

MG132 抑制肝癌细胞 Bel-7404 生长的机制研究*

张 静¹⁾ 李 伟¹⁾ 章康健²⁾ 刘锡君¹⁾ 孔彦平¹⁾ 牛 娜¹⁾ 蒋 海¹⁾ 周秀梅^{1)**}

¹⁾ 浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

²⁾ 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 MG132(Z-Leu-leu-leu-CHO) 是一种蛋白酶体抑制剂, 它可逆地抑制蛋白酶体活性, 从而抑制泛素-蛋白酶体通路所介导的蛋白质降解, 诱导细胞凋亡。实验研究 MG132 抑制肝癌细胞 Bel-7404 生长的机制。采用不同浓度梯度和时间梯度, 通过荧光显微镜、透射电子显微镜、Hoechst33342 染色、MTT 检测、Annexin V/PI 流式细胞术、Western blot 分别检测 MG132 对 Bel-7404 细胞的形态学变化、细胞内质网压力变化、自噬泡形成、凋亡小体形成、细胞存活率、细胞凋亡水平、凋亡及自噬信号途径中相关蛋白质表达的影响。结果显示, MG132 能明显抑制 Bel-7404 细胞生长。通过增加内质网压力激活 Caspase-12, 也可通过线粒体途径调节 Bcl-2/Bax 水平, 促进细胞色素 c 的释放, 两者皆可激活下游效应 Caspase-3, 剪切 PARP, 诱导细胞凋亡。同时, MG132 可诱导 Beclin 1 和 LC3B 的上调, 促使 Bel-7404 细胞发生自噬, 可在透射电镜下观察到自噬泡形成。上述结果表明, MG132 作用 Bel-7404 细胞涉及两类细胞程序性死亡途径: 细胞凋亡和自噬。

关键词 蛋白酶体抑制剂, 肝癌细胞, 凋亡, 自噬, 内质网应激

学科分类号 Q2, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00575

细胞生存的关键在于自身蛋白质合成和分解的平衡。泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP) 是生物体内蛋白质选择性降解的重要途径之一^[1], 主要作用于细胞内半衰期短的调节蛋白和部分半衰期较长的蛋白质, 以及一些结构异常、错叠或受损伤的蛋白质^[2]。其过程是各种靶蛋白以共价键形式联结多个泛素(ubiquitin)分子, 即泛素化(ubiquitination)后, 再输送到 26 S 蛋白酶体上被消化降解, 先被 26 S 蛋白酶体 19 S 亚单位识别, 随后泛素化靶蛋白去泛素化、打开折叠和移位, 进入 20 S 亚单位的筒状结构内被多次切割, 最后消化底物, 释放出 3~22 个多肽的短肽片段^[3]。

UPP 与蛋白质质量控制、受体胞吞、细胞凋亡、细胞周期、DNA 修复、转录及免疫应激等密切相关^[4-5], 也与许多人类疾病的发生相关, 因此与 UPP 有关的酶被认为是药物设计的分子靶标。蛋白酶体精确降解细胞内各种靶蛋白, 参与调节多种细胞功能。故应用其特异性抑制剂改变其酶切位点活性或抑制泛素蛋白酶体通路, 已成为抗肿瘤治疗等医学领域的研究热点^[6]。

MG132 是一种有效、可逆的醛基肽类特异性

蛋白酶体抑制剂, 它能阻止 26 S 蛋白酶体对泛素化靶蛋白的降解, 抑制 20 S 蛋白酶体中类糜蛋白酶(chymotrypsin-like, ChTL) 活性, 从而阻断 UPP, 抑制泛素-蛋白酶体通路所介导的蛋白质降解, 进而影响细胞功能, 可诱导细胞凋亡或自噬^[7-8]。

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 化疗是肝癌综合治疗中的重要手段。蛋白酶体抑制剂 MG132 作为一种潜在的有效抗肿瘤药物, 受到越来越多的关注与研究。本实验以人肝癌 Bel-7404 细胞株为研究对象, 观察蛋白酶体抑制剂 MG132 对 Bel-7404 细胞生长抑制的影响, 并检测 MG132 作用后细胞中凋亡信号通路以及自噬信号通路中蛋白质的表达。初步探讨 MG132 抑制肝癌细胞生长的作用机制, 为蛋白酶体抑制剂应用于肝癌的新型治疗提供实验依据。

* 国家自然科学基金资助项目(30800093)和浙江省重中之重学科开放基金(SWYX0809)。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-86843181, E-mail: zhouxiumei824@163.com

