

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2017) 05-0421-04

顺铂对 T24 膀胱癌细胞 Keap1-Nrf2 通路的影响

张少楠^{1,2} 雍 群¹ 刘晓平²

(1.芜湖市第二人民医院 药剂科,安徽 芜湖 241000; 2.皖南医学院 药学院,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨顺铂对人膀胱移行癌细胞(T24 细胞) Keap1-Nrf2 信号通路的影响。方法: 分别将对照溶媒及浓度为 0.1、1、10、30、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂溶液加入 T24 细胞进行培养 24 h, 用 MTT 法检测顺铂对 T24 细胞增殖抑制作用及半数抑制浓度 IC_{50} ; 对顺铂处理 24 h 后 T24 细胞胞质蛋白和细胞核蛋白进行提取, Western blotting 分析 T24 细胞核内 Nrf2 蛋白表达情况, 胞质 Keap1 蛋白表达情况和胞质典型二相酶 GSTP1、NQO1 的表达情况。结果: 顺铂可明显抑制 T24 细胞增殖, 半数抑制浓度 IC_{50} 为 37.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 加入顺铂共培养后的 T24 细胞胞质 Keap1 蛋白表达量降低, 核内 Nrf2 蛋白质、胞质内二相酶 GSTP1、NQO1 的表达量升高。结论: 顺铂可激活 Keap1-Nrf2 信号通路, 使 T24 细胞内 Nrf2 介导典型二相酶的表达升高。

【关键词】顺铂; Keap1-Nrf2 通路; 膀胱癌细胞; 二相酶

【中图分类号】R 737.14 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.004

Effects of cisplatin on Keap1-Nrf2 pathway in T24 bladder cancer cells

ZHANG Shaonan, YONG Qun, LIU Xiaoping

Department of Pharmacy, Wuhu No.2 People's Hospital, Wuhu 241000, China

【Abstract】Objective: To investigate the effects of cisplatin on Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) (Keap1-Nrf2) signaling pathway in T24 cells. **Methods:** T24 cells were co-cultured with solvent control and different concentrations of cisplatin [(0.1 , 1 , 10 , 30 and 90) $\mu\text{g}/\text{mL}$] for 24 hours. MTT assay was performed to detect the inhibitory effect and 50% inhibition concentration (IC_{50}) of cisplatin on T24 cells. Nuclear and cytoplasmic protein were extracted from the cells treated with the drug. Western blotting assay was used to analyze the expression of nuclear Nrf2 , cytoplasmic Keap1 and two typical phase II enzymes (GSTP1 and NQO1) . **Results:** The proliferation of T24 cells was significantly inhibited by cisplatin , and the IC_{50} was 37.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The expression of Nrf2 , GSTP1 and NQO1 were increased , while Keap1 was decreased following different concentrations of cisplatin treatment. **Conclusion:** Keap1-Nrf2 pathway in T24 cells can be activated by cisplatin , and the expression of typical phase II enzymes (GSTP1 and NQO1) mediated by Nrf2 is also enhanced by cisplatin.

【Key words】 cisplatin; Keap1-Nrf2 pathway; bladder cancer cells; Phase II enzymes

作为当前发现的重要信号通路之一, Keap1-Nrf2 在细胞氧化应激反应以及避免外毒物损害方面发挥着重要作用。Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 是细胞中一种重要的氧化应激转录因子, 在正常的生理状态下, Nrf2 主要被蛋白伴侣分子 Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) 控制在细胞质中, Nrf2 在 Keap1 的控制下在细胞质内进行泛素化降解, 因此在生理状态下, 细胞核内 Nrf2 的表达量较少^[1]。然而细胞被毒物、药物、致癌物等攻击时, Keap1 的构象发生改变或功能降低, Nrf2

从胞质进入胞核内并结合抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE), 启动下游二相抗毒酶基因 (如 GSTP1、NQO1) 的表达, 从而保护细胞免受上述物质的侵害^[2-4], 因此 Keap1-Nrf2 信号通路的激活是正常细胞自我保护的重要机制。

