



投稿



查稿



网上商城



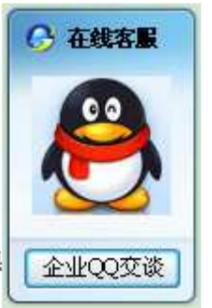
考试



期刊



视频

| 网站
| 我要
| 经验
[首页](#)
[职称晋升](#)
[医学期刊](#)
[专科文献](#)
[期刊阅读](#)
[特色服务](#)
[医学新知](#)
[医学教育](#)
[网上商城](#)
[医学考试](#)
[经典](#)


请输入您想要的信息

搜索

高级搜索



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

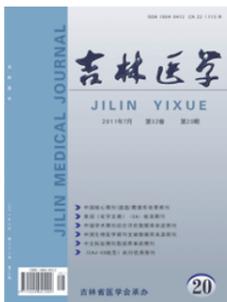


期刊阅读


[中国社区医师](#)
[吉林医学](#)
[中外医疗](#)
[中国医学工程](#)
[中国卫生产业](#)

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



在线客服...

1254635326

4006089123

545493140(重要)

400-6089-123 68590972

您当前位置: [首页](#) >> [专科文献](#)>> [血液内科](#)

血液内科

MAPK途径磷酸化在胰岛素样生长因子1促进人骨髓瘤细胞株KM3增殖中的作用

发表时间: 2011-12-14 9:30:36 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 王华芳,胡豫,孙春艳,王雅丹 作者单位: 华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 430022, 武汉

【摘要】本研究探讨胰岛素样生长因子1(IGF 1)对人骨髓瘤细胞株KM3增殖的影响以及MAPK途径磷酸化在该过程中的作用。采用流式细胞术检测不同浓度的重组人IGF 1处理后KM3细胞周期的变化, Western blot法检测细胞内MAPK信号转导途径主要分子Erk1/2磷酸化在IGF 1刺激及PD98059特异性抑制作用下的改变, TUNEL法检测特异性阻断Erk1/2磷酸化在抑制KM3细胞增殖和诱导凋亡中的作用。结果表明, IGF 1可以显著提高S期和G2/M期的KM3细胞比率和细胞内Erk1/2分子的磷酸化水平, 阻断IGF 1引起的Erk1/2磷酸化可以显著抑制KM3细胞的增殖并引起其凋亡。结论: IGF 1引起的Erk1/2分子磷酸化在KM3细胞增殖过程中起着十分重要的作用。

【关键词】 骨髓瘤

Abstract In order to study the effect of insulin like growth factor 1 (IGF 1) on proliferation of myeloma cell line KM3 and the role of MAPK pathway phosphorylation in this process, the cell cycle distribution shift of KM3 after incubation with series concentration of IGF 1 was detected by flow cytometry. Phosphorated Erk1/2, the key molecule of MAPK pathway, was examined by Western blot after KM3 cells being pretreated with or without PD98059, the special inhibitor of Erk1 and Erk2 phosphorylation. The effect of specifically blocking Erk1 and Erk2 phosphorylation on proliferation and apoptosis of KM3 cells were detected with TUNEL staining. The results showed that the KM3 cells at S and G2/M phase increased and the phosphorylation of Erk1 and Erk2 became intensive when incubated with different concentration of IGF 1. PD98059 could decrease the phosphorylation of Erk1/2 induced by IGF 1 and induce the apoptosis of KM3 cells. It is concluded The phosphorylation of MAPK signaling pathway triggered by IGF 1 plays an important role in the proliferation of myeloma cell line KM3.

Key words IGF 1;MAPK pathway;Erk 1/2 phosphorylation; multiple myeloma

J Exp Hematol 2007; 15(5):978-981

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)在恶性血液系统疾病中发病率居第二位, 其发病机制尚不清楚。胰岛素样生长因子1 (insulin like growth factor I, IGF 1)与多发性骨髓瘤细胞的增殖密切相关, 它不仅刺激多发性骨髓瘤细胞的分裂, 增殖和转移, 还具有抑制地塞米松诱导的细胞凋亡、刺激肿瘤自身分泌血管内皮生长因子等多种作用[1-5]。本研究探讨与多发性骨髓瘤细胞增殖关系密切的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号途径在IGF 1促进MM细胞增殖中的作用。

材料和方法

细胞培养

人多发性骨髓瘤细胞株KM3由上海第二军医大学侯健教授惠赠, 用含10%小牛血清、100 U/ml青霉素、100 g/L链霉素的DMEM, 在37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

试剂与实验分组

重组人IGF 1从Gibco公司购得, 分别用无血清细胞培养液稀释成不同浓度的母液保存;抗人Erk1/2磷酸化抗体购自Santa Cruz公司;酪氨酸蛋白磷酸化酶抑制剂PD98059购自Sigma公司。

细胞周期检测

2×10⁴/ml对数生长期细胞接种于6孔培养板中。37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养24小时后, 换用无血清培养液培养24小时, 再加入10、20、40和100 ng/ml 4个不同浓度的IGF 1, 每种浓度重复3孔, 并设阴性对照, 继续培养48小时后收获细胞,

