

网络出版时间: 2016-4-26 11:06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20160426.1106.028.html>

左卡尼汀抑制 NF- κ B 敏化 TRAIL 诱导神经胶质瘤细胞凋亡

杨秀伟^{1,2}, 谢靖³, 钟凤⁴, 韩彦弢³

(青岛大学 1. 药学院、2. 附属医院、3. 基础医学院、4. 口腔医学院, 山东 青岛 266000)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.05.014

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2016)05-0664-07

中国图书分类号: R329.25; R730.264; R739.41; R977.4

摘要:目的 探讨左卡尼汀作为 TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) 敏化剂, 增强 TRAIL 对神经胶质瘤细胞诱导凋亡的效果, 并对其敏化作用的机制进行研究。方法 以 U87 为神经胶质瘤细胞模型, 通过 CCK-8 检测细胞活性, Annexin V-FITC/PI 染色、caspase-3 表达及活性等指标检测细胞凋亡, 通过 RT-PCR、Western blot 对 NF- κ B (nuclear factor kappa B) 和 c-FLIP (FLICE 抑制蛋白) 的转录与表达进行分析, 沉默 NF- κ B, 分析其与 c-FLIP 的关系。结果 TRAIL 与左卡尼汀联用, 癌细胞存活率明显下降, 凋亡明显上升; 联用组与对照组相比, c-FLIP 的转录和蛋白表达以及 NF- κ B 的转录均有明显降低; 沉默 NF- κ B 证明其为 c-FLIP 上游因子。结论 左卡尼汀与 TRAIL 可以产生协同作用, 诱导 U87 细胞凋亡, 其敏化机制与抑制 NF- κ B 信号通路以及其下游 c-FLIP 表达有关。

关键词: 左卡尼汀; TRAIL; NF- κ B; c-FLIP; 神经胶质瘤; 凋亡

左卡尼汀是一种广泛存在于机体组织内的氨基酸衍生物, 是哺乳动物能量代谢必需的体内天然物质, 主要分布在哺乳动物的骨骼肌以及心肌中。人体可以通过膳食补充左卡尼汀, 肉类、禽类、鱼类以及乳制品都富含左卡尼汀, 而蔬菜和谷物中左卡尼汀的含量较少^[1]。左卡尼汀主要功能是促进机体脂类代谢, 在能量生成的过程中起着至关重要的作用, 它可以协助活化的脂肪酸进入线粒体基质进行 β 氧化产生能量, 并进一步辅助中间产物输出线粒体, 以防止中间产物的聚集^[2]。近期研究表明, 左卡尼汀除了参与能量代谢, 还可以调控细胞的程序性死亡。Fan 等^[3]报道: 左卡尼汀可以选择性诱导

肝癌细胞凋亡而对正常肝细胞没有任何不良影响。截止目前, 对左卡尼汀诱导癌细胞凋亡的机制, 尚无深入研究。

多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 被世界卫生组织分类为四级星形细胞瘤, 占有星形细胞瘤的 50%, 是一种极为普遍且极具侵袭性的恶性胶质瘤^[4]。其治疗措施包括手术、放疗、化疗等, 但由于 GBM 的基因多样性以及其复杂的分子病理, GBM 患者会不同程度的对治疗产生抵抗^[5-7]。因此, 目前治疗恶性胶质瘤成为肿瘤领域的重大挑战之一。近期已有研究发现: 针对特异性分子信号通路的靶向药物对恶性胶质瘤特别有效, 可能成为胶质瘤治疗的新热点。目前, 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 已经被认为是最具有潜力的治疗 GBM 药物靶点^[8]。本研究中, 探讨了左卡尼汀作为 TRAIL 的敏化剂, 增强 TRAIL 对 GBM 细胞诱导凋亡的效果, 并对其敏化作用的机制进行了研究, 旨在为临床 GBM 的治疗提供新的有效手段。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 人恶性胶质瘤细胞株 U87 购自 American Type Culture Collection 公司。左卡尼汀、胎牛血清、青霉素、链霉素购自 Sigma 公司, DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司, 所有抗体均购于 Santa Cruz Biotechnology, 流式凋亡试剂盒购于 BD Pharmingen 公司, caspase-3 活性测定试剂盒购于 Keygen 公司, Nuclear Extraction 试剂盒购于 Active Motif。酶标仪为 Tecan 公司产品 (型号 Infinite M1000), 流式细胞仪为 BD Biosciences 公司产品 (型号 FACS-Canto), PCR 仪为 Thermofisher 公司产品 (型号 GeneAmp 9700)。

1.2 细胞培养 U87 培养于含有 10% 胎牛血清、 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素双抗的高糖 DMEM 完全培养液中, 置于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。根据细胞培养情况, 3~4 d 传代 1 次, 取对数生长期、健康的细胞进行实验。

