中图分类号：R730.231编号：20110204

**承德医学院**

硕士研究生毕业论文

**TGF-β1与P38MAPK在绒毛膜癌JEG-3细胞发生发展中的相互关系的研究**

**The relationship between TGF-β1 and P38MAPK in the occurrence and development of Choriocarcinoma JEG-3 cell**

研究生：张孔雁

导师：李玉红教授

学科专业：病理学与病理生理学所在系部：基础医学部

**承德医学 院**

**学位论文使用授权及知识产权归属承诺**

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获的研究成果，其知识产权归承德医学院所有。承德医学院有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名单位为承德医学院，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归承德医学院所有。否则，承担相应的法律责任。

研究生签名：导师签章：

年月日

**承德医学院**

**研究生学位论文独创性声明**

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，指导教师对此进行了审定。本论文由本人独立撰写，文责自负。

研究生签名：导师签章：

年月日

**TGF-β1与P38MAPK在绒毛膜癌JEG-3细胞发生发展中的相互关系的研究**

**The relationship between TGF-β1 and P38MAPK in the occurrence and development of Choriocarcinoma JEG-3 cell**

研究生：张孔雁学号：20110204

年级：2011级

导师：李玉红教授

学科专业：病理学与病理生理学所在系部：基础医学部

研究方向：滋养细胞肿瘤的恶性侵袭机制

目 录

[摘要](#_Toc686799884) 3

[1. 免疫荧光染色结果](#_Toc686799885) 3

[2. Western blotting检测结果](#_Toc686799886) 3

[结论：](#_Toc686799887) 3

**[Abstract](#_Toc686799888)** 4

[前言](#_Toc686799889) 8

**[1](#_Toc686799890)** [材料](#_Toc686799890) 8

**[2](#_Toc686799891)** [方法](#_Toc686799891) 11

[1. 免疫荧光染色结果](#_Toc686799892) 12

[2. Western blotting检测结果(Fig.7-Fig.8, Table 1-Table 2)](#_Toc686799893) 13

[结论](#_Toc686799894) 16

[3. P38抑制因子（SB203580）可减弱绒癌JEG-3细胞中P38活化后的核转位，并且降低绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38的蛋白水平的表达，且表现出良好的浓度依赖效应。](#_Toc686799895) 16

[4. TGF-β1信号转导通路与P38MAPK信号转导通路在绒癌JEG-3细胞的恶性侵袭机制中存在着相互作用。](#_Toc686799896) 16

[参考文献](#_Toc686799897) 16

[参考文献](#_Toc686799898) 18

**TGF-β1与P38MAPK在绒毛膜癌JEG-3细胞发Th发展中的相互关系的研究**

摘**要**

绒毛膜癌简称绒癌，是一种高度恶性的滋养细胞肿瘤。它由滋养细胞干细胞（细胞滋养层细胞）发生恶性转化而形成，可继发于流产、异位妊娠、葡萄胎、侵蚀性葡萄胎、甚至是正常妊娠。绒癌的发生发展与滋养细胞的过度侵蚀作用密切相关，早期即可发生血道转移而危及患者生命。绒癌的发生是多种因素协同作用的结果，其中细胞信号转导通路在绒癌的形成过程中发挥了重要的作用。TGF-β信号转导通路是当今肿瘤防治领域探讨与钻研的焦点之一。转化生长因子β1（transforming growth factor beta, TGF-β1）是滋养细胞在侵袭母体的过程当中研究最多的细胞调节因子，它主要是通过TGF-β1信号转导通路在滋养细胞肿瘤恶性侵袭与转移的过程中发挥自身的重要作用。P38丝裂原活化蛋白激酶（P38 mitogen-actived protein kinase, P38MAPK）是存在于人体细胞内的一类蛋白激酶，它属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类别。P38MAPK主要参与人体细胞的生长、细胞发育、细胞分裂以及细胞凋亡等生理过程。P38MAPK信号转导通路是细胞内介导细胞外刺激的重要信号系统，在细胞恶变和肿瘤浸润转移过程中发挥关键作用。TGF-β1可以直接激活P38MAPK信号转导通路的上游激酶，从而间接地激活P38MAPK信号转导通路，参与肿瘤的发生与发展。在多种疾病发病机制的研究中，TGF-β1信号转导通路与P38MAPK信号转导通路存在一定的交互作用，但在绒癌发生的分子机制的研究中，两条信号转导通路之间是否存在相互作用的研究目前国内外罕见报道。

本实验通过在低剂量TGF-β1刺激的绒癌JEG-3细胞模型上，分别采用TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）和P38抑制因子（SB203580）阻断两条信号转导通路，比较P38活化后的核转位以及P38、磷酸化P38蛋白水平的表达，从而揭示TGF-β1与P38MAPK信号转导通路在绒癌发生中的相互作用，对绒癌的恶性侵袭及转移的分子机制进行阐明并积累实验依据，为绒癌的临床治疗寻找新的作用靶点。

**目的**

用浓度为5ng/ml的TGF-β1预处理绒癌JEG-3细胞，在建立的细胞模型上，采用免疫荧光染色法检测P38活化后的核转位，Western blotting技术检测P38、磷酸化P38蛋白水平的表达，探讨TGF-β1及P38MAPK信号转导通路间的相互作用及作用的关键步骤，揭示绒癌恶性侵袭及转移的分子机制。

**方法**

1.细胞培养及细胞模型的建立：

实验的主要研究对象为人绒癌JEG-3细胞系。此细胞系来源于中国协和医科大学基础医学研究所。将绒癌JEG-3细胞用含10%胎牛血清的1640完全培养基置于37℃、5%CO2培养箱中培养。当细胞长满至70%-80%时，按0.25%胰酶：0.02%EDTA为1:3的比例进行传代。取对数生长期的绒癌JEG-3细胞进行实验。将浓度为5ng/ml的TGF-β1作用于绒癌JEG-3细胞，同期设立空白对照组、1µM、3µM TGF-β1受体阻滞剂（LY364947）2个剂量组及1µM、3µM P38抑制因子（SB203580）2个剂量组。

2.免疫荧光染色法检测P38活化后的核转位过程。

3.免疫蛋白印迹法检测P38、磷酸化P38蛋白的表达水平。

4.应用SPSS15.0统计学软件对实验数据进行统计学分析。**结果**

# 1. 免疫荧光染色结果

## 1.1 给予TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）后绒癌JEG-3

细胞中P38的活化及核转位的情况

免疫荧光染色法实验表明，TGF-β1受体阻滞剂作用于绒癌JEG-3细胞后，磷酸化P38在细胞核内的荧光染色强度减弱，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；磷酸化P38的核染色强度呈现浓度依赖效应，随着TGF-β1受体阻滞剂浓度的增加，磷酸化P38在细胞核内的荧光染色强度逐渐减弱（*P*＜0.05）。

## 1.2 给予P38MAPK抑制因子（SB203580）后绒癌JEG-3细胞中P38

的活化及核转位的情况

免疫荧光染色法实验表明，P38抑制因子作用于绒癌JEG-3细胞后，磷酸化P38在细胞核内的荧光染色强度减弱，与TGF-β1刺激组比较，差

异具有统计学意义（*P*＜0.05）；磷酸化P38的核染色强度呈现一定的浓度效应，随着P38抑制因子浓度的增加，磷酸化P38在细胞核内的荧光染色强度逐渐减弱（*P*＜0.05）。

# 2. Western blotting检测结果

## 2.1 TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）对绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38蛋白水平表达的影响

实验表明，TGF-β1作用于绒癌JEG-3细胞后，P38及磷酸化P38的蛋白表达量显著增高，与空白对照组比较，差异具有统计学意义（*P*＜

0.5）；而加入TGF-β1受体阻滞剂后，绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化

P38的蛋白表达量减少，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*

＜0.05）；且呈现出浓度依赖效应，随TGF-β1受体阻滞剂作用浓度的增加，

P38及磷酸化P38的蛋白表达量逐渐减少。

## 2.2 P38MAPK抑制因子（SB203580）对绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38蛋白水平表达的影响

实验表明，P38抑制因子（SB203580）作用于绒癌JEG-3细胞后，

P38及磷酸化P38的蛋白表达量减少，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；且表现出浓度依赖效应，P38及磷酸化P38的蛋白表达量随P38抑制因子作用浓度的增加而逐渐减少。

