

# ABT737 通过激活 JNK/c-Jun 通路上调 Bim 诱导 宫颈癌细胞凋亡

王 焕<sup>1</sup>, 张丽娟<sup>2</sup>, 刘穗玲<sup>1</sup>, 叶敏娟<sup>1</sup>, 李文薇<sup>1</sup>

(1.中山大学附属第三医院妇产科,广东 广州 510630;2.大理市第二人民医院妇产科,云南 大理 671003)

**摘要:**【目的】探讨 JNK/c-Jun 信号通路激活 Bim 在 ABT737 诱导宫颈癌细胞凋亡中的作用。【方法】用 MTT 法检测 ABT-737 对人宫颈癌 HeLa 细胞的生长抑制作用;用流式细胞术检测细胞凋亡率;用 Western blot 方法检测 JNK、phospho-JNK、c-Jun、phospho-c-Jun 以及 Bim 蛋白的表达;用 RT-PCR 检测 Bim 在 mRNA 水平的变化;用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 和 siRNA 瞬时转染抑制 JNK 及 c-Jun 的活性。【结果】ABT-737 能抑制 HeLa 细胞的生长,诱导 HeLa 细胞发生凋亡。ABT737 可激活 JNK 激酶活性其下游靶分子 c-Jun,凋亡相关基因 Bim 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达也随之上调。应用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 和靶向 JNK 及 c-Jun 的 siRNA 抑制 JNK 或 c-Jun 的活性或表达后,ABT737 诱导的 Bim 上调及细胞凋亡亦被有效阻断。【结论】ABT737 通过 JNK/c-Jun 信号通路上调凋亡相关基因 Bim 的表达,诱导 HeLa 细胞发生凋亡。

**关键词:** ABT737;JNK/c-Jun;HeLa 细胞;细胞凋亡;Bim

**中图分类号:** R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)05-0695-08

## Role of JNK-mediated Bim Expression in ABT737 -induced Apoptosis in HeLa Cells

WANG Huang<sup>1</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>, LIU Sui-ling<sup>1</sup>, YE Min-juan<sup>1</sup>, LI Wen-wei<sup>1</sup>

(1.Department of Gynaecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2.Department of Gynaecology and Obstetrics, The Second People Hospital of Dali, Dali 671003, China)

**Abstract:**【Objective】ABT-737 is a BH3 mimetic small molecule inhibitor that can effectively inhibit the activity of antiapoptotic Bcl-2 family proteins including Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w, and further enhances the effect of apoptosis. We explored the pivotal role of JNK-mediated Bim expression in ABT737 -induced apoptosis in HeLa cells.【Methods】Annexin V-PI staining was used to assess the apoptosis. The expression of JNK, phospho-JNK, c-Jun, phospho-c-Jun, Bim were detected using Western blot analysis. RT-PCR was used to detect the mRNA level of Bim. JNK specific inhibitor SP600125 or siRNA against JNK c-Jun were used to block activation of JNK.【Results】ABT737 significantly inhibited cell growth of HeLa cells with IC50 value of 15.7  $\mu\text{mol/L}$ . ABT737 induced apoptosis in HeLa cells. JNK was activated in cells exposed to ABT737 and the phosphorylation of c-Jun also increased. In the meantime, the expression of Bim was up-regulated in HeLa cells. The up-regulation of Bim expression and apoptosis induced by ABT737 were blocked by SP600125 or small interfering RNA directed against JNK or c-Jun.【Conclusion】JNK/c-Jun pathway mediates Bim up-regulation in apoptosis induced by ABT737.

**Key words:** ABT-737; JNK/c-Jun;HeLa; apoptosis; Bim

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(5):695-702]

收稿日期:2012-08-30

基金项目:广州市科技计划项目(2012kp072)

作者简介:王焕,硕士研究生,主治医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail:wangh020@163.com

ABT-737 是一种小分子多肽,具有与 BH3-Only 蛋白(如 Bad)相似的活性,与 Bcl-XL( $K_i = 36 \text{ nmol/L}$ )及 Bcl-2( $K_i = 433 \text{ nmol/L}$ )具有高亲和力,能特异性结合 Bcl-2/Bcl-XL 疏水口袋状结构,拮抗 Bcl-2/Bcl-XL 功能,从而破坏它们的抗凋亡活性促进细胞凋亡<sup>[1]</sup>。有研究显示,ABT-737 单用能杀死某些癌细胞,包括淋巴瘤细胞<sup>[2]</sup>和小细胞肺癌细胞<sup>[3]</sup>。近期研究还发现,ABT-737 能增加儿童急性淋巴母细胞白血病传统疗法的效果<sup>[4]</sup>。但 ABT737 是否有应用于宫颈癌的潜力仍不清楚。研究表明,ABT-737 不仅能通过抑制 Bcl-2/Bcl-XL 的功能参与细胞凋亡通路,还可通过调节 PUMA、JAK2 与 JNK 等活性,促进细胞发生凋亡,并导致细胞死亡<sup>[5-8]</sup>。尽管目前对于 ABT-737 诱导细胞凋亡的能力已经明确,但具体机制还不完全明确。本研究以宫颈癌细胞系 HeLa 为模型,采用 MTT 法、流式细胞术、免疫印迹法等探讨 JNK/c-Jun 信号通路激活 Bim 在 ABT737 诱导宫颈癌细胞凋亡中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人宫颈癌细胞株 HeLa 使用含 10% FBS、50  $\mu\text{g/mL}$  青霉素和 50  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM 培养液培养。细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$  和体积分数 5%  $\text{CO}_2$  实验条件下培养。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。ABT737 及 SP600125 购自于 Biochempartner 公司。JNK、P-JNK 及 Bim 抗体购自 Cell Signal 公司。c-Jun、p-c-Jun、GAPDH 及 HRP 标记二抗均为 Santa Cruz 公司产品。siRNA 由上海吉玛公司合成。Control siRNA 为上海吉玛公司赠送。具体序列如下:JNK-siRNA:5'-ACCAAGAAUGUCCUACCUUCU-3' (GeneBank accession number NM002750.2) c-Jun-siRNA: 5'-AGAUGGAAACGACCUUCUATT-3' (GeneBank accession number NM002228.3)

