

STAT3 与 MAPK 蛋白协同调节 肿瘤坏死因子- α 转录活性*

杨丽萍¹⁾ 姚咏明^{1)**} 李杰萍²⁾ 叶棋浓²⁾ 盛志勇¹⁾¹⁾解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048; ²⁾军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850

摘要 探讨信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)在体内是否存在相互作用, 并观察其作用如何影响肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)的转录活性. 采用聚合酶链反应技术, 从人 Flag-p38 和 Flag-细胞外信号蛋白调节激酶 2(extracellular-signal regulated protein kinase 2, ERK2)中扩增出 p38 和 ERK2 基因, 将其插入载体 pcDNA3-HA 中; 用 Western blot 方法在 293T 细胞中检测其表达后应用免疫共沉淀技术检测 STAT3 蛋白与 p38/ERK2 蛋白之间是否存在相互作用. 然后应用报告基因技术检测这种相互作用如何影响 TNF- α 的转录表达, 并在应用 RNA 干扰技术将 STAT3 通路抑制后, 观察 TNF- α 启动子转录活性如何变化. 酶切和测序结果表明, 扩增的 p38 和 ERK2 基因序列正确, 大小为 1 080 bp, 在 293T 细胞中正确表达大小约 40 ku 的 p38 和 ERK2 蛋白. 免疫共沉淀实验结果证实, p38 和 STAT3 蛋白以及 ERK2 和 STAT3 蛋白在体内相互作用. 下游基因 TNF- α 荧光素酶活性实验显示, p38 和 STAT3 蛋白以及 ERK2 和 STAT3 蛋白复合物协同升高 TNF- α 的活性, 应用 STAT3 的干扰 RNA 后其活性则明显下降. 该研究表明, STAT3 和 p38/ERK2 蛋白在体内存在相互作用, STAT3 与 p38、STAT3 与 ERK2 均对 TNF- α 的表达发挥协同效应, 在阻断 STAT3 通路后, STAT3 与 p38、STAT3 与 ERK2 对 TNF- α 表达的协同效应将明显降低.

关键词 信号转导及转录激活因子 3, p38 丝裂原活化蛋白激酶, 细胞外信号蛋白调节激酶, 肿瘤坏死因子- α

学科分类号 R374+.1, R392.3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00552

近年来, 人们发现参与失控性炎症反应及脓毒症(sepsis)病理过程的多条信号通路之间存在着交汇作用(cross-talk), 这使得脓毒症的发生机制变得更加错综复杂. 其中对丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、信号转导和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)通路的研究取得了一定的进展, 它们均可被内毒素直接和间接地激活, 而它们之间是否存在交汇作用并不清楚^[1,2]. 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)作为重要的早期炎症细胞因子, 与脓毒症的发生与发展过程密切相关^[3]. 本实验旨在观察 MAPK 和 STAT3 通路之间是否存在交汇作用, 同时这种相互作用如何影响 TNF- α 的转录活性, 进一步明确通路之间的交汇作用对 TNF- α 表达水平影响的分子机制, 从而丰富脓毒症的发生机制中信号通路的认识, 并为其有效调节提

供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

SV40 病毒转化的人胚胎肾细胞 293T 由解放军总医院全军烧伤研究所保存. pc-DNA3 载体购自 Promega 公司; 表达 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)的大肠杆菌 DH5 α 由解放军总医院全军烧伤研究所保存; 人的 Flag-p38 和 Flag-细胞外信号蛋白调节激酶 2(extracellular-

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB522602)和国家自然科学基金(30672178)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66867394, E-mail: c_ff@sina.com

收稿日期: 2009-03-26, 接受日期: 2009-05-04

signal regulated protein kinase 2, ERK2)质粒和人全长 TNF- α 启动子的报告基因质粒由北京大学顾军教授馈赠; 限制性内切酶、DNA 连接酶、Taq 酶购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒购自申能博彩公司; DMEM 培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; HA-HRP 抗体和抗 Flag 磁珠购自 Sigma 公司; 大肠杆菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自 Sigma 公司.

1.2 真核表达载体 pcDNA3-HA-p38/ERK2 的构建

1.2.1 人 p38 和 ERK2 的 PCR 扩增. 根据 GenBank 中报告的序列设计引物. 用于 p38 PCR 扩增的上游引物为 5' CGGGATCCATGTCTCAGGAGAGG 3', 下游引物为 5' GCTCTAGATCAGGACTCCATC-TC 3'. 上下游引物分别携带 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点. 用于 ERK2 PCR 扩增的上游引物为 5' GCGATATCATGGCGGCGGCGGCGG 3', 下游引物为 5' CCGCTCGAGTTAAGATCTGTATC 3'. 上下游引物分别携带 *Eco*R V 和 *Xho* I 酶切位点. PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成. PCR 模板为人的 Flag-p38 和 Flag-ERK2 质粒. PCR 反应条件为: 首先 94℃ 变性 1 min; 然后以 52℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 5 min 进行 25 个循环.

1.2.2 真核表达载体的酶切鉴定与测序. 将纯化后的上述 PCR 产物 p38 经 *Bam*H I 和 *Xba* I, ERK2 经 *Eco*R V 和 *Xho* I 酶切后连接到经同样酶切的 pcDNA3-HA 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取转化质粒. 采用以上两种内切酶进行酶切鉴定, 得到目的基因大小片段的克隆判定为阳性克隆, 然后进行测序.

