论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0136-04

PD98059对肝癌HepG2细胞Tec信号转导作用的初步研究

郑继军[1],王 阁[1],邓 婧[1],杨 进[2],王红中[1],胡 庆[1],李增鹏[3],王 东[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,[3]大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042,[2]基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨MEK1抑制剂PD98059对肝癌细胞株HepG2细胞中Tec(tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma)及ERK2作用。**方法** 免疫细胞化学方法检测Tec、ERK2在HepG2细胞中的表达;用RT-PCR和Western blot方法检测,不同浓度PD98059处理细胞后,HepG2细胞中的Tec、ERK2 mRNA及蛋白表达。**结果** Tec、ERK2在HepG2细胞中呈高表达,PD98059明显影响HepG2细胞Tec、ERK2 mRNA以及蛋白表达,呈剂量依赖性,40 μmol/L PD98059细胞抑制最明显。**结论** Tec可能是肝癌细胞内Ras/Raf/ERK信号转导途径上游的信号蛋白,与Ras/Raf/ERK信号转导通路存在着某种信号联系。

关键词: PD98059;Tec;ERK2;肝癌;信号转导

中图法分类号: Q555.7;R730.23;R735.7 **文献标识码:** A

Effect of MEK1 inhibitor PD98059 on the signal transduction of Tec in HepG2 hepatoma cells

ZHENG Ji-jun[1], WANG Ge[1], DENG Jing[1], YANG Jin[2], WANG Hong-zhong[1], HU Qing[1], LI Zeng-peng[3], WANG Dong[1] ([1]Cancer Center, [3]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042; [2]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of MEK1 inhibitor PD98058 on Tec and ERK2 in HepG2 hepatoma cells. Methods The expression of mRNA and protein of Tec and ERK2 in HepG2 cells was detected by immunocytochemistry assay. After various concentration of PD98059 treatment, the expression of Tec and ERK2 mRNA in HepG2 cells was detected by RT-PCR and Western blotting. Results Tec and ERK2 expressed highly in HepG2 cells. PD98059 obviously inhibited the expression of mRNA and protein of Tec and ERK2 in a dose-dependent manner, in which 40 μmol/L of PD98059 exhibited the strongest inhibiting effect. Conclusion PD98058, as MEK1 inhibitor, can inhibit Tec, block the signal route of Ras/Raf/ERK and to impede the signal transduction in HepG2 cells. Tec may be the signal protein in the upper stream of Ras/Raf/ERK in hepatocarcinoma cells and is supposed to interact with the signal way of Ras/Raf/ERK.

Key words: PD98059; Tec; ERK2; hepatocarcinoma; signal transduction

目前国内外最新研究表明,肝癌的发生发展与其肝癌细胞内异常Ras-MAPK信号的转导有关。MAPK家族激酶与细胞增殖、分化过程密切相关。MEPK是细胞外信号调节激酶(ERK)的上游激酶,ERK的信号转导通路(Ras-Raf-MEK—ERK)能被多种生长因子、细胞因子及促分裂剂激活,因而ERK信号转导通路在细胞的增殖和分化调控中发挥重要作用,是多种信号交汇点或共同通路[1]。Tec作为最早从肝癌组织中筛选到的一种存在于细胞质内的非受体酪氨酸蛋白激酶,所介导的信号转导在免疫细胞的分化、发育、增殖和凋亡过程中的重要作用已被证实,但对Tec与肝癌细胞Ras/Raf/ERK信号转导通路的相互作用和关系研究很少[2]。因此,我们以MEK1特异性抑制剂PD98059作用于肝癌细胞株HepG2细胞,探讨PD98059对肝癌细胞Ras/Raf/ERK信号通路中Tec和ERK2的影响,发现他们之间的相互作用与关系,以进一步研究Tec在肝癌发生发展的作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370341),全国优秀博士专项基金资助项目(200261)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370341) and the Academic Foundation for Authors of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200261)