用PBS洗涤2次,用75%冷乙醇重悬,4%保存固定过夜。用PBS再次洗涤2遍后,用2 ml PBS重悬,加10 mg/ml的RNA酶A 200 μ l后于37°C水浴30分钟,加100 μ g/ml的碘化丙啶400 μ l混匀,4°C避光反应2小时后进行流式细胞仪分析(FACS),检测波长488 nm。

Erk1/2磷酸化检测

对数生长期的KM3细胞约 5×10^6 /瓶,实验前1天换成无血清培养液培养,以减少血清中各种细胞因子对结果的影响。同细胞周期检测方法,刺激KM3细胞10分钟后收获细胞,未加IGF 1组作为空白对照,阴性对照组中分别加入Erk1/2磷酸化特异性阻断剂PD98059预处理细胞24小时,使其终浓度为50 μ mol/L。收获细胞在加入裂解缓冲液(RIPA buffer)后,置冰上裂解20分钟,4500 \times g离心10分钟,取上清,用Bradford法测定蛋白浓度。每组取40 μ g蛋白,与Laemmli样品缓冲液混合后,煮沸5分钟后上样,以12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白样品。将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭过夜,加入一抗,37°C孵育1小时,用含0.5% Tween 20的PBS(PBST)洗膜,加入二抗,室温孵育1小时,用PBST洗膜,DAB显色。

PD98059诱导KM3细胞凋亡的TUNEL法检测

以10、25、50和80 μ mol/L 4组浓度PD98059预处理KM3细胞24小时,再以40 ng/ml的IGF 1作用10分钟后收获并固定细胞。TUNEL细胞凋亡检测按照说明书进行。每个浓度组取3个独立的实验标本,每张切片随机计数100个细胞,根据TUNEL阳性细胞计算细胞凋亡率。

统计方法

检测数据以 \pm SD表示,应用SPSS 13.0软件对结果进行统计学分析。

结果

IGF 1对细胞周期的影响

KM3细胞经10、20、40和100 ng/ml IGF 1处理48小时后,对其细胞周期分析发现,随着IGF 1浓度的增加,G0/G1期细胞的百分比降低,而S期和G2/M期细胞百分比逐渐增加;10和20 ng/ml组与40 ng/ml和100 ng/ml组之间的差异具有显著性($p < 0.01$)(图1,附表),这提示经过IGF 1作用后KM3细胞大量进入S期和G2/M期,增殖活跃。

MAPK/Erk磷酸化在IGF 1处理后KM3细胞中的作用

利用特异性磷酸化抗体和Western blot技术检测经过IGF 1处理后的KM3细胞Erk1/2的磷酸化情况。结果表明,缺乏血清和IGF 1的培养液存在基础的Erk1/2的磷酸化,但是磷酸化强度较低,而经过不同浓度的IGF 1刺激后Erk1/2的磷酸化明显增强,并且与IGF 1的终浓度呈正相关关系(图2)。加入终浓度为50 μ mol/L时Erk1/2磷酸化特异性阻断剂PD98059组均只能检测到十分微弱的Erk1/2的磷酸化(图3)。

凋亡检测

TUNEL检测到的阳性细胞呈典型的凋亡表现,细胞体积变小,细胞核固缩并被染成深蓝色,少量细胞表现为细胞核内多量蓝色和蓝黑色的粗大颗粒,阴性对照组细胞则未着色(图4)。检测结果表明,经不同浓度(10、25、50、80 μ mol/L) PD98059处理24小时后的KM3细胞均出现凋亡,4组的平均凋亡率分别为13.8%、15.5%、37.5%和39.6%。

讨论

胰岛素样生长因子(IGF)是一类氨基酸序列和功能与胰岛素相似的促细胞生长多肽,其中游离IGF 1是主要的活性形式。IGF在IGF受体的介导和IGF结合蛋白的调节下,通过自分泌、旁分泌和内分泌的方式作用于靶器官,发挥较强的促细胞有丝分裂原作用,在胚胎发育、细胞正常生长发育、骨重建、神经生长以及在肿瘤细胞的增殖和分化,肿瘤免疫等方面起着重要作用。研究提示,IGF的刺激与肺癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤的发生发展、增殖、侵袭、转移和凋亡的关系密切[7-10]。近年来的临床研究表明,骨髓瘤患者血清中IGF 1浓度显著高于正常人,MM骨髓组织中IGF 1呈高表达,并且有研究表明,骨髓瘤患者预后与血清中的IGF 1浓度呈正相关关系[11]。同时发现在骨髓瘤细胞表面亦大量表达IGF 1受体[12],这些结果提示IGF 1可以直接作用于多发性骨髓瘤细胞。

本研究设计采用梯度浓度的IGF 1刺激培养的骨髓瘤细胞系KM3,细胞周期检测的结果显示,KM3细胞的S期和G2/M期细胞比例显著上升,而且该比例与培养液中IGF 1浓度成正相关。此结果说明IGF 1能够促进骨髓瘤KM3细胞增殖。

