

人胃癌 BGC-823 细胞中去甲斑蝥素抑癌作用 机理的蛋白质组学研究*

曹秋菊¹⁾ 田志华²⁾ 孙 晟¹⁾ 杨 宁¹⁾ 王 芳¹⁾ 黄凌云¹⁾
彭 安¹⁾ 柳惠图¹⁾ 张 伟^{1)**}

¹⁾ 北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875;

²⁾ 北京大学临床肿瘤医院, 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100036)

摘要 去甲斑蝥素是我国自行研制的抗肿瘤药物, 在临床上主要用于消化道肿瘤的治疗. 实验表明, 去甲斑蝥素可引起人胃癌 BGC-823 细胞发生 M 期阻滞及细胞凋亡. 进一步利用双向电泳和质谱技术, 筛选出了去甲斑蝥素抑癌作用相关蛋白. 研究显示, 线粒体热休克蛋白 CH60、线粒体 ATP 合酶 d 亚单位、内质网葡萄糖调节蛋白 GRP78、线粒体 Hsp70 的辅助因子 GRPE1、SH3L3 以及染色质组装因子 1 小亚基 RBBP4 参与了去甲斑蝥素的抑癌作用. 研究提示, 去甲斑蝥素可能通过促进线粒体热休克蛋白及 p53 的表达进而激活 caspase-3 依赖的凋亡通路, 并且去甲斑蝥素在引发内质网胁迫之后, 可通过抑制胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)的活性促进肿瘤细胞的凋亡. 进一步分析了去甲斑蝥素与线粒体 ATP 合酶抑制剂寡霉素 A 的联合用药对人胃癌细胞生长的影响, 结果表明, 联合用药的抑癌效果比单独用药的抑癌效果显著, 提示去甲斑蝥素可能通过抑制线粒体 ATP 合酶功能抑制 BGC-823 生长. 上述结果为优化去甲斑蝥素的联合用药方案提供了新线索.

关键词 去甲斑蝥素, M 期阻滞, 细胞凋亡, 蛋白质组学
学科分类号 Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00068

斑蝥素(cantharidin)是从芫青科南方大斑蝥或黄黑小斑蝥体内提取出的一种半萜烯毒素, 具有较好的抗肿瘤活性. 去甲斑蝥素(NCTD)是人工合成的斑蝥素衍生物, 其毒副作用明显降低, 可选择性地抑制肿瘤细胞生长, 并具有抑制肿瘤转移的活性^[1]. 已有报道表明, 在多种肿瘤细胞系中, 去甲斑蝥素可导致细胞周期阻断在 G2/M 期, 并通过线粒体凋亡通路诱导细胞凋亡^[2]. 而这一过程可能与去甲斑蝥素能够特异性抑制 PP2A(蛋白磷酸酶 2A)和 PP1(蛋白磷酸酶 1)的活性有关^[3], 但其作用的相关蛋白还有待于进一步阐明.

本研究以人胃癌 BGC-823 细胞为实验模型, 从细胞水平上探讨了去甲斑蝥素对人胃癌细胞增殖及凋亡的影响. 基于去甲斑蝥素抑癌作用复杂, 可能涉及多条信号通路, 为了从整体的、动态的角度对去甲斑蝥素的抑癌作用分子机理进行系统的研究, 我们利用双向电泳与质谱技术分析和筛选去甲斑蝥素抑癌作用相关蛋白, 并对其作用的分子机理进行了分析, 该研究为进一步揭示去甲斑蝥素作用

的分子机制提供了新思路.

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞 BGC-823 北京师范大学生命科学学院保存; DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究; 去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)购自北京大学医学部; 鼠抗 procaspase-3 单抗、鼠抗 caspase-9 单抗、鼠抗 p53 单抗、兔抗 β -actin 单抗均购自 Santa Cruz 公司; 鼠 p-ERK 单抗购自 Cell Signaling Technology 公司. Oligomycin A 购自 Sigma 公司; IPG strip 购自 Bio-Rad 公司; M-MLV 逆转录酶和 Taq 酶均购

* 国家自然科学基金(30300173), 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02Z4A6)和北京市优秀人才培养(D)(20071D0503100293)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-58809699, E-mail: zhangwei@bnu.edu.cn

收稿日期: 2009-02-04, 接受日期: 2009-03-24

自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(含 100 U/ml 青霉素, 100 g/L 链霉素)中于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长曲线. 将 BGC-823 细胞接种于 96 孔板(10⁴ 个/孔), 24 h 后加入含有相应浓度去甲斑蝥素的培养基培养, 此时记作 0 h, 每隔 24 h 测定一次, 直至 120 h. 测定时加入 MTT(终浓度 0.5 g/L), 4 h 后加入裂解液(终浓度 0.005 mol/L HCl 和 50 g/L SDS), 孵育过夜, 利用酶标仪读取 A₅₇₀ 值(参考波长 655 nm), 每个点取 4 个平行孔的平均值. 生长抑制率=(1-加药组 A₅₇₀/对照组 A₅₇₀)×100%。