1.3 真核表达载体的蛋白质表达鉴定

将测序正确的阳性克隆重新转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒去除内毒素后转染 293T 细胞, 用特异性抗 HA 抗体检测其表达蛋白大小.

1.4 细胞培养

293T 细胞为解放军总医院全军烧伤研究所保存, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于二氧化碳培养箱 (37℃, 5% CO₂) 中培养. 转染前 24 h 将细胞接种于灭菌的 24 孔板, 细胞密度大约为 90%.

1.5 免疫共沉淀

首先按照 5×10^6 个 / 孔的密度种植 293T 细胞于 60 mm 培养皿中, 待细胞长至 80% 融合时按 Invitrogen 公司说明用 Lipofectamine 2000 将携带 HA 标签的 p38/ERK2 和携带有 Flag 标签的 STAT3

重组质粒按照 2:1 的比例进行转染. 24 h 转染结束后细胞用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 然后加入 150 μ l 细胞裂解缓冲液收集细胞, 4℃、12 000 r/min 高速离心后取上清与抗 Flag 抗体偶合磁珠 (预平衡) 4℃ 孵育 4 h, 用 500 μ l 细胞裂解缓冲液洗涤 4 次, 其后在结合有蛋白质的磁珠内加入 1 $\times$ SDS 上样缓冲液 15 μ l, 100℃ 加热 5 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹, 最后用抗 HA 抗体进行 Western blot 分析, 检测 p38 与 STAT3 和 ERK2 与 STAT3 之间是否存在相互作用.

1.6 荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性测定

细胞转染 24 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗细胞 1 次, 加入 160 μ l 裂解缓冲液, 放在水平摇床上摇动 15 min, 用细胞刮子刮下细胞, 放入 1.5 ml 离心管中, 旋涡振动 5 min, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4℃) 后取上清液测定荧光素酶活性. 用邻-硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ortho-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside, ONPG) 测定 β -gal 活性. 取上述上清液 10 μ l 加入到 450 μ l 含有 β -巯基乙醇 (2.7 ml/L) 的 Z 缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.1 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.5 g, KCl 0.75 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.246 g, 双蒸水补足至 1 L, 调 pH 值到 7.0) 中, 加入 100 μ l 0.4% 的 ONPG 溶液, 37℃ 保温, 直到出现浅黄色为止, 加入 250 μ l 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 在 420 nm 波长下测定样品 A_{420} 值.

1.7 转录激活活性检测

蛋白质转录激活活性即为它们对报告基因的转录激活能力. 在每一转染实验中, 同时转染表达某种蛋白质的重组质粒、报告基因质粒和表达 β -gal 的质粒. 蛋白质转录激活活性即为同一孔中荧光素酶活性与 β -gal 活性比值, β -gal 起着校正细胞转染效率的作用.

1.7.1 p38 和 STAT3 的转录激活活性检测. 将构建的 HA-p38 质粒与 Flag-STAT3 质粒分别单独转染以及共同转染 293T 细胞, 同时转染全长 TNF- α 报告基因, 检测 p38 与 STAT3 复合物对全长 TNF- α 启动子活性的影响. 以 8×10^4 个 / 孔密度接种 293T 细胞于 24 孔板内, 待细胞生长密度达到 80%~90% 时进行转染. p38 分为 3 个剂量组: 50 ng、100 ng 和 150 ng. STAT3 分为 3 个剂量组: 50 ng、100 ng 和 200 ng. p38 和 STAT3 共同转染组: 各组转染的质粒总量为 0.15 μ g / 孔; 阴性对照为 pcDNA3 空载体; 质粒 pcDNA3-HA-p38 和 pcDNA3-Flag-STAT3 用量分别为 0.10 μ g / 孔和 0.05 μ g / 孔,

各组用 pcDNA3 空载体补平. 所有孔的 TNF- α -luciferase 用量为 0.1 μg /孔, β -gal 用量为 0.05 μg /孔, Lipofectamine 2000 用量为 1 μl /孔. 将以上分组质粒进行 DNA 电泳校正浓度, 按照 Lipofectamine 2000 使用说明将各组质粒和转染试剂的混合物逐滴加入细胞培养基, 4 h 后加入 LPS 刺激.

1.7.2 ERK2 和 STAT3 的转录激活活性检测. 将构建的 HA-ERK2 质粒与 Flag-STAT3 质粒分别单独转染以及共同转染 293T 细胞, 同时转染全长 TNF- α 报告基因, 检测 ERK2 与 STAT3 复合物对全长 TNF- α 启动子活性的影响. 以 8×10^4 个/孔密度接种 293T 细胞于 24 孔板内, 待细胞生长密度达到 80%~90% 时进行转染. ERK2 分为 3 个剂量组: 50 ng、100 ng 和 150 ng. STAT3 分为 3 个剂量组: 50 ng、100 ng 和 200 ng. ERK2 和 STAT3 共同转染组: 各组转染的质粒总量为 0.2 μg /孔; 阴性对照为 pcDNA3 空载体; 质粒 pcDNA3-HA-ERK2 用量为 0.15 μg /孔, pcDNA3-Flag-STAT3 为 0.05 μg /孔, 各组用 pcDNA3 空载体补平. 所有孔的 TNF- α -luciferase 用量为 0.1 μg /孔, β -gal 用量为 0.05 μg /孔, Lipofectamine 2000 用量为 1 μl /孔. 将以上分组质粒进行 DNA 电泳校正浓度, 按照 Lipofectamine 2000 使用说明将各组质粒和转染试剂的混合物逐滴加入细胞培养基, 4 h 后加入 LPS 刺激.

