

肝大部分切除或HGF刺激可以引起STAT3和TEC的同时激活

李菲菲, 郑红, 许望翔, 杨晓明, 汪思应

李菲菲, 郑红, 汪思应, 安徽医科大学病理生理教研室
安徽省合肥市 230032

许望翔, 杨晓明, 军事医学科学院二所 北京市 100850

李菲菲, 女, 1979-07-17 生, 2002 年安徽医科大学本科毕业, 2002 年至今攻读安徽医科大学硕士学位, 研究方向为肝再生的分子调控。

国家自然科学基金资助项目, No. 39670366,

安徽省自然科学基金资助项目, No. 00044202

安徽省人才开发基金资助项目, No. 2002Z035

项目负责人: 汪思应, 230032, 安徽省合肥市梅山路 69 号, 安徽医科大学病理生理教研室. sywang@ahmu.edu.cn

电话: 0551-5167706 传真: 0551-5167706

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-09-30

Activation of TEC and STAT3 after partial hepatectomy or hepatocytic growth factor stimulation

Fei-Fei Li, Hong Zheng, Wang-Xiang Xu, Xiao-Ming Yang, Si-Ying Wang

Fei-Fei Li, Hong Zheng, Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
Wang-Xiang Xu, Xiao-Ming Yang, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100056, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39670366; the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 00044202; and Human Resource Fund of Anhui Province, No. 2002Z035

Correspondence to: Dr. Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. sywang@ahmu.edu.cn

Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To study the activation of TEC and STAT3 in the hepatocyte after partial hepatectomy (PH) or hepatocytic growth factor (HGF) stimulation in the mice.

METHODS: Mice of SPF degree and WB F-344 cell (liver stem cell line) were used in this study. *In vivo* and *in vitro* experimental models of PH and HGF stimulation were established respectively. Immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) were used to observe the phosphorylation level and time of TEC and STAT3. On the other hand, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to detect the binding ability of STAT3 DNA.

RESULTS: TEC and STAT3 were both inducibly phosphorylated in one hour after PH or HGF stimulation. Ten to twenty minutes after PH, levels of TEC and STAT3 reached the peak. About 10 min after HGF stimulation, TEC phosphorylation level reached maximum value and about 30 min STAT3 phosphorylation level reached peak value. Meanwhile, STAT3 DNA binding activity was enhanced both *in vivo*

and *in vitro* experiments.

CONCLUSION: After PH or HGF-stimulation, both TEC and STAT3 are quickly phosphorylated in one hour, and they synergically affect the early proliferation of hepatocytes.

Li FF, Zheng H, Xu WX, Yang XM, Wang SY. Activation of TEC and STAT3 after partial hepatectomy or hepatocytic growth factor stimulation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2809-2812

摘要

目的: 了解STAT3和TEC在肝再生以及HGF刺激的肝干细胞中激活情况, 探讨在肝细胞早期增生中STAT3和TEC的活化的相关性。

方法: 建立小鼠肝大部分切除和HGF刺激肝干细胞(WB F-344)的体内、体外两个试验模型, 采用免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)、免疫印迹(immunoblotting, IB)的方法检测TEC和STAT3酪氨酸磷酸化激活水平与时间, 使用凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)分析核蛋白与STAT3 DNA特异序列的结合能力。

结果: 肝大部分切除和HGF刺激下STAT3和TEC的磷酸化水平均快速明显升高, 肝大部分切除后10-20 min时二者激活水平均达到最高, HGF刺激后10 min TEC激活水平最高, 30 min STAT3活化水平最高。肝大部分切除或HGF刺激下10 min左右, 核蛋白与STAT3 DNA特异序列的结合能力明显增强。

结论: 肝大部分切除和HGF刺激下STAT3和TEC均被快速激活, 他们之间可能存在相互作用, 共同影响肝细胞早期增生反应。

李菲菲, 郑红, 许望翔, 杨晓明, 汪思应. 肝大部分切除或HGF刺激可以引起STAT3和TEC的同时激活. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2809-2812
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2809.asp>

