



p38 MAPK通路在佛波酯诱导人绒癌JAR细胞体外侵袭中的作用

细胞内丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是非常重要的细胞内信号传导酶超家族,包括细胞外信号调节蛋白激酶(ERK), p38 MAPK激酶和大丝裂原活化蛋白激酶(BMK)等成员,介导机体细胞的生长、分化、分裂、死亡等多种过程[3]。近年来发现MAPK家族中p38 MAPK通路在多种细胞外刺激诱导的MMP和PA表达中发挥着重要的调控作用,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)是多种癌细胞的侵袭过程所必需的[1][2]。本实验探讨p38 MAPK特异性抑制剂SB203580在人绒癌JAR细胞侵袭行为中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 RPMI 1640培养基、小牛血清(Hyclone公司); 过氧化物酶标记phospho-P38抗体(SANTA CRUZ公司); 胰蛋白酶、二甲基亚砷(DMSO)、Triton X-100、PMA、SB203580(Sigma公司); 3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-乙苯基-四唑溴盐(MTT), 购自华美公司; Transwell细胞侵入系统(美国Costor公司); 其它试剂均为国产分析纯。实验时,用DMSO将PMA和SB203580分别配成原浓度为0.1 mmol/L和10 mmol/L,使它们处理细胞时培养液中含有0.1%(v/v)DMSO。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人绒癌JAR细胞株由中科院上海细胞所细胞库提供。JAR细胞生长在含10%小牛血清、100 U/ml青霉素、125 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养基中,每周换液2次,细胞长满瓶时,用含0.02% Na2EDTA和0.25%胰酶消化液按1:3比例传代。

1.2.2 激酶活性测定 本实验参照Wit等[4]方法,建立了细胞ELISA法检测激酶活性。具体方法如下:以每孔 2.5×10^4 个JAR细胞接种在96孔培养板中培养24 h,然后换上新鲜无血清培养液,同时分别加入不同终浓度(1、10、100 mmol/L) PMA或(1、5、10 mmol/L) SB203580处理细胞20 min,然后去除培养液,用PBS洗2次,每孔加150 μ l 4%多聚甲醛室温固定细胞30 min;洗3次,加0.1%Triton X-100室温处理细胞10 min;用含10%山羊血清的封闭液室温30 min;洗2次,分别加入一抗phospho-P38抗体37 $^{\circ}$ C孵育2 h;洗5次,然后加二抗酶标抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1 h;洗5次,加底物液(含OPD)终止反应后,迅速用酶标仪490 nm波长测定。实验设2个复孔,重复4次。相对激酶活性比值=处理组 D_{490} /对照组 D_{490} ,对照组激酶活性值设为1。

1.2.3 细胞侵袭实验 用MTT法评定细胞体外侵袭作用。参照Balch等[5]法,取指数生长期的JAR细胞,用消化法收获细胞用于实验。共设四组分别为0.1%DMSO对照组,10 mmol/L SB203580组,100 mmol/L PMA组,100 mmol/L PMA+10 mmol/L SB203580组。每组将 1×10^5 个细胞悬浮于200 μ l无血清培养基加入Transwell侵袭系统的上室内,下室内加500 μ l无血清培养基。在上室内同时分别加入0.1% DMSO(对照),100 mmol/L PMA,10 mmol/L SB203580,100 mmol/L PMA+10 mmol/L SB203580与细胞共同孵育24 h。然后将加入终浓度为0.5 mg/ml MTT(用D-Hanks液溶解过滤膜除菌)于Transwell的下室继续培养细胞2 h。取

出上室，用棉签擦去未侵袭滤膜表面的细胞，取出滤膜，放入150 μ l DMSO中置4 $^{\circ}$ C过夜以抽提侵袭滤膜的细胞中紫色结晶体，然后再加100 μ l DMSO，放入摇床中震荡至完全溶解，取150 μ l抽提液加入酶标板中，用酶联检测仪测 D_{540} 值。细胞侵袭指数=100 \times 处理组 D_{540} /对照组 D_{540} ，对照组细胞侵袭指数设为100。

1.2.4 绘制细胞生长曲线 用24孔培养板，每孔加 1×10^4 个JAR细胞，37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 细胞培养箱中培养，分别加入上述处理因素，每天每组取3个孔用消化法收获细胞，进行细胞计数，绘制生长曲线。

