

印楝素诱导细胞凋亡途径的研究

徐霖 李升 王嘉福

贵阳学院生物与环境工程学院 贵州大学农业生物工程省重点实验室 贵州 贵阳 550005

作者简介: 徐霖, (1972-), 女, 贵州人, 教授, 硕士。研究方向: 基因农药 Email: xuling629@sina.com

李升, (1982-), 男, 重庆人, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学与毒理学研究, E-mail: listen318@163.com

王嘉福, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物基因工程, E-mail: jfwang@gzu.edu.cn

基金项目: 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字【2014】277); 受贵阳市科技局-贵阳学院科研专项资金【GYU-KYZ (2019-2020) SH-02】资助

【摘要】目的: 印楝素是一种高效低毒的植物源农药, 其作用机制目前仍未清楚, 深入研究印楝素诱导细胞凋亡的机制有助于进一步利用印楝素农药; 方法: 采用基因芯片技术结合实时定量 PCR 技术研究印楝素作用过程中相关基因表达差异变化, 流式细胞仪结合 Fluo-3 AM 荧光探针检测 Ca^{2+} 浓度变化; 结果: 利用基因芯片技术检测到印楝素处理后, 与凋亡途径相关 22 个基因差异化表达, 其中, 钙调蛋白 (CaM) 基因上调 5.05 倍, 是上调最多的基因; 利用实时定量 PCR 技术验证了凋亡途径中相关基因, 证实印楝素通过触发 Ca^{2+} 释放诱导凋亡; 采用流式细胞仪结合 Fluo-3 AM 荧光探针检测到当 Ca^{2+} 途径受阻, 细胞通过蜕皮激素受体途径诱导凋亡; 结论: 印楝素通过触发 Ca^{2+} 释放诱导凋亡, 并发现 Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} -CaM 信号途径或蜕皮激素受体 ECR/ USP 级联信号途径诱导凋亡。

【关键词】 印楝素; 实时定量 PCR; Ca^{2+} -CaM 信号途径; 蜕皮激素受体; ECR/ USP 级联信号途径

0 前言

生物农药 (也称间接杀虫剂) 包括昆虫生长调节剂 (蜕皮激素、保幼激素等), 信息素, 抗孵剂, 拒食剂等, 它们绝大多数都是天然产物, 很容易降解, 不会在动植物体内或环境中积累, 因而越来越受到农药化学家的高度重视。印楝素具有广谱、高效、低毒、易降解、无残留、无抗药性等优点且对脊椎动物无危害, 是目前最具开发潜力的植物源农药^[1-2], 由于有效成分的组成和使用剂量的不同, 印楝素对昆虫可以表现出不同的生物活性: 印楝素及印楝素制剂对昆虫具有拒食、忌避、产卵忌避、生长调节、不育等多种作用^[3-4]。但其作用机理复杂, 作用机制还未清楚, 分子机制研究尚处于起步阶段。

之前课题组运用 AO/EB 染色法检测印楝素对果蝇 S2 细胞的抑制增殖作用主要是通过诱导细胞凋亡实现的^[5], 蛋白水平分析发现, 细胞骨架肌动蛋白及相关辅助蛋白在药物处理后均表达下调, 推论印楝素能作用于细胞骨架肌动蛋白, 引起果蝇发育异常和细胞凋亡等细胞缺陷, 同时, 也通过基因芯片检测发现印楝素引起细胞内凋亡途径下游的主效基因表达差异显著^[6]。但对于在凋亡作用途径中如何在细胞内启动凋亡相关作用信号通路还不清楚, 因此为了进一步弄清楚印楝素诱导细胞凋亡的信号通路, 课题组运用实时定量 PCR 技术及荧光检测胞内 Ca^{2+} 的方法对凋亡途径信号通路中的关键信号因子进行了检测, 以期明确印楝素诱导细胞凋亡的信号通路。