结论：

1. 外源性TGF-β1可促进绒癌JEG-3细胞中P38活化后的核转位，并且可提高绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38的蛋白水平的表达。

2. TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）可减弱绒癌JEG-3细胞中P38活化后的核转位，并且降低绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38蛋白水平的表达，且呈现良好的浓度依赖效应。

3. P38抑制因子（SB203580）可减弱绒癌JEG-3细胞中P38活化后的核转位，并且降低绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38蛋白水平的表达，且表现出良好的浓度依赖效应。

4. TGF-β1信号转导通路与P38MAPK信号转导通路在绒癌JEG-3

细胞的恶性侵袭机制中存在着相互作用。

**关键词：**绒毛膜癌； TGF-β1； P38MAPK；信号转导；相互作用

**The relationship between TGF-β1 and P38MAPK in the occurrence and development of Choriocarcinoma JEG-3 cell**

**Abstract**

Choriocarcinoma, called CC for short, is highly malignant gestational trophoblastic. Forming from malignant transformation of trophoblastic stem cell, it could occur after abortion, ectopic pregnancy, hydatidiform mole, invasive mole and even normal pregnancy. During the early period of Choriocarcinoma, which has a close relationship with excessive invasion capacity of trophoblastic stem cell, blood route metastasis might occur so that patient's life could be threatened. The occurrence of choriocarcinoma was lead by many factors, among which signaling pathway plays an important role. Nowadays the signal pathway of TGF-βis one of hot spots in researching of preventing and curing tumour. Transforming growth factor beta, TGF-β1, is researched most in the filed of trophoblastic cell's invasion involving the process of the mother's body. TGF-β1 acts as a key role in the malignant invasion and transformation of gestational trophoblastic neoplasia through TGF-β1 signal pathway. P38 mitogen-actived protein kinase (P38MAPK) which belongs to intracellular serine / threonine kinase is an intracellular protein kinase existing human body. P38MAPK mainly involves cell growth, development, division, apoptosis and many physiological process. P38 MAPK signal pathway which is an important signal system to transmit extracellular stimulation in cell, works as a key role in the process of cell malignant transformation and tumour infiltrating transformation. TGF-β1could stimulate directly the upstream kinase of P38MAPK signal pathway, so that stiulate indirectly P38MAPK signal pathway to involve the occurrence and development of tumour. In the research of many diseases' pathogeneses, TGF-β1 signal pathway and P38MAPK signal pathway have a certain interactive effect, however, the report is rare whether the two signal pathways have interactive effect in choriocarcinama home and abroad.

According to choriocarcinoma JEG-3 model stimulated by low dose TGF-β1, using TGF-β1 receptor inhibitor ( LY364947) and p38MAPK inhibitor(SB203580) to block the two signal pathways, after the stimulation analyzing the nuclear translocation of P38, the protein expressions of P38 and

Phosphor-P38, the trial aims to reveal the interactive effect between TGF-β1 signal pathway and P38 MAPK signal pathway. The trial also states malignant invasion and transforming molecular mechanism and calculates experimental bases to provide a new target spot in clinical cure of choriocarcinoma.

**Objective**

To use TGF-β1 with 5ng/ml to pretreat choriocarcinoma JEG-3 cell, to check nuclear translocation of P38 after stimulation by the way of Immunofluorescence analysis on the cell model, to test the protein expressions of P38 and phosphor-P38 by the way of Western blotting, to discuss the interactive effect of TGF-β1 signal pathway and P38 MAPK signal pathway and the key procedures of the interactive effect to reveal the mechanism of malignant invasion and molecular transformation of choriocarcinoma.

**Methods**

1. The cultivation of cell and the establishment of cell mode:

The object of study in the essay was the cell system of choriocarcinoma which was brought from Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Medical College. Completed substratum which concluded JEG-3 and RPMI-1640 with 10% fetal bovine serum were cultivated in incubator with 5% CO2 at 37˚C. when the cells reached approximately 70%-80%, to go down to posterity at the proportion of 0.25% trypsin to 0.02%EDTA was 1to 3. Choosing JEG-3 cells in logarithmic phase did experiment. Using TGF-β1 with 5ng/ml acted on JEG-3 cells, establishing groups of comparison without stimulation. The groups of comparison included two dosages of TGF-β1 receptor inhibitor (LY364947) and two dosages of P38 MAPK inhibitor (SB 203580).

2. The process of nuclear transformation of P38 after stimulation was checked by immunofluorscence analysis.

3. The protein expressions of P38 and phospo-P38 were tested by Western blotting.

4. All experimental datum were analyzed by SPSS 15.0 software.

**Results**

**1. Immunofluorescence analysis**

1.1 TGF-β1 receptor inhibitor (LY364947) affects on activation and nuclear transformation of P38 in the JEG-3 cell line.

Immunofluorescence analysis indicated that stain of phospo-P38 in nucleus reduced after TGF-β1 receptor inhibitor acted on JEG-3 cells. According to the group with TGF-β1, the difference had statistic meaning (*P*

＜0.05）. Phospo-P38 showed concentration dependent effect. That was to say

Stain of phospo-P38 in nucleus decreased gradually as the concentrations of the TGF-β1 receptor inhibitor increased (*P*＜0.05) .

1.2 P38 MAPK inhibitor (SB203580) affects on activation and nuclear transformation of P38 in the JEG-3 cell line.

According to Immunofluorescence analysis, stain of phospo-P38 in nucleus reduced after P38 MAPK inhibitor acted on JEG-3 cells. According to the group with TGF-β1, the difference had statistic meaning (*P*＜0.05).

Phospo-P38 showed concentration dependent effect. That was to say stain of phospo-P38 in nucleus decreased gradually with the increase of P38 MAPK inhibitor's concentration (*P*＜0.05) .

1. **Western blotting detection**

2.1 TGF-β1 receptor inhibitor (LY364947) affects on protein expressions of P38 and phospo-P38 in JEG-3 cells.

The trial indicated that protein expressions of P38 and phospo-P38 increased gradually after TGF-β1 acted on JEG-3 cells. The difference had statistic meaning comparing with the group without TGF-β1 (*P*＜0.05); while

Protein expressions of P38 and phospo-P38 decreased gradually after adding TGF-β1 receptor inhibitor. The difference had statistic meaning comparing with the group with TGF-β1 (*P*＜0.05); what's more the density showed

Dependent effect, that was protein expressions of P38 and phospo-P38

Decreased gradually with the increase of the TGF-β1 receptor inhibitor's density.

2.2 P38 MAPK inhibitor(SB203580) affects on protein expressions of P38 and phospo-P38 in JEG-3 cells.

The trial indicated that protein expressions of P38 and phospo-P38

Decreased gradually after P38 MAPK inhibitor acted on JEG-3 cells. The difference had statistic meaning comparing with the group with TGF-β1 (*P*＜0.05); what's more the density showed dependent effect, that was protein

Expressions of P38 and phospo-P38 decreased gradually with the increase of P38 MAPK inhibitor's density.

**Conclusions**

1. Exogenous TGF-β1 could promote P38's nuclear transformation after activation in JEG-3 cells, and could improve protein expressions of P38 and phospo-P38 in JEG-3cells.

2. TGF-β1 receptor inhibitor(LY364947) could reduce P38's nuclear transformation after activation in JEG-3 cells, and could decrease protein expressions of P38 and phospo-P38 in JEG-3cells, presenting good concentration dependant effect.

3. P38 MAPK inhibitor(SB203580) could reduce P38's nuclear transformation after activation in JEG-3 cells, and could decrease protein expressions of P38 and phospo-P38 in JEG-3 cells, presenting good concentration dependant effect.

4. There was a interactive effect between TGF-β1 signal pathway and P38MAPK signal pathway in the malignant invasion of choriocarcinoma JEG-3 cells.

