

p38 MAPK 通路在佛波酯诱导人绒毛 JAR 细胞体外侵袭中的作用

张曦倩¹ 袁晓山² 彭战军¹ 李红¹ 袁思梅¹ 罗仁² 陈士岭¹ 郭福祺¹ 第一军医大学南方医院¹ 妇产科袁中
医科袁东 广州 510515 袁

摘要 目的 研究细胞内 p38MAPK 信号传导通路在人绒毛 JAR 细胞体外侵袭中的作用。方法 用 ELISA 法测定 JAR 细胞中 p38MAPK 的活性变化。用 Transwell 细胞侵入系统检测细胞的侵袭作用。用 MTT 法评价细胞生长状况。结果 佛波酯 PMA 浓度依赖性激活 JAR 细胞中 p38MAPK。PMA 能促进人绒毛 JAR 细胞的体外侵袭作用。而 p38 特异性抑制剂 SB203580 抑制了 JAR 细胞的侵袭能力。结论 p38MAPK 通路在人滋养细胞的侵袭行为以及人绒毛的形成中具有重要作用。p38MAPK 抑制剂可能会为人绒毛的防治提供新的途径。

关键词 肿瘤侵袭 信号传导 蛋白激酶 佛波酯

中图分类号 R714.56 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2003)08-0792-03

Role of p38 pathway in PMA-induced in vitro invasion of JAR human choriocarcinoma cell line
ZHANG Xi-qian¹, ZHAO Xiao-shan², PANG Zhan-jun¹, LI Hong¹, CHEN Si-mei¹, LUO Ren², CHEN Shi-ling¹,
XINGFu-qi¹

Department of Obstetrics Gynecology¹, Department of Traditional Chinese Medicine², Nanfang Hospital, First
Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathways in regulating the in vitro invasion of JAR human choriocarcinoma cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Methods ELISA was used to detect the kinase activity of the JAR cells in response to PMA stimulation, and the in vitro invasion capabilities of the stimulated cells were observed using transwell assay. Changes in the proliferation and activity of the JAR cells cultured in vitro following PMA treatment were also observed by MTT assay. Results p38MAPK was activated dose-dependently in JAR cells upon the stimulation by PMA, which significantly enhanced the in vitro invasion of the JAR cells, while treatment of the cells with SB203580, a specific inhibitor of p38MAPK, inhibited the invasion of the cells. The growth of the cells, as observed from the growth curves, was not affected by the treatment of PMA and/or SB203580. Conclusion Activation of p38MAPK signal transduction pathway may enhance the invasion capability of JAR cells, and p38MAPK inhibition may therefore yield new possibility to control the invasion of choriocarcinoma.

Key words: tumor invasion; signal transduction; protein kinases; phorbol 12-myristate 13-acetate

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 (JNK) 等成员。诱导机体细胞的生长、分化、分裂、死亡等多种过程。近年来发现 MAPK 家族中 p38MAPK 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。本实验探讨 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 在人绒毛 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 RPMI1640 培养基、小牛血清、yclone 公司、过氧化物酶标记 phospho-P38 抗体、ANTA CRUZ 公司、胰蛋白酶、二甲基亚砷 (DMSO)、riton X-100、PMA、SB203580、Sigma 公司、³H-胸腺嘧啶、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。将它们处理细胞时培养液中含有 0.1% DMSO。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人绒毛 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 100U/ml 青霉素、25 链霉素的 RPMI1640 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 1:1 比例传代。

收稿日期 002-10-18

基金项目 73 国家重点基础研究发展规划 1999055903

Supported by National Key Project in Basic Science Research

作者简介 张曦倩 1975- 女 袁晓山 1998 年毕业于第三军医大学 袁中 袁士岭 主要从事生殖医学方面研究 电话 20-61641908

E-mail 张曦倩 xq@fimmu.com

1.2.2 激酶活性测定 本实验参照 Wit 等^[10]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 0.000 、 0.001 、 0.01 、 0.1 、 1 、 10 、 100 mmol/L 兔 PMA 或 0.000 、 0.001 、 0.01 、 0.1 、 1 、 10 、 100 mmol/L 兔 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 μ l 益,孵育 2 h,洗 5 次,然后加二抗酶标抗体 7 μ l 益,孵育 1 h,洗 5 次,加底物液 100 μ l,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,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^[11]方法,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、 0 mmol/L SB203580 组、 0 mmol/L PMA 组、 0 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,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、 100 mmol/L PMA、 0 mmol/L SB203580、 0 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 的 D-Hanks 液溶解,过滤膜除菌,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,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,7 μ l 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 ELISA 法检测了 PMA 对 JAR 细胞 p38MAPK 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 p38MAPK 的激活。

