

# 药物筛选生物技术与抗细胞凋亡 PBK信号传导路径

吴超 曾(杰)邦哲

(邦哲系统生物工程研究所系统遗传学实验室,常州 213022)

**摘要:** 细胞信号传导 PBK-Akt路径涉及细胞周期、再生、分化、衰老与凋亡的调控,采用高通量生物技术分析基因表达谱可用于抗肿瘤或抗衰老的基因与药物筛选。化学诱变剂甲磺酸乙酯 (ethylmethane sulfonate, EMS)处理 CHO 细胞,筛选到抗 10  $\mu$ M、20  $\mu$ M 浓度 lovastatin 的 E10、E20突变细胞系,将 E10细胞再经诱变剂 EMS处理,筛选到抗 70  $\mu$ M 浓度 lovastatin 的 ZE70细胞系。IgF-2刺激基因突变的肌肉萎缩小鼠肌肉细胞系,Western免疫杂交试验结果显示,PBK-Akt路径的 Akt蛋白质磷酸化功能正常。生长因子 IgF-2刺激肌肉细胞系 C2C12的 cDNA 基因芯片实验表明,促细胞再生、分化相关的基因表达上调,细胞凋亡相关的基因表达下调。细胞的基因突变,激素、IgF-2等生长因子刺激,往往是肿瘤发生的病因;但是,IgF-2等可用于抗肌肉萎缩疾病,以及抗细胞凋亡与衰老的药物筛选。

**关键词:** 药物筛选 基因突变 信号传导 PBK-Akt 细胞凋亡

## Biotechnology of Drug Discovery Involved in Antipapoptosis PBK Signal Transduction

Wu Chao Zeng (Jie) Bangzhe

(System Genetics Laboratory, Benjoe Institute of System Biological Engineering, Changzhou 213022)

**Abstract:** Signal Transduction pathway PBK is involved in the regulation of cell cycle, proliferation, differentiation, ageing and apoptosis. Analysis of PBK pathway by using high through biotechnology, is benefit for the discovery of anti-cancer or anti-ageing drug. Results Showed that Treatment CHO cells by EMS (ethylmethane sulfonate), cell lines of E10, E20 surviving in 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M lovastatin were selected. Treatment E10 cells by EMS again, a cell line ZE70 surviving in 70  $\mu$ M lovastatin was isolated. IgF-2 treatment C2C12 and cells isolated from muscular dystrophic mice, the phospho-pAkt was identified well function in both cell lines, therefore, cDNA chips were used for analysis of anti-cancer and anti-apoptosis genes expression in respond to IgF-2 stimulation, and several useful genes were identified.

**Key words:** Drug discovery Gene mutation Cell signaling PBK-Akt Cell Apoptosis

神经、内分泌、免疫调控,构成动物、人体形态发生与生理功能的重要调控中枢<sup>[1]</sup>,采取高通量生物技术和细胞信号传导、基因表达与代谢调控进行细胞病理与分子药理的分析,为中医药资源开发和农业现代化提供了技术方法。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,世界范围约占女性恶性肿瘤总数 21%,发病率和死亡率居妇女各类恶性肿瘤之首,在各种致癌因素的作用下,乳腺导管上皮细胞失去正常特性而异常增生,以致超过自我修复限度而发生癌变的疾病。细胞代谢、繁殖、功能的发生过程,体现在

系统遗传学的多基因相互作用、基因系统的结构模型与细胞发生非线性动力学<sup>[2]</sup>,细胞命运决定、细胞再生、细胞分化、细胞迁徙、细胞凋亡与细胞系定位图谱 (cell mapping)是信号传导网络与基因系统调控的过程。乳腺癌主要病因有遗传因素、激素浓度、免疫因素、精神压抑等。雌激素通过其受体 (ER)诱导孕酮受体 (PR)表达,两种性激素调节生长因子 Igf1 和 Igf2及细胞周期相关的基因,包括生长因子受体 EGFR和相关癌基因产物,生长因子刺激乳腺上皮细胞增生,使它们易感受体细胞突变。

