

肿瘤科

苦参碱对SMMC 7721细胞MAPK、JAK STAT信号通路的影响

发表时间: 2011-12-22 9:24:10 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 殷飞 作者单位: 石家庄, 河北医科大学第四临床
医院消化内科

【摘要】的观察苦参碱对肝癌细胞SMMC 7721 MAPK通路和JAK STAT通路的影响。方法 苦参碱和(或)JAK STAT途径特异性抑制剂AG490培养肝癌细胞SMMC 7721, RT-PCR法检测苦参碱对SMMC 7721细胞ERK, STAT3、STAT5 mRNA的影响, Western blot法检测苦参碱对肝癌SMMC 7721细胞ERK、STAT3、STAT5、P ERK、P STAT3、P STAT5蛋白表达的影响。结果 苦参碱能下调ERK、STAT3、STAT5 mRNA表达水平, 降低ERK、STAT3、STAT5、P ERK、P STAT3、P STAT5蛋白表达量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。AG490作用于SMMC 7721细胞后, ERK、STAT3、STAT5 mRNA和ERK、STAT3、STAT5蛋白的表达量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), P ERK、P STAT3、P STAT5蛋白表达量与对

照组比较显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与AG490组比较, AG490+苦参碱组ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量显著降低($P < 0.05$), ERK、STAT3、STAT5蛋白表达量显著降低($P < 0.05$), P ERK、P STAT3、P STAT5蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与苦参碱组比较, AG490+苦参碱组ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$), ERK、STAT3、STAT5、P ERK、P STAT3、P STAT5蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

结论 苦参碱能下调ERK、STAT3、STAT5 mRNA表达水平, 因而能降低ERK、STAT3、STAT5蛋白表达水平, 抑制细胞信号转导通路, 从而抑制肝癌细胞增殖。

【关键词】苦参碱 通路 JAK STAT通路 AG490

近年来中药的抗肿瘤作用日益受到重视, 关于中药对肿瘤细胞信号转导的作用已有相关研究[1], 苦参碱的抗肿瘤作用也有相关研究。Ras/Raf/MAPK通路和JAK STAT通路异常与肝癌的发生发展有密切联系, 苦参碱抑制肿瘤作用途径是否与抑制细胞信号转导通路有关, 目前尚不清楚。为研究苦参碱抑制人肝癌细胞SMMC 7721增殖的机制, 本研究观察苦参碱对SMMC 7721细胞MAPK通路和JAK STAT通路的影响, 以JAK STAT途径特异性信号转导阻滞剂AG490为对照, 从基因转录水平和蛋白水平研究苦参碱对重要蛋白激酶ERK、STAT3、STAT5在SMMC 7721细胞表达和活化的影响, 为寻求治疗肝癌的临床有效药物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肝癌SMMC 7721细胞株, 购自中科院上海细胞生物所。

特色服务 Serves


- 在线投稿 投稿指南
- 绿色通道 特色专区
- 服务流程 常见问题
- 编辑中心 期刊阅读

期刊约稿

- 中国社区医师
- 吉林医学
- 中外医疗
- 中国医学工程
- 中国卫生产业

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

题名撰写

医学论文题名撰写中常见问题

在线客服...

QQ留言1254635326

QQ交谈4006089123

545493140(重要)

400-6089-123 68590972

1.2 药品和试剂

JAK-STAT途径特异性信号转导阻滞剂AG490,为Sigma公司产品。苦参碱为山东振东金晶制药有限公司惠赠。ERK引物、STAT3引物、STAT5引物、 β -actin引物均由北京赛百盛生物工程公司合成;Trizol为美国Amresco公司产品;兔抗人ERK、STAT3、STAT5、 β -actin多克隆抗体,鼠抗人P-ERK、P-STAT3单克隆抗体,羊抗人STAT5多克隆抗体均为美国Santa Cruz公司产品;PVDF膜购于博海生物工程公司,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳低分子量标准蛋白质(蛋白Marker)、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒购自北京中山生物工程公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 1×10^6 ml细胞接种于培养瓶,24h后,弃除培养液,分别加入含1.0mg/ml苦参碱[2]、50 μ mol/L AG490、50 μ mol/L AG490+1.0mg/ml苦参碱的培养液,以不加药细胞作为对照。作用48h后收集细胞,用于实验。

