

RIP1 增强顺铂诱导食管癌细胞的凋亡

章余妹¹ 吴 萍¹ 张林杰¹ 吕 磊² 杨守梅²

摘要 目的 探讨受体相互作用蛋白 1 (RIP1) 增强顺铂 (DDP) 诱导食管癌细胞凋亡的敏感性。方法 单溶液细胞增殖分析 (MTS) 法检测不同浓度 DDP 对食管癌细胞株 KYSE510、KYSE410 的增殖抑制作用; Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot 法检测 RIP1、半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)、PARP 的蛋白表达。结果 DDP 诱导食管癌细胞凋亡具有剂量和时间相关性。凋亡率随剂

量增加和时间延长升高, RIP1 蛋白的表达升高, DDP 联合 RIP1 特异性抑制剂处理食管癌细胞后, 较敏感的 KYSE510 凋亡率明显减少。结论 RIP1 可能参与了 DDP 诱导食管癌细胞凋亡的作用。

关键词 食管癌; RIP1; 顺铂; 凋亡

中图分类号 R 735.1; R 329.25

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0172-05

2014-10-23 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011A167)

作者单位: ¹安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

²安徽省肿瘤医院肿瘤内科, 合肥 230001

作者简介: 章余妹, 女, 硕士研究生;

张林杰, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zlj33@vip.sina.com

食管癌是国内外常见的消化道恶性肿瘤之一, 据统计, 全球每年新发食管癌 48 万例, 每年约有 40 万人因此死亡, 我国是食管癌高发国家^[1]。辅助化疗是治疗食管癌的一种重要手段, 但其预后的改善进展却很缓慢^[2]。因此, 研究增强食管癌对药物治疗敏感性的策略, 发现新的治疗靶点至关重要。受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1,

Experimental study on surface microscopic morphology and biological mineralization of tissue engineering bone

Ning Yinkuan, Li Qiang, Cai Weiliang, et al

(Dept of Limb Trauma Surgery, The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001)

Abstract Objective Green fluorescent protein (GFP) labeling, scanning electron microscope and energy dispersive spectrometer (SEM/EDS) were applied to observe surface microstructure and biological mineralization of tissue engineering bone for the purpose of evaluating the decalcified bone matrix (DBM) scaffold materials of biological properties in tissue engineering bone. **Methods** The rabbit bone-marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were marked by Ad-GFP. Real-time growth of the cells was observed by an inverted fluorescence microscope after the osteoinductive culture on to DBM, and surface microstructure and biological mineralization of tissue engineering bone were observed by SEM/EDS. **Results** The cells on surface of DBM had a good adhesion, overlap growth, as observed by an inverted fluorescence microscope, and a higher level of transient expression of GFP was confirmed after 14 days *in vitro* culture. SEM image showed that DBM had a porous structure, with pore diameter ranging from 300 to 600 μm , and a porosity rate was around 90%. The tissue engineering bone showed that cells grew adherently on the surface of DBM, matrix secretion was strong, and the DBM was covered by rough biological mineralization. X-ray photoelectron spectroscopy showed that the surface of rough biological mineralization consisted of Calcium, Phosphorus sediment and its Calcium and Phosphorus ratio (Ca/P) was 1.46. **Conclusion** Tissue engineering bone constructed by DBM scaffold materials *in vitro* has excellent biological properties, and combined application of GFP labeling, SEM and X-ray photoelectron spectroscopy is a feasible method for evaluating DBM scaffold material in tissue engineering bone.

Key words adenovirus; green fluorescent protein; bone-marrow mesenchymal stem cells; decalcified bone matrix; X-ray photoelectron spectroscopy

RIP1) 包含一个 N 末端丝氨酸/苏氨酸激酶活性和一个 C 末端死亡结构域, 是 RIP 家族中第一个被发现的成员, 在调节细胞的死亡和存活方面起重要作用^[3-4]。然而, 目前 RIP1 在食管癌细胞增殖、凋亡及药物治疗敏感性方面起何种作用尚不明确。该研究以食管癌细胞株 KYSE510、KYSE410 为研究对象, 观察 RIP1 对顺铂(cisplatin, DDP) 诱导的食管癌细胞凋亡的影响, 并对其机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人食管鳞癌细胞株 KYSE510、KYSE410 由安徽省肿瘤医院肿瘤研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司); 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); DDP(5 mg/ml, 江苏豪森药业股份有限公司); MTS(美国 Pro-mega 公司); 小鼠抗人 RIP1 抗体(美国 BD Pharmingen 公司); 兔抗人半胱天冬氨酸蛋白酶 3(cysteine aspartate specific protease 3, caspase-3)、PARP 抗体(美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗人 β -actin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); 小分子抑制剂(necrostatin-1, Nec-1) (德国 Calbiochem 公司); Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博 BestBio 公司); BCA 蛋白定量试剂盒、Western 一抗稀释液(江苏碧云天公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司); 天能全自动数码凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞株 KYSE510、KYSE410 采用 RPMI1640 培养液, 含 10% 灭活胎牛血清, 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。常规传代, 生长至对数生长期。