收稿日期: 2009-12-29, 接受日期: 2010-03-24

1 材料与方法

1.1 材料

MG132(Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma 公司), MTT (Sigma 公司), DMSO(无锡展望化工试剂有限公司), Hoechst33342 (Amresco 公司), PARP 一抗 (Santa Cruz), Caspase-3 一抗 (Cell signal technology, CST), Cytochrome c 一抗 (CST), LC3B 一抗(CST), Beta-Actin 一抗(Apitolomics), Bax 一抗(Apitolomics), Beclin-1 一抗 (Apitolomics), Bcl-2 一抗 (HuaAn Biotech), Caspase-12 一抗(Abcam), 驴抗兔荧光二抗(LICOR), 肝癌 Bel-7404 细胞株(购自 ATCC), Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (Becton Dickinson 公司), DMEM 培养基(Gibco 公司), FBS(Gibco 公司)高速冷冻离心机(Hitachi 公司), 纯水系统(Millipore 公司), 倒置荧光显微镜(Olympus 公司), 酶标仪(TECAN 公司), 红外激光成像系统(LICOR 公司), 电子天平(赛多利斯公司), FACScan 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)等。

1.2 细胞增殖检测

收集对数生长期的细胞用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基按 10^5 个/ml 稀释后, 将细胞以 100 μ l/孔接种于 96 孔板中。待贴壁培养 12 h 后, 将 96 孔板中培养液吸出, 换成含不同浓度 MG132(1 μ mol/L、3 μ mol/L、5 μ mol/L、7 μ mol/L、10 μ mol/L)的 2%FBS DMEM 培养基, 另设 PBS 对照孔, 每个浓度设 6 个复孔。作用不同时间: 24 h、48 h、72 h。MG132 处理后, 每孔加入 20 μ l MTT (5 g/L), 37℃、5% CO₂ 孵育 4 h, 吸去上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 在摇床上孵育 20 min 后用酶标仪于 590 nm 下检测吸光度(A)并据此绘制细胞存活率曲线。每组实验重复 3 次。

1.3 细胞形态学观察

将 3.5×10^5 个/ml Bel-7404 细胞接种于 6 孔板中, 贴壁培养 12 h 后, 加药组加入 5 μ mol/L 的 MG132, 对照组加等量的 PBS, 37℃、5% CO₂ 培养, 分别作用 12 h、24 h、48 h 后, 倒置光学显微镜下观察细胞形态学变化。

1.4 Hoechst33342 荧光检测

将 2.5×10^5 个/ml Bel-7404 细胞接种于 12 孔板中, 贴壁培养 12 h 后, 加药组加入 1 μ mol/L、3 μ mol/L、5 μ mol/L 的 MG132, 对照组加等量的 PBS, 37℃、5% CO₂ 培养, 分别作用 12 h、24 h、48 h 后每孔加入 Hoechst33342(10 g/L)各 1 μ l。避

光孵育 30 min。荧光显微镜下观察细胞核的形态变化。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

在 6 孔板中接种 5×10^5 个/ml 的 Bel-7404 细胞, 贴壁培养 12 h 后, 在加药组中加入 3 μ mol/L 的 MG132, 对照组中加入等量的 PBS, 37℃、5% CO₂ 培养。48 h 后, 吸去培养基, 参照 Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作说明: 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 遍, 加入胰酶小心消化细胞, 加入 400 μ l 的 1×结合缓冲液将细胞吹匀悬浮, 分别加入 1.5 μ l Annexin-V 试剂和 1.5 μ l PI, 室温避光放置 15 min 后, 采用流式细胞仪分析。

1.6 Western blot 检测凋亡信号通路

在 6 孔板中接种 5×10^5 个/ml Bel-7404 细胞, 贴壁培养 12 h 后, 在加药组中加入 1 μ mol/L、3 μ mol/L、5 μ mol/L 的 MG132, 对照组中加入等量的 PBS, 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 6 h、12 h、24 h、48 h 后, 吸去细胞培养基, 加入细胞裂解液(碧云天公司), 冰浴 1 min 后, 刮下细胞, 连同细胞裂解液移至 EP 管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。细胞色素 c 的提取参照 Yang 等^[9]的方法, 经过实验处理所得的上清即为不含细胞核和线粒体的胞浆成分。以上蛋白质样品采用 Pierce® BCA Protein Assay Kit(Thermo 公司)进行蛋白质定量。

蛋白质样品加入加样缓冲液, 煮沸, 配置 12%或 15%的 Tris-甘氨酸 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 进行 SDS-PAGE 后转膜。用 10%牛血清 4℃封闭过夜后。一抗结合, 37℃摇床孵育 2 h。TBST 洗 2 遍后加入荧光二抗, 37℃摇床孵育 1 h。TBST 洗 2 次后在红外激光成像系统进行蛋白质分析。

1.7 透射电镜观察细胞内质网压力和自噬泡的形成

在 10 cm 细胞培养皿中接种 2×10^6 个/ml 的 Bel-7404 细胞, 在加药组中加入 3 μ mol/L 的 MG132, 对照组中加入等量的 PBS, 37℃、5% CO₂ 培养。48 h 后, 收集细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 细胞沉淀用含有 2.5%戊二醛的 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)固定 2 h。PBS 清洗, 之后用 1%四氧化钨固定 2 h, 浓度梯度(50%~90%)的乙醇中进一步脱水, 再用丙酮脱水, 用环氧树脂包埋, 浸透过夜, 聚合, 用乙酸双氧铀和柠檬酸铅对超薄切片进行染色。在透射电子显微镜 (JEOL, Akishima, Japan) 下观察加药组与对照组细胞内质网压力的变

化以及自噬泡的形成.

