

蛋白激酶 B 在佛波酯诱导人胃癌细胞系凋亡中的作用

张兵^{1*} 夏春²

(1. 厦门大学医学院组织学胚胎学教研室, 厦门 361005; 2. 厦门大学附属中山医院, 厦门 361004)

[摘要] 目的 探讨佛波酯(TPA)诱导胃癌细胞系凋亡过程中蛋白激酶 B(PKB)的作用。方法 通过 BrdU 处理,流式细胞术检测以及 DAPI 染色,荧光显微镜观察分析 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞的影响;免疫印迹法检测 TPA 对 PKB 蛋白表达水平、磷酸化的影响;核浆分离获得核浆蛋白,用于免疫印迹法检测 TPA 对胃癌细胞内 PKB 和其 Ser 473 位点磷酸化的核浆表达影响,以及激光扫描共焦显微镜观察 TPA 是否改变胃癌细胞内 PKB 的分布。结果 TPA 诱导 BGC-823 细胞凋亡;TPA 下调 BGC-823 细胞内 PKB 蛋白表达,并且与 TPA 作用时间和 TPA 浓度呈正相关,与 PP2A 降解作用无关;TPA 抑制 PKB 的 Ser 473 位点磷酸化,而对其 Thr 308 位点磷酸化没有明显影响;TPA 下调细胞核内 PKB 的表达以及 Ser 473 位点的磷酸化;TPA 并不改变 PKB 在胃癌细胞内的分布。结论 PKB 的抑制作用可能参与 TPA 诱导胃癌细胞凋亡过程;由 TPA 诱导的胃癌细胞凋亡可能部分是由于细胞核内 PKB 蛋白表达和 Ser 473 位点磷酸化下降所致。

[关键词] 佛波酯;细胞凋亡;蛋白激酶 B;免疫印迹法;激光扫描共焦显微镜;BGC-823 细胞

[中图分类号] R3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0529-1356(2008)02-207

THE ROLE OF PROTEIN KINASE B IN THE APOPTOSIS OF GASTRIC CANCER CELLS INDUCED BY 12-O-TETRADECANOYL PHORBOL-1,3-ACETATE

ZHANG Bing^{1*}, XIA Chun²

(1. Department of Histology and Embryology, Medical School of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen 361005, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of protein kinase B (PKB) in gastric cancer BGC-823 cells treated by TPA. **Methods** Flow cytometry (FAC) and fluorescence microscope were used to detect the effect of TPA on gastric cancer BGC-823 cells, after cells were treated by BrdU and stained by DAPI, respectively. The effect of TPA on the expression level of PKB protein and its phosphorylation of Ser 473 and Thr 308 were investigated by Western blotting. When nuclear and cytoplasmic protein fractions were prepared through lysis of cell and centrifugation, the effect of TPA on the expression level of PKB protein and its phosphorylation of Ser 473 in cytoplasm and nuclei were detected by Western blotting. Meanwhile, the effect of TPA on the distribution of PKB was observed under laser-scanning confocal microscope with immunofluorescence technique. **Results** TPA induced the apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells. It also induced the inhibition of PKB protein expression in a TPA concentration-dependent and time-dependent manner in gastric cancer BGC-823 cells, regardless of dephosphorylation of PP2A. TPA inhibited the phosphorylation of PKB at Ser 473, but it did not affect its phosphorylation at Thr308. TPA only attenuated the expression level of PKB and its phosphorylation of Ser 473 in nuclei, whereas it did not change the distribution of PKB in BGC-823 cells. **Conclusion** These data suggest that the inhibition of PKB plays an important role in mediating the effect of TPA in gastric cell line. Apoptosis induced by TPA is partly due to the inhibition of PKB and its phosphorylation of Ser 473 in nuclei.

[Key words] TPA; Cell apoptosis; Protein kinase B (PKB); Western blotting; Laser-scanning confocal microscope; BGC-823 cells

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 作为一个关

键的丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶,被细胞外因子激活后可以参与各种重要的细胞活动;同时可被细胞内蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 降解^[1],其调节细胞代谢活动最为突出的功能是通过作用细胞内不同的底物分子,抑制细胞凋亡,促进细胞生长^[2]。现已发现,在人肿瘤细胞中 PKB 具有较高的表达频率,肿瘤患者预后效果较差与 PKB 被激活密

[收稿日期] 2007-10-09 **[修回日期]** 2007-12-20

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(C0310001)

[作者简介] 张兵(1966—),女(汉族),辽宁省人,博士,副教授。

*通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

E-mail: bingzhang1966@yahoo.com.cn Tel: (0592) 2188672

切相关,因此,PKB 已经成为治疗肿瘤的关键靶位点之一^[3]。佛波酯(12-O-tetradecanoylphorbol-1,3-acetate,TPA)作为一种细胞外因子能够调节细胞的代谢活动,其对肿瘤细胞的作用是双向的,它既能诱导肿瘤细胞凋亡,又能诱导肿瘤发生,与不同的细胞类型有关^[4,5]。而有关 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞的作用,尤其 PKB 在此过程中的意义少见报道,我们旨在通过实验,探讨 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞的作用及在此过程中 PKB 扮演的角色和可能的作用机理。