1.2.3 流式细胞术. 按文献[3]中的方法进行。

1.2.4 细胞计数及台盼蓝染色. 按文献[3]中的方法进行。

1.2.5 PI/Hoechst 33342 双染色. 按文献[3]中的方法进行。

1.2.6 Western blot 测定. 用裂解液(100 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 25 g/L SDS, 10% β-mercaptoethanol, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油)裂解细胞. Bradford 法测定蛋白质浓度. 进行 SDS-PAGE, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%~12%, 而后将蛋白质条带转移到 NC 膜上. 封闭, 一抗孵育, 二抗孵育和曝光等步骤按照抗体说明书和 ECL 试剂盒(Amersham Pharmacia)说明进行操作。

1.2.7 双向电泳. 收集细胞, 用山梨醇缓冲液(25 mmol/L山梨醇, 10 mmol/L Tris-HCl pH7.4)洗 3 次, 加入裂解液(8 mol/L 尿素, 40 mmol/L Tris, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 1% pharmalyte, 5 mmol/L Na₃VO₄, 1 g/L aprotinin, 1 g/L leupeptin 和 5 mmol/L PMSF), 冰上裂解 1 h. 液氮中反复冻融 3 次. 超声裂解(20W, 每次超声 2 s, 间隔 5 s, 超声 4 次). 4℃ 12 000 g, 离心 45 min, 取上清. Bradford 法测定蛋白质浓度. 一向电泳: 用水化液(8 mol/L 尿素, 20 g/L CHAPS, 4 g/L DTT 和 0.5% IPG 缓冲液, 痕量溴酚蓝)稀释样品(总蛋白均为 1.2 mg), 总体积 320 μl. 水化 IPG 胶条(pH4~7) 30 min, 等电聚焦程序为: 50 V, 16 h(线性); 150 V, 1 h; 300 V, 1 h; 600 V, 1 h; 1 200 V, 1 h; 10 000 V, 2 h; 10 000 V, 45 000 Vh(快速). 二向电泳: 用 φ=1%的 DTT 平衡液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30%甘油, 20 g/L SDS)平衡

IPG 胶条 15 min, 用 φ=2.5%的碘乙酰胺平衡液平衡 IPG 胶条 15 min, 进行 φ=12.5%的 SDS-PAGE, 二向电泳程序为: 先进行恒功率电泳, 每块胶 3W, 1 h, 而后进行恒流电泳, 每块胶 10 mA, 2.5 h, 最后进行恒流电泳, 每块胶 15 mA 直至溴酚蓝到达分离胶底部. R350 染色过夜, 脱色至背景干净。

1.2.8 质谱鉴定. 按文献[4]中的方法进行。

1.2.9 RT-PCR. 按 TRIZOL 说明书(Gibco)提取 RNA, 按照 M-MLV 逆转录酶说明书进行反转录. CH60_HUMAN 和 GRP78 的 PCR 引物及程序参考文献[5, 6].

1.2.10 生物统计学. 检测数据用非参数检验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 显示。

2 结果与分析

2.1 NCTD 对 BGC-823 细胞生长的影响

利用 MTT 法和细胞计数实验检测 NCTD 对 BGC-823 细胞生长的影响. 结果表明, NCTD 对细胞的生长抑制作用存在着明显的时间与剂量依赖性(图 1a), 15 mg/L NCTD 处理 24 h 细胞坏死率仅

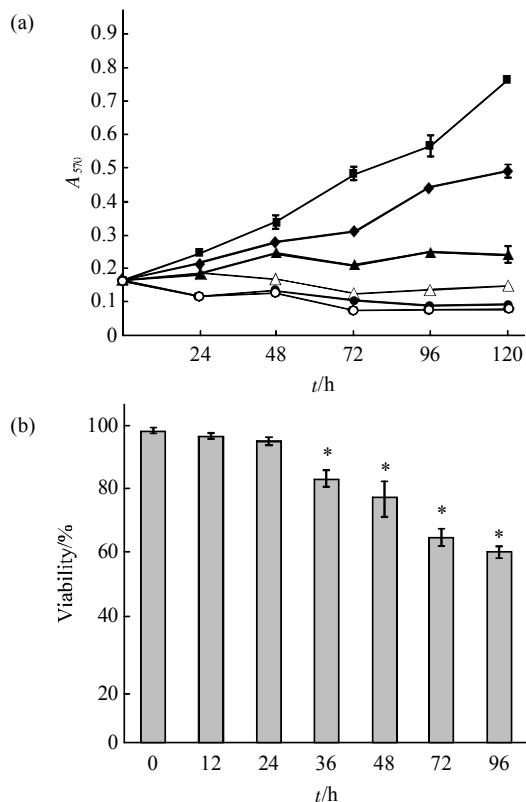


Fig. 1 The effect of NCTD on the growth of BGC-823 cell line

(a) The inhibitory effect of NCTD on the growth of BGC-823 cell line by MTT assay. ■—■: 0 mg/L; ◆—◆: 5 mg/L; ▲—▲: 10 mg/L; △—△: 15 mg/L; ●—●: 20 mg/L; ○—○: 25 mg/L. (b) The effect of 15 mg/L NCTD on the viability of BGC-823 cells (*P < 0.05) by cell counting.

