

信号分子抑制剂对辐射后 NFS-60 细胞的影响 *

从玉文 陈家佩 赵卫红 吴岚军

(北京放射医学研究所 北京 100850)

摘要 为了解造血因子受体信号转导在造血细胞辐射损伤时的变化及其与细胞增殖的关系,应用 MTT 法分别观察了蛋白质酪氨酸和丝苏氨酸激酶及其磷酸酶抑制剂对照射及未照射 NFS-60 细胞增殖的影响。结果显示,一定浓度的磷酸酶抑制剂可促进细胞增殖,而激酶抑制剂则抑制细胞生长,同未照射细胞相比,磷酸酶抑制剂对 3Gy 照射细胞具有更强的促增殖作用,而某些激酶抑制剂则可加重细胞的辐射损伤。提示辐射后 NFS-60 细胞激酶 / 磷酸酶自稳平衡失调,推测这可能是辐射后造血细胞增殖抑制的原因之一。

关键词 信号分子抑制剂, 辐射损伤, NFS-60 细胞

中图分类号 R818.71

研究发现造血细胞受照射后对造血因子刺激的反应性降低,造血因子受体与因子的亲和力下降^[1]。合理推测,造血细胞辐射损伤时造血因子受体信号转导可能发生障碍。已知造血因子受体信号转导的本质是蛋白质磷酸化的级联反应,并受到蛋白质酪氨酸、丝苏氨酸激酶及其磷酸酶的双重调控^[2],其中激酶使蛋白质磷酸化,增强信号转导,磷酸酶使蛋白质脱磷酸化,下调信号转导,两者的自稳平衡使细胞维持在恰当的增殖状态。NFS-60 细胞为 G-CSF 依赖细胞株, G-CSF 受体信号转导为 NFS-60 细胞生长所必需。因此,为了解造血细胞辐射损伤时造血因子受体信号转导的变化及其与细胞增殖的关系,本文应用蛋白质酪氨酸、丝苏氨酸激酶及其磷酸酶的特异性抑制剂上调或下调信号转导,比较观察信号转导的变化对照射及未照射 NFS-60 细胞增殖的影响。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

酪氨酸激酶抑制剂 (Genistein)、丝苏氨酸磷酸酶抑制剂 (Cantharidin) 及 PI3 激酶抑制剂 (Wortmannin) 均购自 Sigma 公司;丝苏氨酸激酶 MEK1 特异性抑制剂 PD98059 购自 Biol-lab 公司;硫酸钠购于北京化学试剂公司。

1.2 酪氨酸磷酸酶抑制剂过硫酸钠的制备^[3]

分别配制 200 μ mol/L 的硫酸钠和 H₂O₂ 溶液,过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。无菌条件下各吸

* 国家自然科学基金资助 (39800032)

收稿日期: 初稿 1999-05-02, 修回 1999-10-05

取 40 μ L, 加入 320 μ L RPMI 1640, 22 $^{\circ}$ C 作用 15min, 反应结束后加入 4 μ L 过氧化氢酶溶液 (20mg/mL, Boehringer Mannheim 公司) 灭活剩余的 H₂O₂。现配现用。

1.3 细胞培养

NFS-60 细胞为小鼠源性 G-CSF 依赖细胞株, 放射医学研究所实验室保存。rhG-CSF 活性为 1 $\times 10^7$ /mg, 纯度 98%, 放射医学研究所陈惠鹏副教授惠赠。以适当数量的细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 加入 G-CSF 至终浓度为 10ng/mL, 隔天换液一次, 取指数生长期细胞用于实验。