材料和方法

1. 细胞培养

人胃癌细胞株 BGC-823 购自上海细胞所细胞库。BGC-823 细胞培养于 RPMI1640 培养液中(含有 10% 小牛血清,1mmol/L 谷氨酸和 100mg/L 青霉素),37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

2. 5-溴-2-脱氧尿核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)检测^[6]

细胞经 TPA 处理 24h 后再结合 BrdU(20μmol/L) 孵育 2h,收集细胞,预冷 4% 多聚甲醛 4 固定 30min。PBS 洗 3 次,悬浮于 6 × 10⁻² IU/L DNA 酶 I (DNase I) 缓冲液中,25℃ 孵育 30min,收集细胞,羊血清-PBS-T 缓冲液(含 0.05% Tween-20-PBS) 37℃ 孵育 30min,加入 BrdU 一抗,37℃ 孵育 1h。PBS 洗 3 次后加入荧光二抗 37℃ 孵育 1h(避光)。PBS 洗细胞,Beckman Coulter 流式细胞仪检测。

3. 细胞凋亡检测^[7]

加入 TPA(100μg/L) 处理胃癌细胞 24h, PBS 漂洗,预冷 4% 多聚甲醛 4 固定 30min。DAPI 染色, Olympus BX-51 荧光显微镜下观察细胞凋亡变化。

4. 免疫印迹法(Western blotting)检测^[8]

细胞用预冷的 PBS 洗 2~3 次,加入 0.5ml 含 1mmol/L PMSF 的 PBS 离心收集细胞。加入细胞裂解液 RIPA 50~100μl,冰上放置裂解 30min,离心收集上清,测蛋白浓度。行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并电转至 PVDF 膜。与相应的抗体杂交,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL) 检测。用 Tubulin, actin 或 LaminB 做内标。每个实验独立重复 5 次,并对结果进行统计学分析(GraphPad Prism 4)。

5. 核浆分离^[8]

收集细胞加细胞裂解液 A 100μl [10mmol/L Hepes 7.9, 10mmol/L KCl, 0.1mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.1mmol/L 2, 乙二胺双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA), 0.15% NP-40, 0.1% 1mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT), 10% 蛋白酶抑制剂], 冰浴 5min。离心收集上清即为胞浆蛋白,测蛋白浓度。

向上述离心所得沉淀中加入裂解液 B (20mmol/L Hepes 7.9, 400mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA, 0.5% NP-40, 1% 1mmol/L DTT, 10% 蛋白酶抑制剂) 冰上震荡 15min。离心收集上清即为细胞核蛋白,测蛋白浓度。

6. 激光共焦显微镜分析^[7]

将细胞接种到盖玻片上,待细胞贴壁后,根据需要加入 TPA 处理。PBS 漂洗,预冷 4% 多聚甲醛 4 固定 30min。滴加一抗,37℃ 温箱孵育 3h。PBS 漂洗 3 次,滴加荧光标记二抗,37℃ 避光孵育 3h。PBS 漂洗,PI 避光染色 10min。吸干、封片。MRC-1024ES 激光共焦显微镜观察并摄片。

结 果

1. TPA 诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡

BrdU 处理细胞,流式细胞术分析 TPA 诱导胃癌细胞中 DNA 合成率的变化。图 1 显示,当 TPA(100μg/L) 处理 BGC-823 细胞 24h 时,与对照组(黑色)相比,BrdU 曲线(浅色)向左移动,表明 TPA 能够降低 BGC-823 细胞的 DNA 合成速率,从而抑制胃癌细胞生长。同时,荧光显微镜观察 TPA(100μg/L) 处理胃癌 BGC-823 细胞 24h 与对照组比较细胞形态发生变化,BGC-823 细胞经 TPA 处理 24h 后一部分细胞的形状变圆,细胞核固缩,核膜核仁破碎,染色体发亮,并观察到细胞核内的凋亡小体(图 2B,箭头所示);对照组无凋亡小体(图 2A),表明细胞没有发生明显的凋亡。以上实验结果显示,TPA 能够诱导胃癌 BGC-823 细胞发生凋亡,抑制其生长。

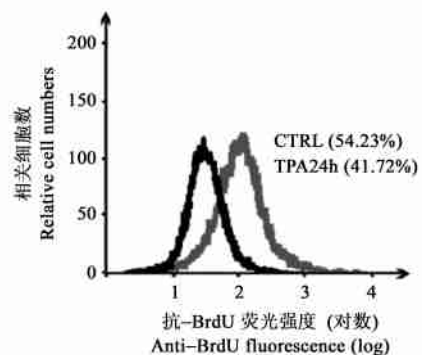


图 1 TPA 降低胃癌 BGC-823 细胞 DNA 合成率
Fig. 1 TPA decreases the rate of DNA synthesis in gastric cancer BGC-823 cells