为 4.74%，此时与对照组相比细胞的存活率并没有发生明显的改变，随着药物作用时间的延长，细胞的存活率明显降低，与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$, 图 1b)。

2.2 NCTD 对 BGC-823 细胞周期的影响

15 mg/L NCTD 分别处理细胞 0 h、24 h、48 h，通过流式细胞术分析细胞周期时相。结果显示，

BGC-823 细胞经 15 mg/L NCTD 处理 24 h，G2 与 M 期细胞数占总细胞数的 49.6%，是对照组的 3.22 倍，经 NCTD 处理 48 h，G2 与 M 期细胞数占总细胞数的 38.5%，与 NCTD 处理 24 h 相比，G2 与 M 期比例有一定程度的下降(图 2)。结果表明，NCTD 可引起人胃癌 BGC-823 细胞发生 G2/M 期阻滞。

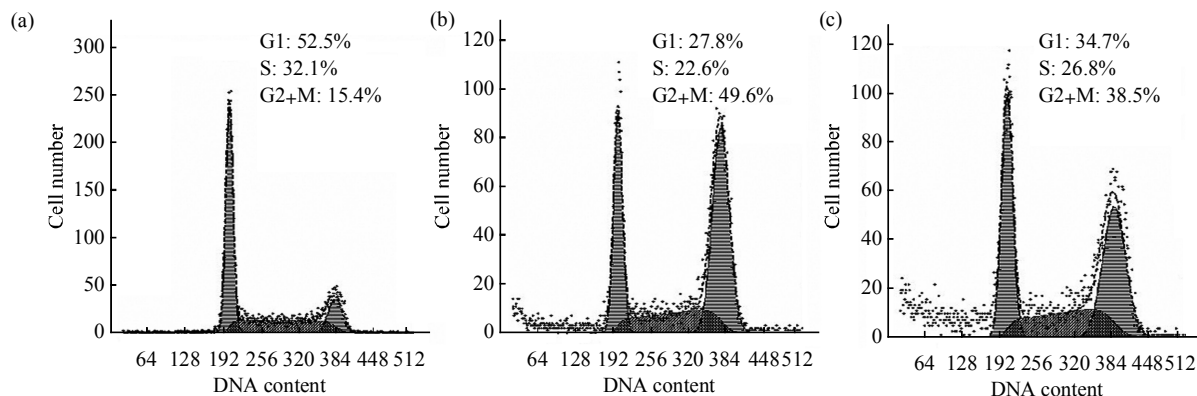


Fig. 2 The effect of 15 mg/L NCTD on the cell cycle of BGC-823 cell line

(a) 0 h. (b) 24 h. (c) 48 h.

2.3 NCTD 对 BGC-823 凋亡的影响

PI/Hoechst33342. 双染色后在荧光显微镜下观察，结果显示：15 mg/L NCTD 处理 BGC-823 细胞 24 h，一些细胞呈现凋亡形态特征，即染色质不均匀凝集，有凋亡小体形成，但是质膜仍保持完整。处理 48 h，凋亡细胞和坏死细胞数量均增加。另外，处理细胞 24 h 及 48 h 视野中亦发现很多处

于有丝分裂期的细胞，表明 15 mg/L NCTD 处理可引起细胞发生 M 期阻滞(图 3a)。利用流式细胞术对 SubG1 细胞的检测结果显示：15 mg/L NCTD 处理 24 h，SubG1 细胞亚群所占比例为 14.15%，处理 48 h，SubG1 细胞亚群所占比例为 16.95%，随着 NCTD 处理时间的延长，SubG1 细胞亚群所占比例增加，结果见图 3b。

