

- cific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- 12 Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, Hengartner H, Zinkernagel R. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998;187:1383-1393
- 13 Maru Y, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Analysis of T cell receptor variable regions and complementarity determining region 3 of infiltrating T lymphocytes in the liver of patients with chronic type B hepatitis. *Intervirology* 2003;46:277-288
- 14 Ou R, Zhou S, Huang L, Moskopidhis D. Critical role for alpha/beta and gamma interferons in persistence of lymphocytic choriomeningitis virus by clonal exhaustion of cytotoxic T cells. *J Virol* 2001;75:8407-8423
- 15 Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce anti-viral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75
- 16 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60
- 17 Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-3458
- 18 Liaw YF, Yang SS, Chen TJ, Chu CM. Acute exacerbation in hepatitis B e antigen positive chronic type B hepatitis. A clinicopathological study. *J Hepatol* 1985;1:227-233
- 19 Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Pao CC, Chen TJ. Acute exacerbation in chronic type B hepatitis: comparison between HBeAg and antibody-positive patients. *Hepatology* 1987;7:20-23
- 20 Liaw YF. Management of YMDD mutations during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S333-S337
- 21 Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000;174:47-62

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

清肝化癥方含药血清对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响

殷飞, 吴新满, 高洪生, 姚树坤

殷飞, 吴新满, 高洪生, 姚树坤, 河北医科大学第四医院消化科 河北省石家庄 050011

河北省自然科学基金资助项目 NO. 301394

项目负责人: 姚树坤, 050011 河北省石家庄市健康路 12 号, 河北医科大学第四医院消化科。

电话: 0311-6033941-342

收稿日期: 2004-09-24 接受日期: 2004-10-22

摘要

目的: 观察清肝化癥方含药血清对 TGF α 诱导人肝癌细胞, 对 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响。

方法: 采用血清药理学方法, 以病理鼠血清作对照, 用 Western 免疫印迹方法检测清肝化癥方含药血清对 Raf、MEK、ERK 蛋白表达影响, RT-PCR 方法检测清肝化癥方含药血清对 MEK1 mRNA 表达影响。

结果: 清肝化癥方含药血清能抑制 Raf、MEK、ERK 蛋白的表达, 但以抑制 MEK 蛋白为主 ($P < 0.05$), 能抑制 MEK1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。

结论: 清肝化癥方含药血清能够抑制 TGF α 诱导的人肝癌细

胞增生, 阻断 TGF α 在细胞内的信号传导。

殷飞, 吴新满, 高洪生, 姚树坤. 清肝化癥方含药血清对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13(1):88-90

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/88.asp>

0 引言

信号传导在细胞调控中起重要作用, 选择性的阻断肿瘤细胞自分泌或旁分泌的信号传导通路, 破坏其自控性生长调节机制, 正在成为极具吸引力的研究热点。自研中药清肝化癥方 (半枝莲、白花蛇舌草、苦参、三棱、莪术、黄芪等组成), 以清热解毒、祛瘀散结、健脾理气为治法, 对肝癌患者有抑制肿瘤生长、缓解症状和延长生存期的作用, 基础实验表明他对大鼠肝癌前病变及癌变有明显的阻断作用^[1-3], 其机制有待于进一步研究。我们采用血清药理学方法, 从信号传导的角度, 体外研究清肝化癥方对转化生长因子 α (TGF α) 诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 增生和对 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性SD大鼠, 体重180-200 g, 购自北京实验动物中心. 人肝癌细胞SMMC-7721购自中科院上海细胞生物所. 二乙基亚硝胺(DEN)购自瑞典Fluca公司. 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司. RPMI-1640培养基购自GIBCO公司. 小牛血清(FCS)购自杭州四季青公司. TGF α 购自Peprotech公司. 考马斯亮兰R-250购自Serva公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)购自Gibco公司. 过硫酸胺(APS)、亮抑肽酶(Leupeptin)、NP-40、硝酸纤维素膜购自Sigma公司. 兔抗鼠Raf、MEK、ERK单克隆抗体、Western Blotting Luminol Reagent购自Santa Cruz公司. 细胞总RNA提取试剂盒、TaqDNA聚合酶、Amv逆转录酶、随机引物购自Promega公司. GAPDH引物、MEK1引物由上海生工生物公司合成. 全自动酶标仪为奥地利产品. 清肝化瘀方(半枝莲、白花蛇舌草、苦参、三棱、莪术、黄芪等组成)由河北医科大学第四医院制剂室经水煎、浓缩及醇沉制成.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含100 mL/L FCS、青霉素100 kU/L、链霉素100 mg/L的RPMI-1640培养液培养人肝癌细胞株SMMC-7721, 置于37℃, 50 mL/L CO₂ 孵育箱中培养, 每3-4 d传代一次, 取对数生长期的细胞用于实验.