1.2.5 统计学分析 用Instat软件处理数据，用完全随机设计的方差分析、两两比较用Hames-Howell进行显著性分析。

2 结果

2.1 PMA对JAR细胞MAPK活性以及SB203580其的影响

我们用细胞ELSIA法检测了PMA对JAR细胞p38 MAPK激酶活性的影响，结果显示，PMA处理JAR细胞20 min呈浓度依赖性趋势激活 p38 MAPK，而p38 MAPK 的选择性抑制剂SB203580可呈浓度依赖性趋势抑制PMA对p38 MAPK的激活(图1、2)。

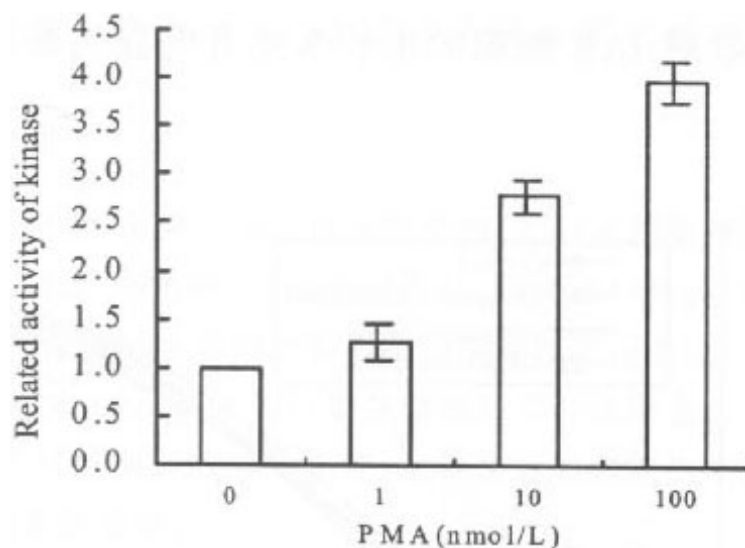


图1 PMA对p38 MAPK蛋白激酶活性的影响(n=4, $\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Effect of PMA on the activity of p38 MAPK (n=4, Mean \pm SD)
PMA: phorbol 12-myri4state 13-acetate

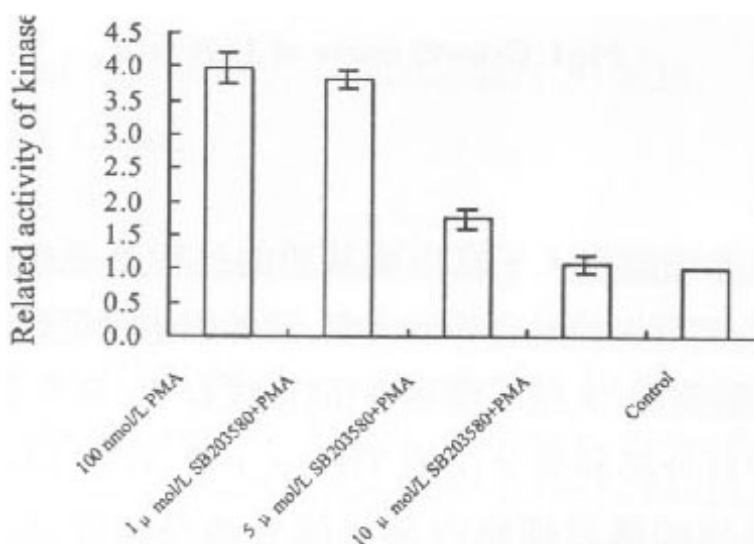


图2 SB203580对p38 MAPK蛋白激酶活性的影响(n=4, $\bar{x} \pm s$)

Fig.2 Effect of SB203580 on the activity of p38 MAPK induced by PMA (n=4, Mean±SD)
MAPK: mitogen-activated protein kinase

2.2 SB203580抑制JAR细胞的体外侵袭作用

细胞体外侵袭实验结果表明，PMA可促进人绒毛癌JAR细胞的体外侵袭作用($P<0.001$)；单独给予 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ SB203580能明显抑制JAR细胞的体外侵入能力($P<0.05$)，也能显著抑制PMA对JAR细胞侵入的作用($P<0.001$) (图3)。

