

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.002

DUSP1 在药物诱导的肝癌细胞衰老中的表达变化 及其作用研究 *

徐英倩 杨兆娟 王博石 夏苏华 刘永忠[△]

(上海交通大学医学院附属仁济医院 上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室 上海 200240)

摘要 目的:在肝癌的治疗中,化学疗法是重要的治疗手段,尤其在结合外科手术切除的联合治疗中,化疗被广泛的应用于临床。而体内试验证实,化疗药物诱导的细胞衰老在治疗肿瘤的过程中,普遍存在并发挥重要作用,我们着重探讨在药物诱导的人肝癌细胞衰老中,细胞内重要信号途径的变化,发现并利用对细胞衰老有重要意义的蛋白,增强化学治疗肿瘤的效果。在本课题中,我们利用化疗药物阿霉素(doxorubicin)和蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导的人衰老肝癌细胞模型,对 MAPK 信号途径的负调控因子 DUSP 家族的表达变化进行检测,筛选表达水平发生显著变化的双特异性磷酸酶(DUSP)家族成员,并初步探讨其在细胞衰老中的作用。**方法:**利用低剂量的阿霉素和蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导人肝癌细胞衰老;通过 Real time RT-PCR 和 Western blotting 检测 DUSP 家族基因 mRNA 和蛋白质水平的变化;利用 siRNA 干扰技术敲降 DUSP1,检测药物诱导肝癌细胞衰老水平的变化。**结果:**经低剂量的阿霉素和蛋白酶体抑制剂短时间处理后,人肝癌细胞系 Huh7 和 SMMC-7721 细胞发生明显的细胞衰老;在诱导的衰老细胞中,DUSP1mRNA 和蛋白质水平呈显著升高。在敲降 DUSP1 后,MG132 诱导的细胞衰老得到显著的缓解。**结论:**DUSP1 在药物诱导的人肝癌细胞衰老中具有重要的作用,为研究临床治疗中化疗药物引起肿瘤细胞衰老的具体机制带来启发。

关键词:DUSP1;肝癌;细胞衰老

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3206-06

Expression Patterns and Functional Analysis of DUSP1 in Drug-induced Cellular Senescence in Human Liver Cancer Cells *

XU Ying-qian, YANG Zhao-juan, WANG Bo-shi, XIA Su-hua, LIU Yong-zhong[△]

(State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji hospital, Shanghai Jiao Tong University school of medicine, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: Chemotherapy plays an important role and is widely used in clinical by combining with surgical operation excision in the treatment of HCC. Current research suggests that tumor cellular senescence that induced by Chemotherapy contributes to treatment outcome *in vivo*. Here, we focused on screening and detecting the changed signaling pathways in human senescent liver cancer cell induced by chemotherapy drug. In this study, we screened of the DUSP family members which are the cardinal negative regulators of MAPK with altered expression in doxorubicin-and MG132-induced senescence of human liver cancer cells. **Methods:** The chemotherapeutic drug doxorubicin and proteasome inhibitor MG132 were used for inducing senescence in human liver cancer cells. The expression levels of DUSP members in the senescent cells were measured by RT-PCR and Western blotting. The proportion of senescent cells was detected by SA- β -gal staining in the cells treated with or without the drug when DUSP1 was knocked down by siRNA. **Results:** Doxorubicin and MG132 robustly elicited senescence in human liver cancer cells. DUSP1 was significantly up-regulated in the senescent Huh7 and SMMC-7721 cells induced by doxorubicin and MG132. The inhibition of DUSP1 by siRNA was able to suppress MG132- but not doxorubicin-induced cellular senescence. **Conclusions:** DUSP1 was up-regulated mostly in 10 DUSP members in drug-induced cellular senescence. The DUSP1 expression has an important function in drug-induced senescence.

Key words: DUSP1; Liver cancer; Cellular senescence

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3206-06

前言

细胞衰老是维持机体稳态的一种重要的机制。细胞衰老是

指细胞不可逆转的生长阻滞,分为复制衰老(Replicative senescence)和提前衰老(Premature senescence)两种,后者通常是由于癌基因活化、抑癌基因失活、某些化学药物、物理因素作用引

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81201542)

作者简介:徐英倩,女,硕士研究生,主要从事基因 DUSP1 在肝癌细胞中的作用的研究,

电话:18817314164, E-mail:yingqian100200@163.com

[△] 通讯作者:刘永忠, E-mail: Liuyong52@yahoo.com

(收稿日期:2013-12-25 接受日期:2014-01-21)

起^[1]。现已知,诱导肿瘤细胞衰老是化疗药物和放射治疗肿瘤的重要机制^[2-4]。诱导细胞衰老的信号分子的机制研究及相关药物的开发,对于阐明肿瘤的发生机制和肿瘤治疗,均具有十分重要的意义。

