

## 蓝萼甲素诱导胶质瘤细胞凋亡及其上调 GEF-H1 的作用机制

费凡<sup>1</sup>, 蒋小岗<sup>1</sup>, 张健<sup>1</sup>, 郑龙太<sup>1</sup>, 镇学初<sup>1\*</sup>, 甘平<sup>2\*</sup>

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215021; 2. 泰州市第二人民医院, 江苏 泰州 225500)

**摘要:** 蓝萼香茶菜 [*Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) Hara] 是中国民间草药, 具有抗肿瘤活性。此研究的目的是探讨蓝萼甲素 (glaucocalyxin A, GLA), 一种从蓝萼香茶菜中分离纯化得到的二萜类化合物, 诱导胶质瘤细胞凋亡的作用及其机制。通过检测 C6 大鼠胶质瘤细胞的存活率及干扰核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和蛋白质免疫印迹 (Western blot) 技术以探究细胞凋亡的分子信号机制。当 GLA 存在时, C6 大鼠胶质瘤细胞的存活率明显降低, 鸟嘌呤核苷酸交换因子 H1 (guanine nucleotide-exchange factor, GEF-H1) 表达上调, 引起细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 蛋白磷酸化, 造成细胞凋亡。因此, GLA 诱导神经胶质细胞凋亡是通过激活 GEF-H1/ERK 途径。

**关键词:** 蓝萼甲素; 胶质瘤; 细胞凋亡; 鸟嘌呤核苷酸交换因子 H1; 细胞外调节蛋白激酶

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1825-09

## Mechanism of glaucocalyxin A that induces apoptosis of glioma cell and up-regulates GEF-H1

FEI Fan<sup>1</sup>, JIANG Xiao-gang<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, ZHENG Long-tai<sup>1</sup>, ZHEN Xue-chu<sup>1\*</sup>, GAN Ping<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215021, China;

2. Taizhou Second People's Hospital, Taizhou 225500, China)

**Abstract:** *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) Hara is a traditional Chinese medicine, and is known to have anti-tumor effects. This study aims to investigate the effect of glaucocalyxin A (GLA), a diterpenoids extracted from *Glaucocalyx Hara*, on apoptosis of glioma cells and its mechanism. This study investigated the molecular signaling mechanism of GLA-induced glioma cell apoptosis by analyzing survival rate of C6 rat glioma cells, cell morphology, colony formation ability, interference ribonucleic acid, polymerase chain reaction, and Western blot. The result showed that in the presence of GLA, the survival rate of C6 rat glioma cells decreased significantly, while the expression of guanine nucleotide-exchange factor-H1 was up-regulated, causing phosphorylation of extracellular regulated protein kinases proteins and apoptosis. Hence, the mechanism of GLA-induced glioma cell apoptosis was the GEF-H1/ERK pathway.

**Key words:** glaucocalyxin A; glioma; apoptosis; guanine nucleotide exchange factor-H1; extracellular regulated protein kinases

神经胶质瘤是最常见的中枢神经系统原发性的

脑部肿瘤。胶质母细胞瘤恶性度最高, 预后最差, 约占颅内肿瘤 40%~50%。目前临床常用的化疗药物均具有骨髓抑制、肺毒性和血液毒性等不良反应, 且易产生耐药性。迫切需要一种高效、低毒的化疗药物来改善胶质瘤的治疗现状。本文研究的蓝萼甲素 (GLA) 是从蓝萼香茶菜中提取出的二萜类化合物, 近年来

收稿日期: 2018-06-06; 修回日期: 2018-08-02.

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD).

\*通讯作者 Tel: 86-523-88117219, E-mail: ganping19860628@163.com;

Tel / Fax: 86-512-65880369, E-mail: zhenxuechu@suda.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0533

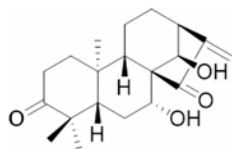
的药理研究显示其通过激活人凋亡相关因子配体和 C-Jun 氨基末端激酶 (C-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路诱导人类乳腺癌细胞凋亡<sup>[1]</sup>。GLA 能够诱导 HL-60 细胞凋亡<sup>[2]</sup>; 对宫颈鳞癌 SiHa 细胞株生长具有抑制作用<sup>[3]</sup>; 可诱导白血病细胞 K562 的细胞毒性及细胞周期阻滞<sup>[4]</sup>; GLA 可抑制 HepG2 细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[5]</sup>。关于胶质瘤方面, Xiao 等<sup>[6]</sup>报道 GLA 作为蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的负性调节剂诱导了胶质瘤细胞 U87MG 凋亡, 但其具体的作用靶蛋白还不清楚。本研究就蓝萼甲素对胶质瘤细胞的凋亡作用及机制进行深入的探讨, 以期为临床开发新的抗胶质瘤药物提供一定的依据。

## 材料与方 法

**主要仪器** 蛋白电泳仪和实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 离心机 (上海安亭仪器厂); 二氧化碳培养箱和酶标仪、核酸浓度测定仪 (美国 Thermo 公司); 流式细胞仪 (美国 R&D 公司); 倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