收稿日期:2009-03-04

作者简介:吴超 (1963-),女,湖南长沙人,讲师,从事生物化学、分析化学与合成生物学研究

通讯作者:曾(杰)邦哲 (1963-),男,研究员,从事应用系统遗传学与合成生物学研究;E-mail: benjeng@sysbieng.com, Tel: 0519-85087793

细胞外信号分子作用于细胞膜上的受体,影响细胞内磷酸化酶和一系列的蛋白质传递与基因调控网络,从而调控特异基因表达、蛋白质合成与降解,以及细胞内代谢过程。细胞信号传导 PBK-Akt路径与细胞凋亡、细胞再生、细胞衰老调控有关,生长因子 Igf1、Igf2和胰岛素刺激与调控细胞的再生与分化过程。细胞膜蛋白质受胆固醇代谢路径的影响,而且 Cholesterol是甾体类激素的前体和细胞膜的重要组成,HMG-CoA reductase是胆固醇代谢路径的一个关键酶,其基因表达的启动子部分与蛋白质膜上折叠区域是 RNA 转录与蛋白质在内质网降解受胆固醇代谢产物的反馈调控位点<sup>[3]</sup>。采用化学诱变剂 EMS(ethylmethane sulfonate)处理 CHO 细胞系,筛选 HMG-CoA reductase 高表达与酶活性的抗药物突变细胞系,以及 cDNA 基因芯片等高通量生物技术分析正常与突变细胞系的基因表达谱,对细胞再生、细胞凋亡调控的信号传导 PBK-Akt路径相关基因表达分析,可筛选用于治疗的药用基因与药物分子,提供细胞病理、分子药理与天然药物分析的技术与方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 ZE70、LP90突变细胞建系

CHO 细胞系,150 mm 培养皿种植  $10^6$  细胞数,培养于 5% FCS 的 MEM (10 × MEM 25 ml 谷氨酰胺 1.25 ml, P.S 2.5 ml, 10% FCS 25 ml, 7.5% 碳酸氢钠 12.5 ml, 加双蒸水到 250 ml, 高压灭菌) 培养液,用 400 μg/ml 甲磺酸乙酯 (EMS) 处理 2 h 使 37% 细胞能够生长。吸掉 EMS 后以 10 ml PBS 冲洗 4 次,用胰酶溶液将细胞从培养皿移出后以  $2.5 \times 10^5$  细胞培养于常规 5% FCS 的 MEM 培养液,同时对照组为未经突变剂处理的 CHO 细胞系。分别以洛伐他汀 (lovastatin) 10 μM、20 μM、30 μM、40 μM 选择,只有 10 μM 和 20 μM 培养皿中成活细胞 E10、E20。将 10 μM 培养皿中筛选的细胞系 E10 更换到新培养皿,再用 400 μg/ml EMS 处理,以 40 μM、70 μM 浓度洛伐他汀筛选,得到 ZE40、ZE70 突变细胞系。CHO 细胞系,置于 5% LPDS 的 MEM 培养液中,每 3 d 更换培养液,连续培养 1 个月后,采用含 0.5 μM 洛伐他汀、5% LPDS 的 MEM 培养液连续培养 1 个月,然后每过 1 个月转移到含 5 μM、10 μM、