作者简介: 郑继军(1974-),男,山东省青州市人,硕士研究生,医师,主要从事原发性肝癌的分子靶向治疗方面的研究。电话:(023)60798904

通讯作者: 王 阁,电话:(023)68757759

收稿日期: 2005-07-21;**修回日期:** 2005-11-04

1　材料与方法

1.1　材料

①人肝癌细胞株 HepG2 细胞由本中心实验室保存；②兔抗人单克隆抗体 ERK2（Cell Signaling 公司）；③羊抗人单克隆抗体 Tec（Santa cruz 公司）；④PD98059 抑制剂（Cell Signaling 公司）；⑤羊抗兔辣根过氧化物酶标记的抗体（北京中山生物公司），兔抗羊辣根过氧化物酶标记的抗体（Santa Cruz 公司）；⑥S-P 免疫组化试剂盒（北京中山生物公司）；⑦RT-PCR kit（Takara 公司）；⑧发光试剂盒（Pierce）；⑨所有引物均有北京塞百盛生物公司合成。Tec 基因上游引物：5′-TAC AGC CGC TTC AGC AGC AAA TC-3′；下游引物：5′-CCT TCA ACT GGC ATC AGC TAA CAT-3′；ERK2 基因上游引物：5′-TCC AAC CTG CTG CTC AAC ACC AC-3′；下游引物：5′-CAC TCG GGT CGT AAT ACT GCT CC-3′；GAPDH 上游引物：5′-GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG-3′，下游引物：5′-AGG TGG AGG AGT GGG TGT CGC TGT-3′。

1.2　细胞培养与药物

人肝癌细胞株 HepG2 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基，置 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养，培养液加 1% 双抗（青霉素、链霉素），36～48 h 传代，传代前用 0.25% 胰酶消化。

PD98059 为 Cell Signaling 公司产品，以 DMSO 溶解后储存于 -20 ℃备用，其药物活性无改变，每次实验前用新鲜培养液按一定比例稀释到终浓度。HepG2 细胞中加入含 PD98059 的培养液继续培养 48 h 后，依次进行以下实验。实验分为对照组和 PD98059 处理组。处理组又根据 PD98059 的终浓度分为 3 组，即处理 1 组（10 μmol/L）和处理 2 组（20 μmol/L），处理 3 组（40 μmol/L）每组设 3 个孔，结果取平均值。

1.3　免疫细胞化学

将对数生长期的 HepG2 细胞接种于含盖玻片的 6 孔板内，常规培养，待细胞生长至单层时，取出玻片，PBS 缓冲液洗，95% 乙醇固定 30 min，用 PBS 洗后放入 4 ℃冰箱备用。免疫细胞化学染色操作步骤严格按 S-P 试剂盒说明书进行。

1.4　RT-PCR

收集 HepG2 细胞，采用 Trizol 一步法提取总 RNA。逆转录（RT）反应体系 10 μl，$MgCl_2$ 2 μl，10 × RT Buffer 1 μl，Rnase Free dH_2O 3.75 μl，dNTP（各 10 mmol/L）1 μl，Rnase Inhibitor 0.25 μl，0ligo-dT-Adaptor Primer 0.5 μl（1 g/L），AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl，RNA 样品 1 μl。反应条件：30 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min 1 个循环。PCR 反应：在 10 μl的 RT 反应产物中，加入 5 × PCR Buffer 10 μl，灭菌蒸馏水 28.75 μl，上游特异性 PCR 引物 0.5 μl，下游特异性 PCR 引物 0.5 μl，TaKaRa EX Taq™ HS 0.25 μl。循环条件：94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，54 ℃ 40 s，72 ℃ 1 min，共 35 个循环，取 PCR 产物 5 μl，Buffer 2 μl，2% 的琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。以各指标和 GAPDH 扩增条带的吸光面积积分值的比值来评定各指标 mRNA 的表达水平，进行半定量分析。

1.5　Western blot 检测 PD98059 对 HepG2 细胞中 Tec、ERK2 蛋白的抑制作用

细胞用 1 × SDS 细胞裂解液［50 mmol/L Tris-Cl（pH 6.8），100 mmol/L DTT，2% SDS，0.1% 溴酚蓝，10% 甘油］裂解，用超声仪破碎，然后在 4 ℃，10 000 r/min，离心 10 min，上清液用 Bradford 法测蛋白含量，然后加入 2 × SDS 上样缓冲液，煮沸 5 min，离心，上样到 8% SDS-PAGE 胶进行电泳。然后 4 ℃下电转过夜，把蛋白转到 PVDF 膜，然后膜与一抗在摇床上室温摇 4 h。与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h，最后用发光试剂发光，X 线胶片进行曝光、显影、定影、图像分析。

