

·基础研究·

## 他莫昔芬诱导C6胶质瘤细胞凋亡及其作用机制

田芬<sup>1,2</sup>, 武慧姣<sup>2</sup>, 黄锦桃<sup>2</sup>, 李朝红<sup>2</sup>, 谢富康<sup>2</sup>

(1.中南大学湘雅医院生殖医学中心,湖南长沙410008;2.中山大学中山医学院组织学与胚胎学教研室,广东广州510080)

**摘要:**【目的】探讨他莫昔芬(TAM)对C6胶质瘤细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。【方法】①TAM经不同浓度、不同时间处理C6胶质瘤细胞后,用台盼蓝染色法检测细胞死亡现象,DAPI组化染色观察凋亡细胞核形态,DNA阶梯法和FACS检测细胞凋亡,Western blot法分析PKC $\alpha$ 磷酸化水平。②PKC $\alpha$ 特异性抑制剂Go6976与TAM联合处理C6胶质瘤细胞后,DNA阶梯法和FACS检测C6胶质瘤细胞凋亡。【结果】①TAM能诱导C6胶质瘤细胞死亡,且与TAM浓度、TAM处理时间呈正相关;TAM组可见典型的细胞凋亡的形态学变化(如核固缩)和明显的DNA梯度条带;C6胶质瘤细胞凋亡率和PKC $\alpha$ 磷酸化水平具有TAM浓度依赖性和时间依赖性。②Go6976与TAM联合处理C6胶质瘤细胞后,可进一步促进TAM诱导的C6胶质瘤细胞凋亡。【结论】TAM能诱导C6胶质瘤细胞凋亡,且PKC $\alpha$ 参与介导TAM诱导的C6胶质瘤细胞凋亡。该研究可为临床神经胶质瘤的治疗提供实验依据。

**关键词:** C6胶质瘤细胞;细胞凋亡;他莫昔芬;PKC $\alpha$

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)06-0811-07

## Efficiency and Mechanism of Tamoxifen in C6 Glioma Cell Apoptosis

TIAN Fen<sup>1,2</sup>, WU Hui-jiao<sup>2</sup>, HUANG Jin-tao<sup>2</sup>, LI Chao-hong<sup>2</sup>, XIE Fu-kang<sup>2</sup>

(1.Reproductive Medicine Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;  
2.Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: LI Chao-hong, E-mail: lichzq@qq.com; XIE Fu-kang, E-mail: xiefukang2018@126.com

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of tamoxifen (TAM) on the apoptosis of C6 glioma cells and to explore the possible molecular mechanism. 【Methods】 C6 glioma cells were treated with different concentrations of TAM at different time points. Cell death was measured by trypan blue staining. Cell apoptosis was evaluated by DAPI staining, DNA ladder and FACS. Phosphorylation of PKC $\alpha$  was detected by Western blot. After C6 glioma cells were pretreated with or without 10  $\mu$ mol/L Go6976 (inhibitor of PKC $\alpha$ ) for 1 h followed by different concentrations of TAM (or 0.3% DMSO) exposure for 24 h, we performed agarose gel electrophoresis and FACS to analyze cell apoptosis. 【Results】 TAM markedly induced cell death of C6 glioma cells, which was positive correlation with the concentrations and treatment time of TAM. The TAM-mediated cell death was mainly apoptosis. Cells treated with TAM displayed typical morphological change of apoptosis such as cell shrinkage, and DNA ladder bands. TAM increased the percentage of apoptotic cells and phosphorylation of PKC $\alpha$  in dose- and time-dependent manners. In addition, Go6976, a specific inhibitor of PKC $\alpha$ , enhanced TAM-induced C6 glioma cells apoptosis. 【Conclusion】 TAM promoted C6 glioma cell apoptosis. PKC $\alpha$  mediated TAM-induced C6 glioma cell apoptosis. This study would provide useful knowledge for prevention and treatment of human glioma.

**Key words:** C6 glioma cells; apoptosis; tamoxifen; PKC $\alpha$

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6): 811-817; 843]

收稿日期:2018-06-22

基金项目:美国中华医学基金会项目(#98-677);国家自然科学基金青年基金(81701437);广东自然科学基金(2017A030313574)

作者简介:田芬,副主任技师,研究方向:DNA损伤和卵母细胞老化,E-mail: 9637149@qq.com;李朝红,通信作者,博士生导师,E-mail: lichzq@qq.com;谢富康,通信作者,博士生导师,E-mail: xiefukang2018@126.com