1.8 RNA 干扰

RNA 干扰是利用小分子双链 RNA 分子 (siRNA) 抑制细胞基因表达, 是一种简便、快速的基因干扰技术. 其原理是通过 21~23 碱基对的小分子双链 RNA 片段特异地与同源序列基因结合, 从而使靶基因沉默.

1.8.1 内源性 STAT3 对全长 TNF- α 启动子转录活性的影响. 将 293T 细胞接种于 6 cm 皿内, 待细胞融合达到 90% 时进行转染, 细胞分两组: LPS 未刺激组和 LPS 刺激组. TNF- α -luciferase 用量为 0.5 μg /皿, β -gal 用量为 0.25 μg /皿, 转染前 2 h 给细胞换上 2 ml 新鲜培养基, 同时准备转染混合液. 转染后 4 h 更换培养基, 更换后培养基体积为 3 ml, 同时加入 LPS (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) 刺激. 转染后 24 h 收集细胞检测活性, 其具体过程如下: 在每一转染实验中, 同时转染表达某种蛋白质的重组质粒、报告基因质粒和表达 β -gal 的质粒. 蛋白质转录激活活性即为同一孔中荧光素酶活性与 β -gal 活性比值, β -gal 起着校正细胞转染效率的作

用. 为了证实 293T 细胞内表达 STAT3 蛋白, 我们将同样条件下的上述实验细胞收集变性后, 应用抗 STAT3 抗体检测其表达情况.

1.8.2 sRNAi-STAT3 对内源性 STAT3 作用的干扰. 将 293T 细胞接种于 6 cm 皿内, 待细胞融合达到 90% 时进行转染, 细胞分两组: sRNAi 对照组和 sRNAi-STAT3 组. 质粒和 sRNAi、sRNAi-STAT3 用量分别为 0.5 μg /皿, 各组转染质粒总量为 1.25 μg /皿. 转染前 2 h 给细胞换上 2 ml 新鲜培养基, 同时准备转染混合液. 转染后 4 h 更换培养基, 更换后培养基体积为 3 ml, 同时加入 LPS (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) 刺激. 转染后 48 h 收集细胞检测活性, 方法同上.

1.8.3 sRNAi-STAT3 对 STAT3 与 p38 相互作用的干扰.

将 293T 细胞接种于 24 孔板内, 待细胞融合达到 90% 时进行转染, 将 6 孔细胞随机分为 3 组. 分别为 sRNAi 对照组、共转 pcDNA3-HA-p38 和 pcDNA3-Flag-STAT3 组、共转 sRNAi-STAT3、pcDNA3-HA-p38 和 pcDNA3-Flag-STAT3 组. 质粒 pcDNA3-HA-p38、pcDNA3-Flag-STAT3 和 sRNAi-STAT3 用量分别为 0.10 μg /孔、0.05 μg /孔和 0.10 μg /孔, 各组转染质粒总量为 0.25 μg /孔, 用 sRNAi 对照补平.

转染前 2 h 给细胞换上 0.5 ml 新鲜培养基, 同时准备转染混合液. 转染后 4 h 更换培养基, 更换后培养基体积为 1 ml, 同时加入 LPS (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) 刺激. 转染后 48 h 收集细胞检测活性.

1.8.4 sRNAi-STAT3 对 STAT3 与 ERK2 相互作用的干扰.

将 293T 细胞接种于 24 孔板内, 待细胞融合达到 90% 时进行转染, 将 6 孔细胞随机分为 3 组. 分别为 sRNAi 对照组、共转 pcDNA3-HA-ERK2 和 pcDNA3-Flag-STAT3 组、共转 sRNAi-STAT3、pcDNA3-HA-ERK2 和 pcDNA3-Flag-STAT3 组. 质粒 pcDNA3-HA-ERK2、pcDNA3-Flag-STAT3 和 sRNAi-STAT3 用量分别为 0.15 μg /孔、0.05 μg /孔和 0.10 μg /孔, 各组转染质粒总量为 0.3 μg /孔, 用 sRNAi 对照补平.

转染前 2 h 给细胞换上 0.5 ml 新鲜培养基, 同时准备转染混合液. 转染后 4 h 更换培养基, 更换后培养基体积为 1 ml, 同时加入 LPS (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) 刺激. 转染后 48 h 收集细胞检测活性.

2 结 果

2.1 MAPK 片段的扩增和重组质粒的鉴定

将从质粒 pcDNA3-Flag-p38/ERK2 进行 PCR 扩增得到的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见在 1.0 kb 附近分别有一条带, 与预计的目的片段大小位置相符(图 1a). pcDNA3-HA-p38/ERK2 重组质粒分别经 *Bam*H I /*Xba* I 和 *Eco*R V /*Xho* I 双酶切后分别产生约 1.08 kb 大小的目的片段(图 1b).

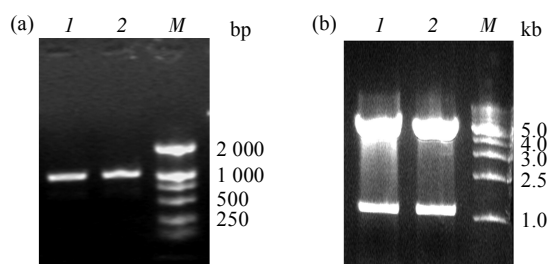


Fig. 1 PCR of p38/ERK2 and identification of pcDNA3-HA-p38/ERK2 recombinant vector

(a) 1: PCR product of Flag-p38; 2: PCR product of Flag-ERK2; M: DNA marker. (b) 1: Double restriction enzyme digestion of pcDNA3-HA-p38; 2: Double restriction enzyme digestion of pcDNA3-HA-ERK2; M: DNA marker.