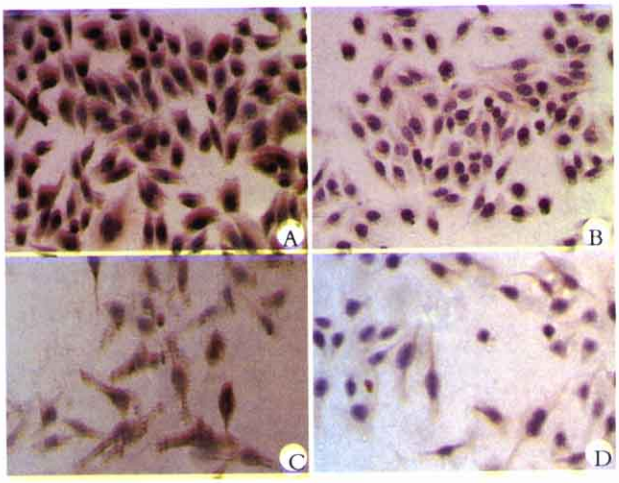
1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　免疫细胞化学分析

Tec、ERK2 经免疫细胞化学染色后，用显微镜观察发现，在 PD98059 处理前的 HepG2 细胞中，胞质内有粗大、密集的棕黄色细颗粒状颗粒；用 PD98058 处理细胞 24 h 后，细胞颗粒明显减少，表现出散在点状分布的细小的颗粒，颗粒变得变小，散在（图 1）。

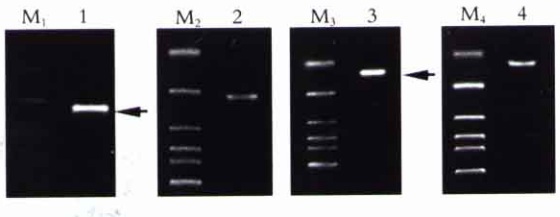


A、B、C、D 分别为抑制前后 ERK2、Tec 在 HepG2 细胞中的表达

图 1　抑制前后 HepG2 细胞中 Tec、ERK2 表达　（S-P × 200）

2.2　PD98059 抑制后的 ERK2、TEC mRNA 表达

ERK2、Tec 经过 PD98059 抑制后，其 mRNA 水平表达降低（图 2）。

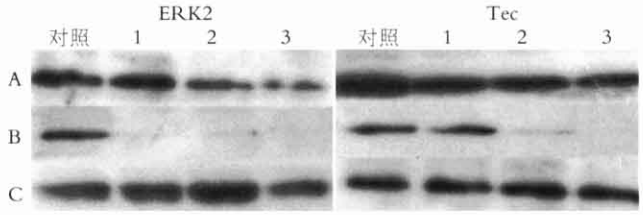


M_1、M_2、M_3、M_4：标准；1、2、3、4 分别为抑制前后 ERK2、Tec mRNA 水平

图 2　ERK2、Tec 抑制前后 mRNA 水平表达

2.3 PD98059 对 HepG2 细胞 ERK2、Tec 蛋白表达的影响

各组细胞经不同处理后，免疫印迹法测得各免疫印迹区带的发光强度各不相同，其中对照组的发光强度最强，终浓度为 40 μmol/L 组的发光强度最弱（图3）。



1、2、3 分别为抑制剂 PD98059 浓度为 10、20、40 μmol/L；A、B 为抑制前后表达、C 为 actin 表达

图3 PD98059 对 ERK2、Tec 蛋白的抑制作用

3 讨论

Tec 是 1990 年，Mono 等在研究肝癌时，从小鼠肝脏的 cDNA 文库中用 v-fps 激酶结构域作为探针，在肝癌组织中筛选到的、起重要作用的一种工作酪氨酸蛋白激酶基因，编码 527 个氨基酸，其分子量约 61×10^3。人 Tec cDNAs 能编码一个 631 个氨基酸残基的多肽，具有 73 624 的分子量。人的 Tec 基因通过荧光原位杂交方法定位在染色体的 4p12。Tec 基因主要在肝脏表达，尤其在人类肝细胞肝癌（HCC）中表达异常高，这是首次报道与肝细胞增殖有关的特异蛋白酪氨酸激酶[3-5]。