公司产品; 果蝇 S2 细胞 (购于武汉大学细胞典藏中心), 胎牛血清 (杭州四季青); Schneider 昆虫细胞培养基粉剂 (武汉创新生物); 其他普通化学试剂 (上海化学试剂厂分析级试剂), Fluo3-AM Ca^{2+} 探针试剂盒 (Dojindo, Kumamoto, Japan), Trizol 试剂 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), SYBR-Green I 嵌入染料 (Bio-Rad, Hercules, CA), 荧光定量 PCR 试剂盒, 荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler®480, Roche 公司); 核酸蛋白检测仪 (Nano Drop2000 型, 美国 Scientific Thermo 公司)。

2.2 方法

2.2.1 实时定量 PCR (RT-qPCR)

用 Trizol 试剂从 S2 细胞中提取总 RNA。cDNA 的合成按照厂家的说明用随机引物 oligo (dT) 15 和 M-MLV 逆转录酶 (Promega), 靶基因的引物设计列于表 1 中。GAPDH 和 U6 snRNA 用作内部对照。RT-qPCR 使用 SYBR-Green I 嵌入染料染色, 使用实时 PCR 系统 (Bio-Rad CFX 连接)。使用以下程序: 95℃ 5 分钟; 95℃ 15 秒, 40 个循环; 60℃, 15 秒; 72℃, 20 秒。RT-qPCR 数据由 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 分析, 以阴性对照组 GAPDH 基因表达倍数归一化后, 计算处理组各基因表达变化。所有的实验都是独立重复 3 次。

以合成的 cDNA 为模板, 按照荧光定量 PCR 试剂盒进行反应。反应体系如下:

2 试剂与方法

2.1 试剂

印楝素 A 标准品 (纯度 95%, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Sigma

反应成分	μL / 样本	μL /5 次反应	终浓度
TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) (2 $\times$)	25.0	125.0	1 $\times$
2 $\times$ Assays-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix (Assays-on-Demand™ 基因表达实验分型试剂)	2.5	12.5	1 $\times$
cDNA 样本	5.0	25.0	50 ng
无核酸酶水	17.5	87.5	-
总计	50.0	250	-

其中 TaqMan Universal PCR Master Mix, 2 $\times$ Assays-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix 均由 ABI 公司合成。把所有样品分装完成后载入 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪中进行检测。

表 1 RT-qPCR 引物列表

Table1 List of primers for RT-qPCR

No. Genes	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
1 akt	TCATGCGCTTACGGAACAGA	ATGGCGTGCTGGCACTATCT
2 argos	TTTGCCTGCTCTCCCTGAC	AACTCTCGCCGGCTATCACG
3 baz	CGACGTTTCGATTCTGGTTC	ATGCCGACTGTGTCTGGAG
4 bcl2	CAACCAGGGGAAATGTCTGTG	GTTCACTGCGGGAAAACCTTC
5 CaM	GATGGCACCATCACAACAAAGG	GCGTGCCAPTATGTAAGGAAT
6 cytc	CGTTCCTGCTGGTGATGTGA	TCCTCGTTCAGGTGATGCC
7 diap1	GCCGAGGAACCTGAAACAGAAG	CTTGACGAATCGGCACTGACTT
8 diap2	GATTCCATCCAGCCAAACC	ACCTCTCGTCCAAGCATACC
9 drice	CTGACCCTGCTCACATTCGTGT	CCCACCGTTTATGCCATACCAT
10 ecr	GAGGAGCTGTGCTGTTTG	AGGCGGCACCTGACACTT
11 egr	AACGCGTGTATCGCATCTGG	CATCGTCGTCCTCTCTCA
12 eip93f	CAGCAGCAGCAGCAACAACA	TGAAGTCGCCAGCAGTGAG
13 grim	CATGGCCATCGCCTATTTC	ATGATGTCGCTGCTGCTGCT
14 hid	GGCGATCGCTACGACAACCT	GTCGCTGCTGACTGATGTGG
15 hsp70	CTTCCACGGCAAGAACCTCA	ACACCTCCAGCGGTCTCAAT
16 mam	CCAGCCAGATGCAGATGACC	CCGCCACCATTTGTTGTTGT
17 p53	CGAAGAAGATGAGCCGTCCA	ATGCTCTGCAGCAGCCATTC
18 rdx	TGCGTCTGTCTCTGCTCCATC	TCAACAGCAGCAGATTCTCCAG
19 rpr	TACCCGATCAGGCGACTCTG	ATCCTCATTGCGATGGCTTG
20 skl	TCGTACGACAACCTGCCAAGAG	GCTATCGACTTGATCGCCACTG
21 sp7	AACAGCCCAGAGAGCACCATA	GTCAAAACCCCTTCGCATCAGC
22 xmas	GATCCTGACATTACGGCGGAGT	AGGCGTACGATCTCTGCTCACC