1.2.2 MTS 法检测 取 96 孔细胞培养板, 每孔中加 100 μ l 含 10 000 个细胞的 RPMI 1640 培养液, 在 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养使细胞贴壁。培养 24 h 后, 弃去每孔培养液, 换新鲜含 10% 胎牛血清培养液, 实验设不同浓度 DDP 处理组(药物浓度为 1、5、10、20、40 μ g/ml)、不加 DDP 的空白对照组和无细胞仅培养液的凋零组。加药后分别在 24 ~ 72 h(药物作用终点时间) 终止培养, 每孔加入 MTS 10 μ l, 37 °C 避光孵育 2 h, 全自动定量绘图酶标仪测定每孔的 490 nm 波长光密度(optical densi-

ty, OD) 值, 各组重复实验 3 次。

1.2.3 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡 将对数生长期的细胞制成单细胞悬液接种于 24 孔板, 每孔中每 1 ml 含 1×10^5 个细胞, 培养 24 h 后, PBS 洗涤 2 次, 按实验设计加入药物后, 收集上清液中细胞并用不含 EDTA 的胰酶消化法收集贴壁细胞至 10 ml 离心管。用冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 1 400 r/min, 2 ~ 8 °C, 离心 5 min, 弃培养液, 用 400 μ l $1 \times$ Annexin V 结合液悬浮细胞, 浓度约为 1×10^6 个/ml 细胞。在细胞悬浮液中加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色液, 轻轻混匀后于 2 ~ 8 °C 避光条件下孵育 15 min, 加入 10 μ l PI 染色液后轻轻混匀于 2 ~ 8 °C 避光条件下孵育 5 min。1 h 内上流式细胞仪检测, 每组实验重复 3 次。FCS express 4 软件分析细胞凋亡率。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达 5 μ g/ml DDP 作用于细胞不同时间点(0、6、12、24、36 h) 后, 分别收集上清液中细胞并加胰酶消化收集贴壁的细胞至离心管。用 PBS 洗涤 2 次, 1 500 r/min, 离心 10 min, 弃上清液, 每管加入 100 μ l 细胞总蛋白裂解液(90 μ l 裂解储存液 + 10 μ l 苯甲基磺酰氟化物), 吸至 1.5 ml EP 管中, 冰上孵育 30 min, 期间不时弹 EP 管。以 4 °C 14 000 r/min 离心 30 min 后取上清液, 此即为细胞总蛋白。BCA 法蛋白定量后, 加入等体积的 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 煮沸 3 min 使蛋白变性。取 20 μ g 蛋白样品在不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶中恒压电泳约 60 min, 再转移至硝酸纤维素膜上, 转膜约 70 min, 防止气泡产生, 用含质量为 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h, 弃去封闭液。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 分别加入抗 RIP1、caspase-3、PARP 抗体, 以 β -actin 为内参, 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 再加辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。ECL 法显色, 照相并分析结果。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数间比较采用方差分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 DDP 对食管癌 KYSE510、KYSE410 细胞的增殖抑制作用 KYSE510、KYSE410 细胞对 DDP 的半数抑制浓度分别为 (5.021 \pm 0.069) μ g/ml、(40.169 \pm 0.302) μ g/ml, 差异有统计学意义 ($P <$

0.01); 后者是前者的 8 倍, 因此选 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为 KYSE510 和 KYSE410 的实验浓度。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 作用于两株细胞 0、24、48、72 h, 随着时间的延长, KYSE510 细胞存活率减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果显示, DDP 诱导食管癌 KYSE510、KYSE410 细胞凋亡具有浓度和时间相关性, 且 KYSE510 对 DDP 诱导凋亡相对敏感。见图 1。