1.3 CCK-8 法测定细胞存活率 将细胞接种于 96

收稿日期: 2016-01-25, 修回日期: 2016-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 81473384)

作者简介: 杨秀伟 (1978-), 女, 硕士, 药师, 研究方向: 肿瘤防治, E-mail: qdzhfeng01@163.com;

韩彦弢 (1964-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物抗肿瘤, 通讯作者, E-mail: hanyt19@126.com

孔板中,相应药物处理后,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液后将 96 孔板放入细胞培养箱孵育 3 h。用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度,计算各组细胞存活率。

1.4 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 将细胞接种至 6 孔板中,相应药物处理后,用胰酶消化、离心、收集细胞沉淀, PBS 重悬细胞并计数。取 3×10^5 个细胞,加入 100 μL 结合液,重悬细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC,混匀后加入 5 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI),置于室温避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 Western blot 检测蛋白表达 收集细胞,预冷的裂解液(含 1% NP 40、0.5% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、蛋白酶抑制剂 cocktail, pH 6.8) 每组 100 μL 冰上裂解 10 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min 收集上清液, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。上样 10 μL , 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温条件下转膜, NC 膜以 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2h。将对应的特异性一抗按 1:200、 β -actin 按 1:1 000 稀释后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶结合的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗膜 3 次,加入 DAB 显色。图像经 Quantity One 凝胶成像分析系统进行分析。

1.6 NF- κ B 活性测试 以 Nuclear Extraction 试剂盒(Active Motif)进行细胞核内成分提取。细胞用 PBS 清洗,离心收集细胞,取细胞沉淀备用。每 20 μL 细胞沉淀加入 200 μL 核蛋白抽提试剂 A(含 PMSF),混匀冰浴 10~15 min,然后加入核蛋白抽提试剂 B 10 μL ,混匀后冰浴 1 min,离心吸取上清即为核蛋白。NF- κ B 活性利用 ELISA 试剂盒按步骤进行检测,用酶标仪在 450 nm 波长处测量 OD 值。

1.7 Caspase-3 活性检测 Caspase-3 活性利用试剂盒测定(Keygen Biotech, Nanjing, China)。细胞以 PBS 缓冲液重悬,冰上孵育 60 min, 10 000 $\times g$ 离心 1 min。收集上清与特异性酶底物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 4 h,利用分光光度计检测 450 nm 处吸光度。

1.8 细胞转染 将 3 条靶向 p65/NF- κ B 基因的特异性 siRNA 转入细胞,筛选出对 p65/NF- κ B 表达抑制最有效的一条。转染前取对数生长期细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/High Glucose 培养液悬浮后,以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中。Lipofectamine 2000 用 Opti-MEM 预混后,静置 5 min,加入 Opti-MEM 稀释后的 p65/NF- κ B siRNA 和 control-siRNA 并混匀,室温静置 20 min。p65/NF- κ B siRNA 序列为 5'-GATGAAGACTTCTCCTCCATTGCGGA-

CAT-3'(shRNA), control-siRNA 序列为 5'-TGAC-CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGC-3' 将混合物按分组加入含胶质瘤细胞的 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 48 h 后收集细胞进行试验。

1.9 定量 PCR 测试 于转染后 48 h 收获细胞,每孔加 0.5 mL TRIzol,按照 TRIzol 试剂说明书进行操作。测定紫外分光光度计 260 nm/280 nm 波长处的吸光度值,计算浓度,2% 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性。逆转录条件参照 AMV 酶说明书进行,PCR 扩增应用 ABI PRISM 7000 Sequence Detection 系统(Applied Biosystems)进行检测。引物序列如下(sense) 5'-CGGACTATAGAGTGCTGATGG-3' 以及(antisense) 5'-GATTATCAGGCAGATTCCTAG-3'。GADPH 用作内参来定量 PCR 产物。

1.10 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单个实验重复至少 3 次,Graphpad Prism 5.01 软件处理数据,SNK 统计学软件进行组间统计。

2 结果

2.1 左卡尼汀增强 U87 细胞中 TRAIL 诱导的细胞凋亡 首先检测 TRAIL 以及左卡尼汀对细胞存活率的影响。如图 1A 所示,当 TRAIL 浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞 48 h,可以明显降低细胞存活率($P < 0.05$)。左卡尼汀对细胞存活率的影响如图 1B 所示,左卡尼汀对细胞存活率的抑制呈现浓度依赖,与对照组相比较,20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左卡尼汀处理 48 h 可以将细胞的存活率降低至 $(62.1 \pm 5.2)\%$ 。基于以上的结果,以 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TRAIL 与 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左卡尼汀组合进行后续实验。如图 1C 所示,50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TRAIL 与 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左卡尼汀联合处理细胞 48 h,细胞的存活率降至 $(49.2 \pm 4.9)\%$ 。

