

研究报告

P44/42 MAPK 和 STAT3 在 γ 射线诱发的小鼠白血病骨髓细胞中的表达

傅志超¹⁾ 蔡建明^{1)*} 韩玲¹⁾ 王凤玫²⁾黄定德¹⁾ 黄越承¹⁾ 李百龙¹⁾ 高建国¹⁾¹⁾第二军医大学海医系放射医学教研室, 上海 200433; ²⁾第二军医大学基础部组织胚胎学教研室, 上海 200433)

摘要 为了观察 P44/42 MAPK 和 STAT3 在 γ 射线诱发的小鼠白血病骨髓细胞中的变化情况, 首先利用 γ 射线诱发 Balb/C 小鼠发生白血病, 成功地建立了辐射致癌模型。在此基础上, 将动物分为三组: 癌变组、辐射未癌变组和对照组, 利用免疫沉淀和免疫印迹技术, 检测各组骨髓细胞的 P44/42 MAPK 和 STAT3 蛋白及磷酸化水平变化情况。结果显示: 癌变组骨髓细胞 P44/42 MAPK 蛋白及磷酸化水平均高于辐射未癌变组和对照组 ($P < 0.05$); 而 STAT3 蛋白及磷酸化水平在三组骨髓细胞之间无显著差异 ($P > 0.05$)。说明 Ras/ P44/42 MAPK 途径可能在 γ 射线诱发的小鼠白血病中发挥一定的作用, 而 JAK/STAT3 途径并未参与这一癌变过程。

关键词 辐射致癌, 信号转导, 丝裂活化蛋白激酶 (MAPK), 信号转导子与转录激活子 (STAT), 白血病

学科分类号 Q345

肿瘤的发生在于细胞的失控性生长, 其中与生长分化有关的信号转导障碍则是增殖失控的至关重要的因素。生长因子和细胞因子作为细胞增殖的重要胞外刺激因素, 与相应受体结合后, 主要是通过 Ras/ MAPK 和 JAK/STAT 两条途径来实现信号转导^[1]。丝裂活化蛋白激酶家族 (mitogenactivated protein kinases, MAPK) 作为类丝/苏氨酸蛋白激酶, 是一组具有苏氨酸和酪氨酸残基的双磷酸化能力的蛋白激酶, P44/42 MAPK (ERK1/ERK2) 是其中与增殖有关的重要成员^[2]; 信号转导子与转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是 STAT 家族的成员之一, 通过 JAK (Janus kinase) 家族成员而活化, 参与了对细胞生物功能的调控^[3]。

γ 射线作为特殊的胞外刺激因素, 能诱发机体发生肿瘤, 但机理非常复杂, 可能涉及到癌基因、抑癌基因、细胞周期和信号转导等各个方面^[4], 其中, 信号转导途径在辐射致癌中的作用正越来越受到关注。本实验利用 γ 射线诱发 Balb/C 小鼠发生白血病, 分析肿瘤细胞内 P44/42 MAPK 和 STAT3 蛋白及磷酸化水平, 以明确 Ras/ P44/42 MAPK 和 JAK/STAT3 两条途径在辐射致癌中的作用。

1 材料与方法

1.1 辐射致癌动物模型

Balb/C 小鼠购自上海实验动物中心, 雌雄各半,

体重 (18 ± 2) g, 6~8 周龄。随机分为实验组和对照组。实验组小鼠经⁶⁰Co (二军大辐照中心) γ 射线全身照射, 吸收剂量率为 0.88 Gy/min, 吸收剂量为 1.75 Gy, 每周一次, 共 4 次, 累积剂量为 7 Gy。对照组未经 γ 射线照射, 与实验组同步喂养。

1.2 病理检查及裸鼠致瘤实验

照射 3 个月起每隔 1~2 个月活杀一批小鼠。取脾、肝、肺、胸腺及骨髓进行病理学检查, 实验组中出现白血病者为癌变组, 未出现肿瘤者为辐射未癌变组。裸鼠为 BALB/c Nu 品系, 超洁净 (SPF) 级。体重约 15~25 g, 4~8 周龄, 雌雄各半, 购自上海实验动物中心。将照射癌变组中的小鼠肿瘤组织 (胸腺) 研磨成单细胞悬液 (母液为无血清 1640 培养基), 取约 0.2 ml (细胞总数不低于 5×10^7 /ml) 细胞悬液注入裸鼠颈背部皮下。SPF 条件下喂养, 每日观察, 待肿瘤在裸鼠上移植成功后取相应组织进行病理学检查, 同时将取出的瘤块按上述方法重新种植于裸鼠颈背部皮下, 进行连续传代。