2. TPA 诱导胃癌 BGC-823 细胞内 PKB 表达下降

免疫印迹法结果显示,在胃癌 BGC-823 细胞中,TPA(100μg/L) 处理细胞 12h,PKB 蛋白表达水平与对照组比较没有明显的改变;但随着 TPA 作用时间延长,PKB 蛋白表达水平逐渐下降;当 TPA 处理细胞 48h 时,PKB 蛋白分子表达水平下降最为明显(图

3)。类似的抑制趋势也可以在不同浓度的 TPA 作用下观察到(图 4)。图 4 显示,在胃癌 BGC-823 细胞中,不同浓度 TPA(50~150 μ g/L)处理细胞 24h,可见 50 μ g/L TPA 就已经能够降低 PKB 的表达。结果表明,TPA 能够抑制 BGC-823 细胞内 PKB 蛋白表达,并且与 TPA 作用时间和 TPA 浓度呈正相关。

用细胞内 PKB 降解酶 PP2A 的抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA, 100nmol/L)预处理 BGC-823 细胞 2h,再加入 TPA(100 μ g/L)作用细胞 24h。免疫印迹法结果显示,与对照组相比,TPA 单独处理 BGC-823 细胞能够诱导 PKB 蛋白表达水平降低;而用 OA 预处理细胞后 TPA 再处理细胞 24h,PKB 蛋白表达水平和对照组相比也有降低,类似于 TPA 单独处理细胞显示的 PKB 结果(图 5)。表明 TPA 对胃癌细胞内

PKB 的抑制并不受细胞内 PKB 的降解酶 PP2A 的影响,在 PP2A 被抑制情况下 TPA 依旧能够诱导细胞内 PKB 表达下降。

3. 胃癌 BGC-823 细胞中 TPA 调节 PKB 与其磷酸化作用相关

结合抗 PKB 丝氨酸 473(Ser 473)和抗 PKB 苏氨酸 308(Thr 308)特异位点的磷酸化抗体(Phospho-PKB/Ser 473 和 Phospho-PKB/Thr 308),免疫印迹法结果显示,胃癌 BGC-823 细胞中 PKB 处于磷酸化状态,分别在 Ser 473 和 Thr 308 位点被磷酸化(图 6, 7)。TPA(100 μ g/L)处理细胞 6h 后,PKB 的 Ser 473 位点磷酸化与对照组比较变化不显著;但是当 TPA 处理细胞 24h 后,PKB 的 Ser 473 位点磷酸化开始下降;TPA 处理细胞 48h 后,PKB 的 Ser 473 位点磷酸

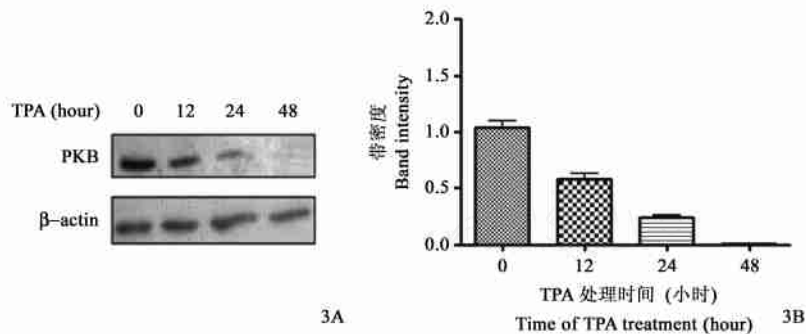


图 3 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞内的 PKB 表达的影响。A. 免疫印迹; B. 带密度统计分析

Fig. 3 Effect of TPA on the expression of PKB in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

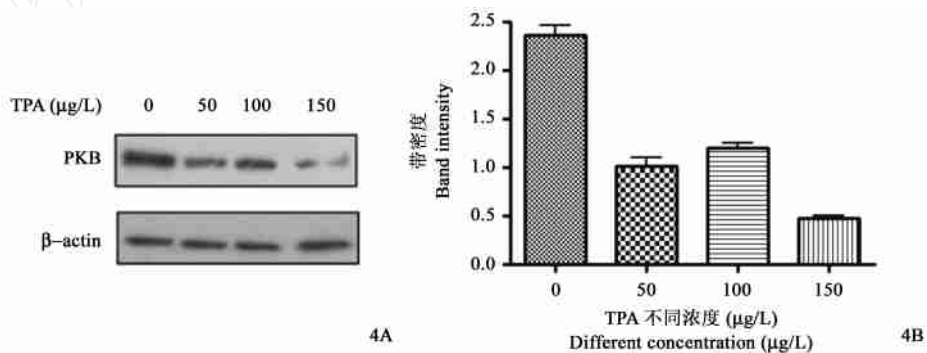


图 4 不同浓度 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞内 PKB 表达的影响。A. 免疫印迹; B. 带密度统计分析

