

研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2003)01-0020-03

UV 通过 p38MAPK 促进大鼠胶质瘤 C6 细胞凋亡

张 丰¹, 李 青¹, 王 莉¹, 曹云新², 林圣彩³ (第四军医大学: ¹ 西京医院病理科, ² 基础部免疫学教研室, 陕西 西安 710033, ³ 新加坡国立大学分子细胞生物学研究所, 新加坡 117609)

Rat glioma C6 cell apoptosis induced by UV radiation via p38-MAPK

ZHANG Feng¹, LI Qing¹, WANG Li¹, CAO Yun-Xin², LIN Sheng-Cai³

¹Department of Pathology, Xijing Hospital, ²Department of Immunology, Faculty of Preclinical Medicine Fourth Military Medical University, Xi'an, 710033, China, ³Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore, Singapore 117609

【Abstract】 AIM: To study the signal transduction of p38 mitogen-activated protein kinase in rat glioma C6 cells after the stimulation of UV radiation. METHODS: Flow cytometry was applied to measure the fraction number changes in the cell cycle phase and to detect whether UV could induce apoptosis of C6 cells. The level and distribution of p38MAPK expression was examined by immunocytochemical method both before and after the UV radiation. RESULTS: Flow cytometry indicated that the numbers of G1 phase fraction of 1, 2 and 4h groups accumulated by 0.12, 0.21 and 0.19 respectively and those of S phase fraction reduced by 0.10, 0.14 and 0.15 respectively and their apoptosis rates were 12%, 49% and 34% respectively in the UV treated groups. 2h after the UV radiation, p38MAPK was strongly expressed and distributed mainly in the nucleus of C6 cells while for the untreated C6 cells, p38MAPK was weakly dispersed in the whole cell. CONCLUSION: Apoptosis of rat glioma C6 cells is induced by UV radiation via p38MAPK.

【Keywords】 ultraviolet; p38MAPK; immunocytochemistry; apoptosis

【摘要】目的: 探讨 p38MAPK 在紫外线损伤刺激细胞中的特异性信号转导作用。方法: 流式细胞仪检测紫外线照射 30 min 后 1, 2 及 4 h 的 C6 细胞周期变化和是否有凋亡发生; 应用免疫细胞化学技术观察紫外线刺激前后 p38MAPK 在 C6

细胞中的表达强度和分布特征。结果: 细胞周期结果显示 1, 2 和 4 h 后 G1 期细胞数分数各增多 0.12, 0.21 和 0.19, 而 S 期细胞数分数减少 0.10, 0.14 和 0.15; 各组的凋亡率分别是 12%, 49% 和 34%; 未受刺激的细胞中, p38MAPK 在胞质和胞核表达较弱; 紫外线损伤作用 2 h 后, 细胞核区的染色强度即明显增强, 而胞质区域的染色强度相对降低。结论: C6 细胞受紫外线损伤后可通过 p38MAPK 通路发生凋亡。

【关键词】 紫外线; p38 蛋白激酶; 免疫细胞化学; 凋亡

【中图分类号】 R739.41

【文献标识码】 A

0 引言

丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路是引人注目的蛋白激酶级联通路。p38MAPK 通路是其目前已确定的通路之一。该通路参与了细胞生长、发育、分裂及细胞间的功能同步等多种细胞过程。紫外线 (ultraviolet, UV)、高渗、炎症因子等作用下, p38MAPK 被磷酸化活化, 通过磷酸化活化转录因子调控特定基因的表达, 从而将信号从细胞外传导到细胞核^[1]。紫外线损伤对组织细胞产生的生物学效应部分通过 p38MAPK 信号通路起作用^[2], 但在这个刺激过程中 p38MAPK 的蛋白表达量和在细胞中分布定位是否有变化以及与细胞凋亡的关系还不确定。我们应用免疫细胞化学方法和流式细胞仪观察紫外线损伤后 p38MAPK 在 C6 细胞中的表达和分布的变化以及同时发生的细胞凋亡和细胞周期变化, 为探讨 p38MAPK 在紫外线损伤刺激中对胶质瘤的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠胶质瘤细胞 C6: 本室保存; 兔抗鼠 p38MAPK IgG 抗体: 新加坡国立大学林圣彩教授惠赠; 免疫组化试剂盒: 武汉博士德公司; DNA-Prep 试剂盒: 美国 Coulter 公司; 普通倒置显微镜: 上海光学仪器六厂, 37X 型; 流式细胞仪: 美国 Coulter 公司, EPICS-ELITE-ESP 型。