1.3 细胞总蛋白的获取

小鼠经乙醚麻醉后, 打开胸腔用 2 ml 注射器心脏取血后颈椎脱臼处死小鼠, 取相应组织加入 10% 甲醛固定作病理检查。股骨肌肉剥离后, 股骨头进行骨髓涂片, 用 2 ml 注射器冲出骨髓后, 过

* 通讯联系人。

Tel: 021-25070341, Fax: 021-25070341

E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-08-26, 接受日期: 2002-10-16

4号针头制成单细胞悬液,冰浴PBS洗涤后,4℃,12 000 r/min离心收集细胞.按 5×10^6 个细胞加100 μ l含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(pH 7.4, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 1 mmol/L NaF和 Na_3VO_3),蛋白酶抑制剂(1 mmol/L ZnCl_2 , 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 20 mg/L 亮抑蛋白酶肽, 1 mg/L 抑蛋白酶肽)用前临时加入^[5].在冰上反应30 min后,4℃,12 000 r/min离心10 min收集上清,-80℃保存备用.

1.4 STAT3 磷酸化的检测

用免疫沉淀和免疫印迹法检测STAT3的磷酸化.取样品总蛋白280 μ g,加入NET-明胶缓冲液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.1% NP-40 (Fluka公司), 1 mmol/L EDTA (Sigma公司), 0.25% 叠氮钠, 0.25% 明胶),使总体积为500 μ l,每管加入STAT3抗体(Santa Cruz公司),4℃摇床孵育2 h,加入Protein G agarose (Santa Cruz公司) 20 μ l,4℃摇床孵育2 h后4℃冰箱过夜,1 000 g离心8 min,弃上清,沉淀用PBS (pH 7.4)洗2次(每次10 min)后,加入1 $\times$ SDS凝胶上样缓冲液,100℃变性4 min,1 000 g离心5 min,上清加入上样孔,进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),用槽式转膜仪将蛋白质转移到PVDF膜(Whayman)上,该膜用含5%脱脂奶粉的TBST封闭液(50 mmol/L pH 7.5,含0.1% Tween-20),4℃封闭过夜,用封闭液稀释的抗酪氨酸磷酸化的单克隆抗体(Santa Cruz公司)与膜蛋白结合后,再与羊抗鼠IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记的二抗,Santa Cruz公司)结合,最后经增强化学发光(ECL)试剂盒(上海普飞生物公司)显影,X光片记录结果.

1.5 STAT3、P44/42 MAPK、Phospho-P44/42 MAPK 变化的检测

用免疫印迹法检测.取样品总蛋白40 μ g,加入等体积的2 $\times$ SDS凝胶上样缓冲液,100℃变性4 min.一抗分别为兔抗鼠phospho-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)、P44/42 MAPK (Biolabs公司)、STAT3抗体,二抗为羊抗兔IgG-HRP (Santa Cruz公司),其余条件同上.最后取记录完结果的PVDF膜在TBST中4℃放置过夜,加入anti- β -actin一抗(Sigma公司)做内参照,其余方法同前.

1.6 图像分析和统计学处理

图像经SmartView 2001生物电泳图像分析软

件(上海复日科技有限公司)进行处理、分析,实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析.

2 结 果

2.1 γ 射线体外诱发小鼠白血病模型的建立

实验小鼠进行照射后,4个月开始活杀小鼠,发现癌变组小鼠的胸腺、脾、肝有不同程度的肿大,病理切片、骨髓涂片和电镜观察证实为急性淋巴细胞型白血病(图1).另外发现,1只小鼠在右



Fig. 1 Morphologic observation in a bone marrow smear
wright stain, $\times 1155$.

前肢有一包块,证实为腺瘤,但来源不明,2例小鼠发生肉瘤,组织类型尚待确定,3例小鼠发生卵巢肿瘤.对照组发现1例小鼠发生自发性肿瘤.裸鼠致瘤实验中,共将5只癌变组小鼠的胸腺细胞移植到裸鼠上(图2),3例获得成功,目前已传至第10代.裸鼠活杀后取瘤体本身及各脏器进行光镜、电镜观察,取骨髓及外周血涂片检查,见全身各脏器均有瘤细胞浸润,瘤细胞形态与原代小鼠的形态一致,为急性淋巴细胞型白血病.