Fig. 4 Effect of TPA in different concentration on the expression of PKB in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

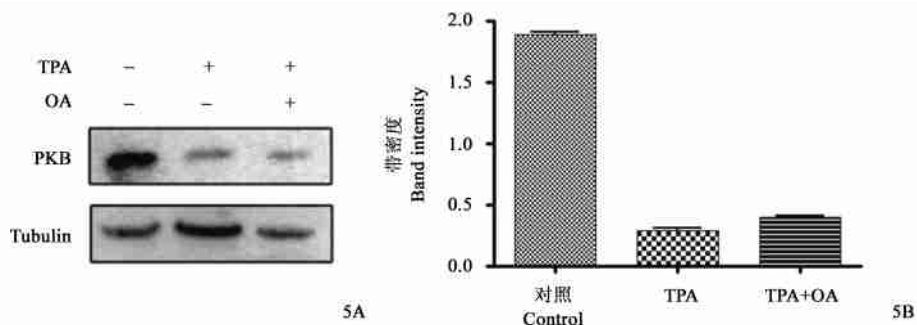


图 5 PP2A 抑制剂 OA 对 TPA 抑制胃癌 BGC-823 细胞内 PKB 表达的影响。A. 免疫印迹法; B. 带密度统计分析

Fig. 5 Effect of OA (PP2A inhibitor) on the inhibition of PKB expression induced by TPA in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

化下降更为明显(图6)。然而,TPA(100 μ g/L)处理BGC-823细胞前后,PKB的Thr 308位点磷酸化没有发生明显的变化(图7)。结果表明,TPA能够诱导PKB的Ser 473位点磷酸化下降,并且与其作用时间呈正相关,但是不能影响PKB的Thr 308位点磷酸化。

4. TPA下调胃癌BGC-823细胞核内PKB的表达和Ser 473位点磷酸化

制备核浆片段,免疫印迹法检测显示,在BGC-823细胞中,PKB蛋白在胞核和胞浆中均有表达,呈现核少浆多的分布。TPA(100 μ g/L)处理细胞24h,胞浆内的PKB蛋白表达水平与对照组相似,TPA处理细胞48h后,胞浆的PKB蛋白表达水平也没有明显下降。与此同时,TPA处理细胞24h后,细胞核的PKB蛋白表达水平明显低于对照组;TPA处理细胞

48h后,细胞核的PKB蛋白表达水平下降到最低点,几乎检测不到(图8)。这些结果提示,TPA对胃癌细胞内PKB的抑制主要在细胞核内。

激光共焦显微术分析结果显示,在BGC-823细胞中,PKB在胞浆和细胞核均有分布,从图9可见,TPA(100 μ g/L)处理细胞6h,与对照组相比PKB(绿色)在胞浆和细胞核(红色)内的分布没有明显改变;TPA处理细胞24h后,细胞核内PKB的表达水平比对照组明显减少,重叠图呈现黄红色。TPA处理细胞48h后,细胞核几乎检测不到PKB蛋白,重叠图显示为红色(图9)。结果表明,在胃癌细胞中TPA作用一定时间后能够减弱PKB在细胞核的表达,而且这种减弱与TPA处理细胞时间呈正相关。

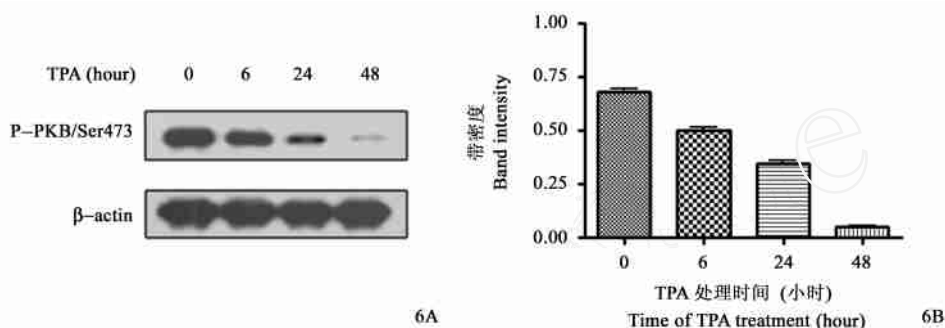


图6 TPA对胃癌BGC-823细胞内PKB的Ser473磷酸化的影响。A. 免疫印迹法; B. 带密度统计分析

Fig. 6 Effect of TPA on the phosphorylation of PKB/Ser473 in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