**Key words**: Choriocarcinoma; TGF-β1; P38MAPK; Signal pathway; Interactive effect

**英文缩写**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| TGF-β1 | Transforming growth factor beta 1 | 转化生长因子 β1 |
| P38MAPK | P38 mitogen-actived protein kinase | P38 丝裂原活化蛋白激酶 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| MMPS | Matrix metalloproteinases | 基质金属蛋白酶 |
| TIMP | Tissue inhibitor of metalloproteinases | 基质金属蛋白酶抑制剂 |
| RTPK | Receptor tyrosine kinase | 受体酪氨酸蛋白激酶 |
| PKC | Protein kinase C | 蛋白激酶 C |
| TAK1 | Transforming growth factor β-activated kinase 1 | 转化生长因子 β 激活激酶 |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase | 细胞外信号调节激酶 |
| JNK | C-Jun N-terminal kinase | c-Jun 氨基末端激酶 |
| SAPK | Stress-activated protein kinase | 应激活化蛋白激酶 |
| BMK1 | Big mitogen-activated protein kinase 1 | 大丝裂素活化蛋白激酶 |
| MEKK2-4 | Mitogen-activatedprotein/extraeellular signal regulated kinase-kinase2-4 | 促分裂原活化蛋白激酶/ 细胞外信号调节  激酶-激酶 2-4 |
| MKPS | Mitogen-activated protein kinase phosphatases | 促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶 |
| LPS | lipopohsaccharides | 细菌脂多糖 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |
| IL | interleukin | 白细胞介素 |
| ECM | Extracellular matrixc | 细胞外基质 |
| BM | Basement membrane | 基底膜 |
| HGF | Hepatocyte growth factor | 肝细胞生长因子 |
| TGF | Tumor growth factor | 肿瘤生长因子 |
| EDTA | Ethylene diamine tetra acetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| FBS | Fetal bulk serium | 胎牛血清 |
| APS | Ammonium persulfate | 过硫酸铵 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| Triton X-100 | Octyl Phenoxy Poly Ethoxy Ethanol | 聚乙二醇辛基苯基醚 |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride | 4,6-联脒-2-苯基吲哚 |
| WB | Western blotting | 蛋白免疫印迹法 |
| TBST | Tris-Buffered Saline and Tween20 | Tris-Hcl 缓冲盐溶液+ 聚ft梨酯 |
| PBS | Phosphate buffered solution | 磷酸盐缓冲液 |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis | SDS-聚丙烯酰胺 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |

**TGF-β1与P38MAPK在绒毛膜癌JEG-3细胞发Th发展中的相互关系的研究**

前**言**

绒毛膜癌是一种主要发生于生育年龄妇女的滋养细胞肿瘤，具有高度恶性，对生育年龄妇女的生命威胁很大。绒癌的发生率具有明显的地区差异性，亚洲如印尼、印度、菲律宾、日本、中国等国家均明显高于欧美国家。尽管绒癌是可以通过化疗药物治愈的一种恶性肿瘤，但近些年来随着多药联合化疗的进展，耐药与复发构成了绒癌治疗失败的主要原因。这使得分子靶向治疗日益受到关注[1]，为更好地研究绒癌细胞特性改变的作用靶点，信号转导通路成为在绒癌细胞恶性转化、侵袭和转移的分子机制研究领域中的焦点之一。

转化生长因子β1（transforming growth factor beta, TGF-β1）属于生长因子超家族的一种同源双链的多肽类细胞因子。它在细胞的分化、细胞的增殖、细胞周期的阻滞和细胞外基质的形成等多种细胞过程中起着调节作用[2]。有研究显示[3]，包括P63、TIMP、TGF-β、MMPS、cadherin和滋养细胞特异性HLA家族I类分子HLA-G等在内的多种因子，在滋养细胞侵蚀的调节中发挥作用。由此可见，TGF-β1介导的信号转导通路在绒癌的发生和发展中起重要作用。

P38 丝裂原活化蛋白激酶（P38 mitogen-actived protein kinase ，

P38MAPK），作为丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases,

MAPK）大家族中的一员，它易受环境压力和炎性细胞因子的影响[4]，并参与细胞分化、凋亡、自噬等生理过程。P38MAPK信号转导通路是细胞内重要的信息传递系统，在肿瘤浸润与转移的过程中发挥重要作用，并且调节多种肿瘤细胞中与侵袭相关基因的表达[5]。

本实验通过应用TGF-β1受体（I和II）阻滞剂和P38抑制因子在绒癌JEG-3细胞上阻断两条信号转导通路，比较P38活化后的核转位以及

P38、磷酸化P38蛋白水平的表达情况，以此来研究TGF-β1与P38MAPK两条信号转导通路在绒癌发生发展中的相互作用关系，为阐释绒癌的发病机理提供理论依据，同时也为临床治疗绒癌开辟新的途径。

**材料与方法**

# **1** 材料

## 1.1 细胞

1.1.1细胞的来源

实验所使用的人绒毛膜癌JEG-3细胞系来源于中国协和医科大学基础医学研究所。

1.1.2细胞的培养

将人绒癌JEG-3细胞接种于规格为3.5cm的细胞培养皿中，使用含10%胎牛血清的1640完全培养基（此培养基中添加有200mM谷氨酰胺、100mM丙酮酸钠、100U/ml链霉素、100U/ml青霉素）置于培养条件为湿度95%、温度37℃、5%CO2的培养箱中进行培养。每隔三天，应用磷酸盐缓冲液

（PBS）洗涤细胞，并更换1640完全培养基。当绒癌JEG-3细胞长满培养皿底部的70%-80%左右时，弃去培养皿中的培养液，加入1-2ml含有0.25%胰酶和0.02%乙二胺四乙酸二钠（EDTA）的消化液进行消化。并放在倒置显微镜下观察细胞的消化情况，当贴壁的JEG-3细胞间隙增加，形状逐渐趋于圆形，并且贴壁的细胞还未漂起时立即吸除消化液，并加入适当体积的1640完全培养基终止消化，使用吸管将贴壁的细胞吹打成悬液，尽量避免产生气泡，按照1: 3的比例进行传代。取对数生长期的绒癌JEG-3细胞进行实验。

## 1.2 主要设备和仪器

|  |  |
| --- | --- |
| **名** 称 | **来** 源 |
| 150 CO2 培养箱 | 德国 Heraceu 公司 |
| 090-135.001 倒置显微镜 | 德国徕卡公司 |
| SW-CJ-1B 超净工作台 | 江苏麒麟厂 |
| 恒温水浴箱 | 上海跃进仪器厂 |
| DYCZ-40D 垂直电泳槽 | 北京六一厂 |
| DYCZ-40D 转膜电泳槽 | 北京六一厂 |
| DYY-III6B 稳压稳流电泳仪 | 北京六一厂 |
| DU600 紫外可见分光光度计 | 美国 BECKMAN 公司 |
| TS-8 转移脱色摇床 | 海门其林贝尔仪器制造有限公司 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | SIM-F124 制冰机 | 日本三洋公司 |
|  | MK3 酶标仪 | 芬兰雷勃公司 |
|  | D-37520 低温高速离心机 | 德国 Heraeus **公司** |
|  | 普通离心机 | 德国 Heraeus **公司** |
|  | CSR-1-30 实验室超纯水器 | 北京爱思泰克公司 |
|  | KQ-250DE 数控超声波清洗机 | 昆ft市超声仪器有限公司 |
|  | MA110 电子天平 | 上海跃进医疗器厂 |
|  | LD4-2A 型水平式离心机 | 北京医用离心机厂 |
|  | 激光扫描共聚焦显微镜 | 日本 Nikon 公司 |
|  | 3.5cm 细胞培养皿 | 美国 coming 公司 |
|  | 6 孔板 | 美国 coming 公司 |