0 引言

STAT3 (signal transducer and activator transcription factor 3, STAT3)对不同组织的发育和细胞的增生有着至关重要的作用^[1-3]. 它可以与急性期基因启动子上的增强元件(即急性期反应元件)相互作用, 对HGF, EGF等生长因子刺激诱导的肝细胞早期增生有重要作用^[4-6]. TEC (tyrosine kinase expressed in hepacelluar carcinoma, TEC)

是一种重要的非受体型酪氨酸激酶^[7],参与造血细胞生长、分化的调控^[8],被认为具有造血组织及肝组织分布相对特异性^[9].我们发现大鼠TEC的mRNA在2/3肝切除的大鼠再生肝中表达迅速升高,并发现TEC是一种与肝再生调控密切相关的早期反应基因,他可能参与肝细胞早期生长^[10-11].肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能的细胞活性因子,是目前公认的最重要的肝再生启动因子之一^[12].无论是肝再生还是HGF刺激下引起的肝细胞的增生的机制目前还不十分明了.由于TEC与STAT3都与肝大部分切除后细胞早期增生有关,提示我们二者可能共同作用于肝干细胞或是存在cross-talk.因此我们研究STAT3和TEC在肝再生以及HGF刺激的肝干细胞中激活的情况,探讨在肝细胞早期增生中STAT3和TEC的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 鼠重组肝细胞生长因子(mHGF)为Sigma公司产品. TEC抗体、抗磷酸化PY99抗体、STAT3抗体、磷酸化STAT3抗体购自Santa Cruz. Protein A-Sepharose 4B Beads, 辣根过氧化物酶标记的IgG抗体, ECL (enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购于北京中山生物公司. PVDF (polyvinylidene difluoride, PVDF)膜为Amersham公司产品. DMEM胰酶为Gibco公司产品,胎牛血清为Life Technologies公司产品. 昆明鼠购于军事医学科学院动物实验中心. 肝干细胞^[13]WB F-344为中国医学科学院药理所韩锐教授赠送. 培养条件: 高糖DMEM, 含100 g/L胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 37℃, 50 mL/L CO₂ 孵箱培养. 5×10⁸/L细胞密度下使用10 g/L胎牛血清的DMEM饥饿培养24-48 h,再用HGF刺激(20-50 μg/L). 25-30 g SPF级(♀)昆明鼠12只,随机分为实验组与对照组,10 g/L戊巴比妥ip麻醉后,实验组依次进行2/3肝大部切除,分别在切除后10, 20, 30, 60 min取再生肝组织,以小号研磨器研磨后过滤,加入RIPA(975 g/L PBS, 10 g/L Nonidet P-40, 5 g/L脱氧胆酸钠, 1 g/L SDS)冰上裂解30 min, 4℃离心取上清,即为再生肝总蛋白. 对照组开腹牵拉肝组织后10, 20, 30, 60 min取肝组织提总蛋白.

1.2 方法

1.2.1 TEC与STAT3活化的检测 TEC酪氨酸磷酸化水平检测: 再生肝组织或HGF刺激后的细胞用冰PBS洗3遍, RIPA裂解后提取蛋白. 取细胞蛋白或组织蛋白2 mg/group, 加入抗TEC抗体(1:100稀释)在旋转器上4℃混匀1 h, 再加入Protein A-Sepharose 4B Beads于4℃混匀过夜, 将免疫沉淀复合物用冰RIPA洗4遍, 重悬于2×SDS上样缓冲液中, 100℃变性3 min后上样进行100 g/L SDS-PAGE电泳, 再电转(100 mA、120 min)至PVDF膜上, 转好的膜放在TBS-T(20 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.5 g/L Tween20)中封闭3 h, 然后再将膜置于加入抗PY99抗体(1:1 000)

的TBST中室温孵育1 h, 再加入相应结合的二抗后与ECL发光检测剂结合显示结果. STAT3酪氨酸磷酸化水平检测: 再生肝组织蛋白或HGF刺激后的细胞裂解物(10 μg/group)经100 g/L SDS-PAGE胶分离后电转(100 mA, 120 min)至PVDF膜上, 转好的膜放在TBST中封闭3 h. 然后再将膜置于加入抗STAT3抗体(1:2 000)或phospho-STAT3(1:2 000)的TBST中室温孵育1 h, 再加入相应结合的二抗后与ECL发光检测剂结合显示结果.