Tec 作为最早从肝癌组织中筛选到的一种存在于细胞质内的非受体酪氨酸蛋白激酶，所介导的信号转导主要在免疫细胞的分化、发育、增殖和凋亡过程中起着重要的作用。Tec 是多种细胞因子、辅助分子及受体型蛋白酪氨酸激酶信号转导途径中的重要靶分子，被上游分子激活后，作用于下游底物使之磷酸化，进行信号分子的逐级传递，同时能够参与并调节多种生物学效应。现认为 Tec 是通过与细胞内多种信号分子或 PTK 的相互作用，如 Fyn、Lyn、PI3-K、PLCγ-1、Vav、PKB 等形成不同复合物，发挥着不同信号传递的角色，可在受 Src 家族蛋白激酶的激活，通过接头蛋白，激活 Ras，Raf，发生 MAKP 磷酸化级联反应[5-8]。

MAPK 信号转导通路是一条关键的调节细胞增生和凋亡的相关信号转导通路。ERK 为丝氨酸/苏氨酸激酶，是 Ras/Raf/ERK 信号通路中的关键组分，Ras/Raf/ERK 通路介导的信号传导在 HCC 的发生、发展的各阶段发挥着重要意义[9-11]。Toyoda 等观察癌组织、癌旁和正常对照组织中 ERK1/2 的表达及活性，发现癌组织的 ERK1/2 的表达增强，活性升高，分别为正常对照的 4.5～7.5 倍（$P<0.01$）和 4.6 倍（$P<0.01$）。癌组织的 ERK1/2 表达及活性明显高于癌旁组织。我们使用 MEK1 特异性抑制剂 PD98059 来抑制 ERK2 表达，来观察其对 Tec 的作用，以进一步研究 Tec 在肝癌细胞信号转导中的作用[12-14]。

在本研究中，我们用免疫细胞化学方法分析 Tec、ERK2 在细胞中的表达，发现 Tec、ERK2 在肝癌 HepG2 细胞中高表达，将不同浓度的 PD98059 作用于 HepG2 细胞后发现，HepG2 细胞质中棕黄色颗粒明显减少，着色变浅，Western Blot 进一步证实在 PD9805 作用下 Tec、ERK2 蛋白表达明显受抑制，呈现出量效关系。RT-PCR 检测了抑制前后 Tec、ERK2 mRNA 表达，抑制后 mRNA 水平表达降低，提示 Tec 作为细胞质内的一种非受体酪氨酸蛋白激酶，参与了肝癌 HepG2 细胞的 Ras-MAPK 信号转导通路。

由于用 PD98059 抑制后能够明显的抑制 Tec 表达，与 ERK2 表达和活性呈同步改变，结合 Tec 作为信号转导连接分子位于 ERK2 信号转导通路上游，因此，我们推断 Tec 参与了肝癌的 Ras-MAPK 信号转导或至少是与该信号转导通路发生了 Cross-Talk，进而影响肝癌 HepG2 细胞的信号转导，但 Tec、ERK2 之间具体的相互作用关系还有待进一步的实验研究证明。

参考文献：

[1] SEGER R, KREBS E G. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9(9): 726-735.

[2] TAKESONO A, FINKELSTEIN L D, SCHWARTZBERG P L. Beyond calcium: new signaling pathways for Tec family kinases[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 15): 3039-3048.

[3] MILLER A T, BERG L J. New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system[J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(3): 331-340.

[4] XU W, WANG S, WANG G, *et al*. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(2): 318-325.

[5] OHYA K, KAJIGAYA S, YAMASHITA Y, *et al*. SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase[J]. J Biol Chem, 1997, 272(43): 27178-27182.

[6] YOSHIDA K, YAMASHITA Y, MIYAZATO A, *et al*. Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(32): 24945-24952.

[7] LIANG X, WISNIEWSKI D, STRIFE A, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase and Src family kinases are required for phosphorylation and membrane recruitment of Dok-1 in c-Kit signaling[J]. J Biol Chem,

2002, 277(16): 13732-13738.
[8] TOMLINSON M G, KANE L P, SU J, *et al*. Expression and function of Tec, Itk, and Btk in lymphocytes: evidence for a unique role for Tec [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(6): 2455-2466.
[9] HARRIS V K, COTICCHIA C M, KAGAN B L, *et al*. Induction of the angiogenic modulator fibroblast growth factor-binding protein by epidermal growth factor is mediated through both MEK/ERK and p38 signal transduction pathways[J]. J Biol Chem, 2000, 275(15): 10802-10811.
[10] POSAS F, TAKEKAWA M, SAITO H. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast[J]. Curr Opin Microbiol, 1998, 1(2): 175-182.
[11] PAGES G, LENORMAND P, L'ALLEMAIN G, *et al*. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(18): 8319-8323.
[12] GRAVES L M, GUY H I, KOZLOWSKI P, *et al*. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase[J]. Nature, 2000, 403(6767): 328-332.
[13] XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, *et al*. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis[J]. Science, 1995, 270(5240): 1326-1331.
[14] YADAV G, STRAUME M, HEATH J 3rd, *et al*. Are changes in MAPK/ERK necessary or sufficient for entrainment in chick pineal cells[J]? J Neurosci, 2003, 23(31): 10021-10031.