15 μM、30 μM、50 μM、90 μM 浓度洛伐他汀培养液,每次 90% 细胞死亡,然后筛选到 LP90 突变细胞系。

### 1.2 蛋白质定量分析与免疫杂交

突变细胞系 Western 杂交 (图 1): E10、E20、ZE20、ZE70 细胞系和对照 CHO 细胞系,培养于 60 mm 培养皿,第二天转移到含 5% FCS 或 5% LPDS 的 MEM 培养液 24 h,提取总蛋白质,用标准的 BSA 蛋白质和 micro BCA 试剂盒测定蛋白质含量。蛋白质样品,混合 2 × 加样缓冲液 (20% 甘油、1% SDS、1% β 巯基乙醇、10 mM Tris-HCl 缓冲液, pH 6.8), 95 °C 加热 5 min, 65 μg 在 100 V 电压下跑 8% 的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺胶电泳,三相缓冲液 2 mA/cm<sup>2</sup>、4、1.5 h 电转移 (Pharmacia) 到杂交膜上,膜放置在 5% trichloro 5% trichloroacetic acid (TCA)、0.2% ponceaus 标志蛋白质 ladder, PBS/0.1% triton 在室温 30 min, 20 ml 封闭溶液 (10% 的 1% 牛奶、0.2% triton X-100, 1 × PBS) 加 10 μl HMGR rabbit 抗体室温摇动 2 h, 然后用 PBS 冲洗,用 20 ml 封闭溶液加 6.6 μl anti-rabbit IgG, PBS 洗涤后用 ECL 溶液浸泡 1 min, 胶片曝光 10 s、30 s、1 min、3 min。

### 1.3 C2C12 细胞系培养与 Igf-2 处理

C2C12 (正常) 和 dfd13 (dystrophic 小鼠) 肌肉细胞系,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内用 Dulbecco's MEM / NTMIX F-12 培养液 (GibcoBRL) 加 10% 热失活的胎牛血清 (Sigma)、1% L 谷氨酰胺 (200 mM) (Sigma)、1% 青霉素/链霉素培养,每 3 d 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗 2 次后,用胰酶 (1 × 胰酶 EDTA) 处理后加新鲜培养液,分取 1/10 重新培养。细胞生长到 80% 密度,细胞密度采用血球计数器测定,按每孔  $1 \times 10^5$  细胞分到 6 孔板继续培养过夜,然后换新鲜培养液 3 ml,分别加 Igf-2 0 (参照)、5 nM、10 nM、40 nM 各培养 2 h。培养皿放在冰块上,吸除培养液,用 1 × PBS 洗涤 2 次,用含 1 × protease 抑制剂的 100 ~ 150 μl RIPA 缓冲液裂解细胞,提取总蛋白质。

### 1.4 PKB/Akt 蛋白质磷酸化试验

蛋白质样品,用 2 × 加样缓冲液 (20% 甘油、1% SDS、1% β 巯基乙醇、10 mM Tris-HCl, pH 6.8) 混合,95 °C 加热 5 min, 50 μg 在 100 V 电压下跑 10% 的 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺) (Bio-Rad, Mini-Protein Cell) 胶电泳,三相缓冲液 2 mA/cm<sup>2</sup>、4、1.5 h

电转移到杂交膜上,膜放置在封闭溶液(5% milk, 0.05% Tween-20, 1 × PBS)室温 1 h 摇荡封闭非特异性蛋白质,然后加 phospho-Akt 或 pAkt 抗体(1:1 000, 1% (w/v) BSA),放在塑料袋 4 过夜。第 2 天用 TBS/Tween(0.05%)洗涤 3 次,每次 10 min,按 1/2 000 比例加 anti-rabbit IgG (goat)在封闭溶液室温 1 h 摇荡。1% (v/v) Tween-20 的 TBS 溶液洗涤膜 3 次,用化学发光(PIERCE)溶液浸泡 5 min,然后放在塑料袋(BDH)内用 ECL hyperfilm (Amersham)曝光、X-O-graph 冲洗胶片。膜每次用 stripping 溶液(0.1 M glycine-HCl, pH 2.5)处理 5 min, PBS 洗涤 19 min 3 次,再用于  $\alpha$ -tubulin(1:1 000, 3% milk, 0.05% Tween)放在塑料袋内室温过夜, PBS-tween(0.05%)洗涤膜 4 次,各 1 h,第 2 抗体 anti-mouse IgG-HRP(1:1 000, 3% milk, 0.05% tween, 1 × PBS 稀释), PBS-tween(0.05%)洗涤膜 4 次,各 1 h,然后同上操作(图 2)。