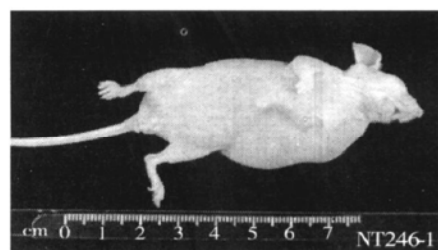


Fig. 2 A tumor in the flank of a nude mouse
injected with leukemia cells of a tumor sample

2.2 STAT3 的表达

样品总蛋白定量上样,常规蛋白质印迹(Western blotting)方法,观察各组STAT3蛋白的

变化情况, 结果发现, 癌变组、辐射未癌变组和对照组三组之间并无显著差异. 同时在 STAT3 条带上方另有一条能与 STAT3 抗体结合的条带 (图 3), 据文献报道, STAT3 与 P91 有 52.5% 的同源性, 我们推测有可能是 P91, 但尚待实验证实^[6].

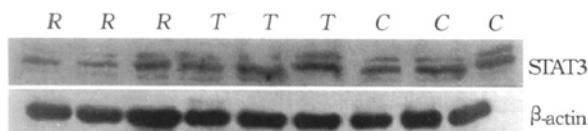


Fig. 3 The expression of STAT3 in marrow cells induced by γ -ray irradiation on mice

R: uncarcinomatous control group; T: carcinomatous group; C: the unirradiated control group; β -actin: internal control.

2.3 P44/42 MAPK 的表达

蛋白质定量上样, 加入 P44/42 MAPK 一抗, 其余条件同前, 观察各组 P44/42 MAPK 的表达情况, P44/42 MAPK 在癌变组的表达较辐射未癌变组及对照组高, 辐射未癌变组比对照组高, 但两者之间的差别并无统计学意义 (图 4 和图 5).

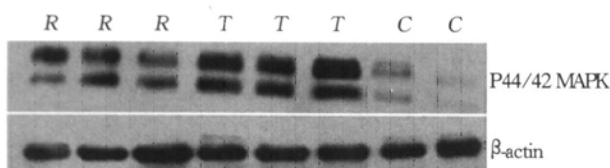


Fig. 4 The expression of P44/42 MAPK in marrow cells induced by γ -ray irradiation on mice

R: uncarcinomatous control group; T: carcinomatous group; C: the unirradiated control group; β -actin: internal control.

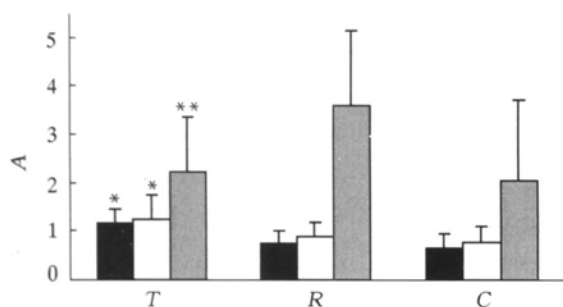


Fig. 5 The expression of P44/42 MAPK and STAT3 in marrow cells induced by γ -ray irradiation on mice

R: uncarcinomatous control group; T: carcinomatous group; C: the unirradiated control group. * The expression of P44/42 MAPK was significantly higher in the marrow cell of the carcinomatous group than in that of the control group ($P < 0.05$). ** The expression of STAT3 was not different in the three groups ($P > 0.05$). ■: P42 MAPK; □: P44 MAPK; ▒: STAT3.

2.4 STAT3 的磷酸化

各个样品取总蛋白 280 μ g, 先后加入 STAT3 一抗、酪氨酸磷酸化一抗及羊抗鼠二抗, 最后 ECL 记录实验结果. 结果发现, 癌变组的 STAT3 酪氨酸磷酸化水平并没有比辐射未癌变组和对照组高 (图 6), 提示辐射诱导细胞癌变过程中, STAT3 并未参与这一进程.

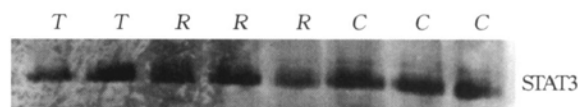


Fig. 6 Various levels of phospho-STAT3 in marrow cells induced by γ -ray irradiation on mice

R: uncarcinomatous control group; T: carcinomatous group; C: the unirradiated control group.

2.5 P44/42 MAPK 的磷酸化

从图 7 和图 8 可以看出, P44/42 MAPK 的磷酸化变化规律与其蛋白质变化规律相似, 癌变组的 P44/42 MAPK 磷酸化水平显著升高, 说明 P44/42 MAPK 在癌细胞中处于活化状态, 在癌变病

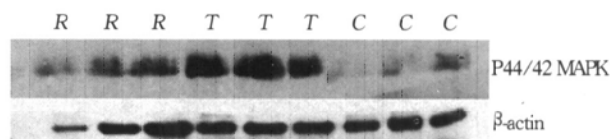


Fig. 7 Various levels of phospho-P44/42 MAPK in marrow cells induced by γ -ray irradiation on mice

R: uncarcinomatous control group; T: carcinomatous group; C: the unirradiated control group; β -actin: internal control.