2 结 果

2.1 MTT 实验

结果显示, 不同浓度的 MG132 作用不同时间后, 能明显抑制肝癌 Bel-7404 细胞生长, 呈现时间依赖性和浓度依赖性. MTT 细胞存活率 /% = (加药组-空白组)/(对照组-空白组). 通过 SPSS 软件分析, MG132 作用 Bel-7404 细胞 1 天、2 天、3 天, IC_{50} 值分别为 $16.3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $7.0\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $3.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ (图 1).

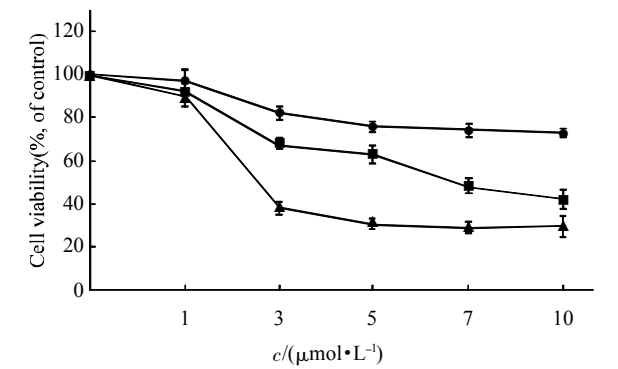


Fig. 1 Cell viability was assayed by MTT test
Hepatoma carcinoma cell (Bel-7404) was treated with MG132 at concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of 1, 3, 5, 7 and 10. On days 1, 2 and 3 post-effection, cells were stained with MTT as described in **Materials and methods**. Results are presented as $\bar{x} \pm s$ (error bars) of triplicate experiments and are expressed as a percentage of untreated control cells.
●—● : 1 day; ■—■ : 2 day; ▲—▲ : 3 day.

2.2 细胞形态变化

Bel-7404 细胞用 MG132 处理后出现典型凋亡变化. 光学显微镜下观察, 蛋白酶体抑制剂处理 48 h 后, Bel-7404 细胞生长受到明显抑制, 出现典型的凋亡形态学变化: 细胞皱缩、细胞膜出现发泡现象、细胞核浓缩(图 2).

Hoechst 染色检测 MG132 以 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的浓度作用 Bel-7404 细胞 12 h、24 h、48 h 后的细胞凋亡效应: 对照组染色质均匀、无浓缩、边集现象, 荧光显微镜下观察, 细胞核染色均一, 无明显亮蓝色. 而 MG132 处理组细胞核染色质明显凝集、固缩, 并有核碎裂出现凋亡小体. 荧光显微镜下观察, 呈现致密浓染或者碎块状致密浓染(图 3).

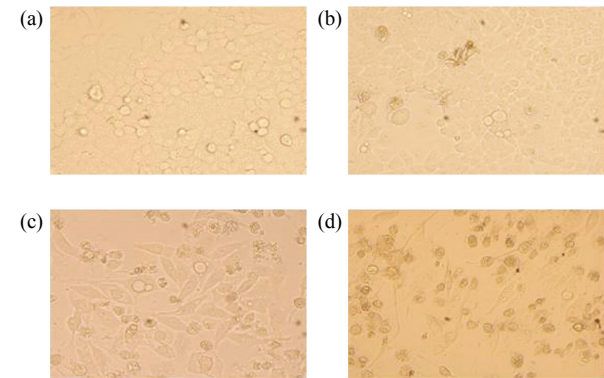


Fig. 2 The size and configuration of MG132 treated Bel-7404 (b,c,d) compared with untreated Bel-7404
(a) Untreated cells. (b) Treated with $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ MG132 for 12 h. (c) $5\text{ }\mu\text{mol/L}$, 24 h. (d) $5\text{ }\mu\text{mol/L}$, 48 h. Original magnification $\times 200$.