在对IGF 1促进骨髓瘤细胞增殖的机制研究中,与细胞增殖、分化、细胞周期调控和生存密切相关的MAPK信号通路引起研究者的关注[5, 13, 14]。MAPK信号通路由一组级联活化的丝/苏氨酸蛋白激酶组成,其作用底物主要是多种核蛋白和膜受体,包括转录因子、蛋白激酶、磷脂酶和细胞骨架蛋白,目前以Erk1和Erk2分子研究较为清楚,多种细胞因子,神经递质,膜去极化,钙内流等均通过Erk1/2信号转导途径传导。本研究通过检测IGF 1刺激后KM3细胞内Erk1/2分子的磷酸化状态改变情况,发现Erk1/2分子的磷酸化与IGF 1浓度成正比,表现为IGF 1浓度越高,Erk1/2分子的磷酸化程度越强,且基础条件下可以检测到KM3细胞存在Erk1/2的磷酸化,这提示Erk1/2磷酸化是维持KM3细胞增殖的重要因素;结合细胞周期的研究结果,同时给予IGF 1和Erk1/2磷酸化阻断剂时KM3的细胞周期变化不明显,单纯给予Erk1/2磷酸化阻断剂则可以显著诱导KM3细胞凋亡,提示Erk1/2分子磷酸化可能是KM3细胞增殖的重要细胞内分子机制之一。

多种细胞因子的促增殖作用是肿瘤发生发展的重要机制,其细胞内信号转导异常导致肿瘤细胞增殖与凋亡平衡改变,本研究揭示IGF 1与骨髓瘤细胞增殖的关系,为更为深入地理解骨髓瘤发生发展机制和产生可能的治疗方法在分子水平提供了实验依据。

【参考文献】

1 Freund GG, Kulas DT, Mooney RA. Insulin and IGF 1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPMI 8226. J Immunol, 1993;151:1811-1820

2 Frostad S, Bjerknes R, Hervig T, et al. Malignancy: insulin like growth factor 1 (IGF 1) is a costimulator of the expansion of lineage committed cells derived from peripheral blood mobilized CD34+ cells in multiple myeloma patients. Hematology, 1999; 4:217-229

3Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*, 2002;21:5673-5683

4Tucci A, Bonadonna S, Cattaneo C, et al. Transformation of a MGUS to overt multiple myeloma: the possible role of a pituitary macroadenoma secreting high levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *Leuk Lymphoma*, 2003; 44: 543-554

5Menu E, Kooijman R, Van Valckenborgh E, et al. Specific roles for the PI3K and the MEK-ERK pathway in IGF-1 stimulated chemotaxis, VEGF secretion and proliferation of multiple myeloma cells: study in the 5T33MM model. *Br J Cancer*, 2004;90:1076-1083

6郭益群,陈世伦.多发性骨髓瘤骨髓基质细胞分泌IGF-1、VEGF和IL-6的动态变化. *中华血液学杂志*,2006;27:231-234

7周莉.胰岛素样生长因子系统与卵巢癌. *国外医学·计划生育分册*, 2003; 23:112-115

8 邓建华.胰岛素样生长因子系统与前列腺癌的研究进展. *国外医学·泌尿系统分册*, 2003; 23:228-231

9宋东,刘国津等,孙淑宾.胰岛素样生长因子与乳腺癌. *中国老年学杂志*,2003;23:263-封3

10Slomiany MG, Black LA, Kibbey MM, et al. IGF-1 induced vascular endothelial growth factor secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006;342:851-858

11Standal T, Borset M, Lenhoff S, et al. Serum insulin like growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*, 2002;100:3925-3929

12Chng WJ, Gualberto A, Fonseca R. IGF-1R is overexpressed in poor prognostic subtypes of multiple myeloma. *Leukemia*, 2006;20:174-617

13Hodge DR, Xiao W, Wang LH, et al. Activating mutations in STAT3 and STAT5 differentially affect cellular proliferation and apoptotic resistance in multiple myeloma cells. *Cancer Biol Ther*, 2004;3:188-194

14Yasui H, Hideshima T, Richardson PG, et al. Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2006;132:385-397

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



▶MAPK途径磷酸化在胰岛素样生长因子1促进人骨髓瘤细胞株KM3增殖中的作用

2011-12-14

▶5负载U266细胞抗原的树突状细胞诱导T细胞的抗骨髓瘤活性

2011-12-13

▶多发性骨髓瘤病人sICAM-1检测及临床意义

2011-11-28

▶多发性骨髓瘤1557例误诊资料分析

2011-11-14

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



[关于我们](#) | [合作伙伴](#) | [特色服务](#) | [客户留言](#) | [免责声明](#) | [学术团队](#) | [学术动态](#) | [项目合作](#) | [招贤纳士](#) | [联系方式](#)

电 话: 400-6089-123 029-68590970 68590971 68590972 68590973 传 真: 029-68590977
服务邮箱: vip@yixue360.com QQ: 1254635326 (修稿) QQ: 545493140 (项目合作)
Copyright @ 2007 - 2012 www.yixue360.com , All Rights Reserved 陕ICP备:08003669号