1.2.2 中药血清和病理血清的制备^[2] 雄性SD大鼠30只, 随机分为两组: 病理对照组和中药预防组. 每组均给与DEN 35 mg/kg灌胃, 2次/wk, 共16 wk, 中药预防组同时给予成人等效剂量5倍的清肝化瘀方灌胃, 1次/d, 16 wk后两组停用DEN, 中药预防组继续使用中药至20 wk. 病理对照组于20 wk末, 中药预防组于最后一次给药后1-2 h下腔静脉取血, 分离血清, 所得血清均经56℃, 30 min灭活, 0.22 μ m 滤器过滤, -70℃冻存. 临用前用含10 mL/L FCS的RPMI-1640培养液稀释成100 mL/L浓度.

1.2.3 Western免疫印迹 细胞生长40 h后弃去培养液, 实验组和对照组分别换成含5 μ g/L TGF α 的100 mL/L中药血清或5 μ g/L TGF α 的100 mL/L病理血清的培养液, 培养48 h, 5 g/L胰酶消化, 用预冷的PBS洗涤2次, 加入预冷的细胞裂解液裂解[50 mmol/L pH7.6 Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 10 mL/L NP-40, 5 mL/L脱氧胆酸, 1 mL/L SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 2 mg/L Leupatin], 置0℃ 30 min, 4℃ 12 000 g离心10 min, 取上清-70℃冻存. 采用考马斯亮兰G-250染色法进行蛋白质定量. 在100 mL/L SDS-PAGE凝胶上进行电泳分离, 半干式电转膜, 封闭后加入MEK-1单抗1:100, 4℃过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗1:1000, 37℃ 1 h, 洗膜后ECL显色, 曝光, 洗片进行图像分析, 检测密度扫描值.

1.2.4 细胞总RNA的提取 将1 $\times$ 10⁶/L细胞10 mL接种于培养瓶, 40 h后, 弃除培养液, 实验组和对照组分别换成含5 μ g/L TGF α 的100 mL/L中药血清或5 μ g/L TGF α

的100 mL/L病理血清的培养液, 培养48 h, 一步法进行细胞总RNA的提取.

1.2.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 取2 μ g总RNA进行逆转录反应, 逆转录产物2 μ L进行PCR. MEK1引物设计依据大鼠MEK1序列^[16], 上游引物: 5'-AAGCA ACAA GAGCA AGTC -3', 下游引物: 5'-CAAGC ACAA GCCAA TCC -3', 扩增的目的片段长度为212 bp. 大鼠GAPDH扩增的目的片段长度为540 bp. 使用50 μ L反应体系, 在相同条件下分别扩增MEK1和GAPDH, PCR的具体循环参数为: 94℃ 45 s; 50℃ 45 s; 72℃ 45 s循环30次; 94℃ 45 s; 60℃ 45 s; 72℃ 5 min末次循环. 循环完成后, 取10 μ L PCR产物进行20 g/L琼脂糖电泳、照相、扫描, 用Adobe photoshop图像分析软件进行分析, 计算MEK1/GAPDH的光密度比值及其相对对照组的表达量.

统计学处理 所有实验结果采用mean $\pm$ SD表示, 显著性差异采用t检验.