2.2.2 Ca^{2+} 浓度检测

Fluo-3 AM 是最常用的检测细胞内钙离子浓度的荧光探针之一, 使 Fluo-3-AM 试剂盒测量 Ca^{2+} 浓度 (Dojindo, Kumamoto, 日本), 监测细胞内 Ca^{2+} 浓度变化。细胞用添加印楝素 ($2 \times 10^{-3} \text{g l}^{-1}$)、三氟拉嗪盐酸盐 ($1 \times 10^{-3} \text{g l}^{-1}$) 的 TC100 培养基培养, 细胞从培养板中取出并换用添加 $4 \mu\text{M}$ Fluo-3-AM 的 HBSS 缓冲液, 37°C 保持 20 分钟。

用 HEPES 缓冲盐水洗涤细胞 3 次, 离心沉淀 ($500 \times g$, 5min), 重悬浮 ($1 \times 10^5 \text{ml}^{-1}$) 在 1ml HEPES 缓冲盐水中, 立即于 37°C 、528 nm 处在 FACSCanto II 流式细胞仪上分析 Fluo-3 荧光强度 (Becton Dickinson, FranklinLakes, NJ)。

3 结果与分析

3.1 RT-qPCR 检测

之前研究小组检测到印楝素通过诱导细胞凋亡引起果蝇发育异常, 利用基因芯片技术检测到印楝素处理后, 与凋亡途径相关 22 个基因差异化表达, 其中, 钙调蛋白 (CaM) 基因上调 5.05, 为进一步了解这些差异表达基因诱导凋亡的具体途径, 我们对相关基因进行 RT-qPCR 检测, 结果如图 1。其中 6 个促凋亡 (rpr, CaM, cytc, hsp70, eip93f and p53) 基因在印楝素处理后持续上调, CaM 是差异表达倍数最高的基因; 另外一些促凋亡基因 (ecr, skl, hid, argos, grim and rdx) 在前期 (12-24h) 下调, 后期 (24-48h) 上调; 两个抗凋亡基因 (ced9/bcl2 and akt) 持续下调。

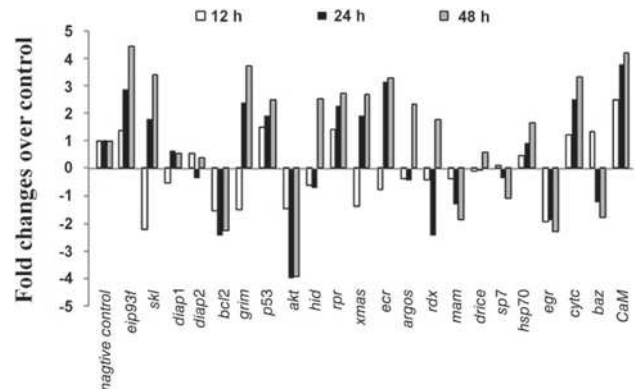


图 1 22 个凋亡基因 RT-qPCR 检测

Fig1 Analysis of expression of 22 apoptosis-related genes induced by azadirachtin A

3.2 Ca^{2+} 检测

如图 2 所示, 用 Fluo-3-AM 与 S2 细胞共同孵育 5min, 10min 和 30min, 细胞内 Ca^{2+} 浓度从 5min 开始显著增加。当用钙调蛋白抑制剂三氟拉嗪盐酸盐 (TH) 共同处理, 显示 Ca^{2+} 浓度在处理 5min 时是未加 TH 的 42.1 倍, 并在 30min 内 Ca^{2+} 浓度持续保持高水平 (32.7%)。