1.2.2 EMSA法检测STAT3结合活性 核蛋白的提取: 组织提取物或细胞用预冷的PBS 10 mL洗2次, 重悬于400 μL buffer A(10 mmol/L Hepes pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L aprotinin, 1 mg/L pepstatin A). 冰上放置15 min, 加入12.5 μL 100 g/L Nonidet P-40, 轻轻混匀后于4℃2 000 g离心10 min, 沉淀重悬于40 μL buffer C(20 mmol/L Hepes pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 450 mmol/L NaCl, 250 g/L glycerol, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L aprotinin, 1 mg/L pepstatin A), 冰上静置30 min, 20 000 g离心15 min, 上清即为核提取物. STAT3同源寡核苷酸片段为Promega公司标记和纯化产品. 探针的制备: ³²P标记STAT3寡核苷酸(1.75 p mol/L) 2 μL, 10×T4缓冲液1 μL, ³²P-ATP(111 PBq/mmol) 1 μL, 无菌水5 μL, T4核酸酶(5-10 MU/L) 1 μL, 37℃反应10 min, 加入1 μL 0.5 mol/L EDTA终止反应. EMSA实验: 98 μg核蛋白在结合液(20 mmol/L Hepes pH 7.9, 100 mmol/L KCl, 200 g/L glycerol, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF)中与1 μL ³²P标记STAT3寡核苷酸中4℃反应15 min. 加上样缓冲液1 μL, 上样, DNA-protein复合物在400 g/L聚丙烯酰胺凝胶中电泳(300 V, 30-40 min), 取出凝胶压片. 在-20℃放射性自显影8-24 h.

2 结果

2.1 肝大部分切除后STAT3与TEC快速活化 肝大部分切除后STAT3与TEC磷酸化水平均在1 h内迅速升高, 其中STAT3激活水平在10-20 min达最高(图1A), TEC激活水平在20-30 min达最高.(图1B)

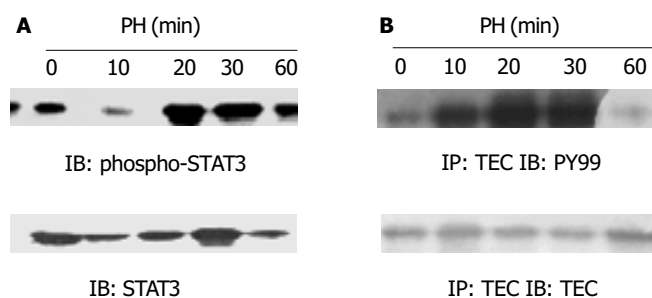


图1 小鼠肝大部分切除术(PH)后TEC和STAT3酪氨酸磷酸化水平. A: STAT3酪氨酸磷酸化水平; B: TEC酪氨酸磷酸化水平.

2.2 HGF 刺激使 STAT3 与 TEC 也均被快速活化 在 HGF 刺激下, 肝干细胞 WBF-344 中 STAT3 和 TEC 快速激活. 其中在 TEC 在 HGF 刺激 10 min 时磷酸化水平达最高(图 2A), STAT3 则在 30 min 时磷酸化水平达最高(图 2B).

