

甲基乙二醛对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖及凋亡蛋白表达的影响

张涓娟 蒲宇 李勇 沈成义 张小明

【摘要】 目的 探讨甲基乙二醛(MGO)对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖影响及其作用机制。方法 培养 PANC-1 细胞,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测 MGO 对 PANC-1 细胞增殖的影响;Hoechst33258 染色细胞后显微镜下观察 MGO 处理后 PANC-1 细胞形态变化,Western blot 检测凋亡家族蛋白 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达变化。结果 MTT 检测发现 MGO 对人胰腺癌 PANC-1 有明显的抑制作用,且在一定程度上呈剂量时间依赖性;MGO 处理 48 h 后的 PANC-1 细胞在 Hoechst33258 染色后荧光显微镜下呈现典型的凋亡细胞核固缩表现;Western blot 检测表明 MGO 能显著降低 Bcl-2 蛋白表达量而提高 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量。结论 MGO 能够有效抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖并诱导其凋亡,其作用机制可能是通过作用凋亡信号通路调控凋亡家族蛋白 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 表达进而诱导 PANC-1 细胞凋亡。

【关键词】 胰腺肿瘤; bcl-2 相关 X 蛋白质; 甲基乙二醛; Caspase-3; Bcl-2

Effect of methylglyoxal on proliferation of human pancreatic carcinoma (PANC-1) cells and expression of apoptotic proteins ZHANG Juan-juan, PU Yu, LI Yong, SHEN Cheng-yi, ZHANG Xiao-ming. Sichuan Key Laboratory of Medical Image, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Corresponding author: ZHANG Xiao-ming, Email: cjr.zhxm@vip.163.com

【Abstract】 Objective To study the influence of methylglyoxal on human pancreatic carcinoma PANC-1 cells proliferation and possible mechanism. **Methods** Cell proliferation was evaluated using MTT method; Hoechst33258 staining assay was used to observe MGO-induced morphological changes; Changes for Bcl-2 and Bax expression level were assessed using Western blot. **Results** Comparing with control group, PANC-1 cells proliferation was suppressed by methylglyoxal. The growth inhibition induced by MGO was in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Apoptosis of the PANC-1 cells was observed after exposure to MGO, which was verified by morphological changes and increased proportion of Hoechst positive cells. The expression level of Bcl-2 was significantly decreased compared with the control group, but that of Bax was higher in the former than that in the latter, as well as the expression level of Caspase-3. **Conclusion** MGO could inhibit PANC-1 cells proliferation significantly and induce the apoptosis via regulating the expression level of Caspase-3 and Bcl-2 family proteins.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; bcl-2-Associated X protein; Methylglyoxal; Caspase-3; Bcl-2

甲基乙二醛(MGO)是生命体进行葡萄糖酵解过程中生成的一种二羰基化合物,具有非酶糖基化功能,在糖酵解过程中MGO作为中间产物会大量增加,随着MGO含量的增加而与细胞内DNA和蛋白质的化学作用被激活,MGO对它们的修饰活动也随之增强进而抑制癌细胞生长作用,是一种潜在的抗癌药物^[1-2]。本研究主要通过体外细胞实验来检测MGO对胰腺癌细胞是否具有抑制生长,诱导凋亡的作用及其可能的分子机制。Chetyrkin等^[2]通过研究发现在糖代谢产生大量

MGO同时伴随自氧化,生成大量活性氧(ROS)。这可能是MGO等糖酵解中间产物破坏细胞功能诱导其凋亡的主要因素之一。目前尚未有MGO对人胰腺癌细胞作用影响的相关报道。本实验以MGO作用胰腺癌 PANC-1 细胞,观察其对PANC-1 细胞生长增殖、凋亡的相关影响以及对其作用可能的机制进行初步探讨,为胰腺癌的治疗提供新途径。

材料与方法

一、细胞与试剂

胰腺癌细胞系 PANC-1 购自上海中科院细胞库。RPMI-1640 培养基、无血清 RPMI-1640 培养基购于美国 Hyclone 公司,胎牛血清购于杭州四季青公司。Western blott 抗体购于美国 Abcom 公司。Hoechst33258 和 Western blot 实验试剂购于上海碧云天生物技术公