3.3 蜕皮激素途径基因检测

如图 3 所示, 我们对蜕皮激素信号相关的凋亡基因途径进行了进一步检测, 发现当用钙调蛋白抑制剂三氟拉嗪盐酸盐 (TH) ($1 \times 10^{-3} \text{g l}^{-1}$ for 12 and 24 h) 与印楝素共同处理细胞时, 诱导 CaM, rpr, bcl2, eip93f, E74 and BR-C 基因表达显著增加, 其中, BR-C 基因在处理 12h 后表达上调 83 倍。

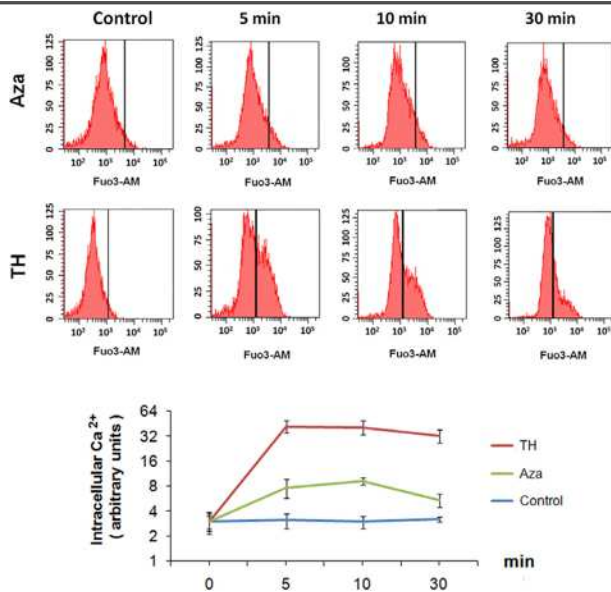


图2 钙离子荧光探针染色及流式细胞仪检测果蝇 S2 细胞印楝素诱导细胞内 Ca^{2+} 释放 (Aza=azadirachtin. TH=tri cytometry fluoperaze hydroczinhloride)

Figure 2 Azadirachtin-induced intracellular Ca^{2+} release in S2 cells using Fluo-3-AM dye and flow

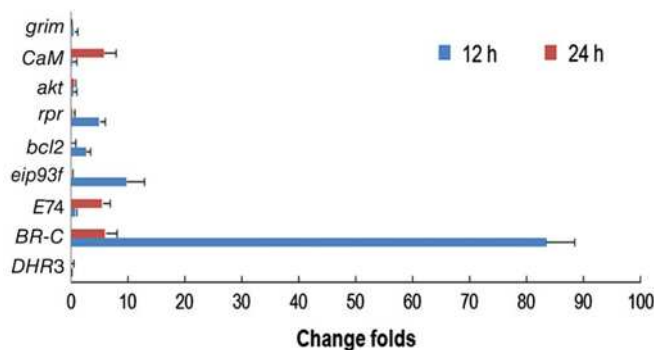


图3 TH 处理诱导 S2 细胞蜕皮激素信号途径凋亡基因表达分析

Figure 3 Analysis of expression of some ecdysone signalling and apoptosis genes induced in S2 cells by trifluoperazine hydrochloride.

【参考文献】

- [1] Radhaw a N.S, Parmar B.S, In: Lalo. P. ed. .Recent Advance in India En-omology[J]. APC Publications, 1996: 67-82.
- [2] Aritaku L.A, Ramaswamy S, Annadura I. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A[J]. Insect Bioc hemistry and Molecular Biology ,2007(37) : 627-63.
- [3] Kumar CH SSR, Malladi Srinivas, Shirish Yakkundi. Limonoids from the seeds of Azadirachta indica [J]. Phytochemistry. 1996, 43(2): 451-4557.
- [4] Yamasaki K.B, Klocke J.A, Mark Lee S. Isolation and purification of azadirachtin from neem (Azadirachta indica) seeds using flash chromatography and high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1986, 356: 220-226.
- [5] 徐霖, 杨明飞. 运用 MTT 比色法检测印楝素对果蝇 S2 细胞的毒力作用 [J]. 河南农业大学学报, 2012, 46(1): 72-75.
- [6] 徐霖, 冉雪琴, 王家福. 印楝素作用分子靶标的研究 [J]. 河南农业大学学报, 2014, 48(1) : 83-86.
- [7] Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P and Rizzuto R, Ca^{2+} signaling, mitochondria and cell death[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(2): 119-130.
- [8] Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD[J]. Science, 1999, 284: 339-343.

