

[文章编号] 1000-4718(2005)10-1888-04

Manumycin 通过诱导细胞凋亡抑制人胰腺 导管癌细胞 Panc-1 活性*

杨惠玲¹, 陶祥¹, 杨林², 郑芹¹

(1)中山大学病理生理学教研室, 广东广州 510080; (2)中山大学附属第三医院传染病科, 广东广州 510630)

[摘要] 目的:观察 manumycin 对人胰腺导管癌细胞 Panc-1 的抑制效应,并探讨其诱导细胞凋亡是否经 p38^{MAPK}介导。方法:用 MTT 法检测 manumycin 对 Panc-1 细胞的抑癌作用。用 caspase-3 活性检测试剂盒定量检测 manumycin 诱导细胞凋亡的水平及评估特异性的 p38^{MAPK} 抑制剂 SB203580 对它的影响。结果:经 manumycin (6 μmol/L、18 μmol/L、54 μmol/L)处理 Panc-1 细胞 24 h,对 Panc-1 细胞生长具有明显的抑制作用,其抑制率分别为 8.9%、21.9%和 67.0%,其中后二者的细胞活性与对照组相比有显著差异($P < 0.01$),呈量效关系。用药 24 h 的 IC₅₀ 为 34.7 μmol/L。同时,此药物可明显增加 caspase-3 的活性,且这一效应可部分地被 p38 抑制剂 SB203580 阻断。结论:Manumycin 可通过诱导 Panc-1 细胞凋亡而产生抑癌作用,p38^{MAPK} 是 manumycin 诱导细胞凋亡的通路之一。

[关键词] Manumycin; 胰腺导管癌; 细胞凋亡; p38MAP 激酶

[中图分类号] R735.905.3

[文献标识码] A

Manumycin inhibits activity of pancreatic duct cancer cell line Panc-1 via inducing apoptosis

YANG Hui-ling¹, TAO Xiang¹, YANG Lin², ZHENG Qin¹

(1)Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; (2)Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

[ABSTRACT] **AIM:** In this study, we investigated the anticancer effect and mechanisms of manumycin on pancreatic cancer cell line - Panc-1 and the role of p38^{MAPK} pathway in apoptosis. **METHODS:** The test of anticancer effect was performed by MTT assay. Apoptosis was induced in the cells by manumycin and then treated with SB203580, a specific p38^{MAPK} inhibitor. A quantitative caspase-3 activity assay kit was used in this experiment. **RESULTS:** Manumycin (6 μmol/L, 18 μmol/L, 54 μmol/L) significantly inhibited cell growth of pancreatic cancer cell line Panc-1. The inhibition rates 24 h after treatment with 6 μmol/L, 18 μmol/L and 54 μmol/L manumycin were 8.9%, 21.9% and 67.0%, respectively. Compared with the control group, the survival levels of the last two groups were of significant statistical difference ($P < 0.01$). The anticancer effects also showed dosage-effect relationship, the value of IC₅₀ 24 h after treatment was 34.7 μmol/L. In addition, this reagent simultaneously activated caspase-3 protein, which was partly blocked by p38^{MAPK} specific inhibitor, SB203580. **CONCLUSION:** Manumycin exerted anticancer effect on Panc-1 cell line via inducing cell apoptosis, which was partly regulated by p38^{MAPK}.

[KEY WORDS] Manumycin; Pancreatic neoplasms; Apoptosis; p38 MAP kinase

胰腺癌是一种高度恶性的肿瘤,5 年生存率仅 10% 左右。手术治疗是目前最为理想的治疗手段,其疗效依赖于早期诊断。但遗憾的是胰腺癌患者的早期症状与体征缺乏特异性,明确诊断时大多已属晚期而失去手术机会;同时胰腺癌对现有的化疗药物普遍不敏感^[1],故寻找一种高效低毒的化疗药物对于提高胰腺癌病人的存活率有重要的意义。

Manumycin 属于法尼基转移酶抑制剂(farnesyl-transferase inhibitor, FTI)。Manumycin 及相关化合物最初是从链丝菌培养液中以其抗真菌活性被发现,直至 1993 年始发现其有抑癌作用^[2]。目前,manumycin 已试用于多种肿瘤治疗的研究。Reddy 等^[3]研究认为 Ras 蛋白的突变使其持续性激活,是促肿瘤形成以及细胞增殖的重要原因;Mizumoto 等^[4]