1.4 照射条件

⁶⁰Co γ 射线一次均匀照射, 照射剂量为 3Gy, 剂量率为 1.15~1.23Gy/min。

1.5 MTT 方法

将待测细胞用 RPMI 1640 培养液洗涤 3 次, 台盼蓝染色计数活细胞, 用含 10% 新生牛血清 RPMI 1640 培养基调整活细胞浓度为 1.25 $\times 10^5$ /mL, 每孔 80 μ L 加入 96 孔板中; 抑制剂 2 倍或 3 倍递减稀释后, 每孔加入 10 μ L, 每组做 4 个复孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 抑制剂与细胞充分作用后, 每孔加入 10 μ L G-CSF 溶液 (5ng/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养 48h, 加 MTT (5mg/mL) 20 μ L, 继续培养 4h, 吸弃上清 80 μ L, 加入 200 μ L DMSO, 振荡助溶, 在 MODEL 450 酶联仪 (BIO-RAD) 上测 492nm 波长的 OD 值, 以抑制剂浓度为横坐标, 以加入抑制剂细胞的 OD 值与未加抑制剂细胞的 OD 值的比值 (即增殖指数) 为纵坐标绘图。

2 结 果

2.1 过钒酸钠对照射后 NFS-60 细胞增殖的影响

过钒酸钠是钒酸钠与过氧化氢反应生成的络合物, 通过不可逆地氧化蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTP) 催化亚基中的半胱氨酸, 抑制了 PTP 酶活性, 是目前最有效的 PTP 特异抑制剂之一^[4]。现尚缺乏 PTP 参与 G-CSF 受体信号转导负调控的直接证据, 但 PTP 如造血细胞磷酸酶 (HCP) 基因功能缺失, 可提高造血细胞对 G-CSF 的增殖敏感性, 提示 PTP 也是 G-CSF 的负调控元件之一^[5]。图 1 显示 NFS-60 细胞与不同浓度过钒酸钠作用后细胞增殖状况。对于未照射的 NFS-60 细胞, 当过钒酸钠浓度小于 10 μ mol/L 时, 细胞增殖指数没有明显变化, 当浓度为 10~20 μ mol/L 时, 增殖指数稍有增加, 当浓度大于 20 μ mol/L, 增殖指数则显著降低, 细胞增殖受抑制。NFS-60 细胞经 3Gy 照射后, 当过钒酸钠浓度大于 0.2 μ mol/L 时, 增殖指数即开始升高, 当浓度为 1~10 μ mol/L 时, 出现一个明显的增殖峰, 其峰值可达对照组的 1.6 倍以上, 当浓度大于 10 μ mol/L 时, 增殖指数下降。这些结果说明, 较低浓度的过钒酸钠即可促进照射细胞增殖, 并可获得较高的促增殖效果。

2.2 Cantharidin 对照射后 NFS-60 细胞增殖的影响

Cantharidin 是疣甲虫产生的自然防御毒物, 同 ATP 竞争结合蛋白质磷酸酶 (PP) 的催化亚基, 是 PP1/PP2A 的特异抑制剂^[6]。PP1/PP2A 在真核细胞中可使大量的靶分子脱磷酸化, G-CSF 激活的 RAS/R AF 通路中的某些元件也可能受此调节^[7]。图 2 为在不同浓度的 Cantharidin 中 NFS-60 细胞增殖能力变化的情况。Cantharidin 对未照射的 NFS-60 细胞没有明显的促增殖作用, 当浓度大于 1 μ mol/L 时, 增殖指数下降。3Gy 照射细胞在 0.01~0.05 μ mol/L Cantharidin 溶液中培养后, 有一个小的增殖峰, 其峰值约为未照射细胞的 1.2 倍。表明在一

定的浓度范围内 Cantharidin 仅对照射细胞有促增殖作用。

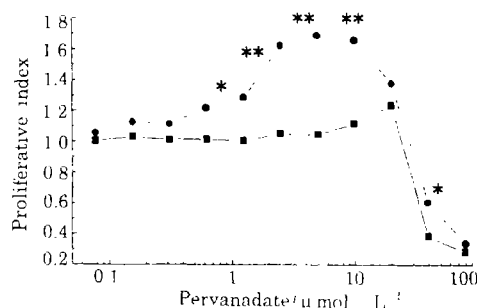


Fig.1 Effects of pervanadate on the growth of irradiated NFS-60 cells

□ Unirradiated cells, ● 3Gy irradiated cells,
Compared with unirradiated cells: * $p < 0.05$,
** $p < 0.01$