DUSP 家族由 10 个主要的家族成员组成,它们对 MAPK 蛋白的磷酸化苏氨酸和酪氨酸去磷酸化,从而使 MAPK 失活^[5-6]。作为 DUSP 家族的第一个成员,DUSP1 的表达水平在多种癌症中都有显著的变化,许多研究表明 DUSP1 在肝癌的发生发展及其预后中有着重要的作用^[7-9]。在本课题中,我们在体外建立了化疗药物阿霉素和蛋白酶体 MG132 诱导的人肝癌细胞系 Huh7 和 SMMC-7721 的细胞衰老模型,并利用 real time RT-PCR 和 Western Blotting 筛选出在衰老细胞中变化最明显的 DUSP1。并利用 SiRNA 技术对其在药物诱导的细胞衰老中作用进行了初步探讨。我们的结果显示,在药物诱导肝癌细胞系 Huh7 和 SMMC-7721 衰老的过程中,DUSP1 的表达水平有显著的上调,而利用 siRNA 敲降掉 DUSP1 后,可缓解 MG132 引起的细胞衰老。

1 材料与方法

1.1 实验仪器和试剂

台式冷冻离心机(美国 Beckman counter);Real-time 7300 PCR 仪器(美国 Applied Biosystem 公司);微量移液器(法国 Glison 公司);ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);倒置显微镜(德国 Zeiss 公司);高速离心机(美国 Thermo 公司);酶标仪(美国 BIO-TEK 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);RNAiso Plus(中国 TaKaRa 公司);PrimeScript™ RT Reagent Kit(中国 TaKaRa 公司);SYBR Premix Ex Taq™ (中国 TaKaRa 公司);阿霉素

(D1515;美国 Sigma 公司);MG132(474790;美国 Millipore 公司);Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司);衰老检测试剂盒(C0602;中国碧云天公司);抗人 DUSP1(sc-1102;美国 Santa Cruz 公司);抗人 DUSP4(10739-1-AP;美国 Proteintech Group 公司);抗人 DUSP6(sc-8599;美国 Santa Cruz 公司);抗人 γ H2AX(2212-1;美国 Epitomics 公司);抗人 α -Tubulin(sc-69969;美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞培养及处理

肝癌细胞系 Huh7 和 SMMC-7721 用完全培养液(含 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素以及 100 μ g/mL HEPES 的 DMEM 培养液),置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.3 细胞衰老 β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)检测

SA- β -gal 染色根据产品说明书进行操作,具体步骤如下:(1)将 5×10⁴ 的待测细胞接种于 6 孔板中,过夜培养后,吸除培养板内的培养液,用 PBS 洗两遍。(2)加入 1 mL 染色固定液,室温固定 15 min。(3)除去固定液,加入 1 mL PBS,室温放置 3 min 后除去,重复 3 次。(4)吸出 PBS 后,加入 1 mL 染色混合液(其组成如下:染色液 C 930 μ L,X-gal 溶液 50 μ L,染色液 A 10 μ L,染色液 B 10 μ L),置于 37℃ 无 CO₂ 的培养箱中培养 12-16 h。(5)随机选取 5 个视野,对其中 SA- β -gal 染色阳性细胞的数目进行计数并求其平均数。

1.4 Real time-PCR 检测基因表达

培养的细胞中加入 RNAiso Plus,按照产品说明书提取总 RNA,并利用 PrimeScript™ RT Kit 反转录为 cDNA,以 cDNA 作为模板,检测样本中目的基因的变化。以 GAPDH 为内参照,以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 的值表示目的基因 mRNA 在不同样本中的相对表达量,所检测基因的引物序列参见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers (5'-3')

Name	Primer Sequences	
DUSP1	F:CCCTGAGTACTAGCGTCCCT	R:GGCCACCCTGATCGTAGAGT
DUSP2	F:TCCTGTCTACGACCAGGGTG	R:CAGGTCTGACGAGTGACTGC
DUSP4	F:TACGACGAGCGCAGCC	R:ATAGCCGCCTTTGAGCAGG
DUSP5	F:CCAGCTTATGACCAGGGTGG	R:CGAGGAACCTCGACTTGGAT
DUSP6	F:ACTGGAACGAGAATACGGGC	R:CTGAAGCCACCTTCCAGGTA
DUSP7	F:ACCTCCAAGGTGGTTTCAACA	R:GAAGAGCTGTCCACGTTGGT
DUSP8	F:CTGCCAAGTCATCGTCCACT	R:CTTCACGAACCTGTAGGCGT
DUSP9	F:AAGCAGATCCCCATCTCCGA	R:CTGGGACAAGGCCTCATCAAT
DUSP10	F:CGAGTGAATGGGGGCTGAAT	R:TCAAGAAGAACTCAAGACAGT
DUSP16	F:CAAGTCCGGGAGGCGAG	R:CTGAAAGCTTTTGGGGCCG
GAPDH	F:TCCTGTTTCAGAGTCAGCCGCA	R:ACCAGGCGCCCAATACGACCA

Note: F: Forward; R:Reverse.