1.2 方法 C6 细胞在含 150 mL L⁻¹ 小牛血清的

收稿日期: 2002-11-22; 修回日期: 2002-12-15

基金项目: 高等学校骨干教师计划资助, 留学归国人员科研启动基金 ([1999]747 号)

通讯作者: 李 青. (029) 3373445 Email: Liqing@fmmu.edu.cn

作者简介: 张 丰 (1975-), 男 (汉族), 山西省稷山县人, 硕士. Tel. (029) 3374541 Ext. 119 Email: cypress1975@263.net

RPMI 1640 培养液中常规培养,细胞生长至对数期时以 1×10^5 /孔接种于 6 孔培养板,同时制备细胞爬片,应用紫外线 UV-C 波段光源垂直照射距离其 30 cm 处的 C6 细胞 30 min,继续培养,动态观察细胞形态变化^[3],并分别取照射后 1, 2 和 4 h 的细胞,行 HE 染色. 同时设未处理组作对照. 取各组细胞各约 1×10^6 个,经胰酶消化制成单细胞悬液,2000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 次,每次 PBS 4 mL 洗涤. $700 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇固定, DNA 染色后用流式细胞仪检测细胞周期变化和是否有凋亡峰出现^[4]. 免疫组织细胞化学参照 ABC 试剂盒提供的方法,并以 PBS 缓冲液代替一抗,设立相应的阴性对照. 分别取照射后的各组细胞及相应的正常细胞爬片, Hanks 液冲洗 2 次, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 冲洗 3 次, 纯丙酮固定 10 min, 自然干燥, PBS 冲洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$; $30 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢溶液室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$; 加入 $50 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 非免疫性动物血清, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$; 加入 $100 \mu\text{L}$ 一抗(兔抗鼠 p38MAPK IgG 抗体) 4 过夜, 一抗稀释度为 1:50, PBS 冲洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$; 加入 $50 \mu\text{L}$ 链亲和素-过氧化物酶溶液, 室温下孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$; $100 \mu\text{L}$ 新鲜配制的 DAB- H_2O_2 溶液, 显色 10 min, 显微镜观察, 待显色后用自来水冲洗 3 min, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

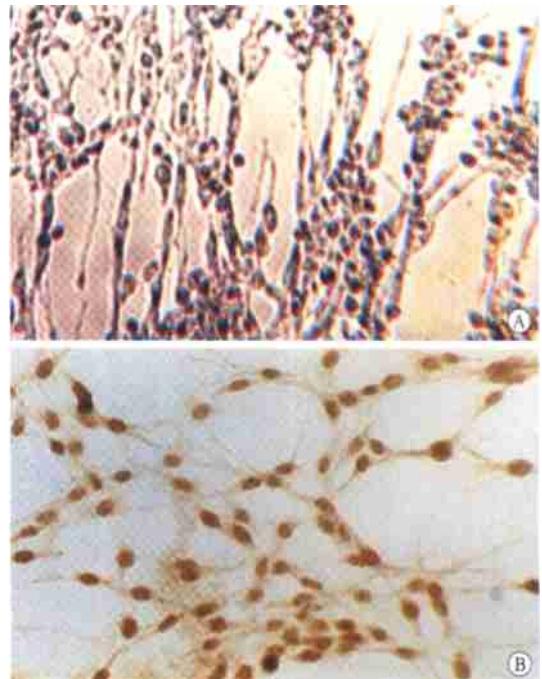
2 结果

未处理的 C6 胶质瘤细胞生长多呈长梭型, 胞体向两极伸长, 少部分细胞呈星形. 经紫外线处理的 C6 胶质瘤细胞 1 h 后有部分细胞贴壁性降低, 突起收缩, 细胞变圆, 2 h 后达到高峰 (Fig 1A), 4 h 后有大量坏死细胞漂浮. 未照射组 p38MAPK 蛋白表达弱阳性, 并且比较弥散, 分布于胞质和胞核; 紫外线照射后 2 h 组细胞核 p38MAPK 蛋白表达强阳性, 而胞质中 p38MAPK 却表达下降 (Fig 1B). 细胞周期结果显示 1, 2 和 4 h 后 G1 期细胞数分数各增多 0.12, 0.21 和 0.19, 而 S 期细胞数分数减少 0.10, 0.14 和 0.15; 各组的凋亡率分别是 12%, 49% 和 34%.