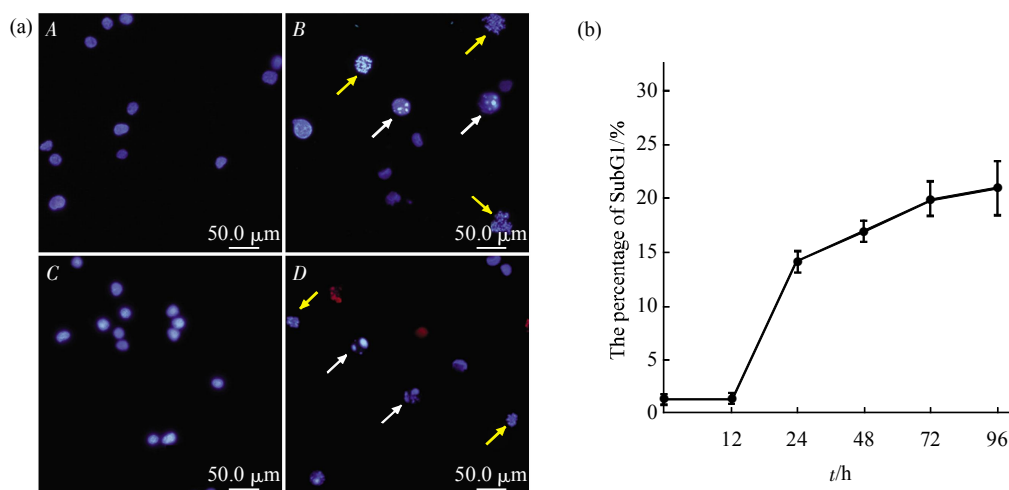


Fig. 3 The effect of 15 mg/L NCTD on the apoptosis of BGC-823 cells

(a) The effect of 15 mg/L NCTD on the morphology of the nucleus of BGC-823 cells. A, C: The control groups; B: The group treated with 15 mg/L NCTD for 24 h; D: The group treated with 15 mg/L NCTD for 48 h. The white arrows show the apoptotic cells, and the yellow show the mitotic cells. (b) The percent of cells in SubG1 phase in BGC-823 cells treated with 15 mg/L NCTD.

2.4 去甲斑蝥素作用相关蛋白的筛选及作用机理的探讨

用 15 mg/L NCTD 处理 BGC-823 细胞 24 h, 分别取对照组和加药组的细胞全蛋白进行双向电泳, 一向电泳 pH4~7, 二向 SDS-PAGE 的胶浓度为 12.5%。经 Melanie3Trial 软件分析, 在对照组图上共有 501 个点, 在加药组图上共有 486 点, 其中两组图匹配点共有 415 个, 匹配率为 84.09%。分 3 次对 3 对实验组和对照组的样品进行了双向电泳获得了 16 个在 NCTD 处理组和对照组表达差异在 2 倍以上, 且具有可重复性的蛋白质, 结果见图 4。灰度分析显示处理后上调的蛋白质 12 个, 下调的蛋白质 4 个。以 *d4* 蛋白为例说明灰度分析结果, 见图 5。

进一步用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)分别对 2-DE 胶上选定的 10 对差异点进行一级肽指纹图谱(PMF)和二级肽指纹图谱(MS/MS)分析(the mass tolerance of 50 ppm)。搜索内部数据库和外部数据库(<http://www.matrixscience.com> and <http://cn.expasy.org/sprot/>)鉴定得到 10 个差异蛋白的相关信息, 结果见表 1。

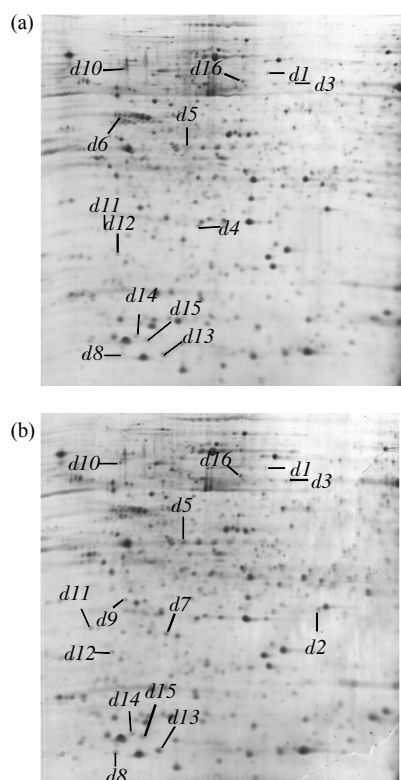


Fig. 4 The effect of 15 mg/L NCTD on the proteomics of BGC-823 cell line

(a) The control group. (b) The group exposed to 15 mg/L NCTD for 24 h.

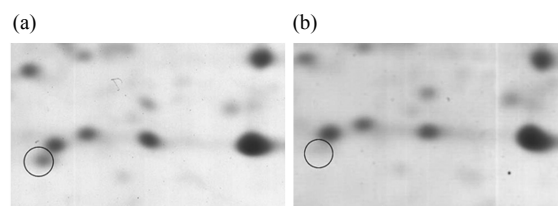


Fig. 5 The comparison of protein levels of the differential spot *d4*

(a) The control group. (b) The group exposed to 15 mg/L NCTD for 24 h.