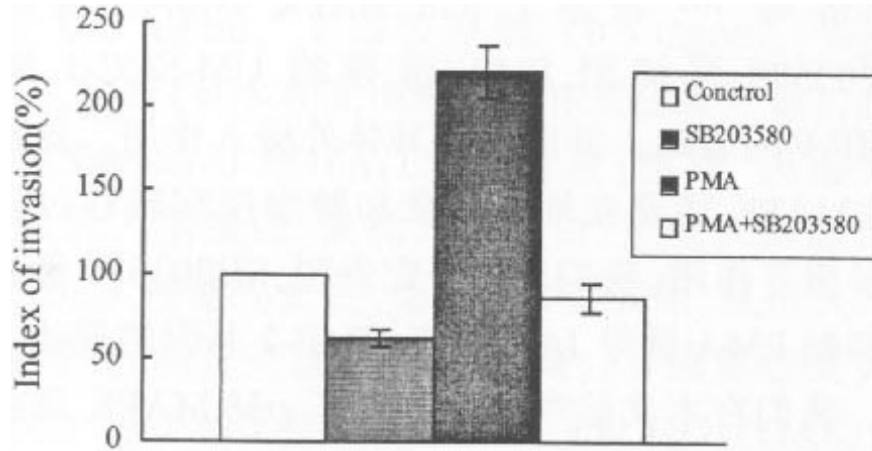


图3 SB203580对JAR细胞的体外侵袭作用的影响(n=4, $\bar{x}\pm s$)

Fig.3 Effect of SB203580 on PMA-induced in vitro invasion of JAR cells (n=4, Mean±SD)

2.3 对JAR细胞生长的影响

我们将上述不同因素加入培养液中培养JAR细胞4 d以观察它们对其生长的影响。结果显示，PMA和SB203580对JAR细胞的生长未见有明显的影响(图4)。

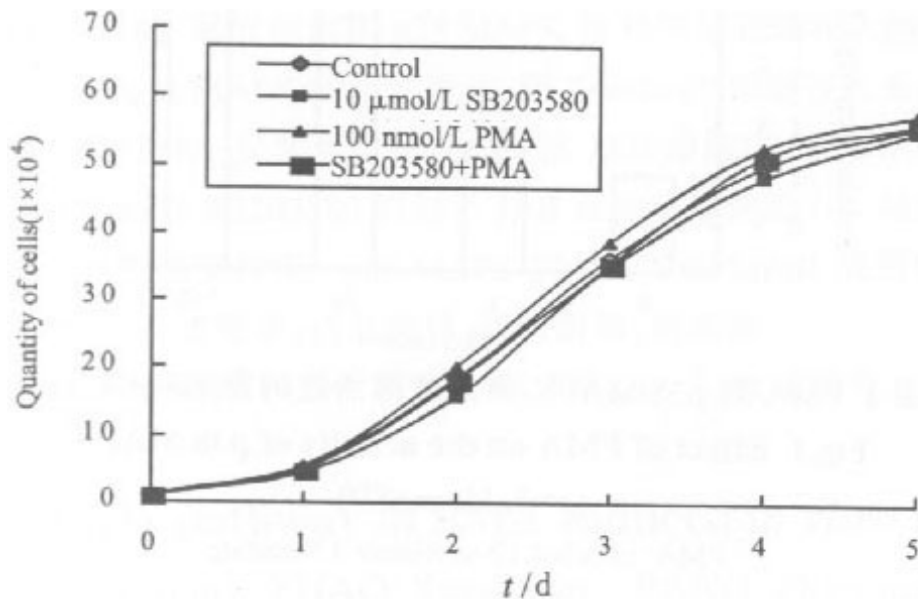


图4 JAR细胞的生长曲线

Fig4 Growth curve of JAR cells

滋养细胞侵入子宫内膜基质的过程是受机体精密调控的, 调节失控就会导致病变, 滋养细胞过度的侵入与滋养细胞疾病(人绒毛膜癌等)的形成有关。研究表明, 体内多种自分泌和旁分泌的TNF- α 、IGF、TGF、EGF以及丝裂原均能通过细胞内某些信号通路调控滋养细胞MMP、uPA等侵袭相关的蛋白酶的表达, 从而调节滋养细胞的侵袭作用[6][7]。然而, 目前对于滋养细胞侵入过程中信息传递机制尚未阐明。

p38 MAPK属于MAPK家族中一员, 是真核细胞介导细胞外信号到细胞内反应的重要蛋白激酶, 其通路的激活可导致基因转录、蛋白合成、细胞表面受体表达和细胞骨架结构改变, 最终影响细胞存活或导致程序性细胞死亡, 已证实在全身性炎症反应、休克等方面具有重要作用[8]。然而, Huang等[9]研究发现内源性p38 MAPK的活性与乳癌细胞的侵袭能力相关, 用p38 MAPK特异性抑制剂可明显减少uPA/uPAR基因和蛋白的表达, 抑制BT549细胞对matrigel的侵袭能力。Simon等[10]报道了p38 MAPK特异性抑制剂SB203580可抑制PMA诱导的UM-SCC-1细胞MMP-9的表达, 并能阻止其体外侵入作用。这提示p38 MAPK通路在细胞恶变和肿瘤浸润转移过程中起着重要作用。我们以往研究表明, SB203580能显著地抑制PMA诱导JAR细胞MMP-2基因的表达。因此, 我们在本实验中着重探讨了p38 MAPK通路对绒毛膜癌JAR细胞体外侵袭能力的影响。