## 1.3 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **名** 称 | **来** 源 |
| 人重组转化生长因子 1（TGF-β1） | 美国 Peprotech 公司 |
| TGF-β1 受体阻滞剂 LY364947 | 美国 SigMa 公司 |
| P38 抑制因子 SB203580 | 美国 SigMa 公司 |
| P38 单克隆兔抗人一抗 | 美国 Epitmics 公司 |
| 磷酸化 P38 单克隆兔抗人一抗 | 美国 Epitmics 公司 |
| 羊抗兔二抗 | 美国 Epitmics 公司 |
| 1640 干粉 | 美国 GIBRO BRL 产品 |
| 胎 牛 血 清 （ FBS, Fetal bulk serium） | 杭州四季青生物工程材料有限公司 |
| SuperECL Plus 超敏发光液 | 北京普利来基因技术有限公司 |
| BCA 蛋白定量试剂盒 | 北京普利来基因技术有限公司 |
| RIPA 细胞裂解液 | 北京泰格美科技有限公司 |

## 1.4 实验所用试剂的配制

1.4.1绒癌JEG-3细胞培养过程所用试剂：

（1）1640细胞培养液：取RPMI-1640干粉一袋，将干粉培养基倒入

1000ml烧瓶中，用总量1/3的超纯水将其溶解，根据RPMI-1640干粉培

养基包装袋说明及实验需要，加入1.2g碳酸氢钠、2.39g HEPES后匀速搅拌约15分钟，再加入青霉素和链霉素，使二者终浓度均为100U/ml,此时应用超纯水将其定容至1000ml，搅拌均匀后用5%碳酸氢钠调节PH值至

7.0，经过滤除菌后，冷冻保存于-20℃的冰箱中。

（2）磷酸盐缓冲液（PBS）：称取8.0g氯化钠、0.2g氯化钾、0.24g磷酸二氢钾、1.44g磷酸二氢钠以及8.0g葡萄糖，将上述物质溶解于800ml超纯水中，使用盐酸调节溶液的PH值至7.4，再加入超纯水使其定容至

1000ml即可。然后在高压下蒸汽灭菌，保存于-20℃的冰箱中。

（3）100mM丙酮酸钠：称取1.1g丙酮酸钠，将其溶解于100ml PBS液中，经0.22μm的滤膜过滤除菌后分装为1ml/管后，置于-20℃的冰箱中保存备用。

（4）200mM谷氨酰胺：称取2.93g谷氨酰胺，将其溶解于100ml PBS液中，经0.22μm的滤膜过滤除菌后分装为1ml/管后，置于-20℃的冰箱中保存备用。

（5）胰蛋白酶消化液：称量0.25g胰蛋白酶、0.02g乙二胺四乙酸二钠

（EDTA）后溶于100ml的PBS液中，磁力搅拌器搅拌至完全溶解，置于

4℃冰箱内稳定约2小时，经0.22μm的滤膜过滤除菌后分装于10ml小青瓶中，保存于-20℃的冰箱备用。

1.4.2免疫荧光染色法所用试剂：

（1）4%多聚甲醛固定液：称取4g多聚甲醛，将其放入带有磁力搅拌棒的容器内，加入100ml 0.1M PBS液及数滴1N氢氧化钠，在通风柜中加热至60℃使溶液充分溶解后冷却至室温，并调节溶液的PH值至7.4，使用前新鲜配制。

（2）0.1%聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）：分别量取Triton X-100试剂28.2ml、0.1M PBS 72.8ml混合后置37℃-40℃水浴中2-3小时，使其充分溶解混匀，即可配制出30% Triton X-100储备液。实验前用PBS将此储备液浓度稀释至0.1%即可。

（3）4,6-联脒-2-苯基吲哚（DAPI）工作液：称取10mg DAPI，将其充分溶解于10ml超纯水中，使用冻存管分装为1ml/管，置于-20℃冰箱避光保存。实验时，取出一管放于4℃的避光环境中备用。

1.4.3免疫蛋白印迹法所用试剂：

（1）10%十二烷基硫酸钠（SDS）：称取100g SDS，将其溶解于900ml超纯水中，加热至68℃使其充分溶解，然后滴加浓盐酸调节PH值至7.2，再加入超纯水定容至1000ml，分装备用。

（2）30%丙烯酰胺溶液：称量29g丙烯酰胺、1g N，N'-亚甲双丙烯酰胺，将二者溶于60ml的超纯水中，加热至37℃使溶液充分溶解，再加入超纯水定容至100ml，0.45μm滤膜过滤后避光保存于室温。

（3）1.5mol/L Tris-Hcl：称取Tris 18.15g，使其溶解于90ml超纯水中，用浓盐酸调节溶液PH值至8.8后，用超纯水定容至100ml，保存于4℃的条件下。

（4）1.0 mol/L Tris-Hcl：称取Tris 12.1g，使其溶解于90ml超纯水中，用浓盐酸调节溶液PH值至6.8后，用超纯水定容至100ml，保存于4℃的条件下。

（5）10%过硫酸铵（APS）：称取10g APS溶于100ml超纯水中，4℃避光保存，保存时间为2周。

（6）1×电泳缓冲液：称取3.02g Tris、18.8g甘氨酸及1g SDS，加入超纯水定容至1000ml，搅拌使其充分溶解，保存于4℃的条件下。

（7）1×转膜缓冲液：称量Tris 3.0g、甘氨酸14.4g、SDS 1.0g，将上述三种物质溶于600ml超纯水中，搅拌使其充分溶解。然后向其中加入甲醇200ml，充分搅拌，使其混合均匀后，向混合液中加入超纯水使其定容至1000ml，室温条件下保存。

（8）TBST缓冲液：将称量好的8.8g氯化钠、1.0M Tris-Hcl 20ml放入1000ml烧杯中，加入800ml超纯水搅拌使其充分溶解，然后加入0.5ml的Tween 20，充分混匀后加入超纯水使其定容至1000ml，并保存于4℃的条件下。

（9）封闭液（5%脱脂奶粉）：称量脱脂奶粉1.5g，将其溶解于30ml TBST

中，充分混匀后置于4℃的条件下保存。

## 1.5 人重组TGF-β1的配制：

应用1ml经高压灭菌后的PBS液溶解5μg的人重组TGF-β1干粉，配制成浓度为5ng/ml的存储液，分装在经高压灭菌处理后的EP管内，置于-20℃的冰箱中保存。

## 1.6 TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）的配制：

应用二甲基亚砜（DMSO）5ml溶解TGF-β1受体阻滞剂（LY364947）干粉5mg，配制成浓度为1mM的存储液，分装在经高压灭菌处理后的EP管内，-20℃的冰箱中保存。

## 1.7 P38抑制因子（SB203580）的配制：

应用二甲基亚砜（DMSO）50μl溶解P38抑制因子（SB203580）干粉1mg，配制成浓度为1mM的存储液，分装在经高压灭菌处理后的EP管内，-20℃的冰箱中保存。

# **2** 方法

## 2.1 细胞模型的建立

取对数生长期的绒癌JEG-3细胞，将其分别接种于24孔板（免疫荧光染色实验）或6孔板（免疫印迹蛋白实验）上，每孔细胞的初浓度均为

5×10 4/ml，在二氧化碳培养箱中培养48h。将接种于24孔板或6孔板的绒癌JEG-3细胞分为以下6个实验组，即空白对照组、TGF-β1刺激组、1μM LY364947 组、3μM LY364947组、1μM SB203580组、3μM SB203580

组，每组设2个平行孔。当细胞融合程度达80%左右时，在TGF-β1受体

（I和II）阻滞剂组（LY364947组）及P38抑制因子组（SB203580组）中分别加入不同浓度的LY364947及SB203580，继续培养4h。然后在除空白对照组以外，每组中分别加入5ng/ml的TGF-β1培养2h后终止细胞培养，进行实验。

## 2.2 免疫荧光染色法

2.2.1实验原理：

免疫荧光技术是根据抗原抗体反应，将已知的抗原或抗体标记上荧光素，使其成为荧光标记物，再用这种荧光抗体或抗原作为分子探针来检测细胞或组织内的相应抗原或抗体。免疫荧光染色法主要是应用固定剂将细胞固定以增加细胞膜的通透性，并利用Triton-X-100使部分膜蛋白变性，从而进一步增强细胞膜的通透性。然后应用正常羊血清封闭，以达到使特异性抗体与目的蛋白能够更好结合的目的。而二抗可以特异性识别一抗的