利用 RT-PCR 方法分析了 NCTD 对部分差异蛋白 [*d3*(CH60_HUMAN), *d10*(GRP78_HUMAN)] mRNA 水平的影响, 选择 β -actin 作为内参。结果表明, 与对照组细胞相比, 15 mg/L NCTD 处理 24 h, *d3*(CH60_HUMAN), *d10*(GRP78_HUMAN) mRNA 水平上调约为 2 倍, 结果见图 6, 提示去甲斑蝥素可能通过调节细胞中 CH60 及 GRP78 mRNA 的水平, 引起其蛋白质水平的改变。

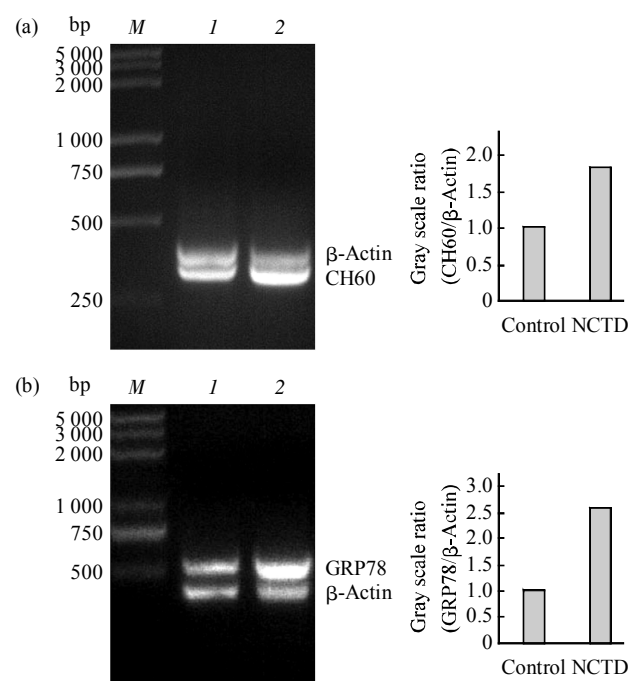


Fig. 6 The effect of 15 mg/L NCTD on the mRNA level of CH60 and GRP78

(a) The effect of 15 mg/L NCTD on the mRNA level of CH60. (b) The effect of 15 mg/L NCTD on the mRNA level of GRP78. M: DL2000 marker; 1: The control group; 2: The group treated with 15 mg/L NCTD 24 h.

Table 1 The results of identification by MS/MS^[7~13]

No.	AC	Name	M/ku	pI	Control /NCTD	Description	Function
d2	Q9HAV7	GRPEL1	24 279	8.19	0.03/0.15	GrpE protein homolog 1, mitochondrial [Precursor]	GrpE facilitates the exchange of mtHsp70 bound ADP with ATP. p53 localized to mitochondria in a complex with mtHsp70 at onset of p53-dependent apoptosis after either DNA damage or hypoxic damage ^[7] .
d3	P10809	HSPD1	61 055	5.64	0.06/0.14	60 ku heat shock protein, mitochondrial [Precursor], CH60	Mitochondrial Hsp60, mtHsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis ^[8] .
d4	NP_006347	ATP5H	18 491	5.21	0.23/0.03	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F ₀ complex, subunitd, isoform a	F ₀ F ₁ -ATP synthase, a complex V of the electron transport chain, is an important constituent of mitochondria-dependent signaling pathways involved in apoptosis ^[9] .
d6	Q09028	RBBP4	47 656	4.59	0.35/0.17	Histone-binding protein RBBP4	Initially identified as retinoblastoma binding proteins. Subsequently, It was characterized as components of at least four distinct nucleosome-modifying complexes, the nuclear histone deacetylases (HDACs), the Drosophila nucleosome-remodeling factor NURF, chromatin assembly factor 1 (CAF-1), and Hat1, a type B (cytoplasmic) histone acetylase involved in chromatin assembly ^[12] .
d7	P16949	STMN1	17 303	5.87	0.03/0.37	Stathmin	Stathmin is a major cytosolic phosphoprotein that plays an important role in the control of cellular proliferation by regulating the dynamics of the microtubules that make up the mitotic spindle. Stathmin is expressed at high levels in a wide variety of human cancer cells and provides an attractive molecule to target in cancer therapies ^[10] .
d8	Q9H299	SH3BGL3	10 438	4.65	0.02/0.16	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	A member of Grxs (glutathione dependent oxidoreductases) that catalyze the reduction of protein disulfides and of glutathione-protein mixed disulfides. Grxs are involved in diverse cellular functions, including the activation of enzymes, such as ribonucleotide reductase, the regulation of transcription factors, Grx has been shown to function as a redox sensor, <i>via</i> a direct interaction with the apoptosis signal-regulating kinase ^[11] .
d10	P11021	HSPA5	72 333	4.90	0.05/0.20	78 ku glucose-regulated protein [Precursor], GRP78	ER stress marker, a multifunctional molecular chaperone protein that involved in controlling the activation of the UPR pathways in response to ER stress ^[13] .
d12	P24534	EEF1B2	24 764	4.33	0.09/0.20	Elongation factor 1-beta	EF-1 beta possesses GTP/GDP exchange activity. EF-1 beta is a substrate for Casein kinase II and is phosphorylated <i>in vivo</i>
d13	O75531	BANF1	10 059	5.93	0.35/0.83	Barrier-to-auto integration factor	BAF is required for the integrity of the nuclear lamina and normal progression of S phase in human cells
d15	P61970	NUTF2	14 478	5.08	0.18/0.38	Nuclear transport factor 2	Nuclear transport factor-2 (NTF-2) functions in yeast and mammalian cell culture in targeting proteins into the nucleus.