1.5 免疫印迹

收集的细胞在冰上用裂解液裂解 1 h 后,在低温离心机中,4℃,12,000 rpm 离心 30 min,收集上清,按比例加入适量

SDS 上样缓冲液,99.9℃ 变性 5 min。得到的蛋白样品利用 SDS-PAGE 胶电泳,分离不同分子量的蛋白,并将膜上的蛋白转至硝酸纤维膜上,再经 5%牛血清白蛋白室温下封闭一小

时,在杂交一抗和相应二抗后,检测目的蛋白的表达。

1.6 MTT

将待测的肝癌细胞消化后,计数并按照每孔 1000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,培养过夜,测量细胞活性时,在培养液中加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液,在细胞培养箱中继续培养 3 h 后,去掉培养基,加入 150 μ L 的 DMSO 充分溶解后,放于酶标仪上于 540 nm 波长检查 OD 值。

1.7 siRNA 转染试验

将需要转染的肝癌细胞以一定的密度接种于 6 孔板中,培养过夜后,用脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 进行 siRNA 转染。其具体操作按照 LipofectamineTM 2000 产品说明书进行。siRNA-DUSP1 的正义链(5'→3'):GCCUUGAUCACGUCUCAGCCAAUU,反义链(5'→3'):AAUUGGCUGAGACGUUGAUC AAGGC。

1.8 统计学分析

计量资料以平均值 $\pm$ 标准差表示,实验获得数据采用 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) 软件进行统计分析。采用 Student's t-test 分析其统计学意义,统计分析概率 $P<0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 化疗药物阿霉素和蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导的肝癌细胞衰老模型的建立

为了研究 DUSP 家族基因在细胞衰老中的表达变化,我们利用低浓度的化疗药物阿霉素^[10]和蛋白酶抑制剂 MG132 来诱导肝癌细胞系 Huh7 和 SMMC-7721 细胞的衰老。阿霉素诱导衰老,将细胞在含 100 nM 阿霉素的培养液中培养 24 h,除去培养液,用 PBS 清洗两遍,再用完全培养液继续培养 24 h 后,发现经处理的肝癌细胞出现明显的衰老表型:细胞体积明显变大、变平, β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色呈阳性,其阳性细胞数占 80 %以上 ($P<0.001$)(如图 1A),同时,衰老细胞的标志物 γ H2AX 蛋白质水平明显升高(图 2B)。在 MG132 诱导细胞衰老时,将细胞在浓度为 10 μ M 的 MG132 培养液中培养 8 h,除去培养液,用 PBS 清洗两遍,再用完全培养液继续培养 2 天后,细胞开始出现衰老的表型,其中 β 半乳糖苷酶阳性细胞数占 60%以上 ($P<0.001$)(如图 1B)。以上结果表明,低剂量的阿霉素和 MG132 可诱导肝癌细胞发生衰老。

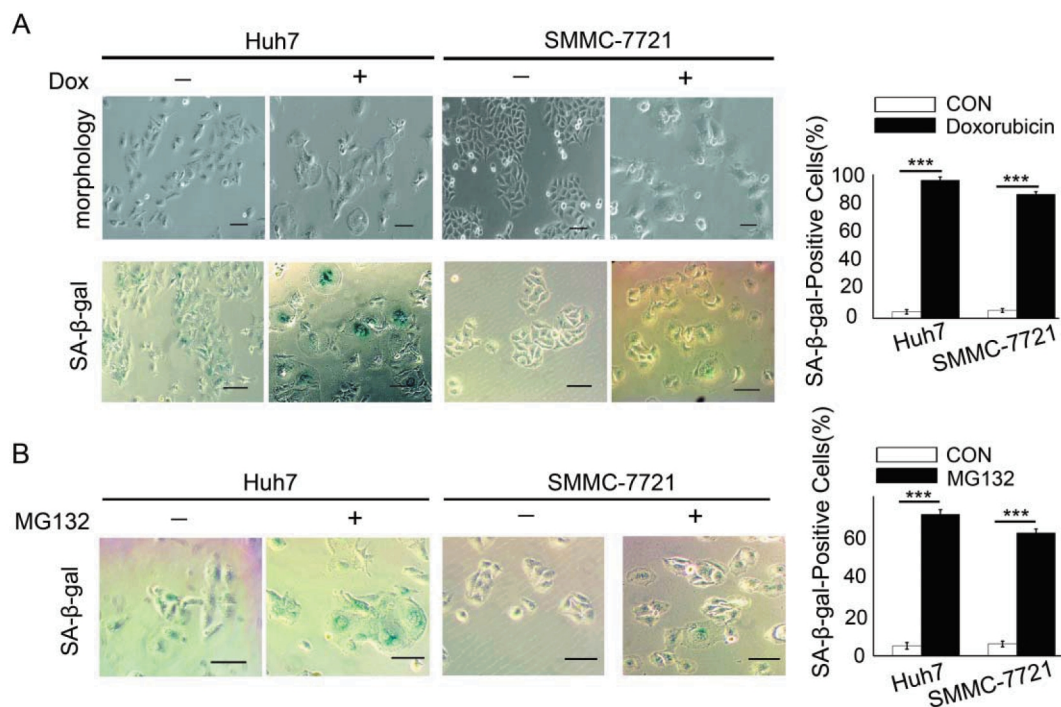


图 1 药物诱导的人肝癌细胞衰老模型

Fig. 1 Cellular senescence induced by chemotherapeutic drug doxorubicin and proteasome inhibitor MG132 in human liver cancer cells