利用流式细胞仪,对左卡尼汀与 TRAIL 联合诱导凋亡的效果进行检测。如图 2A 所示,当 TRAIL 浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,不能够在细胞中引起明显的凋亡($P > 0.05$)。但是当 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TRAIL 与 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左卡尼汀联合给药时,左卡尼汀可以明显增强细胞对 TRAIL 诱导凋亡作用的敏感度,两者联用可以在细胞中引起明显的凋亡($P < 0.05$)。细胞的凋亡与 caspase-3 和 PARP 的活化紧密相关,因此检测了两者联用对 caspase-3 以及 PARP 活化状态的影响。如图 2B 所示,TRAIL 与左卡尼汀联用导致活化 caspase-3 和 PARP 的表达明显升高。caspase-3 的活化也进一步的被酶活性检测结果所证实,如图 2C 所示。

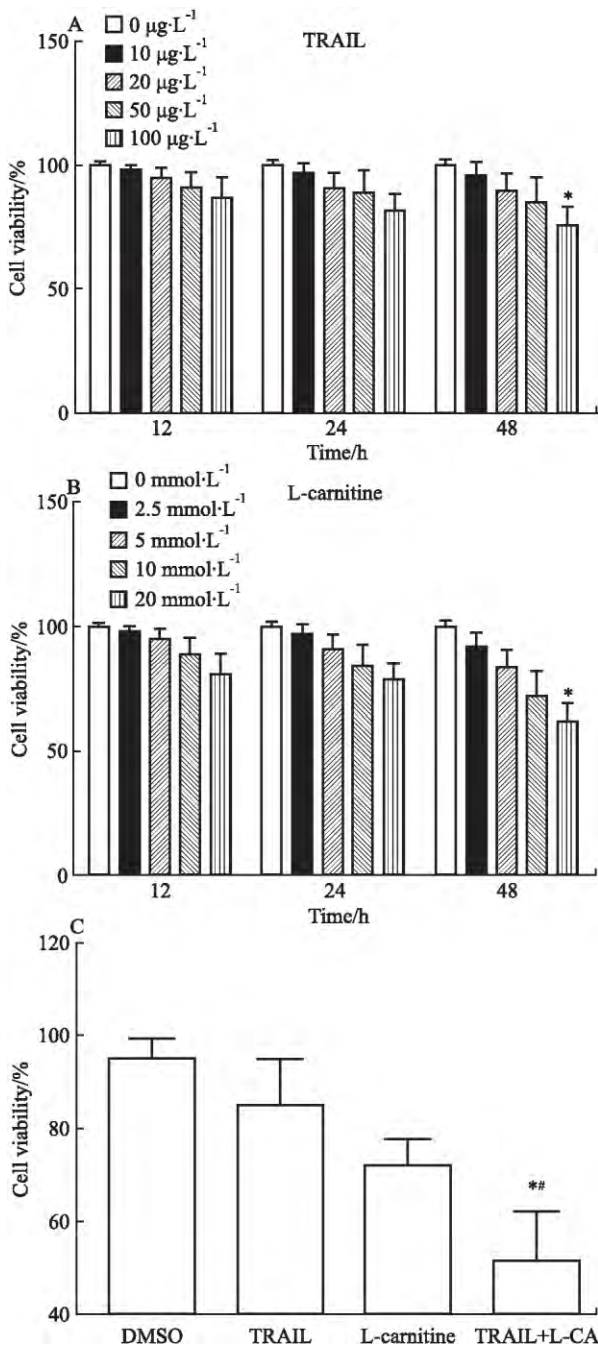


Fig 1 Effect of L-carnitine or/and TRAIL on cell viability

Cells were treated with indicated concentration of L-carnitine , TRAIL , or both for 48 h. * $P < 0.05$ vs DMSO; # $P < 0.05$ vs TRAIL

2.2 左卡尼汀通过调节c-FLIP水平提高U87细胞对TRAIL的敏感性 U87细胞的凋亡与c-FLIP的水平密切相关^[10,16] 本研究检测了左卡尼汀是否通过调节c-FLIP水平提高U87细胞对TRAIL的敏感性。如Fig 3A所示, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TRAIL并未引起细胞内c-FLIP水平的明显变化 ($P > 0.05$), 而10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左卡尼汀也只是将细胞内的c-FLIP水平稍微下调 ($P > 0.05$)。但是当两者联用, 细胞中的c-FLIP水平呈现出明显的下降 ($P < 0.05$)。为了进