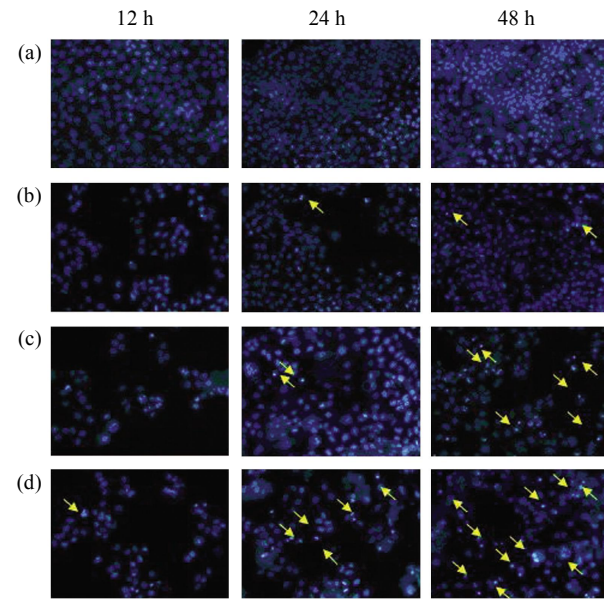


Fig. 3 Bel-7404 cells were stained with Hoechst 33342 after treated with Mg132 at concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of 1, 3 and 5 for 12, 24 and 48 h respectively
(a) Control. Control acted as untreated cells. (b) $1\text{ }\mu\text{mol/L}$. (c) $3\text{ }\mu\text{mol/L}$. (d) $5\text{ }\mu\text{mol/L}$. Original magnification $\times 200$.

2.3 Western blot 检测凋亡相关蛋白的变化

蛋白酶体抑制剂 MG132 作用肝癌 Bel-7404 细胞 24 h 后, 一方面通过降低 Bcl-2/Bax 比值, 进而改变线粒体膜电位, 释放细胞色素 c, 进一步激活 Caspase-3, 剪切 PARP, 另一方面, 通过改变内质网压力, 引起内质网应激, 激活 Caspase-12, 介导

细胞凋亡. MG132 分别以 $1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $3\ \mu\text{mol/L}$ 、 $5\ \mu\text{mol/L}$ 的浓度作用 Bel-7404 细胞 6 h、12 h、24 h、48 h. 在 24 h 时, PARP、Caspase-3、Caspase-12、Bax、细胞色素 c 的蛋白质量均随药物浓度的增加而增加, 呈正相关. Bcl-2 蛋白表达相应减少, 呈负相关(图 4a). 时间梯度中, PARP、Caspase-3 的表达量在 24 h 达到高峰(图 4b).

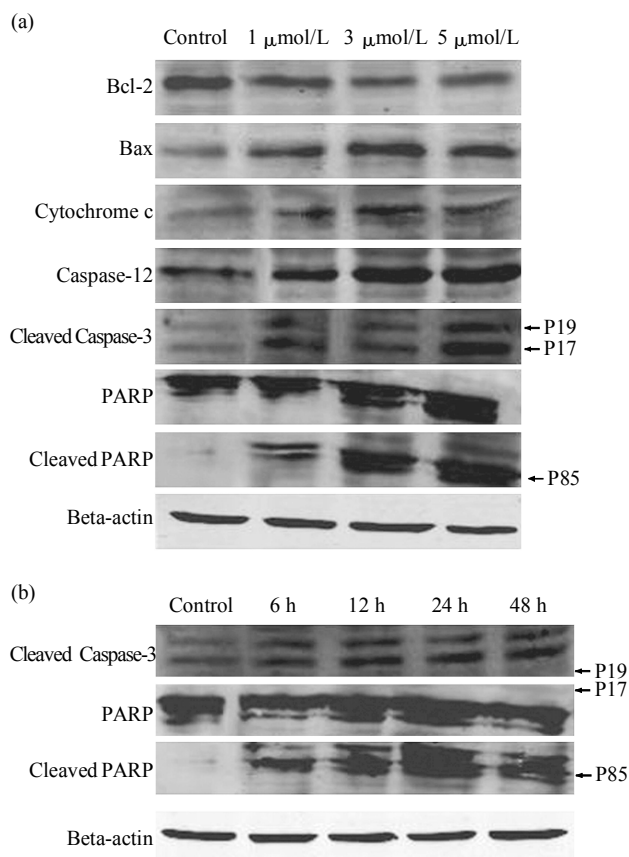


Fig. 4 Bel-7404 cells was treated with different-concentration of MG132, for 48 h (a) and Bel-7404 cells was treated for different-time of MG132, with $5\ \mu\text{mol/L}$ (b)

Western blot to investigate the expression of mitochondria-mediated signaling pathway related genes Bcl-2, Bax, cytochrome c and the endoplasmic reticulum stress pathway related gene Caspase-12, which induced Bel-7404 cell apoptosis. The activated executive protein Caspase-3 contributed to apoptosis were detected, also, the downstream protein poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) of apoptosis has also done. Result shows remarkably increased the expression of the splicers of both caspase-3 and PARP. MG132 induced the apoptosis of Bel-7404 cells in a concentration-dependent and time-dependent manner.

