

· 基础研究 ·

## 双硫仑通过上调 GADD45A 抑制胰腺癌细胞增殖的机制研究

陆 辰<sup>1</sup>,狄亚萱<sup>1</sup>,刘方舟<sup>2</sup>,李欣妍<sup>1</sup>,高 俊<sup>1</sup>,冯振卿<sup>1</sup>,张 晓<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学国家卫生健康委抗体技术重点实验室,江苏 南京 211166;<sup>2</sup>南京医科大学附属肿瘤医院头颈外科,江苏 南京 210009

**[摘 要]** 目的:通过体外实验评估双硫仑(disulfiram, DSF)对人胰腺癌细胞增殖、细胞周期的影响并初步探讨可能作用机制。方法:不同浓度梯度的DSF联合Cu(DSF/Cu)处理人胰腺癌PANC-1和PATU8988T细胞,CCK-8法检测细胞增殖活性及药物对细胞的增殖抑制率;选取IC<sub>50</sub>浓度的DSF/Cu处理细胞,流式细胞术检测细胞周期分布情况,并采用荧光定量PCR和Western blot法检测各组细胞中生长阻滞和DNA损伤诱导基因45A(growth arrest and DNA damage inducible 45A, GADD45A),G2/M周期特异性蛋白CCNB1、CDC25C、CDK1的转录和翻译水平,同时检测MAPK通路相关蛋白P38和JNK蛋白磷酸化水平;siRNA干扰试验检测抑制GADD45A基因后细胞相对活力、细胞周期及MAPK通路相关蛋白磷酸化水平的变化。结果:DSF联合Cu对人胰腺癌细胞增殖具有明显抑制作用,且抑制率随DSF浓度增加而增加。DSF/Cu可明显上调GADD45A基因的表达,诱导细胞周期G2/M期阻滞,抑制G2/M周期特异性基因及蛋白的表达;Real-time PCR结果表明DSF/Cu处理PANC-1细胞和PATU8988T细胞24 h后GADD45A表达量升高,分别为对照组的11.4和7.99倍( $P$ 均 $<0.001$ );相应地,PANC-1细胞和PATU8988T细胞CCNB1、CDC25C、CDK1表达量下降,分别为对照组的31%、35%和37%( $P$ 均 $<0.05$ )及48%、24%和29%( $P$ 均 $<0.05$ ),差异有统计学意义。Western blot结果与RNA表达结果相对应,且呈浓度和时间依赖趋势。同时,MAPK信号通路相关蛋白磷酸化水平增高。siRNA-GADD45A干扰后细胞活力增加,G2/M细胞比例降低,MAPK信号通路磷酸化水平降低。结论:DSF/Cu可通过上调GADD45A并激活JNK/P38-MAPK信号通路诱导细胞周期G2/M阻滞,进而引起细胞增殖抑制,发挥抗肿瘤作用。

**[关键词]** DSF/Cu;胰腺癌;细胞周期;G2/M阻滞;GADD45A;P38;JNK

**[中图分类号]** R735.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)11-1575-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20201102

## Disulfiram inhibits the growth of pancreatic cancer cell via upregulation of GADD45A expression

LU Chen<sup>1</sup>, DI Yaxuan<sup>1</sup>, LIU Fangzhou<sup>2</sup>, LI Xinyan<sup>1</sup>, GAO Jun<sup>1</sup>, FENG Zhenqing<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Antibody Technology, National Health Commission, Nanjing Medical University, Nanjing 211166;

<sup>2</sup>Department of Head and Neck Surgery, Jiangsu Cancer Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to observe the effects of disulfiram (DSF) on the proliferation and cell cycle arrest in human pancreatic cancer cells, and to explore its mechanism. **Methods:** CCK-8 was used to detect the effects of DSF on the proliferation activity and the cycle distribution was detected by flow cytometry. Real-time PCR and Western blot were used to detect mRNA and protein expression of GADD45A, G2/M related CCNB1, CDC25C, and CDK1 genes and proteins. The phosphorylation of P38 and JNK in MAPK pathway were also detected. SiRNA assay was used to detect the changes of cell cycle and phosphorylation of proteins in MAPK pathway after growth arrest and DNA damage inducible 45A (GADD45A) genes were decreased. **Results:** DSF combined with Cu (DSF/Cu) inhibited the proliferation of pancreatic cancer cells in concentration-dependent trend. GADD45A was significantly increased in DSF treated groups (11.4 times of control group in PANC-1 cells and 7.99 times of control group in PATU8988T cells,  $P < 0.001$ , respectively). The cells were mainly blocked in G2/M phase and CCNB1, CDC25C and CDK1 genes were significantly decreased (31%, 35%, 37% of control in PANC-1 cells and 48%, 24%, 29% of control in PATU8988T cells,  $P < 0.05$ , respectively) after treated 24 hours. The proteins showed the same results with the mRNA expression while the p-P38 and p-JNK were increased in

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81872426);江苏省自然科学基金(BK20181372)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangxiao@njmu.edu.cn

dosage and time-dependent trend. Compared with the DSF treated groups, the groups of cells pretreated with siRNA-GADD45A showed an increasing relative viability and the percentage of G2/M phase cells was decreased. Meanwhile, the p-P38 and p-JNK were also decreased. **Conclusion:** DSF/Cu can significantly inhibit the proliferation and induce G2/M arrest in pancreatic cancer cells. Its anti-tumor effect may attribute to upregulating GADD45A and activating JNK/P38 MAPK signaling pathway.