用 15 mg/L NCTD 处理 BGC-823 细胞 24 h 及 48 h, 提取细胞总蛋白, 利用免疫印迹方法对去甲斑蝥素作用的分子机理进行了初步分析(图 7). 结果表明, NCTD 作用 24 h, procaspase-3 的水平明显降低, 随着药物作用时间的延长, procaspase-3 的含量进一步降低. p-ERK 水平在 NCTD 作用 24 h 没有明显的改变, 但在药物作用 48 h 其水平明显降低, 而 p53 的表达水平则在 NCTD 作用后有所升高, caspase-9 的表达水平则没有明显的改变. 由于 procaspase-3 在多种组织中组成性表达, 在凋亡信号的刺激下被裂解激活. 本研究提示 procaspase-3 可能被裂解为成熟 caspase-3, 进而诱导细胞凋亡. 已有研究表明, mt-Hsp70 参与细胞凋亡过程, 并且其促凋亡功能可能与 p53 活性有关^[7]. 本研究提示, NCTD 可能通过促进线粒体热休克蛋白及 p53 的表达进而激活 caspase-3 依赖的凋亡通路.

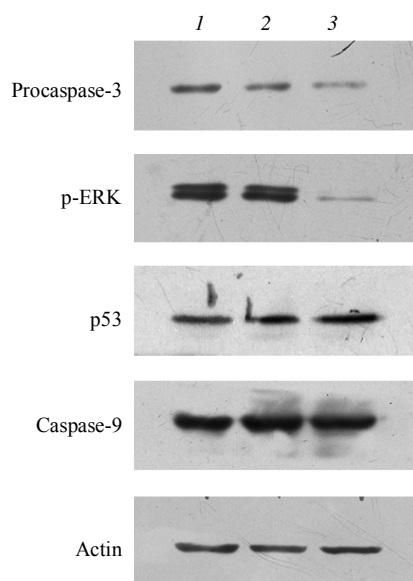


Fig. 7 The effect of 15 mg/L NCTD on the protein level of BGC-823 cells

1: Control; 2: 15 mg/L NCTD 24 h; 3: 15 mg/L NCTD 48 h.

基于去甲斑蝥素可以下调线粒体 ATP 合酶 F₀ 复合物 d 亚单位, 进而抑制线粒体 ATP 合酶的活性, 为了进一步探讨线粒体 ATP 合酶在去甲斑蝥素抑癌过程中的作用, 我们利用 MTT 分析方法初步观察了线粒体 ATP 合酶的抑制剂 oligomycin A 和去甲斑蝥素联合用药对 BGC-823 细胞增殖的影响. 结果表明, 在 5 mg/L NCTD 和 0.1 μmol/L

oligomycin A 联合用药对 BGC-823 的生长抑制作用比单独用药更为显著(图 8).

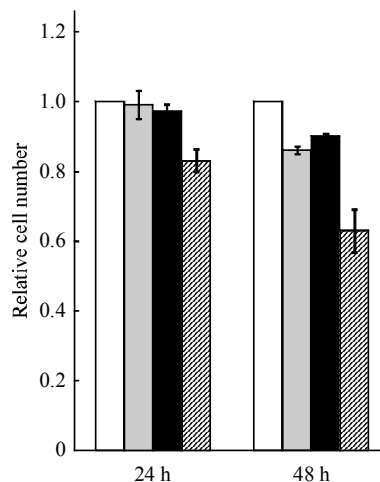


Fig. 8 The effect of the combinational treatment of NCTD and oligomycin A on the growth of BGC-823 cell

□: Control; ▒: NCTD(5 mg/L); ■: Oligomycin A(0.1 μmol/L); ▨: NCTD(5 mg/L) + oligomycin A(0.1 μmol/L).

3 讨 论

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是拥有我国自主知识产权的抗肿瘤药物, 用于多种肿瘤的治疗, 尤其是肝癌、胃癌和食道癌等. 大量的研究表明, 去甲斑蝥素可以引起多种肿瘤细胞凋亡, 但对其作用相关蛋白及信号调节通路的研究却知之甚少. 本研究以 BGC-823 细胞为模型, 观察了去甲斑蝥素对人胃癌细胞增殖及凋亡的影响. 研究发现, 去甲斑蝥素作用于 BGC-823 细胞, 可引起有丝分裂阻抑及细胞凋亡.