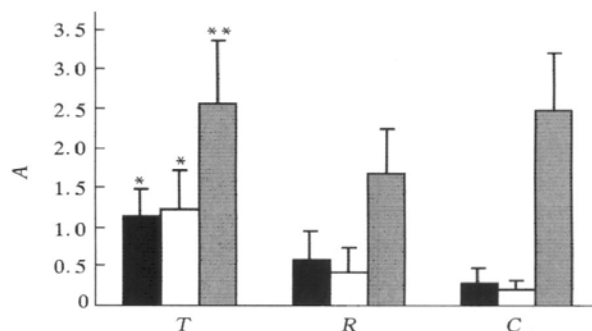


Fig. 8 Various levels of phospho-P44/42 MAPK and phospho-STAT3 in marrow cells induced by γ -ray irradiation in mice

R: uncarcinomatous control group; T: carcinomatous group; C: the unirradiated control group. * The level of phospho-P44/42 MAPK was significantly higher in the marrow cell of the carcinomatous group than in that of the control groups ($P < 0.05$). ** The levels of phospho-STAT3 were different in the three groups ($P > 0.05$). ■: P-P42 MAPK; □: P-P44 MAPK; ▒: P-STAT3.

理过程中发挥一定的作用, 但辐射未癌变组的磷酸化水平较对照组要高 (图 7 和图 8), 说明电离辐射后 P44/42 MAPK 仍有活化, 这对于细胞的恶性转化是否有影响, 仍不清楚。

3 讨 论

细胞外信号可以通过相应受体及细胞内信号转导途径, 引起细胞生长、增殖、分化、凋亡等一系列生物效应。很多生长因子, 如表皮生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF) 等, 能够激活受体酪氨酸激酶和 G 蛋白耦联受体, 活化由原癌基因 ras 基因编码的 Ras 蛋白, 并最终引发 P44/42 MAPK 的活化。另外, 大多数细胞因子受体都缺乏内在的酪氨酸激酶活性, 主要是借助于具有酪氨酸酶活性的 JAK 家族成员, 从而激活 STAT3, 最终调节基因的表达。肿瘤的发生在于细胞的增殖失去控制, 而在肿瘤细胞内与生长分化有关的信号转导障碍则是增殖失控的至关重要因素, 因此, JAK/STAT 途径和 Ras/ MAPK 途径是目前与肿瘤发生密切相关的两条重要信号转导通路^[1~3]。

电离辐射是特殊的胞外刺激因素, 可能起到生长因子或细胞因子样作用。文献报道, 辐射的一个重要靶标是表皮生长因子受体, 能激活 Ras/ MAPK 途径, 促进细胞的增殖, 并对细胞损伤有保护作用^[7]。那么在辐射致癌的过程中, Ras/ P44/42 MAPK 途径是否被激活, 且激活后是否在其中起作用, 是辐射致癌机理研究的重要内容。本研究结果提示, 无论是蛋白质水平还是磷酸化水平, 癌变组 P44/42 MAPK 均比辐射未癌变组、对照组明显升高, 说明 γ 射线在诱发小鼠发生白血病的过程中起着异常活跃的作用, 并可能是通过活化一系列转录因子或蛋白激酶 (如 $c-myc$ 、 $c-fos$ 、 $c-jun$), 促进细胞的失控性增殖, 从而在细胞恶性转化过程中起一定的作用。但辐射未癌变组与对照组之间无明显差异, 因此可以排除辐射的早期生物学效应 (< 3 个月)。

STAT3 既是信号转导分子, 又是转录因子, STAT3 的激活有赖于其 Tyr705 的磷酸化, 从而形成二聚体转入核内, 调节基因的表达。与许多肿瘤的发生发展密切相关, 如 Bromberg 等^[8]通过将半胱氨酸插入 SH2 结构域组成二聚体, 构建一种活化 STAT3 分子, 它能使培养的小鼠和大鼠细胞都发生转化, 并在裸鼠中形成肿瘤。但本实验通过免

疫沉淀和免疫印迹的方法, 检测 STAT3 酪氨酸磷酸化水平, 癌变组与辐射未癌变组、对照组相比, 并无显著差异, 说明在 γ 射线诱发小鼠白血病中, STAT3 并没有被活化, 且并未检测到癌变组 STAT3 蛋白水平有升高的现象, 结果提示 STAT3 可能没有参加辐射致癌过程中细胞的恶性转化。