[收稿日期] 2004-08-14

[修回日期] 2004-11-05

* [基金项目] 广东省重大科技专项基金资助项目(No.2004A30801006);国际合作项目(2004B50301003)

Tel: 020-87332626; E-mail: hlyang@gzsums.edu.cn

的研究发现约 90% 的胰腺癌病例中有 Ras 蛋白的突变。研究表明, manumycin 可以抑制 Ras 蛋白活化依赖性的法尼基转移酶^[2], 并且发现其对突变型的 Ras 蛋白亲和力高于野生型的 Ras 蛋白^[5]。另外, 研究还认为 Ras - MAPK 通路介导了促细胞增殖和细胞凋亡两种截然相反的效应^[6]。然而, manumycin 是否通过 p38^{MAPK} 介导细胞凋亡而抑制 Panc - 1 细胞, 至今文献未见报道。故本研究拟采用 MTT 法和 caspase - 3 活性试剂盒研究 manumycin 对培养的 Panc - 1 细胞的抑瘤作用, 拓展该药物在胰腺癌的应用前景。并初步探讨 Ras - MAPK 通路中的 p38^{MAPK} 途径在 manumycin 诱导 Panc - 1 细胞凋亡中的作用。

材 料 和 方 法

1 材料

Manumycin (手霉素)、SB203580 [4 - (4 - fluorophenyl) - 2 - (4 - methylsulfinylphenyl) - 5 - (4 - pyridyl) - 1H - imidazole]、二甲基亚砜 (DMSO, 组织培养级)、MTT [3 - (4, 5 - dimethylthiazolyl) - 2 - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide] 均为 Sigma Chemical Co. (St. Louise, MO) 的产品。DMEM 培养基、胰酶、EDTA 以及培养基中的添加成份均购自 Life Technologies, Inc (Gaithersburg, MD)。Enzchek Caspase - 3 活性检测盒 No. 2 购自 Molecular Probes, Inc (Eugene, OR)。人胰腺导管细胞癌株 Panc - 1 由 MD. Anderson Cancer Center (Houston, TX) 提供。

2 MTT 法测细胞活性

胰酶消化对数生长期的细胞, 用含 10% 灭活小牛血清的 DMEM 培养液 (含 10% 灭活小牛血清, 1×10^5 U/L 青霉素, 1×10^5 U/L 链霉素) 稀释至 4×10^7 L 的细胞悬液, 接种 96 孔培养板, $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 。24 h 后吸尽培养液, 加入培养液配制的三种浓度的 manumycin 稀释液 ($6 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $18 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $54 \mu\text{mol}/\text{L}$) 或 / 和 p38^{MAPK} 抑制剂 SB203580, 同时设立 0.1% (V/V) 的 DMSO 对照 (阴性对照) 以及无细胞的空白对照, 终体积均为 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 。每组设 3 个复孔。培养 24 h 后, 加入 3% (W/V) MTT $20 \mu\text{L}/\text{well}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h, 弃上清, 加入 DMSO $50 \mu\text{L}/\text{well}$, 混匀 15 min 后, 检测 590 nm 处的 A 值。所得实验结果均在测量的线性范围之内。抑制率的计算公式: (处理组 A 值 - 阴性对照 A 值) / (对照组 A 值 - 阴性对照 A 值) \times 100%。IC₅₀ 值的计算由 SPSS (11.0 版) 进行 Logarithmic 曲线拟合, 得到关于剂量 - 抑制率的回归方程。算得抑制率在 50% 时的药物浓度。