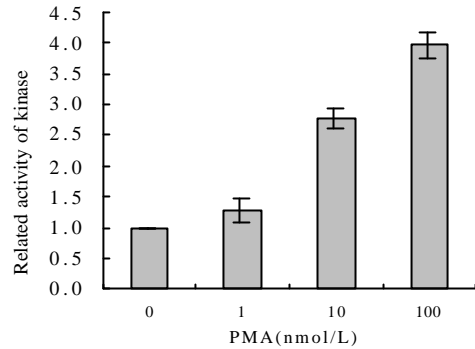


图 1 PMA 对 p38MAPK 蛋白激酶活性的影响 $n=4$, \bar{x} 依 \bar{S}
Fig.1 Effect of PMA on the activity of p38 MAPK (n=4, Mean \pm SD)
PMA:phorbol12-myristate13-acetate

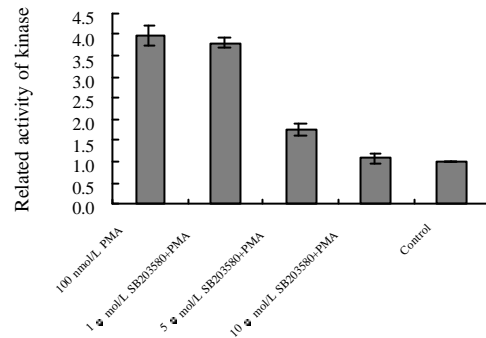


图 2 SB203580 对 p38MAPK 蛋白激酶活性的影响 $n=4$, \bar{x} 依 \bar{S}
Fig.2 Effect of SB203580 on the activity of p38 MAPK induced by PMA (n=4, Mean \pm SD)
MAPK: mitogen-activated protein kinase

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 JAR 细胞的体外侵袭作用, $P < 0.001$, 单独给予 10 mmol/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, $P < 0.001$ 。

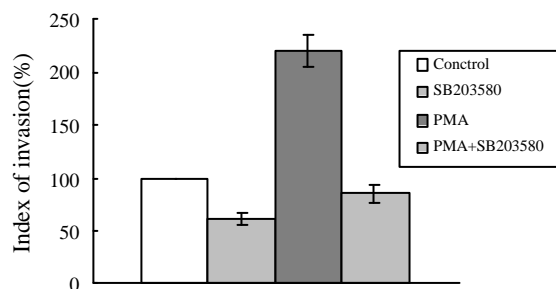


图 3 SB203580 对 JAR 细胞的体外侵袭作用的影响 $n=4$, \bar{x} 依 \bar{S}
Fig.3 Effect of SB203580 on PMA-induced in vitro invasion of JAR cells (n=4, Mean \pm SD)

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。

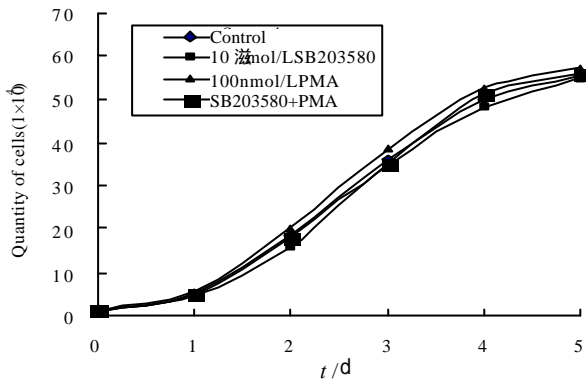


图 4 JAR 细胞的生长曲线
Fig4 Growth curve of JAR cells

3 讨论

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、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 、GF- α 、GF- β 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-9、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。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。

p38MAPK 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。然而 Wang 等研究发现内源性 p38MAPK 的活性与乳癌细胞的侵袭能力相关。应用 p38MAPK 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 p38MAPK 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 p38MAPK 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 p38MAPK。而 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 呈浓度依赖的方式抑制 PMA 对 p38MAPK 的激活。PMA 能促进人绒毛膜 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 p38MAPK 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- α 、GF- α 、GF- β 、IL-1 等均能启动细胞内 p38MAPK 信号通路而调控 MMP 的表达。这些研究揭示了 p38MAPK 通路在人滋养细胞的侵袭行为以及人绒毛膜癌的形成中具有重要作用。p38MAPK 抑制剂可能会为绒毛膜的防治提供新的途径。

参考文献

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

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

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

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

Balch C, Dedman JR. Annexin V and V inhibit cell migration. *Exp Cell Res*, 1997, 237: 259-63.

Bischof P, Meisser A, Campana A. Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 157-62.

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. *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 First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(7): 588-591.

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

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. *Biol Chem*, 2000, 275: 12266-72.

Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB203580 blocks PMA-induced Mr92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res*, 1998, 58(6): 1135-39.