

## ERK<sub>1,2</sub> 抑制剂联合 5-FU 对 B16 细胞增殖和凋亡的影响

谭雪梅, 郑辉, 洪学军

(暨南大学医学院生理学教研室, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 观察 ERK<sub>1,2</sub> 抑制剂联合 5-FU 对 B16 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨作用机制。方法: 用 MTT 法观察 ERK<sub>1,2</sub> 抑制剂、5-FU 和联合用药对细胞增殖的抑制作用, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 用 RT-PCR 观察 ERK<sub>1,2</sub> 抑制剂、5-FU 和联合用药对 bcl-2 和 caspase-9 的表达的影响。结果: ERK<sub>1,2</sub> 抑制剂联合 5-FU 组在抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 均较对照组、单独用药组作用增强, 并且下调 bcl-2 和上调 caspase-9 的表达。结论: ERK<sub>1,2</sub> 抑制剂联合 5-FU 有协同抑制 B16 细胞增殖, 促进凋亡的作用, 其机制可能与诱导细胞凋亡, 下调 bcl-2 和上调 caspase-9 的表达有关。

**[关键词]** 丝裂原活化蛋白激酶; 5-氟尿嘧啶; 凋亡; 细胞外调节蛋白激酶

**[中图分类号]** R 394.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0606-04

## Effects of the combination of the MEK<sub>1,2</sub> inhibitor and 5-FU on proliferation and apoptosis of B16 cells

TAN Xue-mei, ZHENG Hui, HONG Xue-jun

(Department of Physiology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Aim:** To study the effects of combination of the ERK<sub>1,2</sub> inhibitor and 5-FU on B16 cells in vitro and their antitumor mechanisms. **Methods:** To detect the growth inhibitory effects of the specific inhibitor of MAPK/ERK<sub>1,2</sub>, 5-FU alone or combination in various concentration on B16 cells by MTT assays. Flow cytometry was used to determine the effects of the specific inhibitor of MAPK/ERK<sub>1,2</sub>, 5-FU alone or combination in various concentration on apoptosis was analyzed by using flow cytometry. The reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect the influence of the specific inhibitor of MAPK/ERK<sub>1,2</sub>, 5-FU alone or combination to the expression of Bcl-2 and Caspase-9. **Results:** Combination of the specific inhibitor of MAPK/ERK<sub>1,2</sub> with 5-FU had greater inhibitory effects on growth and proliferation, enhanced the effects of cellular apoptosis of B16 cells, and decreased the expression of bcl-2 and increased the expression of caspase-9, compared to the sum of the specific inhibitor of MAPK/ERK<sub>1,2</sub>, 5-FU alone and the control group. **Conclusion:** Combination of specific inhibitor of MAPK/ERK<sub>1,2</sub> with 5-FU has a significantly synergic anti cancer effect. The antitumor mechanism may be associated with induction of apoptosis and down-regulation of anti-apoptotic bcl-2 and up-regulation of the caspase-9.

**[收稿日期]** 2009-09-11

**[基金项目]** 广东省医学科研基金(A2009351)

**[作者简介]** 谭雪梅(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 医学分子病理和生理

通讯作者: 郑辉, 女, 副教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220260; E-mail: tlihz@jnu.edu.cn

[Key words] mitogen activated protein kinase; 5-fluorouracil; apoptosis; extracellular regulated protein kinases

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号途径是一种丝裂原活化的蛋白激酶超家族,主要包括3个信号转导途径:细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)途径、Jnk途径和p38途径,调控细胞间代谢、基因表达、细胞的生长、分化、凋亡和对外界压力的反应等<sup>[1]</sup>,其中ERK途径是与素瘤(malignant melanoma, MM)关系最密切。MAPK/ERK途径主要由RAS-RAF-MEK-ERK等蛋白激酶组成,通过依次催化下级蛋白激酶发生磷酸化而激活整个信号通路。小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)恶性黑素瘤中ERK过度活化后影响细胞周期素、MITF等因子促使细胞生长过度 and 分化不良。阻断ERK蛋白活性可以抑制黑素瘤细胞的恶性生长,应用ERK<sub>1,2</sub>抑制剂阻断部分黑素瘤细胞的体外和体内侵袭和转移<sup>[2]</sup>。而5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)能阻断脱氧尿嘧啶核苷酸向脱氧胸腺嘧啶核苷酸的转变,抑制DNA的生物合成,是治疗肿瘤、预防肿瘤复发和肿瘤复发后化疗最常用的药物之一,但副作用较大。选择ERK<sub>1,2</sub>抑制剂和5-FU做为新的联合治疗方案,以期降低ERK<sub>1,2</sub>抑制剂和5-FU的使用剂量,从而减少副作用和增加疗效,为临床上恶性黑素瘤患者的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂仪器