2.2 重组质粒和 Flag-STAT3 真核表达鉴定

将重组质粒 pcDNA3-HA-p38/ERK2 和 pRC/CMV-Flag-STAT3 分别转染 293T 细胞后进行 Western blot, 分别在 40 ku 和 92 ku 附近见到条带, 与预计蛋白质大小相同(图 2).

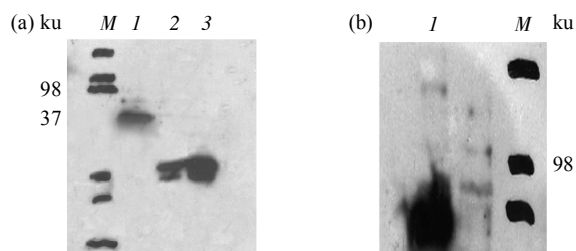


Fig. 2 Eukaryotic identification of pcDNA3-HA-p38/ERK2(a) and pRC/CMV-Flag-STAT3(b)
(a) M: Protein marker; 1: Positive control; 2: p38 protein; 3: ERK2 protein. (b) 1: STAT3 protein; M: Protein marker.

2.3 293T 细胞内 MAPK 和 STAT3 结合

2.3.1 p38 和 STAT3 的相互作用. 免疫共沉淀 (coimmunoprecipitation) 分析是验证两个蛋白质分子

之间直接相互作用的有效方法. 将 pcDNA3-Flag-STAT3 和 pcDNA3 分别与 pcDNA3-HA-p38 共转染于 293T 细胞进行免疫共沉淀实验, 结果发现, p38 与 STAT3 在体内存在相互作用. 结果如图 3 所示.

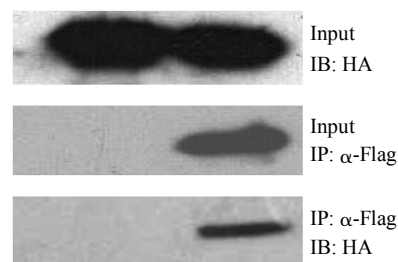


Fig. 3 STAT3 interacts with p38 in 293T cells

2.3.2 ERK2 和 STAT3 的相互作用. 将 pcDNA3-Flag-STAT3 和 pcDNA3 分别与 pcDNA3-HA-ERK2 共转染于 293T 细胞进行免疫共沉淀实验, 结果如图 4 所示, ERK2 与 STAT3 存在相互作用.

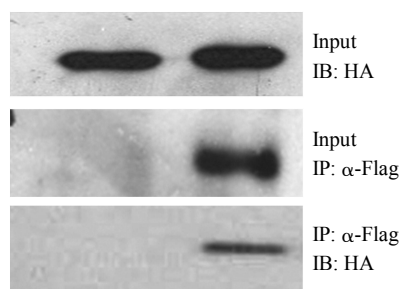


Fig. 4 STAT3 interacts with ERK2 in 293T cells

2.4 STAT3 和 MAPK 对全长 TNF- α 启动子活性的影响

为了进一步明确 p38 和 STAT3 蛋白的相互作用是否调节它们共同的下游基因 TNF- α , 我们将这两种质粒和 TNF- α 全长启动子报告基因共同转染 293T 细胞, 转染 4 h 后用 LPS 刺激, 24 h 后收集细胞检测荧光素酶活性.

2.4.1 STAT3 和 p38 单独和共同作用对全长 TNF- α 启动子转录活性的影响. STAT3 对全长 TNF- α 启动子活性结果显示, 随着 STAT3 剂量从 50 ng 增加到 200 ng, 与空白对照相比, 启动子的活性也从 1.56 倍增加到 2.28 倍(图 5b). 同样 p38 对全长 TNF- α 启动子活性结果显示, 随着 p38 剂量从 50 ng 增加到 150 ng, 与空白对照相比, 启动子的活性也从 1.66 倍增加到 2.87 倍(图 5a). 因此,

我们选择 STAT3 50 ng 和 p38 150 ng 进行转染. LPS 未刺激前, 与对照组相比, 单独转染 p38 和 STAT3 后分别增加了 2.14 倍和 2.35 倍, 而共同转

染后增加了 5.57 倍; 用 LPS 刺激后, 单独转染 p38 和 STAT3 后分别增加了 5.17 倍和 5.59 倍, 而共同转染后则增加了 11.96 倍(图 5c).