**药品与试剂** GLA 由苏州大学张健副教授研究组分离制备, 纯度 > 99%, 结构见图 1, <sup>1</sup>H NMR (Me<sub>2</sub>CO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 6.00 (1H, brs, H-17), 5.36 (1H, brs, H-17), 4.80 (1H, brs, H-14 $\alpha$ ), 4.19 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 3.01 (1H, brs, H-13 $\alpha$ ), 1.04 (3H, s), 1.09 (6H, s)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Me<sub>2</sub>CO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 38.6 (C-1), 34.1 (C-2), 216.7 (C-3), 47.1 (C-4), 51.6 (C-5), 31.4 (C-6), 73.8 (C-7), 61.4 (C-8), 53.7 (C-9), 39.3 (C-10), 18.6 (C-11), 30.6 (C-12), 46.8 (C-13), 75.3 (C-14), 206.2 (C-15), 149.5 (C-16), 116.6 (C-17), 27.6 (C-18), 21.1 (C-19), 18.4 (C-20)<sup>[7]</sup>。培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶、双抗 (美国 Gibco 公司); 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、 $\alpha$ -tubulin、GAPDH 抗体 (美国 Sigma 公司); 细胞色素 C (cytochrome C) 抗体 (美国 Epitomic 公司); cleaved caspase-3、cleaved PAR、phospho-p38、p38 MAPK、phospho-SAPK/JNK、SAPK/JNK、phospho-p42/44 MAPK、p42/44 MAPK 抗体 (美国 Cell Signaling 公司)。

**细胞培养** C6、U251、GL261、U87MG 和 T98G



**Figure 1** Chemical structure of glaucocalyxin A (GLA)

细胞培养于含 10% FBS 及 1% 双抗的完全培养基中, 置于 37 °C 恒温、恒湿和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞密度达到 75%~80% 可进行实验。

**MTT 检测** 细胞种于 96 孔板, 加入不同浓度的 GLA 及终浓度为 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡莫司汀 [1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea, BCNU] 阳性对照药。处理 24 h 后加入质量浓度为 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT, 每孔 30  $\mu\text{L}$ , 37 °C 孵育 2 h 后, 每孔加 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度。

**Hoechst 33258 染色** 将盖玻片置于 24 孔板内, 种入细胞使其生长密度约为 80%。GLA 处理 24 h 后, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 次, 加入冰甲醇 0.5 mL, 固定细胞 15 min。用 PBS 洗 3 次后, 加入 Hoechst 33258 染色液 (1:10 000) 0.5 mL, 37 °C 染色 15 min, 在荧光显微镜下观察。

**平板克隆** 将细胞种于 6 孔板中, 每个孔 500 个, 24 h 后用不同浓度的 GLA 处理细胞。置细胞培养箱中培养 14 天。加冰甲醇 2 mL, 固定细胞 15 min。然后弃固定液, PBS 洗 3 次, 加入 0.1% 结晶紫染色液 500  $\mu\text{L}$ , 30 min 后用水清洗 4 次, 空气干燥。在显微镜下统计细胞数, 大于 50 个细胞的记为 1 个克隆。计算克隆形成率。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。

**细胞周期检测** 细胞种于 6 孔板中, 每孔接种  $4\times 10^5$  个细胞, 加药处理后, 用胰酶消化, 1 100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3 min。用 PBS 洗 3 次, 加入 PBS 300  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 逐滴加入无水乙醇 700  $\mu\text{L}$ , 4 °C 固定 12 h。取出后室温放置 30 min, 1 100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3 min, 弃固定液, PBS 清洗 3 次, 用试剂盒中提供的缓冲液 500  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 加入 RNA 酶, 使其终质量浓度为 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 37 °C 孵育 30 min, PI 染色 15 min, 采用流式细胞仪检测。

**Annexin V/propidium iodide (PI) 双染检测凋亡** 细胞种于 6 孔板, 每孔接种  $4\times 10^5$  个细胞, 加药处理后, 用胰酶消化, PBS 清洗细胞 2 次, 收集  $1\times 10^5$  个细胞。用试剂盒中的缓冲液 500  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 加入 Annexin V 和 PI 各 5  $\mu\text{L}$ , 避光反应 5 min, 采用流式细胞仪检测。

**线粒体膜电位检测** 细胞种于 6 孔板中, 每孔接种  $4\times 10^5$  个细胞, 加药处理后, 收集细胞, 用培养液 500  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 加入染色工作液 500  $\mu\text{L}$ , 细胞培养箱中孵育 20 min。孵育结束后, 1 000  $\times$ , 4 °C 离心 5 min, 用染色缓冲液洗 2 次。再加入适量染色缓冲液重悬细胞, 用流式细胞仪进行分析。

**Western blot** 细胞以合适的密度接种于6孔板, 经处理后, 收集细胞。每个样品中加入适量的裂解液, 置于冰上裂解后 15 min, 震荡数秒, 再裂解 5 min, 4 °C, 12 500  $r\ddot{v}min^{-1}$  离心 15 min, 收集上清液, 测定蛋白浓度。制备分离胶和浓缩胶后, 蛋白上样进行凝胶电泳。采用 250 mA 恒流将蛋白从凝胶转移至聚偏二氟乙烯膜, 待转膜结束后, 采用 7% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入二抗室温孵育 1 h, 洗膜 5 次, 加入显影液, 室温孵育 1 min 显影。

**稳定同位素标记 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)** 定量蛋白组学两组细胞同时培养, A 组培养基含有  $^{12}C$ , B 组含有  $^{13}C$ 。待  $^{12}C$ 、 $^{13}C$  完全掺入到蛋白中后, 加药处理 24 h, 提取蛋白。然后上样, 跑胶, 结束后凝胶进行银染、漂洗和脱色处理。将最后的样品放入冷冻干燥机干燥后用适量 0.1% 三氟乙酸溶解, 采用质谱仪检测。得到的数据用 Sequest 及 Gene Ontology 软件进行分析<sup>[8]</sup>。