(A) Huh7 and SMMC-7721 cells were treated with doxorubicin (100nM) for 24 h to induce cellular senescence. Cells were examined with SA- β -gal staining 3 days after doxorubicin treatment. Statistical plots of the percentage of SA- β -gal staining positive cells in the indicated groups were shown (right panel). Scale bars, 0.1 mm; Columns, means; bars, SD ($n=3$; *** $P<0.001$). (B) Huh7 and SMMC-7721 cells were treated with MG132 (10 μ M) for 8 h to induce cellular senescence. 3 days after MG132 treatment, cells were examined with SA- β -gal staining and the percentage of SA- β -gal-positive cells is presented in the histogram (right panel). Scale bars, 0.1 mm; Columns, means; bars, SD ($n=3$; *** $P<0.001$).

2.2 在药物诱导肝癌细胞衰老过程中 DUSP1 表达上调

利用药物诱导的细胞衰老模型,我们比较了衰老细胞和对照细胞中 DUSP 家族成员的表达水平。收集阿霉素处理的、具衰老表型的肝癌细胞 Huh7 和 SMMC-7721 及其对照细胞,提取总 RNA,利用 Real time RT-PCR 的方法检测 10 个 DUSP 家

族成员的 mRNA 丰度,结果显示,DUSP1、DUSP4 和 DUSP6 在细胞衰老过程中表达上调 ($P<0.001$)(如图 2A)。收集同样处理的细胞的蛋白并检测了上述三个 DUSP 蛋白的水平变化,发现 DUSP1 在蛋白水平上的表达变化最为明显,其中 γ H2AX 为细胞衰老的检测蛋白(如图 2B)。收集 MG132 处理的、具有

衰老表型的肝癌细胞及其对照细胞的蛋白并检测 DUSP1 蛋白的水平变化(如图 2C),结果同样显示 DUSP1 在药物诱导的衰老过程中显著升高。以上结果提示,DUSP1 的表达在衰老细胞中显著升高。

2.3 DUSP1 的敲低可一定程度地缓解药物引起的细胞衰老

为探讨 DUSP1 在药物诱导衰老过程中的作用,我们利用 siRNA 技术敲降细胞中的 DUSP1,再用药物诱导细胞发生衰老,观察敲降 DUSP1 的肝癌细胞和其对照组之间,细胞衰老比例和衰老相关的生长抑制率的变化。敲降 DUSP1 后,肝癌细胞系 Huh7 和 SMMC-7721 再用阿霉素处理,干扰组与其对照组

细胞相比,其 β 半乳糖苷酶阳性的细胞的数目并未有显著的变化(文章中未显示)。收集敲降掉 DUSP1,同时用阿霉素处理 3 天且出现衰老表型的细胞及对照细胞蛋白,检查 DUSP1 在各组中的表达水平(如图 3A),同时检测各组细胞在敲降掉 DUSP1 并加入阿霉素处理后 3 天内的细胞生长增殖水平($P < 0.05$)(如图 3B),结果显示敲降 DUSP1 可使衰老相关的细胞生长抑制有轻微水平的缓解。而在 MG132 诱导的肝癌细胞衰老过程中,敲降 DUSP1 后可以降低 MG132 引起的衰老细胞比例($P < 0.01$)(如图 3C 和 3D)。以上结果显示,DUSP1 在药物诱导的细胞衰老中,起促衰老的作用。