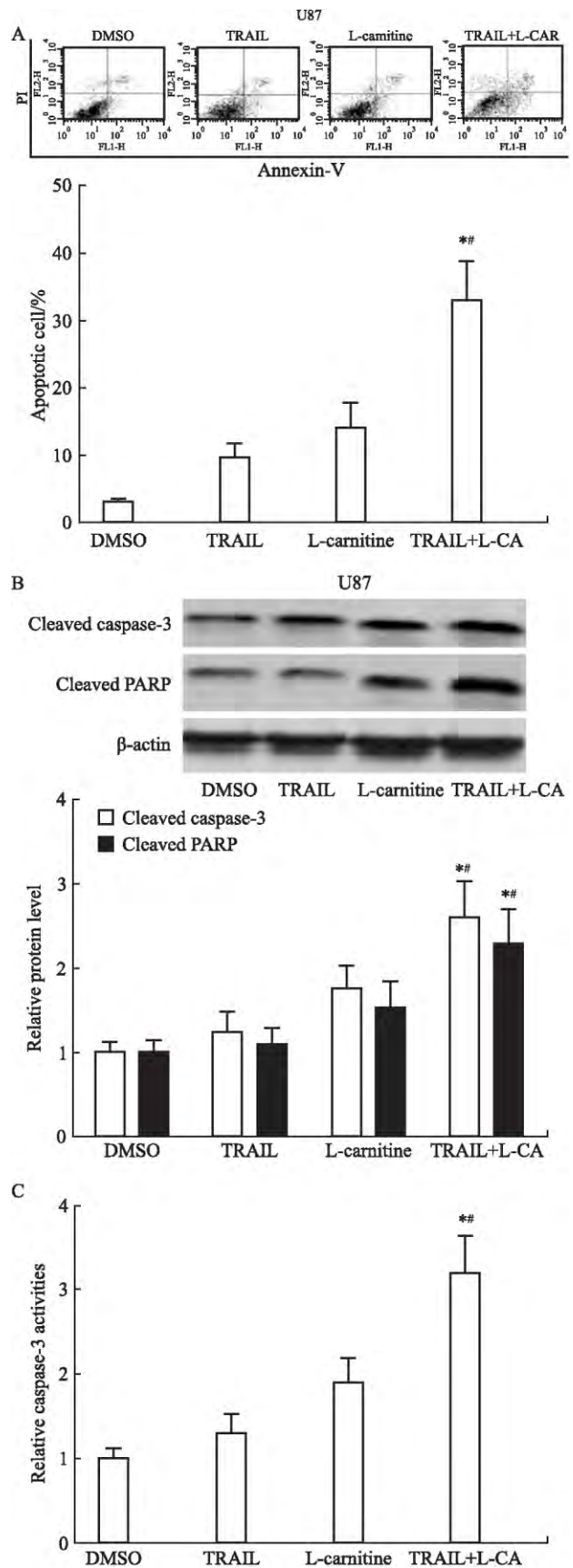


Fig 2 Combinatory treatment with L-carnitine plus TRAIL induced apoptosis mediated via caspase-dependent pathway

Cells were treated with indicated concentration of L-carnitine , TRAIL , or both for 48 h. * $P < 0.05$ vs DMSO; # $P < 0.05$ vs TRAIL

一步证实以上结果,利用 RT-PCR 检测了 c-FLIP 的 mRNA 表达水平。如 Fig 3B 所示,TRAIL 与左卡尼汀联合,明显抑制 c-FLIP 的 mRNA 表达,表明左卡尼汀增强 TRAIL 诱导凋亡效果伴随 c-FLIP 水平的下调。