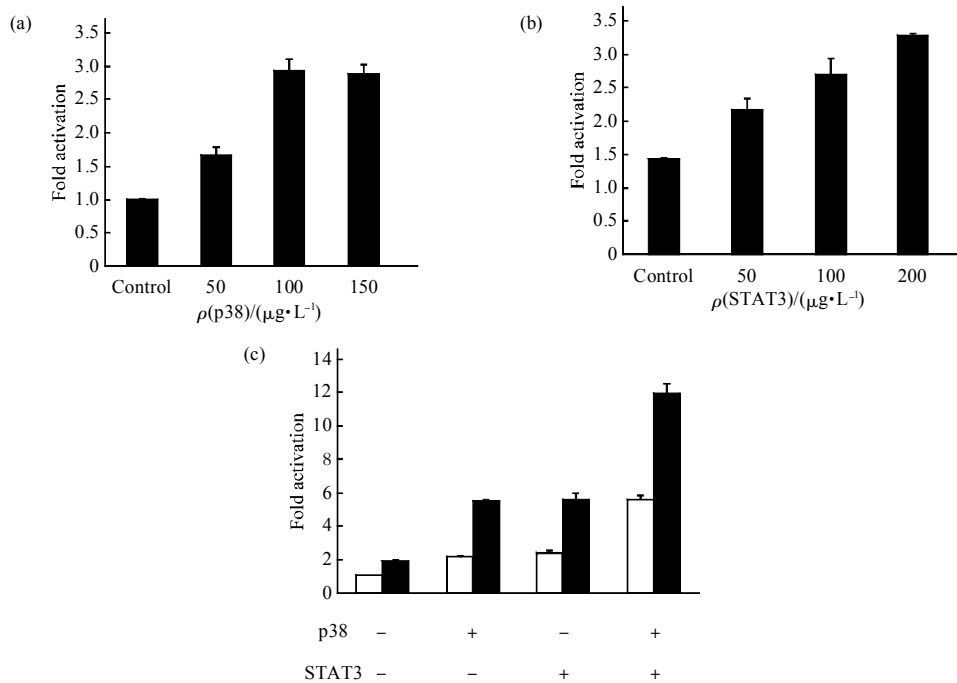


Fig. 5 Influence of STAT3 and p38 on full length TNF- α promoter transcription activity alone and together
(a) Dose-effect of p38 on full length TNF- α promoter transcription activity. (b) Dose-effect of STAT3 on full length TNF- α promoter transcription activity. (c) Influence of STAT3 together with p38 on full length TNF- α promoter transcription activity. □: -LPS; ■: +LPS.

2.4.2 STAT3 和 ERK2 单独和共同作用对全长 TNF- α 启动子转录活性的影响. STAT3 对全长 TNF- α 启动子活性结果显示, 随着 STAT3 剂量从

50 ng 增加到 200 ng, 与空白对照相比, 启动子的活性也从 1.25 倍增加到 2.19 倍(图 6b). 同样, ERK2 对全长 TNF- α 启动子活性结果显示, 随着

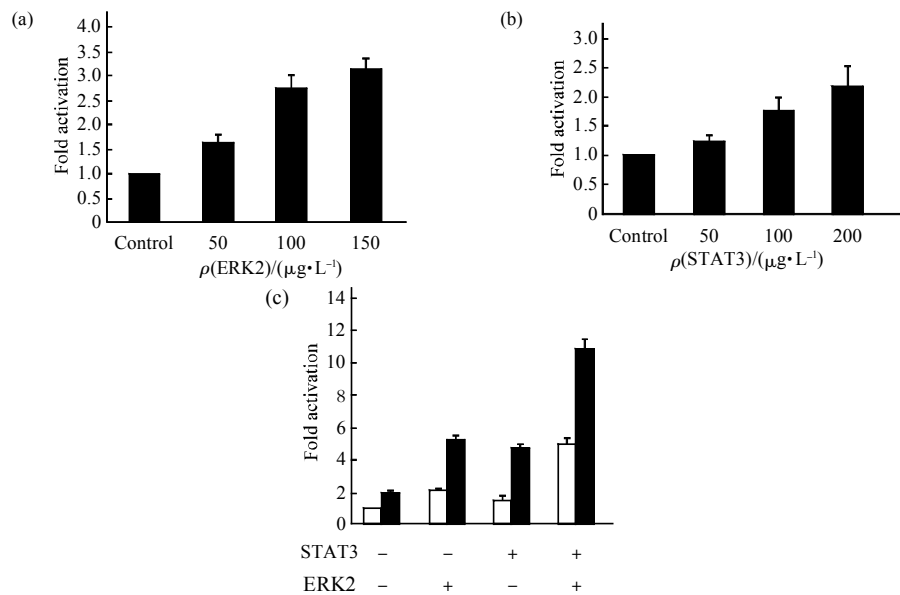


Fig. 6 Influence of STAT3 and ERK2 on full length TNF- α promoter transcription activity alone and together
(a) Dose-effect of ERK2 on full length TNF- α promoter transcription activity. (b) Dose-effect of STAT3 on full length TNF- α promoter transcription activity. (c) Influence of STAT3 together with ERK2 on full length TNF- α promoter transcription activity. □: -LPS; ■: +LPS.

ERK2 剂量从 50 ng 增加到 150 ng, 与空白对照相比, 启动子的活性也从 1.65 倍增加到 3.15 倍 (图 6a). 因此, 我们选择 STAT3 50 ng 和 ERK2 150 ng 进行转染. LPS 未刺激前, 与对照组相比, 单独转染 ERK2 和 STAT3 后分别增加了 2.13 倍和 1.69 倍, 而共同转染后增加了 5.22 倍; 用 LPS 刺激后, 单独转染 ERK2 和 STAT3 后分别增加了 5.43 倍和 4.91 倍, 而共同转染后增加了 11.27 倍 (图 6c).

2.5 STAT3 的 RNA 干扰实验

为了证实阻断这两条通路中任何一方就可以减少 TNF- α 的产生, 我们将 STAT3 的干扰质粒与 MAPK 和 STAT3 质粒混合物共同转染细胞, 进行 TNF- α 全长报告基因的检测.