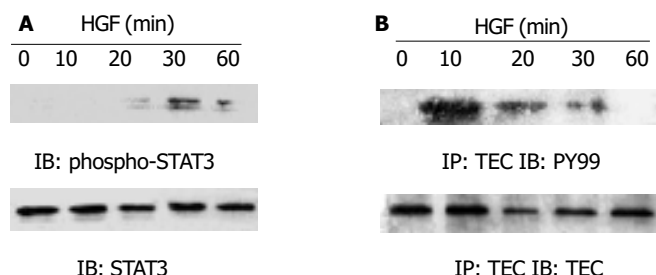


图2 WBF-344 在 HGF 刺激后 TEC 和 STAT3 酪氨酸磷酸化水平. A: STAT3 酪氨酸磷酸化水平; B: TEC 酪氨酸磷酸化水平.

2.3 核蛋白与 STAT3 DNA 结合能力增强 肝大部分切除和 HGF 刺激 1 h 内, 核蛋白与 STAT3 的 DNA 结合能力呈瞬时性增强, 在肝大部分切除 20 min 左右, HGF 刺激 10 min 左右结合力达最高(图 3).

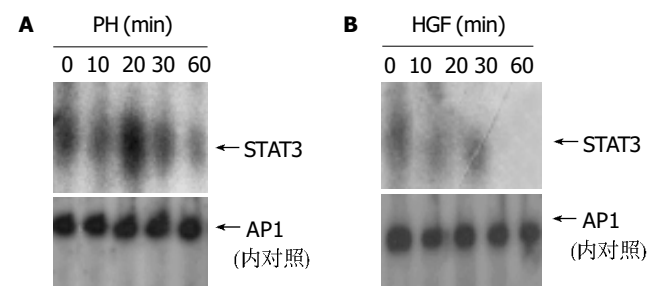


图3 肝大部分切除术(PH)和 HGF 刺激后 STAT3 与核蛋白结合能力. A: 肝大部分切除术(PH); B: HGF 刺激.

3 讨论

本结果表明, 在肝切除或生长因子等多种因素刺激下, TEC 和 STAT3 被迅速激活, 都共同参与了肝细胞的增生反应, 可能对肝细胞的早期分裂增生发挥重要作用. STAT3 参与了多种病理生理过程中的应答, 是 gp-130 受体(IL-6 受体)下游最重要的介导信号转导的分子^[14-15]. STAT3 和其他 STAT 蛋白一样, 在氨基末端有 1 个 4 聚体化区, 参与受体的募集与 STAT 自身二聚体化. STAT3 的酪氨酸磷酸化是在细胞因子刺激下, 由 JAK 激酶介导下而发生的^[16-17], 这种酪氨酸磷酸化对 STAT3 的二聚体化激活、核定位、与 DNA 结合是必须的^[18]. TEC 基因编码框由 PH domain、TH domain、SH3 domain、SH2 domain 和 kinase domain 组成^[19]. SH2 domain 与 kinase domain 可以与下游一些蛋白 Dok1, BROG1, PKC- 等结合, 从而使后者磷酸化而激活^[20-22].

肝再生是一个复杂的病理生理过程, 有很多基因参与其中^[23-24]. 以往的研究表明 STAT3 与 TEC 是肝再生早期反应基因^[25-27]. HGF 是肝再生最强的启动因子之一^[28-29]. HGF 与其细胞表面的受体 c-met 结合后, 引起细胞内

一系列蛋白酪氨酸磷酸化^[30]. 我们有理由设想 STAT3 与 TEC 间可能也存在交叉对话, 共同影响肝细胞早期增生反应. 根据我们的实验结果, 我们提出 TEC 在活化后可以使 STAT3 活化的假设, 有两种可能, 一种简单的假设是 TEC 磷酸化激活后发挥其激酶活性, 其 kinase domain 使 STAT3 的碳末端活化区的酪氨酸位点磷酸化, 直接激活 STAT3; 另一种可能是间接激活, TEC 活化后, 通过激活其他激酶使 STAT3 发生磷酸化活化, 这种激酶可能是 JAK2 或者是 TEC 下游其他靶基因. TEC 与 STAT3 激活后将调节一些对细胞增生起重要作用的基因的活性, 如 c-fos, 从而调节细胞增生信号转导途径, 最终对急性肝损伤或细胞因子诱导下的肝细胞有丝分裂起正相调控作用. 本研究为进一步探讨 STAT3 与 TEC 之间信号转导关系奠定了基础, 为进一步深入了解肝细胞再生机制提供了新思路.