### 1.2 方 法

1.2.1 MTT 法 取对数生长期的细胞加入 96 孔

板中,每孔 5 000 个细胞,200  $\mu\text{L}$  每孔。实验组加入 ABT737,对照组加入使终浓度为 0.1% 的 DMSO,每组设 4 个平行孔,置体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  培养 72 h 后,除去孔内培养液,每孔加工 100  $\mu\text{L}$  培养液,同时每孔加入 10  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT 试剂,微板振荡器振荡混匀,放入培养箱中继续培养 4 h,BIO-RAD 公司 Model 550 酶标仪检测各孔的吸光值。按下列公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率=(对照组吸光度-实验组吸光度)/对照组吸光度  $\times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 收集用药物处理过的细胞,PBS 洗涤 2 次,离心。加入 1  $\times$  结合缓冲液调整细胞密度为  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。取 0.5 mL 细胞悬液,加入 1.25  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC,避光,室温(18 ~ 24  $^{\circ}\text{C}$ )静置 15 min 后离心,吸弃上层液体。再加 0.5 mL 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞,加入 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI, 10 mg/L)染色 10 min,避光。立即将标本置于冰块中,1 h 内用流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测。

1.2.3 免疫印迹法 取处于对数生长期的细胞,处理后,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液 100  $\mu\text{L}$ ,14 000 r/min( $r = 17 \text{ cm}$ )离心 15 min,定量蛋白,取 40  $\mu\text{g}$  蛋白,加入上样缓冲液,95  $^{\circ}\text{C}$  下变性 10 min。聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维膜上,5%脱脂牛奶封闭后依次加入第一、二抗体,在室温下孵育 2 h,TBST 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH7.4,150 mmol/L NaCl,0.1% Tween20)洗涤 3 次,每次 10 min,加入化学发光剂,放入暗盒中并压片,2 ~ 5 min 后显影、定影。

1.2.4 RNA 提取和 Real-time RT-PCR 收集经药物处理的细胞,PBS 洗涤两次,加入 1 mL 的 Trizol,按照说明书提示的步骤抽提出 RNA。在逆转录过程中,先将 2  $\mu\text{g}$  RNA 与 0.5  $\mu\text{g}$  Olig(dT)15 混合,加 DEPC 水定量至 15  $\mu\text{L}$ ,在 70  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min 后置于冰上。再加 5  $\mu\text{L}$  5  $\times$  M-MLV reaction buffer,1.25  $\mu\text{L}$  4  $\times$  dNTP (10 mmol/L),1  $\mu\text{L}$  M-MLV (Promega,200 U/ $\mu\text{L}$ ),0.625  $\mu\text{L}$  RNaseOUT TM(40 U/ $\mu\text{L}$ ),并加 DEPC 水将总反应体系调量至 25  $\mu\text{L}$ ,42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min,然后在 75 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10

min 中止反应。Real-time RT-PCR 中 Bim 和 GAPDH 的引物来自于 SybGREEN qPCR primer pairs (OriGene Technologies)。在 ABI PRISM 7900HT sequence detection 系统中按下列反应条件反应,变性 95 °C 15 s(第一个循环 10 min),退火 60 °C 10 s,延伸 72 °C 25 s,扩增 40 个循环。

1.2.5 siRNA 干扰 转染前 24 h 消化和计数 HeLa 细胞,在 6 孔板中接种细胞,待细胞达到 50% ~ 60% 融合时进行转染;将 5  $\mu$ L siRNA 稀释于 100  $\mu$ L 无血清的基础培养基 opti-MEM 中,室温放置 5 min;取 2  $\mu$ L Lipfectamin™2000 稀释于 100  $\mu$ L 无血清的基础培养基 opti-MEM 中,室温放置 5 min;将稀释的 siRNA 溶液加入脂质体溶液中,轻柔混匀,室温放置 20 min;吸弃细胞培养物中的完全培养基,用基础培养基 opti-MEM 漂洗细胞 2 次,加入无血清基础培养基 opti-MEM 0.8 mL;将 siRNA-脂质体复合物加入细胞中,前后轻晃 6 孔板使混合液分散均匀。4-6 h 后吸弃转染复合物,换入含 100 mL/L 胎牛血清的新鲜培养基。转染后 24 h 进行后续实验。