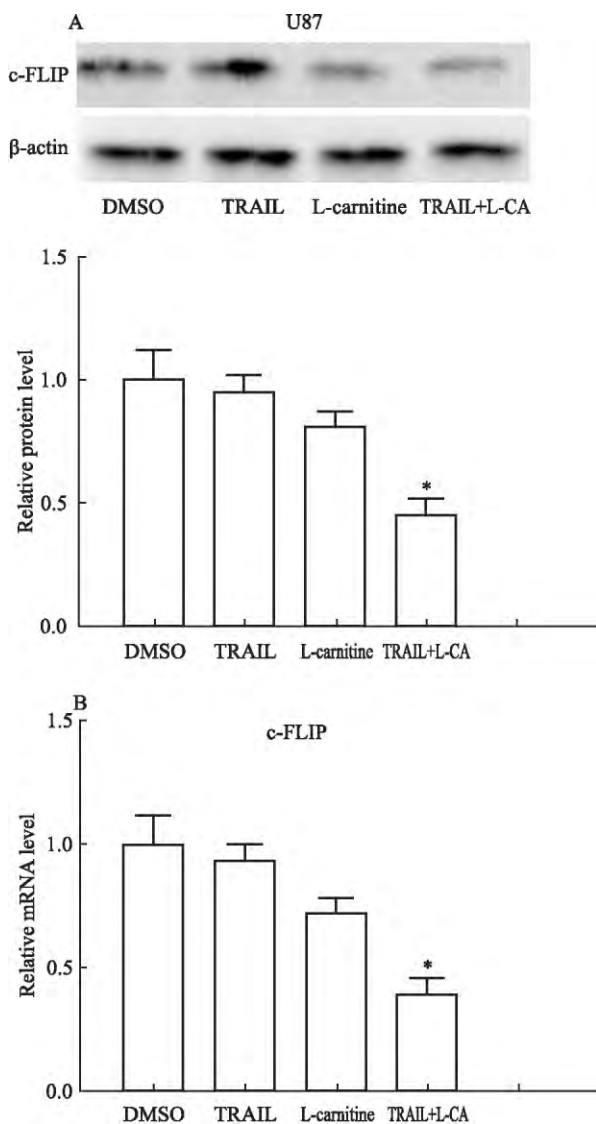


Fig 3 Effects of TRAIL and L-carnitine on c-FLIP expression in U87 cells

Cells were treated with indicated concentration of L-carnitine, TRAIL, or both for 48 h. * $P < 0.05$ vs DMSO

2.3 左卡尼汀抑制 U87 细胞中 TRAIL 诱导的 NF- κ B 活化 NF- κ B 对于细胞内 c-FLIP 水平起到关键的调节作用^[10],本研究检测了 TRAIL、左卡尼汀以及两者联用对 NF- κ B 信号通路的影响。如 Fig 4A 所示,ELISA 的检测结果表明,100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TRAIL 可以将 NF- κ B 的核内转运比例稍稍上调,而左卡尼汀可以稍微下调 p65 亚基的核内转运。但是当二者联用时,与对照组相比,NF- κ B 的活化显示出

明显抑制($P < 0.05$),提示左卡尼汀对于 TRAIL 诱导凋亡的敏化作用与 NF- κ B 通路活化受阻有密切关系。

2.4 沉默 p65/NF- κ B 基因诱导 U87 细胞的神经毒性 为了更直观的显示 NF- κ B 信号通路抑制对于 TRAIL 诱导细胞凋亡的敏化作用,以 shRNA 沉默了 p65/NF- κ B 基因。转染 48 h 以后,对 p65/NF- κ B 基因沉默的效果利用免疫印迹进行验证,如 Fig 4B 所示,siRNA 转染可以明显抑制 p65/NF- κ B 的表达。MTT 实验结果表明,沉默 p65/NF- κ B 基因可以明显增强 TRAIL 对于 U87 细胞存活率的抑制(Fig 4C)。同时,RT-PCR 和 Western blot 结果也表明,p65/NF- κ B 基因沉默明显降低了 U87 细胞内 c-FLIP mRNA 以及蛋白的表达(Fig 4D)。以上结果显示,抑制 NF- κ B 信号通路的活化可以在 U87 细胞中增强 TRAIL 诱导的凋亡,这种敏化效果与 c-FLIP 蛋白的下调有关。

3 讨论

多形性成胶质细胞瘤(GBM)是成人患者中最常见的脑部肿瘤,具有高侵袭性、高死亡率的特点,中位存活期只有 14.6 月^[9]。由于分子病理异相性,GBM 的治疗相较于其他肿瘤尤其困难。为了改善预后,提高生存率,针对凋亡以及存活通路的一系列药物已经被用于治疗 GBM,包括针对表皮生长因子的 erlotinib 与 gefitinib,针对 Akt 通路的 perifosine,针对 mTOR 靶点的 temsirolimus,以及针对 Bcl-2 的 gossypol。已有临床前研究表明,人类 TRAIL 能在活体动物模型中抑制胶质瘤生长^[10],提示 TRAIL 具有应用于临床治疗的巨大潜力。但是,大部分胶质瘤细胞对 TRAIL 呈现出耐受,极大的限制了 TRAIL 的临床应用。近 10 年来,一系列研究结果显示,将 TRAIL 与其他抗癌药物相结合,可以有效克服 TRAIL 耐受,提高治疗效果。Saito 等^[11]发现将 Temozolomide 与 TRAIL 相结合可以明显延长荷瘤小鼠的存活期。Lee 等^[12]也证实了一些天然产物可以与 TRAIL 联用,提高胶质瘤细胞对 TRAIL 的敏感度。本项研究中,我们对左卡尼汀与 TRAIL 的协同作用进行了研究,并对其相关机制进行了探讨。

TRAIL 通过与死亡受体 DR4/TRAIL-R1 以及 DR5/TRAIL-R2 相结合,引致 DISC 形成,从而激活 caspase-8,诱导细胞凋亡。从 DISC 发出的凋亡信号可以被细胞内 FLICE 抑制蛋白(c-FLIP)所抑制。c-FLIP 属于 death effector domain(DED) 家族,是具有催化活性的没有 caspase-8/-10 的同系物,并且已经被发现在多种肿瘤中呈现高表达,被认为是凋亡的