2.5.1 内源性 STAT3 对全长 TNF- α 启动子转录活性的影响. 如图 7 所示, LPS 刺激前后, 内源性 STAT3 使得 TNF- α 活性分别升高了 2.51 和 2.82 倍. 同时, 应用抗 STAT3 抗体检测 STAT3 在 LPS 刺激前后 293T 细胞内的表达 (图 8).

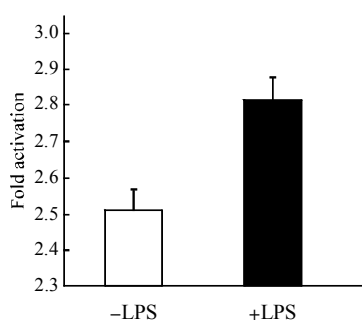


Fig. 7 Influence of endogenous STAT3 on full length TNF- α promoter transcription activity

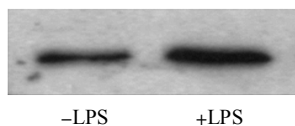


Fig. 8 STAT3 proteins on 293T cells with or without LPS

2.5.2 RNAi-STAT3 对内源性 STAT3 诱导全长 TNF- α 启动子转录活性的影响. 如图 9 所示, 在 RNAi 对照组, 刺激前后 TNF- α 活性分别升高了 2.58 和 2.81 倍; 在 RNAi-STAT3 组, LPS 刺激前后 TNF- α 活性分别降低至 RNAi 对照组的 50.38% 和 54.45%.

2.5.3 RNAi-STAT3 对 p38 和 STAT3 相互作用诱导全长 TNF- α 启动子转录活性的影响. 如图 10 所示, 与 RNAi 对照相比, 刺激前 p38 和 STAT3 使得 TNF- α 升高了 3.28 倍, LPS 刺激后升高了 6.82

倍. 在加入 RNAi-STAT3 后, 刺激前降低至 RNAi 对照组的 48.17%, 刺激后降低至 50.88%.

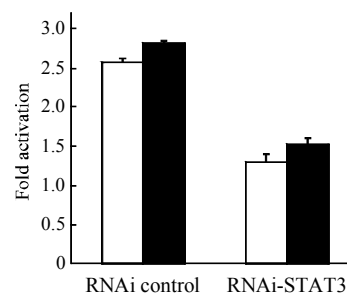


Fig. 9 Effect of RNAi-STAT3 on full length TNF- α promoter transcription activity induced by endogenous STAT3

□: -LPS; ■: +LPS.

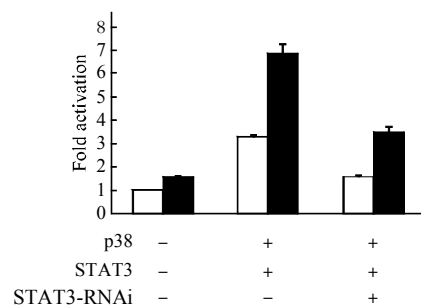


Fig. 10 Effect of RNAi-STAT3 on full length TNF- α promoter transcription activity induced by p38 and STAT3

□: -LPS; ■: +LPS.

2.5.4 RNAi-STAT3 对 ERK2 和 STAT3 相互作用诱导的 TNF- α 转录活性的影响. 如图 11 所示, 与 RNAi 对照相比, 刺激前 ERK2 和 STAT3 使得 TNF- α 升高了 3.22 倍, LPS 刺激后升高了 6.37 倍. 在加入 RNAi-STAT3 后, 刺激前降低至 RNAi 对照组的 52.17%, 刺激后降低至 54.63%.

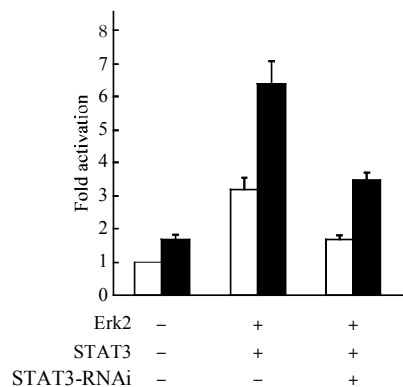


Fig. 11 Effect of RNAi-STAT3 on full length TNF- α promoter transcription activity induced by ERK2 and STAT3

□: -LPS; ■: +LPS.

3 讨 论

在脓毒症的发生与发展过程中,许多信号转导通路被相继激活,其中包括 MAPK、Janus 激酶(Janus kinase, JAK)/STAT 和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等通路,它们共同参与对脓毒症发生机制的调节.有资料证实,ERK、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)和 p38 都可以磷酸化 STAT3 的 727 位丝氨酸位点,其中 ERK1/2 和 p38 与 STAT3 密切相关^[4,5].