[Key words] DSF/Cu; pancreatic cancer; cell cycles; G2/M arrest; GADD45A; P38; JNK

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(11): 1575-1582]

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是恶性程度极高的肿瘤,预后差,5年生存率低于5%。在美国,胰腺癌约占癌症致死原因的6%,居肿瘤相关死亡的第4位<sup>[1]</sup>。在中国,胰腺癌发病率和死亡率均呈增长趋势。2015年,中国男性肿瘤中胰腺癌的发病率和死亡率均已上升到第6位<sup>[2]</sup>。双硫仑(disulfiram, DSF)又名戒酒硫,是临床上已经使用了近百年的抗酗酒药物,安全性好,价格低廉<sup>[3]</sup>。近年来,有研究表明其还可以抑制神经胶质瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌、前列腺癌和白血病等肿瘤细胞的生长<sup>[4-8]</sup>,同时还可以提高某些化疗药物对实体瘤细胞的细胞毒作用。本课题组之前研究证实DSF/Cu具有抗肿瘤活性,可以诱导乳腺癌和胰腺癌细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>,还能明显增强癌细胞对传统化疗药物和放疗的敏感性<sup>[11]</sup>。本研究进一步通过细胞实验验证DSF/Cu对胰腺癌细胞的杀伤作用,并探讨其作用与生长阻滞和DNA损伤诱导基因45A(growth arrest and DNA damage inducible 45A, GADD45A)上调引起的细胞周期阻滞之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人胰腺癌细胞株PANC-1和PATU8988T细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃恒温培养箱中进行常规培养。每隔2d用EDTA-胰酶消化传代。

DSF、copper(II)D-gluconate(copper, Cu)(Sigma公司,美国);Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所,日本);DMEM培养基、胎牛血清、EDTA-胰酶、TRIzol、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit、Lipofectamine RNAi MAX(赛默飞公司,美国);BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液和DAPI染液(杭州碧云天生物技术有限公司);一抗兔源抗体GADD45A、p-P38、P38、JNK、p-JNK、CDC25C、CDK1、CCNB1和GAPDH(CST公司,美国),二抗HRP标记

山羊抗兔抗体(Jackson公司,美国),SYBR Green qPCR Master Mix(TaKaRa公司,日本),siRNA由上海吉玛生物科技有限公司设计合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 CCK-8法检测细胞增殖

取对数生长期的PANC-1和PATU8988T细胞,以 $5 \times 10^4$ 个/mL接种于96孔板,每孔100  $\mu$ L。实验共分为3组,每组设置3个复孔。空白对照组:仅加入DMEM完全培养基,无细胞;阴性对照组:正常生长的细胞,无DSF/Cu;实验组:含细胞和不同浓度的DSF(5.000 000 0、2.500 000 0、1.250 000 0、0.625 000 0、0.312 500 0、0.156 250 0、0.078 125 0、0.039 062 5  $\mu$ mol/L),并保持Cu浓度始终为1  $\mu$ mol/L。培养24 h和48 h后,移除培养基,每孔加入100  $\mu$ L稀释后的CCK-8工作液(1:10),37℃、5% CO<sub>2</sub>孵育2 h,在450 nm波长处测定吸光度值,实验重复3次。检测细胞相对活力,计算DSF对胰腺癌细胞的生长抑制率及半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值。选择IC<sub>50</sub>值为后续实验浓度。

#### 1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的PANC-1和PATU8988T细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种于6孔板,每孔2 mL。实验分为2组:对照组,正常生长的细胞;实验组,分别给予含终浓度为0.25 mol/L DSF、1  $\mu$ mol/L Cu(PANC-1细胞)或0.50 mol/L DSF、1  $\mu$ mol/L Cu(PATU8988T细胞)的完全培养基培养24 h后,弃培养基并用PBS洗涤2次,离心收集各组细胞,用提前预冷的75%乙醇固定过夜,用PI试剂染色,PBS清洗2次后,流式细胞仪检测细胞周期。

#### 1.2.3 实时荧光定量PCR

取对数生长期的PANC-1和PATU8988T细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种于6孔板中,每孔2 mL。实验分为2组:对照组,正常生长的细胞;实验组,分别给予含终浓度为0.25 mol/L DSF、1  $\mu$ mol/L Cu(PANC-1细胞)或0.50 mol/L DSF、1  $\mu$ mol/L Cu(PATU8988T细胞)的完全培养基培养8、24 h。TRIzol试剂提取



细胞总 RNA 后测定其纯度和浓度,按照逆转录试剂盒操作说明书合成 cDNA,反应完成后将 cDNA 用 RNase-free 水稀释至 100 μg/mL,置于-20 ℃保存。配制 20 μL 反应体系:SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL,双蒸水 8.2 μL,上游引物(10 μmol/L)0.4 μL,下游引物(10 μmol/L) 0.4 μL,cDNA 1.0 μL。反应条件为:95 ℃,10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。反应结束后确认扩增曲线和熔解曲线,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法算出相对值,以相对倍数表示。