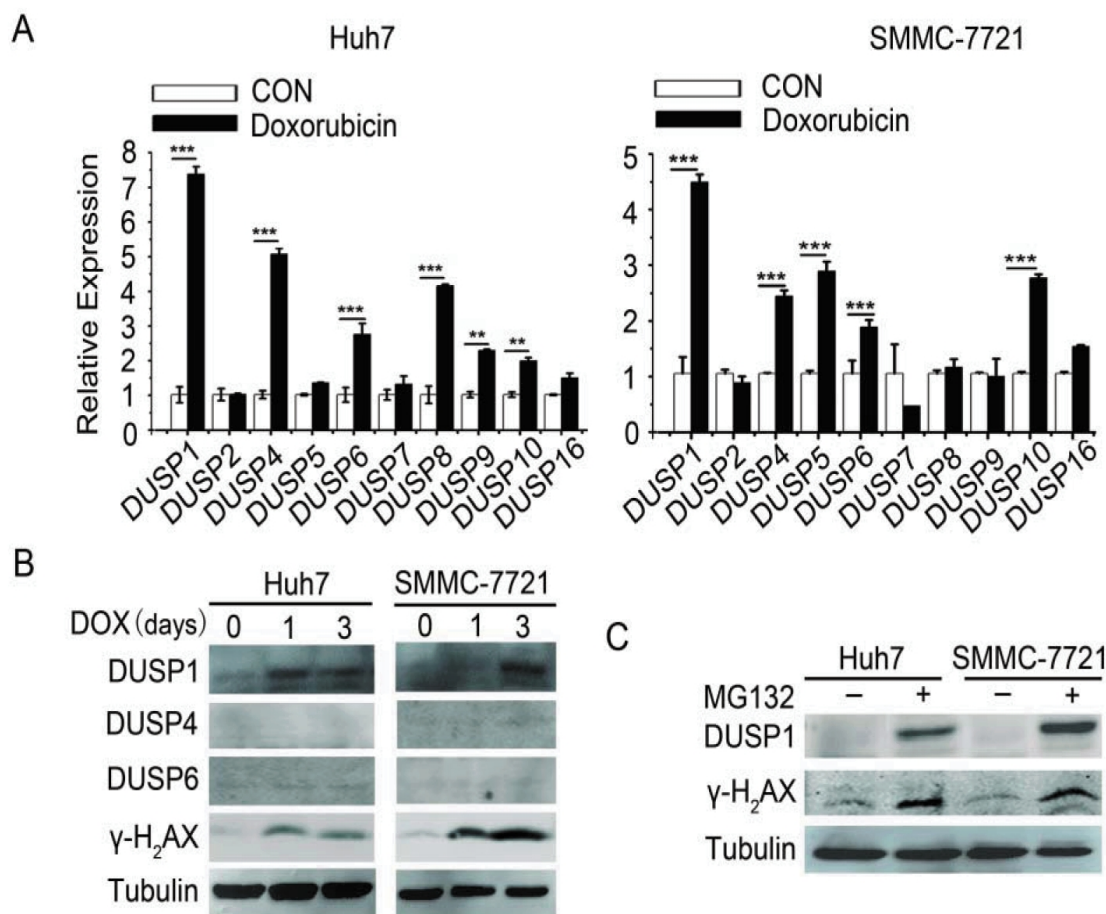


图 2 DUSP1 在药物诱导衰老过程中显著上调

Fig.2 DUSP1 upregulation in drug-induced senescence of liver cancer cells

(A) The mRNA levels of 10 DUSP family members were determined by real-time-RT-PCR in Huh7 and SMMC-7721 cells with or without doxorubicin treatment at day 3. Columns, means; bars, SD ($n = 3$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). (B) Huh7 and SMMC-7721 cells treated with or without doxorubicin were harvested at the indicated time points. The protein levels of DUSP1, DUSP4 and DUSP6 were analyzed by Western blotting. (C) Huh7 and SMMC-7721 cells were treated with MG132 (10 μ M) for 8 h, then washed and cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS for 2 days. Cells were harvested to measure the protein levels of DUSP1 by Western blotting. α -tubulin was used as a loading control.

3 讨论

化疗是肝癌治疗的重要手段,而化疗和外科手术切除的联合治疗,更可延长病人的生存期,甚至提高肝癌的治愈率^[11,12],小鼠体内研究结果和临床分析表明,在用化疗药物治疗肝癌的过程中,药物引起的细胞衰老作为抵抗肿瘤的重要方面^[13,14],广泛存在并且与病人的预后密切相关^[15]。细胞衰老是指不可逆的生长阻滞,诱导肿瘤细胞衰老疗法是一项越来越受到关注的治

疗方式,衰老的肿瘤细胞可通过活化免疫细胞而被清除,进而增加肿瘤的治疗效果。所以探讨肿瘤细胞衰老的发生机制对于治疗肿瘤有重要作用。

在本课题中,我们利用药物诱导的方法在体外建立人肝癌细胞衰老的模型^[10],从而对参与药物诱导肝癌细胞衰老过程中的重要蛋白和信号通路进行研究。根据研究表明,DUSP 家族不仅是 MAPK 信号途径主要的负调控因子,而且与 Notch、STAT 和 NF- κ B 等多条信号通路有广泛的相互作用^[16-18],它对

肿瘤的发生、侵袭转移以及预后都有重要的作用。作为 DUSP 家族中非常重要的一个成员, DUSP1 在肝癌中有重要的作用, 它的表达水平与肝癌病人的预后有重要联系^[7-9], 肝癌组织中 DUSP1 高表达的病人往往具有较好的预后, 在肝癌细胞系中,