Fc区域，利用二抗连接不同的荧光基因，在荧光显微镜下可以观察到不同的荧光，从而显示目的基因表达及定位的情况。

2.2.2实验步骤：

（1）将绒癌JEG-3细胞种植于铺有直径为14mm圆形盖玻片的24 孔

板上，调整细胞初始浓度为5×10 4/ml，培养48h后，按照实验组分组情况，即空白对照组、TGF-β1刺激组、1μM LY364947组、3μM LY364947组、1μM SB203580组、3μM SB203580组，在相应实验组中分别加入1μM的LY364947及SB203580、3μM的LY364947及SB203580，培养4h后，

在除空白对照组以外，每组中分别加入5ng/ml的TGF-β1培养2h后进行实验；

（2）在每孔中加入新鲜配制的4%多聚甲醛，室温下固定细胞10min；

（3）PBS洗3次，每次5min；

（4）室温下每孔加入0.5ml 0.1% Triton X-100，对绒癌JEG-3细胞进行透化处理15min[6]；

（5）PBS洗3次，每次5min；

（6）10%ft羊血清工作液室温下封闭20min；

（7）PBS洗2次，每次5min；

（8）加入稀释浓度为1: 100的一抗，置于湿盒中4℃过夜；

（9）次日将细胞置于37℃5%CO2培养箱中孵育45min, PBS洗3次，每次5min[7]；

（10）加入稀释浓度为1: 50的羊抗兔二抗，37℃孵育30min；

（11）PBS洗3次，每次5min；

（12）加入浓度为1: 100的DAPI于室温下避光染色5min；

（13）PBS洗3次，去除多余的DAPI；

（14）取出圆形盖玻片，将其放在载玻片上，用滤纸吸去多余水分，滴入封片剂封片，激光扫描共聚焦显微镜下观察。

2.2.3结果判断标准：

（1）激光扫描共聚焦显微镜下观察圆形盖玻片中P38活化后的核转位情况。磷酸化P38是P38活化后的表现形式。而此实验中所应用的DAPI是一种荧光染料，它主要是通过与细胞核中的双链DNA结合而对细胞核进行标记。在紫外光的照射下，在波长条件为345nm时，DAPI呈现出的荧光强度最高。在激光扫描共聚焦显微镜下可以看到显现蓝色荧光的细胞。磷酸化P38主要在细胞核内表达，显现为红色荧光。判断标准同时需考虑荧光强度：（+++～++++）为荧光闪亮，呈明显的亮蓝色或亮红色；

（++）为荧光明亮，呈蓝色或红色；（+）为荧光较弱，但清楚可见；（±）

为极弱的可疑荧光；（－）为无荧光。

## 2.3 免疫蛋白印迹技术

2.3.1实验原理：

免疫蛋白印迹法又称Western blot印迹方法，是将获得的细胞或组织蛋白通过SDS-聚丙烯酰胺（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）电泳，使不同分子量的蛋白质分离，并转移至固相支持物上。以固相支持物上的蛋白质作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体反应，经过底物显色或放射自显影以检测特异性目的基因表达的蛋白成分。

2.3.2实验步骤：

（1）绒癌JEG-3细胞蛋白质的提取：将终止培养的绒癌JEG-3细胞弃去培养液后用温和的PBS洗涤2～3次，加入适量的冰预冷的细胞裂解液，置于冰上裂解20min。用细胞刮刀将细胞刮下，收集到Ep管中。在低温高速离心机中，以12000rpm 4℃离心5min，收取上清液分装于Ep管中

-20℃保存；

（2）蛋白含量测定：按50: 1比例取50体积BCA试剂及1体积Cu试剂配制BCA工作液，用PBS将10μl BSA标准品稀释至100μl，使其终浓度为0.5mg/ml。将标准品按照0,2,4,6,8,12,16,20μl加到96孔板中，每孔中分别加入PBS 20, 18,16,12,8,4,0μl，然后在各孔中分别加入200μl

BCA工作液。再将样品稀释至适当浓度，取20μl加入到96孔板中，然后加入200μl BCA工作液。充分混匀，37℃放置30min后，在酶标仪上测定吸光值，绘制标准曲线以计算蛋白浓度；

（3）SDS-PAGE电泳：首先将10μg样品与5×loading Buffer混合后，于95℃变性15min备用。应用各种实验试剂配制12%分离胶（H2O 3.3ml，

30%丙烯酰胺4.0ml, 1.5M Tris-Hcl 2.5ml, 10%SDS 0.1ml,10%APS 0.1ml, TEMED 0.004ml）和5%浓缩胶（H2O 2.7ml, 30%丙烯酰胺0.67ml, 1.0M Tris-Hcl 0.5ml, 10%SDS 0.04ml, 10%APS 0.04ml, TEMED 0.004ml），配制好浓缩胶后插入梳子，待浓缩胶凝集后，小心移出梳子，将电泳缓冲液加入电泳槽中，用微量加样器加入变性的蛋白样品（按照算出的上样量加样），用1×loading Buffer填补其他空白泳道，接好电源及电泳槽的电极，调整电压为80V稳压跑浓缩胶，至分离胶时将电压调整为120V，当携带

溴酚蓝染料的蛋白质到达分离胶的底部时即可停止电泳；

（4）转膜：电泳完毕后将玻璃板撬开，根据目的蛋白分子量的大小进行切胶，根据凝胶大小剪取6张滤纸及1张PVDF膜，将PVDF膜浸泡于甲醇中5min，然后将滤纸、PVDF膜及凝胶在转移缓冲液中浸泡15min，装好电转移仪，将其放入转移槽内，接通电源调整电流为130mA，稳流转膜2h；

（5）封闭：从电转移仪中取出PVDF膜，放入5%脱脂奶粉封闭液中，在4℃的条件下，置于摇床上封闭2h；

（6）一抗杂交：将裁好的杂交膜放入杂交袋中，加入浓度为1: 500的一抗工作液，4℃过夜，次日用TBST洗膜3次，时间分别为15min、10min、10min；

（7）二抗杂交：用2.5%脱脂奶粉封闭液按1: 2000稀释二抗，将PVDF膜有蛋白的一面向上，滴加适量的二抗工作液于PVDF膜上，室温下孵育1h，然后用TBST洗膜3次，每次5min；

（8）显影：按照说明配好发光液，将PVDF膜有蛋白的一面朝下放入发光液中，3min后用保鲜膜将PVDF膜包好放入暗盒中固定。打开暗室中的红光，将X胶片置于膜上，扣紧暗盒，曝光2min。曝光完毕后，将

X胶片依次放入显影液、水、定影液中，取出晾干后进行胶片标记。胶片经扫描仪扫描后，应用软件对显影条带进行分析。同样方法，以β-actin

（稀释浓度为1: 100）杂交作为内对照。

## 2.4 实验数据的统计学处理

所有实验数据均采用SPSS15.0统计学软件进行分析与处理。实验所得数据中的计量资料采用*x±s*来表示。根据实验目的和类型不同，选用单因素方差分析（ANOVA）进行组间比较，应用SNK-*q*检验进行两两之间的比较，以*P*<0.05为显著性检验标准。

**结果**

# 1. 免疫荧光染色结果

## 1.1 TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）对绒癌JEG-3细胞中P38

的激活及核转位的影响(Fig.1-Fig.3)

免疫荧光染色法实验表明，TGF-β1受体阻滞剂作用于绒癌JEG-3细胞后，磷酸化P38在细胞核内的染色强度减弱，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；磷酸化P38的核染色强度呈现浓度依赖效应，随着TGF-β1受体阻滞剂浓度的增加，磷酸化P38在细胞核内的染色强度逐渐减弱（*P*＜0.05）。

## 1.2 P38抑制因子（SB203580）对绒癌JEG-3细胞中P38的激活及核转位的影响(Fig.4-Fig.6)

免疫荧光染色法实验表明，P38抑制因子作用于绒癌JEG-3细胞后，磷酸化P38在细胞核内的染色强度减弱，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；磷酸化P38的核染色强度呈现一定的浓度效应，随着P38抑制因子浓度的增加，磷酸化P38在细胞核内的染色强度逐渐减弱（*P*＜0.05）。