## 2 结 果

### 2.1 ABT-737 可抑制人宫颈癌 Hela 细胞的增殖

用 MTT 的方法检测 ABT-737 对人宫颈癌细胞 Hela 的生长抑制,黄色的 MTT 可以被活细胞中的琥珀酸脱氢酶代谢为蓝紫色的甲瓩产物,并且其生成量与存活的细胞数成正比,经 DMSO 溶解后呈紫色或淡紫色,根据颜色的深浅可判断活细胞的多少。因此,用酶标仪检测各组吸光度数值便能计算出细胞增殖的抑制率并以此来推断药物作用的强弱以及细胞对药物的敏感性。以 2.5、5、10、20 和 40  $\mu$ mol/L ABT-737 处理 Hela 细胞 72 h,对 HeLa 细胞的生长抑制率分别为 6.9%、11.4%、13.1%、26.1%、36.3%、46.3%、57% 和 76.7%,与对照组相比,该药能明显抑制 HeLa 细胞的增殖( $P < 0.05$ ),并呈浓度和时间依赖性,其 IC<sub>50</sub> 为 14.5  $\mu$ mol/L(图 1)。但是该药并未明显抑制正常肝上皮细胞的增殖。以上结果说明 ABT737 在体外能

显著抑制 HeLa 细胞的增殖。

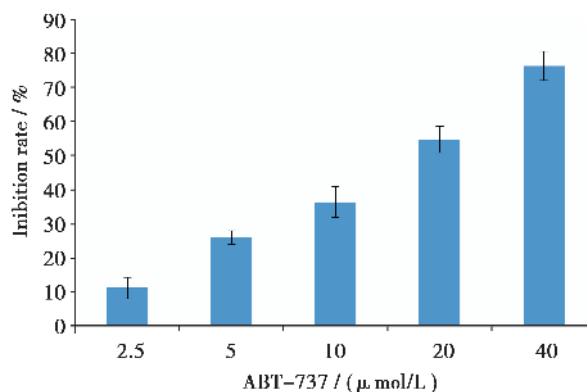


图 1 ABT737 抑制 HeLa 细胞生长

Fig.1 ABT737 inhibited cell growth of HeLa cells

HeLa cells were plated at the density of 5000 cells/well in a 96-well plate. The stock of ABT737 was added to wells. Cells were cultured for 3 days. Thereafter, MTT assay was conducted ( $P < 0.01$ ). The results were representative of 3 experiments.

### 2.2 ABT-737 可诱导人宫颈癌细胞株 HeLa 发生早期凋亡

在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧,而在细胞凋亡早期,细胞膜中的磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种分子质量为 36 ku 的 Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞,PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用,就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。当用 10 mmol/L 及 20 mmol/L ABT737 作用于 HeLa 细胞 24 h 后,早期凋亡率分别为 22.8% 和 37.9%,明显高于对照组(图 2)。上述结果说明 ABT737 可以诱导 HeLa 细胞发生凋亡。

### 2.3 ABT-737 激活 JNK 激酶及其下游靶分子 c-Jun

我们知道,ABT-737 具有与 BH3-Only 蛋白

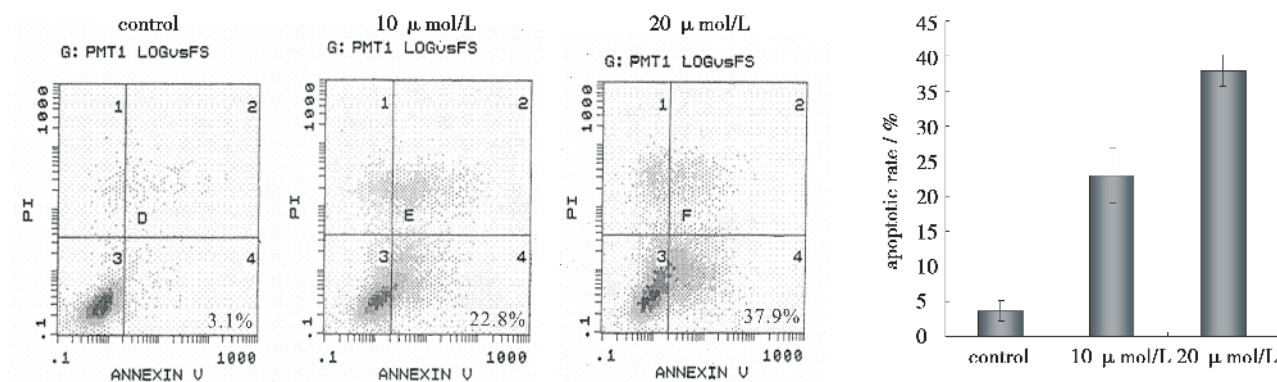


图 2 ABT737 诱导 HeLa 细胞凋亡

Fig.2 ABT737 induced apoptosis in HeLa cells

HeLa cells treated with indicated concentrations of ABT737 for 24 h. The cells were collected sequentially and stained with AnnexinV and PI and then analyzed by flow cytometry. The cells in the downright quadrant (AnnexinV+/PI-) were early apoptotic cells. The results were representative of 3 experiments.