（编辑 汪勤俭）

文章编号:1000-5404(2006)02-0139-01

个案与短篇

经皮腔内血管内支架成形术治疗症状性大脑中动脉狭窄1例

陈胜利,陈康宁,迟路湘,史树贵,范文辉 （第三军医大学西南医院神经内科,重庆 400038）

脑动脉脉狭窄是脑卒中的一个重要原因,大约10%的缺血性卒中及8%的短暂性脑缺血发作(transient ischemia attack, TIA)是由此而引起的。在亚洲,约1/3急性缺血性卒中是由颅内大动脉闭塞性病变引起的。药物治疗难以解除大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)狭窄导致的TIA发作,而颅内动脉支架成形术提供了一种有希望的方法[1,2]。

1 临床资料

患者,女性,63岁,因"反复发作性左侧肢体无力,说话含糊不清4 h"于2004-10-06门诊以"短暂性脑缺血发作"收入神经内科,既往有高血压病史5年,未正规降压治疗。入院后查体:血压175/100 mmHg。神经系统查体:不完全性运动性失语,右侧鼻唇沟变浅,伸舌向右偏,右侧肢体肌力Ⅲ级,病理反射阳性。急诊查头颅CT提示:双侧小脑、半卵圆中心腔隙性脑梗死。颈部血管超声提示右侧颈内动脉内中膜厚1.4 mm。TCD示右侧MCA未探及,左侧ACA收缩期血流速度:120 cm/s。入院时发作时NIHSS评分8分,入院后给予口服阿司匹林300 mg等治疗,患者的失语和偏瘫于入院后1 h完全缓解,缓解后无神经系统体征,入院后又反复发作上述症状3次。

2 结果

入院以后行选择性全脑血管造影,结果提示左侧大脑中动脉(MCA)M1段狭窄,狭窄率80%,狭窄远端的关注不良(图1)。造影后给予抗血小板聚集3 d,在全麻下行左侧大脑中动脉支架置入术。手术过程:右腹股沟股动脉穿刺,将6 F导引导管,送达颈内动脉海绵窦段下2 cm。再将0.014的微导丝通过狭窄部位插至MCA M3段,造影并测量狭窄长度及程度,狭窄长度为7 mm,狭窄程度为80%,将预选好的支架(2.5 mm×8 mm, Medtronic, AVE)适当塑形,通过微导丝送入。球囊命名压力8 atm×10 s,球囊扩张,脱落支架,使支架扩张并支撑于狭窄部位。造影示支架位置良好,左侧MCA狭窄消失(图2),狭窄远端显影良好。手术后给予抗凝,抗血小板治疗,手术后7 d患者无不适。复查TCD提示左侧MCA及ACA均可探及且流速正常。随访3个月患者无TIA发作。

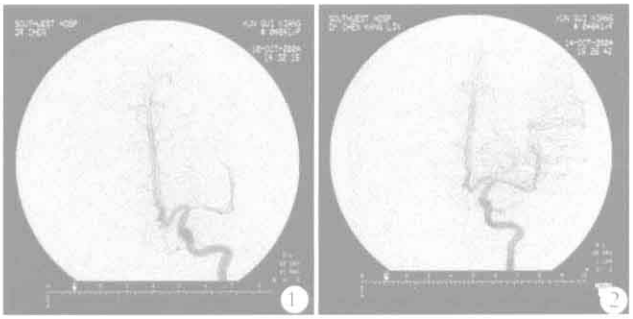


图1 左侧MCA狭窄,狭窄远端灌注不良
图2 MCA狭窄消失,狭窄远端灌注改善

作者简介:陈胜利(1968-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事缺血性脑血管病介入方面的研究,现在重庆市万州三峡中心医院神经内科。电话:(023)73339928
通讯作者:陈康宁,电话:(023)68765253
收稿日期:2005-01-03;修回日期:2005-04-10

（下转143页）