研究发现,在脓毒症早期,应用 p38 MAPK 通路抑制剂 SB203580 可以显著降低脓毒症的死亡率^[6].通过采用盲肠结扎穿刺术(cecal ligation and puncture, CLP)制备脓毒症大鼠模型,治疗组术前给予 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 灌胃,在不同时间点观察大鼠血清 TNF- α 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平改变.结果证实,CLP 术后大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高,应用 SB203580 后血清 TNF- α 、IL-1 水平则显著降低,因此通过调控 p38 MAPK 信号转导通路可对脓毒症所致失控炎症反应和组织损伤起保护作用^[7].另据报道,烫伤脓毒症后肝、肺、肾组织 ERK 均呈现不同程度的活化.给予 ERK2 抑制剂 AG126 拮抗组肺组织磷酸化 ERK 水平明显下降,而肝、肾组织其磷酸化水平不同时相点几乎完全抑制,同时各组织中 TNF- α 基因及蛋白质表达水平明显下调.与烫伤脓毒症组相比,AG126 拮抗组肝、肾功能指标显著改善,肺组织髓过氧化物酶活性下降.结果表明,ERK 信号通路参与了严重烧伤后金黄色葡萄球菌感染所致炎症反应与多器官损伤的病理过程,针对该环节进行早期干预可有效缓解多器官功能异常改变^[8].我们前期研究证实,从腹腔分离巨噬细胞采用 LPS 刺激,观察到 JAK2、STAT1 和 STAT3 在 2 h 内被激活,尤其是 STAT3 反应迅速,其活性在刺激后 10 min 即非常活跃,3 h 达到高峰^[9].同时,使用 JAK/STAT 通路抑制剂可显著减少重要晚期炎症因子——高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1) mRNA 水平,但是并不影响其释放.最近的另一组实验应用 HMGB1 刺激大鼠巨噬细胞后,给予 STAT3 特异性抑制剂——Rapamycin 进行干预,发现 HMGB1 所致巨噬细胞 TNF- α 基因表达明显升高, Rapamycin 可显著下调巨噬细胞由 HMGB1 诱导的 TNF- α 基因表达水平^[10,11].这些结果提示,

STAT3 和 MAPK 途径可能均参与 HMGB1 诱导的 TNF- α mRNA 表达的信号调控机制.那么它们之间在脓毒症的信号转导过程中是否存在相互作用?其相互作用效应在调节下游炎症介质的合成和释放过程中作用如何?目前均不清楚^[12].

本组资料中,我们将外源性 STAT3 和 p38/ERK2 重组质粒通过转染导入 293T 细胞系表达蛋白,应用免疫共沉淀的方法检测它们是否存在相互作用.结果表明,在细胞的上清中用抗 Flag 抗体偶合磁珠检测到 STAT3 蛋白表达,随后使用抗 HA 抗体分别检测到 p38/ERK2 蛋白表达,说明 STAT3 蛋白与 p38/ERK2 蛋白存在相互作用,为下一步实验奠定了基础.在确定了 STAT3 蛋白与 p38/ERK2 蛋白可以结合后,我们将 p38 与 STAT3、ERK2 与 STAT3 分别与 TNF- α 启动子报告基因共同转染 293T 细胞,观察它们是否共同协调 TNF- α 启动子的活性. STAT3 对全长 TNF- α 启动子活性结果显示,随着 STAT3 剂量增加,与空白对照相比, TNF- α 启动子的活性也逐渐增高,说明 LPS 刺激后 STAT3 可以单独调节 TNF- α 启动子活性,这与我们既往的研究基本一致^[13];同样, p38 对全长 TNF- α 启动子活性结果显示,随着 p38 作用剂量增加,与空白对照相比, TNF- α 启动子的活性也逐渐增高,说明 LPS 刺激后 p38 亦能单独调节 TNF- α 启动子活性,这与以前的文献报道相符^[14].在进一步实验中, STAT3 和 p38 共同进行转染的结果证实,与对照组相比, LPS 刺激前后, p38 和 STAT3 共同转染时获得的最大活性均超过了单独转染时所获得活性的简单相加,提示 p38 和 STAT3 可协同促进 TNF- α 的转录活性.

在 MAPK 的另一个亚型 ERK2 和 STAT3 对 TNF- α 启动子活性的影响实验中,我们得到了与 p38 和 STAT3 相似的结果,说明 ERK2 和 STAT3 在 LPS 刺激前后不仅单独可以调节 TNF- α 启动子的活性,而且可以协同调节其活性.以上结果证实, MAPK 和 STAT3 信号转导通路之间存在明显交汇作用,共同调节 LPS 引起的 TNF- α 启动子活性的增加,从而可能影响脓毒症的发生与发展过程.因此,只要阻断其中一条通路, p38/ERK2 和 STAT3 的协同作用将被降低, TNF- α 的合成将随之减少,从而有助于缓解脓毒症时过度炎症反应状态.

为了进一步证明上述设想,我们首先检测了 LPS 刺激前后内源性 STAT3 对 TNF- α 活性的影

响, 以及 STAT3 的干扰质粒对内源性 STAT3 诱导 TNF- α 活性的影响. 结果表明, STAT3 的干扰质粒可以降低内源性 STAT3 所致 TNF- α 活性的升高. 在这一基础上我们将 STAT3 的干扰质粒与 MAPK 和 STAT3 质粒混合物共同转染细胞, 进行 TNF- α 全长报告基因的检测. RNAi-STAT3 干扰 p38 和 STAT3 协同效应以及 ERK2 和 STAT3 协同效应的结果证实, 如果应用 STAT3 的干扰 RNA 抑制 STAT3 的表达, MAPK 和 STAT3 对 TNF- α 的协同效应将被显著抑制. 这一结果证明, 在内毒素攻击所致脓毒症相关的 STAT3 通路被抑制后, TNF- α 的合成将明显减少, 对炎症的发展可以起到一定的阻碍作用^[3].

综上所述, 本文初步证实了在体内 MAPK 和 STAT3 存在相互作用, 共同调节早期炎症介质 TNF- α 的转录表达, 从而深化了对炎症反应信号转导通路的认识, 为脓毒症的干预提供了新的思路 and 方向.

