

## P44/42MAPK 在辐射诱发会厌癌中的表达

傅志超<sup>1</sup> 程惠华<sup>1</sup> 蔡建明<sup>2</sup> 王凤玫<sup>2</sup> 韩玲<sup>2</sup> 陈建英<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(南京军区福州总医院放疗科 福州 350025)

<sup>2</sup>(第二军医大学放射医学教研室 上海 200433)

**摘要** 探讨 P44/42 MAPK 在 X 射线诱发会厌癌的表达及其作用。从 X 射线诱发的会厌癌中得到肿瘤组织及相应的癌旁正常组织,分离总蛋白及 mRNA,应用蛋白印迹法分析两组 P44/42 MAPK 的表达及磷酸化水平,应用逆转录-聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)半定量方法得到两组 P42 MAPK 的 mRNA 变化。结果表明,会厌癌 P44/42 MAPK 的蛋白表达及磷酸化水平均显著高于癌旁正常组织,P42 MAPK 的 mRNA 在会厌癌中的表达也明显升高。结果显示,P44/42 MAPK 在 X 射线诱发会厌癌有异常表达且磷酸化水平显著增高,此信号转导途径可能在 X 射线诱发会厌癌发挥一定的作用。

**关键词** 辐射致癌,信号转导,丝裂活化蛋白激酶,会厌癌

**中图分类号** Q345, Q691, R731

丝裂活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPK)是 Ras/Raf/MAPK 信号途径中的重要组成成分。它的主要功能是促进细胞的增殖和抑制凋亡,在许多肿瘤中均有表达<sup>[1]</sup>,P44/42 MAPK 是其中的重要一员,其作用是磷酸化并激活多种下游底物,引发多种细胞反应。本工作的动物实验已证实,P44/42 MAPK 在  $\gamma$  射线诱发的小鼠白血病中异常过量表达及过度磷酸化,从而在  $\gamma$  射线诱发小鼠白血病中可能发挥重要作用<sup>[2-4]</sup>。那么,在临床放疗引起的恶性肿瘤中 P44/42 MAPK 的作用又是如何,目前未见报道。本实验对放疗诱发的会厌癌进行 P44/42 MAPK 的检测,进一步探讨 P44/42 MAPK 在辐射致癌中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 病例来源

男性患者,于 1977 年因“鼻咽低分化鳞癌”在我科行直线加速器,6 MV X 射线,鼻咽癌根治性放疗,放疗剂量为 2 Gy/次,共 35 次,总剂量为 70 Gy,放疗后痊愈,会厌均在鼻咽癌全程放射野内。患者于 2005 年 4 月出现“饮水呛咳”症状就诊,确诊为“会厌中分化鳞癌”临床上非辐射诱导发生的会厌癌发病率极低,此例患者放疗后发生会厌癌的潜伏期与文献报道基本一致,故可认为此例会厌癌为辐射所致。患者就诊时病期较早,且再次放疗副作用

大,行会厌癌切除根治术,取得手术标本,术后临床评价为痊愈。

#### 1.2 细胞总蛋白的获取

分别取会厌癌及癌旁正常组织进行机械研磨,200 目尼龙网过滤并制成单细胞悬液,冰浴磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)分别洗涤后,4℃,12000 r/min 离心收集细胞。在 4℃条件下,按  $5 \times 10^6$  个细胞加 100  $\mu$ L 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,蛋白酶抑制剂用前临时加入(详见文献 2)。在冰上反应 30 min 后,4℃,12000 r/min 离心 10 min 收集上清,-80℃保存备用。

#### 1.3 总 RNA 的制备

按照试剂盒操作说明进行。提取后的核糖核酸(Polymerase chain reaction, RNA)在核酸蛋白分析仪测其浓度, A260/A280 比值 2.0 的样品弃用,其余-80℃保存备用。

#### 1.4 免疫印迹分析 P44/42MAPK 的蛋白及磷酸化表达

蛋白定量后,分别取总蛋白 40  $\mu$ g 所需的细胞裂解液体积,加入同等体积的 2 $\times$ SDS 上样液并变性,走 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳,用槽式转膜仪将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene

第一作者:傅志超,男,1977年9月出生,2003年在第二军医大学获放射医学专业硕士学位,住院医师,主要从事肿瘤临床放射生物学研究

收稿日期:初稿 2005-07-05,修回 2005-09-13

difluoride, PVDF, Whatman 公司)。分别用兔抗鼠的 P44/42 MAPK IgG (Biolabs 公司)、Phospho-P44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204, Cell Signaling 公司) 与膜蛋白结合, 再与 anti-rabbit IgG-HRP (Biolabs 公司) 结合, 最后经增强化学发光 (Enhanced chemiluminescence, ECL) 发光试剂盒显影, X 光片记录结果。取记录完后结果的 PVDF 膜在三乙醇胺缓冲盐水溶液 (Triethanolamine-buffered saline solution, TBST) 中 4 放置过夜, 加入 anti- $\beta$ -actin 一抗 (Sigma 公司) 做内参照, 其余方法同上。