# 2. Western blotting检测结果(Fig.7-Fig.8, Table 1-Table 2)

## 2.1 TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）对绒癌JEG-3细胞中P38

及磷酸化P38蛋白水平表达的影响

实验表明，TGF-β1作用于绒癌JEG-3细胞后，P38及磷酸化P38的蛋白表达量显著增高，与空白对照组比较，差异具有统计学意义（*P*＜

0.05）；而加入TGF-β1受体阻滞剂后，绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化

P38的蛋白表达量减少，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*

＜0.05）；且呈现出浓度依赖效应，随TGF-β1受体阻滞剂作用浓度的增加，

P38及磷酸化P38的蛋白表达量逐渐减少。

## 2.2 P38抑制因子（SB203580）对绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38

蛋白水平表达的影响

实验表明，P38抑制因子（SB203580）作用于绒癌JEG-3细胞后，

P38及磷酸化P38的蛋白表达量减少，与TGF-β1刺激组比较，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；且表现出浓度依赖效应，P38及磷酸化P38的蛋白表达量随P38抑制因子作用浓度的增加而逐渐减少。

**附图**

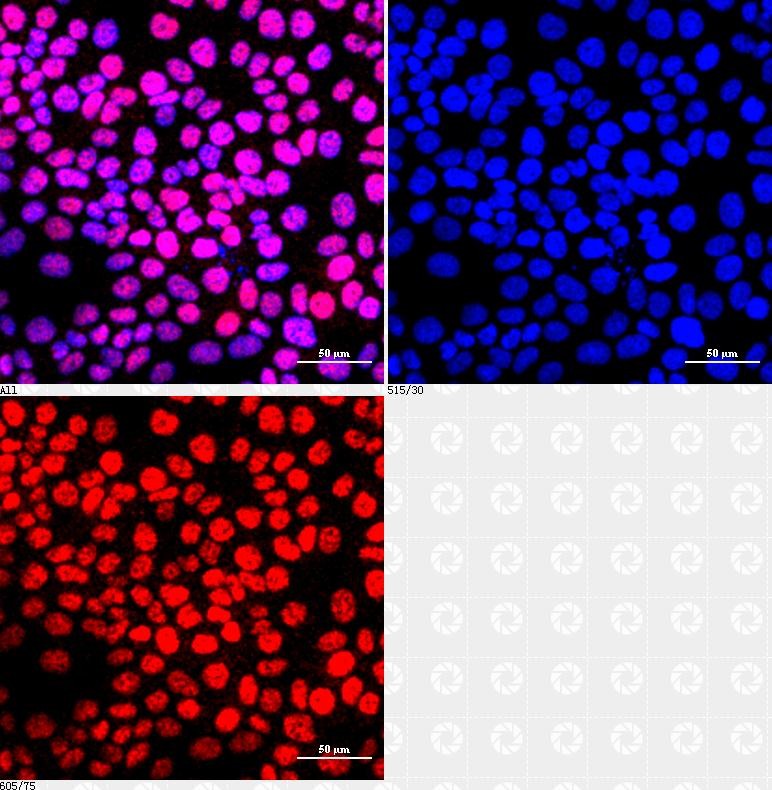


Fig. 1 nuclear translocation of the JEG-3 cells of TGF-β1-treated group

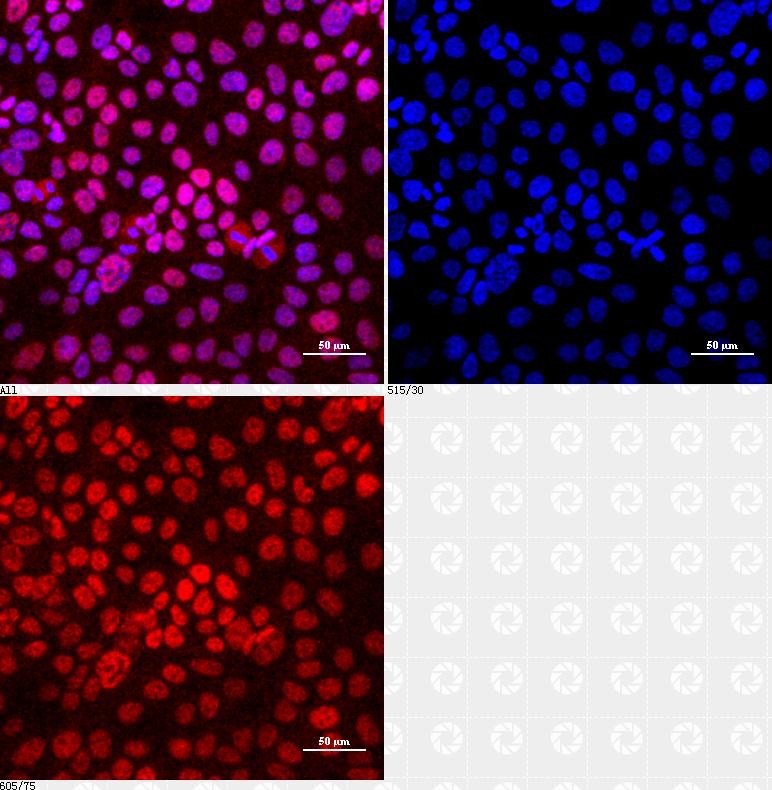


Fig. 2 nuclear translocation of the JEG-3 cells of 1μM TGF-β1 receptor inhibitor (LY364947)



Fig. 3 nuclear translocation of the JEG-3 cells of 3μM TGF-β1 receptor inhibitor (LY364947)



Fig. 4 nuclear translocation of the JEG-3 cells of TGF-β1-treated group



Fig. 5 nuclear translocation of the JEG-3 cells of 1μM P38MAPK inhibitor (SB203580)



Fig.6 nuclear translocation of the JEG-3 cells of 3μM P38MAPK inhibitor (SB203580)



Fig.7 Effect of TGF-β1 receptor inhibitor(LY364947) and P38MAPK inhibitor (SB203580) on p38 and phospho-p38 protein expression in the JEG-3 cell line.



Fig.8 Effect of TGF-β1 receptor inhibitor(LY364947) and P38MAPK inhibitor (SB203580) on p38 and phospho-p38 protein expression in the JEG-3 cell line. Note: VS control group: **\****P*<0.05; VS 5µg/L TGF -β1 group: **^***P*<0.05

**附表**

Table 1 Effect of TGF-β1 receptor inhibitor(LY364947) and P38MAPK inhibitor (SB203580) on p38 protein expression in the JEG-3 cell line

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Groups | n | P38/β-actin | Groups | *q* |
| Control(A) | 5 | 0.13±0.02 | A vs B | 10.28\*\* |
| 5µg/L TGF-β1(B) | 5 | 0.22±0.03\*^ | B vs C | 11.42\*\* |
| 1µM LY364947(C) | 5 | 0.12±0.02\*^ | B vs D | 17.13\*\* |
| 3µM LY364947(D) | 5 | 0.07±0.01\*^ | B vs E | 13.71\*\* |
| 1µM SB203580(E) | 5 | 0.10±0.02\*^ | B vs F | 19.42\*\* |
| 3µM SB203580(F) | 5 | 0.05±0.01\*^ | C vs D | 5.71\*\* |
|  |  |  | E vs F | 5.71\*\* |
| *F* |  | 46.30 |  |  |

statistics

VS control group: **\****P*<0.05; VS 5µg/L TGF-β1 group: ^*P*<0.05; \*\**P*<0.01 Table 2 Effect of TGF-β1 receptor inhibitor(LY364947) and P38MAPK

Inhibitor (SB203580) on phospo-P38 protein expression in the JEG-3 cell line

statistics

| Groups | n | P-P38/β-actin | Groups | q |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Control(A) | 5 | 0.14±0.03 | A vs B | 9.32\*\* |
| 5µg/L TGF-β1(B) | 5 | 0.23±0.03\*^ | B vs C | 3.52\*\* |
| 1µM LY364947(C) | 5 | 0.20±0.02\*^ | B vs D | 18.63\*\* |
| 3µM LY364947(D) | 5 | 0.05±0.01\*^ | B vs E | 10.35\*\* |
| 1µM SB203580(E) | 5 | 0.13±0.02\*^ | B vs F | 15.53\*\* |
| 3µM SB203580(F) | 5 | 0.08±0.01\*^ | C vs D | 15.11\*\* |
|  |  |  | E vs F | 5.18\*\* |
| F |  | 49.29 |  |  |