DUSP1 的高表达可以抑制其生长, 并引起凋亡^[8], 这些结果提示, DUSP1 在肝癌中是抑制癌症发展的。

在我们的实验中发现, 在药物诱导衰老的人肝癌细胞中, DUSP1 的表达显著升高, 提示 DUSP1 可能与肝癌细胞的衰老

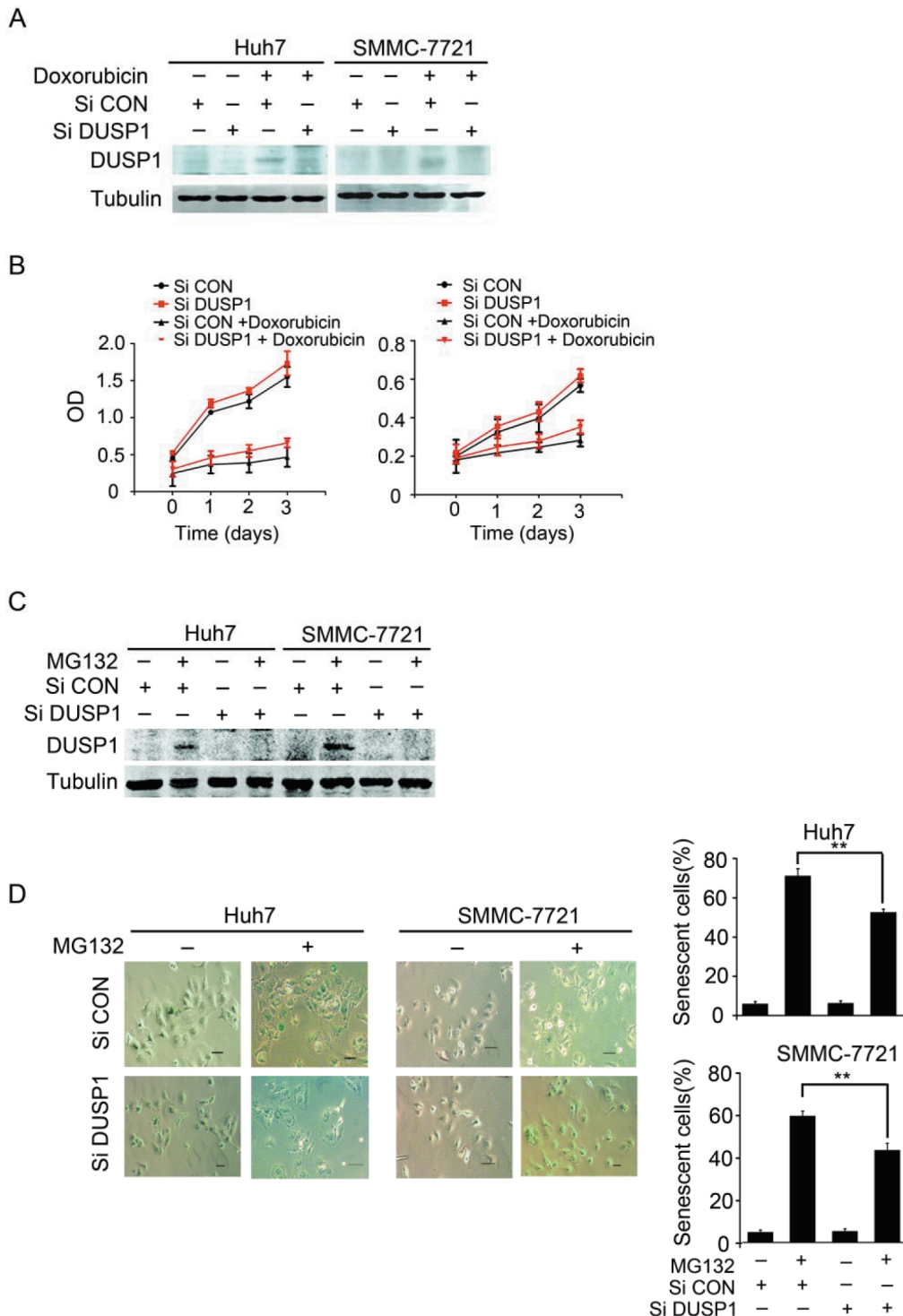


图3 敲除 DUSP1 可缓解药物诱导的衰老

Fig.3 Knock-down of DUSP1 resulted in a slight attenuation of drug-induced senescence in Huh7 and SMMC-7721 cells

(A-C) Cells were transfected with siRNA control (Si Con) or siRNA targeting DUSP1 (Si DUSP1). After 24 h of the transfection, these cells were treated with doxorubicin for 24 h or treated with 10 μ M MG132 for 8 h, then washed and cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS for rest time of the days. (A) The efficiency of DUSP1 specific siRNA was analyzed by Western blotting. (B) Cell proliferation of each group was evaluated by MTT assay after treatment of doxorubicin for the indicated days. (C) The cells treated with MG132 were harvested for the analysis of DUSP1 by Western blotting. α -tubulin was used as a loading control. (D) The cells from each group were examined with SA- β -gal staining. The percentage of SA- β -gal-positive cells is presented in the histogram (right panel). Scale bars, 0.1 mm; Columns, means; bars, SD (n = 3; ** P<0.01).