4 参考文献

- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635
- Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002;109:1143-1148
- 俞丽芬, 吴云林. 信号传导及转录活化因子 STAT 与消化系统疾病的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12:1196-1201
- Leu JJ, Crissey MA, Leu JP, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol* 2000;21:414-424
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994;264:95-98
- Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994;263:89-92
- Tsygankov AY. Non-receptor protein tyrosine kinases. *Front Biosci* 2003;8:595-635
- Lucas JA, Miller AT, Atherly LO, Berg LJ. The role of Tec family kinases in T cell development and function. *Immunol Rev* 2003;191:119-138
- Mano H, Ishikawa F, Nishida J, Hirai H, Takaku F. A novel protein-tyrosine kinase, tec, is preferentially expressed in liver. *Oncogene* 1990;5:1781-1786
- Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during the liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:318-325
- 汪思应, 王阁, 许望翔, 魏汉东, 杨晓明. Tec 酪氨酸蛋白激酶基因是一种与肝再生调控相关的早期反应基因. *中国生物化学与分子生物学报* 2001;17:325-328
- Gohda E. Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002;119:287-294
- 展玉涛, 任继萍. 肝脏干细胞. *世界华人消化杂志* 2003;11:1735-1737
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000;19:2548-2556
- Schuringa JJ, Jonk LJ, Dokter WH, Vellenga E, Kruijer W. Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* 2000;347:89-96
- Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 re-

- ceptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 1999;274:16513-16521
- 17 Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J* 1995;14:1421-1429
- 18 Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:199-207
- 19 Mano H. Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:267-280
- 20 Mayer BJ, Hirai H, Sakai R. Evidence that SH2 domain promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinase. *Curr Biol* 1995;5:296-305
- 21 Yokohari K, Yamashita Y, Okada S, Ohya K, Oda S, Hatano M, Mano H, Hirasawa H, Tokuhisa T. Isoform-dependent interaction of BRDG1 with Tec kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:414-420
- 22 Altman A, Kaminski S, Busuttill V, Droin N, Hu J, Tadevosyan Y, Hipskind RA, Villalba M. Positive feedback regulation of PLCgamma1/Ca(2+) signaling by PKCtheta in restimulated T cells via a Tec kinase-dependent pathway. *Eur J Immun* 2004;34:2001-2011
- 23 Schoen JM, Lutt WW. Nitric oxide potentiates C-Fos mRNA expression after 2/3 partial hepatectomy. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:47-48
- 24 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487
- 25 Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:28411-28417
- 26 Debonera F, Aldegue X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, Greenbaum LE, Furth EE, Taub R, Olthoff KM. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res* 2001;96:289-295
- 27 Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential Role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation in the liver. *Mol Cell Biol* 2001;21:1621-1632
- 28 Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4477-4482
- 29 Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10608-10613
- 30 Okano J, Shiota G, Matsumoto K, Yasui S, Kurimasa A, Hisatome I, Steinberg P, Murawaki Y. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:298-304

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物，可作为理工科研究生的教学用书或自学教材，也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍，介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求。从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作，通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity)，分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写，举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项，总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题，结合实例举证，从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达，较为详尽地总结了英文标点符号的使用，从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系，综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富。为方便读者进一步追溯和研读相关资料，书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著：任胜利，理学博士，《自然科学进展》责任编辑，1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 篇。出版：科学出版社。定价：28 元 + 2 元(邮费)。邮购地址：100085，国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室，北京市海淀区双清路 83 号。联系人：刘俐，程宇。联系电话：010-62327204；传真：010-62326921。开户银行：中国工商银行北京北太平庄支行 开户名：国家自然科学基金委员会科学基金杂志社，帐号：0200010009200062483。(国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)