### 1.5 细胞总 RNA 提取

C2C12 细胞系,采用 Igf-2: 0(参照)、20 nM 浓度培养 2 h。细胞总 RNA 提取采用 Biozym 公司的 RNA 提取试剂盒,依据说明书操作。10 × FA 电泳缓冲液溶液: 200 mM MOPS-free acid(20.93 g)、50 mM 醋酸钠(2.05 g)、10 mM EDTA(1.46 g),加双蒸水到 500 ml, NaOH 调节 pH 值到 7.0。5 × RNA 加样缓冲液: 16  $\mu$ l 饱和溴酚蓝、80  $\mu$ l 500 mM EDTA (pH 8.0)、720  $\mu$ l 37% (12.3 M) 甲醛、2 ml 100% 甘油、3.084  $\mu$ l 甲酰胺、4 ml 10 × FA 胶缓冲液,加 RNAse-free water 到 10 ml。1.2% FA agarose 胶用微波炉融化冷却到 65 后加 1.8 ml 37% (12.3 M) 甲醛,加 1  $\mu$ l EtBr (10 mg/ml)混合后灌胶,跑电泳前在 1 × FA 电泳缓冲液中浸 30 min。0.5  $\mu$ g RNA 样品,3  $\mu$ l 5 × 加样缓冲液,加双蒸水到 15  $\mu$ l,摄氏 65 约 3~5 min,冰上立即冷却,加样到胶的加样槽里,89 V 电压跑胶 30 min,在胶文件管理仪器的紫外光下检查 RNA 的质量。

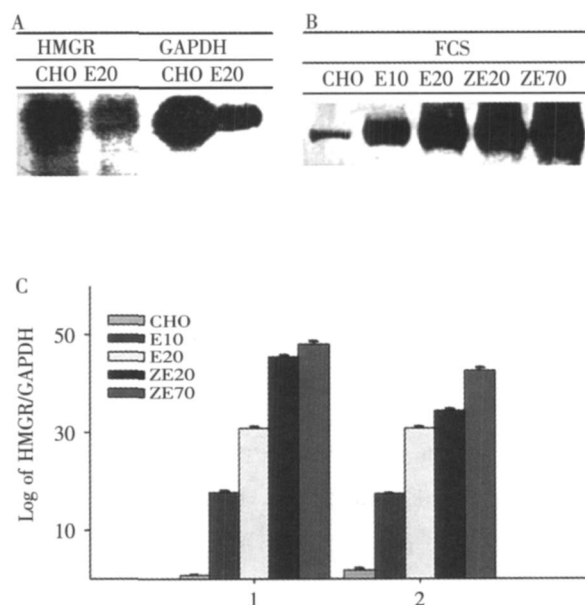
### 1.6 cDNA 基因芯片技术

C2C12 细胞系培养,采用 Igf-2 处理和未处理的对照组,提取总 RNA 后用荧光光度计测量浓度。荧光标记 cDNA 合成逆转录反应(Lifetech 公司试剂): (1) 10  $\mu$ g 总 RNA、1  $\mu$ l Random hexamers(3  $\mu$ g/ml)、

4  $\mu$ l Oligo(d) T<sub>12-18</sub> (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)加 Nuclease-free water 到 22  $\mu$ l, 70 10 min,冰上冷却; (2) Igf2 处理的细胞系,总 RNA 与对照组分别采用 Cy3 与 Cy5 做标记反应,5 Super Script 缓冲液 8  $\mu$ l, 0.1 M DTT 4  $\mu$ l, dNTPs (100  $\mu$ M dGTP, dATP, dTTP 和 10  $\mu$ M dCTP) 2  $\mu$ l, Cy3 dCTP (1 mM) 或 Cy5 dCTP (1 mM) 2  $\mu$ l, Super Script 酶 2  $\mu$ l,加 Nuclease-free water 到总体积 18  $\mu$ l;将(1)与(2)混合后在 PCR 仪 23 反应 10 min,然后在 42 过夜反应。逆转录 cDNA 产物用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化,用荧光光度计在 A<sub>550</sub>测量 Cy3, A<sub>650</sub>测量 Cy5 的浓度,以及在 A<sub>260</sub>测量 cDNA 的浓度,等量 FOI 值(与 ng cDNA 的比值)的 Cy3(9.8)和 Cy5(8.8)混合到共 80  $\mu$ l,在 95 加热 5 min,然后进行芯片(剑桥 Sanger)预杂交处理,2 × 杂交液(50%甲酰胺、10 × SSC、0.2% SDS) 100  $\mu$ l,在 42 过夜,42 用 2 × SSC/0.1% SDS 洗涤,0.1 × SSC/0.1% SDS 洗涤,0.1 × SSC 洗涤,然后扫描与用分析软件处理数据。