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.18.045

基金项目:国家自然科学基金(81271643);中央财政支持地方高校专项资金(医学影像创新团队)

作者单位:637000 四川南充,川北医学院医学影像四川省重点实验室
川北医学院附属医院放射科

通讯作者:张小明,Email: cjr.zhxm@vip.163.com

司。MGO、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国Sigma公司。

二、主要仪器

冷冻离心机(芬兰THREMO), ImageReader 发光成像分析仪、酶标仪读数仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司), 荧光显微镜(日本OLYMPUS)。

三、方法

1. 细胞培养: PANC-1 细胞常规培养于含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。适时换液传代培养, 待细胞生长处于对数期时取出用于实验。

2. MTT 对照组细胞常规培养: 取对数生长期的 PANC-1 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的混合消化液制成 4×10^4 /ml 单细胞悬液, 每孔 200 μ l 接种于 96 孔板。置于培养箱中过夜培养后分别加入终浓度为 0.1、0.5、1 和 2 mmol/L 的 MGO, 以不含 MGO 的培养液作为空白对照, 每组设 6 个复孔。分别培养 12、24、48 和 72 h 后, 按照说明书加入 MTT, 并使 MTT 的终浓度为 0.5 mg/ml, 继续培养 3 h 后吸去培养液, 每孔中再加入 100 μ l 二甲基亚砷(DMSO)溶解蓝紫色结晶物, 稍振荡待结晶物充分溶解后用酶标仪测定 570 nm, 参考波长为 630 nm 的 OD 值。细胞的存活率 = (加药孔 OD 值 - 加药孔空白 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 对照孔空白 OD 值) \times 100%, 计算 MGO 处理后的 PANC-1 细胞的存活率。实验重复 3 次。

3. Hoechst 染色观察细胞形态变化: 对数生长期的 PANC-1 细胞 1×10^5 /ml 接种于 24 孔板, 经 MGO 处理后培养不同时间后吸净培养液, 用 PBS 洗三次, 加入预冷的 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 0.5 ml 固定细胞 30 min 后, 吸取固定液, 然后用 PBS 荡洗三次。最后加入 0.5 ml Hoechst 33258 (10 mg/ml), 在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中避光 10 min 后, 置于荧光显微镜下观察。

4. Western blot 检测 PANC-1 细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白表达: 收集 1 mmol/L MGO 处理 48 h 后的 PANC-1 细胞, 加入细胞裂解液(上海碧云天)后高速冷冻离心提取总蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测定量, -70 °C 保存。按照碧云天 WB 试剂说明配制 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶, 每凝胶孔加入 20 μ l 样本进行变性电泳后转移至硝酸纤维素膜, 封闭液封闭 1 h 后漂洗三次加入一抗鼠抗人 Bcl-2 及鼠抗人 Bax 单克隆抗体(1:1500), 鼠抗人 Caspase-3 一抗(1:2000); 置于 4 °C 冰箱过夜, 清洗后分别加入二抗山羊抗鼠 IgG/HRP(1:2000)室温放置 2 h, 清洗后加入 ECL 化学发光试剂盒说明书进行曝光, 置于成像分析仪中显影成像。以目的条带

与内参 β -actin 条带灰度比值表示蛋白相对表达量。实验结果为每个样本三次独立实验平均值。

四、统计学分析

数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析, 每组实验重复三次, 多个样本均数比较应用多因素方差分析。取 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

结 果

1. MGO 对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖抑制作用: 加入 0~2 mmol/L 终浓度的 MGO 对 PANC-1 细胞作用 24、48、72 h 后, 随着 MGO 浓度从 0.1~2 mmol/L 及作用时间的增加, 其对 PANC-1 细胞增殖抑制作用逐渐增加。当 MGO 浓度 ≤ 0.5 mmol/L 时, 处理 PANC-1 细胞 48 h 内, MGO 对 PANC-1 细胞在各时间点并无明显抑制作用; 但当 MGO 浓度 > 1 mmol/L 时, MGO 对 PANC-1 细胞的抑制率随时间增长而升高(图 1)。