2.4 Western blot 检测自噬相关蛋白的变化

细胞凋亡属于 I 型程序性死亡, 而自噬性死亡

属于 II 型程序性死亡. 近来, 越来越多的研究表明自噬活性与肿瘤的发生、发展密切相关. LC3B 和 Beclin 1 均是参与自噬体形成的重要基因^[10-11]. MG132 分别以 $1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $3\ \mu\text{mol/L}$ 、 $5\ \mu\text{mol/L}$ 的浓度作用 Bel-7404 细胞 24 h 后, Western blot 结果显示, 药物组自噬蛋白的表达水平明显高于对照组, 细胞发生自噬性死亡(图 5).

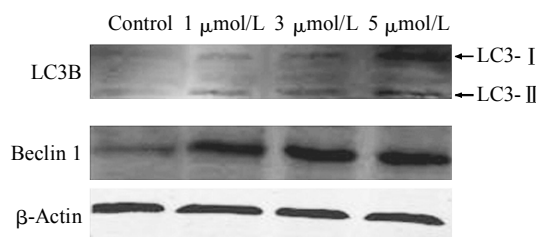


Fig. 5 Bel-7404 cells was treated with different-concentration of MG132, for 48 h

Western blot to investigate the expression of autophagy pathway related genes LC3B and Beclin1.

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

蛋白酶体抑制剂 MG132 以 $3\ \mu\text{mol/L}$ 作用 Bel-7404 细胞 48 h, 收集细胞经 Annexin V/PI 双染后, 流式细胞仪检测细胞凋亡. 在 Annexin V 高染而 PI 低染区域的细胞为早期细胞凋亡, 实验结果显示, 加药组出现了细胞凋亡现象且凋亡率为 2.1%, 而对照未加药组的细胞基本无凋亡现象, 凋亡率仅为 0.2% (图 6).

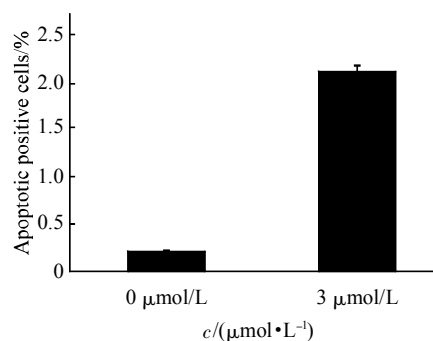


Fig. 6 Apoptosis detection assay after infection with MG132 by Annexin V-binding assay

Bel-7404 cells was treated for 48 h at an concentration of $3\ \mu\text{mol/L}$ with MG132 or remained untreated as a control. The percentage of apoptotic cells was calculated with CellQuest software (BD Biosciences). The Bel-7404 liver cancer cells treated with MG132 were positive for apoptosis, whereas untreated cells seldom displayed any apoptotic effect.

2.6 透射电镜观察内质网压力与自噬泡形成

蛋白酶体抑制剂 MG132 的作用会使细胞的蛋白酶体活性发生异常, 导致内质网压力变化. 此外, MG132 可能会诱导细胞自噬, 其中自噬泡的形成是最直接的证据. 实验采用透射电子显微镜观察加药组和对照组细胞的内质网压力变化以及自噬泡, 这是一种最直观的检测方法. 结果显示: 对照组细胞中内质网呈扁平状, 形态正常规则; 加药组中细胞内质网腔明显膨胀隆起(红色箭头标注), 推测是由于 MG132 的作用产生了内质网压力, 正常 Bel-7404 细胞中无此现象. 同时在加药组中观察到大量自噬泡的形成(蓝色箭头标注), 进一步佐证了 MG132 可以通过自噬途径抑制细胞生长(图 7).

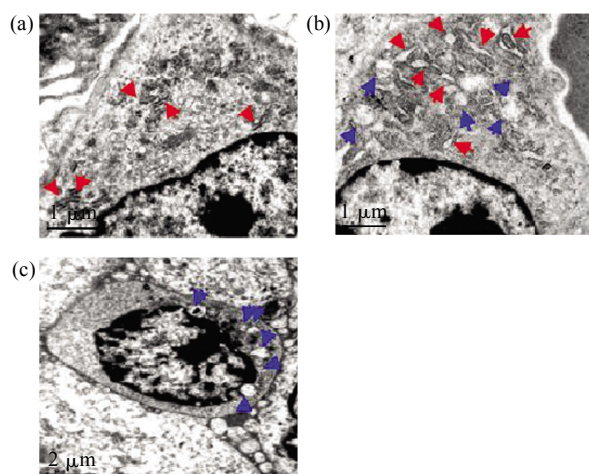


Fig. 7 Observation of endoplasmic reticulum stress and autophagic vacuoles by TEM analysis

Bel-7404 cells was treated for 48 h at an concentration of 3 $\mu\text{mol/L}$ with MG132 (b and c) or remained untreated as a control (a). $\rightarrow$: Endoplasmic reticulum; $\rightarrow$: Autophagic vacuoles.