相似的活性,能拮抗 Bcl-2 /Bcl-XL 功能,诱导细胞发生凋亡,但具体的机制尚不清楚。有大量研究证明 JNK 与细胞凋亡有密切关系。在 ABT-737 的细胞凋亡过程中,JNK 通路是否活化并起到关键作用呢? 我们首先应用 Western blot 的方法检测 JNK 通路的磷酸化。如图 3A 显示,使用不同浓度 ABT737 处理 HeLa 细胞,当药物浓度仅为 1.25 μmol/L 时,JNK 的磷酸化已十分明显,并随药物浓度的增加激活作用越明显。由图 3B 可见 10 μmol/L ABT-737 作用于 HeLa 细胞 0 ~ 48 h, JNK 激酶持续激活,且从 6 h 开始磷酸化水平已明显增高。进一步观察到 JNK 下游重要的转录因子 c-Jun 的磷酸化水平也显著上调,并呈浓度依赖性和时间依赖性。该结果说明,ABT-737 作用于 HeLa 细胞后,可以显著激活 JNK/c-Jun 信号通路。

#### 2.4 ABT-737 诱导细胞凋亡相关蛋白 Bim 表达增加

既然 ABT-737 能通过抑制 Bcl-2 /Bcl-XL 的功能参与细胞凋亡通路,而 Bim 是细胞凋亡的激活蛋白,那么 ABT-737 是否可以激活 Bim 而发挥诱导细胞凋亡的作用呢? Western blot 结果显示,ABT737 能显著上调 HeLa 细胞中 Bim 蛋白的表达水平,并呈显著的时间及浓度依赖性(图 4A 和 4C)。同时我们用 RT-PCR 方法检测了 ABT737 处

理后,细胞中 Bim 在 mRNA 水平上的表达情况。结果显示显示,ABT737 处理可以在转录水平上调 Bim 的表达(图 4B 和 4D)。

#### 2.5 抑制 JNK/c-Jun 通路阻断 ABT-737 诱导 Bim 的表达

由以上结果可知 ABT-737 不仅可以上调 JNK 的表达,也能够上调 Bim 的表达,那么,Bim 表达的上调是否与 JNK 信号通路的激活相关?为此,我们应用 JNK 特异性小分子抑制剂 SP600125 抑制 JNK 激酶的活性。首先使用 10 μmol/L SP600125 预孵育 HeLa 细胞 1 h,观察其对 ABT-737 导致的 Bim 上调的影响。Western blot 检测结果显示,联用 SP600125 处理抑制 JNK 激酶及其下游 c-Jun 的磷酸化后,ABT737 导致的 Bim 上调在蛋白水平和 mRNA 水平均得到一定程度的抑制(图 5A 和 5B)。

为了排除抑制剂非特异性的干扰,我们进一步使用 JNK 特异性小干扰 RNA 沉默 JNK 表达后,观察其对 ABT-737 导致的 Bim 上调的影响。将 JNK 特异性 siRNA 或对照 siRNA 瞬时转染 HeLa 细胞 24 h 后,分别向两组细胞中加入 10 μmol/L ABT-737 继续处理 24 h,应用 Western blot 检测可以发现,当 JNK 表达沉默后,ABT737 导致的 Bim 上调在蛋白水平和 mRNA 水平均有减弱(图 5C 和 5D)。