ERK<sub>1,2</sub>抑制剂PD98059购自英国tocris生物公司,氟尿嘧啶注射液购自上海旭东海普药业有限公司,DMEM高糖购自Gibco公司,新生牛血清购自Gibco公司;2×Taq PCR MasterMix逆转录试剂盒购自天根公司;琼脂糖购自西班牙Biowest公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列分别如下:

Caspase-9引物序列:上游:5'-CCGTGGACATT-GGTTCT-3';下游:5'-TTGGCACTCAGGTCGTT-3',扩增长度为247 bp。Bcl-2引物序列:上游:5'-GCCT-GCTTTATGGAGA-3';下游:5'-GGC ACTACCT-GCGTTC-3',扩增长度为279 bp。β-微球蛋白(Beta-

microglobulin)为内参,其引物序列:上游:5'-CCG-GCTTGTATGCTATCCAG-3';下游:5'-CTCGATC-CCAGTAGACGGT-3',扩增长度306 bp。

### 1.2 方法

(1)细胞培养 B16用体积分数10%新生牛血清、青霉素质量浓度为0.1 g/L、链霉素质量浓度为0.1 g/L的DMEM高糖,在37℃、95%饱和湿度、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养,2~3 d换液传代培养。

(2)MTT法 实验分组:A组:单用PD98059,终浓度分别 $12.5 \times 10^{-3}$ 、 $25 \times 10^{-3}$ 、 $37.5 \times 10^{-3}$  mol/L;B组:单用5-FU,终浓度分别 $35 \times 10^{-3}$ 、 $75 \times 10^{-3}$ 、 $105 \times 10^{-3}$  mol/L;C组联合用药终浓度分别 $(12.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3})$  mol/L、 $(25 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3})$  mol/L、 $(37.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3})$  mol/L;D组空白对照组。将细胞以 $1.0 \times 10^7$ /L接种于96孔板,每孔 $1.0 \times 10^{-4}$  L,24 h后换液,按上述分组处理细胞,设置6个复孔,置于恒温孵育箱内继续培养。于培养第24 h、48 h后,常规MTT法于570 nm波长测吸光值(A),并计算细胞增殖抑制率,重复3次。

(3)流式细胞术 接种于6孔板,每孔 $2.0 \times 10^{-3}$  L,药物作用24 h、48 h后,收集细胞。用预冷PBS洗涤2次,体积分数为75%乙醇4℃固定,以终质量浓度为 $5 \times 10^{-2}$  g/L PI避光染色处理30 min后,经流式细胞仪检测凋亡率。

(4)RT-PCR 接种于6孔板中,每孔 $2.0 \times 10^{-3}$  L,药物作用24 h、48 h后,用TRizol试剂提取总RNA。逆转录反应: $2 \times 10^{-6}$  L Oligo(dt)、 $2 \times 10^{-6}$  L总RNA、 $2 \times 10^{-6}$  L dNTP和 $7.5 \times 10^{-6}$  L Rnase-free ddH<sub>2</sub>O 70℃加热5 min后,迅速冰上冷却2 min,再原EP管中加入 $4 \times 10^{-6}$  L 5倍缓冲液、 $0.5 \times 10^{-6}$  L Rnasin $\mu$ L、 $1 \times 10^{-6}$  L 0.1 m DTT和 $1 \times 10^{-6}$  L M-MLV逆转录酶至 $20 \times 10^{-6}$  L,再将EP管置于42℃中50 min,95℃中加热5 min终止反应,加Rnase-free ddH<sub>2</sub>O至 $50 \times 10^{-6}$  L。-20℃保存,以备做PCR。PCR反应体系: $2 \times 10^{-6}$  L cDNA、 $1 \times 10^{-6}$  L primer 1、 $1 \times 10^{-6}$  L primer 2、 $12.5 \times 10^{-6}$  L 2

倍 master Mix 和  $8.5 \times 10^{-6}$  L ddH<sub>2</sub>O 置于 PCR 仪中。条件设置为:94 ℃ 预变性 1 min 后,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共循环 30 个循环。PCR 产物体积分数为 2% 琼脂糖电泳后凝胶成像系统检测结果。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。所有数据均以(均数 ± 标准差)( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用完全随机设计的单因素方差分析(one-way ANOVA)分析组间差异的显著性, $P < 0.05$  具有统计学差异。