辐射致癌机理的阐明是一个复杂的生物系统工程, 它有赖于从生物学的各个层面进行研究。本研究运用免疫沉淀和免疫印迹的方法, 分别检测了 P44/42 MAPK 和 STAT3 蛋白及磷酸化水平, 从信号转导方面对辐射致癌机理进行了初步探讨。结果提示, γ 射线诱发小鼠发生白血病中, Ras/ P44/42 MAPK 途径可能在细胞恶性转化过程中起一定的作用, 而 JAK/STAT3 途径并未参加这一进程。但有文献报道, STAT3 能通过其丝氨酸 727 位点的磷酸化而被活化, 主要有依赖 P44/42 MAPK 和不依赖 P44/42 MAPK 两种方式^[9], 前一种激活方式最终使这两条通路发生交汇, 但通过丝氨酸 727 位点磷酸化的 STAT3 其进一步的作用方式和具体功能仍不清楚。本实验只是检测了 STAT3 的酪氨酸磷酸化水平, 而未检测 STAT3 的丝氨酸磷酸化水平, 因此 STAT3 丝氨酸 727 位点是否被活化, 如活化是不是被 P44/42 MAPK 所激活, 还有待下一步的实验研究。

参 考 文 献

- McCubrey J A, May W S, Duronio V, *et al.* Serine/ threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*, 2000, **14** (1): 9~ 21
- Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/ MEK/ ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*, 2001, **93** (1~ 2): 53~ 62
- Williams J G. STAT signaling in cell proliferation and in development. *Curr Opin Geret Dev*, 2000, **10** (5): 503~ 507
- 吴德昌. 辐射防护的生物学基础. 辐射防护, 1998, **18** (5~ 6): 460~ 474
- Wu D C. Radiation Protection, 1998, **18** (5~ 6): 460~ 474
- Sharlow E R, Pacifici R, Crouse J, *et al.* Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin induced hemoglobinization in ery throleukemic SKT6cells. *Blood*, 1997, **90** (6): 2175~ 2187
- Akira S, Nishio Y, Inoue M, *et al.* Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor3 p91-related transcription factor involved in the gp 130-mediated signaling pathway. *Cell*, 1994, **77** (1): 63~ 71
- Schmidt-Ullrich R K, Dent P, Grant S, *et al.* Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res*, 2000, **153** (3): 245~ 257
- Bromberg J F, Wrzeszczynska M H, Devgan G, *et al.* STAT3 as an Oncogene. *Cell*, 1999, **98** (3): 295~ 303
- Kuroki M, O' Flaherty J T. Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) -dependent and ERK-independent pathways target STAT3 on serine 727 in human neutrophils stimulated by chemotactic factors and cytokines. *Biochem J*, 1999, **341** (Pt 3): 691~ 696

The Function of P44/42 Mitogenactivated Protein Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Leukemia Marrow Cell Induced by γ -Ray Irradiation on Mice

FU Zhi-Chao¹⁾, CAI Jian-Ming^{1)*}, HAN Ling¹⁾, WANG Feng-Mei²⁾,
HUANG Ding-De¹⁾, HUANG Yue-Cheng¹⁾, LI Ba-Long¹⁾, GAO Jian-Guo¹⁾

¹⁾ Department of Radiation Medicine, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²⁾ Department of Histology and Embryology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract In order to study the possible role of the p44/42 mitogenactivated protein kinases (MAPK) and the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in the cancerization process of leukemia marrow cell induced by γ -ray irradiation, the mice were divided into three groups according to the pathological examination: the carcinomatous group, the uncarcinomatous control group and the unirradiated control group. The level of phospho-STAT3 were detected by the immunoprecipitation and Western blotting assay, and the change of the expression of the P44/42 MAPK, phospho-P44/42 MAPK and STAT3 were detected by Western blotting analysis. The results showed that the levels of P44/42 MAPK and phospho-P44/42 MAPK were significantly higher in the marrow cell of the carcinomatous group than that in the control groups ($P < 0.05$) respectively. But statistically, there was no difference in the levels of STAT3 and phospho-STAT3 among the three groups ($P > 0.05$). All the results suggest that there is a possible involvement of Ras/ P44/42 MAPK pathways in the cancerization process of leukemia cell, while JAK/STAT3 pathway makes no contribution to the process of radiation carcinogenesis.

Key words radiation carcinogenesis, signal transduction, MAPK, STAT, leukaemia

* Corresponding author. Tel: 86-21-25070341, Fax: 86-21-25070341, E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn

Received: August 26, 2002 Accepted: October 16, 2002