时处理时,JNK总蛋白水平无明显改变,磷酸化JNK明显减少,相应的caspase-3的剪切活化片段及其底物 Δ PARP也减少(图5A),细胞凋亡显著减少(图5B),提示PKC δ 的活性片段介导的细胞凋亡依赖于JNK的磷酸化。

3 讨论

蛋白激酶主要有蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶(calmodulin dependent protein kinases, CaMKs)、酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinases, TPK)等。近年来的研究表明,蛋白激酶参与了多种多样细胞凋亡的信号转导,加速或者延迟凋亡^[4]。本研究发现,喜树碱诱导细胞凋亡过程中伴随PKC δ 的剪切活化和JNK磷酸化,其化学抑制剂均显著降低喜树碱诱导细胞凋亡的效应,提示两种蛋白激酶的活化均促进了喜树碱诱导的细胞凋亡。

PKC δ 是属于PKC家族的一个成员,PKC δ 剪切产生活性片段而被活化^[5-8]。已有研究发现,PKC δ 的活性片段可以诱导细胞凋亡的发生,而表达无活性的PKC δ 催化片段突变体能阻断凋亡的产生,而且在导致细胞发生线粒体膜电位丢失和caspase-3活化之前,PKC δ 即可发生剪切活化,其化学抑制剂rottlerin可以阻断细胞凋亡的发生^[10],表明PKC δ 的功能可能在凋亡早期就有显现。JNK是MAPK家族的重要成员之一,参与细胞内外的应激反应,是应激激活蛋白激酶。JNK具有促进细胞凋亡的能力,当细胞缺失JNK时,细胞的凋亡能力明显下降,注入细胞色素c可以补救这种缺失的凋亡能力,说明JNK是通过线粒体途径发挥促进凋亡的作用的。研究显示,JNK能够通过活化c-Jun上调p53等促凋亡蛋白的表达,并调控Bcl-2家族成员,介导多种胞外刺激诱导的细胞凋亡^[9,11-12]。

本研究结果显示,PKC δ 与JNK之间互相促进,形成正反馈,共同促进了喜树碱诱导的细胞凋亡。也有报道称,JNK是PKC δ 的下游效应分子,PKC δ 可通过丝裂原活化蛋白激酶的激酶的激酶1(mitogen-

activated protein kinase kinase kinase 1, MEKK1)和丝裂原活化蛋白激酶的激酶7(mitogen-activated protein kinase kinase 7, MKK7)介导调控JNK的磷酸化^[13]。在佛波酯或依托波忒处理细胞时,JNK激酶也以依赖PKC δ 方式发生了活化^[14]。在DNA损伤反应中,PKC δ 也可能通过MKK7活化JNK^[15]。另有研究表明,用伏波酯-12-十四烷酸酯-13-乙酸酯(12-O-tetradecanoyl phorbol-13-ester, TPA)处理唾液腺泡细胞,能通过活化PKC δ 和PKC α 诱导细胞发生凋亡,同时能诱导JNK发生活化及降低Erk活性^[16]。然而,尚无研究显示JNK反过来也影响PKC δ 的剪切活化,本研究为两个激酶之间的联系增加了新的线索。

参考文献 (References)

- 1 Wang LS, Xia L, Shen SM, Zheng Y, Yu Y, Chen GQ. Dissecting cell death with proteomic scalpels. *Proteomics* 2012; 12(4/5): 597-606.
- 2 Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16(2): 2942-55.
- 3 Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med* 2014; 65: 139-55.
- 4 Anderson P. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61(1): 33-46.
- 5 Reyland ME. Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5): 1001-4.
- 6 Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, *et al.* Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 1996; 184(6): 2399-404.
- 7 Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, *et al.* Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 1995; 14(24): 6148-56.
- 8 Emoto Y, Kisaki H, Manome Y, Kharbanda S, Kufe D. Activation of protein kinase Cdelta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Blood* 1996; 87(5): 1990-6.
- 9 Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(9): 1619-33.
- 10 Song MG, Gao SM, Du KM, Xu M, Yu Y, Zhou YH, *et al.* Nanomolar concentration of NSC606985, a camptothecin analog, induces leukemic-cell apoptosis through protein kinase Cdelta-dependent mechanisms. *Blood* 2005; 105(9): 3714-21.
- 11 Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27(48): 6245-51.
- 12 Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res* 2005; 15(1): 36-42.
- 13 Yoshida K, Miki Y, Kufe D. Activation of SAPK/JNK signaling by protein kinase Cdelta in response to DNA damage. *J Biol*

- Chem 2002; 277(50): 48372-8.
- 14 Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Protective role of taurine against arsenic-induced mitochondria-dependent hepatic apoptosis via the inhibition of PKCdelta-JNK pathway. PLoS One 2010; 5(9): e12602.
- 15 Mitsutake N, Namba H, Shklyev SS, Tsukazaki T, Ohtsuru A, Ohba M, *et al.* PKC delta mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. Oncogene 2001; 20(8): 989-96.
- 16 Reyland ME, Barzen KA, Anderson SM, Quissell DO, Matassa AA. Activation of PKC is sufficient to induce an apoptotic program in salivary gland acinar cells. Cell Death Differ 2000; 7(12): 1200-9.