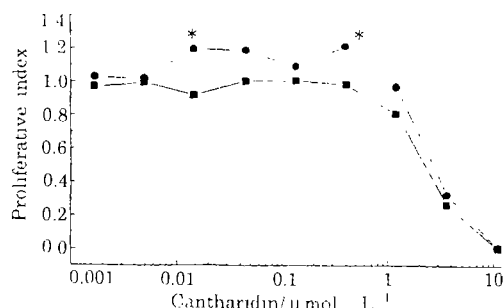


Fig.2 Effects of cantharidin on the growth of irradiated NFS-60 cells

□ Unirradiated cells, ● 3Gy irradiated cells,
Compared with unirradiated cells: * $p < 0.05$

2.3 Genestein 对照射后 NFS-60 细胞增殖的影响

Genestein 又称大豆异黄酮,可特异地抑制细胞内酪氨酸激酶和 DNA 拓扑异构酶 II,参与细胞增殖、凋亡及细胞周期的调节,是目前用于干预细胞内酪氨酸激酶 / 磷酸酶自稳平衡的重要措施之一 [8,9]。图 3 显示 NFS-60 细胞加入不同浓度 Genestein 后细胞增殖的情况由图 3 可见,随着 Genestein 浓度的增加,照射细胞及未照射细胞的增殖指数均明显下降,照射细胞增殖指数下降幅度比未照射细胞缓慢,两者的半数抑制浓度分别为 $52.3 \mu\text{mol/L}$ 和 $21.1 \mu\text{mol/L}$ 。说明 Genestein 可抑制细胞增殖,但对照射细胞的抑制作用相对较轻。

2.4 PD98059 对照射后 NFS-60 细胞增殖的影响

Ras/Raf 通路是 G-CSF 受体信号转导的主要通路之一, MEK1 是 Raf 的直接底物,是实现 G-CSF 促增殖信号传导的必需激酶 [2]。PD98059 是 MEK1/2 的特异性抑制剂 [10]。图 4 显示不同浓度 PD98059 对 NFS-60 细胞增殖的影响。从图 4 可看出,随着 PD98059 浓度的增加,增殖指数下降,照射与未照射细胞间的差异不显著,表明 PD98059 具有抑制 NFS-60 细胞增殖的作用。当 PD98059 浓度为 $3 \sim 25 \mu\text{mol/L}$ 时,在个别浓度点上 3Gy 照射细胞的增殖指数明显低于未照射细胞,提示在该浓度上 PD98059 似可加重辐射对 NFS-60 细胞增殖的抑制程度。

2.5 Wortmannin 对照射后 NFS-60 细胞增殖的影响

PI3 激酶通路可能不参与 G-CSF 的受体信号转导,但在细胞辐射损伤中可有 PI3 激酶家族蛋白如 DNA 依赖性蛋白激酶的活化,其作用是增强细胞的辐射耐性 [11]。Wortmannin 是 PI3 激酶家族蛋白的特异性抑制剂 [12]。图 5 显示不同浓度的 Wortmannin 与 NFS-60 细胞作用后细胞增殖的状况。从图 5 看出, Wortmannin 对照射及未照射细胞的增殖仅表现抑制作用,起始抑制浓度为 $11.1 \mu\text{mol/L}$,当 Wortmannin 的浓度为 $11.1 \sim 33.3 \mu\text{mol/L}$ 时, 3Gy 照射细胞的增殖指数比同浓度未照射细胞低 10% 左右,表明 Wortmannin 对照射细胞的抑制作用

略强。

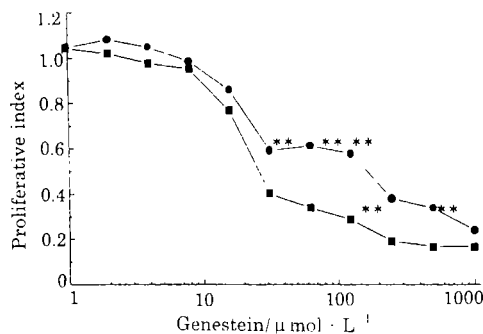


Fig.3 Effects of genestein on the growth of irradiated NFS-60 cells

□ Unirradiated cells, ● 3Gy irradiated cells,
Compared with unirradiated cells: * $p < 0.05$;
** $p < 0.01$

