

胰高血糖素样肽2对吉西他滨诱导的肠上皮细胞凋亡、周期阻滞及Ras-Raf-MEK-ERK通路的影响

叶蕾 杜晓翔

[摘要] 目的 探讨胰高血糖素样肽2(GLP-2)对吉西他滨(GEM)诱导的肠上皮细胞凋亡、周期及Ras-Raf-MEK-ERK通路的影响。方法 培养人肠上皮模型细胞Caco2,根据损伤与保护措施分为溶剂对照组、10 mg/L GEM损伤组和10 mg/L GEM基础上加入1 μ mol/L GLP-2的保护组。细胞培养24 h后,采用流式细胞术PI单染法检测分析细胞周期;采用流式细胞术AnnexinV-FITC/PI双染法检测分析细胞凋亡情况;采用real-time RT-PCR检测周期相关分子CDK4、细胞凋亡相关分子BAX和FAS、Ras-Raf-MEK-ERK通路关键分子MEK mRNA的表达。结果 与对照组比较,GEM不仅明显增加细胞周期G1期比例与细胞凋亡比例($P<0.05$),而且使CDK4 mRNA表达下降($t=12.15, P<0.05$),BAX、FAS mRNA及MEK mRNA表达升高(t 分别=-12.80、-19.30、-4.55, P 均 <0.05)。而GLP-2干预GEM作用后,细胞周期G1期比例与细胞凋亡比例均下调,且CDK4 mRNA表达上调,BAX mRNA、FAS mRNA及MEK mRNA表达明显下调(t 分别=-25.23、5.16、15.51、4.78, P 均 <0.05)。结论 GLP-2可抑制甚至逆转GEM所致的肠上皮细胞周期阻滞、细胞凋亡及Ras-Raf-MEK-ERK信号通路的异常活化。

[关键词] 胰高血糖素样肽2; 吉西他滨; 细胞周期阻滞; 细胞凋亡; Ras-Raf-MEK-ERK通路

Effects of glucagon like peptide-2 (GLP-2) on apoptosis, cell cycle arrest and Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway induced by gemcitabine in intestinal epithelial cells YE Lei, DU Xiaoxiang. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of glucagon like peptide-2 (GLP-2) on apoptosis, cycle arrest and Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway induced by gemcitabine (GEM) in intestinal epithelial cells. **Methods** Caco2 cells were randomly divided into three groups: control group that treated with solvent only, GEM group that treated with 10 mg/L GEM, and GLP-2 group that treated with 10 mg/L GEM combined with 1 μ mol/L GLP-2. After culturing for 24 hours, cell cycle was detected by flow cytometry PI monochrome staining. Apoptosis was detected by flow cytometry AnnexinV-FITC/PI double staining. The mRNA expressions of cycle-related molecules CDK4, apoptosis-related molecules BAX and FAS, Ras-Raf-MEK-ERK pathway-related molecules MEK were quantified by real-time RT-PCR. **Results** Compared with the control group, GEM not only significantly increased the ratio of G1 phase in cell cycle and the ratio of apoptosis ($P<0.05$), but also decreased the mRNA expression of CDK4, and increased the mRNA expression of BAX, FAS and MEK in Caco2 cells ($t=12.15, -12.80, -19.30, -4.55, P<0.05$). However, after the intervention of GEM with GLP-2, the ratio of G1 phase in cell cycle and the ratio of apoptosis were both down-regulated, the mRNA expression of CDK4 was up-regulated and the mRNA expressions of BAX, FAS and MEK were significantly down-regulated ($t=-25.23, 5.16, 15.51, 4.78, P<0.05$). **Conclusion** GLP-2 can inhibit even reverse the cycle arrest, apoptosis and the overactivation of Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway induced by GEM in intestinal epithelial cells.

[Key words] glucagon like peptide 2; gemcitabine; cell cycle arrest; apoptosis; Ras-Raf-MEK-ERK pathway

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.03.004

基金项目:温州市科技计划项目(Y20130172)