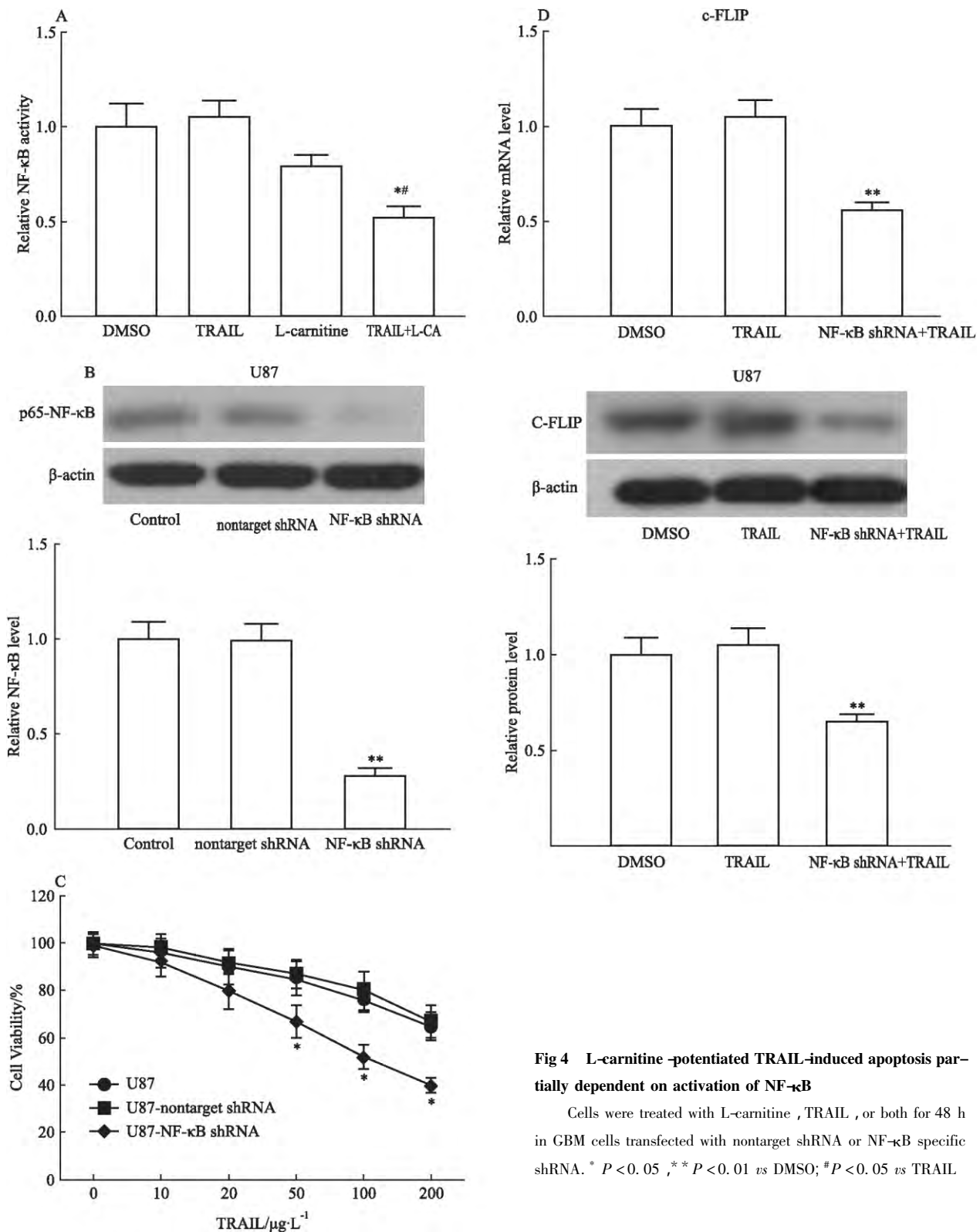


Fig 4 L-carnitine-potentiated TRAIL-induced apoptosis partially dependent on activation of NF-κB

Cells were treated with L-carnitine, TRAIL, or both for 48 h in GBM cells transfected with nontarget shRNA or NF-κB specific shRNA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DMSO; # $P < 0.05$ vs TRAIL.

抑制因子之一^[13]。3种 c-FLIP 片段变体已经被鉴定为细胞内蛋白,包括 55 ku 的长型 c-FLIP(L)、26 ku 的短型 c-FLIP(S)以及 24 ku 的 c-FLIP(R)。当处于高表达状态,所有 3 种 c-FLIP 都被认为可以作为抗凋亡蛋白,并且与 caspase-8/-10 竞争,参与 DISC 的富集^[9]。相反的,在生理条件下,c-FLIP 呈

现低表达,c-FLIP 可以促进 caspase-8 的活化以及死亡受体介导的凋亡^[9]。Kang 等的研究表明,利用 siRNA 敲除 c-FLIP 可以增强 TRAIL 诱导的凋亡。以上研究都提示:对于 TRAIL 诱导的凋亡,c-FLIP 起到至关重要的作用。与此前研究结果相吻合,我们的研究结果也发现,左卡尼汀对于 TRAIL 诱导凋