RT-PCR 所需的引物序列由上海生物工程公司合成,扩增时以 GAPDH 作为内参照,PCR 引物序列和产物长度见表 1。

| 表 1 实时荧光定量 PCR 引物<br>Table 1 Real-time PCR primers |                            |        |
|----------------------------------------------------|----------------------------|--------|
| 引物名称                                               | 引物序列(5'→3')                | 扩增片段长度 |
| GADD45A                                            | 上游:CGAAAGGATGGATAAGGTG     | 197 bp |
|                                                    | 下游:GGATCAGGGTGAAGTGA       |        |
| CDK1                                               | 上游:GGAATACCTATCAGAGTAT     | 186 bp |
|                                                    | 下游:CCTGAAGAGTTGATCAAT      |        |
| CDC25C                                             | 上游:TTCCTCTTTTTACACCCAGTCA  | 173 bp |
|                                                    | 下游:TCGGTTGTCAAGGTTTGTAGTTC |        |
| CCNB1                                              | 上游:GACCTGTGTGACGGCTTTCTCTG | 154 bp |
|                                                    | 下游:GGTATTTTGGTCTGACTGCTTGC |        |
| GAPDH                                              | 上游:GAAGGTGAAGGTCGGAGTC     | 225 bp |
|                                                    | 下游:GAAGATGGTGATGGG ATTTTC  |        |

1.2.4 免疫印迹实验检测 GADD45A、细胞周期蛋白及 MAPK 通路相关蛋白的表达

将 PANC-1 和 PATU8988T 细胞分为 5 组,实验组分别经过不同浓度 DSF/Cu(0.25 μmol/L、1 μmol/L、0.50 μmol/L、1 μmol/L)处理 8、24 h,阴性对照组为正常生长的细胞。RIPA 裂解后提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。各组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电转至硝酸纤维素膜上,无蛋白快速封闭液在室温条件下封闭 30 min,分别加入一抗:GADD45A、CCNB1、CDC25C、CDK1、P38、p - P38、JNK、p-JNK 和 GAPDH(以 1:1 000 比例稀释),置于 4 ℃孵育过夜。使用 PBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体(以 1:2 000 比例稀释)在室温孵育 1 h,再用 PBST 清洗 5 次,最后使用 ECL 发光显色液对蛋白表达情况进行检测。

1.2.5 siRNA 干扰试验

取对数生长期的 PANC-1 和 PATU8988T 细胞,以 2×10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 12 孔板各孔中培养过夜。实

验分为 4 组:正常生长的细胞(对照组),正常生长的细胞经 DSF/Cu 处理 24 h(DSF/Cu 组),特异性抑制 GADD45A 的小干扰 RNA 组(siRNA-GADD45A 组),阴性对照组(siRNA-NC 组)转染细胞 48 h 后再用 DSF/Cu 处理 24 h。收集各组细胞,CCK-8 检测细胞相对活力,流式细胞仪检测细胞周期,Western blot 检测 GADD45A 及 MAPK 通路相关蛋白 p-P38 和 p-JNK 蛋白磷酸化的变化。

1.3 统计学方法

数据采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析,结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示,两组样本均数间比较采用 *t* 检验。不同处理时间之间的差异比较采用卡方检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DSF/Cu 可抑制胰腺癌细胞的增殖

与对照组相比,不同浓度的 DSF 联合 Cu 作用于胰腺癌细胞 24 h 和 48 h 后,其存活率均显著降低(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),且浓度越大,细胞的存活率越低(图 1A、B),DSF 对细胞的生长抑制率越高,二者均呈浓度依赖趋势(图 1C、D)。