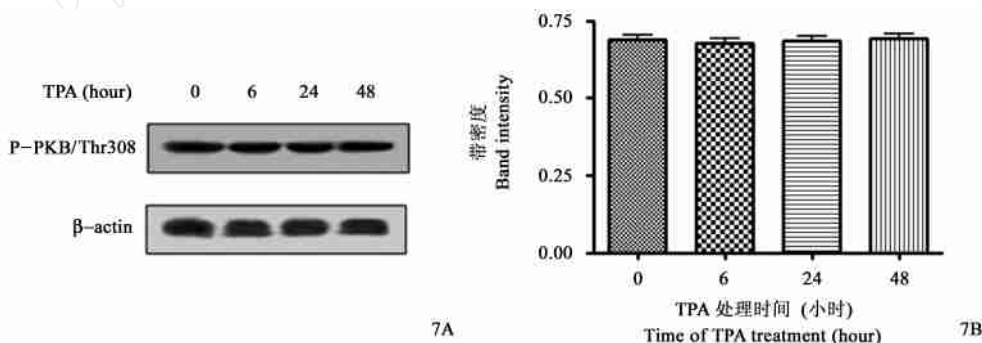


图7 TPA对胃癌BGC-823细胞内PKB的Thr473磷酸化的影响。A. 免疫印迹法; B. 带密度统计分析

Fig. 7 Effect of TPA on the phosphorylation of PKB/Thr308 in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

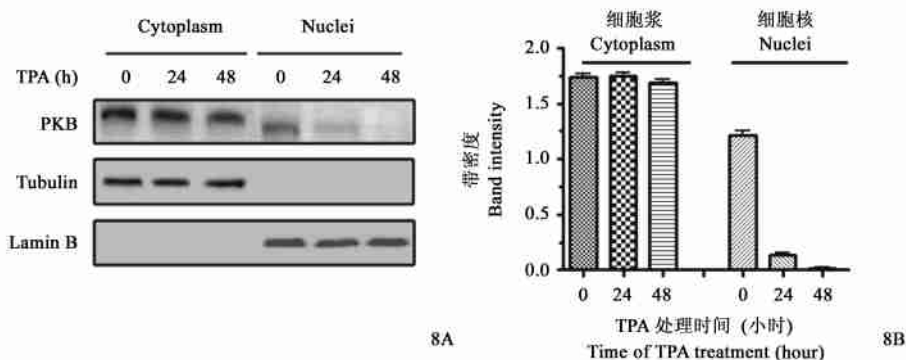


图8 TPA对胃癌BGC-823细胞内PKB核浆表达的影响。A. 免疫印迹法; B. 带密度统计分析

Fig. 8 Effect of TPA on the expression of PKB in cytoplasm and nuclei in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

制备核浆片段,免疫印迹法结合 PKB 的 Ser 473 磷酸化抗体,结果表明,在 BGC-823 细胞中,PKB 的 Ser 473 位点磷酸化在胞核和胞浆中均有表达,也呈现核少浆多的分布。TPA (100 μ g/L) 处理细胞 24h,胞浆内的 Ser 473 位点磷酸化和对照组相似,TPA 处理细胞 48h 后,胞浆的 Ser 473 位点磷酸化无明显下

降。但 TPA 处理细胞 24h 后,细胞核的 Ser 473 位点磷酸化明显低于对照组;TPA 处理细胞 48h 后,细胞核的 Ser 473 位点磷酸化几乎无表达(图 10)。表明 TPA 能够抑制细胞核内 PKB 的 Ser 473 位点磷酸化,并也与 TPA 处理细胞时间呈正相关。

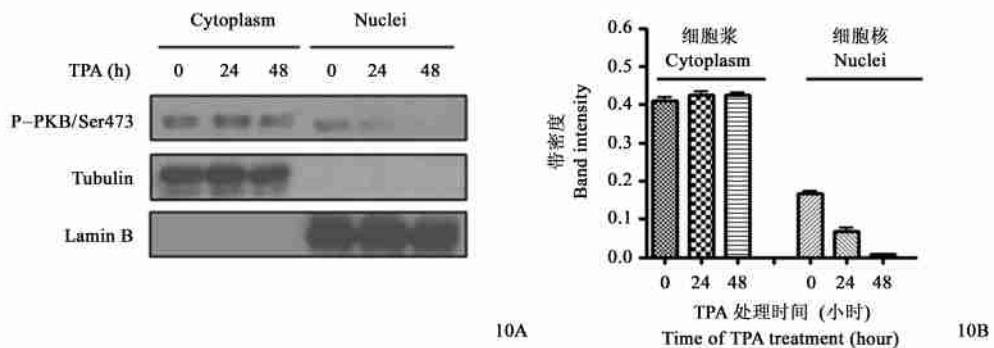


图 10 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞内 PKB 的 Ser473 位点磷酸化的影响。A. 免疫印迹法; B. 带密度统计分析

