

苦参碱对 SMMC-7721 细胞 MAPK、JAK-STAT 信号通路的影响

殷飞,赵军艳,姚树坤

Effect of Matrine on Signaling Transduction of MAPK and JAK-STAT in SMMC-7721 Cell Line

YIN Fei, ZHAO Jun-yan, YAO Shu-kun

Department of Gastroenterology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of matrine on MAPK and JAK-STAT signaling transduction pathway in SMMC-7721 cell line. **Methods** Treated with matrine and AG490 (the inhibitor of JAK-STAT signaling transduction), the mRNA expression of ERK, STAT3 and STAT5 in SMMC-7721 cell line were assessed with RT-PCR. The protein expression of ERK, STAT3, STAT5, P-ERK, P-STAT3 and P-STAT5 in SMMC-7721 cell line were detected by Western blotting. **Results** The mRNA expression of ERK, STAT3 and STAT5 in SMMC-7721 cell with matrine was significantly lower than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and so did the protein expression of ERK, STAT3, STAT5, P-ERK, P-STAT3 and P-STAT5 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no significant difference of the mRNA expression of ERK, STAT3 and STAT5 between AG490 and control group ($P > 0.05$), and so did the protein expression of ERK, STAT3 and STAT5 ($P > 0.05$). But P-ERK, P-STAT3 and P-STAT5 protein were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treated with matrine plus AG490, the mRNA expression of ERK, STAT3 and STAT5 were significantly lower than those in AG490 group ($P < 0.05$) and so did the protein expression of ERK, STAT3, STAT5 ($P < 0.05$). There were no significant difference of the P-ERK, P-STAT3 and P-STAT5 protein between matrine plus AG490 group and AG490 group ($P > 0.05$). There were no significant difference of the mRNA expression of ERK, STAT3 and STAT5 between matrine plus AG490 group and matrine group ($P > 0.05$), and so did ERK, STAT3, STAT5, P-ERK, P-STAT3 and P-STAT5 protein ($P > 0.05$). **Conclusion** Matrine could significantly down-regulate the mRNA expression of ERK, STAT3, STAT5 and protein expression of ERK, STAT3 and STAT5 in SMMC-7721 cells. So matrine could inhibit the signaling transduction pathway of MAPK and JAK-STAT and inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells.

Key words: Matrine; MAPK; JAK-STAT; AG490

摘要: **目的** 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 blott 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 ($P > 0.05$)。

收稿日期:2007-01-17;修回日期:2007-03-23

基金项目:河北省科技领军人才资金资助项目(06547008D-4)

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四临床医院消化内科

作者简介:殷飞(1972-)女,博士,副主任医师,副教授,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究

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; MAPK 通路; JAK-STAT 通路; AG490

中图分类号: R735.7; R979.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2008)02-0084-04

0 引言

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。

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,24 h 后,弃除培养液,分别加入含 1.0 mg/ml 苦参碱^[2]、50 μ mol/L AG490、50 μ mol/L AG490 + 1.0 mg/ml 苦参碱的培养液,以不加药细胞作为对照。作用 48 h 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 AATGGC-TACTACAGA-3', 下游引物: 5'-CGAACTGAGGCGAGAA-3', 扩增的目的片段长度为 358 bp, 退火温度 55.2 $^{\circ}$ C。STAT3 上游引物: 5'-TT TGGAGGCA GGAA TAGG-3', 下游引物: 5'-TGGCTTGACGGGTTGAT-3', 扩增的目的片段长度为 230 bp, 退火温度 50.6 $^{\circ}$ C。STAT5 上游引物: 5'-TTTGGAGGCA GGAA TAGG-3', 下游引物: 5'-TGGCTTGACGGGTTGAT-3', 扩增的目的片段长度为 347 bp, 退火温度 56.6 $^{\circ}$ C。 β -actin 上游引物: 5'-TCCACCGCAAA TGCTTCTAG-3', 下游引物: 5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3', 扩增的目的片段长度为 189 bp, 退火温度 50.4 $^{\circ}$ C。RT-PCR 扩增产物凝胶用美国 ST 公司 AlphaImager 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 冰箱冻存储存。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,80 V 电压进行电泳,样品在浓缩胶中电泳约 1 h,待样品进入分离胶后,150 V 电泳 3 h 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 1 h。按 0.1 ml/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,1 h。取出 PVDF 膜,用 TBS 溶液振荡洗 3 次,每次 10 min,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-Analyser 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

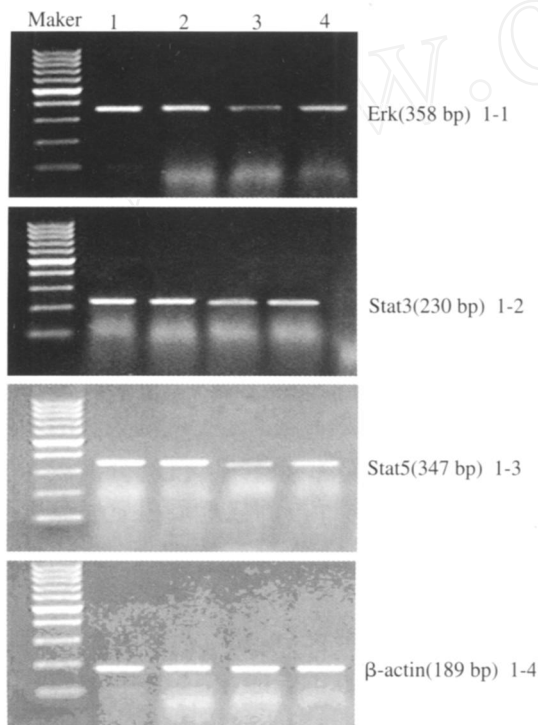
用 SPSS 11.5 统计软件分析,所有实验结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,同一指标的组间比较采用 *t* 检验,检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