3 讨论

已知 p38MAPK 通路参与了炎症、应激等病理生理反应, 说明在应激反应过程中一些应激蛋白的表达受 p38MAPK 调控. 其中 p53 也是 p38MAPK 的下游底物之一, 并在紫外线损伤导致的细胞凋亡中起一定作用^[5,6]. p53 在细胞应激反应中起重要作用, 其活化后启动一系列生化反应阻止细胞周期的进行(一

般停滞于 G1 期), 协同参与损伤修复的酶对细胞损伤及时修复, 但是如果损伤严重难以修复则启动凋亡程序使细胞凋亡^[7]. 我们发现在未受刺激的细胞中, p38MAPK 染色强度呈弱阳性, 弥散性分布于胞质和胞核; 而受紫外线损伤刺激的细胞, 细胞核染色强度明显增强, 细胞质染色强度相对降低, 这种现象在紫外线损伤 1 h 后即可观察到, 并且在 2 h 后细胞核强度增强趋势更加明显, 这提示 p38MAPK 在未激活前散在、均匀性地分布于细胞中; 而紫外线损伤作用后, 其 p38MAPK 迅速由胞质移位到胞核. 与此对应, 紫外线照射 1, 2 和 4 h 后各组 G1 期细胞增多, 而 S 期细胞减少, 这说明细胞周期逐渐被抑制于 G1 期; 并且随着细胞周期的停滞, 凋亡大量增加. 这种相互关系提示 p38MAPK 在一般情况下弥散分布在细胞中, 受到应激信号如紫外线的刺激后激活, 转位到细胞核磷酸化激活其靶蛋白, 从而引起一系列应激反应. 由于 p53 位于细胞核并且在应激反应引起的细胞周期抑制和凋亡中起中心作用, 因此我们推测 p38MAPK 由胞质转位到胞核后可能激活了 p53, 从而引起细胞周期的变化和凋亡发生. 但也不能排除其他信号分子的参与和其他信号通路的作用^[8]. 目前关于 p38MAPK 参与细胞凋亡和增殖的报道很多^[9], 这可能与组织细胞种类的不同和细胞当时所受刺激的环境差别有关.



A: C6 cells $\times 100$; B: p38MAPK ABC $\times 200$

图 1 经紫外线处理 30 min 的 C6 胶质瘤细胞

Fig 1 Morphological and adhesive changes in C6 cells

【参考文献】

- [1] Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38 [J]. *Cell Signal*, 2001; 13(5): 299 - 310.
- [2] Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes [J]. *Oncogene*, 2001; 20(29): 3921 - 3926.
- [3] Zhang QS, Maddock DA, Chen JP, Heo S, Chiu C, Lai D, Souza K, Mehta S, Wan YS. Cytokine-induced p38 activation feedback regulates the prolonged activation of AKT cell survival pathway initiated by reactive oxygen species in response to UV irradiation in human keratinocytes [J]. *Int J Oncol*, 2001; 19(5): 1057 - 1061.
- [4] Zhang BC, Li Q, Ye J, Wang YM. p38MAPK gene transfection can induce the apoptosis of glioma cells C6 [J]. *Dʼsi Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 2001; 22(3): 211 - 213.
- [5] Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of human p53 by p38

kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation [J]. *EMBO J*, 1999; 18(23): 6845 - 6854.

- [6] Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389 [J]. *J Biol Chem*, 1999; 274(18): 12229 - 12235.
- [7] Pruschy M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fisher DE, Glanzmann C, Bodis S. Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001; 49(2): 561 - 567.
- [8] Noguchi K, Yamana H, Kitanaka C, Mochizuki T, Kokubu A, Kuchino Y. Differential role of the JNK and p38 MAPK pathway in c-Myc- and s-Myc-mediated apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 267(1): 221 - 227.
- [9] Varghese J, Chattopadhyaya S, Sarin A. Inhibition of p38 kinase reveals a TNF-alpha-mediated, caspase-dependent, apoptotic death pathway in a human myelomonocyte cell line [J]. *J Immunol*, 2001; 166(11): 6570 - 6577.

编辑 王 睿

经验交流 · 文章编号:1000-2790(2003)01-0022-01

血色病多系统器官衰竭 1 例

赵曙光, 闻勤生, 赵保民, 黄裕新

(第四军医大学唐都医院消化内科, 陕西 西安 710038)