他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)为非固醇类三苯乙烯衍生物,是强有力的雌激素受体(estrogen receptor, ER)拮抗剂,广泛应用于乳腺癌的治疗。近年来,研究发现 TAM 可用于治疗黑色素瘤、肺癌、神经胶质瘤等非性激素靶器官肿瘤。诸多文献指出 TAM 能够调控 C6 胶质瘤细胞的生长、凋亡等生物学功能<sup>[1-4]</sup>。Wang 等<sup>[1]</sup>报道 TAM 能够抑制 C6 胶质瘤细胞增殖并诱导其凋亡。Li 和 Feng 等<sup>[2-3]</sup>也报道了 TAM 能够促进 C6 胶质瘤细胞凋亡。虽然 TAM 能够诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡,但其分子作用机制有待进一步研究。有研究表明一定剂量的 TAM 能够通过多种信号转导途径诱发细胞凋亡,其中蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)家族在 TAM 诱导的细胞凋亡过程中具有重要作用<sup>[3-5]</sup>。PKC 是一族结构相似、磷脂依赖、甘油二酯活化的丝氨酸/苏氨酸激酶,广泛存在于机体的组织细胞内,在细胞信号转导过程中具有重要作用<sup>[6]</sup>。由于 PKC 家族拥有众多亚型,不同亚型 TAM 诱导细胞凋亡的作用机制仍不十分明了。PKC $\alpha$  属于经典的 PKC 亚群,与乳腺癌、脑肿瘤等多种恶性肿瘤的发生和发展关系密切<sup>[7-8]</sup>。已有资料显示 PKC $\alpha$  在 C6 胶质瘤细胞中高表达<sup>[9]</sup>,然而其是否参与了 TAM 诱导的 C6 细胞凋亡作用,目前并不是清楚。本研究采用 TAM 处理体外培养的 C6 胶质瘤细胞后,观察 TAM 对 C6 胶质瘤细胞凋亡和 PKC $\alpha$  磷酸化水平的影响,旨在阐明 TAM 诱导神经胶质瘤细胞凋亡作用的分子机制,为将 TAM 用于临床神经胶质瘤的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

C6 胶质瘤细胞株由中山大学肿瘤防治中心黄文林教授惠赠;胎牛血清购自天津 TBD 公司;高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;TAM 粉剂和蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司。TAM 用二甲基亚砜(DMSO)配成 10 mmol/L 贮存液于 -20 °C 避光保存,用时按需稀释;蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司;PKC $\alpha$  抑制剂 Go6976 购自美国 Calbiochem 公司;兔抗 p-PKC $\alpha$ 、兔抗 PKC $\alpha$ 、兔抗  $\beta$ -actin 等一抗购自 Cell Signal 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自联科生物科技公司;ECL 显

色试剂盒购自美国 General 公司;蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司;酚:氯仿:异戊醇(24:25:1)DNA 提取液购自天津 TBD 公司。

### 1.2 体外细胞培养与处理

C6 胶质瘤细胞在含 100 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(含 10  $\mu$ g/mL 青霉素和 10  $\mu$ g/mL 链霉素),37 °C、体积分数为 5%的 CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养(Galaxy 双气培养箱)。0.125%胰酶 + 0.02%EDTA 消化传代。将培养至对数生长期的细胞以  $(3 \sim 5) \times 10^5$ /mL 密度接种于直径为 90 mm 的培养皿中,接种 24 h 后换用无血清培养基饥饿 24 h;加入不同浓度的 TAM 作用不同时间。在抑制剂实验中,细胞饥饿后,加入 10  $\mu$ mol/L Go6976 预处理 1 h,再加入 30  $\mu$ mol/L TAM 作用 24 h。

### 1.3 台盼蓝染色法检测细胞死亡率

细胞药物处理后,收集待测细胞,取 90  $\mu$ L 细胞悬液,与 10  $\mu$ L 0.4%台盼蓝混匀;染色 1 min 后,用血细胞计数板在镜下分别计数活细胞(染料拒染)和死细胞(呈淡蓝色);按公式计算细胞死亡百分比:细胞死亡百分比 = [死细胞数/(活细胞数 + 死细胞数)]  $\times$  100%;根据文献所示方法<sup>[10-11]</sup>,用 SPSS 软件的相关功能计算 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.4 DAPI 组化染色观察凋亡细胞的形态改变

将培养至对数期的细胞接种于爬片上,接种 24 h 后换用无血清培养基饥饿 24 h,然后加入 30  $\mu$ mol/L TAM 处理 24 h。取出细胞片,经 PBS 洗涤后,以 4% PFA 固定,漂洗后加入 DAPI 工作液染色。于 Leica 荧光显微镜下观察,拍照。

### 1.5 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 梯形条带

细胞药物处理后,刮取细胞,PBS 洗涤,加入细胞裂解液(配方略)充分裂解细胞;离心,取上清,加入蛋白酶 K 水解蛋白;加入无水乙醇和 5 mol/L NaCl 溶液;离心后弃上清,加入酚/氯仿/异戊醇提取液抽提,离心,取上清后加入氯仿重抽提;加入无水乙醇和 5 mol/L NaCl 溶液;离心后弃上清,挥发干乙醇,加入 Tris-EDTA 溶解沉淀,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下观察,拍照。

### 1.6 Western blot 检测 PKC $\alpha$ 磷酸化水平

细胞药物处理后,冰上收集待测细胞,用含蛋白酶抑制剂的裂解液(配方略)充分裂解细胞,离心后收集上清细胞总蛋白,测定提取液的蛋白浓度。以每孔 50  $\mu$ g 上样于 12%聚丙烯酰胺凝胶,电泳分离总蛋白,电转移到硝酸纤维素膜上;用