1.3.2 RT-PCR法检测SMMC 7721细胞中ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达 按Trizol试剂盒说明书提取细胞总RNA。取4 μ l(1 μ g)提取的总RNA,加入预先配置的逆转录体系中,加入M⁻MLV逆转录酶1 μ l进行逆转录。取逆转录产物2 μ l进行PCR反应。ERK上游引物:5'-CGC AATGGCTACTACAGA-3',下游引物:5'-CGAACTGAGGCGAGAA-3',扩增的目的片段长度为358bp,退火温度55.2 $^{\circ}$ C。STAT3上游引物:5'-TT TGGAGGCAGGAATAGG-3',下游引物:5'-TGGCTTGACGGGTTGAT-3',扩增的目的片段长度为230bp,退火温度50.6 $^{\circ}$ C。STAT5上游引物:5'-TTTGGAGGCAGGAATAGG-3',下游引物:5'-TGGCTTGACGGGTTGAT-3',扩增的目的片段长度为347bp,退火温度56.6 $^{\circ}$ C。 β -actin上游引物:5'-TCCA CCGCAAATGCTTCTAG-3',下游引物:5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3',扩增的目的片段长度为189bp,退火温度50.4 $^{\circ}$ C。RT-PCR扩增产物凝胶用美国ST公司AlphalMager TM1200型读胶仪读取扩增条带的光密度值进行分析,以目标基因与 β -actin扩增产物的光密度值的比值计算表达水平。

1.3.3 Western blot法检测SMMC 7721细胞中ERK、STAT3、STAT5蛋白表达 分别提取对照细胞和加药作用后细胞总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白含量,-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存备用。配制分离胶和浓缩胶,将已加入上样缓冲液的标准蛋白质样品及待测样品加入样品槽内,上样量为100 μ g。然后接通电源,80V电压进行电泳,样品在浓缩胶中电泳约1h,待样品进入分离胶后,150V电泳3h左右,直到溴酚蓝到达分离胶的底部,关闭电源。转膜,丽春红染色,以确定胶中蛋白质的转移情况。5%脱脂奶粉中,室温振荡封闭1h。按0.1ml/cm²加入一抗溶液(1:80),封膜机封口,4 $^{\circ}$ C过夜。加入二抗溶液(1:1000),37 $^{\circ}$ C,1h。取出PVDF膜,用TBS溶液振荡清洗3次,每次10min,在暗室中进行化学发光,胶片曝光显影后分析结果。结果应用Gel Pro Analyzer 3.1凝胶分析软件进行分析,计算目的蛋白与 β -actin的光密度比值。

1.4 统计学方法

用SPSS11.5统计软件分析,所有实验结果采用均数 \pm 标准差(\pm s)表示,同一指标的组间比较采用t检验,检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 苦参碱对SMMC 7721细胞ERK、STAT3、STAT5 mRNA的影响

苦参碱培养SMMC 7721细胞48h后,ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量与对照组比较明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。AG490培养SMMC 7721细胞48h后,ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。苦参碱单独和AG490+苦参碱联合作用于SMMC 7721细胞48h后,ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量与对照组比较明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与AG490组比较,AG490+苦参碱组ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量显著降低($P<0.01$)。与苦参碱组比较,AG490+苦参碱组ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。

1: 对照组SMMC 7721细胞;2: AG490 50 μ mol/L组;3: 苦参碱1.0 mg/ml组;4: 苦参碱+AG490组表1 ERK、STAT3和STAT5 mRNA在注:与对照组比较,** $P<0.01$;与AG490组比较, Δ $P<0.01$

2.2 苦参碱对SMMC 7721细胞ERK、STAT3、STAT5蛋白的影响

苦参碱作用于SMMC 7721细胞48h后,ERK、STAT3、STAT5、P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达量与对照组比较显著降低($P<0.05$)。AG490作用于SMMC 7721细胞48h后,ERK、STAT3、STAT5与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达量与对照组比较显著降低($P<0.05$)。AG490+苦参碱作用于SMMC 7721细胞48h后,ERK、STAT3、STAT5、P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达量与对照组比较显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与AG490组比较,AG490+苦参碱组ERK、STAT3、STAT5蛋白表达量显著降低($P<0.05$),P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。与苦参碱组比较,AG490+苦参碱组ERK、STAT3、STAT5、P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

苦参是传统中药,含多种生物碱,已广泛应用于临床。其有效成分具有抗寄生虫、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗肝损伤等药理作用,并有一定的调节免疫作用[3]。研究发现苦参碱在体外可抑制肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡[4],并可通过多种途径产生抗肿瘤作用。

司维柯等[5]研究发现苦参碱可诱导HepG2凋亡,并且与凋亡相关基因表达增强和抗凋亡相关基因表达减弱有关。有研究者在对多种中药单体化合物进行酪氨酸酶活性抑制作用的体外筛选实验中发现苦参碱作用最明显[6]。刘北忠等[7, 8]研究也表明在苦参碱抑制K562细胞增殖、诱导细胞红系分化的过程中有广泛的蛋白酪氨酸激酶活性短暂下降和酪氨酸磷酸酶的活性变化。这些研究表明苦参碱抑制肿瘤细胞增殖机制可能是通过抑制酪氨酸磷酸酶的活性而影响细胞增殖过程中酪氨酸蛋白激酶的磷酸化水平,使肿瘤细胞异常增殖的信号通路在一定程度上受到阻滞,从而进一步影响细胞增殖分化,促进其凋亡。