顺铂 (cisplatin, DDP) 是治疗膀胱癌的一线药物, 但该药物单用疗效并不理想, 肿瘤细胞对其抗药是主要原因, 因此探索该耐药性产生的机制可为临床合理用药提供基础。既然 Keap1-Nrf2 信号通路的激活是正常细胞自我保护的机制, 那么肿瘤细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81272485)

收稿日期: 2017-03-30

作者简介: 张少楠 (1989-) 男, 硕士, 主管药师 (电话) 18055316073 (电子信箱) zsnwhey@163.com;

刘晓平, 男, 教授, 博士, 硕士生导师 (电子信箱) liuxiaoping@wnmc.edu.cn, 通信作者。

的 Keap1-Nrf2 通路是否被顺铂激活来抵抗该药物的作用? 本文对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人膀胱移行癌细胞(T24 细胞), 保存于弋矶山医院中心实验室。

1.2 主要材料与试剂 顺铂(cis-platinum, DDP) 购自美国 Sigma 公司; 1640 培养液、优级胎牛血清、0.25%胰酶/EDTA 及抗生素(100×) 均购自 GIBCO 公司; 核蛋白和胞质蛋白提取试剂盒购自南京凯基; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; 一抗 Nrf2、Keap1、Gstp1、Lamin B1(细胞核蛋白内参)、β-actin(细胞质蛋白内参) 兔多克隆抗体; 一抗 NQO1 山羊多克隆抗体; 驴抗羊、羊抗兔二抗购自美国圣克鲁斯公司。

1.3 药物配制 用 0.9%氯化钠溶液分别配制终浓度为 0.1、1、10、30、90 μg/mL 的顺铂溶液, 避光保存。

1.4 MTT 法测定细胞增殖抑制率 用含有胎牛血清、抗生素的 1640 培养液培养 T24 细胞, 接种于 96 孔板继续培养, 取处于对数期生长的细胞, 采用对照溶媒(0.9%氯化钠溶液) 和多种浓度顺铂(0.1、1、10、30、90 μg/mL) 分别与 T24 细胞共同培养 24 h 后, MTT 法检测细胞增殖, 测定 OD 值, 计算细胞增殖抑制率及半数抑制浓度 IC₅₀, 抑制率(%) = (1 - 实验组 OD / 溶媒对照组 OD) × 100%。

1.5 Western Blotting 测定蛋白水平 根据顺铂半数抑制浓度选取合适浓度的顺铂作用 T24 细胞 24 h 后, 消化并破碎细胞, 按照核蛋白和胞质蛋白提取试剂盒说明书提取胞质蛋白及细胞核蛋白并测定蛋白浓度。将各组蛋白电泳转膜后经一抗、二抗孵育, TBST 洗涤等步骤后, 经凝胶成像系统扫描分析 T24 胞质 Keap1 蛋白表达情况, 核内 Nrf2 蛋白表达情况和二相酶 GSTP1、NQO1 的表达情况。

1.6 统计学处理 用 $\bar{x} \pm s$ 描述统计数据, 单因素方差分析采用 SPSS 18.0 软件, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

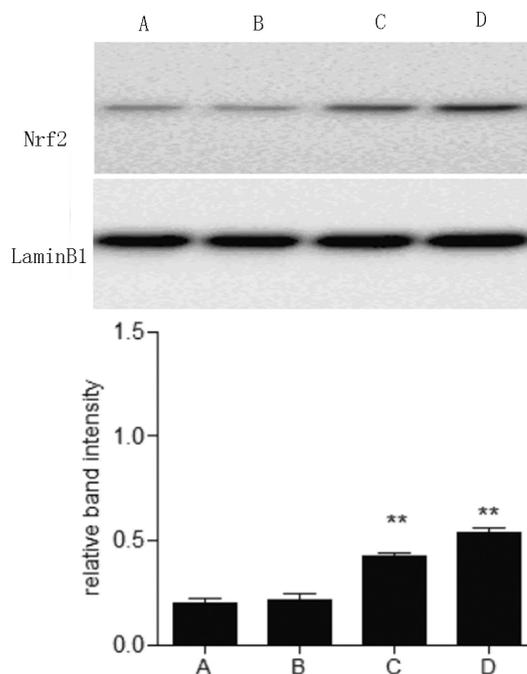
2.1 顺铂对 T24 细胞增殖的抑制作用 用不同浓度顺铂处理 T24 细胞 24 h 后, T24 细胞增殖抑制率随顺铂浓度升高而增加(表 1), 顺铂 IC₅₀ 为 37.74 μg/mL, 选取浓度为 0.1、1、10 μg/mL 的顺铂溶液用于 Western Blotting 实验。