### 1.5 RT-PCR 测定 P42MAPK

mRNA 逆转录成互补脱氧核糖核酸 (Complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 及聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 方法详见文献 4。样品同时分为两份, 一份做目的基因 P42 MAPK 的检测, 一份做  $\beta$ -actin 内参照, P42MAPK 的引物序列是: 上游引物序列: 5'-TCT CCC GCA CAA AAA TAA G 3', 下游: 5'-GGA AGG GGA CAA ACT GAA T-3',  $\beta$ -actin 引物的序列是: 上游引物为 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3', 下游引物序列为 5'-ATGCCACAGGATTCCATACCC-3', 引物的设计、合成委托上海 Genecore 公司完成。反应结束后上胶电泳记录结果。

## 2 结果

### 2.1 P44/42MAPK 在辐射诱发会厌癌组织的表达

样品总蛋白定量上样, 常规 Western blotting 方法, 观察组 P44/42MAPK 蛋白的变化情况, 结果发现, 癌旁组织虽然有 P44/42MAPK 表达, 但明显弱于会厌癌组织, 具体见图 1。

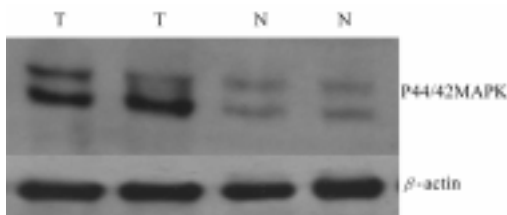


Fig.1 The expression of P44/42 MAPK in epiglottis tumor induced by X-ray irradiation. T: Epiglottis tumor; N: Normal tissue near to tumor;  $\beta$ -actin: Internal control

### 2.2 P44/42MAPK 在辐射诱发会厌癌组织的磷酸化

蛋白定量上样, 加入 P44/42 MAPK 磷酸化一抗, 其余条件同前, 观察各组 P44/42 MAPK 磷酸化水平。会厌癌 P44/42 MAPK 蛋白明显被磷酸化, 而癌旁组织的 P44/42 MAPK 蛋白基本未见到被磷

酸化, 具体见图 2。

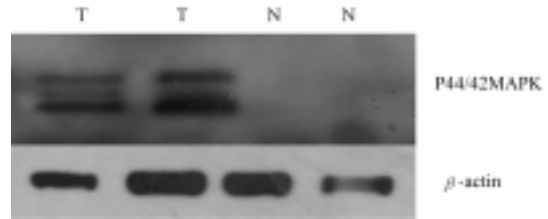


Fig.2 Various levels of Phospho-P44/42 MAPK in epiglottis tumor induced by X-ray irradiation. T: Epiglottis tumor; N: Normal tissue near to tumor;  $\beta$ -actin: Internal control

### 2.3 P42MAPK 在辐射诱发会厌癌组织的 mRNA 表达

在 PCR 反应 30 个循环后, 常规琼脂糖凝胶电泳, Marker 为 100 bp 小分子量标记物, 分别进行 P42 MAPK 和  $\beta$ -actin 的电泳。结果如图 3 所示, 其中 P42 MAPK 的大小为 399 bp。

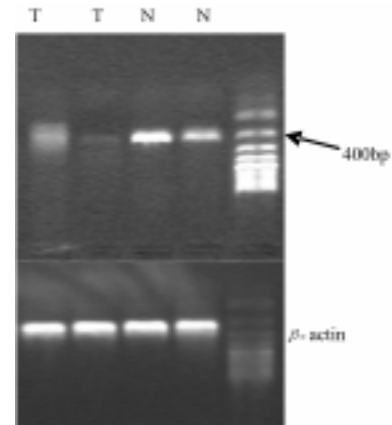


Fig.3 The mRNA of P44/42 MAPK in epiglottis tumor induced by X-ray irradiation. T: Epiglottis tumor; N: Normal tissue near to tumor;  $\beta$ -actin: Internal control

## 3 讨论

电离辐射是环境致癌的主要因素之一<sup>[5]</sup>。此外, 随着放疗设备技术的不断进步, 患者的生存率明显得到延长, 由放疗诱发恶性肿瘤的毒副作用也越来越值得关注<sup>[6]</sup>。通常认为, 原发头颈部的恶性肿瘤照射后, 辐射致癌的潜伏期为 10—25 年, Seydel<sup>[7]</sup>报告 1464 例原发头颈部癌, 放射治疗后 23 例发生野内/外的继发性肿瘤, 几率 1.6%。其中放疗后生存超过 5 年的 611 例患者 辐射致癌的几率为 1.5%。而且似乎辐射导致的继发恶性肿瘤的侵袭性和恶性程度高于同型自然发生性病变。辐射诱发会厌癌目前仍未见文献报道。

辐射致癌机制极为复杂, 可能包括癌基因激活、抑癌基因的失活、细胞周期调控异常及信号转导失控<sup>[8]</sup>。其中, 辐射作用于细胞能激活多条信号转导通路, 从而决定了细胞的不同命运 (包括细胞癌变),

