



投稿



查稿



网上商城



考试



期刊



视频

专科文献

在线投稿 稿件查询 期刊阅读

搜索: 请输入您想要的信息 搜索 高级搜索

您当前位置: 首页 >> 专科文献 >> 血液内科

血液内科

丁酸钠诱导人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1分化作用中细胞外信号调节激酶通路的改变

发表时间: 2011-12-7 9:27:46 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 李春蕊,刘文励,孙汉英,周剑锋 作者单位: 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科, 武汉 430030

【摘要】本研究探讨细胞外信号调节激酶(ERK)通路在丁酸钠(NaB)诱导人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1分化中的作用, 阐明丁酸钠诱导SKM-1细胞分化的分子机制。用Western blot方法检测总ERK和磷酸化ERK的表达水平;将ERK特异性的抑制剂PD98059与丁酸钠联合应用, 观察它们对SKM-1细胞生长曲线的影响及分化效应, 并用Western blot方法检测P21和组蛋白脱乙酰酶(HDAC)蛋白质的表达水平。结果表明: SKM-1细胞经1 mmol/L的丁酸钠作用后, 总ERK的表达水平未发生变化, 而磷酸化ERK的表达水平下降;丁酸钠及丁酸钠+PD98059均可以上调P21和HDAC蛋白质的表达水平, 且丁酸钠联合PD98059的作用强于丁酸钠单用。结论: ERK通路抑制是丁酸钠诱导SKM-1细胞分化的重要分子机制。

【关键词】 丁酸钠

Abstract The study was purposed to investigate the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in the differentiation of human MDS cell lines SKM-1 induced by sodium butyrate (NaB), and to elucidate the molecular mechanism of differentiation in SKM-1 cells induced by NaB. The expression levels of total ERK and phosphorylated-ERK were determined by Western blot. The effect of NaB in combination with the ERK inhibitor PD98059 on the proliferation/differentiation of SKM-1 cells was studied, and then the expression levels of the P21 and HDAC protein were detected by Western blot. The results showed that the expression level of phosphorylated ERK was down-regulated by the 1 mmol/L NaB, and the level of total ERK had not changed. NaB or combination of the MEK inhibitor PD98059 with NaB could increase the differentiation of the SKM-1 cells and up-regulated the levels of the P21 and HDAC protein, but the effect of combination of NaB with PD98059 was higher than that of NaB alone. It is concluded that the inhibition of ERK may be involved in sodium butyrate inducing differentiation in SKM-1 cells.

Key words differentiation; SKM-1; sodium butyrate; ERK

大量研究显示, 肿瘤细胞分化与丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号转导途径密切相关。MAPK属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可被多种刺激所活化, 活化后可磷酸化核转录因子和其它蛋白激酶等多种底物, 调节相关基因的转录, 进而参与细胞生长、发育、分裂等多种生理过程。细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路是MAPK系统主要的和经典的通路, 主要传递细胞丝裂原信号, 参与调节细胞周期及促进细胞增殖分化[1]。有研究表明[2]在丁酸钠诱导人大肠癌细胞分化过程中有ERK通路的抑制, 但有关丁酸钠诱导人骨髓增生异常综合征细胞分化的ERK信号转导途径尚无报道。我们前期的研究结果表明[3]: 小剂量的NaB可促进SKM-1细胞的分化, 将细胞周期阻滞于G0/G1期, 其机制可能是通过上调P21的表达和下调细胞周期蛋白-D (cyclin D)与依赖细胞周期蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的表达实现的。本实验是在我们先前研究的基础上, 进一步探讨ERK 通路在丁酸钠诱导人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1分化中的作用, 阐明

特色服务
Serves

- 在线投稿
- 投稿指南
- 绿色通道
- 特色专区
- 服务流程
- 常见问题
- 编辑中心
- 期刊阅读

期刊约稿

- 中国社区医师
- 医学信息
- 吉林医学
- 按摩与康复医学
- 临床合理用药杂志

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

职称晋升政策汇总
让您的晋升不留下半点遗憾

丁酸钠诱导SKM-1细胞分化的分子机制。

材料和方法

细胞株及细胞培养

SKM-1细胞由日本Ryuji Kawaguchi教授惠赠, Ryuji Kawaguchi教授建株于患有MDS-转为RAEB-T后转为AML 70岁男性的外周血[3], 并在1993年交于日本JCRB细胞库保存。它是一个研究MDS发生、发展、DNA重排改变以及基因不稳定性的非常好的细胞株, 呈淋巴细胞形态, 强烈表达髓过氧化物酶。采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(含有100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素), 在37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养, 取对数生长期细胞进行实验。所有实验均重复3次。

