

• 论著 •

Stat1 蛋白在急性髓系细胞 白血病患者外周血白细胞中的激活

刘 峰¹, 陈元玉¹, 李冠武^{2,*}, 温博贵²

(1. 汕头大学医学院第二附属医院, 广东 汕头 515031;

2. 汕头大学医学院肿瘤分子生物学开放实验室, 汕头大学医学院病理系, 广东 汕头 515041)

【摘要】背景与目的: 了解急性髓系细胞白血病外周血白细胞 Stat1 蛋白表达情况, 探讨 Stat1 蛋白的作用区域及与核基质的相互关系。材料与方法: 用免疫印迹法检测急性髓系细胞白血病外周血白细胞中 Stat1 蛋白的表达; 结果: 在 41 例急性髓系细胞白血病外周血白细胞中, Stat1 激活的阳性率为 53.7%, 正常对照 15 例阳性率为 0%。激活的 Stat1 蛋白转移到细胞核内并与核基质结合; 结论: Stat1 蛋白在急性髓系细胞白血病外周血白细胞中有异常激活, 并与核基质结合, 可能通过核基质蛋白发挥作用。

【关键词】急性髓系细胞白血病; Stat1 蛋白; 核基质

中图分类号: R730.45

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)04-0214-03

Activation of the Stat1 Protein in the Peripheral Blood White Cells of the Patients with Acute Myeloid Leukemia

LIU Feng¹, CHEN Yuan-yu¹, LI Guan-wu^{2,*}, et al

(1. The Second affiliated hospital, Shantou University Medical College, Shantou, 515041 China; 2. Laboratory of Tumor Molecular Biology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To learn the expression and activation of Stat1 protein in the peripheral blood white cells of acute myeloid leukemia(AML) by combing to the nuclear matrix. **MATERIAL AND METHODS:** The Stat1 activation were detected by western blot with anti-Stat1 antibody. **RESULT:** The results showed that Stat1 was activated in the 22/41(53.7%) with AML and 0% in the 15 normal controls, and activated Stat1 existed in the nuclear matrix components. **CONCLUSION:** The conclusion denotes that over expression and activation of Stat1 maybe play an important role in the process of AML by attaching to nuclear matrix .

【KEY WORDS】 acute myeloid leukemia; Stat1 protein; nuclear matrix

众多研究显示, 相当一部分造血系统疾病的发生与造血调控异常有关, 其中细胞因子与受体的相互作用及信号传导是当前造血调控研究的热点之一。细胞因子对细胞的作用可通过信号传导和转录激活蛋白 (Stat, Signal transducers and activators of transcription protein) 实现。目前已发现 Stat 蛋白与人类多种肿瘤有关^[1]。Stat1 是 Stat 蛋白家族中的一员, Stat 蛋白除了参与正常的生理功能, 还与细胞的转化

和肿瘤的形成密切相关, 尤其是 Stat1、3、5。现已发现 Stat 蛋白在一些人类主要的恶性中都发生异常激活, 包括血液恶性肿瘤 (白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤) 和实体肿瘤 (头颈部肿瘤、脑癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌)。Stat 蛋白能被具有受体功能的酪氨酸蛋白激酶激活, 形成磷酸化的 Stat, 随即转移到细胞核内与靶向基因启动子结合调节该基因的表达。核基质是细胞核中的网状蛋白骨架系统, 不仅起到持

收稿日期: 2004-03-09; 修订日期: 2004-06-01

基金项目: 广东省卫生厅课题(No. A2000468)