【关键词】血色病; 多系统器官衰竭

【中图分类号】R573 【文献标识码】B

1 病例报告 男, 63 岁。因间断性乏力、纳差 30 d, 加重伴心慌、气短 2 wk 于 2001-12-11 入院。1995 年因胆石症行胆囊摘除术时发现脾肿大, 并行脾切除术。查体: T 36.4, P 68 次·min⁻¹, R 28 次·min⁻¹, BP 12/8 kPa。神志清, 精神差, 皮肤巩膜轻度黄染, 有肝掌无蜘蛛痣, 口唇轻度发绀, 颈静脉怒张, 左下肺叩诊呈实音, 触觉语颤减弱, 呼吸音减低, 双肺底均可闻及细小湿性罗音。心界向左下扩大, 心率 68 次·min⁻¹, 心律不齐, 音低钝, P2 分裂, 胸骨左缘第 4、5 肋间可闻及收缩期 2 级吹风样杂音。腹膨隆, 无腹壁静脉曲张, 肝肋下 4 cm, 质硬, 移动性浊音阳性, 双下肢膝关节以下皮肤有青黑色素沉着及凹陷性水肿。血 WBC 14.1 × 10⁹ L⁻¹, RBC 1.93 × 10⁹ L⁻¹, Hb 83 g L⁻¹, HCV 113 fl, MCHC 43.3%, PLT 34 × 10¹² L⁻¹, ESR 63 mm h⁻¹, TBil 90 μmol L⁻¹, Dbil 33 μmol L⁻¹, 总蛋白 73 g L⁻¹, 白蛋白 36 g L⁻¹, 球蛋白 27 g L⁻¹, ALT 350 nkat L⁻¹, AST 1117 nkat L⁻¹, 凝血酶原时间 14.7 s, BUN 20.48 mmol L⁻¹, CRea 129 μmol L⁻¹, UA 983 μmol L⁻¹, AST 1603 nkat L⁻¹, HBDH 6129 nkat L⁻¹, LDH 5294 nkat L⁻¹, LDH1 3457 nkat L⁻¹, 空腹血糖: 8.6 mmol L⁻¹, Na⁺

120 mmol L⁻¹, K⁺ 4.8 mmol L⁻¹, Cl⁻ 86 mmol L⁻¹, 血清铁蛋白 4309 μg L⁻¹, 血清铁 2309 μg L⁻¹, 转铁蛋白受体 2.3 ng L⁻¹。CT: 肝硬化腹水, 双侧胸腔积液, 肝内胆管扩张。超声心动图: 广泛心肌缺血, 三尖瓣中度关闭不全, 肺动脉瓣及二尖瓣轻度关闭不全, 少量心包积液。心电图: 频发房早, 完全性右束支传导阻滞。入院后行胸水检查为漏出液。胃镜: 慢性浅表性胃炎。临床诊断: 血色病。给予吸氧、强心、利尿、保肝等治疗后, 患者精神一度好转, 气短改善, 移动性浊音消失。但随后患者出现尿少, 双下肢水肿加重, BUN, CRea 进行性升高, 电解质紊乱加重, 血氨升高, 心脏、肾脏、肝脏等重要脏器均出现功能衰竭后死亡。

2 讨论 血色病是一种罕见的铁代谢紊乱性常染色体隐性遗传病, 与其发病有关的基因有 HFE, JH 和 HF3 等^[1,2]。过多的铁进入血液沉积于各脏器, 当体内储铁总量达到 15~40 g 时, 临床出现血色病症状。本例患者转铁蛋白浓度为 4309 μg L⁻¹, 根据 1 μg L⁻¹ 转铁蛋白相当于 8 mg 储存铁计算, 该患者体内储存铁达 34 g, 为正常人的 10 倍。本病治疗有静脉放血和螯合剂治疗, 间歇性放血适应于原发性血色病, 继发性血色病常有严重贫血而以螯合剂治疗, 未经治疗 5 a 生存率为 18%, 10 a 生存率为 6%, 早期治疗可使预后大为改观^[3]。

【参考文献】

- [1] Papanikolaou G, Politou M, Roetto A, Bo. Linkage to chromosome 1q in Greek families with juvenile hemochromatosis [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2001; 27(4): 744 - 749.
- [2] Parkkila S, Niemela O, Britton RS, Fleming RE, Waheed A, Bacon BR, Sly WS. Molecular aspects of iron absorption and HFE expression [J]. *Gastroenterology*, 2001; 121(6): 1489 - 1496.
- [3] Bathum L, Christiansen L, Nybo H, Ranberg KA, Gaist D, Jeune B, Petersen NE, Vaupel J, Christensen K. Association of mutations in the hemochromatosis gene with shorter life expectancy [J]. *Arch Intern Med*, 2001; 161(20): 2441 - 2444.

编辑 许昌泰

收稿日期: 2002-09-23; 修回日期: 2002-11-01

作者简介: 赵曙光 (1971-), 男 (汉族), 陕西省耀县人, 硕士, 住院医师。Tel: (029) 3377721 Email: zsg711203@263.net