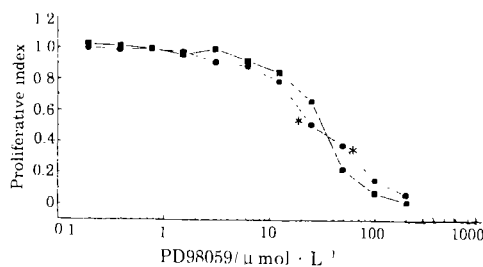


Fig.4 Effects of PD98059 on the growth of irradiated NFS-60 cells

□ Unirradiated cells, ● 3Gy irradiated cells,
Compared with unirradiated cells: * $p < 0.05$

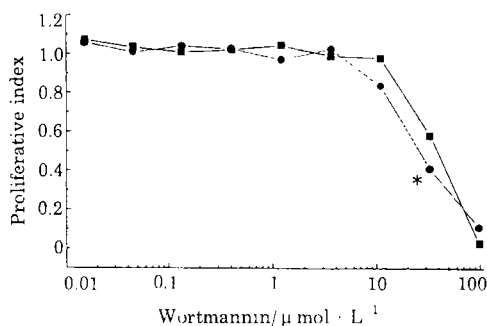


Fig. 5 Effects of wortmannin on the growth of irradiated NFS-60 cells

□ Unirradiated cells, ● 3Gy irradiated cells, Compared with unirradiated cells: * $p < 0.05$

3 讨 论

G-CSF 受体信号转导是 NFS-60 细胞增殖的基础。文献揭示 G-CSF 受体信号转导的基本过程是: G-CSF 与受体结合引起受体寡聚化, 激活 JAK2 激酶, 启动信号转导, 通过 JAK(Just Another Kinase)/STAT(Signal Transducer and Activation of Transduction) 及 Ras/Raf 两条通路把信息传递到胞核内, 诱导相关基因表达, 调节细胞的增殖和分化^[13]。现发现有两组蛋白质激酶及其磷酸酶参与信号转导的调控, 一组为蛋白质酪氨酸激酶及磷酸酶, 主要参与调控 JAK/STAT 通路和 Ras 的激活, 另一组为蛋白质丝苏氨酸激酶及磷酸酶, 是 Ras/Raf 的调控酶, 其中激酶使蛋白质磷酸化, 增强信号转导, 磷酸酶使蛋白质脱磷酸化, 下调信号转导^[3]。据此推测, 激酶抑制剂通过下调信号转导应抑制细胞增殖, 而磷酸酶抑制剂通过增强信号转导则可促进细胞增殖。我们的实验结果基本证实了这一推测, 并发现照射细胞和未照射细胞

在对某些抑制剂的反应上具有显著的差异：(1) 过钒酸钠对 3Gy 照射细胞的促增殖作用明显高于未照射细胞，其最大增殖指数可达未照射细胞的 1.6 倍以上。(2) 一定浓度的 Cantharidin 不能促进未照射细胞的增殖，但可显著提高 3Gy 照射细胞的增殖指数。(3) Genestein 对照射细胞的抑制作用较未照射细胞轻，而 PD98059 和 Wortmannin 在一定浓度下对照射细胞的抑制作用略重。说明辐射后细胞激酶磷酸酶自稳平衡可能失调，表现为磷酸酶负调控作用增强，激酶的正调控作用相对减弱，两者的交互作用可能下调受体信号转导，导致照射后细胞增殖抑制。因此，抑制蛋白质磷酸酶活性，增强受体信号转导，可促进照射后细胞增殖，而抑制蛋白质激酶活性下调信号转导，则有可能加重细胞的辐射损伤。在上述研究中发现，酪氨酸磷酸酶抑制剂过钒酸钠对受照 NFS-60 细胞的促增殖作用较强。随后的实验中也观察了过钒酸钠照射后不同时间给药 (0~96h) 对不同剂量照射 NFS-60 细胞 (1~5Gy) 的促增殖作用，结果发现：照射剂量越大，细胞增殖抑制越显著，过钒酸钠促增殖作用也越强；而随着照射后时间的延长和细胞增殖能力的恢复，过钒酸钠促增殖作用逐渐减弱 (结果未示出)。表明过钒酸钠的促增殖作用与照射后细胞的增殖抑制程度明显相关，进一步提示抑制磷酸酶活性，增强受体信号转导可减轻造血细胞辐射损伤。NFS-60 细胞为造血因子依赖细胞株，在一定程度上可反映正常造血细胞的增殖特性，由此推测造血细胞辐射损伤时也可能存在造血因子受体信号转导的障碍。确切的实验依据正在研究中。