2 结果

2.1 中药血清对TGF α 诱导的肝癌细胞Raf、MEK、ERK蛋白表达的影响 中药血清培养肝癌细胞48 h, 能抑制TGF α 对肝癌细胞Ras-Raf-MEK-ERK通路的信号传导, 抑制Raf、MEK、ERK蛋白表达, 其中以抑制MEK表达为主($P < 0.05$). 结果(表1, 图1).

表1 肝癌细胞Raf、MEK、ERK_{1,2}蛋白表达(光密度值, mean $\pm$ SD)

组别	n	Raf	MEK	ERK _{1,2}
对照组	15	165.9 $\pm$ 1.3	255.1 $\pm$ 2.4	267.7 $\pm$ 1.8
实验组	15	144.5 $\pm$ 2.5	172.3 $\pm$ 1.9 ^a	236.5 $\pm$ 2.1

^a $P < 0.05$.

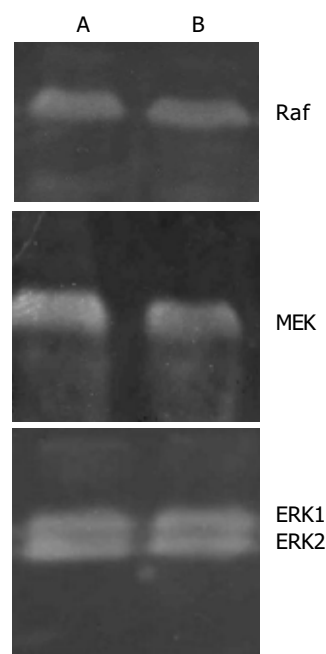


图1 Western blotting 检测SMMC-7721细胞Raf、MEK、ERK蛋白表达. A: 病理组; B: 实验组.

2.2 中药血清对 TGF α 诱导的肝癌细胞 MEK1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测结果显示, 与对照相比, 中药血清培养肝癌细胞 48 h, 能抑制 5 μ g / L TGF α 诱导的 SMMC-7721 肝癌细胞 MEK1 mRNA 的转录, 密度扫描显示, 其 MEK1 mRNA 的表达相对量较对照组明显减少 ($P < 0.05$). 结果 (表 2, 图 2).

表 2 肝癌细胞 MEK1 mRNA 表达 (光密度比值, mean $\pm$ SD)

组别	n	MEK1/GAPDH
对照组	15	0.793 $\pm$ 0.041
实验组	15	0.598 $\pm$ 0.003 ^a

^a $P < 0.05$

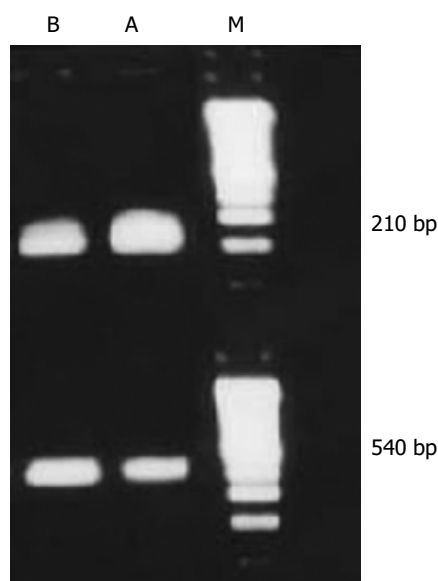


图 2 RT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞 MEK1 mRNA 表达. A: 病理组; B: 实验组.

3 讨论

Ras 是质膜胞质面的内在膜蛋白, 而 Raf 是胞质蛋白, 必须通过 Ras-GTP-Raf-1 结合才能把 Raf 转位到质膜骨架蛋白上. Raf 定位于胞膜是其活化的前提. Raf 的失活主要表现在从膜上回到细胞质中, 与 Raf 的脱磷酸化有关. 本研究中, 清肝化瘀方含药血清未能明显抑制 Raf 的蛋白的表达, 可能与清肝化瘀方含药血清未能使 Raf 磷酸化, 从而未能转移到细胞膜有关.