亡的敏化效果与 c-FLIP 下调有密切关系。

已有研究显示^[14]: NF- κ B 信号通路参与调节不依赖生长因子的细胞增殖,抑制凋亡、无限复制、组织的侵袭以及转移,与肿瘤的发生发展紧密相关。NF- κ B 信号通路在神经胶质瘤的发展中也起着重要作用,其活性增加与不良预后呈正性相关。另外, NF- κ B 信号通路活化与转录水平上的 c-FLIP 上调也呈正性相关。因此,抑制 NF- κ B 信号通路已成为治疗神经胶质瘤的方案之一。Jane 等^[15]发现 Bortezomib 与 TRAIL 联用,可以对神经胶质瘤的生长产生协同抑制,其机制与抑制 NF- κ B 信号通路活化有关。本研究也发现左卡尼汀可以有效地抑制 U87 细胞中 NF- κ B 信号通路活化,且 NF- κ B 信号通路抑制是左卡尼汀敏化 TRAIL 诱导凋亡的主要机制。

综上所述,本研究表明左卡尼汀可以在神经胶质瘤细胞中增强 TRAIL 诱导的凋亡,其机制与抑制 NF- κ B 信号通路及其下游 c-FLIP 表达有关。此结果为将左卡尼汀应用于神经胶质瘤临床治疗提供了理论依据。

(致谢:感谢青岛大学国家实验教学中心人体机能实验室全体人员的帮助。)

参考文献:

- [1] Shimada K, Sakuma Y, Wakamatsu J, et al. Species and muscle differences in L-carnitine levels in skeletal muscles based on a new simple assay [J]. *Meat Sci*, 2004, **68**(3): 357–62.
- [2] Jogl G, Hsiao Y S, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1033**: 17–29.
- [3] Fan J P, Kim H S, Han G D. Induction of apoptosis by L-carnitine through regulation of two main pathways in Hepal c1c 7 cells [J]. *Amino Acids*, 2009, **36**(2): 365–72.
- [4] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005, **64**(6): 479–89.
- [5] 余永强,陈骏,钱银锋,等. 立体定向建立大鼠 C6 脑胶质瘤模型 [J]. *中国药理学通报*, 2004, **19**(2): 222–5.
- [5] Yu Y Q, Chen J, Qian Y F, et al. Establishment of rat C6 glioma

models with stereotaxis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2004, **19**(2): 222–5.

- [6] Park D M, Rich J N. Biology of glioma cancer stem cells [J]. *Mol Cells*, 2009, **28**(1): 7–12.
- [7] Stupp R, Mason W P, van den Bent M J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, **352**(10): 987–96.
- [8] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand [J]. *J Clin Invest*, 1999, **104**(2): 155–62.
- [9] Schleich K, Warnken U, Fricker N, et al. Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model [J]. *Mol Cell*, 2012, **47**(2): 306–19.
- [10] Roth W, Isenmann S, Naumann U, et al. Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **265**(2): 479–83.
- [11] Saito R, Bringas J R, Panner A, et al. Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model [J]. *Cancer Res*, 2004, **64**(19): 6858–62.
- [12] Lee D H, Kim D W, Jung C H, et al. Gingerol sensitizes TRAIL-induced apoptotic cell death of glioblastoma cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, **279**(3): 253–65.
- [13] Tian F, Lu J J, Wang L, et al. Expression of c-FLIP in malignant melanoma, and its relationship with the clinicopathological features of the disease [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2012, **37**(3): 259–65.
- [14] Nogueira L, Ruiz-Ontañón P, Vazquez-Barquero A, et al. The NF- κ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2011, **2**(8): 646–53.
- [15] Jane E P, Premkumar D R, Pollack I F. Bortezomib sensitizes malignant human glioma cells to TRAIL, mediated by inhibition of the NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, **10**(1): 198–208.
- [16] 陈立立,陈志明,王冠林,等. 以细胞存亡调控蛋白 c-FLIP 为靶点的癌症治疗研究 [J]. *中国药理学通报*, 2014, **30**(11): 1496–502.
- [16] Chen L L, Chen Z M, Wang G L, et al. Studies on cell death and survival regulatory protein c-FLIP as a target for cancer treatment [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, **30**(11): 1496–502.