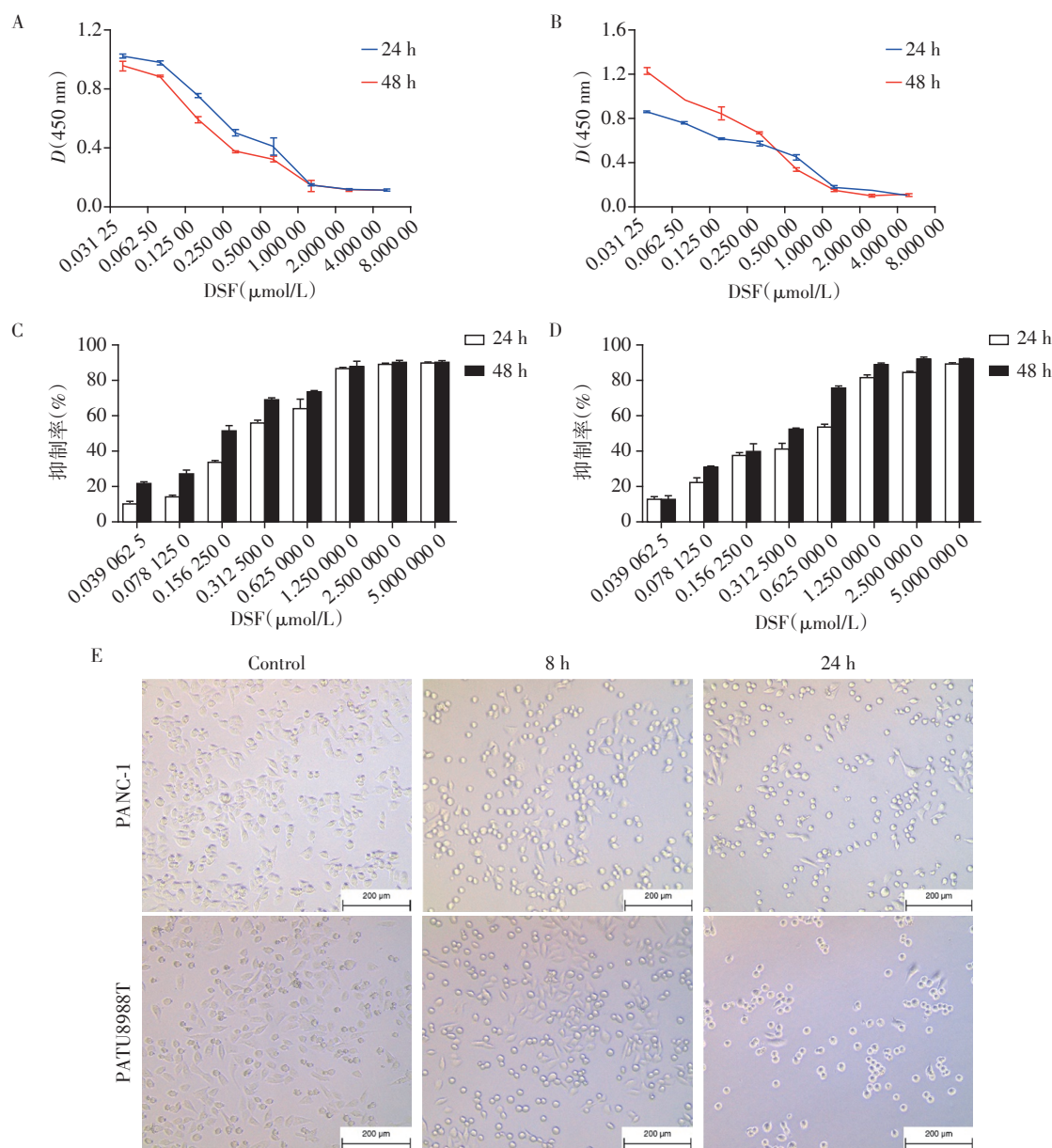
Graphpad Prism 8.0 软件分析获得 DSF/Cu 处理 PANC-1 细胞 24 h 和 48 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.2567 μmol/L 和 0.1382 μmol/L。DSF 处理 PATU8988T 细胞 24 h 和 48 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.435 9 μmol/L 和 0.225 2 μmol/L。基于此,后续试验分别选取 0.25 μmol/L、1 μmol/L 与 0.50 μmol/L、1 μmol/L 为 DSF/Cu 处理 PANC-1 和 PATU8988T 细胞的给药浓度,给药时间为 24 h。且所选浓度处理细胞 8 h 时即可观察到其形态发生明显变化,部分细胞变圆、稍发亮甚至漂浮,处理 24 h 后绝大多数细胞变圆、脱落至漂浮状态(图 1E)。

2.2 DSF/Cu 可将胰腺癌细胞周期阻滞于 G2/M 期

经 DSF/Cu 处理 24 h 的 PANC-1 和 PATU8988T 细胞周期分布见图 2。各组检测细胞总数均为 10 000 个,细胞周期检测显示,与对照组相比,DSF/Cu 处理组 S 期细胞百分比均较对照组显著降低(*P* < 0.05,表 2),G2/M 期细胞百分比均较对照组显著增加(*P* < 0.05,表 2);而 G0/G1 期细胞百分比与对照组比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.3 DSF/Cu 可上调 GADD45A 及降低细胞周期相关基因及蛋白的表达

与对照组相比,DSF/Cu 处理后的胰腺癌细胞中 GADD45A mRNA 均明显升高。Real-time PCR 结果



A、B:不同浓度DSF处理PANC-1细胞(A)和PATU8988T细胞(B)后相对活力变化;C、D:不同浓度DSF对PANC-1细胞(C)和PATU8988T细胞(D)的抑制率;E:DSF处理后细胞形态学变化。

图1 不同浓度的DSF联合Cu对胰腺癌细胞增殖的影响

Figure 1 Effects of disulfiram combined with copper on the proliferation of pancreatic cancer cells

表明DSF/Cu处理PANC-1细胞8、24 h后,GADD45A表达量升高,分别为对照组的4.72倍( $P < 0.01$ )、11.4倍( $P < 0.001$ );DSF/Cu处理PATU8988T细胞8、24 h后GADD45A表达量也升高,分别为对照组的2.66倍( $P < 0.01$ )、7.99倍( $P < 0.001$ )。相应地,在G2/M期转换中发挥重要作用的蛋白的mRNA水平被DSF/Cu明显抑制,DSF/Cu处理PANC-1细胞8 h后,CCNB1、CDC25C、CDK1分别为对照组的65%、40%、85%,处理24 h后分别为对照组的31%、35%、37%,差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ,图3A)。

DSF/Cu处理PATU8988T细胞8 h后,CCNB1、

CDC25C、CDK1表达量较对照组也呈下降趋势,分别为对照组的59%、38%、35%,处理24 h后分别为对照组的48%、24%、29%( $P$ 均 $< 0.05$ ,图3B)。随着处理时间的增加,相关基因的表达变化越明显,呈时间依赖趋势( $P < 0.05$ )。

与对照组相比,Western blot检测证明DSF/Cu处理后可上调各组细胞中GADD45A蛋白的表达,而细胞周期相关蛋白CCNB1、CDC25C、CDK1的蛋白表达均被DSF/Cu明显抑制(图3C),且呈时间和浓度依赖趋势,进一步提示胰腺癌细胞发生细胞周期G2/M期阻滞。