2. Hoeshst33258 染色法观察细胞凋亡: 经不同浓度 MGO 处理不同时间后的 PANC-1 细胞, 用 Hoeshst33258 染色后置于荧光显微镜下观察, 结果表明对照组 PANC-1 细胞核荧光分布均匀, 核体完整较大, 且荧光分布整齐且弱(图 2A), 经过不同浓度的 MGO 处理的 PANC-1 细胞(图 2B 箭头所示), 则出现不同程度的细胞破碎、核皱缩、并出现荧光强的凋亡小体, 为典型细胞凋亡形态。当 MGO 浓度达到 1 mmol/L 处理 48 h 后形态变化最为明显。

3. MGO 对 PANC-1 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响(图 3): 为了进一步阐明 MGO 诱导的 PANC-1 细胞死亡是否与凋亡相关, 本实验以 Western blot 检测了 MGO 处理前后 PANC-1 细胞凋亡过程中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达变化。Western blot 检测分析结果表明 MGO 处理 48 h 后的 PANC-1 细胞中 Bcl-2 蛋白表达量比对照组显著降低, Bax 蛋白表达量则升高, 凋亡家族蛋白 Bax/Bcl-2 表达量比率明显增高 2.8 倍, 而 Caspase-3 蛋白表达量是对照组的 3.7 倍($P < 0.01$)。MGO 处理后的 PANC-1 细胞内凋亡家族蛋白的表达变化结果表明 MGO 可能通过诱导凋亡信号通路蛋白的表达来促进 PANC-1 细胞凋亡。

讨 论

Queisser 等^[3]发现 MGO 会促进蛋白加合物形成导致内皮细胞正常功能失调; Brouwers 等^[4]利用小鼠构建肠系膜动脉动物模型研究高血糖引起的内皮组织血管舒张, 发现其机制可能是 MGO 通过氧化应激诱导产生。上述研究表明, MGO 主要通过细胞内蛋白或 DNA 发生不可逆的非酶化学反应, 从而产生大量活

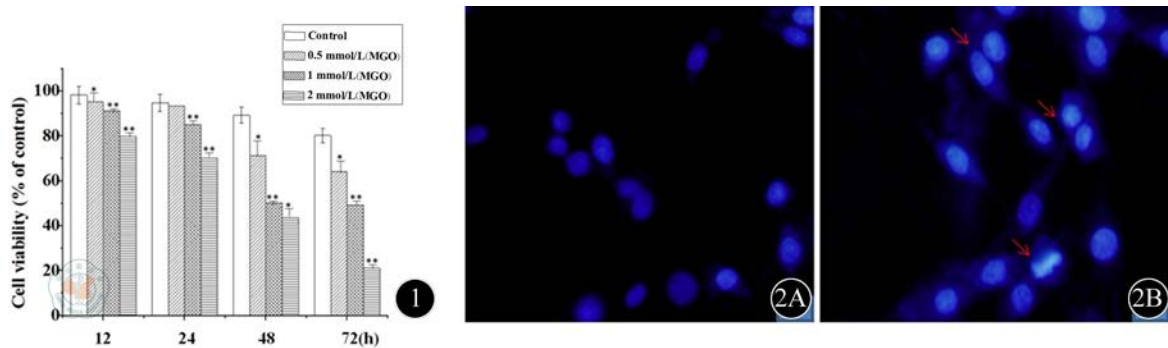


图1 MTT检测MGO处理PANC-1细胞12、24、48、72 h后的存活率,与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 图2 荧光显微镜观察胰腺癌细胞凋亡形态变化 ($\times 400$), 2A: 对照组; 2B: 1 mmol/L MGO 处理PANC-1细胞48 h