作者简介: 刘 峰(1958-), 男, 湖南省祁阳人, 副主任医师, 硕士, 主要从事血液分子生物学研究。

* 通讯作者: Tel: 0754-8900473, Email: gwli@stu.edu.cn

细胞核的作用,而且是活性基因的载体,研究表明:只有表达的基因才能与核基质结合,许多转录激活因子是核基质的组分^[2]。为此,本文采用免疫印迹法检测其在急性髓系细胞白血病外周血白细胞中 Stat1 的磷酸化(激活)状态,并探讨其与核基质的关系,报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 初治急性髓系细胞白血病(AML)41例,男25例,女16例,年龄21~64岁,平均37.8岁,按FAB分类,其中M1 8例、M2 14例、M3 3例、M4 10例、M5 6例,全部病例均符合诊断标准^[3];分别经肘静脉抽取外周血20 ml,肝素抗凝;对照组健康人15例,来源于本地区中心血站献血员,分别经肘静脉抽取外周血100 ml,肝素抗凝。

1.2 主要试剂 抗磷酸化 Stat1 抗体,抗 Stat1 抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology.Inc.,羊抗兔 IgG-HRP 为 sigma 产品,Western Blot 试剂及 ECL 化学发光检测试剂盒为 Amersham-Pharmacia 产品。

1.3 细胞组分的制备 外周血白细胞提取按文献进行^[4]。全细胞用预冷的 PBS(含 2 mmol/L Na₃VO₄)悬浮,震荡混匀后离心 500 g 离心 10 min,沉淀重新悬浮于低渗缓冲液(20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 10 % glycerol, 0.5 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L phenylmethylsulphonyl fluoride, 15 μg/mL aprotinin, 3 μg/mL leupeptin, 3 μg/mL pepstatin, and 2 mmol/L Na₃VO₄, with 0.2 % Nonidet P-40)充分匀浆,0.1 % 甲烯兰染色,在显微镜下观察,见大部分细胞核逸出(计数 400 个细胞中完整细胞应该少于 3 个)时终止匀浆。以含有 0.8 mol/L 蔗糖的低渗缓冲液垫底,将细胞核的悬液轻轻地加在蔗糖垫上,800 g, 4 °C 下离心 10 min。重复两次蔗糖垫离心,即可获得纯的细胞核。纯细胞核悬浮于 20 倍体积的 DNAase I 缓冲液中, 37 °C 消化 10 min,离心后沉淀悬浮于低盐缓冲液(0.2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L TrisCl, pH 7.5)中离心洗涤两次,沉淀悬浮于 20 倍体积的高盐缓冲液(2 mol/L NaCl, 0.01M TrisCl, 1 mmol/L PMSF, 0.02 mmol/L DTT, 15 μg/mL aprotinin, 3 μg/mL leupeptin, 3 μg/mL pepstatin, and 2 mmol/L Na₃VO₄, pH 7.5)中抽提以出去组蛋白等染色质可溶性组分,离心后沉淀即为白细胞核基质蛋白。制备好的细胞各组分立即用于进一步分析。

1.4 Western Blot 制备好的全细胞、细胞核和核基质蛋白溶解于细胞裂解液中,并经 BCA 法测定蛋

白质浓度,于 10 % SDS-PAGE 胶上分离,每孔加样量为 50 μg。于 Bio-Rad protein II 微型双垂直板电泳槽上 150 V 电泳 2 h,溴酚蓝跑出凝胶前沿后 10 min,终止电泳。电泳完毕后,将凝胶置于蛋白转移电泳槽,4 °C 下,200 mA 恒流 4 h 电转移到硝酸纤维素膜上,丽春红染色观察转移情况;转移过的凝胶进一步作考马斯兰染色,确认蛋白质转移完全后,5 % 脱脂奶粉,TBS,于 4 °C 封闭过夜。第二天,依次进行 TBS 洗涤 5 min,重复 3 次,分别加抗 Stat1 抗体/抗磷酸化 Stat1 抗体于 37 °C 恒温箱内孵育 1 h, TBS 洗涤 5 min,重复 3 次后,加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(二抗)同样条件下,再孵育 1 h; TBS 洗涤 5 min,重复 3 次后,按说明书操作进行化学发光法 γ 光片曝光,照相。