表 1 不同浓度顺铂对 T24 细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

顺铂/(μg/mL)	OD 值	抑制率/%
0.00	1.35±0.07	-
0.10	1.19±0.07*	11.85
1.00	1.02±0.15*	24.44
10.00	0.93±0.06**	31.11
30.00	0.73±0.12**	45.93
90.00	0.49±0.14**	63.70
F	26.71	-
P	0.000	-

注: 与溶媒对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

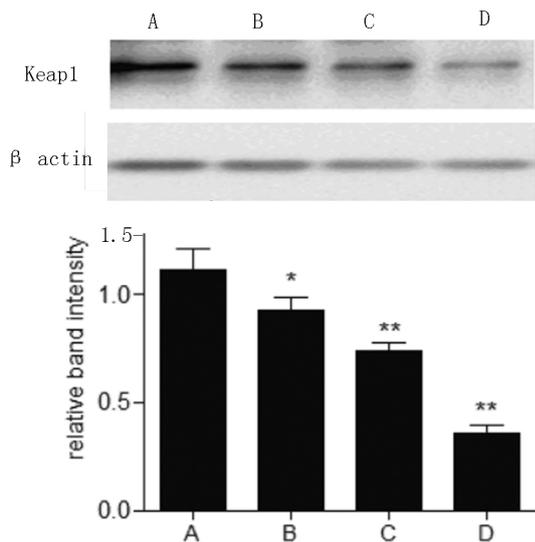
2.2 顺铂对 T24 细胞核内 Nrf2 影响 用不同浓度顺铂处理 T24 细胞 24 h 后, 各组间 Nrf2 蛋白表达差异有统计学意义($F = 308.38, P = 0.000$); 与对照溶媒处理后相比, 顺铂浓度为 0.1 μg/mL 时 T24 核内 Nrf2 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$); 然而顺铂浓度升高后, 核内 Nrf2 表达量增加($P < 0.01$), 此实验结果初步表明顺铂处理后 Keap1-Nrf2 信号通路被激活。



注: A 表示 0.9%氯化钠溶液对照组, B~D 分别代表 DDP 浓度为 0.1、1、10 μg/mL 组; 与溶媒对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 1 顺铂对 T24 细胞核内 Nrf2 影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

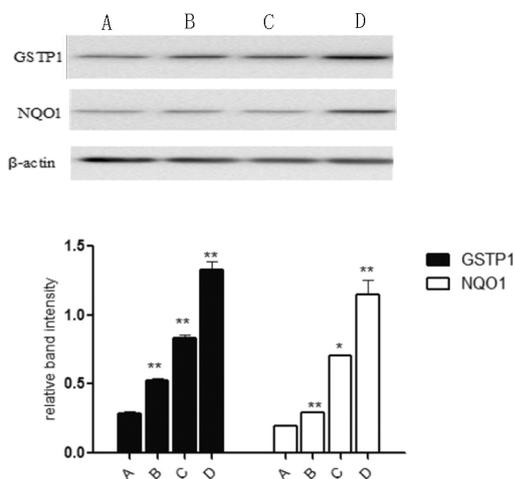
2.3 顺铂对 T24 细胞质内 Keap1 的影响 用不同浓度顺铂处理 T24 细胞 24 h 后, 各组间 Keap1 蛋白表达差异有统计学意义($F = 121.12, P = 0.000$), 胞质内 Keap1 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且呈一定的剂量依赖性(图 2)。