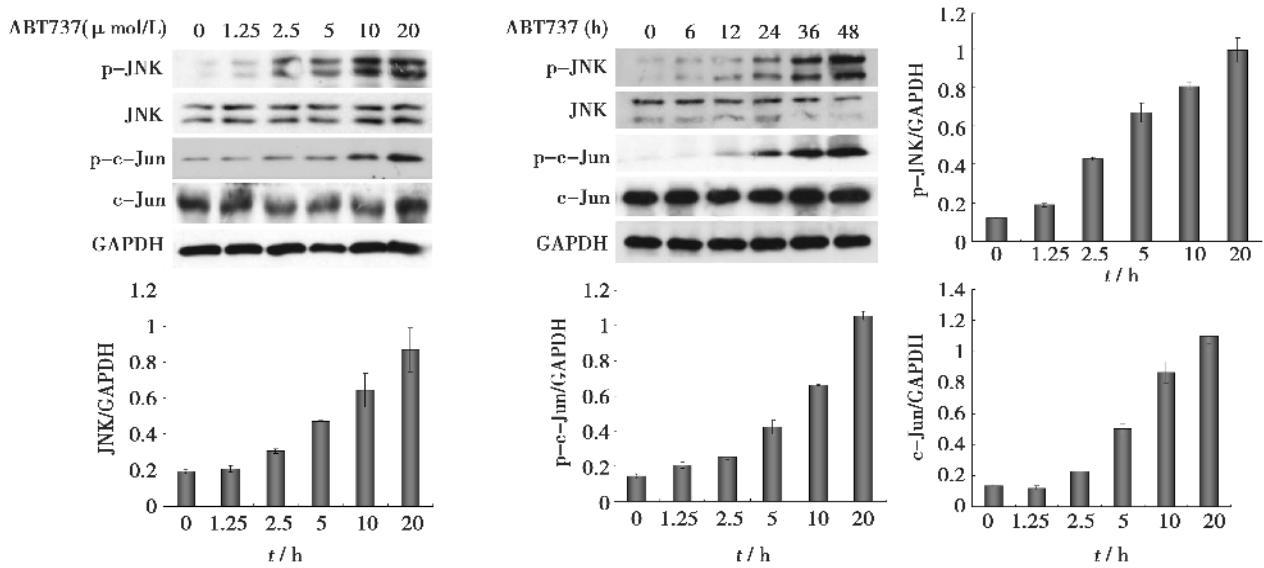


图 3 ABT737 诱导 JNK 和 c-Jun 的磷酸化

Fig.3 ABT737 induced phosphorylation of JNK and its downstream target c-Jun

HeLa cells were treated with various concentrations of ABT737 for 24 h or with 10 μmol/L ABT737 for the indicated periods. After treatments, cell lysates were analyzed by immunoblotting with JNK, phospho-JNK, c-Jun and phospho-c-Jun antibodies. The results were representative of 3 experiments.

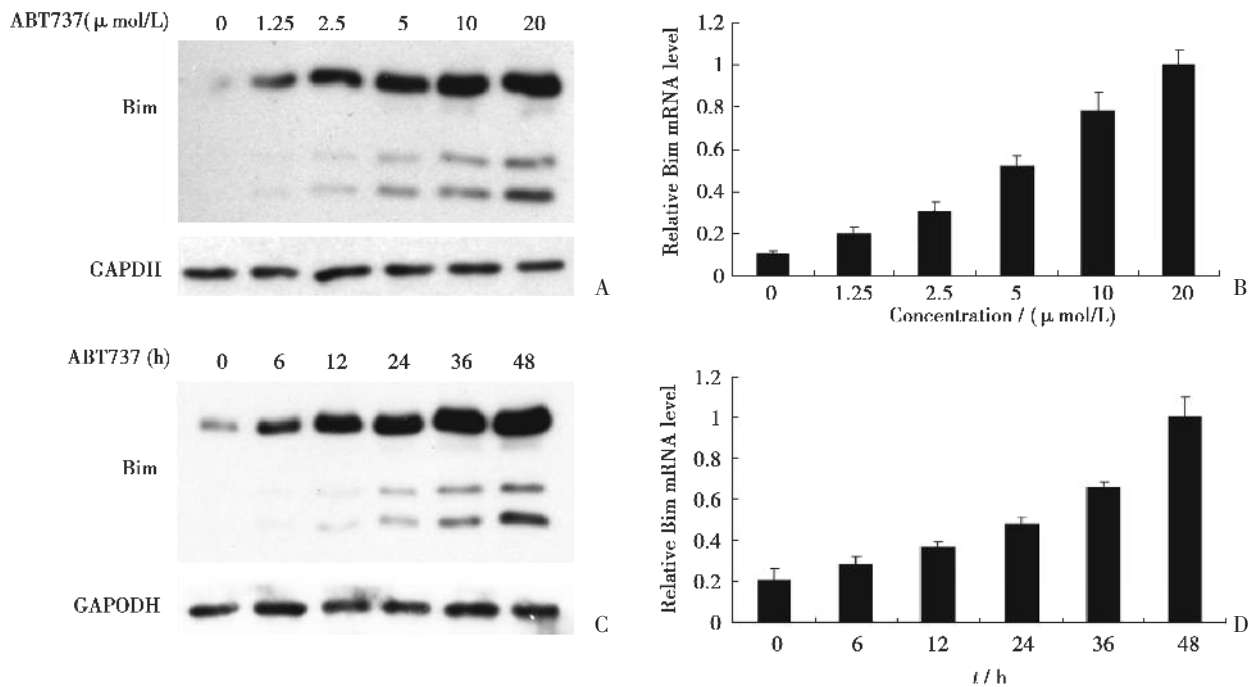


图 4 ABT737 上调 Bim 的表达

Fig.4 ABT737 up-regulated the expression of Bim in HeLa cells

A and B HeLa cells were treated with various concentrations of ABT737 for 24 h. Cell extracts were analyzed by Western Blot using Bim and GAPDH antibodies. The expression level of Bim mRNA was detected by Real-time RT-PCR. Error bars represent standard deviations (SD) calculated from three parallel experiments,  $P < 0.01$ . C and D HeLa cells were treated with 10 μmol/L ABT737 for the indicated periods. Cell extracts were analyzed by Western Blot using Bim and GAPDH antibodies. The expression level of Bim mRNA was detected by real-time RT-PCR. Error bars represent standard deviations (SD) calculated from three parallel experiments,  $P < 0.01$ .

