

微囊藻毒素 LR 影响人肝细胞 HL7702 的 ERK 及 JNK 的蛋白磷酸化

孙 瑜 黄 朴 徐立红

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

MICROCYSTIN-LR INDUCES PHOSPHORYLATION OF ERK AND JNK IN HUMAN HEPATOCYTE HL7702

SUN Yu, HUANG Pu and XU Li-Hong

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

关键词: p-ERK; p-JNK; p-P38; 微囊藻毒素 LR; HL7702 细胞

Key words: p-ERK; p-JNK; p-P38; Microcystin-LR; HL7702

中图分类号: Q503.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)01-0180-03

微囊藻毒素(Microcystin, MCYST)是蓝藻的一些属产生的次级代谢产物,在发生水华的水体中普遍存在。微囊藻毒素 LR(MCLR)是微囊藻毒素中存在最为普遍且毒性作用最强的一种。已有研究表明,微囊藻毒素可以诱发肝毒性并且与人群中的肝癌发生密切相关^[1,2],因此进一步阐明其致毒机理具有重要的意义。

细胞外信号调节蛋白激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(C-jun NH2-terminal kinase, JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 Mitogen activated protein kinase, P38)是丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinases, MAPK)家族的三个关键蛋白。MAPK 家族是 MAPK 信号通路的枢纽,激活时其蛋白磷酸化水平升高,参与调控细胞的增殖、分化、凋亡等细胞活动^[3]。

一些细胞因子、DNA 损伤剂等外来物质和细胞环境的变化可以激活 MAPK 信号通路。本实验室前期研究证实, MCLR 对大鼠淋巴细胞具有 DNA 损伤效应^[4],并且 MCLR 也是一种公认的蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A(Protein phosphatase 1/2A)的抑制剂,因此 MCLR 进入细胞后,很可能通过影响信号通路,对细胞内正常的信息传递产生干扰,从而发挥其毒性作用。本研究探讨了微囊藻毒素对人肝细胞 HL7702 的上述三种蛋白磷酸化的影响(分别表

示为 p-ERK、p-JNK、p-P38),对于评价微囊藻毒素对靶器官的细胞信号转导可能产生的干扰具有重要的参考意义。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人肝细胞系-HL7702 细胞购自中国科学院细胞库, RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,胰蛋白酶购自 Serva 公司; 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑盐 (MTT)购自上海生工生物工程技术有限公司;微囊藻毒素 LR 购自 Sigma 公司; p-JNK(Thr183/ Tyr185)一抗(兔来源单抗)、p-P38 (Thr180/ Tyr182) 一抗(兔来源单抗)、JNK 一抗(兔来源单抗)、P38 一抗(人来源多抗)、ERK1/2 一抗(兔来源单抗)均购自 Cell Signaling Technology 公司; p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) 一抗(兔来源多抗)购自 MBL 公司; GAPDH(鼠来源单抗)购自上海康成生物技术有限公司;二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG)购自 Santa Cruz 公司;硝酸纤维素膜购自 BIO-RAD 公司;滤纸购自 Whatman 公司;医用感光胶片购自 Kodak 公司;其余试剂均为市售分析纯。

1.2 细胞培养及处理

HL7702 细胞以含 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培

收稿日期: 2010-01-11; 修订日期: 2010-11-02

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX07421-001); 国家自然科学基金(20777067); 浙江省自然科学基金(Y206088)资助

作者简介: 孙瑜(1983—), 女, 辽宁盖州市人; 博士研究生; 主要从事生化毒理学研究。E-mail: sunyu9633@yahoo.com.cn

通讯作者: 徐立红, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

培养基在 37℃ 及 5%CO₂ 的湿化培养箱中进行培养, 隔天传代一次。实验所用的细胞均处于对数生长期。细胞培养瓶接种密度为 1×10^5 cells / mL, 96 孔板接种密度为 5×10^4 cells / mL, 细胞贴壁生长 24h 后, 在培养体系中分别加入 MCLR 至终浓度为 0、50、100、500、1000、2000 nmol/L, 作用时间 24h。

1.3 MTT 比色法测细胞活力

染毒 24h 后, 每孔换为 MTT 溶液(5 mg/mL 的 MTT 20 μ L+培养基 180 μ L), 37℃ 继续孵育 4h 后终止培养, 吸弃孔内培养液上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡 10min, 用酶标仪在 490 nm 处测各孔吸光度值。

1.4 细胞全蛋白的提取

经 MCLR 处理的 HL7702 细胞用冷 PBS 缓冲液洗后重悬于 100 μ L 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄, pH 7.6)中, 冰上放置 30min 后, 离心(20000 g, 4℃) 30min, 取上清, Folin 酚法测蛋白浓度, 按 50 μ g/管分装, -80℃ 保存备用。