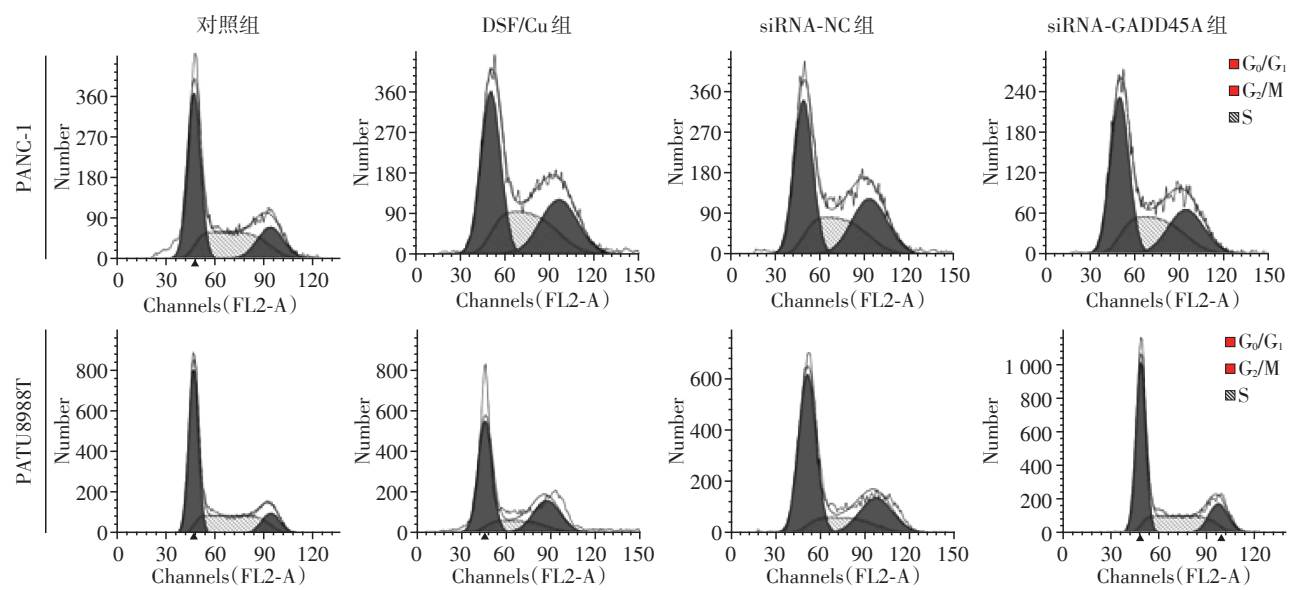


图2 各组细胞周期分布的流式图

Figure 2 Flow cytometry of cell cycle distribution in each group

表2 各组细胞周期百分比

Table 2 The percentage of cell cycle in each group (%)

| 细胞       | 组别              | G0/G1 期 | S 期    | G2/M 期 |
|----------|-----------------|---------|--------|--------|
| PANC-1   | 对照组             | 51.39   | 35.79  | 12.82  |
|          | DSF/Cu 组        | 52.28   | 18.96* | 28.56* |
|          | siRNA-NC 组      | 57.67   | 18.03  | 24.3   |
|          | siRNA-GADD45A 组 | 51.15   | 31.44# | 17.41# |
| PATU898T | 对照组             | 47.76   | 34.39  | 17.85  |
|          | DSF/Cu 组        | 42.02   | 28.97* | 29.01* |
|          | siRNA-NC 组      | 42.15   | 30.87  | 26.99  |
|          | siRNA-GADD45A 组 | 45.24   | 30.38  | 24.38  |

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与 DSF/Cu 组比较,# $P < 0.05$ 。

2.4 DSF/Cu 可上调 GADD45A 并激活 MAPK 通路导致细胞增殖抑制

与对照组相比,DSF/Cu 处理后的细胞 p-P38 和 p-JNK 的蛋白表达均升高(图 4),且呈浓度和时间依赖趋势,P38、JNK 无变化,证明 DSF/Cu 可激活 MAPK 信号通路,从而抑制细胞增殖。

siRNA 干扰试验结果证明:siRNA-GADD45A 能明显减弱 DSF/Cu 对胰腺癌细胞的杀伤作用,细胞活力显著升高(图 5A、B),siRNA-NC 组的细胞无明显变化。siRNA-GADD45A 转染后再经 DSF/Cu 处理的胰腺癌细胞 G2/M 期细胞的比例与 DSF/Cu 组比较降低(图 2,表 2),证明了细胞周期阻滞与 GADD45A 的升高相关。

另一方面,siRNA-NC 组细胞中 p-P38 和 p-JNK 的蛋白水平与 DSF/Cu 组相比,差异没有统计学意义;siRNA-GADD45A 组细胞中 p-P38 和 p-JNK 蛋白水平