3 Caspase - 3 活性检测

在 6 cm 培养皿中接种对数生长期的细胞每皿 2×10^6 细胞, 共 10 皿。分为 5 组, 分别为: 对照, manumycin $54 \mu\text{mol}/\text{L}$, manumycin $18 \mu\text{mol}/\text{L}$, manumycin $54 \mu\text{mol}/\text{L}$ + SB203580 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 manumycin $18 \mu\text{mol}/\text{L}$ + SB203580 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 组。每组 2 皿。24 h 后换液并加药。经药物处理 24 h 后, 制备全细胞裂解液, 以下步骤均在冰水浴中完成: 胰酶消化细胞后置于离心管中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 $1500 \text{ r}/\text{min}$, 5 min, 弃上清后加入 PBS 5 mL, 再次离心, 弃上清后加 PBS 1.5 mL, 并转移至 EP 管中, 重复离心 1 次, 弃上清后加入 $150 \mu\text{L}$ 细胞裂解缓冲液 (试剂盒)。置液氮中 1 min, 取出置冰水中 30 min, 再重复 1 次液氮 - 冰水循环后离心 $5000 \text{ r}/\text{min}$, 10 min, 取上清测 620 nm 光波长处的吸光度 (A) 值定蛋白浓度, 调整各组上清液的蛋白浓度一致。根据说明书检测 caspase - 3 的活性。

4 统计学处理

采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 Dunnett's T3, Tamhane's T2 法 (方差齐性不满足时) 和 Turkey's, SNK - q 法 (方差齐性时)。

结 果

1 Manumycin 对 Panc - 1 细胞活性的影响 (MTT 法, IC₅₀)

MTT 实验的结果显示, manumycin 可以抑制 Panc - 1 细胞的活性, 用 manumycin ($6 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $18 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $54 \mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 24 h 对 Panc - 1 细胞生长具有明显的抑制作用, 其平均抑瘤率分别为 8.9%、21.9% 和 67.0%, 其中 $18 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $54 \mu\text{mol}/\text{L}$ 组的细胞活性与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$) (图 1A), 并呈浓度依赖性 (图 1B), 其确定系数 $R^2 = 0.9988$ 。当 manumycin 处理细胞 24 h 时, IC₅₀ 为 $34.7 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。结果提示, manumycin 在体外有抑制 Panc - 1 细胞的作用, 且呈量效关系。

2 Manumycin 对 Panc - 1 细胞 caspase - 3 活性的影响

利用试剂盒检测 caspase - 3 活性以定量评价 manumycin 诱导细胞凋亡的水平 (图 2), 图中荧光强度与 caspase - 3 活性呈正比。Manumycin 用药浓度为 $18 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $54 \mu\text{mol}/\text{L}$ 时均可不同程度地增加 caspase - 3 活性, 其中药物浓度为 $54 \mu\text{mol}/\text{L}$ 时 caspase - 3 活性与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。结果提示细胞凋亡参与了 manumycin 抑制 Panc - 1 细胞的作用。

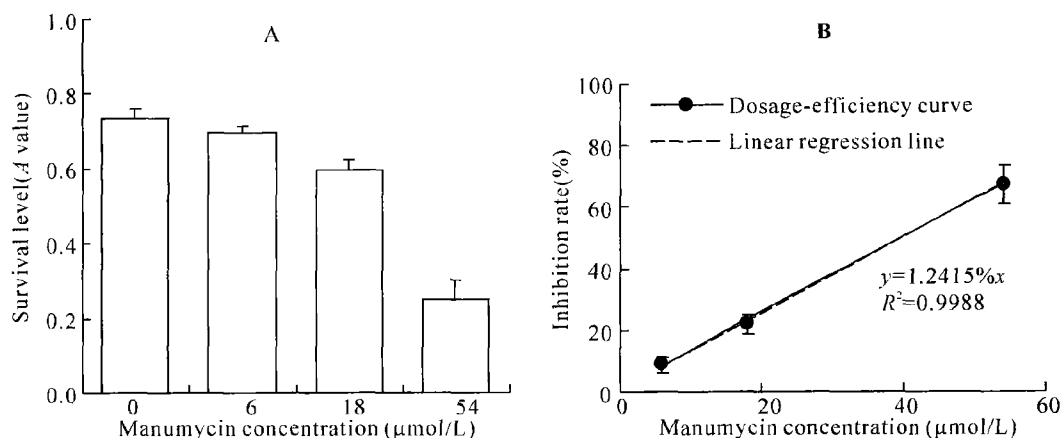


Fig 1 Manumycin inhibit Panc - 1 cell line (MTT assay). A: shows the survival level that affected by different dosage of manumycin; B: shows relationship between dosage and inhibition rate; the linear regression line, its equation and the determinant coefficient (R^2) are also shown ($P < 0.01$).