作者单位:325000 浙江温州,温州医科大学附属第一医院药学部

化疗有多种副作用,胃肠道损伤尤为常见,可损伤肠黏膜并导致严重的肠黏膜屏障功能障碍。胰高血糖素样肽2(glucagon like peptide-2,

GLP-2)具有胃肠道特异性并可促进肠上皮黏膜生长^[1],因此,GLP-2可能成为化疗性肠损伤的特异性药物。吉西他滨(gemcitabine, GEM)通过阻滞细胞周期以抑制肿瘤增殖,但易出现胃肠道损伤副作用。人结直肠癌细胞株 Caco2 因结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞,常作为人肠上皮模型细胞以用来进行模拟体内肠道的相关实验^[2]。本研究拟通过 GLP-2 干预 GEM 对 Caco2 细胞的作用,从体外角度观察 GLP-2 对 GEM 所致的细胞凋亡、周期阻滞及 Ras-Raf-MEK-ERK 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人结直肠癌细胞株 Caco2 于 2018 年购于中科院上海生命科学研究院细胞资源中心。试剂主要有:GLP-2(由美国 Abcam 公司生产);GEM(由美国 Eli Lilly 公司生产);DMEM 细胞培养液(由美国 Gibco 公司生产);胎牛血清(由美国 Gibco 公司生产);胰蛋白酶和 TRIzol 提取液(由美国 Gibco 公司生产);PI 细胞周期检测试剂盒(由美国 BD 公司生产);AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(由美国 BD 公司生产);RT-PCR 试剂(由美国 Promega 公司生产)。主要仪器有:MyCycler 梯度 PCR 仪(由美国 Bio-Rad 公司生产);7500 定量 PCR 仪(由美国 Applied Biosystems 公司生产);Varioskan Flash 全波长多功能扫描仪(由美国 Thermo Scientific 公司生产);DM4 000 B LED 荧光正置显微镜(由德国 Leica 公司生产);BD FACSVerser 流式细胞分析仪(由美国 BD 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 人肠上皮模型细胞的培养和实验分组 将 Caco2 细胞培养在 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,并置于 37℃,5% CO₂ 培养箱。实验前,调整细胞至适当密度并铺板于 6 孔板中,当细胞融合度为 70% 时,开始正式实验。设立组别:溶剂对照组:不加入 GEM 和 GLP-2;GEM 损伤组:细胞培养基中加入 10 mg/L GEM;GLP-2 保护组:在 10 mg/L GEM 基础上,加入 1 μmol/L GLP-2。各组细胞培养 24 h 后,用倒置相差显微镜观察细胞形态学变化。

1.2.2 real-time RT-PCR 检测 mRNA 表达 采用 Trizol 试剂盒提取各组细胞总 RNA,测定 260/280 nm 吸光度值以确定纯度和浓度。根据 RT-PCR 试剂说明书将 RNA 逆转录成 cDNA。针对 CDK4、

BAX、FAS、MEK mRNA 设计特异性引物,以 GAPDH 作为内参,采用 real-time PCR 相对定量法进行检测。引物序列见表 1。

表 1 扩增细胞周期、凋亡及 Ras-Raf-MEK-ERK 通路相关基因 mRNA 特异性引物序列

基因	序列 (5'→3')	长度 /bp
CDK4	CAGCTGGTCACATGGTGAGG	250
	CCATAGGCACCGACACCAAT	
BAX	TCATGGGCTGGACATTGGAC	114
	GAGACAGGGACATCAGTCGC	
FAS	GCAGGCCAAGTTGCTGAATC	175
	TCGTAAACCGCTTCCCTCAC	
MEK	CATCTCGTTGGTGAGCTGG	95
	GGGGCTCTTCCTGTAGGACT	
GAPDH	CCGTATCGGACGCCTGGTT	126
	CCGTGGGTAGAGTCATACTGGAAC	

取逆转录产物 1 μl 进行定量 PCR,PCR 扩增体系:5 μl 2×SYBR Green 荧光定量试剂、上下游引物各 1 μl,终浓度为 200 nmol/L、1 μl cDNA、2 μl 反应缓冲液。扩增程序为:95℃ 5 min、95℃ 10 s、60℃ 35 s,40 个循环。通过溶解曲线评价 PCR 结果可靠性,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对 mRNA 表达量。

1.2.3 流式细胞术检测分析细胞周期 细胞于 6 孔板中按上述实验分组方案给药后培养 24 h,利用 0.25% 胰酶消化,离心收集细胞,PBS 清洗 1 次,弃去上清,加入预冷 80% 乙醇,于 4℃ 固定过夜,离心收集细胞,PBS 清洗 2 次,加入 500 μl 含 50 μg/ml 碘化丙啶,100 μg/ml RNase A,0.2% Triton X-100 的 PBS,4℃ 避光孵育 30 min,以标准程序用流式细胞仪检测,计数并获取 1 万个细胞,结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析周期各相比比例。