Fig. 10 Effect of TPA on the phosphorylation of PKB/Ser473 in gastric cancer BGC-823 cells. A, Western blotting; B, Statistical analysis of band intensity

讨 论

TPA 根据细胞类型的不同既可促进又可抑制细胞凋亡^[4,5]。先前已有学者通过荧光显微镜观察到 TPA 能够诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡^[7], 本实验借助 BrdU 处理 BGC-823 细胞方法显示, TPA 抑制了 BGC-823 细胞的 DNA 合成, 从而抑制了 BGC-823 细胞的生长(图 1), 并重复了荧光显微镜下观察实验(图 2), 更为全面地证实 TPA 能够诱导胃癌 BGC-823 细胞的凋亡, 同时抑制细胞生长。进一步检测发现, 能够抑制细胞凋亡的蛋白激酶 B (PKB) 在此过程中受到影响, TPA 能够诱导其表达水平下降, 并且与 TPA 处理胃癌细胞的时间以及 TPA 的作用浓度呈正相关(图 3, 4), 即在 TPA 诱导胃癌细胞凋亡过程中 PKB 的表达被抑制。同样, 在其他一些刺激因子例如: 10-(对-氯苯基)-2, 10-二氢-3-(对-氯苯氨基)-2-异丙亚氨基吩嗪 (17-allylaminogeldanamycin, 17-AAG)、吉西他滨 (gemcitabine) 和盐酸拓扑替康 (topotecan) 等诱导不同肿瘤细胞凋亡过程中也发现 PKB 表达水平被抑制^[9~11]; 结合细胞内 PKB 降解酶 PP 2A 的抑制剂 OA 处理细胞的实验结果(排除了 TPA 诱导 PKB 下降是 PP 2A 作用所致, 图 5), 更证实了我们的观察。因此, 推测 PKB 的抑制作用可能与 TPA 诱导的胃癌 BGC-823 细胞凋亡活动相关。

蛋白表达水平常与其活性相关^[8], 而 PKB 的磷酸化是其表现活性的关键^[12]。研究已经表明, PKB 的 Thr 308 和 Ser 473 两位点磷酸化是其被外界因子激活所必需的^[13]。近年来的研究发现, 外界因子例如, 星形孢菌素 (7-Hydroxystaurosporine, UCN-01) 和

神经酰胺 (Ceramide) 对 PKB 两个位点的磷酸化影响不同^[14,21]; 而且在一些细胞中, PKB/Thr 308 位点磷酸化是 PKB 激活的基本条件, PKB 的 Ser 473 位点单独磷酸化并不会激活 PKB, 但可在 Thr 308 位点磷酸化的基础上使 PKB 获得最大活性^[15]。这些资料显示, 外界因子发挥功效并不需要同时作用两个 PKB 磷酸化位点。最近的一些研究报告证实, 在小鼠角化细胞中, TPA 仅仅降低 PKB 的 Ser 473 位点磷酸化^[16], 我们也发现 TPA 在抑制胃癌细胞 PKB 过程中, 仅有 Ser 473 位点的磷酸化被同时抑制(图 6), 而 Thr 308 位点的磷酸化并没有受到影响(图 7)。由此显著提示, TPA 可能主要作用于 PKB 的 Ser 473 位点, 其磷酸化的抑制可能是 PKB 表达下降的关键。事实上, 外界因子诱导的 PKB 磷酸化抑制也经常与 PKB 蛋白表达下降相关。抗癌药物健择 (gemcitabine) 处理的胰腺癌细胞, 拓扑替康 (topotecan) 处理的肺癌细胞均发现 PKB 水平下调伴随着 PKB 磷酸化被抑制^[10,11]。因此, 胃癌细胞中 TPA 诱导 PKB 表达下调的同时也伴随着 Ser473 位点磷酸化被抑制(图 3, 6), PKB 的 Ser473 位点磷酸化可能和 PKB 抑制作用相关。

细胞内的蛋白表达水平改变并不是蛋白行使功能的唯一途径, 细胞内蛋白分布也与其功能发挥关系密切。PKB 在细胞的分布依赖于细胞类型, 在细胞核与细胞浆内均可观察到^[17,18]。外界因子例如神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor receptor, PDGF) 以及胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 能够调节 PKB 的分布, 刺激 PKB 从