有关,因此,我们进一步采用 siRNA 干扰 DUSP1 的表达,发现敲降 DUSP1 使 MG132 诱导的细胞衰老得到缓解,其衰老标志物 β 半乳糖苷酶染色阳性的细胞比例下降了 20%以上,而阿霉素诱导的细胞衰老并未明显缓解,但是阿霉素处理引起的衰老相关的生长抑制得到了一定程度的缓解。这些结果提示 DUSP1 在药物诱导的肝癌细胞衰老过程中,起促进衰老的作用,它的表达升高对药物诱导细胞衰老的发生有重要的促进作用,这与文献中所报道的 DUSP1 在肝癌中是抑癌基因的作用是相一致的。但是关于 DUSP1 在肝癌中是通过和哪些信号途径相互作用来抑制肝癌的尚未阐明,据文献报道,在非小细胞性肺癌中,Notch 信号的抑制剂可通过升高 DUSP1 来抑制 MAPK 信号通路,进而抑制肿瘤的生长^[9]。这提示我们化疗药物诱导衰老的过程中,DUSP1 促进细胞衰老可能与 MAPK 信号途径有密切的关系。另有研究证明,DUSP1 是 p53 的靶标^[20],提示 DUSP1 在衰老过程中可能是作为 p53 的下游效应因子起作用的,所以,在 p53 相关的凋亡和衰老中,DUSP1 可能参与了重要的作用,这对 DUSP1 的调节和活化机制提供了重要的启示。

综上所述,我们的实验结果证实了在 MG132 诱导的人肝癌细胞衰老中,抑制掉 DUSP1 的表达可以缓解细胞衰老的发生,提示 DUSP1 在 MG132 诱导的人肝癌细胞衰老的发生过程中有重要的促进作用,那么,活化肝癌细胞内 DUSP1 的表达能否通过引起肝癌细胞的衰老来抑制肝癌的发展将是非常有意义的研究方向。通过化疗药物来诱导肿瘤细胞衰老虽然是抗肿瘤的重要手段,但是化疗药物对正常细胞强烈的杀伤性却带来严重的副作用,所以寻找特异针对肿瘤细胞的药物和方法变得越来越有吸引力。而诱导肿瘤细胞衰老疗法的使人们看到了希望,例如,小鼠实验中证实,在 p53 缺失的肿瘤中,可通过诱导 p53 的再次表达来引起肿瘤细胞衰老;在癌基因 MYC 活化引起的肿瘤中,通过 MYC 抑制而引起的肿瘤细胞衰老,同时,在以上的两个例子中均未引起正常细胞的损伤,却抑制了肿瘤的发展^[25,26]。

我们的实验结果提示,在人肝癌细胞中化疗药物诱导使在人肝癌细胞中表达极低的 DUSP1 升高,而其升高对细胞的衰老有重要的促进作用,所以我们在以后的实验中,验证 DUSP1 的高表达是否是人肝癌细胞发生衰老的诱导因素,并进一步研究对肝癌治疗的作用。

参考文献(References)

- [1] Collado M, Blasco M A, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging[J]. Cell, 2007, 130(2): 223-233
- [2] Ewald J A, Desotelle J A, Wilding G, et al. Therapy-induced senescence in cancer [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2010, 102(20): 1536-1546
- [3] Acosta J C, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy[J]. Trends in cell biology, 2012, 22(4): 211-219
- [4] Kang T W, Yevsa T, Woller N, et al. Senescence surveillance of premalignant hepatocytes limits liver cancer development[J]. Nature, 2011, 479(7374): 547-551
- [5] Bermudez O, Pagès G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2010, 299(2): C189-C202
- [6] Caunt C J, Keyse S M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs)[J]. FEBS Journal, 2013, 280(2): 489-504
- [7] Frau M, Simile M M, Tomasi M L, et al. An expression signature of phenotypic resistance to hepatocellular carcinoma identified by cross-species gene expression analysis [J]. Cellular Oncology, 2012, 35(3): 163-173
- [8] Calvisi D F, Pinna F, Meloni F, et al. Dual-Specificity Phosphatase 1 Ubiquitination in Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Control of Growth in Human Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancer research, 2008, 68(11): 4192-4200
- [9] Tsujita E, Taketomi A, Gion T, et al. Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Oncology, 2005, 69(4): 342-347
- [10] Spallarossa P, Altieri P, Aloï C, et al. Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2 [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297:H2169-2181
- [11] Scher H I, Fizazi K, Saad F, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy [J]. New England Journal of Medicine, 2012, 367(13): 1187-1197
- [12] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. New England Journal of Medicine, 2010, 362(25): 2380-2388
- [13] Acosta J C, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy[J]. Trends in cell biology, 2012, 22(4): 211-219
- [14] Schmitt C A, Fridman J S, Yang M, et al. A Senescence Program Controlled by p53 and p16^{sup} INK4a^{sup} Contributes to the Outcome of Cancer Therapy[J]. Cell, 2002, 109(3): 335-346
- [15] Nardella C, Clohessy J G, Alimonti A, et al. Pro-senescence therapy for cancer treatment[J]. Nature Reviews Cancer, 2011, 11(7): 503-511
- [16] Liu, D., Scafidi, J Prada, A. E, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299(4): 574-580
- [17] Maraver A, Fernandez-Marcos P J, Herranz D, et al. Therapeutic Effect of γ -Secretase Inhibition in *Kras*^{G12V}-Driven Non-Small Cell Lung Carcinoma by Derepression of DUSP1 and Inhibition of ERK[J]. Cancer cell, 2012, 22(2): 222-234
- [18] Gil-Araujo B, Toledo Lobo M V, Gutiérrez-Salmerón M, et al. Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF- κ B activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism[J]. Molecular oncology, 2014, 8(1): 27-38
- [19] Maraver A, Fernandez-Marcos P J, Herranz D, et al. Therapeutic Effect of γ -Secretase Inhibition in *Kras*^{G12V}-Driven Non-Small Cell Lung Carcinoma by Derepression of DUSP1 and Inhibition of ERK[J]. Cancer cell, 2012, 22(2): 222-234
- [20] Li M, Zhou J Y, Ge Y, et al. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(42): 41059-41068
- [21] Moncho-Amor V, Ibanez de Caceres I, Bandres E, DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2011, 30(6): 668-678