**统计学方法** 采用 SPSS 17.0 软件对实验结果进行统计分析, 制作图表。所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较用 one-way ANOVA 检验, post hoc analysis 后期分析采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 结果

### 1 GLA 对胶质瘤细胞活力的影响

为了研究蓝萼香茶菜中提取的二萜类化合物 GLA 的抗胶质瘤作用, 检测了不同浓度 GLA 对 5 株不同来源的胶质瘤细胞活力的影响。5 株胶质瘤细胞分别为大鼠胶质瘤细胞 C6、小鼠胶质瘤细胞 GL261、人胶质瘤细胞 U251、U87MG 和 T98G 细胞。除 T98G

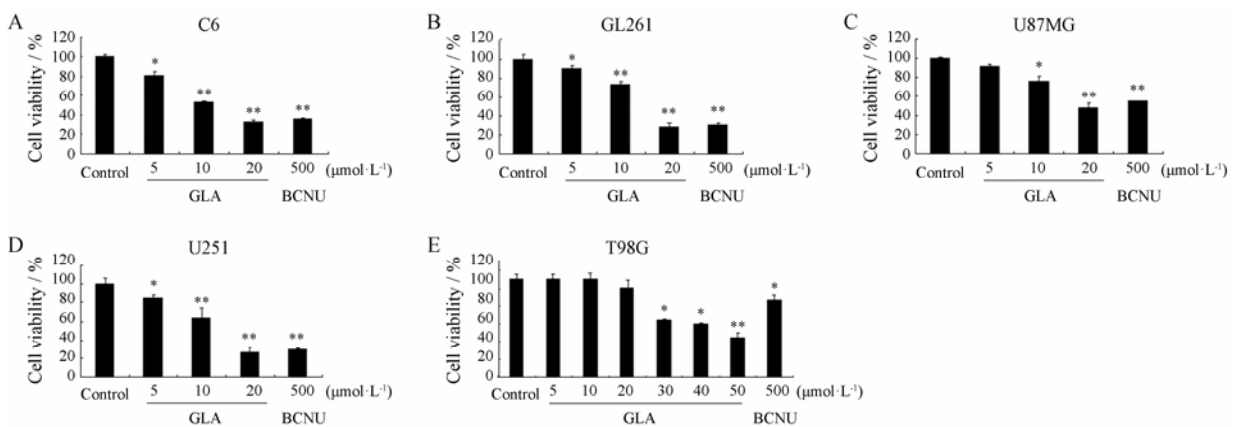
细胞外, 其余 4 株细胞分别用 5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GLA 处理。T98G 细胞最高浓度为 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 2)。结果表明, GLA 显著抑制 5 株胶质瘤细胞的细胞活力且呈剂量依赖性, 对 C6 细胞、GL261 细胞、U251 细胞、U87MG 细胞和 T98G 细胞的  $IC_{50}$  值分别为  $15.03 \pm 1.44$ 、 $14.14 \pm 1.35$ 、 $12.42 \pm 0.68$ 、 $18.49 \pm 1.36$  和  $44.32 \pm 1.92 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2 GLA 诱导 C6 细胞凋亡

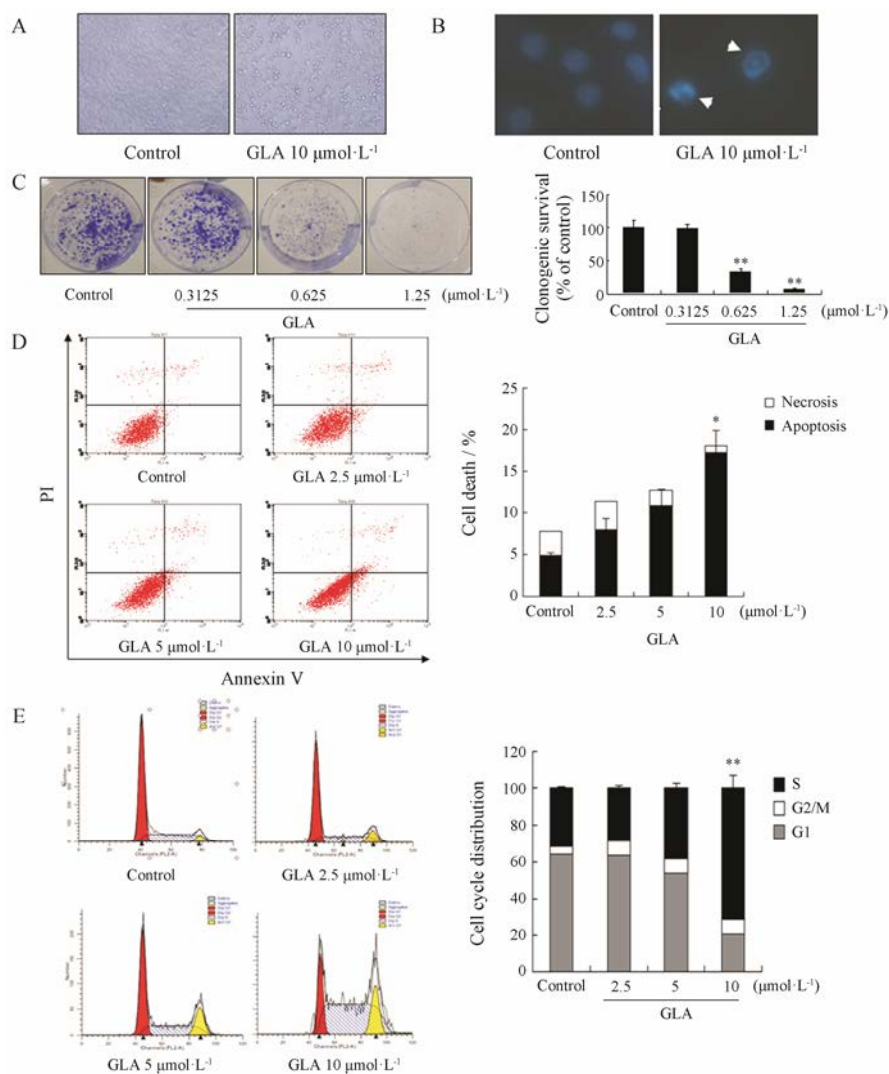
细胞死亡包括凋亡、坏死及自噬, 为了探究 GLA 引起的细胞死亡是否通过凋亡途径, 首先从细胞形态进行观察。图 3A 的结果显示, 用 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GLA 处理 C6 细胞 24 h 后, 显微镜下可明显观察到细胞变圆, 从培养皿上脱落。Hoechst 染色呈典型的凋亡现象, 细胞核呈致密浓染或半月形凝聚 (图 3B)。平板克隆实验结果显示, 在较低浓度 0.625  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, GLA 能有效地抑制 C6 细胞集落的形成; 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GLA 能够使 C6 细胞形成的集落数寥寥无几 (图 3C)。GLA 诱导 C6 细胞凋亡呈剂量依赖性 (图 3D)。细胞周期的结果显示, GLA 主要阻滞了细胞周期的 G2/M 期 (图 3E)。