含5%脱脂奶粉的TBS液置摇床室温封闭30 min, TBS洗涤后,按1:1 000稀释比加入一抗p-PKC $\alpha$ 或PKC $\alpha$ 过夜;TBS洗涤后,加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000),室温孵育1~2 h,洗涤,用ECL发光试剂盒显色,显影,定影,漂洗,并扫描。同一张膜用抗体洗脱液(配方略)洗脱后,封闭,加一抗 $\beta$ -actin,其余各步同上,作为上样对照。使用Gene Genius Bio-imaging System对所有存图像行定量分析。

### 1.7 FACS检测细胞凋亡率

细胞药物处理后,收集待测细胞,PBS离心洗涤后,加入-20℃预冷的70%乙醇,4℃固定过夜。固定好的样本送至中山大学附属第一医院检验科,以碘化吡啶(PI)标记凋亡细胞,用流式细胞仪(Beckman公司)检测。流式细胞仪自带软件分析检测结果。

### 1.8 统计学分析

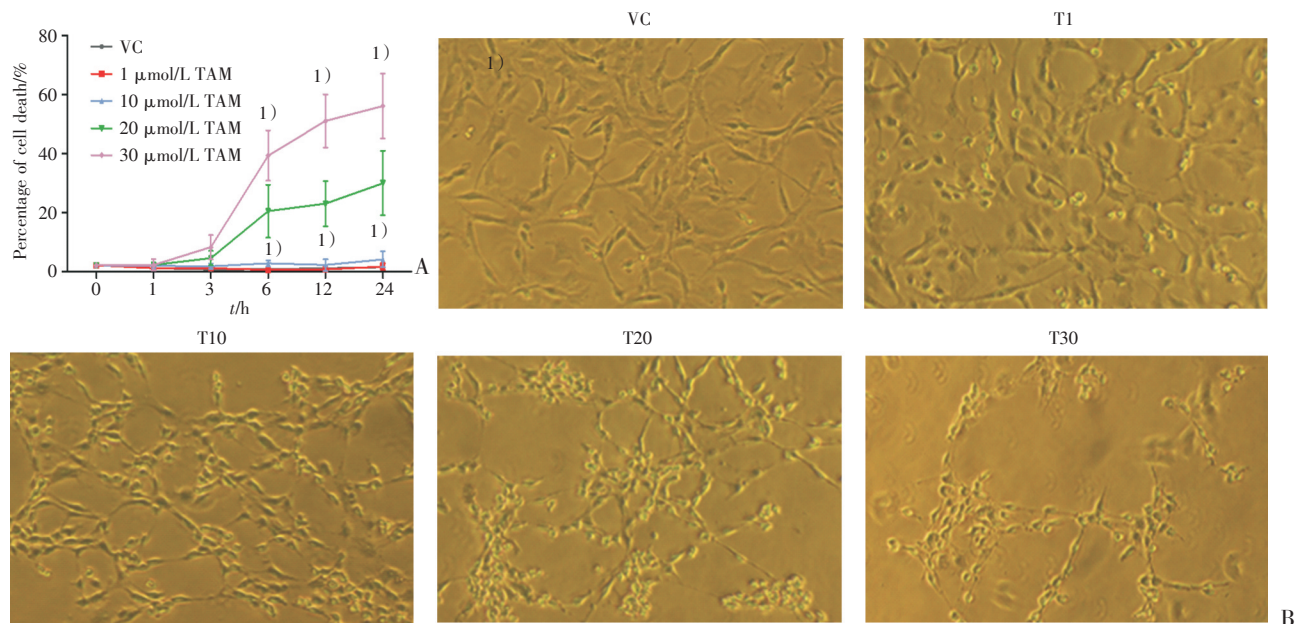
统计数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,浓度与时间、浓度与处理等采用两因素有重复方差分析(采用简单效应检测进行组间两两比较分析),不同浓度采用单因素方差分析(采用Tukey法进行组间两两比较分析),不同时间采用单因素重复

测量方差分析(采用LSD法进行组间两两比较分析),所有实验数据采用SPSS 20.0统计软件分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TAM可明显引起C6胶质瘤细胞凋亡

采用台盼蓝染法检测C6胶质瘤细胞经不同时间、不同浓度TAM处理后的C6胶质瘤细胞死亡率。实验结果显示,与对照组相比,1  $\mu\text{mol/L}$ 和10  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用不同时间时,细胞死亡现象并不明显;20  $\mu\text{mol/L}$ 和30  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用6 h时,细胞死亡率明显增高( $P$ 均 $<0.05$ ),并随作用时间的延长死亡率不断增高;在6、12和24 h 3个时间点,30  $\mu\text{mol/L}$  TAM所致的细胞死亡率高于20  $\mu\text{mol/L}$ (图1A)。经SPSS软件分析,不同浓度TAM作用C6胶质瘤细胞24 h后,其 $\text{IC}_{50}$ 为( $29.05\pm 2.18$ ) $\mu\text{mol/L}$ 。另外,随着TAM浓度增加,细胞形态逐渐发生变化,表现为细胞变圆,皱缩和凝集,细胞贴壁性降低,部分细胞悬浮于培养液中(图1B)。以上结果提示TAM能引起C6胶质瘤细胞死亡,并呈一定浓度和时间依赖性。