酪氨酸磷酸酶参与受体信号转导 JAK/STAT 和 RAS/RAF 两条通路的负调控，丝苏氨酸磷酸酶仅参与 RAS/RAF 的负调控，研究发现，酪氨酸磷酸酶抑制剂过钒酸钠的促增殖作用优于丝苏氨酸磷酸酶抑制剂 Cantharidin，间接证实了受体信号转导的降低与照射细胞的增殖抑制是相关的。Genestein 对照射细胞的抑制作用相对较轻，分析其原因可能与 Genestein 的抑制谱较广有关。据报道在某些细胞中酪氨酸激酶抑制剂可阻止辐射诱导的细胞凋亡^[14]，因此，Genestein 对照射细胞的作用是其抑制多种信号转导通路的综合效果。其确切机制仍有待于深入研究。

参 考 文 献

- 1 Cong Y W, Chen J P, Shao Y. Bull Acad Mil Med Sci (in Chinese), 1999, 23(2):119-123
- 2 Moutoussamy S, Kelly P A, Finidori J. Eur J Biochem, 1998, 255(1):1-11
- 3 Byon J C, Kenner K A, Kusari A B *et al.* J Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 216(1):1-20
- 4 Huyer G, Liu S, Kelly J *et al.* J Biol Chem, 1997, 272(2):843-850
- 5 Tapley P, Shevde N K, Schweitzer P A *et al.* Exp Hematol, 1997, 25(2):122-131
- 6 Laidley C W, Cohen E, Casida J E. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 280(3):1152-1158
- 7 Eldridge R, Casida J E. Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 130(1):95-100
- 8 Brown A, Jolly P, Wei H. Carcinogenesis, 1998, 19(6):991-997
- 9 Choi Y H, Zhang L, Lee W H *et al.* Int J Oncol, 1998, 13(2):391-396
- 10 Lazar D F, Wiese R J, Brady M J *et al.* J Biol Chem, 1995, 270(35):20801-20807
- 11 Hosoi Y, Miyachi H, Matsumoto Y *et al.* Int J Cancer, 1998, 78(5):642-647
- 12 Ui M, Okada T, Hazeki K *et al.* Trends Biochem Sci, 1995, 20(8):303-307
- 13 Avalos B R. Blood, 1996, 88(3):761-777

14 Uckun F M, Tuel-ahlgren L, Song C W *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(19):9005-9010

EFFECTS OF INHIBITORS OF SIGNALING MOLECULARS ON THE IRRADIATED NFS-60 CELLS

CONG Yuwen CHEN Jiapei ZHAO Weihong WU Lanjun

(*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*)

ABSTRACT In order to study the change of receptor signal transduction after irradiation and its relation with growth of irradiated hematopoietic cells, the effects of the inhibitors of protein-tyrosine kinase and phosphatase on irradiated and unirradiated NFS-60 cells were observed by using MTT method. It was showed that the proliferation of NFS-60 cells was promoted by phosphatase inhibitors and suppressed by kinase inhibitors. Compared with unirradiated cells, phosphatase inhibitors had stronger stimulating effects on irradiated NFS-60 cells with 3Gy irradiation, meanwhile some kinase inhibitors might repress the growth of irradiated cells relatively. It was suggested that the homostasis of kinase and phosphatase were out of balance in irradiated NFS-60 cells, which might be one of the reasons for growth repression of hematopoietic cells after irradiation.

KEYWORDS Signaling molecular inhibitors, Radiation injury, NFS-60 cells

CLC R818.71

Supported by the National Natural Science Foundation of China (39800032)