### 3 GLA 通过线粒体途径诱导 C6 细胞凋亡

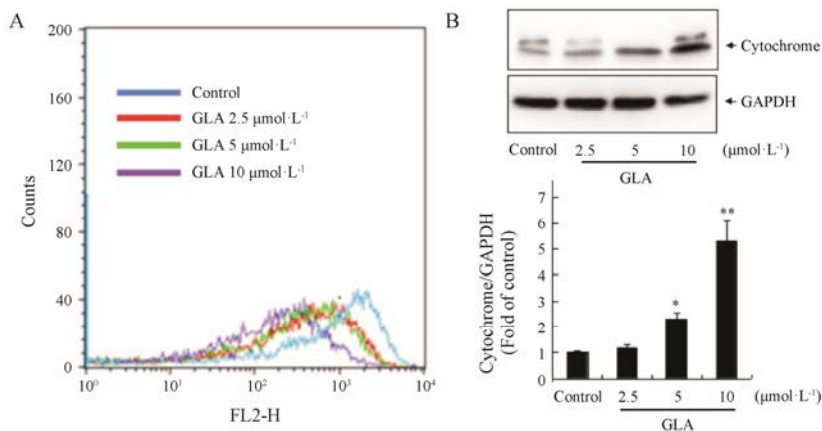
线粒体途径是细胞发生凋亡的内源性途径, 为了进一步确定 GLA 引起的 C6 细胞死亡是通过凋亡, 需要检测 GLA 对 C6 细胞线粒体途径的影响, 图 4A 的结果表明, GLA 剂量依赖性地降低了 C6 细胞的线粒体膜电位。线粒体膜电位降低后会引引起线粒体膜通透性的改变, 使得线粒体中 cytochrome C 释放到细胞浆中。GLA 处理细胞后, 分离细胞浆蛋白, 检测 cytochrome C 的表达量, 发现释放入胞浆的 cytochrome C 明显增多 (图 4B)。



**Figure 2** GLA inhibits glioma cell viability. C6 (A), GL261 (B), U87MG (C), U251 (D) and T98G cells (E) were treated with the indicated concentrations of GLA for 24 h, cell viability was determined by MTT assay. BCNU: 1,3- bis (2-Chloroethyl)-1-nitrosourea.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control



**Figure 3** GLA induced apoptosis in C6 cells. Cells were incubated with or without the indicated concentrations of GLA for 24 h. A: Cell morphology was observed using an invert microscope; B: Chromatin condensation (white arrow) was measured by Hoechst 33258 stain and observed under a fluorescent microscope; C: Colony formation assay was measured by crystal violet stain and observed under an invert microscope; D: Cell apoptosis was measured by Annexin V and propidium iodide (PI) stain and then detected by flow cytometry; E: Cell cycle was measured by propidium iodide stain and monitored by flow cytometry.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control



**Figure 4** GLA induced glioma cell apoptosis through mitochondrial pathway. A: Cell were collected after the drug treatment for 24 h, stained with JC-1 and then detected by flow cytometry; B: Cytoplasmic protein lysates were obtained 24 h after the drug treatments were subjected to Western blot to assess the levels of cytochrome C. Detection of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was done to confirm the equal loading of the samples. The values were expressed as a percentage of control band intensity, which was set to 100%.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control

#### 4 GLA 引起 GEF-H1 蛋白上调

采用蛋白质组学的方法检测 GLA 作用后发生改变的细胞凋亡相关蛋白。其中 GEF-H1 上调十分明显, 上调倍数高达 73 倍, 见图 5A。PCR 的结果显示, GLA 能够剂量依赖性地增加 C6 细胞中 GEF-H1 的 mRNA 水平 (图 5B)。当使用 GEF-H1 的 siRNA 将细胞中的 GEF-H1 沉默 58.68% 后 (图 5C), 能够明显减少 GLA 引起的 C6 细胞存活率下降 (图 5D)。