## 2 结果

### 2.1 CHO 突变细胞建系与多基因遗传(图 1)



1. FCS; 2. LPDSA. HMGR 对照 GAPDH 的 Western 杂交实验; B. 突变细胞系的 HMGR 蛋白质表达分析; C. 突变细胞系 FCS 对照 LPDSA 培养液的 HMGR 蛋白质表达

图 1 CHO 和 EMS 诱导突变细胞系的 HMGR 蛋白质表达

## 2.2 抗细胞凋亡信号传导与 pAkt磷酸化

肌肉萎缩小鼠细胞系 Dfd13与正常肌肉细胞系 C2C12响应生长因子 Igf-2刺激 Akt蛋白质的磷酸化(图2)。

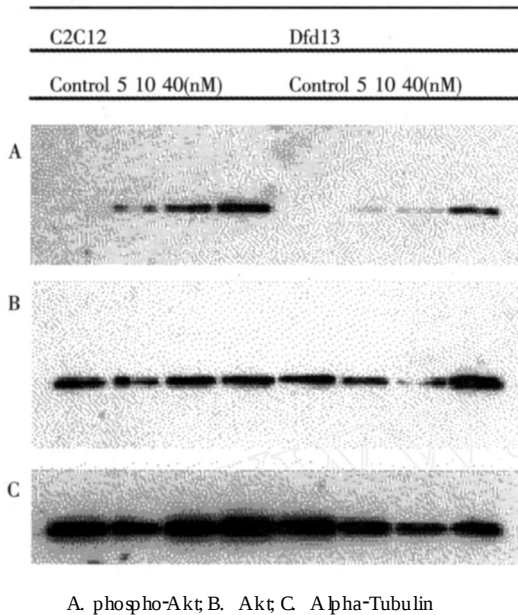


图2 肌肉细胞系 Akt蛋白质磷酸化试验结果

## 2.3 Igf-2信号传导与 cDNA 基因芯片分析

表达下调基因(down-regulation):蛋白质降解路径相关的 Proteasome subunits, ubiquitin-like 1 (Ubl1)、Ube3a基因,以及调控细胞再生、抑制分化的 Cdc2a、Plf $\kappa$ 、Nedd8、Tde1等基因的表达下调。细胞凋亡诱导因子 Cytochrome C subunits, RTN-xS, ceramide transferase等相关基因,以及 Annexin A7等细胞膜蛋白等基因的表达降低。

表达上调基因(Up-regulation):45S前体 rRNA 表达明显增加,用 Igf-2刺激的细胞,其总 RNA 的凝胶电泳也非常明显可见 45S前体 rRNA 带的出现,还未用 Igf2的对照细胞却没有。DNA 复制、重组和促细胞周期的 SW I/SNF chromatin remodelling, Id和 CDC等基因表达上调。Tyrosyl-tRNA synthetase、细胞骨骼 actin、dynein、actin结合蛋白 ABP-278等基因,以及 Cholesterol转运和代谢基因 LDLR、lipoprotein lipase (Lpl)和 Dhcr7等基因表达上调。细胞骨骼蛋白 actin、tubulin 和 ARPC4、WASP、plakoglobin 等基因,以及肌肉特异性 myosin、tropomyo-

sin、H19和 Nctc1等基因的表达上调。信号传导的 GTP2、PLC和 mannose 6-phosphate受体基因,以及 Ddx21、Naip-rs3等基因的表达增强。