A: C6 cells were treated with different concentrations of TAM for different time. Cell death was detected by Trypan blue staining.  $P<0.001$ ,  $F_{\text{Time}} = 44.244$ ;  $P<0.001$ ,  $F_{\text{TAM}} = 114.760$ ;  $P<0.001$ ,  $F_{\text{Time} \times \text{TAM}} = 19.314$ . B: Morphology of C6 cells treated with different concentrations of TAM for 24 h. The results are based on 3 independent experiments. 1)  $P<0.05$  vs VC group.

图1 TAM能引起C6胶质瘤细胞死亡

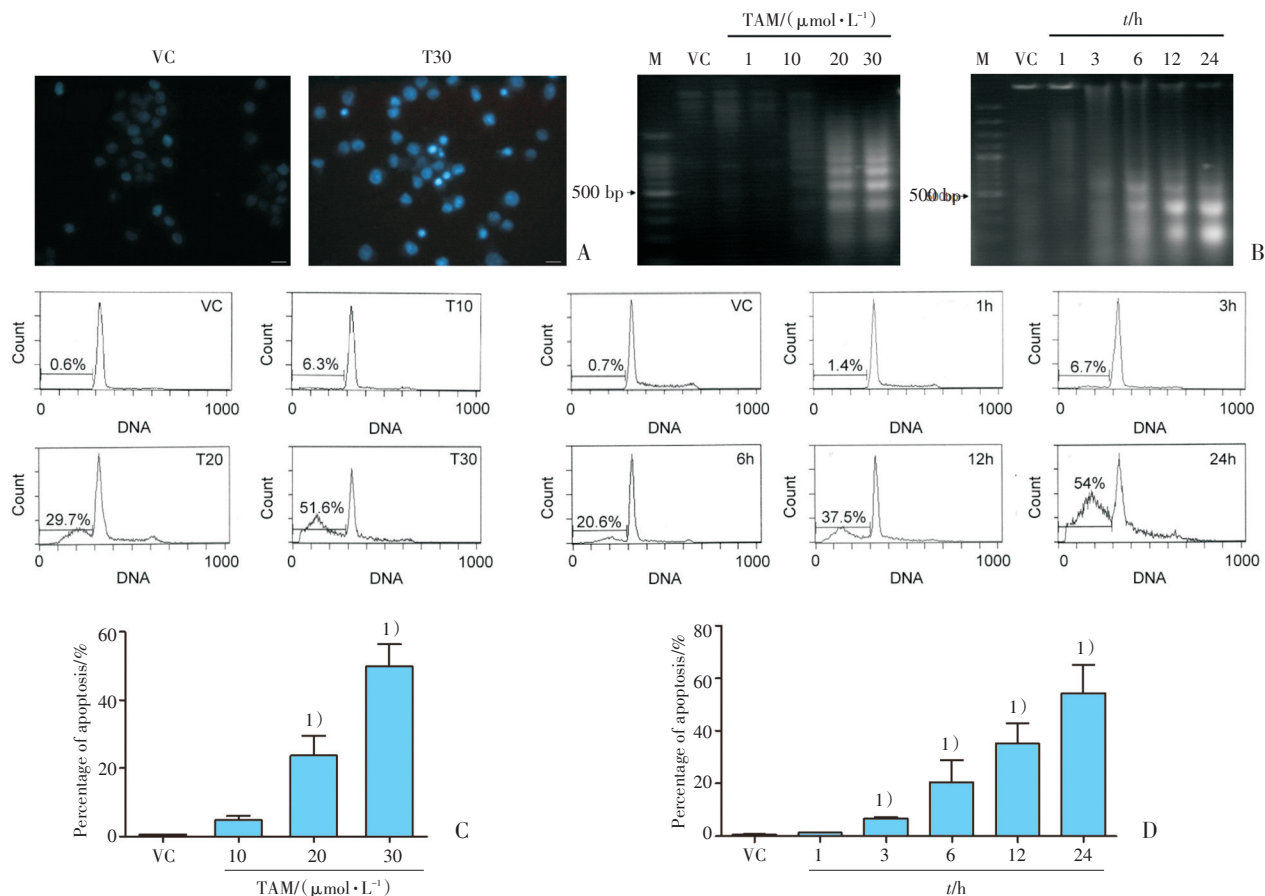
Fig.1 TAM markedly induced cell death of C6 glioma cells