#### 5 GLA 诱导 MAPK 家族蛋白激活

GEF-H1 能够正性调控 MAPK 家族蛋白的表达而诱导细胞凋亡, 检测 GLA 对 MAPK 家族蛋白的影响, 见图 6A。首先检测了 15、30 min 和 1、2、4 h 时间点, 发现在加入 GLA (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 15 min 时就能够明显激活 MAPK 家族蛋白的表达, p-ERK、p-JNK 和 p-p38 的表达明显增加, 且在 2 h 时达到峰值, 所以后续实验选择 2 h 对 C6 细胞进行剂量依赖性的检测。结果显示, GLA 引起 MAPK 家族 3 个蛋白的磷酸化水平存在剂量依赖性, 图 6B 结果表明 GLA 诱导 C6 细胞凋亡可能是通过 MAPK 途径来实现的。

#### 6 抑制 ERK 激活可阻断 GLA 诱导神经胶质瘤细胞凋亡

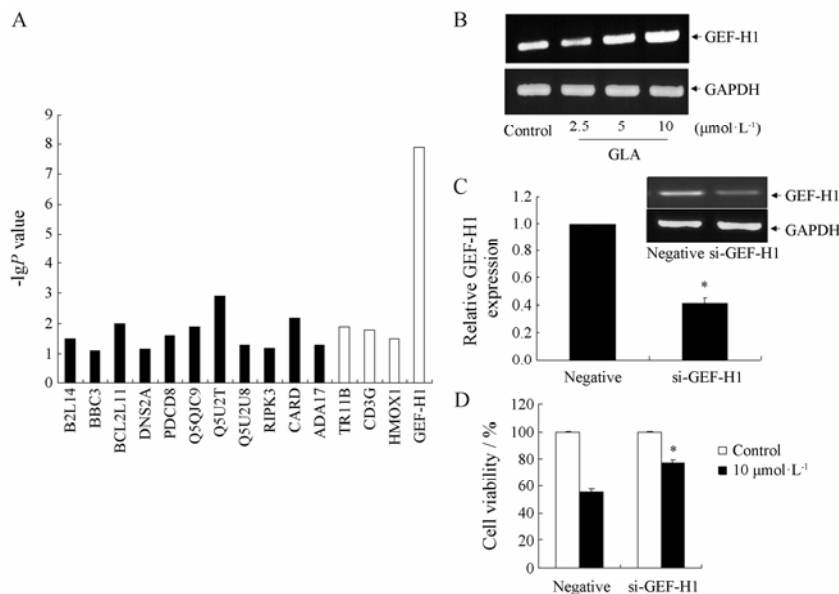
为了进一步研究 MAPK 在 GLA 诱导 C6 细胞凋亡中的作用, 采用了 p38 的抑制剂 SB203580 (10

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、ERK 的抑制剂 U0126 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及 JNK 的抑制剂 SP600125 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对细胞进行预处理 30 min, 再加入 GLA 处理 2 h 后, 检测两个凋亡相关蛋白的表达。结果显示, ERK 的抑制剂 U0126 能显著抑制 GLA 引起的 caspase 3 的活化及 PARP 的剪切 (图 7A)。图 7B 的结果进一步证明 ERK 的抑制剂 U0126 能够缓解 GLA 诱导的 C6 细胞的凋亡。这些结果表明 ERK 激活在 GLA 诱导细胞凋亡中起到重要作用。