本实验结果表明, PMA呈浓度依赖性地激活JAR细胞中p38 MAPK, 而p38 MAPK特异性抑制剂SB203580呈浓度依赖的方式抑制PMA对p38 MAPK的激活。PMA能促进人绒癌JAR细胞的体外侵袭作用, SB203580抑制了JAR细胞的体外侵袭能力。这提示PMA能通过细胞内p38 MAPK信号通路促进JAR细胞的体外侵袭作用。本实验还发现PMA和SB203580对JAR细胞的生长未见有明显影响, 提示SB203580抑制JAR细胞的侵袭能力不是通过抑制细胞生长而起作用的。现已证实, 体内多种因子如TGF、IGF、EGF、KGF、IL-1等均能启动细胞内p38 MAPK信号通路而调控MMP的表达[3]。这些研究揭示了p38 MAPK通路在人滋养细胞的侵袭行为以及人绒膜癌的形成中具有重要作用。p38 MAPK抑制剂可能会为人绒癌的防治提供新的途径。

参考文献:

- [1] Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79: 143-80.
- [2] Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2001, 10(2): 393-415.
- [3] John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis[J]. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7(1): 14-23.
- [4] Wit RD, Boonstra J, Verkleij AJ, et al. Large scale screening for the phosphorylation of MAPKinase in cells[J]. *J Biomolecular Screening*, 1998, 3(4): 277-84.
- [5] Balch C, Dedman JR. Annexins II and V inhibit cell migration[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 237:259-63.
- [6] Bischof P, Meisser A, Campana A. Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion[J]. *Ann N Y Aca Sci*, 2001, 157-62.
- [7] 张曦倩, 庞战军, 陈士岭, 等. 蜕膜条件培养液对滋养细胞侵袭相关基因表达的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(7): 588-591.
- [8] Zhang XQ, Pang ZJ, Chen SL, et al. Effect of conditioned media from decidual cell culture on the expression of genes regulating the invasion of trophoblastic cells[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(7): 588-591.
- [9] Kyriakis JM, Acrcuch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 807-69.
- [10] Huang S, New L, Pan Z, et al. Urokinase plasminogen activator/ urokinase-specific surface receptor expression and matrix invasion by breast cancer cells requires

constitutive p38 alpha mitogen- activated protein kinase activity[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 12266-72.

[10] Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion[J]. Cancer Res, 1998, 58(6): 1135-39.

参考文献:

[1] Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human[J]. Physiol Rev, 1999, 79: 143-80.

[2] Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2001, 10(2): 393-415.

[3] John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis[J]. Pathol Oncol Res, 2001, 7(1): 14-23.

[4] Wit RD, Boonstra J, Verkleij AJ. et al. Large scale screening for the phosphorylation of MAPKinase in cells[J]. J Biomolecular Screening, 1998, 3(4): 277-84.

[5] Balch C, Dedman JR. Annexins II and V inhibit cell migration[J]. Exp Cell Res, 1997, 237:259-63.

[6] Bischof P, Meisser A, Campana A. Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion[J]. Ann N Y Aca Sci, 2001, 157-62.

[7] 张曦倩, 庞战军, 陈士岭, 等. 蜕膜条件培养液对滋养细胞侵袭相关基因表达的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(7): 588-591.

Zhang XQ, Pang ZJ, Chen SL, et al. Effect of conditioned media from decidual cell culture on the expression of genes regulating the invasion of trophoblastic cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(7): 588-591.

[8] Kyriakis JM, Acruich J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 807-69.

[9] Huang S, New L, Pan Z, et al. Urokinase plasminogen activator/ urokinase-specific surface receptor expression and matrix invasion by breast cancer cells requires constitutive p38 alpha mitogen- activated protein kinase activity[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 12266-72.

[10] Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion[J]. Cancer Res, 1998, 58(6): 1135-39.