图1 Manumycin 抑制 Panc - 1 细胞

3 p38^{MAPK} 抑制剂 SB203580 对 manumycin 诱导 Panc - 1 细胞凋亡的影响

同样使用 caspase - 3 试剂盒观测 p38^{MAPK} 抑制剂 SB203580 对 manumycin 诱导 Panc - 1 细胞凋亡的作用, 结果表明 (图 2) 在用 18 μmol/L 和 54 μmol/L manumycin 处理 Panc - 1 细胞时分别加入 10 μmol/L SB203580 可降低 caspase - 3 活性水平, 其中 manumycin 浓度为 54 μmol/L 时, 抑制剂作用与否 caspase - 3 活性水平存在显著差异 ($P < 0.05$)。可见 p38^{MAPK} 抑制剂部分削弱了 manumycin 诱导的细胞凋亡。

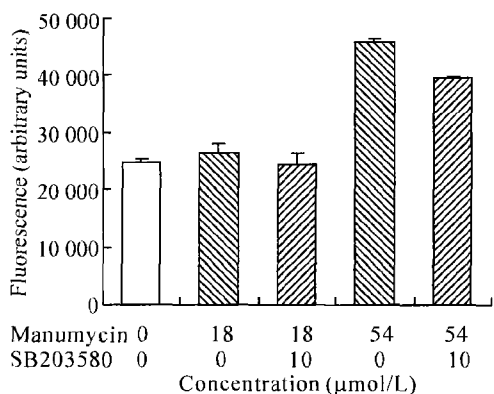


Fig 2 Detecting caspase - 3 activity by assay kit. The fluorescence intensity reflects the activity of caspase - 3. □ control; ▨ manumycin used only; ▩ manumycin used while 10 μmol/L SB203580 is added.

图2 Caspase - 3 活性检测。荧光的强弱反映了 caspase - 3 活性变化

讨 论

目前临床前的体内外实验证实 manumycin 可抑

制多种肿瘤的生长, 包括乳腺癌、肝细胞癌和结肠癌^[7,8]等, 并且已经开展了针对实体瘤和血液系统肿瘤的临床试验^[9]。我们以往的研究发现 manumycin 在体内外的实验模型中对高度恶性的未分化甲状腺癌细胞 ARO 和 KAT - 4 具有抑癌活性, 同时显示 manumycin 与 paclitaxel 的协同效应^[10]; 另外我们已证实 manumycin 可抑制乳腺癌 SK - BR - 3 细胞的生长^[8]; 通过本实验, 作者观察到微摩尔级剂量的 manumycin 即可对 Panc - 1 细胞产生强大的抑制效应, 与 Kainuma 等^[5]和 Matsui 等^[11]结果相似。有关 manumycin 的抑癌效应现在认为是多种机制综合的结果。因为 manumycin 具有抑制法尼基蛋白转移酶 (farnesyltransferase, FTase) 的作用, 其酰胺侧链与法尼基焦磷酸酯 (farnesyl - pyrophosphate, FPP) 的异戊二烯基团相似, 可与 FPP 竞争性结合 FTase。当 FTase 被抑制后, 一方面可阻断 Ras 蛋白与细胞膜结合, 使其不具有生物学活性; 另外可使细胞内未经法尼基化修饰的游离的 Ras 蛋白水平增高, 后者除了本身缺乏生物转化活性外, 还可干扰细胞膜上 Ras 蛋白的功能, 使其不能激活下游促细胞增殖的 Raf - MEK - ERK 通路, 进而抑制细胞的增殖过程, 故认为 manumycin 的抗癌作用与其阻断肿瘤生长的信号通路和启动细胞凋亡通路有关。由于其作用的方式是与 FPP 竞争性结合, 故特异性强; 且 manumycin 产生抑癌作用的重要机制是诱导肿瘤细胞发生凋亡。凋亡作为抑癌机制, 其本质是一种细胞生理性的优胜劣汰的过程, 因清除肿瘤细胞不伴随炎症反应, 故毒性低; 初步的临床试验结果也证实其高效低毒的特性^[9]。提示 manumycin 是一种具有广泛应用前景的