为了寻找新的去甲斑蝥素作用相关蛋白, 进一步阐明去甲斑蝥素的下游信号通路, 本研究利用蛋白质组学方法, 鉴定出 10 种去甲斑蝥素作用相关的蛋白质, 按照差异蛋白的亚细胞定位将其分为:

a. 线粒体蛋白, 线粒体 ATP 合酶 d 亚单位, CH60(线粒体 Hsp60), GRPE1(线粒体 Hsp70 的辅因子); b. 内质网蛋白, GRP78(葡萄糖调节蛋白 78); c. 核蛋白, RBBP4(染色质组装因子 1 小亚基), BAF(障碍自整合因子), NTF2(核运输因子 2); d. 胞浆蛋白, SH3L3 和 EF-1B(延长因子 1β).

研究表明, 去甲斑蝥素可以促进 BGC-823 细胞中线粒体热休克蛋白 CH60、线粒体 Hsp70

(mt-Hsp70)的辅因子 GRPE1 的表达. 并且, NCTD 作用后细胞中 procaspase-3 的水平明显降低, p53 的表达水平则明显升高. 已有研究显示, CH60 可通过活化 caspase-3 促进细胞的凋亡^[8]. 而 mt-Hsp70 与氨基酸饥饿和缺血诱导的细胞凋亡有关, 在多药抗性细胞中线粒体热休克蛋白的表达水平明显低于药物敏感细胞, 并且 mt-Hsp70 在线粒体上可与 p53 形成复合物, 提示其促凋亡功能可能与 p53 活性有关^[7]. 我们的研究提示, 去甲斑蝥素可能通过促进线粒体热休克蛋白及 p53 的表达进而激活 caspase-3 依赖的凋亡通路.

内质网是各种胁迫攻击的主要对象之一, 内质网起初会启动各种机制确保细胞存活, 而延长或严重的内质网胁迫则会导致细胞凋亡. GRP78 是内质网胁迫的标志分子, 抗癌药物通常会促进肿瘤细胞中 GRP78 的表达. 选择性地抑制 ERK 的活性则会增强细胞对药物的敏感性, 促进细胞的凋亡^[14~16]. 本研究显示, BGC-823 细胞经 15 mg/L NCTD 处理 24 h, 细胞中 GRP78 的表达明显升高, 磷酸化 ERK 水平没有明显的改变, 而药物作用 48 h 后磷酸化 ERK 水平显著降低. 本研究初步显示, 去甲斑蝥素在引发内质网胁迫之后, 可通过抑制 ERK 的活性促进肿瘤细胞的凋亡, 这可能是去甲斑蝥素能够有效杀伤肿瘤细胞的分子机理之一.

本研究发现去甲斑蝥素引起线粒体 ATP 合酶 d 亚单位下调. 线粒体 ATP 合酶是细胞能量调控的核心成分, 与细胞的增殖与凋亡密切相关. 研究表明抑制 ATP 合酶活性可以诱导人黑色素瘤细胞和人白血病细胞凋亡^[9]. 在光动力疗法中卟啉光敏增感剂可以显著抑制线粒体 ATP 合酶的活性. 另外, 有研究显示去甲斑蝥素作用于人白血病细胞系 HL-60, 可使线粒体 ATP 合酶 c 亚单位和亚单位 9 下调^[17]. 推测去甲斑蝥素可能通过抑制线粒体 ATP 合酶进而诱导细胞凋亡. 本研究分析了去甲斑蝥素与线粒体 ATP 合酶抑制剂寡霉素 A 联合用药对人胃癌细胞生长的影响, 结果表明, 联合用药的抑癌作用效果比单独用药更为显著, 提示去甲斑蝥素可能通过抑制线粒体 ATP 合酶功能抑制 BGC-823 生长, 本研究为去甲斑蝥素增效减毒的研究以及优化联合用药方案提供了新线索.

SH3L3(SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3)是谷胱甘肽依赖的氧化还原酶(Grx)超家族成员, 但却缺少 Grx 的活性位点, 它可能通过与 Grx 竞争性的结合底物起到 Grx 调节者的作

用^[11]. 有报道表明, 斑蝥素可引起细胞内活性氧的产生, 氧化胁迫可导致 DNA 损伤并进一步启动 p53 依赖性的细胞凋亡^[18]. 去甲斑蝥素是否以类似的机制诱导细胞凋亡, 以及是否通过 SH3L3 提高细胞内的活性氧水平还有待于进一步研究.

去甲斑蝥素引起 RBBP4(染色质组装因子 CAF-1 小亚基)下调. RBBP4 可特异性结合组蛋白 H3/H4, 参与了对 DNA 复制、核小体组装、DNA 损伤修复、基因转录抑制、细胞增殖及凋亡等过程的调节. 在 DNA 双链断裂(DSBs)情况下, CAF-1 和 PCNA 表达上调并被招募到损伤的染色质位点, 以剪接修复和非同源末端连接的方式参与 DNA 单-双链的断裂修复, CAF-1 缺失导致 ATR/ATM 或 Chk1 和 p53 的活化^[12]. 本研究显示, 去甲斑蝥素可能通过下调 RBBP4 的水平, 干扰 DNA 损伤的修复作用, 从而引起细胞周期的阻抑与细胞凋亡.