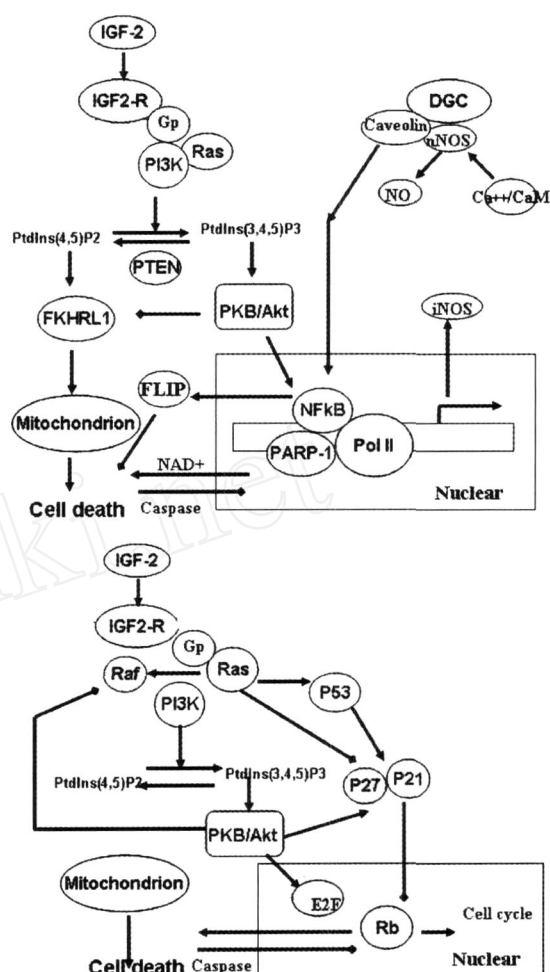
## 3 分析与讨论

采用细胞信号传导、基因表达调控网络的高通量生物技术,提供了细胞病理分析与天然药物分子筛选的技术途径,为中医药与农业现代化提供了重要的方法基础。采用化学突变剂进行 CHO 细胞的 2次突变试验,很快筛选到具有抗 70  $\mu$ M 高浓度 lovastatin药性的突变细胞系 ZE70,可能导致了多基因的调控变化;但是,直接采用非突变的 CHO 细胞自然筛选,筛选到抗 90  $\mu$ M 浓度 lovastatin药物的 LP-90细胞系,历经达数月之久的 lovastatin浓度升级连续筛选。采用 western 杂交试验,抗 lovastatin药物的突变细胞系显示 HMG-CoA reductase酶的蛋白质表达水平或含量显著增加。2005年,法国 Cambien等<sup>[4]</sup>发表动脉硬化疾病的系统遗传学观点;上世纪 90年代中科院曾邦哲提出系统(结构)遗传学概念论述了经典遗传学、分子遗传学与系统(结构图式)遗传学的发展趋势<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞扩散、动脉硬化疾病与血管内层细胞的再生过程有关,涉及细胞内多基因调控、信号传导网络,以及神经-内分泌、免疫系统反馈调控。

生长因子 Igf-2刺激细胞表面的受体,从而引起细胞内 G藕联蛋白和 PBK路径的信号传导,经 PBK-PKB/Akt的磷酸化路径通过抑制 FKHRL1和调控 NF- $\kappa$ B,作用于 FLIP和抑制 pro-caspase-8而拮抗细胞凋亡,PKB/Akt诱导 nitric oxide synthase (NO S)表达。采用 Igf-2、PBK、PKB/Akt和细胞凋亡路径(图3),可以分析与克隆促进与抑制细胞凋亡的相关基因,以及进行药物分子的规模化筛选技术建立。Igf-2作用于 IGF2R受体蛋白质,经两条相关联的信号传导 PBK/inositolP路径和 Ras/MAPK路径。IGF2R是 GTP结合藕联蛋白受体,激活 PBK产生 phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (Ptd Ins (3, 4, 5) P3)和两个关键基因 (FKHRL1和 PKB/Akt)。PTEN激活 FKHR而经 Bcl-2相关基因、Bin和 Bad调控细胞凋亡。Gp/Ras下游是 P53、p21、p27和 E2F/pRB调控细胞周期和凋亡。细胞凋亡的机制已经被很好地研究理解,主要通过启动