TAM引起C6胶质瘤细胞死亡形式是以凋亡为主。为了研究TAM对C6胶质瘤细胞凋亡的影响,我们采用DAPI染色法和常规琼脂糖凝胶电泳检测经TAM处理后C6细胞凋亡情况。DAPI染色结果表明,对照组细胞核浅染,着色均一;30  $\mu\text{mol/L}$  TAM组细胞核深染,呈现核浓缩现象(图2A)。常规琼脂糖凝胶电泳结果表明,20  $\mu\text{mol/L}$ 和30  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用24 h时,可见典型、清晰的DNA阶梯状条带;而1  $\mu\text{mol/L}$ 和10  $\mu\text{mol/L}$  TAM组在相同时间内检测不出此阶梯状条带。30  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用6 h时,可见微弱的DNA阶梯状条带,并随作用时间的延长而增强(图2B)。为了进一步研究TAM对C6胶质瘤细胞凋亡的影响,我们采用FACS方法检测经TAM处理后C6胶质瘤细胞凋亡情况。实验结果所示:

与对照组相比,10  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用24 h时,未见明显细胞凋亡;而20  $\mu\text{mol/L}$ 和30  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用24 h时,细胞凋亡率明显增高( $P$ 均 $< 0.05$ )。30  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用6 h时,细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05$ ),并随TAM作用时间的延长细胞凋亡率不断升高(图2C、D)。此结果表明TAM能够诱导C6胶质瘤细胞凋亡,并呈一定浓度和时间依赖性。

## 2.2 TAM引起C6胶质瘤细胞PKC $\alpha$ 磷酸化水平升高

C6胶质瘤细胞经不同浓度TAM处理不同时间后,Western blot检测PKC $\alpha$ 磷酸化水平。实验结果显示:与对照组相比,30  $\mu\text{mol/L}$  TAM作用15 min后,PKC $\alpha$ 磷酸化水平明显增加( $P$ 均 $< 0.05$ ),TAM持续作用1 h时,PKC $\alpha$ 磷酸化水平仍



C6 glioma cells were treated with different concentrations of TAM for 24 h or 30  $\mu\text{mol/L}$  TAM for different time. A: The morphology of cell nuclei was monitored using DAPI staining. B: DNA fragmentation was detected by agarose gel electrophoresis. C: FACS was performed to measure cell apoptosis,  $F = 77.823$ ,  $P < 0.001$ . D: Cell apoptosis,  $F = 69.177$ ,  $P = 0.011$ . The results are based on 3 independent experiments. 1)  $P < 0.05$  vs VC group.

图2 TAM可明显促进C6胶质瘤细胞凋亡  
Fig.2 TAM significantly promoted C6 glioma cell apoptosis

然保持一定高度;1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  TAM 作用 24 h 时,PKC $\alpha$  磷酸化水平未见明显变化;然而 20  $\mu\text{mol/L}$  和 30  $\mu\text{mol/L}$  TAM 作用 24 h 时,PKC $\alpha$  磷酸化水平显著增加( $P$  均  $< 0.05$ , 图 3)。实验结果提示 TAM 能促进 PKC $\alpha$  磷酸化。

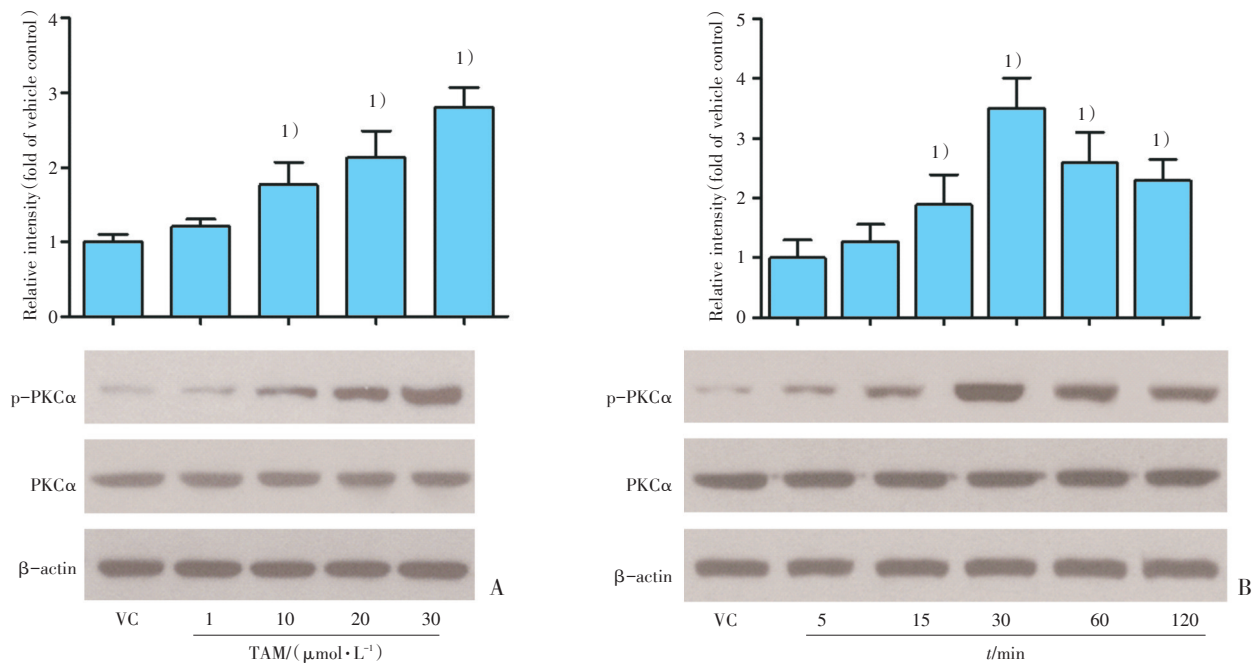
### 2.3 抑制 PKC $\alpha$ 可增强 TAM 促 C6 胶质瘤细胞凋亡的作用