因此信号转导通路成为近年来辐射致癌机制方面最活跃的研究领域之一<sup>[9]</sup>。Ras/Raf/MAPK 信号途径是小 G 蛋白介导的信号转导通路之一，Ras 和 Raf 的级联反应激活 MAPK 而广泛参与细胞增殖、分化等生理过程，MAPK 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶。其中，P44/42 MAPK 是其中的重要一员，其参与的信号途径在辐射引发细胞应激级联反应中起关键的作用。我们在前期实验中发现，P44/42 MAPK 在  $\gamma$  射线诱发小鼠白血病中可能发挥重要作用，具体参考文献<sup>[2-4]</sup>，但所用的是动物模型为易发生肿瘤的 BALB/c 小鼠，用较高剂量进行全身照射，与临床差异较大。临床肿瘤正常范围剂量放射治疗后诱发的癌变更具有代表性，更贴近临床实际，P44/42 MAPK 是否参与这一进程仍需实验的验证。

P44/42 MAPK 蛋白的磷酸化水平升高是这条信号转导通路激活的主要表现形式，它们的过度表达及磷酸化水平的提高可能是细胞的恶性转化的原因之一<sup>[10]</sup>。本实验的结果表明，虽然辐射诱发的会厌癌癌旁正常组织 P44/42 MAPK 蛋白和 mRNA 仍有表达，但明显低于会厌癌，且癌旁正常组织的 P44/42 MAPK 基本没有磷酸化，而会厌癌 P44/42 MAPK 明显被磷酸化了，提示 P44/42 MAPK 在癌变细胞中起着异常活跃的作用。由此我们可以推测，P44/42 MAPK 可能激活了一系列的下游信号分子（如 P21，AKTC-*fos* 等），启动胞核内的转录，促使细胞过度增殖、抑制凋亡，最终导致肿瘤的形成。因此，P44/42 MAPK 可能是参与辐射诱导会厌细胞恶变过程的信号转导途径之一。从由此设想可能通过抑制 P44/42 MAPK 信号转导通路来阻止

肿瘤的发生发展。这一结论为辐射防护和肿瘤的防治奠定了一定的实验基础，由此设想有可能通过抑制 P44/42 MAPK 信号转导通路来阻止辐射诱发肿瘤的发生发展，但仍需通过进一步的实验研究。

### 参考文献

- 1 Peyssonnaud C, Eychene A. *Biol Cell*, 2001, **93**(1): 53-62
- 2 傅志超, 蔡建明, 韩玲, 等. 生物化学与生物物理进展. 2003, **30**(2): 199-203  
FU Zhichao, CAI Jianming, HAN Ling, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(2): 199-203
- 3 傅志超, 蔡建明, 韩玲, 等. 第二军医大学学报, 2003, **24**(7): 735-737  
FU Zhichao, CAI Jianming, HAN Ling, *et al.* *Acad J Second Mil Med Univ*, 2003, **24**(7): 735-737
- 4 傅志超, 蔡建明, 韩玲, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2004, **24**(6): 550-552  
FU Zhichao, CAI Jianming, HAN Ling, *et al.* *Chin J Radiol Med Prot*, 2004, **24**(6): 550-552
- 5 Trosko J E, Chang C C, Upham BL, *et al.* *Radiat Env Biophys*, 2005, **44**(1): 3-9
- 6 Schneider U, Kaser-Hotz B Z. *Med Phys*, 2005, **15**(1): 31-7
- 7 Seydel H G. *Cancer*, 1975, **35**(6): 1641-5
- 8 Lee Y S, Kim I G. *J Biochem Mol Biol*, 2003, **36**(1): 144-8
- 9 Schmidt-Ullrich R K, Dent P, Grant S, *et al.* *Radiat Res*, 2000, **153**(3): 245-257
- 10 Peyssonnaud C, Eychene A. *Biol Cell*, 2001, **93**(1-2): 53-62

## Function of P44/42 mitogen-activated protein kinases in epiglottis carcinoma induced by radiation

FU Zhichao<sup>1</sup> CHEN Huihua<sup>1</sup> CAI Jianming<sup>2</sup> WANG Fengmei<sup>2</sup> HAN Ling<sup>2</sup> CHEN Jianying<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Department of Radiotherapy, Fuzhou general Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025)

<sup>2</sup>(Department of Radiation Medicine, the Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**ABSTRACT** The work is to investigate the role of the P44/42 mitogen-activated protein kinases in proliferation disorder of epiglottis carcinoma induced by X-ray irradiation. After obtaining the tissues from the radiation-induced epiglottis carcinoma, we observed the P44/42 MAPK protein expression level and the phosphorylation level in epiglottis carcinoma by western blotting, and the mRNA level by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that The P44/42 MAPK expression of protein and mRNA was significantly higher in epiglottis carcinoma than in normal tissue nearby the tumor. And the level of P44/42 MAPK phosphorylation in epiglottis carcinoma was higher than in that of the normal tissue. The results suggest that P44/42 MAPK may play a role in proliferation disorder of epiglottis carcinoma induced by the radiation.

**KEYWORDS** Signal transduction, Mitogenactivated Protein Kinases, Epiglottis carcinoma, Radiation carcinogenesis

**CLC** Q345, Q691, R731