主要试剂

ERK1/2 特异性抑制剂PD98059溶于DMSO中, 置于-80℃冰箱;丁酸钠(sodium butyrate, NaB)溶于PBS中, 置于-20℃冰箱, ERK抑制剂(PD98059)与NaB应用时均用RPMI 1640稀释到工作浓度。PD98059、NaB及DMSO均购自Sigma公司, RPMI 1640和胎牛血清购自Gibco公司。

药物对细胞生长影响的检测

将对数生长期SKM-1细胞以 2×10^5 /ml浓度接种于6孔培养板上, PD98059以5、10和15 μmol/L加入培养体系中, 分为3组, 然后每组再分为加和不加NaB(1 mmol/L)组, PD98059提前1小时加入培养基中。每种药物浓度设平行3孔, 培养4天后取样进行台盼蓝染色, 光镜下计数, 连续3次。

氮蓝四唑(NBT)还原试验

将对数生长期SKM-1细胞以 2×10^5 /ml浓度接种于6孔培养板上, 分为NaB组、PD98059组、NaB+PD98059组及对照组(未加任何药物处理)组。NaB的浓度为1 mmol/L, PD98059的浓度为5 μmol/L, PD98059提前1小时加入培养液中, 作用5天后, 收集细胞, 用RPMI 1640液洗涤2次, 再用2 ml RPMI 1640液重悬细胞, 内含0.1% NBT, 100 ng/ml PMA (Sigma公司), 37℃温育20分钟后, 离心弃上清, 加入100 μl DMSO溶解沉淀, 在光镜下观察胞浆含有灰蓝色颗粒的细胞(阳性细胞), 计数200个细胞, 计算阳性细胞百分率。

Western blot分析

丁酸钠对SKM-1细胞ERK蛋白表达的影响

收集1 mmol/L NaB作用不同时间后的各组SKM-1细胞, PBS洗2次, 用三去污试剂提取总蛋白质, Bradford方法测定蛋白质浓度, 取等量蛋白质采用12% SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离, 然后转至PVDF膜上;室温下摇动封闭(TBS-T+5%脱脂奶粉)2小时后, 加入鼠抗-ERK1/2磷酸化抗体(Calbiochem产品, 1 : 1 000稀释)和抗-ERK1/2 抗体(Sigma公司产品, 1 : 1 000稀释), 4℃过夜;室温下洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRP)偶联兔抗鼠IgG(1 : 8 000稀释), 最后用化学发光底物进行发光显迹。

丁酸钠和(或)PD98059P21对SKM-1细胞P21和HDAC的表达的影响

实验分为PD98059组、NaB+PD98059组及对照组(未加任何药物处理), NaB的浓度为1 mmol/L, PD98059的浓度为5 μmol/L。PD98059提前1小时加入培养基中, 作用36小时后, 收集细胞。用三去污试剂提取总蛋白质后测定浓度, 垂直电泳进行分离之后转至PVDF膜上, 封闭2小时之后, 加入鼠抗人P21单克隆抗体和兔抗人HDAC多克隆抗体(均购自为Santa Cruz公司, 1 : 1 000稀释), 4℃过夜, 室温下洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRP)偶联兔抗鼠IgG或辣根过氧化物酶(HRP)偶联羊抗兔IgG(1 : 8 000稀释), 显迹。

统计学处理

两组间连续变量比较用t检验, 多组间连续变量比较用方差分析, 协方差校正, 以均数±标准误($\bar{X} \pm SE$)表示。

结果

药物对SKM-1细胞生长的影响

PD98059可以抑制SKM-1细胞的生长。组2(5 μmol/L PD98059)、组3(10 μmol/L PD98059)及组4(15 μmol/L PD98059)与组1(未加任何药物处理)比较, SKM-1细胞的数目明显减少, 有显著差异性($P < 0.01$);而组2、组3及组4之间差异性不显著($P > 0.05$) (图1)。因此在下面的研究中我们选用5 μmol/L PD98059处理细胞。

PD98059与NaB有协同性, 同时应用对细胞生长的抑制明显增加。同一浓度梯度的PD98059, 加用丁酸钠对SKM-1细胞的抑制均明显增加($P < 0.01$)。

氮蓝四唑(NBT)还原试验

我要立即投稿
--最便捷的绿色通道

在线客服...