为了验证 PKC $\alpha$  在 TAM 诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡中的作用,我们开展了 PKC $\alpha$  特异性抑制剂 Go6976 的实验。琼脂糖凝胶电泳实验结果表明,Go6976 单独组检测不到 DNA 阶梯状条带;TAM 组可见典型、清晰的 DNA 阶梯状条带;TAM 和 Go6976 联合组能观测到比 TAM 组更亮,更清晰的 DNA 阶梯状条带(图 4A)。FACS 实验结果表明,单独的、一定剂量的 Go6976 并不能引起 C6 胶质瘤细胞的明显凋亡,而当细胞经 Go6976 预处理后再加入 TAM 时,便可引起细胞凋亡,随着 TAM 浓度的升高凋亡率不断增加,且 Go6976+TAM 组的细胞凋亡率明显高于单用 TAM 处理组( $P$  均  $< 0.05$ , 图 4B、C)。以上结果提示在 C6 胶质瘤细胞中,PKC $\alpha$  起保护细胞、抑制凋亡的作用。

## 3 讨论

神经胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤之一,通常在颅内呈浸润性生长,由于其生长部位的特殊性及与正常脑组织边界不清的生长特性,标准的手术治疗方案很难彻底切除肿瘤组织。由于正常组织对放疗的耐受性有限,因此致力于寻找合适的化疗药物来治疗神经胶质瘤已经成为共识。本研究中我们使用了 TAM 作用于体外培养的 C6 神经胶质瘤细胞,结果显示 TAM 可引起明显的细胞凋亡,并能快速激活 PKC $\alpha$ ;当 PKC $\alpha$  受抑制时,TAM 所致的细胞凋亡明显增加。该研究进一步证实了 TAM 能诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡,并对其机制进行了初步探讨,为应用 TAM 治疗神经胶质瘤提供了实验室依据。

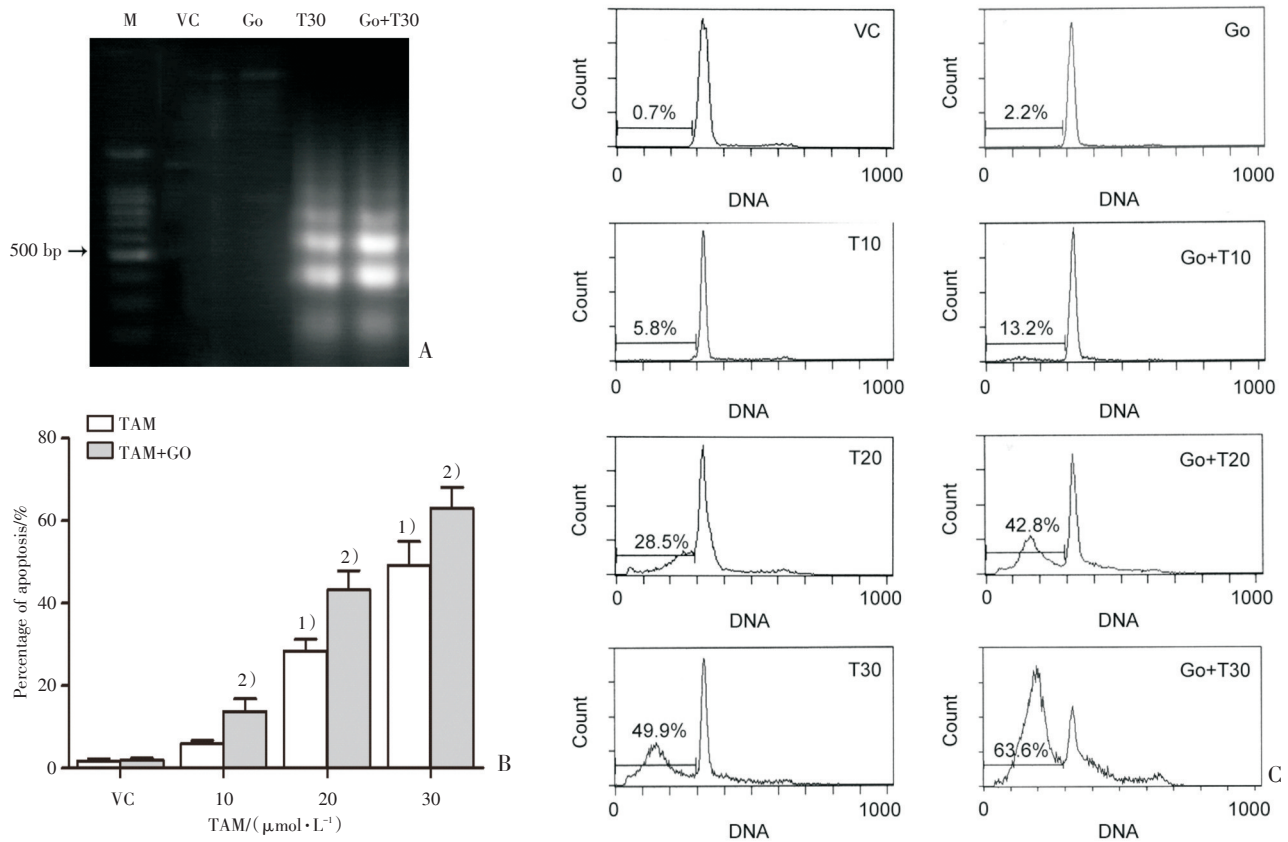
TAM 作为 ER 拮抗剂,能与雌二醇竞争性结合胞浆 ER,形成不能刺激 RNA 和蛋白质合成的复合物,从而阻断 ER 介导的各种生长因子的作用,抑制 ER 阳性的细胞生长<sup>[12]</sup>。早在 1971 年,TAM 即被单一应用或与其他细胞毒的化疗药物



