

蓖麻毒素对肝癌细胞有丝分裂原激活蛋白激酶的影响*

董巨莹¹⁾ 药立波²⁾ 彭宣宪¹⁾ 苏成芝²⁾¹⁾厦门大学生物系, 厦门 361005; ²⁾第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032

摘要 为进一步探讨蓖麻毒素的毒作用机理, 采用 Western 印迹和免疫组化方法研究蓖麻毒素对人肝癌细胞内磷酸化状态和有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)的影响. 其结果表明: 蓖麻毒素能够影响细胞内的磷酸化状态, 并能激活细胞内的有丝分裂原激活蛋白激酶, 对 MAPK 的激活有时间依赖性和剂量依赖性. MAPK 信号传导途径参与了蓖麻毒素对肝癌细胞的毒作用.

关键词 蓖麻毒素, 肝癌细胞, 酪氨酸磷酸化, MAPK

中图分类号 Q71

Effect of Ricin on Mitogen Activated Protein Kinase of Hepatoma*

DONG Ju-ying¹⁾, YAO Li-bo²⁾, PENG Xuan-xian¹⁾, SU Cheng-zhi²⁾¹⁾ Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China;²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract The study demonstrates presently that ricin not only is a protein synthesis inhibitor but also can induce apoptosis, production of cytokines and oxidation. To further study molecular mechanism of ricin on hepatoma, we detected phosphorylation of enzymes and effect of mitogen activated protein kinase(MAPK) pathway after ricin stimulated hepatoma by Western blot and immunohistochemical methods. The results demonstrate that ricin can affect phosphorylation of enzymes and activate MAPK in cells. MAPK's activation is time-dependent and dose-dependent. MAPK signal transduction pathway participated in toxicity of ricin in hepatoma cells.

Key words Ricin, Hepatoma, Tyrosine phosphorylation, MAPK

目前一系列研究表明, 蓖麻毒素的毒性作用不仅表现为抑制蛋白质合成, 而且还能诱导细胞凋亡、细胞因子的产生和脂质过氧化等一些毒作用^[1]. 为了进一步探讨这些现象发生的机理, 故从细胞信号转导的途径来揭示蓖麻毒素作用的本质.

当细胞接受外源信号刺激后可产生多种途径的反应, 表现为信号转导分子本身含量或活性的变化, 细胞形态和细胞功能等多方面的变化. 测定这些变化对于认识细胞对外源信号的接受和转导过程以及机理研究具有重要意义. 蓖麻毒素通过其半乳糖结合位点和甘露糖残基与细胞膜表面相应的受体结合后, 可能会导致细胞内相关信号转导分子的活性变化. 本文观察了蓖麻毒素对肝癌细胞的蛋白酪氨酸磷酸化状态的影响, 并对有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)的变化进行了观察, 该研究有助于阐明蓖麻毒素作用的分子机理.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

Ricin 按 Lappi 方法^[2]从蓖麻籽中提取, 经 SDS-PAGE 鉴定为单一条带, 相对分子质量(M_r)为 65 kD. 肝癌细胞 SMMC-7721 引自上海第二军医大学; Hepes 和 RPMI 1640 培养基为 GIBCO 产品; 小牛血清为上海市放射医学研究所监制产品; 抗酪氨酸磷酸化抗体 PY₁plus 和兔抗人 ERK1 抗体为美国 ZYMED 公司产品; 兔抗人磷酸化 ERK1 抗体为

* 国家自然科学基金资助(编号: 39500122)

** 联系人 Tel: 029-3374513, E-mail: lioyad@fmmu.edu.cn
董巨莹, 女, 1968 年 12 月生. 博士毕业于第四军医大学生物化学与分子生物学教研室. 现在厦门大学生物系博士后工作.

收稿日期: 2000-02-10, 修回日期: 2000-06-21

Santa Cruz 生物技术公司产品; HRP 标记的二抗 (驴抗兔) 购自于北京军事医学科学院; ECL 检测盒购自于 Amersham International PLe, Englan; Protein Assay Kit 和多色荧光凝胶成像仪为美国 BIO-RAD 产品; 蛋白 marker 购自于华美公司; PVDF 转印膜购自于美国 millipore 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SMMC-7721 细胞生长于含 10% 小牛血清 (56°C, 30 min 灭活), 20 mmol/L Hepes 的 1640 培养液中, 在 37°C, 5% CO₂ 的温箱中培养.