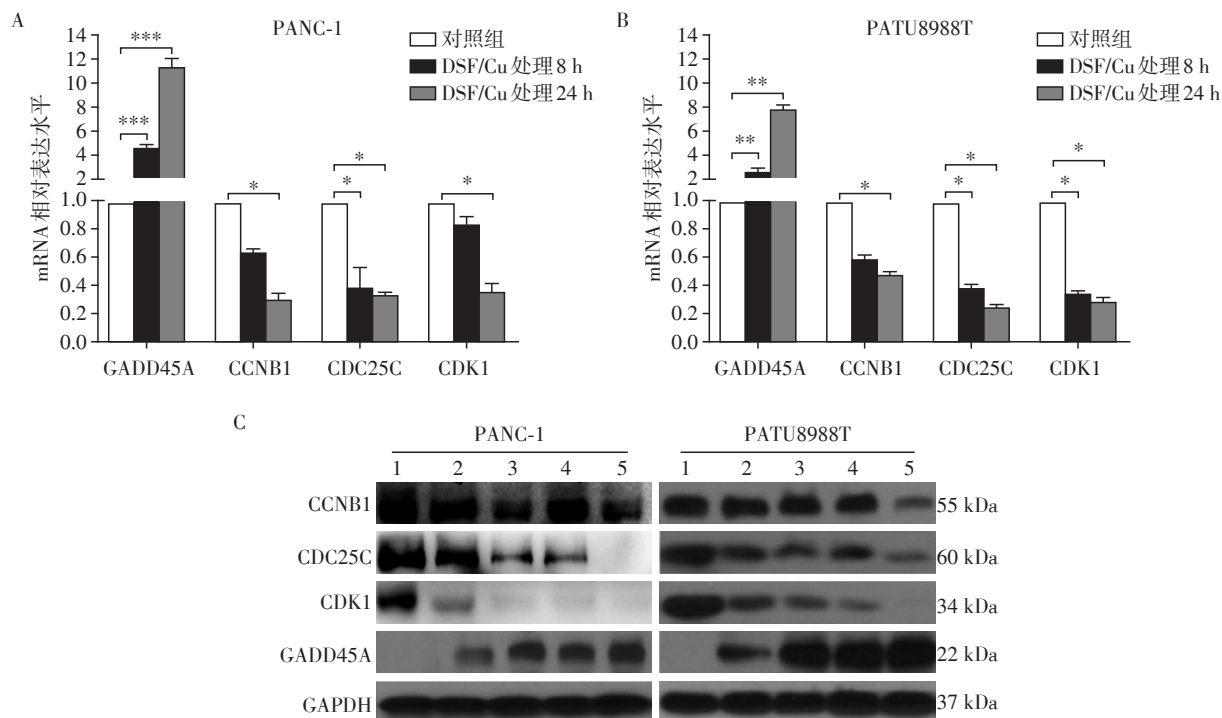
与 DSF/Cu 组、siRNA-NC 组相比明显降低,说明转染 siRNA-GADD45A 可以降低胰腺癌细胞中 p-P38 和 p-JNK 蛋白的表达(图 5C)。证明了抑制 GADD45A 基因表达可抑制 MAPK 信号通路 p-JNK、p-P38 蛋白的表达。

以上结果证明了 DSF 可能是通过提高 GADD45A 基因和蛋白的表达进一步激活 JNK 和 P38 激酶,诱导细胞停留在 G2/M 期,最终导致胰腺癌细胞的增殖抑制及凋亡。

3 讨论

近年来大量基础及临床前研究证实,DSF 与多种二价金属阳离子如铜、锌、镉等螯合后,可以显著增强其抗肿瘤活性。来自丹麦、美国、捷克的研究人员合作,就丹麦 2000—2013 年间的 24 万例癌症患者的医疗数据进行分析,发现长期持续服用 DSF

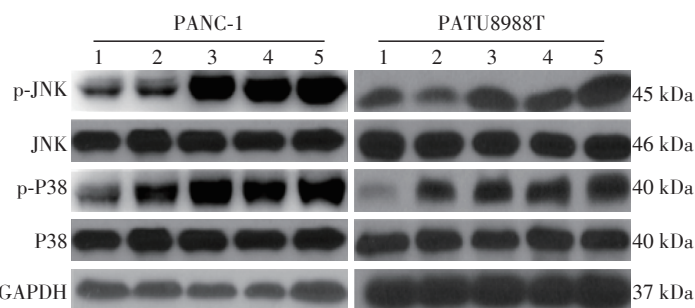




A: PANC-1 cells mRNA relative expression levels; B: PATU8988T cells mRNA relative expression levels; C: Western blot detection of protein expression levels. 1: Control; 2: DSF 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 8 h; 3: DSF 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 24 h; 4: DSF 0.50  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 8 h; 5: DSF 0.50  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 24 h. Two groups compared, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ .

图3 DSF/Cu对胰腺癌细胞GADD45A及G2/M期相关基因mRNA及蛋白表达水平的影响

Figure 3 The mRNA and protein expression of GADD45A and G2/M related genes in pancreatic cancer cells after DSF/Cu treated



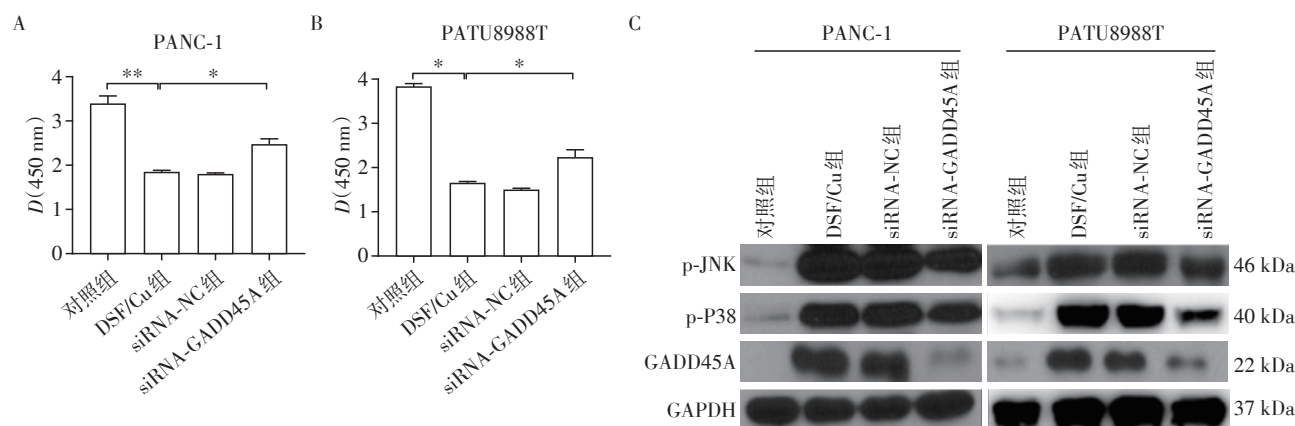
1: Control; 2: DSF 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 8 h; 3: DSF 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 24 h; 4: DSF 0.50  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 8 h; 5: DSF 0.50  $\mu\text{mol/L}$ , Cu 1  $\mu\text{mol/L}$  treatment 24 h.