脂质过氧化,抑制细胞膜损伤,抑制细胞凋亡^[18]。SOD 在生物体内水平的高低是细胞凋亡和衰老的直观指标。丙二醛(MDA)是膜脂质过氧化的最重要的产物之一,通过测定 MDA 可以间接测定膜脂过氧化损伤程度^[19]。

本研究结果显示:黄芪甲苷可以有效保护缺氧复氧损伤的心肌细胞,提高细胞存活率,降低细胞凋亡率,升高 SOD 水平,同时降低 MDA 水平,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达并抑制 Caspase-3 促凋亡途径,且其保护效果呈浓度依赖性。因此我们得出:黄芪甲苷可通过增强 Bcl-2 的表达、抑制 Caspase-3 促凋亡途径、抑制氧化应激损伤、减轻心肌细胞在 IR/I 过程中的凋亡继而保护心肌组织。本研究为黄芪甲苷在治疗心肌缺血再灌注领域提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Hausenloy DJ, Boston-Griffiths E, Yellon DM. Cardioprotection during cardiac surgery [J]. Cardiovasc Res, 2012, 94(2): 253-265
- [2] Forman MB, Jackson EK. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357(23): 2408
- [3] Schwartz Longacre L, Kloner RA, Arai AE, et al. New horizons in cardioprotection: recommendations from the 2010 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop[J]. Circulation 2011, 124(10): 1172-1179
- [4] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3): 413-416
- [5] Li M, Qu YZ, Zhao ZW, et al. Astragaloside IV protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury correlating to suppression of neutrophils adhesion-related molecules [J]. Neurochemistry International, 2012, 60(5): 458-465
- [6] Chen X, Peng LH, Li N, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(3):721-727
- [7] Li ZP, Cao Q. Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(10):898-904
- [8] Wu X, Cao Y, Nie J, et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of Rheb1-mTORC1 Signaling Exerts Cardioprotection against Adverse Cardiac Remodeling in Mice [J]. The American Journal of Pathology, 2013, 182(6): 2005-2014
- [9] Zhang WD, Chen H, Zhang C, et al. Astragaloside IV from Astragalus membranaceus shows cardioprotection during myocardial ischemia in vivo and in vitro[J]. Planta Med, 2006, 72(1):4-8
- [10] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 2012, 148(3): 399-408
- [11] Mewton N, Bochaton T, Ovize M. Postconditioning the heart of ST-elevation myocardial infarction patients [J]. Circ J, 2013, 77(5): 1123-1130
- [12] Li M, Qu YZ, Zhao ZW, et al. Astragaloside IV protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury correlating to suppression of neutrophils adhesion-related molecules [J]. Neurochemistry International, 2012, 60(5): 458-465
- [13] Cheng MX, Chen ZZ, Cai YL, et al. Astragaloside IV Protects Against Ischemia Reperfusion in a Murine Model of Orthotopic Liver Transplantation[J]. Transplantation Proceedings, 2011, 43(5):1456-1461
- [14] Gui D, Huang J, Guo Y, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF-κB-mediated inflammatory genes expression [J]. Cytokine, 2013, 61(3): 970-977
- [15] Chen X, Peng LH, Li N, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 139(3):721-727
- [16] Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, et al. A Protective Molecule in the Cardiovascular System [J]. Nitric Oxide, 2013, pii: S1089-8603(13)00318-00312
- [17] Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(2): 275-282
- [18] Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(1): 16-23
- [19] Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria[J]. Circulation, 2008, 118(19):1915-1919
- [20] Srikant S, Franklin C C, Duke R C, et al. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis [J]. Molecular and cellular biochemistry, 1999, 199(1-2): 169-178
- [21] Tai C J, Wu A T H, Chiou J F, et al. The investigation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 as a potential pharmacological target in non-small cell lung carcinomas, assisted by non-invasive molecular imaging[J]. BMC cancer, 2010, 10(1): 95
- [22] Denkert C, Schmitt W D, Berger S, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma[J]. International journal of cancer, 2002, 102(5): 507-513
- [23] Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas[J]. Nature, 2007, 445(7128): 656-660
- [24] Wu C H, van Riggelen J, Yetil A, et al. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(32): 13028-13033

(上接第 3211 页)