1.2.2 蓖麻毒素刺激及细胞裂解: 刺激前 24 h 将细胞分入 60 mm 塑料培养皿内, 继续培养 24 h, 换成无血清培养液继续培养 12 h. 不同剂量的蓖麻毒素刺激细胞 (采用 3 个时间点, 即 15 min, 30 min, 45 min 或 60 min). 刺激后将刺激剂吸走, 用预温的 PBS (0.05 mol/L, pH 7.4) 洗 2 次. 加入 100 μl 的冰预冷裂解液, 置于冰上裂解. 裂解液含 1% NP-40, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.15 mol/L NaCl, 0.1% Na₃VO₄ 和 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF). 用细胞刮子刮下细胞, 并将粘稠的细胞裂解液吸入离心管中, 置冰浴 10 min, 4°C 离心 12 000 r/min, 10 min, 上清中的蛋白质用 Bio-Rad DC Protein Assay Kit 进行定量, 调整上样体积, 使每孔上样量为 60 μg. 加入 5× loading 缓冲液, 再用 12% SDS-PAGE 分离细胞上清中的蛋白质.

1.2.3 蛋白质印迹转移: 剪 6 张电泳凝胶大小一致的 Whatman 3MM 滤纸和一张 PVDF 转印膜. 用甲醇浸泡 PVDF 转印膜 15 s, 转移缓冲液浸泡 whatman 3MM 滤纸. 采用电转移方法, 将聚丙烯酰胺凝胶电泳中的蛋白条带转移至转印膜上. 用含 1% 明胶的 PBS-T (含 0.05% Tween-20) 封闭膜, 以减少非特异反应. 加入溶有一抗 (浓度按照说明书要求) 的新鲜配制的封闭液, 4°C 过夜后, 加入溶于封闭液中的二抗 (1: 4 000 稀释). 室温振荡温育 1~2 h. 取出膜后, 再用 TBST 洗 10 min × 4 次, 以除去未结合的二抗.

1.2.4 快速化学发光 (ECL) 检测: 用滤纸吸干膜上液体, 备用. 将 ECL 中试剂 1 和 2 各吸出 1 ml, 混匀后将膜浸入 1 min, 将膜上的多余液体吸干, 封入保鲜膜放入压片盒中 X 光片显影.

1.2.5 免疫细胞化学检测 MAPK 将细胞培养于载玻片上, 冷丙酮 4°C 固定 10 min, PBS 浸泡 10 min, 含 0.01% Triton PBS 处理 30 min, PBS 洗 3

min × 3 次. 3% 双氧水封闭 30 min, PBS 洗 3 min × 3 次. 正常羊血清封闭 30 min. 加含有兔抗人的各种一抗 (1: 50), 4°C 冰箱过夜, PBS 洗 3 min × 3 次. 加入生物素化羊抗兔 (1: 200), 室温温育 3 h, PBS 洗 5 min × 3 次. 加入 AB 复合物 (1: 100), 室温温育 1 h. DAB-H₂O₂ 显色 5 min, 苏木精衬染, 脱水透明, DPX 封闭.

2 结 果

2.1 蓖麻毒素对肝癌细胞蛋白酪氨酸磷酸化的影响

2.1.1 蓖麻毒素作用不同时间对肝癌细胞内蛋白酪氨酸磷酸化的影响: 通过预实验选定刺激剂量为 100 nmol/L, 分别用蓖麻毒素刺激 15 min, 30 min 和 60 min. 采用 PY-plus 抗体进行 Western 印迹分析. 从实验结果 (Fig. 1) 观察到: 与阴性对照相比, 在 15~30 min 时, 蓖麻毒素诱导蛋白酪氨酸磷酸化作用有逐渐增强的趋势. 蓖麻毒素诱导 90 kD, 60 kD, 47 kD, 42 kD, 38 kD, 32 kD 蛋白发生酪氨酸磷酸化. 随着时间的延长, 达 1 h 时, 蓖麻毒素诱导蛋白酪氨酸磷酸化作用显著减弱.