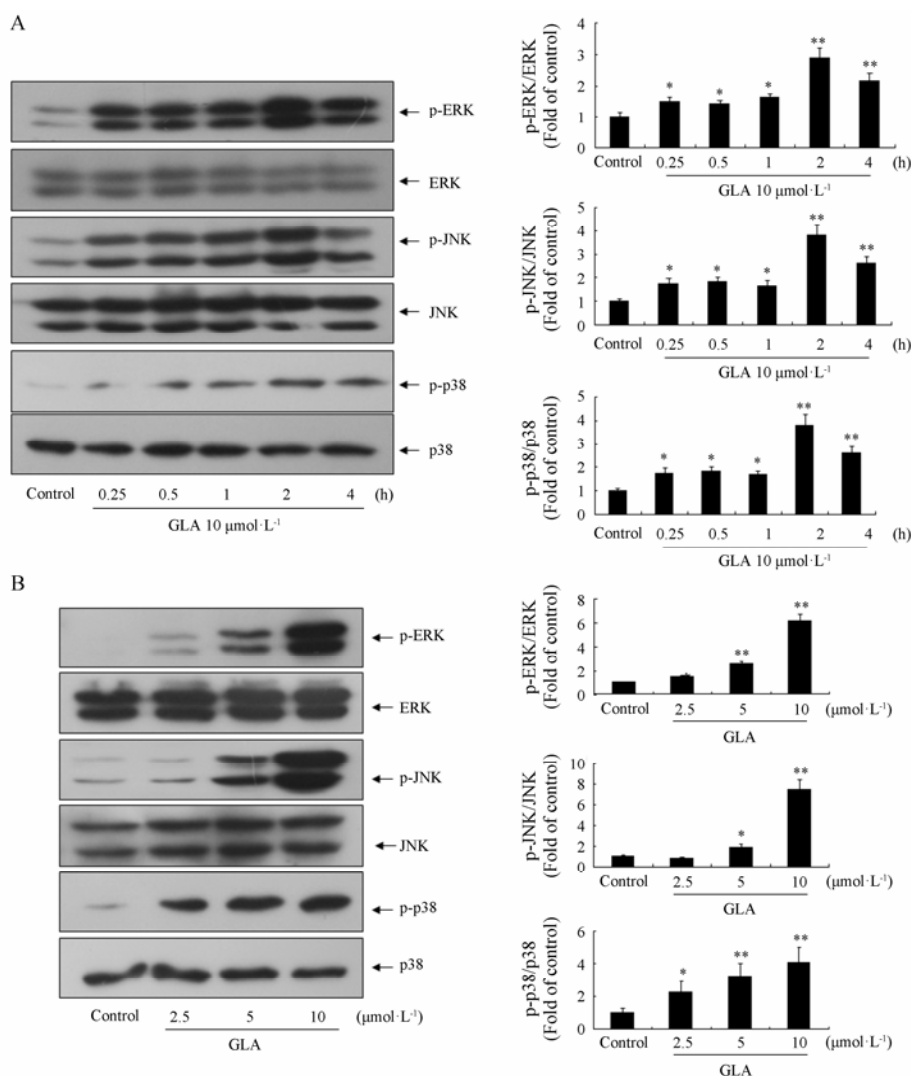
#### 讨论

蓝萼香茶菜中的总二萜有抗菌、抗肿瘤等作用, GLA 为对映贝壳杉烯类二萜, 其中  $\alpha,\beta$ -不饱和酮是抗胶质瘤作用的活性基团。U87MG 细胞为 *PTEN* 基因发生突变的细胞株, T98G 细胞为 *p53* 基因发生突变的细胞株, U251 为 *PTEN* 基因和 *p53* 基因双突变的细胞株。GLA 对 C6、GL261、U251、U87MG 和 T98G 细胞的细胞活力都产生影响并呈剂量依赖性, 说明 GLA 对胶质瘤细胞的杀伤作用不依赖于 *PTEN* 基因和 *p53* 基因。采用 C6 细胞进行平板克隆实验发现, 0.625  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GLA 能抑制细胞克隆的形成, 说明在低浓度时 GLA 就能抑制细胞的生长。

Gao 等<sup>[2]</sup>发现 GLA 可以诱导 HL-60 细胞凋亡, 凋亡细胞百分率从 7.80% (0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 上升到 40.60%



**Figure 5** Proteomic analysis of C6 glioma cells after GLA treatment. The protein abundances were obtained by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). GO classification of the proteins whose abundances changed. The analysis includes all the proteins that were significantly affected by GLA. A: GO enrichment of up-regulated proteins (blank bar) and down-regulated proteins (black bar) involved in cell apoptosis; B: Effect of GLA on GEF-H1 mRNA of C6 cell; C: Effect of siGEF-H1 on GEF-H1 mRNA of C6 cell; D: Effect of siGEF-H1 on cell viability induced by GLA. \* $P < 0.05$  vs negative



**Figure 6** Effects of GLA on MAPK pathway. A: Western blot analysis result of C6 cell processed with 10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA after indicated time. B: Western blot analysis result of C6 cell processed with GLA in various dose. Quantification of these protein levels was performed by densitometric analysis. Detection of ERK, JNK, p38 was done to confirm the equal loading of the samples. n=3,  $\bar{x} \pm s$ . \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control

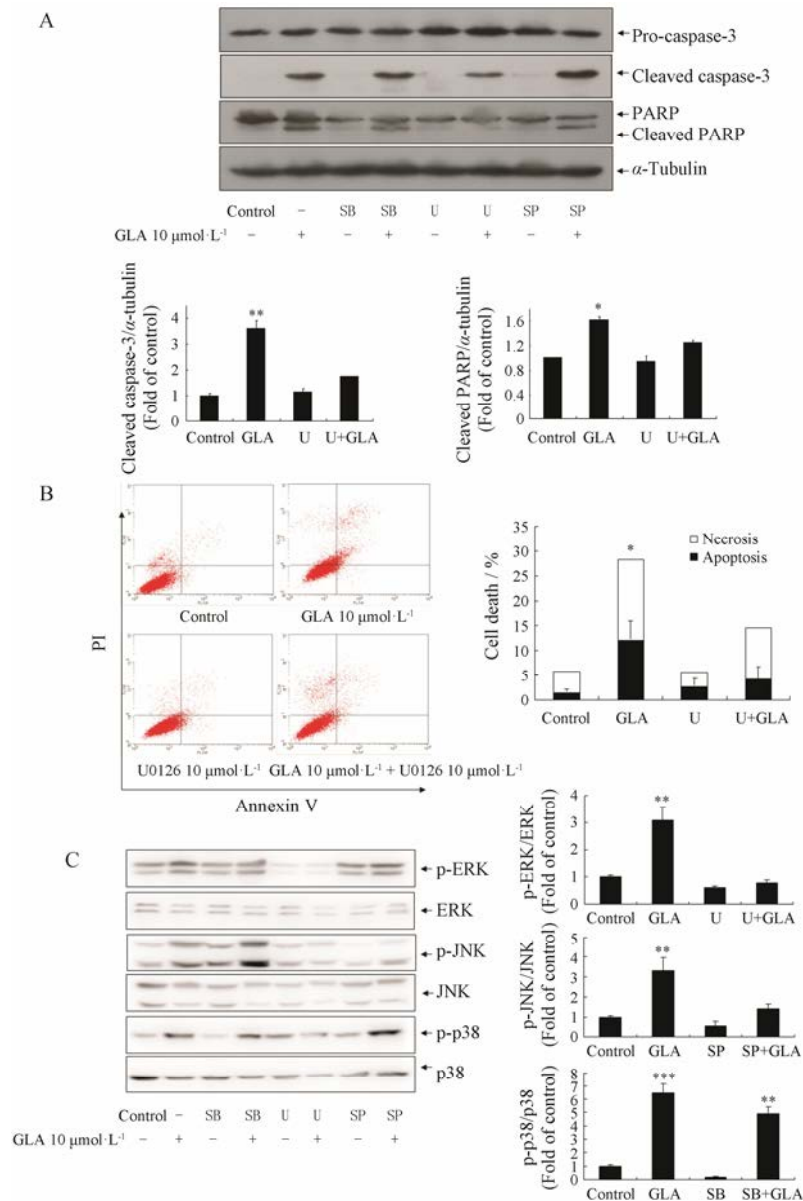
(10 μg·mL<sup>-1</sup>)。本实验通过 Hoechst 染色进行初步的判断, 观察到染色质的浓缩。Annexin-V 与 PI 双染检测发现, 随着 GLA 剂量的增加, 无论是早期凋亡还是晚期凋亡数目都有增加, 基本确定了 GLA 能够诱导 C6 凋亡。细胞周期实验发现, 经过 10 μmol·L<sup>-1</sup> GLA 处理的 C6 细胞与正常细胞相比, G2/M 期的数量由 31.62% 增加至 71.32%, 这与文献<sup>[2]</sup>报道结果一致。