3 讨 论

泛素-蛋白酶体途径是依赖 ATP 的非溶酶体蛋白降解途径, 是机体调节细胞内蛋白质水平与功能的一个重要机制. 此途径可以高效并且高度选择性降解细胞内蛋白质^[12-13]. 负责执行这个调控过程的组成包括泛素及其启动酶系统和蛋白酶体系统^[14]. 当蛋白酶体活性异常时, 细胞将不能有效清除这些异常蛋白质, 包括与细胞周期、凋亡等相关的各种蛋白质, 造成细胞内蛋白质异常积聚, 形成内质网压力, 这就可能会启动一些相关信号通路,

最终影响细胞功能. 近年来, 泛素介导的蛋白质降解途径在肿瘤发生中的重要性越来越受关注, 蛋白酶体已成为开发新的抗肿瘤药物和肿瘤治疗的热点.

MG132 是蛋白酶体抑制剂, 可以抑制泛素-蛋白酶体途径(UPP)中起主要催化作用蛋白酶体的催化活性, 从而阻断了 UPP 对异常蛋白的降解. 许多研究报道, MG132 通过抑制 26 S 蛋白酶体的活性, 可以影响细胞周期, 诱导细胞凋亡, 阻滞抗原递呈, 增强药物敏感性等^[15-18]. 因此, 蛋白酶体抑制剂可以影响多种细胞的生命过程, 对不同肿瘤细胞可能存在不同的分子机制.

本实验研究采用浓度梯度和时间梯度的方式给药, MG132 作用肝癌细胞 Bel-7404 后, 通过 Western blot 检测信号通路中相关蛋白质的表达, 结果分析, MG132 诱导 Bel-7404 细胞凋亡的方式可以通过激活线粒体途径, 也可以激活内质网应激途径. 此外, 细胞自噬途径中相关蛋白也被检测到呈剂量依赖性表达. 这些实验结果都有助于我们进一步研究蛋白酶体抑制剂 MG132 抑制肝癌细胞 Bel-7404 生长的机制.

3.1 MG132 对线粒体/细胞色素 c 介导的凋亡通路的影响

本研究中, MG132 作用肝癌 Bel-7404 细胞, 分别以时间梯度和剂量梯度获得蛋白质, 进行 Western blot 分析. 随着药物浓度的增加, 细胞内 Bcl-2 表达量降低, Bax 表达量增高, 随之细胞色素 c 释放也相应增加, 导致线粒体途径下游的效应 Caspase-3 被激活, 其剪切体(19 ku, 17 ku)也得到相应表达并增强. Caspase-3 的活化在细胞凋亡信号转导中起核心作用. 它是 Caspase 级联反应中一种公共的下游效应分子, 凋亡的执行人, 激活后可以引起其下游底物包括多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 的降解^[19]. PARP 是早期凋亡过程中 Caspase-3 的作用靶点. Caspase-3 经激活后能识别 PARP 中的 Asp-Glu-Val-Asp(DVCD)序列, 从而剪切 PARP^[20]. PARP 被剪切后失去正常功能, 激活受 PARP 负调控的核酸内切酶活性, 最终使核小体间 DNA 降解. 在本研究中, MG132 作用后, Bcl-2、Bax、细胞色素 c、Caspase-3、PARP 的活性及表达都发生相应改变, 且呈剂量依赖性. 因此可推断在肝癌 Bel-7404 细胞中, 蛋白酶体抑制剂 MG132 可以通过线粒体途径诱导细胞凋亡.

3.2 MG132 对内质网应激途径激活Caspase-12 凋亡通路的影响

凋亡是程序性细胞死亡,经典途径包括死亡受体途径和线粒体途径.目前已发现第三条凋亡途径——内质网应激凋亡途径,正处于热点研究阶段^[21].

内质网(endoplasmicreticulum, ER)广泛存在于真核细胞中,是调节蛋白质合成及合成后折叠、聚集的场所,是调节细胞的应激反应及细胞钙水平的场所,也是许多脂质合成的场所.内质网功能的损伤引起 ER 应激(ERS),在细胞凋亡中发挥重要作用^[22-23].透射电镜观察对照组和加药组细胞,发现正常 Bel-7404 细胞内质网压力正常,经过 MG132 作用的细胞内质网压力明显增强.此实验现象可能是由于 MG132 抑制蛋白酶体活性,致使大量未折叠或错折叠蛋白质积聚于内质网内所产生的,由此引起的强烈、持久的内质网应激反应将激活 Caspase-12 诱导细胞凋亡. Caspase-12 定位于 ER 膜上,以前体形式存在,仅在 ERS 刺激下活化,发生自内质网向胞质的移位,是内质网凋亡启动的标志物^[24].激活的 Caspase-12 可进一步剪切 Caspase-3,而引发细胞凋亡,此过程由内质网失常引起,与以膜或线粒体为靶位点的凋亡途径无关.在 Western blot 检测中, Caspase-12 的表达随着 MG132 剂量的增加而增强,呈正相关性.因此可推断在肝癌 Bel-7404 细胞中,蛋白酶体抑制剂 MG132 可以通过内质网应激途径诱导细胞凋亡.