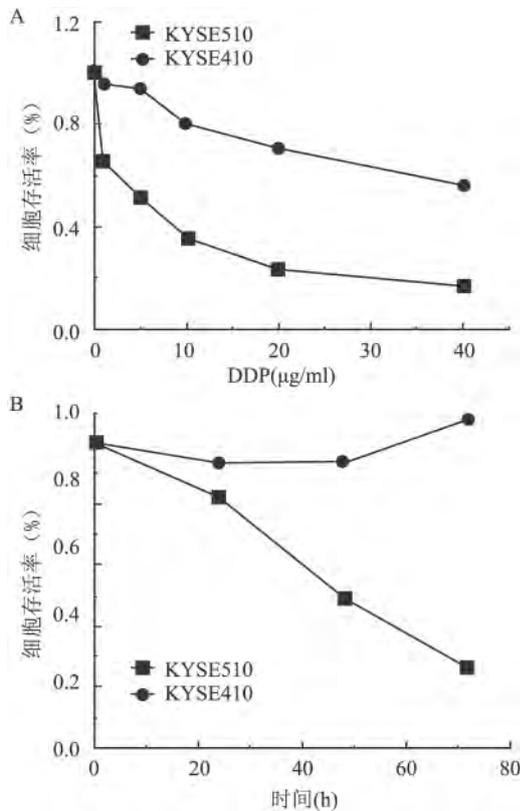


图1 DDP 诱导 KYSE510、KYSE410 细胞的量效曲线和时效曲线
A: 量效曲线; B: 时效曲线

2.2 DDP 诱导食管癌 KYSE510、KYSE410 细胞的凋亡 流式细胞仪结果显示 DDP 能有效诱导食管癌细胞凋亡, 随着作用时间延长, 细胞凋亡率逐渐上升。KYSE510 细胞的早期凋亡率差异有统计学意义 ($F = 5\ 849.181, P < 0.01$), KYSE410 细胞的早期凋亡率差异也有统计学意义 ($F = 6\ 512.189, P < 0.01$)。两株细胞对 DDP 的敏感性不同, KYSE510 比 KYSE410 细胞对 DDP 敏感, 同一时间点的两株细胞凋亡率之间进行比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 RIP1 在 DDP 处理食管癌细胞前后的蛋白表达 Western blot 法检测结果显示 KYSE510 细胞 RIP1 表达水平较 KYSE410 细胞高, 差异有统计学

意义 ($P < 0.01$); DDP 处理前后 KYSE510 细胞 RIP1 表达水平较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3、4。

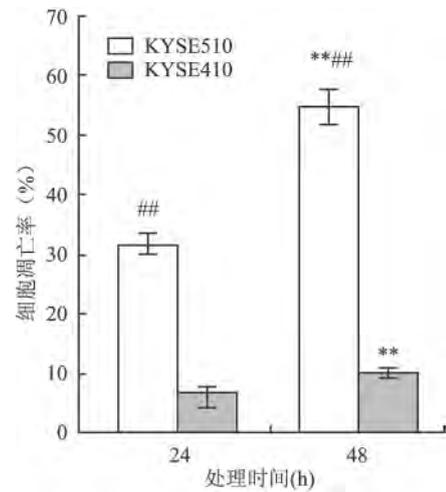


图2 DDP 诱导食管癌 KYSE510、KYSE410 细胞 24、48 h 的细胞凋亡率

与同一细胞 24 h 组比较: ** $P < 0.01$; 与同一时间点的 KYSE410 细胞比较: ## $P < 0.01$

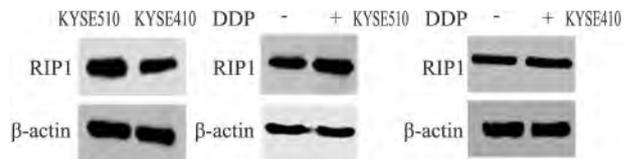


图3 Western blot 法检测 KYSE510、KYSE410 细胞及 DDP 作用 0、12 h 前后两种细胞中 RIP1 的表达

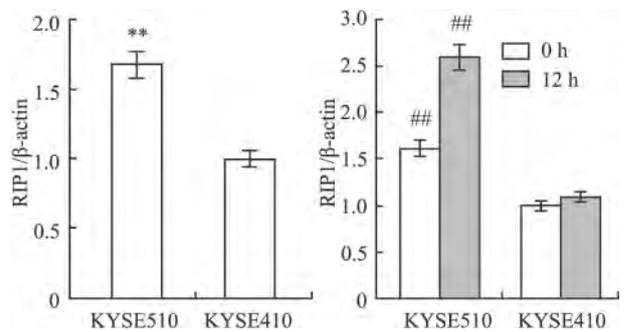


图4 RIP1 在 KYSE510、KYSE410 细胞及 DDP 处理 0、12 h 的蛋白表达水平

与 KYSE410 细胞比较: ** $P < 0.01$; 与 DDP 处理 KYSE410 细胞 0、12 h 比较: ## $P < 0.01$

2.4 caspase-3、PARP 在 DDP 处理食管癌细胞不同时间点的蛋白表达 Western blot 法检测结果显示 KYSE510 细胞 caspase-3、PARP 活化并裂解。见图 5。