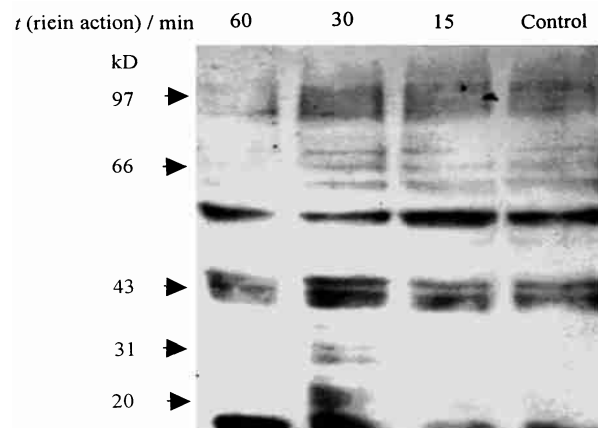


Fig. 1 The effect of ricin on protein tyrosine phosphorylation status in hepatoma

2.1.2 不同浓度的蓖麻毒素对肝癌细胞内蛋白酪氨酸磷酸化的影响: 分别用 10 nmol/L, 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L 的蓖麻毒素刺激肝癌细胞 30 min. 采用 PY-plus 抗体进行 Western 印迹分析. 从实验结果 (Fig. 2) 观察到: 与阴性对照相比, 随着浓度的增加, 蓖麻毒素诱导的蛋白发生酪氨酸磷酸化略有增强, 但变化不十分明显.

2.2 蓖麻毒素诱导肝癌细胞有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 的作用

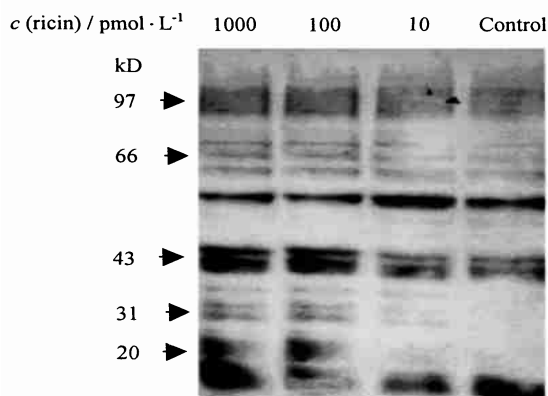


Fig 2 The change of protein tyrosine phosphorylation of hepatoma induced by ricin

2.2.1 蓖麻毒素诱导 MAPK活化的时程: 根据蓖麻毒素作用于细胞的时间分别为 0 min、15 min 和 30 min. 用抗磷酸化的 MAPK 抗体所检测的结果表明: 与未经蓖麻毒素刺激的细胞相比, 在 15 min 时 MAPK 的活性最强, 随着蓖麻毒素作用时间的延长, 30 min 时的磷酸化程度略有降低 (见 Fig. 3A). 采用多色荧光凝胶成像系统进行定量扫描, 其光密度值结果分别为 0.01、0.48、0.68、0.53; 同一张膜 striping 后, 用非活化形式的抗 MAPK 抗体进行染色, 可见 MAPK 的着色在刺激前后变化不大 (见 Fig. 3B). 多色荧光凝胶成像系统定量扫描的光密度值分别为 0.40、0.44、0.47 和 0.43, 表明 MAPK 的总量基本是相同的.

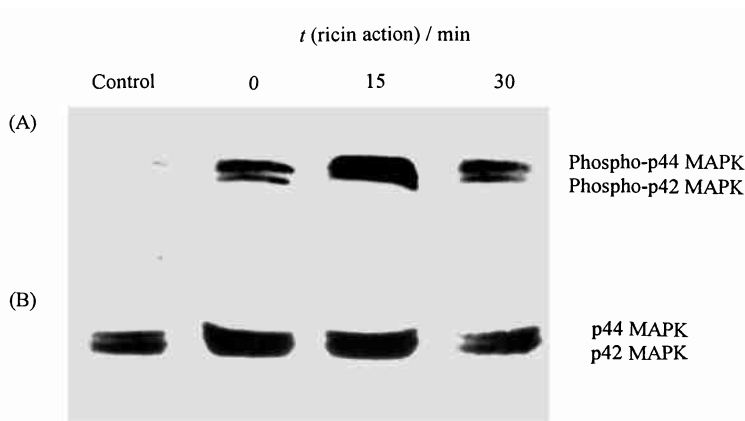


Fig. 3 The activation of P44/42 MAP kinase induced by ricin in SMMC-7721 cells

(A) Phospho-MAP kinase (Thr202/Tyr204) Ab; (B) P44/42 MAP kinase Ab

2.2.2 不同浓度的蓖麻毒素对 MAPK活化的影响: 选定蓖麻毒素刺激细胞的浓度分别为 10 nmol/L、100 nmol/L 和 1000 nmol/L, 作用时间为 15 min. 同上述相同, 用抗磷酸化的和非磷酸化的 ERK