有研究表明, 在肝癌组织中, 位于信号转导途径上游的 Raf-1 激酶活性在癌变组织与非癌变组织相似, 但属于其家庭的 MEK 激酶活性在癌变组织明显升高, 位于信号转导途径下游的 MAP 激酶活性也明显升高, 可见, 肝细胞癌变后 MAP 激酶途径发生了变异. 我们的实验也证实了这一点. 肝癌模型组病理血清培养肝癌细胞与中药血清培养细胞对 Raf 蛋白表达无明显差别, 而 MEK 蛋白表达明显升高, 表明病理血清培养的肝癌细胞 MEK 可能发

生了变异, MEK1 mRNA 的 RT-PCR 实验表明病理血清培养的肝癌细胞 MEK1 的 mRNA 表达明显升高, 这与病理血清能够促进 MEK1 的两个氨基酸位点磷酸化有关. 而清肝化瘀方能够抑制 MEK1 的 mRNA 的表达, 这可能与清肝化瘀方含药血清能够促进 MEK1 的两个氨基酸位点脱磷酸化, 从而降低 MEK1 蛋白的表达.

ERK 信号转导通路是目前研究最为彻底的 MAPK 通路^[4-10], 他受生长因子刺激而激活后, 移位至细胞核, 引起转录因子的磷酸化, 使得 c-fos, c-myc, c-jun 等基因的转录水平升高, 导致细胞增生. 免疫荧光显示, ERK 位于胞质和胞核, 激活后, 移位至细胞核^[11]. 我们也证实了这一点, 病理血清作用细胞后, 胞核着色明显加深, 而清肝化瘀方含药血清作用细胞后, 胞核着色明显减弱^[2], 表明清肝化瘀方含药血清能明显减少 ERK 进入细胞核, 抑制其在细胞核中的表达, 因而能阻断 TGF α 在肝癌细胞中的信号传导, 抑制 TGF α 诱导的肝癌细胞增生.

清肝化瘀方能阻断 TGF α 对肝癌细胞的作用, Western 印迹表明, 清肝化瘀方含药血清能抑制 Raf、MEK、ERK 蛋白的表达, 但以抑制 MEK 蛋白为主. 其机制可能与阻断 TGF α 信号传导有关.

4 参考文献

- 1 姚树坤, 韩俊岭, 殷飞. 清肝化瘀方对大鼠肝癌前病变预防作用的研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:268-269
- 2 殷飞, 姚树坤, 吴新满, 高洪生, 李志辉. 肝症口服液含药血清对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞增生和 ERK 蛋白的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:1017-1020
- 3 殷飞, 姚树坤, 高洪生. 肝症口服液含药血清对转化生长因子 α 诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 增生和凋亡的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:328-330
- 4 Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M. Activation of mitogen-activated protein kinases / extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27:951-958
- 5 Taupin D, Podolsky DK. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* 1999;116:1072-1080
- 6 Gines P, Li XM, Brown SE, Nakamura T, Guzelian PS, Heasley LE, Schrier RW, Nemenoff RA. Inhibitory actions of cyclic adenosine monophosphate and pertussis toxin define two distinct epidermal growth factor-regulated pathways leading to activation of mitogen-activated protein kinase in rat hepatocytes. *Hepatology* 1996;23:1167-1173
- 7 Schaff Z, Hsia CC, Sarosi I, Tabor E. Overexpression of transforming growth factor α in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia from European patients. *Hum Pathol* 1994;25:644-651
- 8 张静, 王文亮, 李青, 乔庆. α -转化生长因子及其受体在人原发性肝细胞肝癌中的表达意义. 世界华人消化杂志 1999;7:939-942
- 9 Tomoaki T, Kujiuara K. Serum transforming growth factor α level as a marker of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. *Cancer* 1996;77:1056-1060
- 10 Wang XM, Tang ZY, Xue Q. Study of enhancement of liver cancer cell growth by transforming growth factor α . *Zhongguo Zhongliu Linchuang* 1995;22:153-156
- 11 Zheng CF, Guan KL. Cytoplasmic localization of the mitogen-activated protein kinase activator MEK. *J Bio Chem* 1994;269:19947-19952