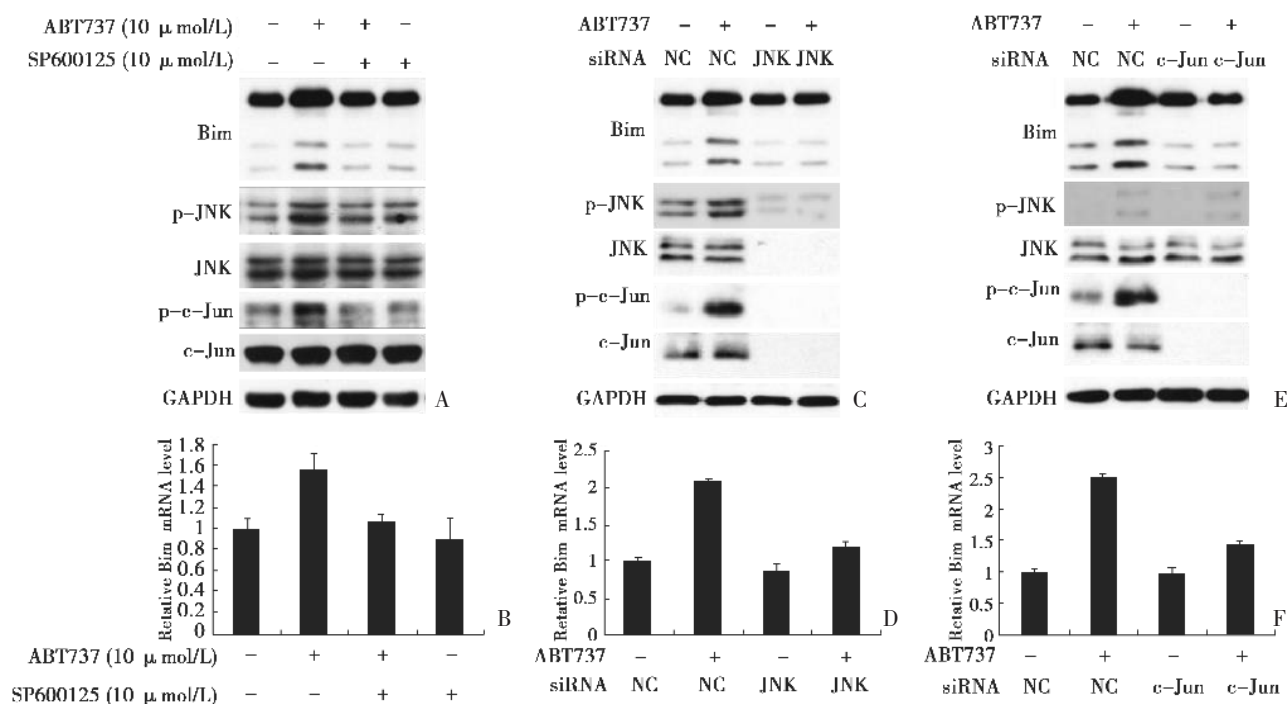


图 5 JNK 和 c-Jun 抑制剂阻断 ABT737 上调 Bim

Fig.5 Inhibition of JNK and c-Jun blocked ABT737-induced Bim up-regulation in HeLa cells

A, B: HeLa cells were treated with ABT737 for 24 h, in the absence or presence of 10 μmol/L SP600125. Then the cells were lysed and the indicated proteins were analyzed by Western Blot. Real-time RT-PCR showed Bim mRNA expression in HeLa cells was blocked by SP600125,  $P < 0.01$ . C, D: HeLa cells were transfected with negative control or JNK siRNA for 48 h, then untreated or were treated with ABT737 for 24 h. The cells were lysed and the indicated proteins were analyzed by Western Blot. Real-time showed that silencing of JNK by siRNA blocked ABT737-induced Bim mRNA expression in HeLa cells,  $P < 0.01$ . E, F: HeLa cells were transfected with negative control or c-Jun siRNA for 48 h, then untreated or were treated with ABT737 for 24 h. The cells were lysed and the indicated proteins were analyzed by Western Blot. Real-time showed that silencing of c-Jun by siRNA blocked ABT737-induced Bim mRNA expression in HeLa cells,  $P < 0.01$ . The results were representative of 3 experiments.