1.2.4 流式细胞术检测分析细胞凋亡 细胞于 6 孔板中按上述实验分组方案给药后培养 24 h,利用 0.25% 胰酶消化,离心收集细胞,PBS 清洗 1 次,弃去上清,用 100 μl 的含有膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(AnnexinV-FITC/PI)标记溶液重悬细胞,4℃ 避光孵育 15 min,清洗离心收集细胞,用 400 μl PBS 重悬细胞,以标准程序用流式细胞仪检测,计数并获取 1 万个细胞,结果用流式分析软件 Flowjo 分析细胞凋亡情况。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组

间比较采用 t 检验;计数资料比较采用精确概率法。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GLP-2 对 GEM 诱导肠上皮模型细胞周期阻滞的影响见封二图 1~3

由封二图 1、2 可见,与对照组比较,10 mg/L 的 GEM 作用 Caco2 细胞 24 h 后,G1 期比例上升,S 期比例下降(P 均 < 0.05)。由封二图 3 可见,GLP-2 与 GEM 一同处理 24 h 后,较单 GEM 作用时,G1 期比例下降,同时 S 期比例上升(P 均 < 0.05)。

2.2 GLP-2 对 GEM 诱导肠上皮模型细胞凋亡的影响见封二图 4~6

由封二图 4、5 可见,与对照组比较,GEM 作用 Caco2 细胞后,细胞凋亡比例明显升高($P < 0.05$)。由封二图 6 可见,GLP-2 保护处理后,细胞凋亡比例明显下降($P < 0.05$)。

2.3 GEM 与 GLP-2 对肠上皮模型细胞 CDK4、BAX、FAS 和 MEK mRNA 表达的影响见图 1

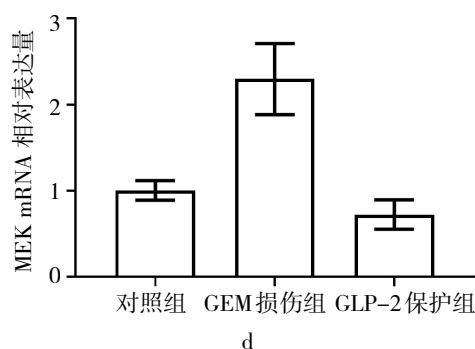
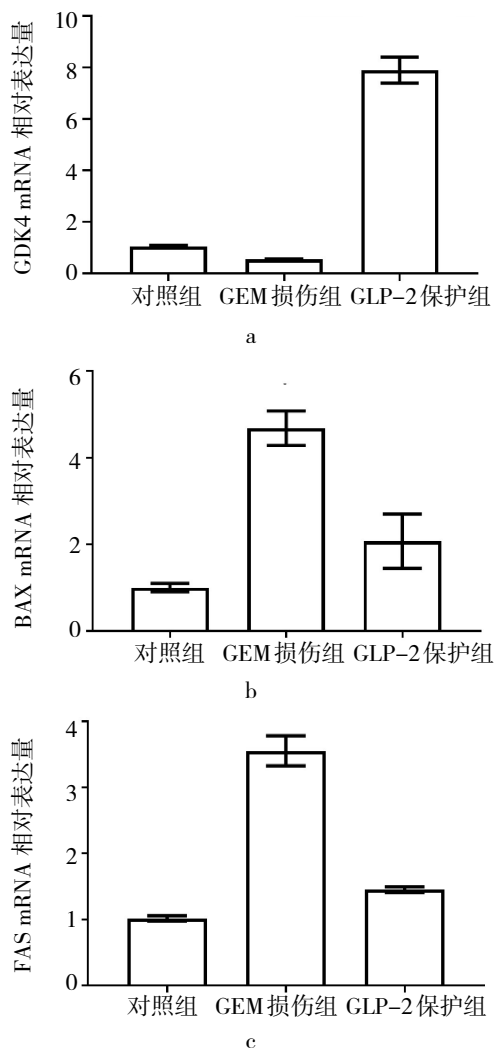


图1 GEM与GLP-2对肠上皮模型细胞CDK4、BAX、FAS和MEK mRNA表达的影响

由图 1 a 可见,GEM 作用 Caco2 细胞,CDK4 mRNA 的表达明显下调($t=12.15$, $P < 0.05$),而 GLP-2 作用后,CDK4 mRNA 的表达明显上调($t=-25.23$, $P < 0.05$)。由图 1 b、c、d 可见,GEM 作用 Caco2 细胞,BAX、FAS、MEK mRNA 表达明显上调(t 分别 $= -12.80$ 、 -19.30 、 -4.55 , P 均 < 0.05),而 GLP-2 作用后,BAX、FAS、MEK mRNA 表达明显下调(t 分别 $= 5.16$ 、 15.51 、 4.78 , P 均 < 0.05),并且 MEK mRNA 表达接近甚至低于肠上皮模型细胞的本底表达。