细胞凋亡必然经过线粒体途径, 会出现线粒体膜电位的降低, 进而导致线粒体膜通透性的改变, 细胞色素 C 从线粒体释放到细胞浆中, caspase-3 的激活进而切割下游底物如 PARP, 最后执行凋亡。所以, 本实验中检测了线粒体膜电位的改变、细胞色素 C 的释放及 caspase-3 的激活, 其结果证明了 GLA 使得线粒体膜电位降低, 细胞色素 C 释放到胞浆, caspase-3 活

化并剪切 PARP。Xiao 等<sup>[6]</sup>研究中, GLA 作用 U87MG 细胞 6 h 时, 就能够检测到活化的 caspase-3, 本实验用 GLA 作用 C6 细胞 24 h, 发现 caspase-3 活化十分明显。Gao 等<sup>[2]</sup>研究中发现 GLA 处理 HL-60 细胞 24 h, 线粒体膜电位降低, 与本实验相符。

Xiao 等<sup>[6]</sup>研究显示 GLA 是通过抑制 Akt 的磷酸化来诱导 U87MG 细胞实现凋亡的, 而本实验用 SILAC 蛋白组学方法得出的结果显示 GEF-H1 蛋白上调最为明显, 也证明了 GLA 能够引起 C6 细胞中 GEF-H1 的 mRNA 水平的升高。当使用 GEF-H1 的 siRNA 将细胞中的 GEF-H1 沉默后, 能够明显减少 GLA 引起的 C6 细胞的存活率下降, 说明 GEF-H1 可能是其中关键蛋白。

GEF-H1 与 Rho 家族蛋白中 RhoA、RhoB、RhoC



**Figure 7** GLA induced C6 cell apoptosis was mediated through ERK activation. A: Protein extracts were prepared and subjected to Western blot assay using antibody against cleaved caspase-3, cleaved PARP. Protein levels of  $\alpha$ -tubulin were also measured as controls; B: The apoptotic status was determined by Annexin V-FITC binding assay; C: Protein extracts were prepared and subjected to Western blot assay using antibody against p-ERK, p-JNK, p-p38. Protein levels of ERK, JNK, p38 were also measured as controls. SB: SB203580; U: U0126; SP: SP600125.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control

和 Rac 都有结合活性, 但是对 RhoA 的结合活性最好<sup>[9]</sup>。GEF-H1 作为 RhoA 特定的活化剂, 在细胞的凋亡中起到了关键作用<sup>[10, 11]</sup>。Gawlak 等<sup>[12]</sup>发现在人肺上皮细胞发生病理环状拉伸时涉及到 GEF-H1 的活性增强, 使 Rho 的活化及 ERK 的磷酸化。Li 等<sup>[13]</sup>研究也显示 RhoA/ROCK1 信号通路在亚硒酸钠诱导的白血病细胞凋亡的命运中起到重要作用, 并且调节了 ERK1/2 与 MEK-ERK 之间的相互作用。Cullis 等<sup>[14]</sup>发现 GEF-H1 对 RAS/MAPK 通路起到正反馈作用, GEF-H1 作为 MAPK 信号的放大器对胰腺肿瘤异

种植瘤的生长和存活十分重要。这些研究都显示了 GEF-H1 与 MAPK 通路有关, 作者推测 MAPK 家族是否就是 GEF-H1 激活 Rho 后下游的效应器, 所以检测了 GLA 对 MAPK 家族 3 个蛋白的影响。结果显示, ERK、JNK 和 p38 在 GLA 处理 15 min 时就发生了磷酸化, 且随着 GLA 剂量的增加, 磷酸化程度也增加。

Kim 等<sup>[15]</sup>研究显示, ERK 的激活参与了 kaempferol 诱导 MCF-7 凋亡, 用 ERK 的抑制剂 PD9805 及 siRNA 沉默 ERK 后能够减轻 kaempferol 引起的 MCF-7 凋亡。而 Jeong 等<sup>[16]</sup>研究显示, kaempferol 引起人胶质