3.3 MG132 对细胞自噬的影响

对于一个细胞来说,要除去随着时间推移所积累的不合适的蛋白质主要有两个通道:泛素-蛋白酶体系统和自噬作用,后者指的是通过一个细胞自身的溶酶体细胞器来使该细胞自己的组成部分自我破坏.自噬大部分情况下由细胞饥饿引起,同时与很多生理现象,包括分化、发育、神经性退行疾病以及恶性肿瘤的发生、发展有关^[25].微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3, three human LC3 isoforms: LC3A, LC3B 和 LC3C)与 Beclin1 均是参与自噬体形成的重要基因. LC3 是酵母自噬相关基因 Atg8 的类似物, LC3 前体(ProLC3)形成后,首先加工成胞浆可溶性形式 LC3-I,并暴露出其羧基端的甘氨酸残基.然后, LC3-I 被 Atg7 活化,转移并被修饰成自噬体膜结合形式 LC3-II. LC3-II 定位于前自噬体和自噬体,使之成为自噬体的标志分子^[26-27]. Beclin 1 是自噬的关键分子之一,它与 Class III

PI3K 结合形成复合物,促进早期自噬泡膜结构的形成^[10].实验中 MG132 以 1 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度作用 Bel-7404 细胞 48 h 后,收取蛋白质用于 Western blot 检测自噬蛋白的表达.结果表明,未处理组细胞没有 LC3-II 表达,而加药处理组有表达,且蛋白质表达量与 MG132 作用浓度成正相关.同时,加药组中 Beclin1 也得到大量表达.

此外,透射电子显微镜观察细胞内自噬泡 (autophagic vacuoles, AV)是最直观的细胞自噬检测方法.在该实验中,仅在加药组细胞中观察到大量的自噬泡形成.因此我们可以推断,蛋白酶体抑制剂 MG132 抑制肝癌细胞 Bel-7404 的机制不仅可以诱导凋亡的方式来解释,也与引起细胞自噬有关.

综上所述,研究证明,蛋白酶体抑制剂 MG132 可以显著抑制肝癌细胞 Bel-7404 的生长,并且通过流式细胞术以及 Western blot 检测结果表明: MG132 可以通过线粒体途径和内质网应激途径诱导肝癌细胞凋亡,并且可以激活细胞自噬途径进一步抑制 Bel-7404 细胞的生长.以上三种信号途径共同发挥作用实现对肝癌细胞 Bel-7404 的有效抑制.这种通过诱导肿瘤细胞凋亡或自噬来消除肿瘤已成为一种肿瘤治疗的有效方法,这将促使人们对泛素-蛋白酶体通路在细胞凋亡和自噬等现象中蛋白质泛素化降解展开进一步深入研究.同时, MG132 引起的细胞凋亡和自噬这两类程序性细胞死亡之间的相互作用机制也值得继续深入研究与探讨,相信会取得更好更新的成果.

参 考 文 献

- [1] Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structure, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1695**(123): 55-72
- [2] Hemhko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ*, 2005, **12**(9): 1191-1197
- [3] Yano M, Kanesaki Y, Koumo Y, *et al.* Chaperone activities of the 26 S and 20 S proteasome. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, **6**(2): 197-203
- [4] Strous G J, Govers R. The ubiquitin2p roteasome system and endocytosis. *J Cell Science*, 1999, **112**(10): 1417-1423
- [5] Marx J. Cell biology. Ubiquitin lives up to its name. *Science*, 2002, **297**(5588): 1792-1794
- [6] Meiners S, Laule M, Rother W, *et al.* Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation*, 2002, **105**(4): 483-489
- [7] Wente M N, Eibl G, Reber H A, *et al.* The proteasome inhibitor