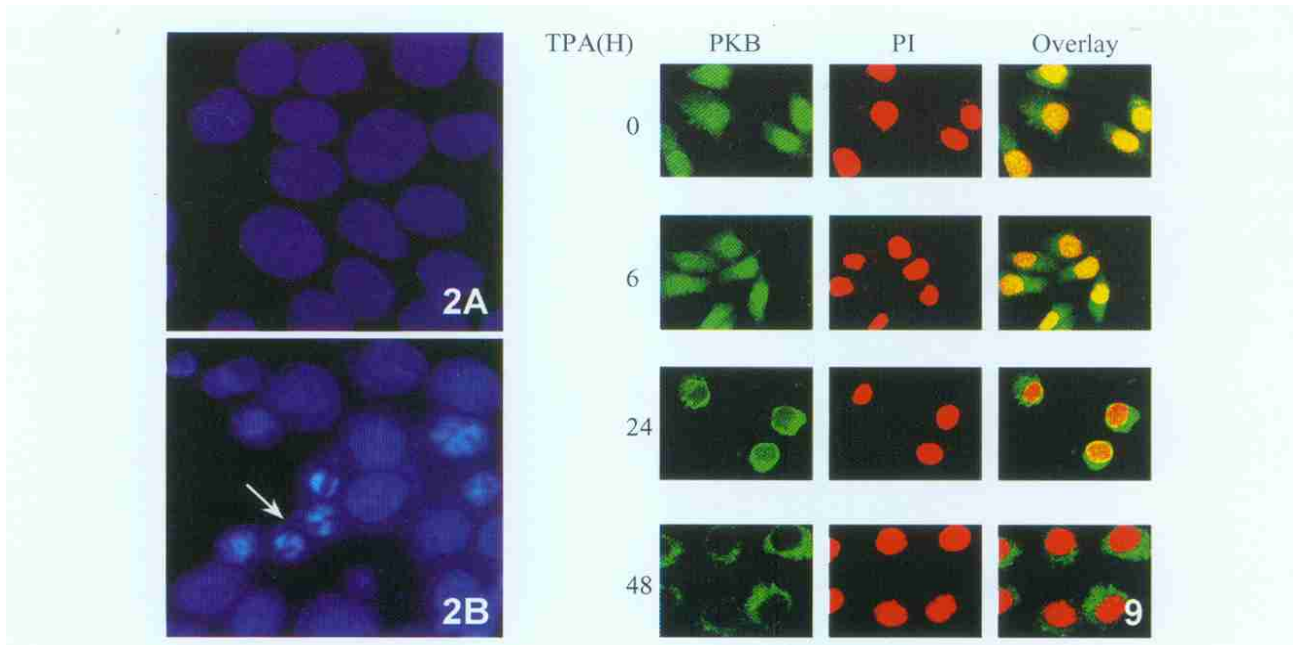


图 2 TPA 诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡

A. 对照组; B. 实验组 TPA(100μg/L) ,24h, 箭头所指为凋亡细胞内的凋亡小体 ×100

图 9 TPA 对胃癌 BGC-823 细胞内 PKB 分布的影响 ×100

Fig.2 TPA induces cell apoptosis in gastric cancer BGC-823 cells.

A ,Control group ; B ,Experimental group TPA(100μg/L) ,24h, Arrow indicated apoptotic bodies of apoptotic cells. ×100

Fig.9 Effect of TPA on the distribution of PKB in gastric cancer BGC-823 cells. ×100

胞浆转运到细胞核^[17,18]。本研究表明,在胃癌 BGC-823 细胞中,PKB 在胞浆和细胞核表达,但 TPA 处理后核内 PKB 表达下降明显(图 8,9),提示 TPA 并没有诱导 PKB 核浆转运,这一点与其他报道有所不同。与此同时,核内 PKB 的 Ser 473 位点磷酸化也受到 TPA 的明显抑制。核浆分离和免疫印迹实验进一步证实,TPA 不能抑制胞浆 PKB 的 Ser 473 位点磷酸化,但是明显地抑制核内 PKB 的 Ser 473 位点磷酸化(图 10)。这些数据一致说明 TPA 主要抑制细胞核的 PKB 及其 Ser 473 位点磷酸化,并没有出现 PKB 在细胞核与细胞浆之间的转运,即 PKB 在细胞内的分布并不改变。那么,核内 PKB 变化的意义是什么?胞浆 PKB 通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 结合到细胞膜上,由磷酸肌醇依赖蛋白激酶(3-phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK1, PDK2) 分别磷酸化 Thr 308 和 Ser 473 位点而被激活。细胞核和核膜也存在激活 PKB 所需的 PI3K、磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 [PtdIns(3,4,5)P3, PIP3] 和磷脂酰肌醇 3,4-二磷酸 [PtdIns(3,4)P2, PIP2], 而且磷酸化 Thr 308 的激酶 PDK1 可以在胞浆和细胞核之间来回穿梭,核内还发现磷酸化 Ser 473 的激酶 PDK2 的同系物^[18]。这些证据表明,PKB 在细胞核也能够被激活。因此,胃癌细胞中 TPA 对 PKB 的作用主要集中在细胞核是一种正常的生理调控过程。PKB 在细胞核内的分布是有意义的,被激活的 PKB 可以和细胞核内的一些因