1.5 Western blot 检测 MAPK 蛋白表达

蛋白电泳方法参考文献[5], 每个样品上样量为 50 μ g。

蛋白转移方法根据文献[5]略加修改: 将结合有目的蛋白的硝酸纤维素膜用 5% 脱脂牛奶封闭 3h, 然后取出放入稀释的一抗中(p-JNK 1: 500, p-P38 1: 200, p-ERK 1:750, JNK 1:2000, P38 1:1000, ERK 1:1000), 置于冰上温和振荡, 过夜; 去掉一抗后用 TBST(50 mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% TWEEN-20, pH 7.6)洗膜 30min, 将膜置于 1:10000 稀释的二抗中温和振荡 2h, 然后用 TBST 洗膜 30min。

曝光、显影及定影方法参考文献[5]。

图像分析及处理: 胶片扫描后用 quantity one 图像分析软件分析, 用磷酸化目的蛋白条带灰度值与其相应总目的蛋白条带灰度值之比计量磷酸化蛋白水平的相对含量, 将对照组的值设为 1, 其余各组以相对倍数表示。

1.6 结果分析

将各剂量组的结果分别与对照组相比, 数据分析采用 SPSS 12.0 统计软件, 采用单因素方差分析法(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MCLR 对细胞活力的影响

图 1 为 MCLR 对细胞活力的影响, 在实验所用 0—2000 nmol/L 的 MCLR 染毒浓度范围内, MCLR 染毒组的 MTT 吸光度值与对照组相比, 无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 MCLR 对蛋白表达的影响

图 2 为 HL7702 细胞暴露于不同浓度 MCLR 24h 后 p-ERK、ERK、p-JNK、JNK、p-P38、P38 的蛋白水平。

随着染毒剂量的升高, p-ERK 和 p-JNK 有升高趋势, 而 p-P38 无变化, 其中 p-JNK 变化更为明显(图 3—5), 在染毒浓度为 1000 nmol/L 和 2000 nmol/L 时, p-ERK 和 p-JNK 与对照组相比具有显著性差异; 而 p-P38 的与对照组相比无统计学差异。

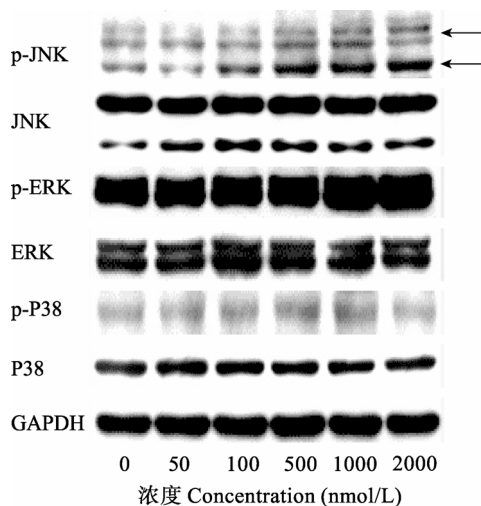


图 1 HL7702 暴露于不同浓度 MCLR 后 p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-P38, P38, GAPDH 蛋白水平(箭头所指为 p-JNK 蛋白条带)
Fig. 1 p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-P38, P38, GAPDH protein level in HL7702 exposed to MCLR (arrows depict p-JNK)

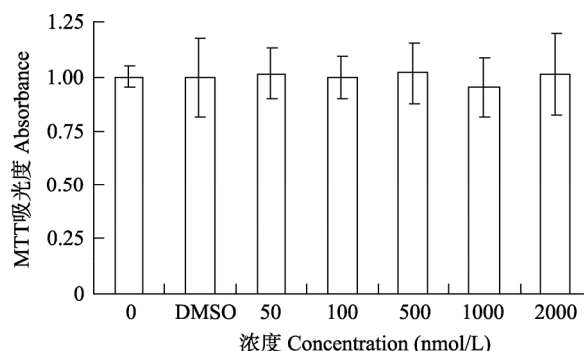


图 2 不同浓度 MCLR 对 HL7702 细胞活力的影响
Fig. 2 Effects of MCLR on proliferation of human hepatocytes ($n=3$)

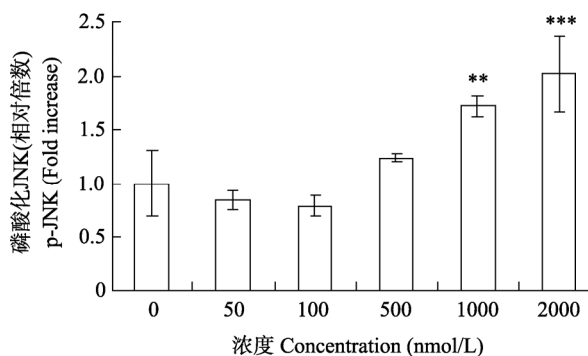


图 3 HL7702 暴露于不同浓度 MCLR 后 p-JNK 水平
Fig. 3 p-JNK expression in HL7702 exposed to MCLR ($n=3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