本研究显示苦参碱作用于SMMC 7721细胞后ERK、STAT3、STAT5 mRNA水平明显下调,ERK、STAT3、STAT5蛋白磷酸化水平明显下调,说明苦参碱抑制了ERK、STAT3、STAT5蛋白激酶的活化,因此苦参碱不仅从基因转录方面抑制了ERK、STAT3、STAT5 mRNA的表达,而且抑制ERK、STAT3、STAT5蛋白激酶的活化。因此苦参碱可以抑制肿瘤发展过程中起重要作用的细胞信号转导通路如MAPK通路和JAK-STAT通路。ERK、STAT3和STAT5蛋白在SMMC 7721细胞的表达注:与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与AG490组比较,△P<0.05

1: 对照组SMMC 7721细胞;2: AG490 50μmol/L组;3: 苦参碱1.0 mg/ml组;4: 苦参碱+AG490组

Western blotting法检测苦参碱、AG490

作用于SMMC 7721细胞后ERK、P-ERK、STAT3、

P-STAT3、STAT5、P-STAT5和β-actin蛋白的表达

AG490是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈的脂类衍生物,分子式C₁₇H₁₄N₂O₃,分子量294.3,结构类似酪氨酸,是JAK-STAT途径特异性信号转导阻滞剂,通过和受体酪氨酸激酶竞争结合位置抑制JAK2的磷酸化,进一步抑制JAK2的底物STAT的磷酸化,磷酸化形式是酪氨酸蛋白激酶的活化形式。JAK-STAT途径与Ras途径有密切的联系,JAK2可以调节Ras效应分子的活性[9]。AG490不仅可以抑制JAK-STAT途径的磷酸化,同时可以抑制MAPK途径的主要成员ERK的磷酸化,可能是AG490抑制了JAK2磷酸化后进一步阻滞了ERK的磷酸化。

本课题应用JAK-STAT途径特异性信号转导阻滞剂AG490作用于SMMC 7721细胞,研究苦参碱对抑制肝癌MAPK途径和JAK-STAT途径的机理。AG490作用于肝癌SMMC 7721细胞后,主要是对ERK、STAT3、STAT5蛋白激酶的活化产生抑制作用,对ERK、STAT3、STAT5 mRNA表达未发现直接影响。AG490和苦参碱联合应用对P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达无明显协同作用。苦参碱对肝癌SMMC 7721细胞P-ERK、P-STAT3、P-STAT5蛋白表达量的影响与其抑制ERK、STAT3、STAT5 mRNA表达,因而抑制ERK、STAT3、STAT5蛋白表达,从而进一步抑制了ERK、STAT3、STAT5蛋白的磷酸化有关;还可能通过其他途径特异地抑制ERK、STAT3、STAT5蛋白的磷酸化,其抑制ERK、STAT3、STAT5蛋白磷酸化的机制是否与AG490抑制机制不同,尚有待于进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 陈伟红,陈燕,谷俊侠,等.姜黄素对K562细胞STAT5信号分子的影响[J].中华血液学杂志,2004,25(3):151-153.
- [2] 赵军艳,姚树坤,殷飞.苦参碱对肝癌细胞增殖凋亡及STAT3、STAT5基因的影响[J].天然药物研究与开发,2006,18(2):225-228.
- [3] 李丹,王金华,张楠森,等.苦参碱类生物碱的研究进展及临床应用[J].中草药,1996,27(5):308-311.
- [4] 张永清,黄高昇,王哲,等.苦参碱对K562细胞增殖及凋亡相关分子表达的影响[J].中国医学科学院学报,2001,23(4):333-336.
- [5] 司维柯,李鹏,姚婕.苦参碱对HepG2细胞代谢水平和基因水平的影响[J].第三军医大学学报,2002,24(11):1346-1349.
- [6] C Tan, W Zhu, Y Lu. Aloin, cinnamic acid and sophorcarpidine are potent inhibitors of tyrosinase[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(12):1859-1862.
- [7] 刘北忠,蒋纪恺,何於娟,等.苦参碱对K562细胞蛋白酪氨酸激酶及磷酸酶活性的影响[J].癌症,2002,21(12):1292-1295.
- [8] 刘小珊,蒋纪恺,张彦,等.苦参碱对人白血病K562细胞胞内酪氨酸蛋白磷酸化的影响[J].中华实用中西医杂志,2004,4(17):3030-3031.
- [9] Ueda T, Bruchofsky N, Sadar MD, et al. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways[J]. J Biol Chem, 2002, 277(7):7076-7082.





考试宝典-高分练兵场



揭秘论文“低价”根源



医学编辑中心



邮箱投稿视频教程

相关文章



▶ 苦参碱对SMMC 7721细胞MAPK、JAK STAT信号通路的影响

2011-12-22

★ 加入收藏夹

👤 复制给朋友

🌐 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论

重置

▲ 上一页

当前第1页，共1页

▼ 下一页