在 ABT-737 激活 JNK 诱导 Bim 表达的过程中, JNK 下游重要靶分子 c-Jun 的激活发挥重要作用。应用 siRNA 干扰的方法, 我们成功阻断了 c-Jun 的表达, 并有效抑制了 c-Jun 的磷酸化。结果发现抑制 c-Jun 从蛋白水平和 mRNA 水平均阻断了 ABT-737 诱导的 Bim 的表达(图 5E 和 5F)。

综上所述, 说明 JNK/c-Jun 通路的激活在 ABT-737 诱导的 Bim 的上调过程中起着关键作用。

## 2.6 抑制 JNK 激酶活性阻断 ABT-737 诱导的细胞凋亡

为了证实 JNK/c-Jun 途径通过上调 Bim 参与了细胞凋亡的调控, 我们进一步用流式细胞术进行了相关实验。当先在 HeLa 细胞中加入 10 μmol/L SP600125(JNK 特异性抑制剂)预处理 1 h 后, 再

加入 20 μmol/L ABT737 作用细胞 24 h, 图 6 显示单独加 ABT737 的细胞早期凋亡率为 32.7%, 较对照组 4.9% 明显增高, 而联合应用 SP600125 则使 ABT737 诱导的细胞凋亡明显减少, 早期凋亡率仅为 11.3%。上述结果说明 JNK 通路的抑制可阻断细胞凋亡的发生。

## 3 讨论

ABT-737 由美国 Abbott 公司研发<sup>[9]</sup>, 目前处于临床前研究阶段<sup>[10]</sup>。该化合物的研发采用基于 NMR 的筛选技术、平行合成以及结构设计的方法, 得到 ABT-737, 作为 Bcl-XL、Bcl-2 和 Bcl-w 蛋白的抑制剂。荧光偏振竞争性结合 (FP) 测试结果显示, ABT-737 在体外与 Bcl-XL、Bcl-2 和

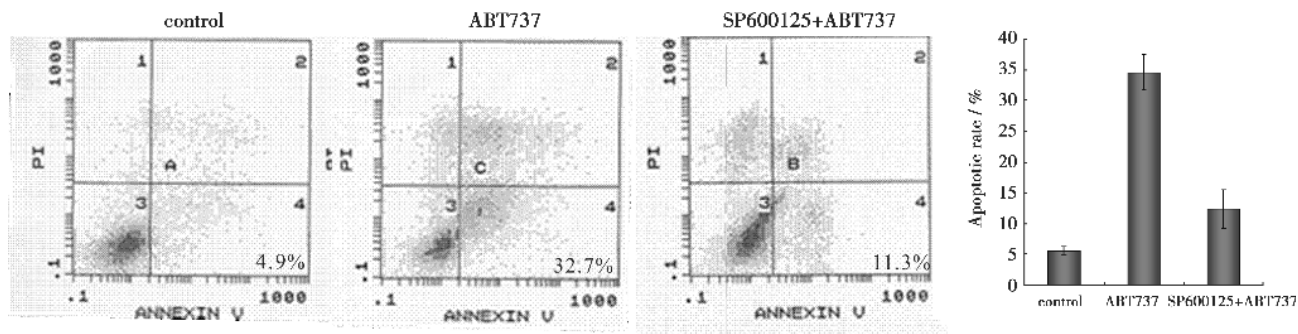


图6 JNK 抑制剂阻断 ABT737 诱导的 HeLa 细胞凋亡

Fig.6 Inhibition of JNK blocked ABT737-induced apoptosis in HeLa cells

HeLa cells treated with ABT737 or ABT737 combination of SP600125 for 24 h. The cells were collected sequentially and stained with AnnexinV and PI and then analyzed by flow cytometry. The cells in the downright quadrant (AnnexinVt/PI<sub>-</sub>) were early apoptotic cells. The results were representative of 3 experiments.

Bcl-w 结合的抑制常数  $K_i$  值均小于  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 具有高亲和力。但 ABT-737 与 Mcl-1、Bcl-B 及 A1 的亲和力较低, 其与前者结合的抑制常数  $K_i$  值为  $(0.46 \pm 0.11) \mu\text{mol/L}$ , 与后两者结合的抑制常数  $K_i$  值均大于  $1 \mu\text{mol/L}$ 。绝大多数 Bcl-2 家族成员含有 C 端跨膜结构域, 该结构域能促使蛋白与线粒体外膜或其他胞外膜结合从而发挥各自功能。已有研究报道, ABT-737 单用能杀灭淋巴瘤细胞<sup>[2]</sup>和小细胞肺癌细胞<sup>[3]</sup>, 但 ABT737 是否对宫颈癌细胞起到杀伤作用, 其机制如何, 目前国内外还未见类似报道。本研究中, 我们首先观察 ABT-737 对人宫颈癌 HeLa 细胞的细胞毒作用。实验显示, ABT-737 对 HeLa 细胞有增殖抑制作用, 同时可以诱导细胞凋亡, 其效应呈浓度及时间依赖性。

ABT-737 不仅能通过抑制 Bcl-2/Bcl-XL 的功能参与调控细胞凋亡, 还可能可通过调节 PUMA、JAK2 等活性, 导致细胞凋亡<sup>[5-8]</sup>。尽管目前对于 ABT-737 诱导细胞凋亡的能力已经明确, 但具体机制尚不十分清楚。JNK 激酶受各种细胞外刺激而激活, 如生长因子、细胞应激等。而对于应激诱导的细胞凋亡, JNK 常常是必需的<sup>[11]</sup>。有大量研究表明, JNK 通过激活下游靶分子 c-Jun 发挥诱导细胞凋亡的效应<sup>[12]</sup>。本实验中, 我们观察到 ABT-737 处理 HeLa 细胞时, JNK 激酶及其下游底物 c-Jun 均被激活, 且呈浓度和时间依赖性, 说明