抗体进行 Western 印迹分析. 磷酸化的 ERK 抗体进行染色, 结果见 Fig. 4A, 与未经蓖麻毒素处理的空白对照相比, 随着浓度的增加, ERK 的活化程度略有增强. 多色荧光凝胶成像系统进行定量扫描, 其

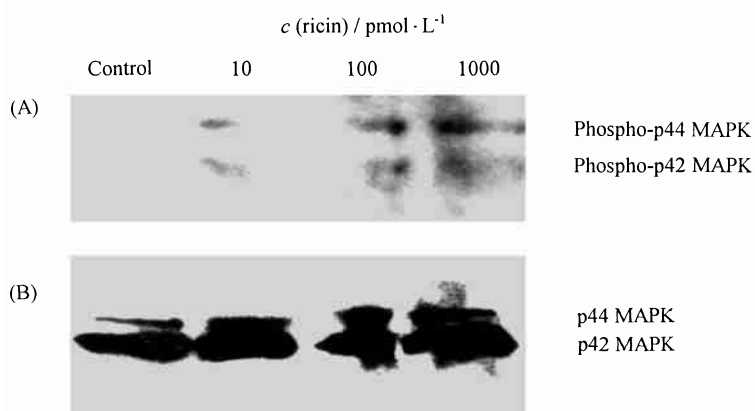


Fig 4 The activation of P44/42 MAP kinase in different concentrations of ricin treated SMMC-7721 cells

(A) Phospho-MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Ab; (B) P44/42 MAP Kinase Ab

光密度值结果分别为 0.12、0.19 和 0.38; Fig. 4B 为非磷酸化的 ERK 抗体分析蓖麻毒素处理前后的结果, 多色荧光凝胶成像系统定量扫描的光密度值分别为 0.45、0.49、0.53 和 0.53, 表明 ERK 的总量基本不变。

2.3 免疫细胞化学染色观察蓖麻毒素刺激细胞后胞内 MAPK 的分布

根据上面的结果, 采用 100 nmol/L 的蓖麻毒素作用于细胞 15 min 后, 冷丙酮固定细胞, 用抗磷酸化的 MAPK 抗体进行免疫组化 ABC 染色, 苏木精衬染。从结果可见, 与空白对照相比 (Fig. 5A), 核内呈棕色着色, 表明蓖麻毒素可诱导 MAPK 的核转位, 即对 MAPK 有激活作用 (Fig. 5B)。

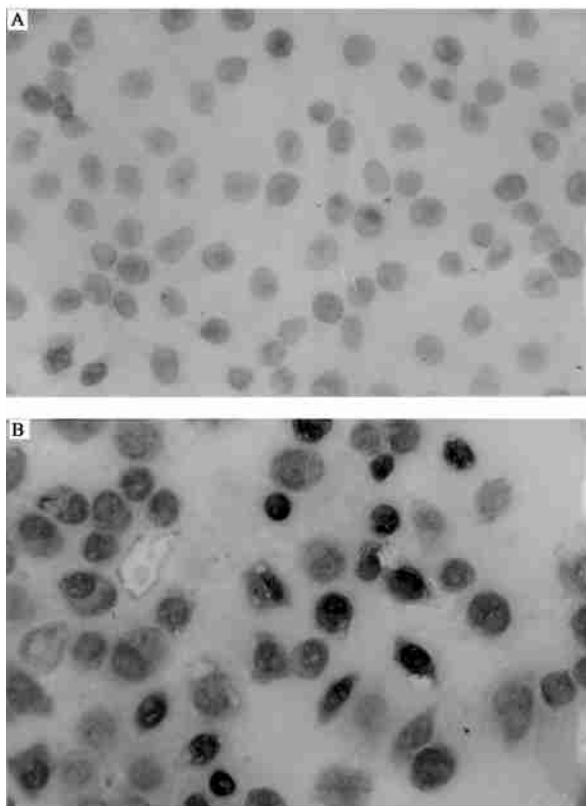


Fig. 5

(A) SMMC-7721 hepatoma cells was not stimulated by ricin

($\times 240$)

(B) Ricin has stimulated hepatoma cells for 15 min ($\times 240$)