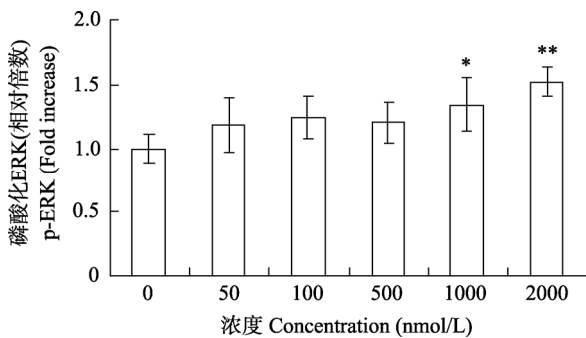


图4 HL7702 暴露于不同浓度 MCLR 后 p-ERK 水平

Fig. 4 p-ERK expression in HL7702 exposed to MCLR ($n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

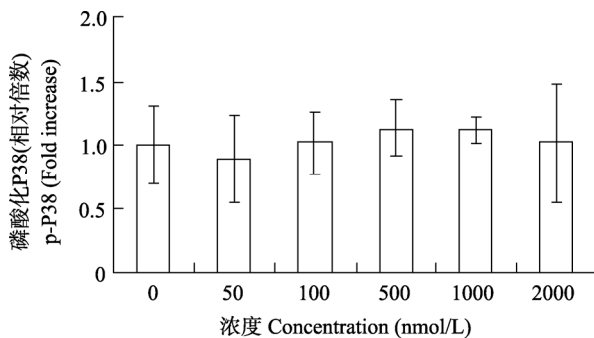


图5 HL7702 暴露于不同浓度 MCLR 后 p-P38 水平

Fig. 5 p-P38 expression in HL7702 exposed to MCLR ($n=3$)

3 讨论

MAPK 信号通路是细胞的重要信号转导途径之一,参与调控细胞的增殖、分化、细胞周期及凋亡等。一些生长因子、细胞因子、渗透压改变、炎症、DNA 损伤剂等可以激活 MAPK 信号通路^[6], MAPK 通路的异常也与癌症相关^[7-9]。MCLR 作为一种公认的 PP1 和 PP2A 的抑制剂,进入细胞后,对细胞内正常的信息传递和信号转导过程的干扰已受到广泛关注。已有研究证实, MAPK 信号通路参与 MCLR 诱导的人肾细胞凋亡^[10]; 在 MCLR 引起的小鼠肝氧化损伤过程中, JNK 通路被激活^[11]。

本实验在对细胞存活力无影响的 MCLR 作用浓度下,检测到了 ERK 通路与 JNK 通路的激活,证明 MCLR 对 HL7702 细胞中 MAPK 信号通路产生了干扰,进而可能影响细胞内正常的生理功能。

虽然已知研究发现, MAPK 家族参与调控细胞的增殖、分化、凋亡等细胞活动,但是被外源性因素激活后,引发的直接的细胞效应还不清楚。例如 JNK 通路激活时,既可能会引起细胞凋亡,也有可能引起细胞增殖,原因可能是因为通路激活的时间和程度不同,导致的结果不同;或者同时伴有其他通路的激活,形成细胞内信号调控的复杂网络式反应。因此,本实验后续的工作将增加

微囊藻毒素对肝细胞的染毒浓度和作用时间点,研究其可能引发的细胞活动的改变以及 MAPK 信号通路是否参与相应细胞活动改变的调节过程。

参考文献:

- [1] Pichardo S, Jos A, Zurita J L, *et al.* The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR [J]. *Toxicol in Vitro*, 2005, **19**(7): 865—873
- [2] Svircev Z, Krstic S, Miladinov-Mikov M, *et al.* Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia [J]. *Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009, **27**(1): 36—55
- [3] M. Krishna, H. Narang. The complexity of mitogen-activated protein kinases(MAPKs) made simple [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, **65**(22): 3525—3544
- [4] Chen J P, Weng D P, Fu W Y, *et al.* Damage of microcystin-LR on rat lymphocytes DNA [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(6): 677—678 [陈加平, 翁登坡, 傅文字, 等. 微囊藻毒素 LR 对大鼠淋巴细胞 DNA 的损伤效应. 水生生物学报, 2004, **28**(6): 677—678]
- [5] Chen J P, Xu L H, Fu W Y, *et al.* Bax expression of rat nephrocyte NRK induced by microcystin-LR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 450—451 [陈加平, 徐立红, 傅文字, 等. 微囊藻毒素 LR 诱导大鼠肾 NRK 细胞 Bax 蛋白表达. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 450—451]
- [6] Junttila M R, Li S P, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival [J]. *The FASEB Journal*, 2008, **22**(4): 954—965
- [7] Galabova-Kovacs G, Kolbus A, Matzen D, *et al.* ERK and beyond: Insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts [J]. *Cell Cycle*, 2006, **5**(14): 1514—1518
- [8] Kennedy NJ, Davis RJ. Role of JNK in tumor development [J]. *Cell Cycle*, 2003, **2**(3): 199—201
- [9] Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, *et al.* Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2003, **97**(12): 3017—3026
- [10] Komatsu M, Furukawa T, Ikeda R, *et al.* Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3 [J]. *Toxicology Sciences*, 2007, **97**(2): 407—416
- [11] Wei Y, Weng D, Li F, *et al.* Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR [J]. *Apoptosis*, 2008, **13**(8): 1031—1042