QQ交谈 1254635326
QQ交谈 4006089123
545493140(重要)
400-6089-123 68590972

SKM-1经NaB、PD98059及NaB+PD98059处理后, NBT还原试验发现阳性细胞百分率均较对照组明显增加($P<0.05$), 两药联用的阳性细胞百分率明显高于单用($P<0.05$)。

丁酸钠对SKM-1细胞ERK蛋白表达的影响

Western blot检测表明, SKM-1细胞经1 mmol/L的NaB作用后, 总ERK1/2的表达水平未发生变化, 而磷酸化ERK1/2的表达水平在6、12、36小时逐渐减少, 说明NaB在其促SKM-1分化的过程中存在着一个持续去磷酸化的过程, ERK的活性受到抑制。由此推测, NaB可能是通过抑制了ERK1/2信号传导诱导SKM-1细胞分化。

丁酸钠和PD98059对SKM-1细胞的P21和HDAC表达的影响

Western blot检测表明, SKM-1细胞经1 mmol/L NaB及1 mmol/L NaB+5 μ mol/L PD98059作用36小时后, P21和HDAC蛋白质的表达水平上升, 且NaB+PD98059的作用强于NaB单用。

讨论

ERK属于MAPK超家族的经典成员, 其在一系列反应如生长因子和有丝分裂等刺激中被激活, 同时其持续活化最终促进细胞增殖和恶性转化;相应地, ERK的下调则可促进细胞生长和生长刺激基因转录的抑制。因此, 丁酸钠抑制ERK传导通路可能是癌细胞在生物化学和形态方面逆转为良性表型的一个重要分子机制。

在本项研究中发现: SKM-1细胞经1 mmol/L的丁酸钠作用后, 总ERK蛋白的表达水平无明显变化, 而磷酸化ERK明显下降, 说明丁酸钠在其促SKM-1分化的过程中存在有一个持续去磷酸化的过程, 丁酸钠可能是通过抑制了ERK1/2信号传导诱导SKM-1细胞分化的。应用ERK的特异性抑制剂PD98059作用于SKM-1细胞, 与丁酸钠在抑制细胞生长和诱导细胞分化方面有协同作用, 且可上调HDAC和P21的表达水平, 也进一步说明了丁酸钠是通过抑制了ERK1/2诱导SKM-1细胞分化。而Witt等[4]在K562红白血病细胞株中的研究表明, 丁酸盐诱导K562向红系细胞分化时有ERK通路抑制和P38通路激活的参与。Yen等[5]的研究表明, 维甲酸在诱导白血病细胞向髓系细胞分化中选择性地激活了ERK2, 而不激活JNK/SAPK或P38。Nagata等[6]的研究结果则提示, P38和JNK的活化对于促红细胞生成素诱导白血病细胞向红细胞分化是必需的。这可能与ERK1和ERK2广泛存在, 在某种程度上它们被多种配体和细胞外界刺激所激活, 具有细胞种类特异性有关[7]。

本实验的研究结果表明, ERK通路抑制是丁酸钠诱导SKM-1细胞分化的重要分子机制, 然而细胞内存在着不同的信号通路, 一定数量的信号蛋白以联合的方式相互作用, 构成复杂的细胞内信号网络调控着不同的细胞生物学反应。是否还有其他的通路参与丁酸钠对SKM-1细胞的分化作用, 尚需进行更深入的研究。

【参考文献】

1Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, 2004; 18: 189-218

2Orchel A, Dzierzewicz Z, Parfiniewicz B, et al. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Dig Dis Sci*, 2005; 50: 490-498

3李春蕊, 刘文励, 黄梅等. 丁酸钠联合全反式维甲酸对MDS细胞株SKM-1的诱导分化作用及其机制初步探讨. *中国实验血液学杂志*, 2004; 12: 601-605

4Witt O, Sand K, Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood*, 2000; 95: 2391-2396

5Yen A, Cherington V, Schaffhausen B, et al. Transformation-defective polyoma middle T antigen mutants defective in PLCgamma, PI-3, or src kinase activation enhance ERK2 activation and promote retinoic acid-induced, cell differentiation like wild-type middle T. *Exp Cell Res*, 1999; 248: 538-551

6Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, et al. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*, 1998; 92: 1859-1869

7Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 1998; 74: 49-139

最热点





考试宝典-高分练兵场



揭秘论文“低价”根源






医学编辑中心



邮箱投稿视频教程

相关文章

- ▶ 丁酸钠诱导人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1分化作用中细胞外信号调节激酶通路的改变 2011-12-7
- ▶ 小儿气管异物手术麻醉探讨——七氟醚与γ-羟基丁酸钠比较 2010-9-21
- ▶ 苯丁酸钠联合奥沙利铂对结肠癌细胞HT29的凋亡作用 2010-9-15
- ▶ 5杂氮 2' 脱氧胞苷联合苯丁酸钠对人结肠癌细胞HT29的抑制作用 2010-9-14

 加入收藏夹
  复制给朋友
  分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论

重置

▲ 上一页

当前第1页，共1页

▼ 下一页