4 结论与讨论

RT-qPCR 检测数据表明: 6 个促凋亡 (rpr, CaM, cytC, hsp70, eip93f and p53) 基因在印楝素处理后持续上调, 其中 CaM 是差异表达倍数最高的基因; 另外一些促凋亡基因 (ecr, skl, hid, argos, grim and rdx) 在前期 (12-24h) 下调, 后期 (24-48h) 上调; 两个抗凋亡基因 (ced9/bcl2 and akt) 持续下调。我们发现, Ecr (先下调再上调) 与 eip93f (持续上调) 表现不同。进一步检测发现, 当用钙调蛋白抑制剂处理, 蜕皮激素信号途径凋亡基因 BR-C 上调显著。这表明由于印楝素 A 处理, 果蝇 S2 细胞中发生蜕皮激素受体信号转导。

Ca^{2+} 在控制细胞和组织生理代谢各个方面作为细胞信使发挥重要作用, 在有丝分裂及细胞死亡程序的调控等方面中也起着主要作用 [7-9]。如我们观察到的, 细胞内 Ca^{2+} 释放会触发细胞增殖, 分化和合成代谢基因的表达。当 Ca^{2+} 释放会破坏细胞内 Ca^{2+} 平衡并诱导细胞内死亡信号基因在错误时间和错误地点的表达 [10-11], 我们的数据表明 Ca^{2+} 信号在印楝素诱导的毒性中起重要作用。

蜕皮激素受体 (EcR) 和超螺旋体 (Usp) 的异二聚体是核受体 [12]。EcR / Usp 复合物与蜕皮激素结合并诱导早期基因 E93, BR-C, E74 和 E74 的转录 [13]。这种异二聚体复合物以及 E93, BR-C 和 E74 蛋白依次激活了几种促死亡基因的转录, 包括 rpr, hid 和 grim; 因此, 当用 TH 阻断钙调蛋白通路, BR-C 基因上调说明当凋亡诱导途径 Ca^{2+} 通路受阻则启动蜕皮激素受体途径。印楝素作为一种外源性植物蜕皮激素, 之前的研究已发现印楝素可增强蜕皮激素中蜕皮激素激动剂 RH-2485 的作用 [14], 并在转基因果蝇系统中激活 GAL4-ecr 和 GAL4-Usp [15], 我们的研究也从另一个角度阐释了印楝素诱导细胞凋亡的途径。

因此, 我们的研究表明: 印楝素是通过介导细胞内 Ca^{2+} 的释放, 通过 Ca^{2+} -CaM 信号途径或蜕皮激素受体 ECR/ USP 途径诱导细胞凋亡。

- [9] Tombal B, Weeraratna AT, Denmeade SR and Isaacs JT, Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-independent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells[J]. *Prostate*, 2000, 43:303–317.
- [10] Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis[J]. *Cell Calcium*, 2006, 40:553–560.
- [11] Stefan MI, Marshall DP and Le Novère N, Structural analysis and stochastic modelling suggest a mechanism for calmodulin trapping by CaMKII[J]. *PLoS ONE* 2012, 7:e29406 .
- [12] Cakouros D, Daish T, Martin D, Baehrecke EH and Kumar S, Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in *Drosophila* is regulated by Broad-Complex[J]. *J Cell Biol*, 2002, 157:985–996.
- [13] Baehrecke EH, Steroid regulation of programmed cell death during *Drosophila* development[J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7:1057–1062 .
- [14] Adel MM and Sehnal F, Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*[J]. *J Insect Physiol*, 2000, 46:267–274.
- [15] Palanker L, Necakov AS, Sampson HM, Ni R, Hu C, Thummel CS. Dynamic regulation of *Drosophila* nuclear receptor activity in vivo[J]. *Development*, 2006, 133:3549–3562.