L-carnitine sensitizes human glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis

YANG Xiu-wei^{1,2}, XIE Jing³, ZHONG Feng⁴, HAN Yan-tao³

((1. School of Pharmacy, 2. the Affiliated Hospital, 3. Basic Medical College, 4. School of Stomatology, Qingdao University, Qingdao Shandong 266000, China)

Abstract: Aim To investigate the enhancing effect of L-carnitine as a sensitizer on tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced ap-

optosis in glioma cells. **Methods** Glioma cell U87 was used as model cell line. Cell viability was determined by CCK-8, and apoptosis was assessed by Annexin

网络出版时间: 2016-4-26 11:06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20160426.1106.030.html>

氯化锂对冈田酸所致 SK-N-SH 神经元突触萎缩的保护作用

袁玉婷¹, 侣营营², 王占洋¹, 弥相权³, 吕欢欢⁴, 许波², 李刚⁴, 李忌², 何杰², 王振华²

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832005; 2. 烟台大学生命科学学院 线粒体与健康衰老研究中心, 山东 烟台 264005; 3. 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000; 4. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.05.015

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2016)05-0670-06

中国图书分类号: R329.24; R338.13; R745.7; R916.3

摘要:目的 考察氯化锂(LiCl)对蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸(OA)诱导的SK-N-SH细胞分化神经元损伤的保护作用和tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平的影响。方法 利用全反式维甲酸(ATRA)诱导SK-N-SH细胞分化为成熟的神经元细胞;采用OA诱导成熟神经元细胞建立AD模型;采用磺酰罗丹明B(SRB)比色法考察LiCl对成熟的神经元细胞增殖的抑制作用;Giemsa染色观察SK-N-SH细胞形态学变化;并采用Image-Proplus软件测定神经元细胞的突触长度;采用Western blot检测synaptophysin蛋白和tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平。结果 10 μmol·L⁻¹ ATRA连续处理7 d,可诱导SK-N-SH细胞突触生长和synaptophysin蛋白表达等典型分化神经元的特征。20~100 nmol·L⁻¹ OA作用于分化神经元,可浓度和时间依赖性抑制细胞增殖,同时致分化神经元突触萎缩,tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平也明显升高。10 mmol·L⁻¹ LiCl预处理可维持synaptophysin蛋白高表达,抑制tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平($P < 0.01$)。结论 LiCl能够改善OA所致分化神经元的突触损伤,并伴

随着synaptophysin表达的升高,tau蛋白Ser-262位点异常磷酸化水平的降低。

关键词: LiCl; 冈田酸; tau蛋白磷酸化; 阿尔茨海默病; 分化神经元; 突触萎缩; 吉姆萨染色

阿尔茨海默病(AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,其病理特征主要表现为淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积形成的老年斑、tau蛋白过度磷酸化导致的神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)以及神经元丢失和突触损伤。其中,NFTs主要由过度磷酸化的tau蛋白聚集形成配对螺旋状细丝(paired helical filament, PHF)组成^[1],而tau蛋白在维持神经突触微管稳定(尤其是轴突)方面具有重要的作用。体外研究表明:tau蛋白的磷酸化程度直接影响神经元生长与成熟过程中微管的稳定性,一般新生体含有丰富的磷酸化tau,而随着神经元的成熟,主要通过下调蛋白激酶和上调磷酸酯酶从而降低tau的磷酸化水平^[2];体内研究证明:tau主要通过调节脯氨酸依赖性的蛋白激酶,从而调节tau蛋白的磷酸化水平,例如细胞周期素依赖性激酶(CDK)、促分裂原激活蛋白激酶(MAPK)和糖原合成激酶(GSK-3 β)^[3-4],目前开发多种激酶抑制剂,主要以降低tau蛋白磷酸化水平作为治疗AD的新药开发的新途径。

LiCl是发现的第一类tau蛋白激酶GSK-3 β 特异性抑制剂^[5]。体内研究表明,LiCl可通过下调GSK-3 β 的表达,上调抗凋亡因子Bcl-2、神经营养因

收稿日期: 2016-01-01, 修回日期: 2016-01-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No 11175222 21372190); 石河子大学重大科技攻关计划项目(No gxjs2012-zdgg02); 山东省泰山学者建设工程专项经费(No tshw201502046); 青海省科技创新能力促进计划项目(No 2014-ZJ-765); 烟台市科技计划项目(No 2014LGS004)

作者简介: 袁玉婷(1989-),女,硕士生,研究方向:分子药理学,E-mail: yutingyuan12345@sina.cn;

王振华(1973-),男,博士,副教授,研究方向:自由基生物医学,通讯作者,E-mail: zhenhuawang@tom.com

V-FITC/PI staining, caspase-3 activity and expression. The expression and transcription of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and FLICE inhibiting protein (c-FLIP) were measured by RT-PCR and Western blot. In addition, NF- κ B was knockdown to analyze its regulating effect on c-FLIP expression. **Results** The combination treatment with TRAIL and L-carnitine significantly inhibited cell proliferation and induced apoptosis. Compared with control, combinational treatment

significantly suppressed the transcription and expression of c-FLIP as well as translocation of NF- κ B. Through silencing NF- κ B, NF- κ B was found to act as upstream signaling to regulate c-FLIP. **Conclusion** L-carnitine sensitizes TRAIL-induced tumor cell apoptosis via suppression of NF- κ B-dependent c-FLIP expression.

Key words: L-carnitine; TRAIL; NF- κ B; c-FLIP; GBM; apoptosis