瘤 A172 细胞凋亡是通过降低 ERK 和 Akt 的表达, 增加 ROS 实现的。ERK 的抑制剂 U0126 和 Akt 的抑制剂 LY984002 或过表达 ERK、Akt 都能够增加 kaempferol 诱导的细胞凋亡。同一种化合物在不同的细胞中 ERK 发挥了相反的作用。关于 ERK 在细胞信号通路中的作用, 有研究认为 ERK 与细胞增殖相关, 而越来越多的证据显示 ERK 也涉及了细胞凋亡途径。如: 淫羊藿素通过 ERK 信号通路诱导人前列腺平滑肌细胞生长抑制以及诱导其凋亡, 此作用可被 ERK 的抑制剂 PD98059 所阻断<sup>[17]</sup>。Li 等<sup>[18]</sup>研究表明, 活化 RAF/MEK/ERK 信号传导通路在钙诱导的上皮细胞凋亡中发挥关键作用。Shen 等<sup>[19]</sup>研究也证实持续活化的 ERK 参与  $\beta,\beta$ -dimethylacrylshikonin 对 SGC-7901 细胞生长抑制和凋亡, 并且 ERK 的抑制剂 U0126 能够缓解  $\beta,\beta$ -dimethylacrylshikonin 引起的细胞凋亡。对于 ERK 发挥着完全相反的作用, 其中具体机制还不明确, 而本实验显示, 利用 MAPK 3 个家族成员的抑制剂进行预处理再加入 GLA, 只有 ERK 的抑制剂能够减轻 GLA 诱导 C6 细胞的凋亡。本实验结果支持 ERK 途径参与 GLA 诱导的胶质瘤细胞凋亡。

至此, GLA 诱导胶质瘤细胞凋亡是通过 ERK 途径还是 Akt 途径? Kim 等<sup>[20]</sup>研究显示, GEF-H1 作为 MAPK 的支架蛋白, 当 MAPK 途径受到抑制时能够增强 PI3K-Akt 途径信号通路。这佐证了本研究与 Xiao 等<sup>[6]</sup>研究并不矛盾, GLA 在激活 MAPK 途径的时候, 同时抑制了 Akt 途径, 从而诱导胶质瘤细胞发生凋亡。因此, GLA 的抗胶质瘤作用值得进一步深入探讨, 为临床治疗胶质瘤提供一定的依据。

## References

- [1] Li M, Jiang XG, Gu ZL, et al. Glucocalyxin A activates FasL and induces apoptosis through activation of the JNK pathway in human breast cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14: 5805–5810.
- [2] Gao LW, Zhang J, Yang WH, et al. Glucocalyxin A induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through mitochondria-mediated death pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25: 51–63.
- [3] Xia W, Wang XZ, Jiang XG, et al. The inhibitory effect of glucocalyxin A on human cervical carcinoma SiHa cells [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2011, 27: 1035–1036.
- [4] Yang WH, Zhang J, Gao LW, et al. Preliminary investigation on glucocalyxin A-induced cytotoxicity in K562 cells [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formu (中国实验方剂学杂志)*, 2011, 17: 181–184.
- [5] Ying N, Xu CL, Zhang J, et al. The effects of glucocalyxin A in hepatic cancer HepG2 cell line [J]. *Strait Pharm J (海峡药理学)*, 2012, 24: 235–238.
- [6] Xiao X, Cao WD, Jiang XF, et al. Glucocalyxin A, a negative Akt regulator, specifically induces apoptosis in human brain glioblastoma U87MG cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45: 946–952.
- [7] Shen XD, Wang B, Liu CY, et al. Study on chemical constituents from *Rabdosia japonica* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2009, 40: 1883–1885.
- [8] Liu WH, Wang Y, Li SM, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of acquired herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 553–560.
- [9] Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM, et al. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 294–301.
- [10] Chang ZF, Lee HH. RhoA signaling in phorbol ester-induced apoptosis [J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13: 173–180.
- [11] Fujishiro SH, Tanimura S, Mure S, et al. ERK1/2 phosphorylate GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368: 162–167.
- [12] Gawlak G, Tian Y, O'Donnell III JJ, et al. Paxillin mediates stretch-induced Rho signaling and endothelial permeability via assembly of paxillin-p42/44MAPK-GEF-H1 complex [J]. *FASEB J*, 2014, 28: 3249–3260.
- [13] Li F, Jiang Q, Shi KJ, et al. RhoA modulates functional and physical interaction between ROCK1 and Erk1/2 in selenite-induced apoptosis of leukaemia cells [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e708.
- [14] Cullis J, Meiri D, Sandi MJ, et al. The RhoGEF GEF-H1 is required for oncogenic RAS signaling via KSR-1 [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25: 181–195.
- [15] Kim BW, Lee ER, Min HM, et al. Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 1080–1089.
- [16] Jeong JC, Kim MS, Kim TH, et al. Kaempferol induces cell death through ERK1/2 and Akt-dependent down-regulation of XIAP and surviving in human glioma cells [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34: 991–1001.

- [17] Chen MF, Qi L, Li Y, et al. Icaritin induces growth inhibition and apoptosis of human prostatic smooth muscle cells in an estrogen receptor-independent manner [J]. *Amino Acids*, 2010, 38: 1505–1513.
- [18] Li DW, Liu JP, Mao YW, et al. Calcium-activated RAF/MEK/ERK signaling pathway mediates p53-dependent apoptosis and is abrogated by alpha B-crystallin through inhibition of RAS activation [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 4437–4453.
- [19] Shen XJ, Wang HB, Ma XQ, et al.  $\beta,\beta$ -Dimethylacrylshikonin induces mitochondria dependent apoptosis through ERK pathway in human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e41773.
- [20] Kim JY, Welsh EA, Fang B, et al. Phosphoproteomics reveals MAPK inhibitors enhance MET- and EGFR-driven AKT signaling in KRAS-mutant lung cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14: 1019–1029.