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 48 h 后,ERK、

STAT 3、STAT 5 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 48 h 后,ERK、STAT 3、STAT 5 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 48 h 后,ERK、STAT 3、STAT 5 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、STAT 3、STAT 5 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、STAT 3、STAT 5 mRNA 的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1、表 1。



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

图 1 RT-PCR 法检测苦参碱、AG490 作用于 SMMC-7721 细胞后 ERK、STAT3、STAT5 和 β -actin mRNA 的表达

表 1 ERK、STAT3 和 STAT5 mRNA 在 SMMC-7721 细胞的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	ERK	STAT 3	STAT 5
对照组	0.84 \pm 0.10	0.76 \pm 0.06	0.72 \pm 0.04
苦参碱	0.54 \pm 0.04 **	0.50 \pm 0.04 **	0.43 \pm 0.03 **
AG490	0.78 \pm 0.04	0.72 \pm 0.11	0.70 \pm 0.06
AG490 + 苦参碱	0.52 \pm 0.07 **	0.48 \pm 0.06 **	0.41 \pm 0.06 **

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与 AG490 组比较, $P < 0.01$

2.2 苦参碱对 SMMC-7721 细胞 ERK、STAT 3、STAT 5 蛋白的影响

苦参碱作用于 SMMC-7721 细胞 48 h 后,ERK、

STAT 3、STAT 5、P-ERK、P-STAT 3、P-STAT 5 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 48 h 后,ERK、STAT 3、STAT 5 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),P-ERK、P-STAT 3、P-STAT 5 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 48 h 后,ERK、STAT 3、STAT 5、P-ERK、P-STAT 3、P-STAT 5 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、STAT 3、STAT 5 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$),P-ERK、P-STAT 3、P-STAT 5 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。与苦参碱组比较,AG490 + 苦参碱组 ERK、STAT 3、STAT 5、P-ERK、P-STAT 3、P-STAT 5 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2、表 2。

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。

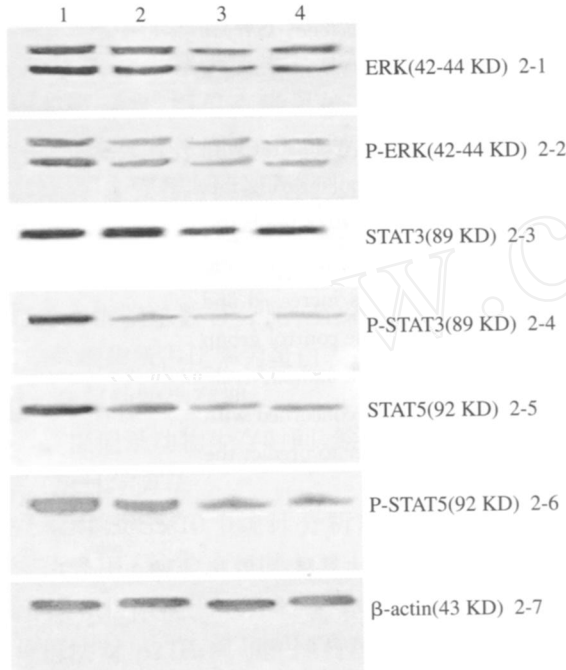
司维柯等^[5]研究发现苦参碱可诱导 Hep G2 凋亡,并且与凋亡相关基因表达增强和抗凋亡相关基因表达减弱有关。有研究者在对多种中药单体化合物进行酪氨酸酶活性抑制作用的体外筛选实验中发现苦参碱作用最明显^[6]。刘北忠等^[7,8]研究也表明在苦参碱抑制 K562 细胞增殖、诱导细胞红系分化的过程中有广泛的蛋白酪氨酸激酶活性短暂下降和酪氨酸磷酸酶的活性变化。这些研究表明苦参碱抑制肿瘤细胞增殖机制可能是通过抑制酪氨酸磷酸酶的活性而影响细胞增殖过程中酪氨酸蛋白激酶的磷酸化水平,使肿瘤细胞异常增殖的信号通路在一定程度上受到阻滞,从而进一步影响细胞增殖分化,促进其凋亡。

本研究显示苦参碱作用于 SMMC-7721 细胞后 ERK、STAT 3、STAT 5 mRNA 水平明显下调,ERK、STAT 3、STAT 5 蛋白磷酸化水平明显下调,说明苦参碱抑制了 ERK、STAT 3、STAT 5 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、STAT 3、STAT 5 mRNA 的表达,而且抑制 ERK、STAT 3、STAT 5 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。

表 2 ERK、STAT3 和 STAT5 蛋白在 SMMC-7721 细胞的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ERK	STAT3	STAT5	P-ERK	P-STAT3	P-STAT5
对照组	1.56 ±0.21	1.10 ±0.17	1.08 ±0.13	1.25 ±0.07	0.94 ±0.13	0.83 ±0.09
苦参碱	1.17 ±0.07*	0.81 ±0.07*	0.82 ±0.07*	1.03 ±0.09*	0.71 ±0.06*	0.64 ±0.06*
AG490	1.48 ±0.16	1.07 ±0.13	1.03 ±0.10	1.04 ±0.09*	0.46 ±0.11**	0.53 ±0.07**
AG490 + 苦参碱	1.19 ±0.05*	0.82 ±0.04*	0.81 ±0.06*	1.02 ±0.09*	0.38 ±0.06**	0.50 ±0.07**

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

图 2 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,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 Hep G2 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 sophorcarpine 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, Bruchovsky 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.

[编辑:刘红武;校对:贺文]