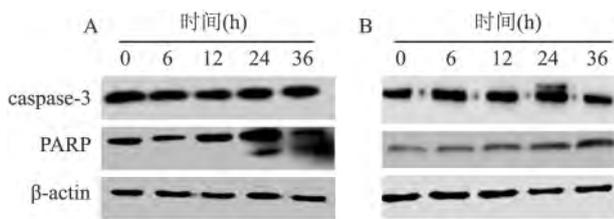


图5 DDP处理细胞0、6、12、24、36 h后 caspase-3 和 PARP 的表达
A: KYSE510 细胞; B: KYSE410 细胞

2.5 Nec-1 联合 DDP 处理细胞前后的凋亡 流式细胞仪检测结果显示: 对 DDP 较敏感的 KYSE510 细胞加入 Nec-1 后早期凋亡率减少明显, 存活率增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而相对不敏感的 KYSE410 细胞加入 Nec-1 后变化不明显, 差异无统计学意义。见图 6。

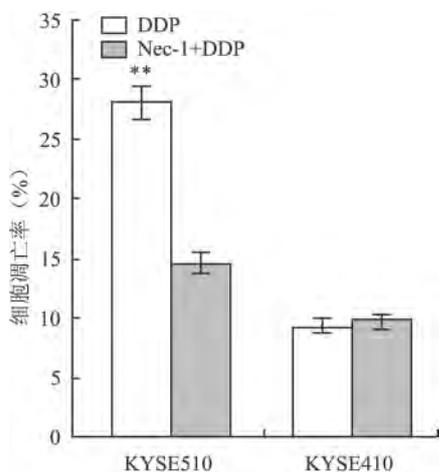


图6 Nec-1 联合 DDP 作用于 KYSE510、KYSE410 细胞 24 h 后的凋亡率
与 Nec-1 + DDP 处理的 KYSE510 细胞比较: ** $P < 0.01$

2.6 DDP 联合 Nec-1 处理细胞前后, RIP1、caspase-3、PARP 的蛋白表达 Western blot 法检测结果显示 DDP 联合 Nec-1 处理 KYSE510、KYSE410 细胞前后 RIP1、caspase-3、PARP 的蛋白表达。见图 7。

3 讨论

DDP 是常用的食管癌化疗药物之一, 可通过产生烷化物作用于 DNA, 形成链内和链间交联, 破坏肿瘤细胞 DNA 结构和功能, 启动 DNA 损伤性反应和肿瘤细胞凋亡途径的激活, 导致肿瘤细胞死亡^[5]。研究^[5-6]表明, 以 DDP 为基础的化疗开始疗效较好, 但随着化疗时间的延长、疗程的增加、肿瘤