- MG132 induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep*, 2005, **14**(6): 1635-1638
- [8] 饶敏, 张淑玲, 熊莉娟. 蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展. *医学分子生物学杂志*, 2005, **2**(4): 298-301
- Rao M, Zhang S L, Xiong L J. *J Med Mol Biol*, 2005, **2**(4): 298-301
- [9] Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, **275**(5303): 1129-1132
- [10] Sun Y, Zhang J, Peng Z L. Beclin1 induces autophagy and its potential contributions to sensitizes SiHa cells to carboplatin therapy. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, **19**(4): 772-776
- [11] Tang H, Da L, Mao Y, *et al.* Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy *via* up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*, 2009, **49**(1): 60-71
- [12] Satou Y, Nosaka K, Koya Y, *et al.* Proteasome inhibitor, bortezomib, Potently Inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both *in vivo* and *in vitro*. *Leukemia*, 2004, **18**(8): 1357-1363
- [13] van Kerkhof P, Alves dos Santos C M, Sachse M, *et al.* Proteasome inhibitors block a late step in lysosomal transport of selected membrane but not soluble proteins. *Mol Biol Cell*, 2001, **12**(8): 2556-2566
- [14] 吴慧娟, 张志刚. 泛素 - 蛋白酶体途径及意义. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, **26**(1): 7-10
- Wu H J, Zhang Z G. *J Int Pathol Clin Med*, 2006, **26**(1): 7-10
- [15] Zanutto-Filho A, Delgado-Cañedo A, Schröder R, *et al.* The pharmacological NFkappaB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. *Cancer Lett*, 2010, **288**(2): 192-203
- [16] Gavioli R, Vertuani S, Masucci M G, *et al.* Proteasome inhibitors reconstitute the presentation of cytotoxic T-cell epitopes in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Int J Cancer*, 2002, **101**(6): 532-528
- [17] Yuan B Z, Chapman J, Reynolds S H, *et al.* Proteasome inhibitors induce apoptosis in human lung cancer cells through a positive feedback mechanism and the subsequent Mcl-1 protein cleavage. *Oncogene*, 2009, **28**(43): 3775-3786
- [18] Li Q Q, Yunmbam M K, Zhong X, *et al.* Lactacystin enhances cisplatin sensitivity in resistant human ovarian cancer cell lines *via* inhibition of DNA repair and ERCC-1 expression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2001, **47**: 61-72
- [19] Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL *via* BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**(3): 443-449
- [20] Katsuda K, Kataoka M, Uno F, *et al.* Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene*, 2002, **21**(13): 2108-2113
- [21] Kim I, Xu W, Reed J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, **7**(12): 1013-1030
- [22] 关丽英, 许彩民, 潘华珍. 内质网应激介导的细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(11): 1136-1141
- Guan L Y, Xu C M, Pan H Z. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(11): 1136-1141
- [23] Lee M J, Kee K H, Suh C H, *et al.* Capsaicin-induced apoptosis is regulated by endoplasmic reticulum stress- and calpain-mediated mitochondrial cell death pathways. *Toxicology*, 2009, **264**(3): 205-214
- [24] Eva S, Una F, Afshin S. Caspase-12 and ER-stress mediate apoptosis the story so far. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **1010**: 186-194
- [25] Wu W K, Wu Y C, Yu L, *et al.* Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **374**(2): 258-263
- [26] Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal met121 to expose gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem*, 2004, **279**(46): 47704-47710
- [27] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, **19**(21): 5720-5728

A Study on The Mechanism of The Inhibition of Bel-7404 Hepatocarcinoma Cell Growth by MG132*

ZHANG Jing¹⁾, LI Wei¹⁾, ZHANG Kang-Jian²⁾, LIU Xi-Jun¹⁾, KONG Yan-Ping¹⁾,
NIU Na¹⁾, JIANG Hai¹⁾, ZHOU Xiu-Mei¹⁾**

¹⁾ Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract MG132(Z-Leu-leu-leu-CHO) is an inhibitor of proteasome, and it can reversibly inhibit the activation of proteasome, thereby inhibiting the degradation of protein which involved in ubiquitin-proteasome pathway (UPP), and inducing apoptosis at last. Study demonstrated that MG132 was capable of inhibition the proliferation of Bel-7404 hepatocarcinoma cell. After treated with different-concentration of MG132 at different-time, the change of morphological change and endoplasmic reticulum stress, formation of autophagic vacuoles and apoptotic bodies, cells viability, cell apoptosis, the protein expression of both apoptosis and autophagy signaling pathway related genes formation of in Bel-7404 cells were assessed by fluorescence microscope, Hoechst33342 staining, MTT assay, Annexin V /PI flow cytometry, Western blotting and transmission electron microscopy analysis. The results suggested that MG132 can inhibit Bel-7404 cells growth remarkably . It was able to activate Caspase-12 through endoplasmic reticulum stress pathway, can also influence the level of Bcl-2/Bax, and consequently induced releasing of cytochrome c through mitochondrial pathway. Both of the two different signaling pathways can activate Caspase-3 and PARP. Furthermore, MG132 increased the expression of Beclin1 and LC3B. Autophagic vacuoles were also detected by transmission electron microscopy analysis. It was confirmed that MG132 inhibited the growth of Bel-7404 cells not only *via* apoptosis pathway, but also related with autophagy pathway.

Key words proteasome inhibitor, Bel-7404 cells, apoptosis, autophagy, ER stress

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00575

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30800093) and The Zhejiang Open Foundation of The Most Important Subjects(SWYX0809).

**Corresponding author.

Tel: 86-571-86843181, E-mail: zhouxiumei824@163.com

Received: December 29, 2009 Accepted: March 24, 2010