VS control group: **\****P*<0.05; VS 5µg/L TGF -β1 group: ^*P*<0.05; \*\**P*<0.01

**讨论**

绒毛膜癌是一种妊娠滋养细胞疾病。它是起源于胎盘滋养细胞的一种恶性肿瘤，具有生长迅速、对局部组织破坏严重、恶性程度高、早期即可发生血液及淋巴系统转移等特点[8]。绒癌多经过侵蚀性葡萄胎发展而形成，它的病变组织即使被切除后仍可继续生长。这充分体现了恶性肿瘤的生长特点。尽管绒癌是人类通过化疗可获得治愈的恶性肿瘤，但它仍然存在潜在的致命性[9]。虽然不同辅助诊断的有效应用可以使预后得到良好转归[10]，但是仍然有许多患者不能得到有效的治疗。这与绒癌滋养细胞的恶性侵袭特性密切相关[11]。

绒癌大多来源于绒毛滋养细胞。滋养细胞是一种极为特殊的细胞，它的特殊性表现在它奇特的生物学特性上，即滋养细胞对母体的侵蚀能力。正常情况下，人体妊娠滋养细胞的先天性侵蚀的功能是受限的，这使得滋养细胞侵蚀母体到一定程度时能够及时停止，不产生任何后遗症。滋养细胞侵蚀能力的异常与包括滋养细胞疾病在内的多种母胎疾病相关。在对滋养细胞侵蚀调节的研究中显示[12]，包括TGF-β、基质金属蛋白酶（matrix

metalloproteinases，MMPS）、基质金属蛋白酶抑制剂（tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP）、α1β1整合素等在内的多种因子均参与其中。TGF-β1是滋养细胞在侵袭母体的过程当中研究最多的细胞调节因子[13]。李玉红[14]等在TGF-β1对绒癌JEG-3细胞中TGF-β受体I、II、smad4 mRNA表达及侵袭能力的影响中表明，TGF-β1可以促进绒癌JEG-3细胞的增殖，增强JEG-3细胞的侵袭能力。可见，TGF-β1在绒癌的发生发展中发挥着重要的作用。

TGF-β1是一种具有广泛生物学功能的多肽类细胞因子，主要参与调节细胞的增殖、细胞的分化及细胞外基质的形成等[15]。TGF-β与细胞膜表面的TGF-β 受体（TβRI 和TβRII）、细胞质内的Smad 蛋白家族构成了TGF-β信号转导通路。近年来的研究表明，该通路在肿瘤的发生发展中起重要作用，主要表现在TGF-β信号转导通路对肿瘤发展的双向调控方面上。在肿瘤发展的早期，TGF-β作为肿瘤的抑制因子抑制肿瘤细胞的生长，而在肿瘤发展的晚期，TGF-β则促进肿瘤细胞的生长[16]。符爱珍[17]等在TGF-β1对人早孕滋养层细胞和绒毛膜癌JAR细胞增殖的影响及其意义的

研究中发现，TGF-β1可以抑制正常滋养细胞的增殖，而在绒癌JAR细胞中则促进细胞的增殖。其研究结果与Iyer[18]等的研究结果相一致。对TGF-β1信号转导通路的深入研究，可以更好地阐释绒癌发生的分子机制。李玉红[19]等的研究发现，TGF-β1可促进绒癌细胞Smad3蛋白的表达，说明TGF-β信号转导通路可能与绒癌的浸润和转移相关。

在对绒癌发病机制的深入研究中，丝裂原活化蛋白激酶（mitogen

–actived protein kinase，MAPK）信号转导通路亦发挥着举足轻重的作用。

MAPK通路是细胞内传递信息的重要传导系统之一，它主要参与细胞的生长、细胞的分裂、细胞的分化及细胞的凋亡等过程，在基因表达调控中发挥作用。其中P38MAPK是MAPK家族中重要的一员，它被激活后以磷酸化的形式进入细胞核，调节基因转录，在多种细胞生理过程中发挥作用。

P38MAPK信号转导通路参与调节多种肿瘤细胞中侵袭相关基因的表达[5]，在肿瘤的浸润和转移中起关键作用。研究发现，用P38MAPK特异性抑制剂可明显抑制乳腺癌BT549细胞的侵袭能力，表明P38MAPK的活性与乳腺癌的侵袭能力相关。张曦倩[20]等在P38MAPK抑制剂SB203580抑制人绒癌JAR细胞的体外侵袭作用的研究中表明，在探究滋养细胞侵袭机制的过程中，P38MAPK通路发挥着重要的作用。本实验中应用P38MAPK抑制剂SB203580作用于TGF-β1介导的绒癌JEG-3细胞，结果显示P38活化后的核转位受到了抑制，并且随P38MAPK抑制剂SB203580浓度的增加而减弱。这也充分说明了P38MAPK信号转导通路在绒癌的恶性侵袭中发挥作用。

近年来，在对肿瘤生长调控作用的研究中显示，肿瘤的形成可能与不同环境中多种细胞因子的影响及不同信号转导通路间的相互作用有关[21]。有研究显示[22]，在皮肤光老化的治疗中，TGF-β1与P38MAPK信号转导通路存在相互作用的关系。这与Irina Kolosova[23]等在TGF-β1诱导的肺泡上皮细胞的纤维化过程中的研究结果相一致。在绒癌的发生中，TGF-β与P38MAPK信号转导通路在绒癌发病的分子机制中均各自发挥着重要作用。在绒癌的浸润与转移中，二者是否存在相互作用的研究甚少。本实验分别应用TGF-β1受体阻滞剂LY364947和P38抑制因子SB203580作用于TGF-β1诱导的绒癌JEG-3细胞上，观察P38活化后的核转位情况及P38、磷酸化P38蛋白水平的表达，探讨TGF-β1与P38MAPK信号转导

通路是否在绒癌的发展中存在相互作用的关系。结果表明：1、TGF-β1作用于绒癌JEG-3细胞，P38活化后的核转位较空白对照组明显增强，P38、磷酸化P38蛋白水平亦较空白对照组的表达增强。这说明了TGF-β1可以诱导P38MAPK通路的激活。2、TGF-β1受体（I和II）阻滞剂作用于TGF-β1介导的绒癌JEG-3细胞，P38活化后的核转位较TGF-β1刺激组减弱，P38、磷酸化P38蛋白表达量较TGF-β1刺激组减少。说明TGF-β1受体（I 和

II）阻滞剂可以阻断P38MAPK信号转导通路的激活。3、P38抑制因子作用于TGF-β1介导的绒癌JEG-3细胞，P38活化后的核转位及P38、磷酸化P38蛋白表达均较TGF-β1刺激组减少。上述结果分别从激活水平和表达水平两个角度说明了，TGF-β1信号转导通路和P38MAPK信号转导通路在TGF-β1 介导的绒癌JEG-3 细胞中存在着交互作用的关系。这与

Dziembowska[24]等在T98G胶质母细胞瘤的研究中得出的结论相一致，即

TGF-β1介导的信号转导与P38MAPK信号转导通路存在交互作用。

在对绒癌恶性浸润和转移的深入研究中，TGF-β1介导的信号转导与

P38MAPK信号转导通路在绒癌细胞中是如何发生交汇作用的机制值得进一步探讨。P38MAPK 信号转导通路是保守的三级酶促反应，首先

MAPKKK发生磷酸化后可以激活MAPKK, 然后MAPKK发挥对MAPK双位点磷酸化的作用，从而使P38MAPK信号通路激活。丝裂原活化蛋白激酶激酶6/丝裂原活化蛋白激酶激酶3 ( MKK6/MKK3)可以特异性地活化P38MAPK。而在TGF-β1信号转导通路中TGF-β1首先在细胞膜与其受体TβRII结合，使TβRII发生磷酸化，然后再与TβRI结合，活化的