图4 DSF/Cu对胰腺癌细胞中MAPK相关蛋白P38 and JNK磷酸化表达的影响

Figure 4 Phosphorylation of P38 and JNK in MAPK pathway in pancreatic cancer cells after DSF/Cu treated

的癌症患者,相比于没有服用DSF的患者,病死率降低34%<sup>[12]</sup>。2015年1项包含42例IV期非小细胞肺癌患者的二期临床试验表明,相比单独化疗,DSF联合化疗可以使患者的生存期延长41%<sup>[6]</sup>。本研究结果也表明,不同浓度DSF对胰腺癌细胞增殖均具有抑制作用,流式细胞分析发现,DSF能显著诱导胰腺癌细胞凋亡<sup>[13]</sup>,同时将细胞周期阻滞于G2/M期,因此,DSF有望作为一种廉价的化疗药物用于胰腺癌治疗。

CCNB1是高度保守的细胞周期家族蛋白,能够调控细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)从而协调细胞增殖,CCNB1和CDK1可组成成熟促进因子(mature promoting factor, MPF),是有丝分裂调控的关键点,其活性调节在有丝分裂过程中起重要作用。CCNB1、CDC25C及CDK1均是细胞周期调控中的关键基因,在调控细胞周期G2/M转换过程中有重要作用<sup>[14]</sup>。当其活性受抑制时,G2期检查点的总开关处于“关闭”状态,发生G2/M期阻滞<sup>[15]</sup>。在对头颈癌、



A: PANC-1 细胞各组吸光度值比较; B: PATU8988T 细胞各组吸光度值比较; C: 各组 PANC-1 和 PATU8988T 细胞 MAPK 通路相关蛋白的 Western blot 检测结果。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n=3$ 。

图5 siRNA-GADD45A 干扰后细胞活力及 MAPK 通路相关蛋白磷酸化的变化

Figure 5 Changes of relative viability and phosphorylation of proteins in MAPK pathway after siRNA-GADD45A treatment

肝癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤的研究发现,CCNB1 和 CDC25C 的 mRNA 和蛋白表达增加<sup>[16-19]</sup>,同时 CDK1 表达水平也增加。提示三者在肿瘤发生发展过程中起重要作用,相互作用于细胞周期,促进细胞增殖。进一步研究表明,抑制或干扰 CCNB1 和 CDC25 基因可明显导致细胞增殖减少<sup>[20-21]</sup>,特别是抑制 CCNB1 可导致细胞 G2/M 期明显阻滞,本研究中 DSF 能显著下调 CCNB1 和 CDC25C 蛋白表达,使细胞阻滞于 G2/M 期,因此,DSF 有一定的抗肿瘤活性。

GADD45 是 DNA 损伤修复相关的重要基因<sup>[22-23]</sup>,其包含 GADD45 $\alpha$ 、GADD45 $\beta$  和 GADD45 $\gamma$ ,在体内经诱导分别产生 GADD45A 蛋白、GADD45B 蛋白和 GADD45G 蛋白。GADD45A 作为细胞生长阻滞和 DNA 损伤调节基因<sup>[24]</sup>,在细胞损伤反应中通过不同途径发挥作用,维持基因组稳定,抑制肿瘤细胞增殖。研究显示,GADD45A 的低表达与乳腺癌的不良预后相关,可作为乳腺癌恶性程度的预测指标<sup>[25]</sup>。GADD45A 蛋白可由多种损伤因素诱导快速产生<sup>[26]</sup>,在调控 G2/M 细胞周期监测点和维持细胞基因组的稳定性中起重要作用<sup>[27]</sup>,可通过多种途径导致细胞凋亡<sup>[28]</sup>。文献报道,GADD45 蛋白成员可通过激活 N 端激酶和 MAPK 信号途径来介导细胞凋亡<sup>[29]</sup>。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是体内一条重要的信号转导途径,涉及细胞生长、分化和发育等过程,与肿瘤、心血管疾病和炎症等多种疾病发生发展密切相关。P38、JNK 是 MAPK 信号通路的重要分支<sup>[30]</sup>,其磷酸化水平升高后可以促进细胞凋亡的发生,肿瘤组织磷酸化水平异常降低。研究显示,GADD45A 在乳腺癌中通过调控下游信号通路 P38、JNK 的激活影响乳腺癌细胞的生长和调