注: A 表示 0.9%氯化钠溶液对照组, B~D 分别代表 DDP 浓度为 0.1、1、10 μg/ mL 组; 与溶媒对照组相比, * P<0.05, ** P<0.01。

图 2 顺铂对 T24 细胞质内 Keap1 的影响($\bar{x}\pm s$ n=3)

2.4 顺铂对 T24 细胞质内药物代谢二相酶 NQO1、GSTP1 的影响 用不同浓度顺铂处理 T24 细胞 24 h 后, 各组间 NQO1 蛋白表达差异有统计学意义($F = 98.86$ $P = 0.000$), GSTP1 蛋白表达差异也有统计学意义($F = 234.57$ $P = 0.000$); 相比如对照组, 顺铂作用后, NQO1、GSTP1 表达量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时表现出剂量效应, 因此从下游基因表达情况再次验证了 Keap1-Nrf2 通路由于顺铂的作用呈现一定的激活状态(图 3)。



注: A 表示 0.9%氯化钠溶液对照组, B~D 分别代表 DDP 浓度为 0.1、1、10 μg/mL 组; 与溶媒对照组相比, * P<0.05, ** P<0.01。

图 3 顺铂对 T24 胞质内 NQO1、GSTP1 的影响($\bar{x}\pm s$ n=3)

3 讨论

正常细胞在受到损伤进行自我防御时, 通常会激活 Keap1-Nrf2 通路, 多项研究表明 Keap1-Nrf2 信

号通路在癌症预防、消化系统疾病、神经系统等多方面发挥着重要的作用^[5-7]。但在肿瘤的药物治疗中, 如果肿瘤细胞 Keap1-Nrf2 信号通路激活, 可能会导致抗药性的发生, 使肿瘤药物疗效降低。本研究选用膀胱癌一线治疗药物顺铂作用 T24 细胞后初步发现, T24 细胞核内 Nrf2 及其介导表达的二相抗毒酶 NQO1、GSTP1 的水平表达升高, 这也表明 Keap1-Nrf2 信号通路激活可能是单独使用顺铂治疗膀胱癌效果不理想的一个重要原因。多项研究报道称, Keap1-Nrf2 通路相关基因表达量降低是改善肿瘤药物疗效的新途径, 现已发现许多天然来源物质可通过下调 Keap1-Nrf2 信号通路来增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[8-9], 但这些天然物质尚未真正应用于临床。

Nrf2 在细胞中生理水平主要依赖于细胞质中 Keap1 的水平及功能强弱。本研究还发现顺铂可降低 T24 细胞质中 Keap1 的蛋白水平, 可能导致 Nrf2 泛素化降解减少, 从而进入细胞核内 Nrf2 的量增多, 这可能是顺铂激活 Keap1-Nrf2 信号通路的一个重要原因。本研究只是验证了顺铂可降低 Keap1 蛋白水平, 但并无法证明 Keap1 的蛋白活性是否降低, Keap1 的功能降低可使其在胞质与 Nrf2 结合减少, 也可能导致 Nrf2 入核增多激活 Keap1-Nrf2 信号通路。诱导物如何激活 Keap1-Nrf2 信号通路是一个复杂的过程, 尚需更多实验进行研究。

总之, 本研究进一步证明了 Keap1-Nrf2 信号通路的激活不仅是正常细胞自我保护的主要机制, 肿瘤细胞也具有此保护机制。本研究尚需动物及临床实验的验证。

【参考文献】

- [1] MAGESH S, CHEN Y, HU L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. Med Res Rev 2012, 32(4) : 687-726.
- [2] AGNIESZKA L, MILENA D, ELZBIETA P, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. Cellular & Molecular Life Sciences 2016, 73: 3221-3247.
- [3] HERPERS B, WINK S, FREDRIKSSON L, et al. Activation of the Nrf2 response by intrinsic hepatotoxic drugs correlates with suppression of NF-κB activation and sensitizes toward TNFα-induced cytotoxicity [J]. Archives of Toxicology 2016, 90(5) : 1163-1179.
- [4] LIN M, ZHAI X, WANG G, et al. Salvianolic acid B protects against acetaminophen hepatotoxicity by inducing Nrf2 and phase II detoxification gene expression via activation of the PI3K and PKC signaling pathways [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2015, 127(2) : 203-210.