1.5 统计方法 各组阳性率间比较,总体可信区间,用二项分布处理。

2 结果

2.1 41 例急性髓系细胞白血病外周血白细胞中,22 例可以检测到磷酸化的 Stat1 蛋白的表达,激活率为 53.7 % (37 % ~ 39 %)。各类型急性髓系细胞白血病 Stat1 蛋白激活情况见表 1,正常对照 15 例外周血白细胞均未检测到磷酸化 Stat1 蛋白,即 Stat1 全不激活,二项分布分析表明两组激活率差异有统计学意义($P = 0.0000$)。各种类型髓性细胞白血病细胞与对照组之间 stat1 激活率差异有显著性,各种白血病之间则无显著性差异。

表 1 各类型急性髓系细胞白血病 Stat1 蛋白激活情况

Table 1 Stat1 activation in AML

FAB	Classification	Sample numbers	Stat1 ⁺	Stat1 ⁻	P value
	M ₁	8	4	4	0.8372
	M ₂	14	8	6	0.9480
	M ₃	3	0	3	0.2238
	M ₄	10	6	4	0.9504
	M ₅	6	4	2	0.9622
	Control	15	0	15	0.0000
	Total	56	22	34	-

Note: P values were calculated with Binominal distribution.

2.2 Western Blot 如图 1 所示,抗磷酸化抗体检测出 Stat1(和(异聚体单体分别位于 91 和 84 kD,我们所用的磷酸化抗体,是针对 Stat1 第 701 位磷酸化酪氨酸的多克隆抗体,主要和 α 单体反应,对 β 单体有弱的交叉反应(图 1 中 1 泳道)。用非磷酸化抗体检测全细胞、细胞核和核基质,分别可见位于 91 kD 位置有一条明显条带。而且依次由细胞,细胞核和核基质逐渐加深,84 kD 单体交叉反应较弱未能显示出来。

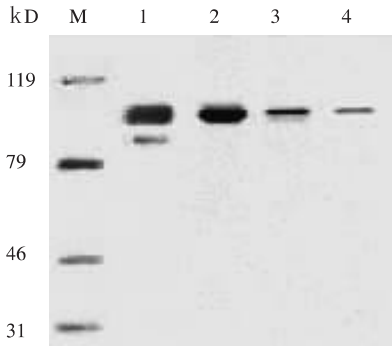


图1 Stat1的Western Blot检测。M: 蛋白质标准, 1: 抗Stat1磷酸化抗体检测AML病人白细胞, 2: 抗Stat1抗体(非磷酸化)检测Stat1激活病人白细胞核基质蛋白, 3: 细胞核蛋白, 4: 全细胞蛋白
Figure 1 Western Blot for Stat1. M: Protein marker, 1: anti-pStat1 antibody to detect white cells in AML, 2: anti-Stat1 antibody to detect white cells nuclear matrix proteins in AML, 3: whole nucleus proteins, 4: whole cells proteins