caspace 蛋白质相互作用传递,激活 caspace-9与线粒体的 cytochrome-C和 Apaf1作用而激活 caspace-3。Cytochrome-C释放或留驻在线粒体内腔内,决定于抗细胞凋亡 (Bcl-2)和诱导细胞凋亡 (Bim, Bad)等 Bcl-2基因家族的相互作用, caspace等降解 PARP-1、pRB等维持细胞生存功能的重要基因。肌肉细胞的 DGCs, dystrophin和 Capain-3等直接影响细胞的生存。PARP-1是 NF- $\kappa$ B 依赖性基因表达的转录激活因子, Igf-2 调控 NF- $\kappa$ B 与 DNA的结合与 NO的产生。DGC和 Igf-2 有共享调节细胞凋亡的信号传导路径。

采用 PBK-PKB /Akt磷酸化特异性抗体的免疫杂交试验,表明 Igf-2能够诱导 PKB /Akt信号传导路径而抗细胞凋亡,由于生长因子的昂贵以及临床应用的复杂效应,采用细胞信号传导筛选相关抗细胞凋亡的基因和药物提供了较好的途径。肿瘤形成与细胞凋亡是细胞发生的相反过程,促进细胞再生的基因和药物可以用于老年痴呆记忆力衰退 (Alzheimer)、遗传性肌肉萎缩 (muscular dystrophy) 等与细胞凋亡有关的疾病治疗,还促进细胞程序化死亡、改善血管 NO环境、刺激免疫细胞增生的基因可以用于肿瘤等疾病的药物开发。海带多糖抑制肿瘤细胞的机理是通过巨噬细胞表面的多糖类受体,激活巨噬细胞识别肿瘤细胞表面的抗原,或者释放效应分子白细胞介素 1 (L-1)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、NO和  $H_2O_2$  等而起作用。海藻多糖的信号传导研究,其中涉及海藻多糖诱导 NOS(nitric oxide synthase)的启动子活动使 NO量增加<sup>[5]</sup>,以及促进白细胞产生肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), NO可以破坏肿瘤细胞滋生与扩散的厌氧环境。2002年 Iwamoto等报道褐藻胶经酶解获得的寡糖,有更强的诱导肿瘤细胞凋亡的机能,促使人单核细胞产生的细胞毒素可能是肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )。Igf1、Igf2和胰岛素调控细胞再生与分化、抗细胞凋亡是通过 Igf-2 /PBK细胞信号传导路径的多基因表达调控过程,从而为药物依赖性与抗药性,以及采用中药的配方模式的药物多靶向协同调控的综合治疗途径提供了实验技术依据与方法。



A. PBK-Akt路径与抗细胞凋亡基因表达;

B. PBK-Akt路径与细胞周期调控

图 3 细胞凋亡、再生与信号传导 PBK-Akt路径

### 参考文献

- 1 Zeng BJ. Signal Transduction and Gene Regulatory Network Involved in Neuro-Endocrine Cytogenesis, Neustadt, a Rbge. Germany, 2002
- 2 Zeng BJ. Genetic Mechanism of Biosystems Pattern - nonlinear Cell Dynamics, The XX International Congress of Genetics Berlin: 2008
- 3 Sommer T, Wolf DH. FASEB J, 1997, 11 (14): 1227 ~ 33
- 4 Cambien F, Tired L. Cardiovasc Toxicol, 2005, 5 (2): 143 ~ 52
- 5 曾 [杰] 邦哲. 生物技术通报, 1997, (6): 13 ~ 18
- 6 Nakamura T, Suzuki H, Wada Y, Kodama T, Doi T. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343 (1): 286 ~ 94