参 考 文 献

- 姜 勇, 龚小卫. MAPK 信号转导通路对炎症反应的调控. 生理学报, 2000, **52**(4): 267~270
Jiang Y, Gong X W. Acta Physiol, 2000, **52**(4): 267~270.
- 翟秀珍, 姚咏明, 王松柏, 等. 脓毒症大鼠多器官内信号转导和转录激活因子 3 变化及其作用. 中华创伤杂志, 2004, **20**(3): 146~149
Zhai X Z, Yao Y M, Wang S B, *et al.* Chin J Trauma, 2004, **20**(3): 146~149
- Oda T, Wang W, Ukai K, *et al.* A sesquiterpene quinone, 5-Epi-smenospongine, promotes TNF- α production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Mar Drugs, 2007, **5**(4): 151~156
- Jiang W, Pisetsky D S. The role of IFN- α and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW 264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide. J Immunol, 2006, **177**(5): 3337~3343.
- Bianchi M E, Manfredi A A. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. Immunol Rev, 2007, **220**(1): 35~46
- Song G Y, Chung C S, Chaudry I H, *et al.* MAPK p38 antagonism as a novel method of inhibiting lymphoid immune suppression in polymicrobial sepsis. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, **281**: C662~669
- 马中富, 乐 胜, 梁艳冰, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对脓毒症大鼠多器官损伤的保护作用研究. 中国危重病急救医学, 2005, **17**(4): 211~213
Ma Z F, Yue S, Liang Y B, *et al.* Chin Crit Care Med, 2005, **17**(4): 211~213
- 姚咏明, 程明华, 姚 胜, 等. 细胞外信号调节激酶抑制剂对烫伤脓毒症大鼠肿瘤坏死因子- α 表达的影响及意义. 中华外科杂志, 2004, **42**(7): 391~395
Yao Y M, Cheng M H, Yao S, *et al.* Chin J Surg, 2004, **42**(7): 391~395
- Andrejko K M, Chen J, Deutschman C S. Intrahepatic STAT3 activation and acute phase gene expression predict outcome after CLP sepsis in the rat. Am J Physiol, 1998, **275**(6 Pt 1): G1423~G1429
- 刘 辉, 姚咏明, 董月青, 等. Janus 激酶 - 信号及转导活化因子通路对内毒素 / 脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞高迁移率族蛋白 B1 合成释放的调节作用. 中华烧伤杂志, 2005, **21**(6): 414~417
Liu H, Yao Y M, Dong Y Q, *et al.* Chin J Burns, 2005, **21**(6): 414~417
- Liu H, Yao Y M, Yu Y, *et al.* Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages. Shock, 2007, **27**(1): 55~60
- 刘 辉, 姚咏明, 于 燕, 等. 信号转导及转录激活因子 1 和 3 抑制剂对高迁移率族蛋白 B1 诱导鼠巨噬细胞合成肿瘤坏死因子- α 的影响. 中华外科杂志, 2006, **44**(3): 193~197
Liu H, Yao Y M, Yu Y, *et al.* Chin J Surg, 2006, **44**(3): 193~197
- 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症信号转导机制的现代认识. 中国危重病急救医学, 2003, **15**(1): 3~6
Yao Y M, Sheng Z Y. Chin Crit Care Med, 2003, **15**(1): 3~6
- Yamakawa T, Eguchi S, Matsumoto T, *et al.* Intracellular signaling in rat cultured vascular smooth muscle cells: roles of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase on tumor necrosis factor- α production. Endocrinology, 1999, **140**(8): 3562~3572

Coordinated Regulation of MAPK and STAT3 Proteins on TNF- α Transcription Activity*

YANG Li-Ping¹⁾, YAO Yong-Ming^{1)**}, LI Jie-Ping²⁾, YE Qi-Nong²⁾, SHENG Zhi-Yong¹⁾

¹⁾Burns Institute, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China;

²⁾Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract In order to investigate if there exists interaction between mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein, and how the interaction regulates tumor necrosis factor- α (TNF- α) transcription activity, the human p38 and extracellular-signal regulated protein kinase 2 (ERK2) genes were amplified from human flag-p38 and flag-ERK2 by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pcDNA3-HA. Protein expression of the plasmids was examined by Western blotting. Co-immunoprecipitation was used to identify if there exists interaction between MAPK and STAT3 proteins. If the interaction was approved to be true, report gene system was applied to find how the interaction affect transcriptional expression of TNF- α . After STAT3 pathway was inhibited by RNA interfering, the action on TNF- α activity was determined. The results of DNA sequencing and enzyme digestion showed that the cloned p38 and ERK2 genes were correct, to be 1 080 bp or so. p38 and ERK2 proteins were expressed in 293T cell to be approximately 40 ku. Co-immunoprecipitation data showed that p38 and ERK2 proteins integrated with STAT3 protein *in vivo*. TNF- α reporter gene activity results found that protein complex of p38-STAT3 and ERK2-STAT3 coordinately increased TNF- α activity. After STAT3 was interfered, the TNF- α activity markedly decreased. These data indicated that there exists interaction between p38 and STAT3 protein, ERK2 and STAT3 protein. The complex of the proteins can coordinately regulate TNF- α expression. After interfering STAT3 pathway, the coordinated action on TNF- α transcription activity might be obviously reduced.

Key words signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular-signal regulated protein kinase, tumor necrosis factor- α

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00552

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2005CB522602) and The National Natural Science Foundation of China (30672178).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66867394, E-mail: c_ff@sina.com

Received: March 26, 2009 Accepted: May 4, 2009