亡。本研究结果显示,抑制 GADD45A 表达可减弱 DSF 对 p-P38、p-JNK 蛋白表达的上调作用,干扰 GADD45A 可通过抑制 TNF/P38-MAPK 信号通路减弱细胞损伤。

综上所述,DSF/Cu 可通过上调 GADD45A 并激活 JNK/P38-MAPK 信号通路,诱导细胞周期 G2/M 阻滞进而引起细胞增殖抑制,发挥抗肿瘤作用。另一方面,由于 MAPK 通路的诱导因素多样且下游通路复杂,下一步将深入探讨 DSF 诱导细胞凋亡可能的其他机制,为其用于胰腺癌的临床治疗提供更多的理论依据。

#### 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [3] SUH J J, PETTINATI H M, KAMPMAN K M, et al. The status of disulfiram: a half of a century later[J]. J Clin Psychopharmacol, 2006, 26(3): 290-302
- [4] HUANG J, CHAUDHARY R, COHEN A L, et al. A multi-center phase II study of temozolomide plus disulfiram and copper for recurrent temozolomide-resistant glioblastoma[J]. J Neurooncol, 2019, 142(3): 537-544
- [5] PAPAIOANNOU M, MYLONAS I, KAST R E, et al. Disulfiram/copper causes redox-related proteotoxicity and concomitant heat shock response in ovarian cancer cells that is augmented by auranofin-mediated thioredoxin inhibition[J]. Oncoscience, 2014, 1(1): 21-29
- [6] NECHUSHTAN H, HAMAMREH Y, NIDAL S, et al. A phase II b trial assessing the addition of disulfiram to che-

- motherapy for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Oncologist*, 2015, 20(4):366-367
- [7] SCHWEIZER M T, LIN J, BLACKFORD A, et al. Pharmacodynamic study of disulfiram in men with non-metastatic recurrent prostate cancer[J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013, 16(4):357-361
- [8] BISTA R, LEE D W, PEPPER O B, et al. Disulfiram overcomes bortezomib and cytarabine resistance in Down-syndrome-associated acute myeloid leukemia cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):22
- [9] WANG Y, LI W, PATEL S S, et al. Blocking the formation of radiation-induced breast cancer stem cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(11):3743-3755
- [10] CONG J, WANG Y, ZHANG X, et al. A novel chemoradiation targeting stem and nonstem pancreatic cancer cells by repurposing disulfiram[J]. *Cancer Lett*, 2017, 409:9-19
- [11] DUFOUR P, LANG J M, GIRON C, et al. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study[J]. *Biotherapy*, 1993, 6(1):9-12
- [12] SKROTT Z, MISTRIK M, ANDERSEN K K, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4[J]. *Nature*, 2017, 552(7684):194-199
- [13] ZHANG X, HU P, DING S Y, et al. Induction of autophagy-dependent apoptosis in cancer cells through activation of ER stress: an uncovered anti-cancer mechanism by anti-alcoholism drug disulfiram[J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(6):1266-1281
- [14] KAUFMANN W K, PAULES R S. DNA damage and cell cycle checkpoints[J]. *FASEB J*, 1996, 10(2):238-247
- [15] WANG R, HE G, NELMAN-GONZALEZ M, et al. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition[J]. *Cell*, 2007, 128(6):1119-1132
- [16] CHEN C Y, HSU Y L, TSAI Y C, et al. Kotomolide A arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(7):2476-2484
- [17] ESMAEILI M A, FARIMANI M M, KIAEI M. Anticancer effect of calycopterin via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways, ROS-mediated pathway and mitochondrial dysfunction in hepatoblastoma cancer (HepG2) cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 397(1-2):17-31
- [18] LIU J, GE Y Y, ZHU H C, et al. Fenofibrate increases radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma via inducing G2/M arrest and apoptosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(16):6649-6655
- [19] OZEN M, ITTMANN M. Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(13):4701-4706
- [20] XIA Y, LEI Q, ZHU Y, et al. SKLB316, a novel small-molecule inhibitor of cell - cycle progression, induces G2/M phase arrest and apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2):297-309
- [21] YUAN J, KRAMER A, MATTHESS Y, et al. Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2006, 25(12):1753-1762
- [22] HOLLANDER M C, KOVALSKY O, SALVADOR J M, et al. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6):2487-2491
- [23] JIN S, ANTINORE M J, LUNG F D, et al. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22):16602-16608
- [24] TRAN H, BRUNET A, GRENIER J M, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein [J]. *Science*, 2002, 296(5567):530-534
- [25] 高其忠, 费伯健, 冯一中. Gadd45a 和 p53 在乳腺癌中的表达及临床病理意义 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2012, 32(2):226-230
- [26] LI Q, WEI X, ZHOU Z W, et al. GADD45alpha sensitizes cervical cancer cells to radiotherapy via increasing cytoplasmic APE1 level [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):524
- [27] JIN S, TONG T, FAN W, et al. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity [J]. *Oncogene*, 2002, 21(57):8696-8704
- [28] ZHAN Q, ANTINORE M J, WANG X W, et al. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45 [J]. *Oncogene*, 1999, 18(18):2892-2900
- [29] HILDESHEIM J, BELOVA G I, TYNER S D, et al. Gadd45a regulates matrix metalloproteinases by suppressing DeltaNp63alpha and beta-catenin via p38 MAP kinase and APC complex activation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(10):1829-1837
- [30] WAGNER E F, NEBREDA A R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8):537-549

[收稿日期] 2020-08-28