3 讨 论

当细胞受到外源化学或物理信号的刺激时, 其细胞的一系列功能改变及其信号转导机制是近年来分子生物学领域中研究最为广泛和深入的内容之一。细胞表面受体到核的信号通路是通过一些磷酸化过程传递的。磷酸化在蛋白功能的急性反应调节

中是重要机制。所有细胞蛋白的 1/3 要进行蛋白磷酸化修饰^[3]。在激素、生长因子、神经递质刺激后的细胞信号转导途径中, 蛋白磷酸化和脱磷酸化功能诱导着快速反应, 发育和分化同样被磷酸化所控制^[3, 4]。

现有的实验表明^[5], 蓖麻毒素不仅能够抑制细胞的蛋白质合成, 而且还能诱导肝癌细胞凋亡、细胞因子的分泌以及细胞内过氧化作用。为什么会产生如此多的作用? 这可能是由于蓖麻毒素的结构所造成。蓖麻毒素是由两条肽链构成的糖蛋白, 蓖麻毒素结构中 B 链上有 3 个半乳糖结合位点^[6], 而细胞膜表面的受体大都是糖蛋白, 而且半乳糖的含量很高。蓖麻毒素可能通过其 β 链上半乳糖结合位点与细胞膜表面含半乳糖残基的受体结合, 信号从膜受体到核的转导过程中, 通过了分裂原激活蛋白激酶的级联反应通路。本文观察了蓖麻毒素对肝癌细胞的蛋白酪氨酸磷酸化状态的影响。蓖麻毒素作用于细胞后, 在分子量为 38 kD、40~46 kD、50~65 kD 等处可见有磷酸化条带, 预示着有 MAPK (分裂原激活蛋白激酶) 家族的成员参与了蓖麻毒素诱导的信号转导。因此根据磷酸化条带, 我们首先选择 MAPK 进行 Western 印迹分析, 观察蓖麻毒素作用于细胞后对该信号分子活性变化的影响, 研究它是否可能通过这一途径引起细胞行为的变化。实验表明, 蓖麻毒素作用于细胞后能够激活 MAPK, MAPK 的激活在蓖麻毒素作用细胞 15 min 时活性最强, 到 30 min 时开始降低; 其活性变化随蓖麻毒素剂量的增大而略有增强。由此可推测蓖麻毒素的毒作用机理与 MAPK 的通路有关。信号途径的激活与诱导细胞凋亡、TNF 等细胞因子的分泌以及氧化应急等都有直接或间接的关系。更深的机理需进一步研究它们诱导发生酪氨酸磷酸化的蛋白种类及具体的信号转导途径。

参考文献 (References)

- 1 Sadani G R, Soman C S, Deodhar K K. Reactive oxygen species involvement in ricin-induced thyroid toxicity in rat. *Hum Exp Toxicol*, 1997, **16**(5): 254-256
- 2 Lappi D A. Disulfide bond connecting chains of ricin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**: 1096-1099
- 3 Chmiack A D, Klarlund J K, Czech M P. Phosphorylation of the ras nucleotide exchange factor Son of Sevenless by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 4717-4720
- 4 Lin K, Kurland I J, Li L, Lee Y H, Okar D, Marecek J F, Pilikis S J. Evidence for NH₂- and COOH-terminal interactions in rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Biol*

Chem, 1994, 269 16953~ 16958

- 5 董巨莹, 王文学. 蓖麻毒素及其修饰物诱导 U937细胞分泌 IL- β 和 TNF- α 的比较. 细胞与分子免疫学杂志 (Dong Ju-ying, Wang Wen-xue. The comparative study for induction of IL- β and TNF- α between ricin and modification in U937. *J Cell Mol Immunol*, 1999, 15(2): 123~ 126

- 6 Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins *J Biol Chem*, 1987, 262 5908 ~ 5912

选择好, 花钱少

—— 华美生物工程公司部分质优价廉常备产品介绍

在选择科研试剂时多数人习惯性地首选在国内已有名的国外名牌, 但他们一般都价格昂贵, 到货期长. 其实像 Biomol Amresco SBG 等公司不仅也是名牌, 而且往往是我们熟知名牌的供应商. 他们为开拓中国市场, 价格和服务都很有竞争力, 因此华美公司许多常备货都选用了这种产品 (见表 1 表 2 及本期广告), 选用这些产品, 用户不但不会到货延迟, 而且也少花钱.