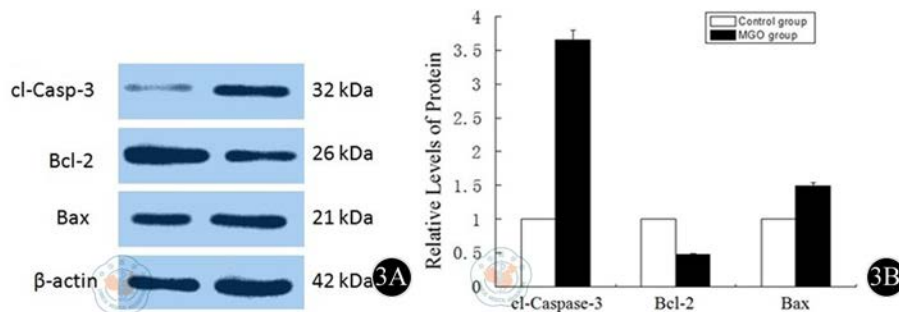


图3 Western blot检测1 mmol/L MGO处理PANC-1细胞48 h后cl-Caspase-3, Bcl-2和Bax蛋白表达量, 3A为蛋白表达免疫印记图, 3B为蛋白表达水平。β-actin作为内参

性氧造成细胞氧化应激而凋亡。Allen 等^[5]指出高浓度的葡萄糖在代谢过程中生成大量 MGO 诱导细胞氧化应激和凋亡, 高浓度的葡萄糖诱导细胞凋亡及发多种糖尿病综合征。这可能跟细胞周期调节及丝裂原激活蛋白激酶信号通路 (MAPKs) 相关。Bax 家族蛋白 (Bcl-2、Bax) 以及 Caspase 蛋白 (Caspase-3、Caspase-9) 都是凋亡蛋白家族的重要成员, 均为区分凋亡中期与晚期的重要标志。在不同的细胞凋亡过程中, 凋亡蛋白家族的蛋白表达变化随凋亡产生变化。为了进一步阐明 MGO 诱导的 PANC-1 细胞死亡是否与凋亡相关。本实验以 Western blot 检测了 MGO 处理前后 PANC-1 细胞凋亡过程中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达变化。

另一方面, 已有研究表明 MGO 对细胞产生的影响可能导致线粒体功能受损而使细胞中的细胞色素 C 被释放到细胞质中, 激活 Caspases 家族蛋白表达^[6]。这一报道与本实验结果部分相符。如图 3 所示 Caspase-3 的蛋白表达量也在 1 mmol/L MGO 作用 PANC-1 细胞 48 h 后大量增加。上述结果表明凋亡家族蛋白表达量的变化可能和 MGO 诱导 PANC-1 细胞凋亡关系密切, 通过有效调控凋亡蛋白家族的蛋白表达水平能有效抑制胰腺癌的发展, 可以作为靶向治疗胰腺癌的一个方面。Chan 等^[6]通过实验检测发现 MGO 处理后的成骨细胞主要通过氧化应激, JNK (c-Jun N-terminal kinase) 激活以及线粒体膜电位发生改变致使细胞色素 C 释放,

从而增加 Bax/Bcl-2 蛋白比率及激活 Caspases (Caspase-9, Caspase-3) 家族蛋白和 p21 活性蛋白激酶 2 (PAK2); 利用 JNK 信号通路特异性阻断剂 SP600125 则可以明显的降低 MGO 诱导的细胞凋亡率^[7-9]。若要更进一步阐述 MGO 诱导 PANC-1 细胞凋亡的具体分子机制, 是否与丝裂原激活蛋白激酶 (MAPKs)、氨基酸末端激酶 JNK 以及 NF-κB 等细胞内信号传递通路相关^[10-11], 则仍需要进一步实验研究证明。