3 讨论

Stat 蛋白家族是一组由数个具有相同结构的胞浆蛋白质家族, 此蛋白家族中有 7 个成员。该蛋白家族可作为细胞因子对细胞作用的传导通路, 将某些生物信号传递至细胞核内, 诱导细胞癌基因或抑癌基因表达, 从而诱导或抑制肿瘤细胞的生成, 在调节细胞增殖、生存和分化方面发挥着重要的生物学功能。目前已发现 Stat 蛋白与人类多种肿瘤有关; 其中 Stat 蛋白对乳腺癌的作用已得到广泛研究, 国外许多学者均发现在乳腺癌细胞中存在 Stat3 蛋白或 Stat1 蛋白的异常激活, 而 Stat1 在正常乳腺组织中不激活^[5]; 国内亦有学者证实在肺癌组织细胞中存在 Stat5 蛋白的异常表达并推测其可能参与肺癌细胞中 P53 基因的调节, 促进肺癌细胞的增殖^[6]; 在非白血病性造血系统恶性肿瘤如多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤组织细胞中也存在 Stat 蛋白的异常表达^[7, 8]。Stat 蛋白激活与白血病生成的相关假设源于对果蝇的研究, 随着研究的不断深入, 越来越多的证据显示 Stat 蛋白家族在白血病发生发展方面的作用; 已证实白血病细胞株和 22% ~ 100% 的急性髓系细胞白血病幼稚细胞中有 Stat 蛋白不同成员的激活^[9], Birkenkamp 等报道急性髓系细胞白血病细胞中存在 69% Stat5 蛋白的激活^[10], Hayakawa 报道急性髓系细胞白血病细胞中存在 74% Stat3 蛋白的激活^[11], 除此之外, 在 Stat 蛋白变化的临床意义研究中还发现在急性髓系细胞白血病中, Stat 蛋白的激活与患者不良预后和生存期明显缩短有关^[12]。Stat1 是 Stat 蛋白家族中的一员, 本文采用抗磷酸化 Stat1 抗体, 通过免疫印迹法检测其在 41 例急性髓系细胞白血病外周血白细胞中的 Stat 激活情况, 结果发现在 22 例病人外周血白细胞中有监测到磷酸化的 Stat1 蛋白, 表明这

些细胞中存在 Stat1 的激活, 占总数的 53.7%; 而在正常人外周血白细胞中未检测到 Stat1 蛋白的激活, 与有关报道结果近似^[8], 提示 Stat1 蛋白的磷酸化/激活与急性髓系细胞白血病有一定的相关性。各种类型急性髓系白血病之间, Stat1 的激活无显著性差异, 可能与这些类型白血病有相同的 Stat1 激活机制相关, 但本文中各种类型病人较少, 因此该问题有待于后续研究的进一步证实。

此外, 核基质是细胞中重要的骨架结构, 在基因表达调控以及转录因子对基因的调控中起着重要的作用; 已发现许多基因成份包括转录因子等结合在核基质上而发挥作用。Stat1 未激活时, 主要存在于细胞浆内, 激活时出现酪氨酸磷酸化, 随即转移到细胞核内, 形成细胞核内 Stat1 蛋白富集现象。也就是说可以通过一般的非磷酸化抗体检测 Stat1 在细胞中的分布情况, 来判断是否存在 Stat1 的激活。因此我们通过制备外周血白细胞(全细胞)、细胞核(核蛋白)和核基质蛋白, 经免疫印迹法检测 Stat1 蛋白在细胞核和核基质中的分布情况; 结果表明尽管电泳转移时, 各组蛋白量上样量相同, Western Blot 结果却显示 Stat1 蛋白在细胞核和核基质组分中含量明显高于全细胞蛋白组分, 说明 Stat1 蛋白激活后富集于细胞核尤其是核基质内。在正常情况下, Stat1 蛋白可被 IFN、生长因子、血管紧张素、IL-6 等物质活化, 通常处于低活化/不活化状态, Stat1 蛋白在急性髓系细胞白血病外周血白细胞中激活明显升高并与核基质结合, 提示 Stat1 蛋白一方面作为致肿瘤因子的传导通路; 另一方面可能通过与核基质结合, 启动某些癌基因的表达, 在急性髓系细胞白血病的发病机制中可能起一定作用。进一步通过分离 Stat1 结合的核基质蛋白, 有可能对了解 Stat1 的作用机制有所帮助。

急性白血病作为造血系统恶性肿瘤, 其发病机制错综复杂, 致病因素也多种多样, 对 Stat1 进行广泛而深入的研究, 有助于全面了解急性髓系细胞白血病的病变情况, 通过研究抑制 Stat 蛋白通路后的急性髓系细胞白血病变化情况, 将有助于急性白血病治疗手段的开发。

参考文献:

- [1] Garcia R, Joue R. Activation of Stat transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling[J]. *J Biomed Sci*, 1998, 5(2): 79-85.
- [2] Van Wijne, AJ Bidwell, JP Fey, et al. Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, CIEBP, OCT-1 and

综上所述,丹参茶各剂量组的微核率和精子畸形率与阴性对照组比较差异无显著性;Ames 试验结果为阴性;对孕鼠体重、活胎数、活胎体重及身长均无明显的影响,也未见胎鼠外观、内脏及骨骼畸形,说明丹参茶未见母体毒性、胚胎毒性和致畸性。因此本实验条件下,丹参茶未见致突变性和致畸性。

(上接 216 页)

- AP-1 [J]. *Biochemistry*, 2002, 32: 8 397 - 8 402.
- [3] 张之南, 沈 娣. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 171 - 215.
- [4] 温博贵. 末梢血中白血球高分子量 DNA 的制备 [J]. 汕头大学医学院学报, 1992, 1: 135 - 137.
- [5] Garcia R, Bowman TL, Niu G, *et al.* Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 2 499 - 2 513.
- [6] 王 红, 韩一平. Stat3 蛋白在原发性支气管癌组织中的表达及临床意义 [J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(9): 836 - 838.
- [7] Weber RM, Egen C, Wehinger J, *et al.* Constitutive activation of Stat proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein Barr virus (EBV) related lymphoma cell lines [J]. *Blood*, 1996, 88: 809 - 816.
- [8] Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of Stats in myeloid differentiation and leukemia [J]. *Oncogene*, 2000,

(上接 219 页)

瘤、乳腺癌、子宫内膜癌等中常见。许多研究人员将 *PTEN* 基因导入该基因失活的肿瘤细胞中,能明显抑制这些肿瘤细胞的生长和诱发 G₁ 期阻滞。

本实验在设计过程中由于 *PTEN* 基因本身基因结构上的特点,在其开放阅读框附近很难筛选出一对合适引物,故作者选取在编码区外侧设计一对引物,该引物扩增的产物长度为 1.4 kb,结果出现特异性 PCR 条带,然后克隆 *PTEN* 基因的完整编码序列并构建了两种型 *PTEN* 真核表达载体。将两种型质粒和 pcDNA3.1 (+) 空载体转染进 *PTEN* 表达缺失的人胶质瘤 U₂₅₁ 细胞进行细胞生长速率和 Western Blot 检测,结果表明转染野生型质粒的细胞生长速率明显减慢,在细胞中检测到 2 条特异性条带,而在转染空载体细胞及未进行转染细胞中无相应条带出现,表明 *PTEN* 可能抑制肿瘤细胞生长。

参考文献:

参考文献:

- [1] 卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003. 177 - 228.
- [2] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the salmonella mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1983. 113 - 173.
- [3] 李寿棋. 毒理学原理与方法 [M]. 第 2 版. 成都: 四川大学出版社, 2003. 423 - 433.
- [4] 19: 2 511 - 2 522.
- [9] Biethahn S, Alves F, Wilde S, *et al.* Expression of granulocyte colony-stimulated factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor associated signal transduction proteins of the JAK/ Stat passway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia [J]. *Exp Hematol*, 1999, 27: 885 - 894.
- [10] Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, *et al.* Regulation of constitutive Stat5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts [J]. *Leukemia*, 2001, 15: 1 923 - 1 931.
- [11] Hayakawa F, Towatari M, Lida H, *et al.* Differential constitutive activation between Stat-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 1998, 101: 521 - 528.
- [12] Mustafa B, Zheng X, Kathleen A. *et al.* Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival [J]. *Blood*, 2002, 99(1): 252 - 257.
- [1] Li J, Yen C, Liaw D, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275: 1 943 - 1 947.
- [2] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, *et al.* Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers [J]. *Nat Genet*, 1997, 15(4): 357 - 362.
- [3] Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(11): 2 124 - 2 129.
- [4] Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4 240 - 4 245.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.