有时候公司为了宣传, 进行促销优惠活动, 使得一些产品在某一阶段有大量现货或价格比较有竞争力 (见表 3), 经常使用的试剂选择适当的时机购买, 也可以节省经费.

另外, 用户长期地在一些比较稳定的公司购买试剂, 也容易享受到一些优惠的措施.

科研试剂市场既有不同于大众市场的独特之处, 又与大众市场有相同的特点, 只要稍微多花一些工夫, 就可以用相同的经费办更多的事情.

表 1 Biomol 公司的部分产品价格 (元)

| | | | | | |
|----------|-----------|---------------|-----------|---------------------|-----------|
| 丙烯酰胺 | 60/100 g | HEPES | 2486/kg | N AD | 230/g |
| 过硫酸铵 | 55/50 g | | 98/25 g | SDS | 30/100 g |
| 氨基青霉素钠盐 | 39/g | N, N 亚甲基双丙烯酰胺 | 698/250 g | 3, 3', 5, 5' 四甲基联苯胺 | 3984/25 g |
| 羧苄青霉素二钠盐 | 75/100 mg | | 35/10 g | Triton X-100 | 36/100 g |

表 2 Amresco 公司的部分产品价格 (元)

| | | | | | |
|-------------|------------|-----------------|------------|--------------|-----------|
| 琼脂粉 (培养用) | 185/100 g | 去离子甲酰胺 | 300/100 ml | 胃蛋白酶 1: 3000 | 709/500 g |
| 溴酚蓝 | 444/50 g | 明胶 | 488/500 g | | 106/50 g |
| 4-氯-1-萘酚 | 496/25 g | Geneticin G-418 | 115/100 mg | 链霉素和素 | 501/mg |
| 考马斯亮蓝 G-250 | 74/2 g | 谷胱甘肽 (还原型) | 157/5 g | 胰蛋白酶 1: 250 | 151/25 g |
| DEPC | 220/5 g | 卡那霉素 | 83/g | Tween 20 | 453/4 L |
| 二甲基甲酰胺 | 112/500 ml | 2-巯基乙醇 | 164/250 ml | 尿素 | 288/kg |
| DM SO | 187/500 ml | PM SF | 84/g | | |

表 3 部分价格比较优惠的产品 (元)

| | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------------------|-------------|------------------|-----------|-----------------------|
| DN TP100 mM | Pharmacia | 280/4 | 100 μ l | MEM 干粉培养基 | Gibco | 287.5/10 \times 1 L |
| 蛋白酶 k | Merck | 280/100 | mg | RP M I-1640F 培养基 | Gibco | 287.5/10 \times 1 L |
| DEPC | Amresco | 220/5 | g | HT 混合盐 | Gibco | 256.50/50 ml |
| Trizol | Gibco | 1202/100 | ml | HAT 混合盐 | Gibco | 582/10 \times 10 ml |
| 琼脂糖 | 国产 | 26/10 | g | 水解乳蛋白 | Gibco | 540.50/500 g |
| 琼脂糖 | 西班牙 | 320/100 | g | 胎牛血清 | 国产 | 138/200 ml |
| Tris (超纯) | Augus | 86/250 | g | 新生牛血清 | 国产 | 68/200 ml |
| 溶菌酶 | Biozyme | 38/1 | g | 葡聚糖凝胶 G-25 | pharmacia | 780/50 g |
| 辣根过氧化物酶 | Biozyme | 6380/100 | mg | 牛血清白蛋白 (组份 V) | Randex | 3100/500 g |
| 链霉菌蛋白酶 E | Merck | 708/ | g | 聚乙二醇 6000 | 日本 | 88/500 g |
| 链脲佐菌素 | sigma | 280/100 | mg | 淋巴细胞分离液 | 上海 | 78/250 ml |
| DM EM 培养基 (高糖) | Gibco | 287.5/10 \times 1 L | | 湿润剂 P-40 | Fluka | 55/100 ml |
| 199 培养基 | Gibco | 287.5/10 \times 1 L | | 叠氮钠 | 进口分装 | 224/100 g |

华美生物工程公司 SINO-AMERICAN BIOTECHNOLOGY COMPANY

地址: 北京市海淀区学院路丙 39 号都宇商住小区 N 栋, 邮政编码: 100083

电话: (010) 82311583, 82311585, 82311586, 82311136; 传真: (010) 82311228; E-mail: sabcbj@SABC.com.cn