参 考 文 献

- 1 Liu X H. Effects of norcantharidin, a protein phosphatase Type-2A inhibitor, on the growth of normal and malignant haemopoietic cells. *Euro J Cancer*, 1995, **31A** (6): 953~963
- 2 Chen Y N. Effector mechanisms of norcantharidin-induce mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int J Cancer*, 2002, **100**(2): 158~165
- 3 Sakoff J A. Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues. *Investigational New Drugs*, 2002, **20**(1): 1~11
- 4 Guo F Z. Proteomic analysis of the transition from quiescent to proliferation stages in rat liver hepatectomy model. *Proteomics*, 2006, **6**(10): 3075~3086
- 5 Bajramović J J. Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. *J Neuroimmunology*, 2000, **106**(1~2): 14~22
- 6 Wang S M. A method for the quantitative analysis of human heat shock gene expression using multiplex RT-PCR assay. *Cell Stress & Chaperons*, 1999, **4**(3): 153~161
- 7 Um J H, *et al.* Involvement of DNA- dependent protein kinase in regulation of the mitochondrial heat shock proteins. *Leukemia Research*, 2003, **27**(6): 509~516
- 8 Xanthoudakis S. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J*, 1999, **18**(8): 2049~2056
- 9 Wolvetang E J. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Letters*, 1994, **339**(1~2): 40~44
- 10 Zhang H Z, Wang Y, Gao P, *et al.* Silencing stathmin gene expression by survivin promoter-driven siRNA vector to reverse malignant phenotype of tumor cells. *Cancer Biol Ther*, 2006, **5**(11): 1457~1461

- 11 Nardini M, *et al.* Crystal structure of the glutaredoxin-like protein SH3BGR13 at 1.6 Å resolution. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318**(2): 470~476
- 12 Hoek M, Stillman B. Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(21): 12183~12188
- 13 Lou L X, *et al.* Endoplasmic reticulum stress response is involved in the pathogenesis of stress induced gastric lesions in rats. *Life Sciences*, 2006, **79**(19): 1856~1864
- 14 Ou Y C, *et al.* Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT. *Eur J Pharmacology*, 2007, **563**(1~3): 49~60
- 15 Jiang C C, Chen L H, Gillespie S, *et al.* Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res*, 2007, **67**(20): 9750~9761
- 16 Zhang L J, Chen S, Wu P, *et al.* Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells. *Cancer Lett*, 2009, **274**(1): 40~46
- 17 Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, **39**(1): 85~89
- 18 Efferth T. Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 2005, **69**(5): 811~818

Determination of Norcantharidin-associated Proteins by Comparative Proteomic Analysis in BGC-823 Cells*

CAO Qiu-Ju¹⁾, TIAN Zhi-Hua²⁾, SUN Sheng¹⁾, YANG Ning¹⁾, WANG Fang¹⁾,
HUANG Ling-Yun¹⁾, PENG An¹⁾, LIU Hui-Tu¹⁾, ZHANG Wei^{1)**}

¹⁾ Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences,
Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

²⁾ Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Peking University School of Oncology,
Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100036, China)

Abstract Norcantharidin (NCTD) is an effective anti-tumor drug developed by China independently. It has been widely used for clinical therapy especially in digestive tract cancers. It was found that NCTD can induce M arrest and apoptosis in a dose- and time-dependent manner in BGC-823 cell line. In order to reveal the molecular mechanism by which NCTD actions systemically, a comparative analysis of proteomic profiling was conducted between control cells and NCTD treated cells by 2-D and mass spectrum. The results indicated that mitochondrial heat shock protein CH60, ATP synthase d subunit, ER glucose-regulated protein GRP78, mitochondrial Hsp70 related factor GRPE1, SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein SH3L3 and Histone-binding protein RBBP4 may involve in the antitumor function of NCTD. The result suggested that NCTD might induce caspase-3 dependent apoptosis through promoting the expression of mitochondrial heat shock protein and p53. NCTD can promote the apoptosis by inhibiting the activity of ERK after inducing ER stress. The combinational treatment of BGC-823 cells with oligomycin A, an inhibitor of mitochondrial ATP synthase, and NCTD inhibited the growth of BGC-823 cells more evidently compared with single drug treatment. This result confirmed that NCTD can suppress the growth of BGC-823 by inhibiting the activity of mitochondrial ATP synthase.

Key words norcantharidin, M phase arrest, apoptosis, proteomics

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00068

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30300173), The National High Technology Research and Development Program of China(863,2006AA02Z4A6) and Beijing Talents Foundation(20071D0503100293).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-58809699, E-mail: zhangwei@bnu.edu.cn

Received: February 4, 2009 Accepted: March 24, 2009