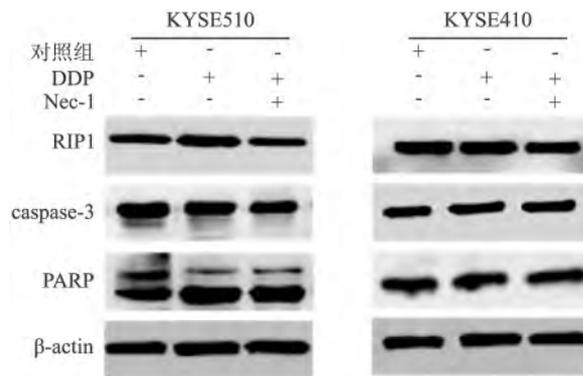


图7 DDP 联合 Nec-1 处理两株细胞前后 RIP1、caspase-3 和 PARP 的表达

细胞对 DDP 治疗的敏感性降低或产生耐药性, 临床疗效降低。表明 DDP 对食管癌细胞之间存在敏感性差异。

RIP1 在细胞的凋亡、程序性坏死与存活等过程中发挥了重要作用^[7]。在促细胞死亡的信号转导中, RIP1 的 C 末端死亡结构域能与 Fas、肿瘤坏死因子受体 1、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 1、受体 2、肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域等蛋白相互作用, 形成复合物, 导致凋亡或程序性坏死^[8]。Nec-1 是 RIP1 的高度特异性抑制剂, 通过变构抑制 RIP1 的活性^[9], 与 RIP1 的 N 端和 C 端结合产生变构效应, 使 RIP1 保持在无活性的构象^[10]。抑制 RIP1 和相关受体相互作用, 也阻止了凋亡或程序性坏死的进行^[11]。Nec-1 的发现能有效地明确 RIP1 在不同细胞的死亡类型和在疾病中的作用^[12]。本研究中, DDP 在两株食管鳞癌细胞中敏感性差异大, 而 RIP1 在两株细胞中的表达差异也较大; 加入 DDP 后, 较敏感细胞株 KYSE510 的 RIP1 上调明显, 而相对 DDP 耐受的 KYSE410 细胞株 RIP1 上调不明显, 表明 RIP1 可能增强 DDP 对食管鳞癌细胞的敏感性。caspase-3 是凋亡的效应分子, 其活化后可导致凋亡; PARP 激活后裂解, 为 caspases 级联反应保存能量, 使 caspases 依赖性的凋亡能够顺利进行^[13]。通过 AnnexinV/PI 双染流式细胞仪检测凋亡显示, DDP 诱导食管鳞癌凋亡随着时间的延长凋亡率上升; 加入 Nec-1 后, 较敏感的 KYSE510 细胞凋亡率明显减少, 存活率增加, 而相对耐受的 KYSE410 细胞差异不明显。通过 Western blot 法检测 RIP1、caspase-3 和 PARP 的蛋白表达, 可以看出 KYSE510 细胞的 RIP1 在加入 DDP 后表达增强, 加入 DDP 和 Nec-1 后表达减低; 而 KYSE410 细胞则在

加入 DDP 或 DDP 联合 Nec-1 后无明显变化。

综上所述, RIP1 参与 DDP 诱导食管癌细胞的凋亡, 并且 Nec-1 处理后对 DDP 敏感的食管癌细胞株凋亡率明显减少, RIP1 的蛋白表达减低, 因此 RIP1 可能介导了 DDP 诱导食管癌细胞凋亡的作用。本研究对进一步探索抗肿瘤治疗及抗癌药的耐药性提供了一定的基础, 但其深入的分子机制还有待研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Vallböhmer D, Peters J H, Kuramochi H, et al. Molecular determinants in targeted therapy for esophageal adenocarcinoma [J]. *Arch Surg*, 2006, 141(5): 476–81.
- [3] Christofferson D E, Li Y, Yuan J. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase [J]. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76: 129–50.
- [4] 章余妹, 张林杰. RIP1 在细胞程序性死亡中作用的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(5): 453–7.
- [5] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance [J]. *Oncogene*, 2012, 31(15): 1869–83.
- [6] Shen D W, Pouliot L M, Hall M D, et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(3): 706–21.
- [7] Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenaabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival [J]. *Cell*, 2009, 138(2): 229–32.
- [8] Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, et al. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(3): 400–10.
- [9] Degterev A, Hitomi J, Gerscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(5): 313–21.
- [10] Xie T, Peng W, Liu Y, et al. Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins [J]. *Structure*, 2013, 21(3): 493–9.
- [11] Vandenaabeele P, Grootjans S, Callewaert N, et al. Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(2): 185–7.
- [12] Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(5): 378–90.
- [13] Cregan S P, Dawson V L, Slack R S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2785–96.

RIP1 enhances DDP sensitivity of human esophageal squamous carcinoma cells

Zhang Yumei, Wu Ping, Zhang Linjie, et al

(Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of receptor-interacting protein 1 (RIP1) on the sensitivity of human esophageal squamous carcinoma cells to cisplatin (DDP)-induced apoptosis and explore a new target for clinical treatment of esophageal squamous carcinoma. **Methods** The viability of human esophageal squamous carcinoma cell lines KYSE510 and KYSE410 exposed to different concentrations of DDP were detected by CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) assay. Annexin V/PI staining was used to observe cell apoptosis in KYSE510 and KYSE410 cells. Western blot was used to detect RIP1, caspase-3, PARP expression in KYSE510 and KYSE410 cells exposed to DDP. **Results** DDP induced apoptosis in esophageal squamous carcinoma cells with dose and time dependency. Apoptotic rate was increased with dose and time, RIP1 expression was upregulated in esophageal squamous carcinoma cell lines. It was significantly reduced after exposure to DDP association special inhibitor of RIP1 in KYSE510 cells which were more sensitive to DDP than KYSE410 cells. **Conclusion** RIP1 may participate in the apoptosis of human esophageal squamous carcinoma cells to DDP, suggesting the potential of RIP1 as a new candidate target for clinical treatment of esophageal squamous carcinoma.

Key words esophageal squamous carcinoma; RIP1; cisplatin; apoptosis