2 结果

2.1 PD98059 和 5-FU 对 B16 细胞增殖的影响

不同浓度的 PD98059、5-FU 和联合用药都抑制 B16 细胞的增殖,并具有明显的量 - 效关系,但 PD98059 和 5-FU 联合用药增强抑制 B16 增殖的作用,且随着 PD98059 浓度的增加,联合用药的抑制率增加(表 1)。

表 1 PD98059 和 5-FU 对 B16 细胞增殖( $\bar{x} \pm s$ )的影响

组别/(mol · L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	
	24 h	48 h
D 组(对照组)	0	0
A 组( $12.5 \times 10^{-3}$ )	$7.60 \pm .07^{1)}$	$9.02 \pm .47^{1)}$
A 组( $25 \times 10^{-3}$ )	$18.65 \pm .07^{1)}$	$19.124 \pm .88^{1)}$
A 组( $37.5 \times 10^{-3}$ )	$25.36 \pm .06^{1)}$	$40.34 \pm .29^{1)}$
B 组( $35 \times 10^{-3}$ )	$13.28 \pm .04^{2)}$	$32.58 \pm .27^{2)}$
B 组( $75 \times 10^{-3}$ )	$24.21 \pm .02^{2)}$	$50.28 \pm .22^{2)}$
B 组( $105 \times 10^{-3}$ )	$32.99 \pm .03^{2)}$	$58.61 \pm .36^{2)}$
C 组( $12.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$33.98 \pm .06^{3)}$	$34.66 \pm .09^{4)}$
C 组( $25 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$41.74 \pm .05^{3)}$	$50.55 \pm .05^{3)}$
C 组( $37.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$49.77 \pm .02^{3)}$	$70.73 \pm .05^{3)}$

1)与对照组相比, $P < 0.05$ ; 2)与单用 PD98059 组相比, $P < 0.05$ ; 3)与单用 5-FU 组相比  $P < 0.05$ ; 4)与浓度 35  $\mu\text{mol/L}$  相比,  $P > 0.05$

2.2 流式细胞术结果

各组药物作用于细胞 24 h 后,凋亡率较对照组相比,有显著差异( $P < 0.05$ );联合用药与单用 PD98059、5-FU 相比,凋亡率随着 PD98059 浓度的增加而显著增加( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 2 PD98059 和 5-FU 联合作用于 B16 细胞亚二倍体率( $\bar{x} \pm s$ )

组别/(mol · L <sup>-1</sup> )	凋亡率/%
D 组(对照组)	$1.73 \pm .70$
A 组( $12.5 \times 10^{-3}$ )	$3.73 \pm .40$
B 组( $35 \times 10^{-3}$ )	$8.13 \pm .71$
C 组( $12.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$15.56 \pm .73$
C 组( $25 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$20.66 \pm .98$
C 组( $37.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$29.86 \pm 1.72$

各用药组与对照组相比, $P < 0.05$ ;3 个联合用药组与单用药组相比,  $P < 0.01$

2.3 RT-PCR 结果

实验组与对照组相比 bcl-2 的 mRNA 相对表达量明显降低( $P < 0.05$ ),caspase-9 的 mRNA 相对表达量明显升高( $P < 0.05$ );联合用药组与单用药组相比 bcl-2 的 mRNA 相对表达量明显降低( $P < 0.05$ ),caspase-9 的 mRNA 相对表达量明显升高( $P < 0.05$ )(表 3 和表 4)。mRNA 相对表达量 = 目的基因的灰度值/内参的灰度值  $\times 100\%$ 。

表 3 PD98059 和 5-FU 联合作用于 B16 细胞后 bcl-2 的 mRNA( $\bar{x} \pm s$ )表达水平

组别/(mol · L <sup>-1</sup> )	24 h	48 h
D 组(对照组)	$49.24 \pm 2.69$	$48.57 \pm 3.36$
A 组( $12.5 \times 10^{-3}$ )	$37.65 \pm 1.59$	$41.93 \pm 1.52$
B 组( $35 \times 10^{-3}$ )	$32.19 \pm 2.01$	$25.73 \pm .89$
C 组( $12.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$27.67 \pm .42$	$22.94 \pm 3.41$
C 组( $25 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$24.18 \pm .97$	$19.58 \pm .69$