在 ABT737 诱导的细胞凋亡中, JNK 信号通路可能参与了其中的调控。我们知道, JNK 通路诱导细胞凋亡主要通过调控胞浆中的底物实现, 例如磷酸化并活化 BAX, Bim 等促凋亡因子<sup>[13]</sup>; 或通过多种机制激活线粒体凋亡途径, 如磷酸化并抑制 BCL-2、bcl-xl、mcl-1 等抗凋亡 bcl-2 家族成员<sup>[14]</sup>。我们的研究发现, 在 ABT737 诱导细胞凋亡及 JNK 激酶活化时, 具有促凋亡功能的 BH3 亚家族中 Bim 蛋白的表达随之增加, 也呈浓度梯度和时间梯度依赖性。

因此, 我们预想 JNK/c-Jun 途径可能通过上调 Bim 参与了 ABT737 诱导的细胞凋亡。为了证明这个假设, 我们使用 JNK 特异性小分子抑制剂 SP600125 处理 HeLa 细胞, 结果发现联用 SP600125 处理抑制 JNK 激酶的活性可使 ABT737 诱导的 Bim 的表达下调。为了进一步证实我们的观点, 我们还采用了特异靶向 JNK 的小分子 RNA 干扰技术, RNA 干扰可以达到特异性减少 JNK 表达的目的。与使用抑制剂的结果一致, JNK 表达的沉默使 ABT737 诱导的 Bim 的上调在蛋白水平及 mRNA 水平均被明显地抑制, 从而证明 JNK 信号通路介导了 ABT-737 诱导的 Bim 的表达。

值得注意的是, 我们发现在 ABT737 处理的过程中, JNK 下游重要的转录因子 c-Jun 的磷酸化水平随着 JNK 激酶的激活而逐渐上升, 并且表达

时间相当持续,直至 48 h。因此我们考虑这可能不是一种简单的、应激性的增高。为了进一步阐明 c-Jun 与 ABT737 诱导的 Bim 表达的关系,我们应用靶向 c-Jun 的 siRNA 阻断了 HeLa 细胞中 c-Jun 的表达,这也有效抑制了 c-Jun 的磷酸化。结果显示,当 c-Jun 的表达和活性被抑制后,ABT737 诱导的 Bim 的表达也随之下调。

通过上述实验我们已证实,在 ABT737 处理 HeLa 细胞的过程中,凋亡相关基因 Bim 可以被 JNK/c-Jun 通路诱导表达。进一步的研究发现,当用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 抑制 HeLa 细胞中 JNK 的活性后,ABT737 所诱导的细胞凋亡亦受到抑制。

综上所述,我们发现 ABT737 可通过激活 JNK/c-Jun 信号通路,上调凋亡蛋白 Bim 的表达,进而诱导人宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡。这一机制的阐明为深入探讨 Bcl-2 小分子抑制剂的作用机制及寻找新的宫颈癌治疗方法提供了一定的实验依据和理论指导。

#### 参考文献:

- [1] Maldonado V, Melendez-Zajgla J, Ortega A. Modulation of NF- $\kappa$ B, and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells [J]. *Mutat Res*, 1997, 381(1): 67-75.
- [2] Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, et al. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 112-121.
- [3] Tahir SK, Yang X, Anderson MG, et al. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1176-1183.
- [4] Kang MH, Kang YH, Szymanska B, et al. Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo[J]. *Blood*, 2007, 110(6): 2057-2066.
- [5] Keuling AM, Andrew SE, Tron VA. Inhibition of p38 MAPK enhances ABT-737-induced cell death in melanoma cell lines: novel regulation of PUMA [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(3): 430-440.
- [6] Will B, Siddiqi T, Jorda MA, et al. Apoptosis induced by JAK2 inhibition is mediated by Bim and enhanced by the BH3 mimetic ABT-737 in JAK2 mutant human erythroid cells[J]. *Blood*, 2010, 115(14): 2901-2909.
- [7] Dasmahapatra G, Lembersky D, Rahmani M, et al. Bcl-2 antagonists interact synergistically with bortezomib in DLBCL cells in association with JNK activation and induction of ER stress[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(9): 808-819.
- [8] Cui F, Li J, Ding A, et al. Conditional QTL mapping for plant height with respect to the length of the spike and internode in two mapping populations of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 122(8): 1517-1536.
- [9] Petros AM, Dinges J, Augeri DJ, et al. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(2): 656-663.
- [10] Azmi AS, Wang Z, Philip PA, et al. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2011, 16(1): 59-70.
- [11] Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword[J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 36-42.
- [12] Chen YR, Wang X, Templeton D, et al. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation: Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(50): 31929-31936.
- [13] Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5): 2432-2437.
- [14] Srivastava RK, Sollott SJ, Khan L, et al. Bcl-2 and Bcl-X(L) block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun NH(2)-terminal kinase activity, and apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5659-5674.

(编辑 张恩健)