3 讨论

GLP-2 认为是肠上皮特异性生长因子,可促进正常肠道多种生理功能^[3]。GLP-2 通过其受体 GLP-2R 来发挥功能。因此,GLP-2 作用的组织特异性取决于 GLP-2R 的表达分布情况。通过 Human Protein Atlas 数据库^[4]查询分析,GLP-2R 主要在胃肠道的组织细胞中表达。Yusta 等^[5]的研究认为 GLP-2R 可通过依赖 cAMP/PKA 途径抑制凋亡,促进增殖。有研究报道,GLP-2 可增加细胞周期蛋白 D1/E/A 的表达,GLP-2R 可作用于 G1/G0 而激活 Ras-Raf-MEK-ERK 通路^[6]。Ras-Raf-MEK-ERK 通路异常活化可导致一系列与细胞增殖、分化、迁移、癌变相关的分子表达^[7,8]。此外,GLP-2/GLP-2R 对细胞的增殖和生存的调节是通过不同的途径完成的^[9]。可见,GLP-2 的作用机制是极为复杂的,对细胞增殖凋亡的作用也可通过非受体途径实现,包括 Ras-Raf-MEK-ERK 通路。同时 Ras-Raf-MEK-ERK 通路可能是人类癌症中最重要的致癌途径^[10]。

本次研究结果表明,GEM 可明显促进肠上皮模型细胞凋亡,且可致其细胞周期阻滞在 G1 期,鉴于 CDK4 表达显著下降,表明周期阻滞在 G1 期的周期限制点 R 点。而 GLP-2 保护处理后,GEM 诱导的细胞凋亡与周期阻滞都得到明显改善,凋亡相关蛋白

BAX与FAS表达明显下调,表明相应的凋亡通路得到抑制。而周期结果表明,GLP-2处理可恢复细胞周期与增殖,同时CDK4高表达,使得细胞能够冲破周期限制点R点进入正常细胞周期。GLP-2对Ras-Raf-MEK-ERK通路也产生影响。GEM作用后,MEK表达上调。GLP-2处理后,MEK表达下调,表明正常肠上皮因GEM损伤导致Ras-Raf-MEK-ERK通路异常活化而提升细胞生存能力,也因此产生高癌变风险。而在GLP-2保护作用下,可避免该通路的异常活化,可降低正常细胞因GEM诱导产生的高癌变风险,同时避免化疗后残余肿瘤细胞对该通路的持续异常活化,从而降低肿瘤复发和获得耐药性的风险,为化疗联合用药新方案的提出提供新思路。

综上所述,GLP-2可改善GEM诱导的肠上皮细胞周期阻滞、凋亡及Ras-Raf-MEK-ERK通路的过度活化,在提升肠上皮细胞生存能力的同时降低了肿瘤复发和耐药的风险。同时,本次研究观察到单用GLP-2时Ras-Raf-MEK-ERK通路活化,而GLP-2与GEM联合使用可抑制Ras-Raf-MEK-ERK通路的异常活化,此现象机制尚需进一步研究。本研究为化疗联合用药新方案,尤其是GLP-2与GEM联合用药的提出提供支持。

参考文献

- 1 Hsieh J, Trajcevski KE, Farr SL, et al. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) stimulates postprandial chylomicron production and postabsorptive release of intestinal triglyceride storage pools via induction of nitric oxide signaling in male hamsters and mice[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(10):3538-3547.
- 2 Moran GW, O'Neill C, McLaughlin JT. GLP-2 enhances barrier formation and attenuates TNF α -induced changes in a Caco-2 cell model of the intestinal barrier [J]. *Regul Pept*, 2012, 178(1-3):95-101.
- 3 Nishimura K, Hiramatsu K, Monir MM, et al. Ultrastructural study on colocalization of glucagon-like peptide (GLP)-1 with GLP-2 in chicken intestinal L-cells [J]. *J Vet Med Sci*, 2013, 75(10):1335-1339.
- 4 Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16):6062-6067.
- 5 Yusta B, Estall J, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(28):24896-24906.
- 6 Jasleen J, Ashley SW, Shimoda N, et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro[J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(5):1135-1140.
- 7 Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 109(15):314-341.
- 8 Chowdhury I, Thompson WE, Thomas K. Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(8):998-1004.
- 9 Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ. The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways[J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(2):459-473.
- 10 De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(Suppl 2):S17-27.

(收稿日期 2018-11-15)

(本文编辑 蔡华波)