各用药组与对照组相比, $P < 0.05$ ;两个联合用药组与单用药组相比,  $P < 0.05$

表 4 PD98059 和 5-FU 联合作用于 B16 细胞后 caspase-9 的 mRNA( $\bar{x} \pm s$ )表达水平

组别/(mol · L <sup>-1</sup> )	24 h	48 h
D 组(对照组)	$11.58 \pm 0.13$	$11.69157 \pm 0.11$
A 组( $12.5 \times 10^{-3}$ )	$11.78 \pm 0.35$	$16.60644 \pm 1.79$
B 组( $35 \times 10^{-3}$ )	$14.59 \pm 1.38$	$13.56968 \pm 0.74$
C 组( $12.5 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$13.75 \pm 0.518$	$18.10645 \pm 1.47$
C 组( $25 \times 10^{-3} + 35 \times 10^{-3}$ )	$18.77 \pm 0.37$	$25.4304 \pm 1.58$

各用药组与对照组相比, $P < 0.05$ ; 两个联合用药组与单用药组相比  $P < 0.05$

3 讨论

MM 从 60 年代开始在多数国家的发病率每年

升高3%~8%<sup>[3-4]</sup>。MM发展转移到其他器官,预后不理想,而且转移性MM一般对常规化疗呈抗拒性,有效的标准系统治疗策略至今仍未确定<sup>[5]</sup>。

单独运用ERK<sub>1,2</sub>抑制剂和5-FU对B16细胞生长均有不同程度的抑制作用,但联合用药具有更强的抑制B16细胞生长的作用。MTT法结果表明:不同浓度ERK<sub>1,2</sub>抑制剂与5-FU联合应用时,生长抑制率均高于单独用药组,且呈时间、剂量依赖。可见ERK<sub>1,2</sub>抑制剂和5-FU联合应用,有协同效果,能有效的抑制细胞的生长,达到减少甚至杀死癌细胞的作用。

流式细胞术结果显示:单独ERK<sub>1,2</sub>抑制剂和5-FU均可诱导B16细胞发生凋亡,但是联合用药组细胞凋亡率高于单独用药组( $P < 0.05$ ),同样联合用药组之间细胞凋亡率差别也有统计学差异( $P < 0.05$ )。可见联合用药组在诱导细胞凋亡有较好的效果,优于单独用药组,则ERK<sub>1,2</sub>抑制剂和5-FU联合用药增强诱导凋亡的作用,达到控制癌细胞的效果。

细胞凋亡以及调控机制的异常是肿瘤发生发展和肿瘤治疗效果的重要因素。人类的MM中,在90%的病人中可见B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白的表达<sup>[6]</sup>。Bcl-2家族蛋白质通过调节线粒体膜的通透性参与细胞凋亡的信号传导<sup>[7]</sup>。抗凋亡基因bcl-2是Bcl-2家族蛋白成员中主要的抗凋亡分子。因此检测细胞内bcl-2的表达可反应细胞抗凋亡的情况。而细胞内与凋亡有关的一系列有序级联反应,关键是激活一组caspase蛋白酶,其中caspase-8和caspase-9在死亡受体内外途径中起着最重要作用,在caspase级联反应中都属于启动性caspase。运用RT-PCR检测bcl-2和caspase-9mRNA的表达水平的变化,本研究中单一用药组和联合用药组均能下调bcl-2的表达,但联合用药组与单一用药组相比,mRNA的相对表

达量有显著差异,且随联合用药浓度的增加而减少,呈量效关系;单一用药组和联合用药组均能下调caspase-9的表达,但联合用药组与单一用药组相比,mRNA的相对表达量有显著差异,且随联合用药浓度的增加而减少,呈量效关系。ERK<sub>1,2</sub>抑制剂联合5-FU能有效的减少抗凋亡分子bcl-2的表达和增加启动性的凋亡分子caspase-9的表达,调节细胞进入凋亡程序,促进细胞凋亡,从而达到治疗肿瘤的效果。因此,ERK<sub>1,2</sub>抑制剂联合5-FU可能是一种可行的治疗转移性MM的联合化疗方法。

### [参考文献]

- [1] KYRA J, COWAN, KENNETH B. Storey. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress [J]. J Exp Biol, 2003, 206(Pt7): 1107-1115.
- [2] SMALLEY KEIRAN S M. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? [J]. Int J Cancer, 2003, 104(5): 527-532.
- [3] MARQUETTE A, BAGOT M, BENSUSSAN A, et al. Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007, 55(6): 363-372.
- [4] LENS M. Current clinical overview of cutaneous melanoma [J]. Br J Nurs, 2008, 17(5): 300-305.
- [5] FREDERICK C. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur [J]. Oncologist, 2003, 8(5): 459-465.
- [6] CERRONI L, SOYER H P, KERL H. Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi [J]. Am J Dermatopathol, 1995, 17(1): 7-11.
- [7] MARTINOU J C, GREEN D R. Breaking the mitochondrial barrier [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(1): 63-67.

[责任编辑:朱颖娜]