C6 glioma cells were treated with 30  $\mu\text{mol/L}$  TAM for different time or different concentrations of TAM for 15 min. A: Western blot were used to evaluate the protein levels of phospho PKC $\alpha$  and total PKC $\alpha$ .  $F = 25.804$ ,  $P < 0.001$ . B: The protein levels of phospho PKC $\alpha$  and total PKC $\alpha$ .  $F = 201.040$ ,  $P = 0.001$ . The results are based on 3 independent experiments. 1)  $P < 0.05$  vs VC group.

图3 TAM引起C6胶质瘤细胞中PKC $\alpha$ 磷酸化水平升高

Fig.3 TAM significantly increased phosphorylation of PKC $\alpha$  in C6 glioma cells



C6 glioma cells were pretreated with or without 10  $\mu\text{mol/L}$  Go6976 (inhibitor of PKC $\alpha$ ) for 1h followed by different concentrations of TAM (or 0.3% DMSO) exposure for 24 h. A: Agarose gel electrophoresis was performed to examine DNA fragmentation. B-C: Cell apoptosis was measured by FACS.  $F_{\text{TAM}} = 298.685$ ,  $P < 0.001$ ;  $F_{\text{Treat}} = 41.196$ ,  $P < 0.001$ ;  $F_{\text{TAM}^{\text{Treat}}} = 5.632$ ,  $P = 0.008$ . The results are based on 3 independent experiments. 1)  $P < 0.05$  vs VC group; 2)  $P < 0.05$  vs TAM-treated alone group.

图4 抑制 PKC $\alpha$  可增强 TAM 促 C6 胶质瘤细胞凋亡的作用

Fig.4 Inhibition of PKC $\alpha$  enhanced TAM-induced C6 glioma cells apoptosis

联合应用于对激素敏感的乳腺癌的治疗<sup>[13]</sup>。TAM 对神经胶质瘤的治疗作用的研究始于二十世纪九十年代初期,随后人们设计了大量实验来验证 TAM 治疗神经胶质瘤的作用效果和机制<sup>[14-15]</sup>。离体细胞培养和动物实验的大量研究证实,TAM 有明显的抗胶质瘤作用,目前已经进入临床应用<sup>[16-17]</sup>。由于神经胶质瘤细胞通常不表达 ER,属于非激素依赖性肿瘤,TAM 对胶质瘤细胞的作用一般不经过 ER 途径,而是经过其他促进细胞凋亡的信号途径。有研究表明 TAM 抑制胶质瘤细胞增殖和促进其凋亡与 PKC 活性密切相关<sup>[17-18]</sup>。本研究也表明 TAM 能诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡,并且能够促进 PKC 活性。然而,PKC 是否介导 TAM 诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡还需要进一步研究。

PKC 是最早被确认的蛋白激酶之一。其家族

至少有 12 种同工酶,根据同工酶的结构、酶的特性、激活时对  $\text{Ca}^{2+}$  和二酰甘油(DG/DAG)的依赖性不同,通常分为四个亚群:经典 PKC 亚群,包括  $\alpha$ 、 $\beta$  I、 $\beta$  II 和  $\gamma$  亚型;新 PKC 亚群,包括  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$  和  $\theta$  等亚型;非典型 PKC 亚群,包括  $\xi$  和  $\iota/\lambda$  亚型;PKC 相关激酶,包括 PRK1 和 PRK2<sup>[5]</sup>。PKC 广泛存在于机体的组织细胞内,其生物学作用呈现多面性:一方面能激活有丝分裂原活化蛋白激酶,后者进入细胞核内,促进 DNA 复制和转录,影响细胞生长、分化、迁移以及耐药等;另一方面,还可通过激活 Bcl-2 等抗凋亡途径,抑制或促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>。在多种肿瘤组织细胞中,PKC 的一种或几种亚型的表达高于对应的正常组织,TAM 对于这些肿瘤的治疗很大程度上是通过抑制 PKC 起作用。在 C6 胶质瘤细胞中至少有 2 种 PKC 亚型蛋