治疗肿瘤的新药物。

Manumycin 诱导细胞凋亡的具体通路仍存在争议。在本实验中,我们通过检测 caspase - 3 的活性,发现 manumycin 可激活 Panc - 1 细胞的凋亡途径;而在使用 p38^{MAPK}抑制剂 SB203580 后,manumycin 诱导细胞凋亡的水平有所下降,提示 p38^{MAPK}通路是此药物诱导 Panc - 1 细胞凋亡的途径之一,这与 manumycin 对乳腺癌细胞 SK - BR - 3 的研究结果^[8]相似。我们在未分化甲状腺细胞株的实验也观察到 p21WAF1 的激活在 manumycin 诱导细胞凋亡中起重要作用^[10]。Pan 等^[12]在未分化甲状腺癌模型中观察到 manumycin 可促进线粒体释放细胞色素 C,进而激活 caspase - 9, caspase - 8 和 caspase - 3 诱导细胞凋亡;Zhou 等^[7]在肝细胞癌模型中认为癌细胞的凋亡与 p53 和 p21WAF1 的激活以及 I κ B 的抑制有关。同时 Park 在中国仓鼠卵巢癌细胞发现 PI3K - Akt 途径的抑制也参与了 manumycin 引起的凋亡过程^[13]。另外,Frassanito 等^[14]在多发性骨髓瘤模型的研究表明,凋亡与 manumycin 抑制了肿瘤细胞自分泌白细胞介素 - 6 有关。由此提示 manumycin 诱导凋亡的通路可能与癌细胞的表型密切相关。Kainuma 等^[5]和 Matsui 等^[11]在胰腺肿瘤细胞株的实验发现,Ras 突变的细胞株 SUI - 1 对 manumycin 的敏感性高于非突变的细胞株 BxPC - 3。那么本实验中采用的 Panc - 1 细胞的 Ras 蛋白也是突变型的,manumycin 是否直接激活 p38^{MAPK}通路而致凋亡呢?值得深入讨论。

[参 考 文 献]

- [1] 董志伟,谷铎之. 临床肿瘤学[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,2002. 1058 - 1069.
- [2] Hara M, Akasaka K, Akinaga S, et al. Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2281 - 2285.
- [3] Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, et al. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene [J]. Nature, 1982, 300(5888): 149 - 152.
- [4] Mizumoto K, Tanaka M. Genetic diagnosis of pancreatic cancer[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002, 9(1): 39 - 44.
- [5] Kainuma O, Asano T, Hasegawa M, et al. Inhibition of growth and invasive activity of human pancreatic cancer cells by a farnesyltransferase inhibitor, manumycin[J]. Pancreas, 1997, 15(4): 379 - 383.
- [6] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen - activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions[J]. Endocr Rev, 2001, 22(2): 153 - 183.
- [7] Zhou JM, Zhu XF, Pan QC, et al. Manumycin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. Int J Mol Med, 2003, 12(6): 955 - 959.
- [8] 陶 祥,杨惠玲,杨 林,等. Manumycin 诱导细胞凋亡抑制乳腺癌细胞 SK - BR - 3 活性[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(12): 2311 - 2315.
- [9] Caponigro F, Casale M, Bryce J. Farnesyl transferase inhibitors in clinical development[J]. Expert Opin Invest Drugs, 2003, 12(6): 943 - 954.
- [10] Yang HL, Pan JX, Sun L, et al. p21 Waf - 1 (Cip - 1) enhances apoptosis induced by manumycin and paclitaxel in anaplastic thyroid cancer cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(2): 763 - 772.
- [11] Matsui Y, Goto M, Iwakawa M, et al. Modified radiosensitivity of pancreatic cancer xenografts by farnesyl protein transferase inhibitor and MEK inhibitor[J]. Oncol Rep, 2003, 10(5): 1525 - 1528.
- [12] Pan J, Xu G, Yeung SC. Cytochrome c release is upstream to activation of caspase - 9, caspase - 8, and caspase - 3 in the enhanced apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells induced by manumycin and paclitaxel[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(10): 4731 - 4740.
- [13] Park D, Pandey SK, Maksimova E, et al. Akt - dependent antiapoptotic action of insulin is sensitive to farnesyltransferase inhibitor[J]. Biochemistry, 2000, 39(41): 12513 - 12521.
- [14] Frassanito MA, Cusmai A, Piccoli C, et al. Manumycin inhibits farnesyltransferase and induces apoptosis of drug - resistant interleukin 6 - producing myeloma cells[J]. Br J Haematol, 2002, 118(1): 157 - 165.