牛蒡低聚果糖的提取条件及其稳定性研究

袁平川^{1 2} 陈靠山^{1 2 3} 柳春燕^{1 2 3} 房芳^{1 2} 王颜天池^{1 2}

(皖南医学院 1.药学院; 2.安徽省多糖药物工程技术研究中心; 3.活性生物大分子研究安徽省重点实验室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究牛蒡低聚果糖的最佳提取条件及其稳定性。方法: 通过单因素实验及正交实验对牛蒡低聚果糖的提取条件进行优化, 采用蒽酮法测定其在不同条件下的稳定性。结果: 牛蒡低聚果糖最佳提取条件为固液比 1:25、提取温度 80℃、提取时间 90 min, 在此条件下, 牛蒡低聚果糖得率为 67.54%。牛蒡低聚果糖热稳定性及光照条件下稳定性较好, 易被氧化, 在 pH>8 或 pH<4 及含有 Cu²⁺、Fe³⁺ 溶液中的稳定性较差。结论: 牛蒡低聚果糖在存储过程中应避免与空气及铁铜制品直接接触, 提取时温度应低于 90℃, 且溶液无强酸碱性。

【关键词】牛蒡低聚果糖; 提取; 稳定性

【中图分类号】R 285.5 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.005

On the extraction process and stability of burdock oligosaccharide

YUAN Pingchuan, CHEN Kaoshan, LIU Chunyan, FANG Fang, WANGYan Tianchi

Department of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the optimal conditions for extracting the oligosaccharide from burdock and stability of the extracts. **Methods:** Single-factor experiment and orthogonal test were used to optimize the extraction conditions for burdock oligosaccharide, and the stability of the extracts was determined under diverse conditions using anthrone method. **Results:** The optimal conditions for extracting the oligosaccharide from burdock were: solid/liquid ratio 1:25, temperature at 80℃, extraction time for 90 min. This condition yielded burdock oligosaccharide by 67.54%. The stability for burdock oligosaccharide was better when heated or lighted, yet the extract was susceptible to oxidation, and the stability appeared poorer when stored in solution with pH> 8 or pH<4 or containing Cu²⁺ or Fe³⁺. **Conclusion:** Burdock oligosaccharide should be stored at room temperature and isolated from oxygen without antioxidant supplement, and be free of direct contact with iron or copper during the extraction process. The extraction process must be under 90℃, and kept from solution with strong acidity and alkaline.

【Key words】 burdock oligosaccharide; extracting; stability

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1408085MH197); 安徽高校自然科学研究项目(KJ2015A199); 芜湖市科技计划项目(2012jc14)

收稿日期: 2017-04-05

作者简介: 袁平川(1992-), 男, 2015 级硕士研究生, (电话) 18355336398, (电子信箱) 2455474850@qq.com;

陈靠山(1962-), 男, 教授, 博士生导师, (电子信箱) ksc313@126.com, 通信作者。

[5] DENICOLA GM, CHEN PH, MULLARKY E, *et al.* NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer[J]. *Nature Genetics* 2015, 47(12): 1475-1481.

[6] KÖHLER UA, KURINNA S, SCHWITTER D, *et al.* Activated Nrf2 impairs liver regeneration in mice by activation of genes involved in cell-cycle control and apoptosis[J]. *Hepatology* 2014, 60(2): 670-678.

[7] LEIPNITZ G, VARGAS GR, WAJNER M. Disturbance of redox homeostasis as a contributing underlying pathomechanism of brain and liver alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency[J]. *Journal of inherited metabolic disease* 2015, 38(6): 1021-1028.

[8] ZHONG Y, ZHANG F, SUN Z, *et al.* Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7 /DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response[J]. *Mol Carcinog* 2013, 52(10): 824-834.

[9] CHIAN S, LI YY, WANG XJ, *et al.* Luteolin sensitizes two oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to chemotherapeutic drugs via inhibition of the Nrf2 pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, 15(6): 2911-2916.