子相互作用,如 Tc11 (TcL1 基因产物,参与人成熟 T 细胞白血病的发生)和转录因子(FOXO1)等^[18,19]。我们观察到的结果显示,TPA 不改变 PKB 的分布而只是减弱胃癌 BGC-823 细胞核内 PKB 表达和 Ser 473 磷酸化作用,进而推测 PKB 可能通过改变与细胞核内其他因子的相互作用而参与 TPA 诱导的胃癌 BGC-823 细胞凋亡过程。当然,进一步探讨细胞核内 PKB 与其他核内因子相互作用尚需进一步研究。

总之,本研究结果表明,PKB 的抑制作用参与了 TPA 诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡过程;TPA 诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡可能一部分是通过下调胃癌 BGC-823 细胞的核内 PKB 表达以及其 Ser 473 位点磷酸化完成。

参 考 文 献

[1] Hemmings BA. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions [J]. Science, 1997, 275(5300): 628-630.
 [2] Schubert KM, Scheid MP, Duronio V. Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(18): 13330-13335.
 [3] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy [J]. Cell Signal, 2002, 14(5): 381-395.
 [4] Zeng Y, Miao XC, Jiao B, et al. Epstein-Barr virus activation in Raji cells with ether extracts of soil from different areas in China [J]. Cancer Lett, 1984, 23(1): 53-59.
 [5] Jiang PZ, Gan M, Huang H, et al. Proteomics-based identification of

- proteins with altered expression induced by 12- α -tetradecanoylphorbol 13-acetate in nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(2):97-106.
- [6] Liu B, Wu JF, Zhan YY, et al. Regulation of the orphan receptor TR3 nuclear functions by c-Jun N-terminal kinase phosphorylation [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(1):34-44.
- [7] Wu Q, Liu S, Ye XF, et al. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(10):1583-1592.
- [8] Ye XF, Liu S, Wu Q, et al. Degradation of retinoid X receptor alpha by TPA through proteasome pathway in gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(9):1915-1919.
- [9] Baso AD, Solit DB, Chiosis G, et al. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(42):39858-39866.
- [10] Ng SSW, Tsao MS, Chow S, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19):5451-6455.
- [11] Nakashio A, Fujita N, Rokudai S, et al. Prevention of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(18):5303-5309.
- [12] Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68:965-1014.
- [13] Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4):261-269.
- [14] Kondapaka SB, Zarnowski M, Yver DR, et al. 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibition of Akt Thr308 but not Ser473 phosphorylation: a basis for decreased insulin-stimulated glucose transport[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21):7192-7198.
- [15] O'Boyle A, Mbule SK, Lockyer H, et al. Tumor necrosis factor- α activation of protein kinase B in WEHI-164 cells is accompanied by increased phosphorylation of Ser473, but not Thr308 [J]. *Biochem J*, 2001, 359(Pt1):119-127.
- [16] Li LW, Sampat K, Hu N, et al. Protein kinase C negatively regulates Akt activity and modifies UCV-induced apoptosis in mouse keratinocytes [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(6):3237-3243.
- [17] Borgatti P, Martelli AM, Tabellini G, et al. Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(1):79-88.
- [18] Wang R, Brattain MG. Akt can be activated in the nucleus[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(10):1722-1731.
- [19] Huang H, Regan KM, Wang F, et al. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5):1649-1654.

(编辑 安晓意)

《动物细胞培养——基本技术指南》(第5版)评介

英国格拉斯哥大学向来被有关科学研究人员看作是“细胞培养之乡”。由该大学 Beatson 癌症研究实验室肿瘤学与临床药理中心荣誉资深研究员 R. Ian Freshney 编写的《Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique》被公认为细胞培养中的传世经典之作。2005 年该书第 5 版面世,无疑表明它是深受世界各有关科学技术人员欢迎的。

该书自 2000 年第 4 版出版以来,细胞培养及其相关学科的技术方法发展更加迅猛,诸如干细胞、组织工程、克隆以及体外毒性检测方面等均取得了长足的、甚至是突破性的进展,为将这些内容和进展融入该书,于是有了“与时俱进”的新版。

第 5 版除保留原有主要内容之外,为了适应细胞培养新手,尤其是生物制药工业中所涌现的技术人员的需要,专门开辟了一章“培养纲要”,其中包括基本技术训练,高阶练习以及相关实践等。另外,如同前版一样,本版详尽介绍了如下内容:原代培养、细胞系、传代、分化人癌细胞和细胞转化、三维培养、大规模培养、分子细胞学技术、污染、特殊设备、细胞培养中可能遇到的难题及对策。因此本版最大的特色可以概括为全面、新颖和实用。

该书的承译者大多为第 4 版的原译者,因此虽不能说不会有错误,但毕竟是轻车熟路,因此可以将错译之处降到最低点,这也是该书的优势之一。本书印刷精良,封面设计美丽大方,还贴上了有编号的 WILEY 防伪标记,使用者不妨留意一下。

章静波