白高表达:PKC $\alpha$ 和PKC $\delta$ ,其中PKC $\alpha$ 是唯一高表达的经典型PKC亚群<sup>[9]</sup>。通过药物抑制剂或反义寡核苷酸的方法抑制PKC $\alpha$ 表达能够阻碍胶质瘤细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[19]</sup>,提示PKC $\alpha$ 对胶质瘤细胞起到保护作用。我们的实验结果也表明,Go6976(PKC $\alpha$ 抑制剂)能增强TAM诱导的C6胶质瘤细胞凋亡作用。这一结果似乎与TAM引起C6胶质瘤细胞凋亡并伴随着PKC $\alpha$ 磷酸化水平升高的结果相互矛盾。PKC $\alpha$ 是胶质瘤细胞保护因素,TAM引起C6胶质瘤细胞PKC $\alpha$ 磷酸化水平升高是一种细胞保护反应,在一定程度上能阻止细胞向凋亡方向发展。PKC $\alpha$ 抑制剂的应用能增强TAM的致凋亡作用,正好说明了PKC $\alpha$ 对C6胶质瘤细胞保护作用的减弱而导致了凋亡的增加。然而,随着TAM浓度增加或作用时间的延长,可能

触发C6胶质瘤细胞内其他致凋亡信号途径,这些致凋亡信号途径逐渐占据优势作用,最终导致细胞走向凋亡。

本研究证实了TAM能够诱导C6胶质瘤细胞凋亡。以PKC $\alpha$ 为切入点,发现了TAM作用与PKC $\alpha$ 的磷酸化水平增加密切相关,PKC $\alpha$ 抑制剂能与TAM协同作用,促进C6胶质瘤细胞的凋亡。然而,PKC $\alpha$ 在TAM诱导C6胶质瘤细胞凋亡中的确切作用及其下游的分子机制仍然需要更多的研究加以证实。另外,各种不同PKC亚型在介导TAM诱导C6胶质瘤细胞凋亡中的作用也十分不明。由于神经胶质瘤ER表达常为阴性,通常选用大剂量TAM进行神经胶质瘤的体内外实验,因此用药安全以及正常组织细胞对TAM的耐受等都是有待深入探讨的课题。

#### 参考文献

- [1] Wang Y, Zhou Z, Luo H, et al. Combination of tamoxifen and antisense human telomerase RNA inhibits glioma cell proliferation and anti-apoptosis via suppression of telomerase activity [J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(6): 935-940.
- [2] Li C, Zhou C, Wang S, et al. Sensitization of glioma cells to tamoxifen-induced apoptosis by PI3-kinase inhibitor through the GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e27053.
- [3] Feng Y, Huang J, Ding Y, et al. Tamoxifen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akt, JNK and ERK activation [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(6): 1561-1567.
- [4] Moodbidri MS, Shirsat NV. Activated JNK brings about accelerated apoptosis of Bcl-2-overexpressing C6 glioma cells on treatment with tamoxifen [J]. *J Neurochem*, 2005, 92(1): 1-9.
- [5] Li Z, Wang N, Fang J, et al. Role of PKC-ERK signaling in tamoxifen-induced apoptosis and tamoxifen resistance in human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6): 1879-1886.
- [6] Okhrimenko H, Lu W, Xiang C, et al. Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7301-7309.
- [7] Hou J, Wang Z, Xu H, et al. Stanniocalcin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-mediated signaling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122179.
- [8] Li J, Yuan J, Yuan XR, et al. Induction effect of MicroRNA-449a on glioma cell proliferation and inhibition on glioma cell apoptosis by promoting PKC $\alpha$  [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(19): 3587-3592.
- [9] González MI, Kazanietz MG, Robinson MB. Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(4): 901-910.
- [10] 周一平. 用SPSS软件计算新药的LD50 [J]. *药学进展*, 2003, 27(5): 314-316.  
Zhou YP. The Calculation of LD50 in New Drugs with Software SPSS [J]. *Progr Pharmac Sci*, 2003, 27(5): 314-316.
- [11] 于锋, 黄鑫, 艾毛毛, 等. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志 siRNA 干扰  $\beta$ -catenin 基因表达后喉癌 Hep-2 细胞对顺铂化疗敏感性的研究 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(13): 1143-1147.  
Yu F, Huang X, Ai M, et al. The study of siRNA interference after laryngeal cancer Hep-2 cells to  
(下转第843页 to page 843)