此外, MGO 对 PANC-1 细胞诱导的凋亡与糖代谢过程中的乙二醛酶系统亦有重大关联。Wang 等^[12]通过针对胰腺癌患者取样分析人体胰腺癌肿瘤组织样本中乙二醛酶蛋白的表达情况, 发现肿瘤组织比相邻非肿瘤组织中乙二醛酶 I (glyoxalase- I, GLO I) 的表达量明显增高, 这表明 GLO I 在胰腺癌治疗中是重要的治疗靶向。Pun 等^[13-18]指出作为糖基化终端产物的主要前体的 MGO 在肿瘤细胞内会增加, 且 MGO 对不同类型的肿瘤细胞会产生多种不同损伤^[19], 而最终产生不同程度的糖基化。此外, 过量表达 GLO I 和 GLO II 可能与肿瘤的多耐药性相关^[14-16]。通过上调乙二醛酶系统会抵消 MGO 的增加, 这可能是 GLOI 抑制剂成为癌症化疗的潜在因素, GLOI 抑制剂会通过激活聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (PARP) 清除细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 并抑制甘油醛 (G3P) 去氢化导致 MGO 大量增加^[17-18]。肿瘤细胞内大量积累的 MGO 可以通过调控凋亡蛋白的表达影响肿瘤细胞增殖及凋

亡,与本实验结果一致。综上所述,在本研究已有基础上,进一步深入探讨 MGO 在胰腺癌发生发展过程中对肿瘤细胞中相关凋亡信号通路蛋白的分子调控机制,可以为胰腺癌治疗提供新的靶向。

本研究表明 MGO 可以通过提高 Bax/Bcl-2 蛋白表达量比率,同时激活 Caspase-3 蛋白表达,诱导胰腺癌 PANC-1 细胞产生凋亡而有效抑制胰腺癌细胞增殖最终导致其大量死亡,发挥其对肿瘤的抑制功能,其作用机制可能是通过参与调控凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员的表达,影响线粒体正常功能而释放出细胞色素 C 进而激活 Caspases 家族蛋白表达提高凋亡蛋白 Caspase-3 蛋白表达量来实现。通过本研究首次明确了糖酵解中间产物 MGO 通过凋亡信号通路蛋白的表达对胰腺癌的抑制作用机制,同时也为治疗胰腺癌新方向提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Thornalley PJ. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 2008, 23: 125-150.
- [2] Chetyrkin S, Mathis M, Pedchenko V, et al. Glucose Autoxidation Induces Functional Damage to Proteins via Modification of Critical Arginine Residues. *Biochemistry*, 2011, 50: 6102-6112.
- [3] Queisser MA, Yao D, Geisler S, et al. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes*, 2010, 59: 670-678.
- [4] Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, et al. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*, 2010, 53: 989-1000.
- [5] Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, 16: 705-713.
- [6] Chan WH, Wu HJ, Shiao NH. Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *J Cell Biochem*, 2007, 100: 1056-1069.
- [7] Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci*, 2008, 9: 698-718.
- [8] Wei Y, Wang D, Moran G, et al. Fructose-induced stress signaling in the liver involves methylglyoxal. *Nutr Metab (Lond)*, 2013, 10: 32.
- [9] Khan M, Ding C, Rasul A, et al. Isoalantolactone induces reactive oxygen species mediated apoptosis in pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 533-547.
- [10] Lau ST, Lin ZX, Leung PS. Role of reactive oxygen species in bruceine D-mediated p38-mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signalling pathways in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Br J Cancer*, 2010, 102: 583-593.
- [11] Lau ST, Lin ZX, Liao Y, et al. Bruceine D induces apoptosis in pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1 through the activation of p38-mitogen activated protein kinase. *Cancer Lett*, 2009, 281: 42-52.
- [12] Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, et al. Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer Res*, 2012, 32: 3219-3222.
- [13] Pun PB, Murphy MP. Pathological significance of mitochondrial glycation. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 843505.
- [14] Liu L, Lin ZX, Leung PS, et al. Involvement of the mitochondrial pathway in bruceine D-induced apoptosis in Capan-2 human pancreatic adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med*, 2012, 30: 93-99.
- [15] Thornalley PJ. Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31: 1372-1377.
- [16] Thornalley PJ. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 2008, 23: 125-150.
- [17] Bair WB 3rd, Cabello CM, Uchida K, et al. GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma Res*, 2010, 20: 85-96.
- [18] Antognelli C, Mezzasoma L, Fettucciari K, et al. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in prostate cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 836-844.
- [19] Taniguchi H, Horinaka M, Yoshida T, et al. Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by downregulating the expression of antiapoptotic molecules. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 2294-2300.

(收稿日期: 2013-08-08)

(本文编辑: 戚红丹)