TβRⅠ可进一步识别并结合胞浆中的两个转录因子Smad2和Smad3。活化的Smad2或Smad3与TβRⅠ受体分离，与共用型Smad4蛋白结合而形成异聚体进入细胞核内发挥作用。在TGF-β1转导途径中，活化的Smad2或Smad3可激活转化生长因子β激活激酶（Transforming growth factorβ-activated kinase 1, TAK1），进一步激活下游细胞信号级联反应，发挥信息传递的作用。TAK1是MAPKKK家族的成员之一，而在TGF-β1介导的信号转导通路中，作为活化的Smad2或Smad3的下游激酶在细胞内信息传递过程中起重要作用。TAK1作为MKK6/MKK3的上游激酶，可以间接地激活P38MAPK信号转导通路。可见，TAK1是两条信号转导通路的交汇点。本实验中应用的TGF-β1受体（I和II）阻滞剂是在绒癌

细胞膜发挥信号转导通路的阻断作用，而P38抑制因子是在绒癌细胞质中发挥阻断作用，应用上述两种抑制剂后，均出现了P38活化后的核转位的减弱，P38、磷酸化P38蛋白表达量减少。虽然两种抑制剂发挥作用的部位不同，但都得到了相同的结果。由此推测，在绒癌的发生发展中，TGF-β1与P38MAPK信号转导通路发生交互关系的作用点很有可能是TAK1，两条信号转导通路在绒癌JEG-3细胞中发挥交互作用的具体部位还有待于进一步深入的研究。

TGF-β1信号转导通路与P38MAPK信号转导通路在调节诸如细胞增殖、分化等基本细胞生理过程中均发挥着重要的作用[25]。肿瘤的形成是一个十分复杂的过程，是机体调节细胞生长与增殖发生紊乱的结果。它与细胞信号转导异常直接相关。上述两条信号转导通路在肿瘤的发生发展中亦存在着相互作用的关系。在Andrei V. Bakin[26]等的研究中揭示了在成纤维细胞的分化和细胞转移中TGF-β与P38MAPK信号转导通路存在交互作用。在对信号转导通路激活的研究中，主要从表达水平及激活水平两个方面来阐述作用机制。在肿瘤形成的过程中，细胞信号转导通路在激活水平的异常表达起着至关重要的作用[27]。本实验中，分别应用上述两条信号转导通路的抑制剂作用于TGF-β1诱导的绒癌JEG-3细胞模型上，通过检测P38的蛋白表达量即是在表达水平上来探讨两条信号转导通路间的关系；而对P38活化后的核转位及磷酸化P38的蛋白表达量的检测是从激活水平揭示TGF-β1与P38MAPK信号转导通路之间的关系。结果显示，无论是从表达水平还是从激活水平，两条通路的抑制剂均可使P38活化后的核转位减少，P38及磷酸化P38的蛋白表达量亦减少。说明了在绒癌的发生发展中，TGF-β1与P38MAPK信号转导通路存在交互作用。对上述两条信号转导通路在绒癌恶性侵袭转移中的交互作用的深入探讨，可以为绒癌的防治靶点开辟新的途径。

结**论**

1. 外源性TGF-β1可促进绒癌JEG-3细胞中P38活化后的核转位，并且可提高绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38的蛋白水平的表达。

2. TGF-β1受体（I和II）阻滞剂（LY364947）可减弱绒癌JEG-3细胞中

P38活化后的核转位，并且降低绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38的蛋白水平的表达，且呈现良好的浓度依赖效应。

# 3. P38抑制因子（SB203580）可减弱绒癌JEG-3细胞中P38活化后的核转位，并且降低绒癌JEG-3细胞中P38及磷酸化P38的蛋白水平的表达，且表现出良好的浓度依赖效应。

# 4. TGF-β1信号转导通路与P38MAPK信号转导通路在绒癌JEG-3细胞的恶性侵袭机制中存在着相互作用。

参考文献

[1] Denkert C, Darb-Esfahani S, Loibl S. Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy[J]. Semin Immunopathol, 2011 Apr 17, Epub ahead of print.

[[2] Fu Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fu%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923), [O'Connor LM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=O%27Connor%20LM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923), [Shepherd TG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shepherd%20TG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923), [Nachtigal MW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nachtigal%20MW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923). The p38MAPK inhibitor, PD169316, inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling in human ovarian cancer cells. [Biochem Biophys Res Commun](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521923) 310(2): 391-7, 2003

[3] Loregger T, Pollheimer J, Knofler M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast-a review. Placenta. 2003 Apr; 24 Suppl A: S104-10.

[4] Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA [p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665431) Trends Mol Med 15(8), 369–79, 2009.

[5] Takekawa M, Kubota Y, Nakamura T, et al. Regulation of stress-actived MAP kinase pathways during cell fate decisions[J]. Nagoya J Med Sci, 2011, 73(1-2): 1-14.

[6] Yi-Xiong Chen, Zhi-Hong Weng, Shu-Ling Zhang. Notch3 regulates the activation of hepatic stellate cells. World J Gastroenterol. 18(12): 1397-1403, 2012.

[7] Bimal Vyas, Keiko Ishikawa, Suzy Duflo, Xia Chen, Susan L. Inhibitory effects of HGF and IL-6 on TGF-β1 mediated vocal fibroblast-myofibroblast differentiation. Ann Otol Rhinol Laryngol. 119(5): 350–357, 2010.

[8] Goldstein DP, Berkowitz RS. Gestational trophoblastic disease. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. Abeloff's Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2008: chap 94.

[9] Carsten Denker t, Silvia Darb- Esfahani, Sibylle Loibl, Ioannis Anagno stopoul os, Korinna Jöhrens. Anti -cancer immune response mechanis ms

In neoad juvant and targeted therapy. Semin Immunopathol.33:341–351, 2011.

[10] McGee J, Covens A. Gestational trophoblastic disease: hydatidiform mole, nonmetastatic and metastatic gestational trophoblastic tumor: diagnosis and management. In: Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL, eds. Comprehensive Gynecology. 6th ed. Philadelphia, Pa: Mosby Elsevier; 2012: chap 35.

[11] Goldstein DP, Berkowitz RS. Gestational trophoblastic disease. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. Abeloff's Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2008: chap 94.

[12] Loregger T, Pollheimer J, Knofler M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast-a review. Placenta. 2003 Apr; 24 Suppl A: S104-10.

[13] Dennler S, Goumans MJ, Peter TD. Transforming growth factor beta signal transduction[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(5): 731-740.

[14] YuHong Li, Qian Xu, Zhuo Zhang, ShaoChen Liu, ChangHua Shi and YuSi Tan. The impact of TGF-β1 on the mRNA expression of TβR I, TβR II, Smad4 and the invasiveness of the JEG-3 placental choriocarcinoma cell line. Oncology Letters. 10.3892/ol. 2012.906, 2012.

[[15] Fu Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fu%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923), [O'Connor LM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=O%27Connor%20LM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923), [Shepherd TG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shepherd%20TG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923), [Nachtigal MW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nachtigal%20MW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14521923). The p38 MAPK inhibitor, PD169316, inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling in human ovarian cancer cells. [Biochem Biophys Res Commun](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521923) 310(2): 391-7, 2003

[16] Douglas A Chapnick, Lisa Warner, Jennifer Bernet, Timsi Rao and Xuedong Liu. Partners in crime: the TGF beta and MAPK pathways in cancer progression. Chapnick et al. Cell & Bioscience. 1: 42, 2011

[17] 符爱珍, 蔡永广, 李英勇, 等. TGF-β1 对人早孕滋养层细胞和绒毛

膜癌JAR细胞增殖的影响及其意义[J].中国妇幼保健, 2008,23（18）:

2582-2585

[18] Lyer S, Wang Z, Akhtari M, etal. Targeting TGF beta signaling for cancer

therapy[J]. BiolTher,2005,4(3):189-196

[19] 李玉红, 许倩, 李晓茹, 等. TGF-β1作用下Smad3蛋白在绒癌细胞中的表达[J]. 承德医学院学报, 2008, 25（4）: 347-349

[20] 张曦倩, 庞战军, 陈士岭, 等. P38MAPK抑制剂SB203580抑制人绒癌JAR细胞的体外侵袭作用[J]. 实用肿瘤杂志, 2003, 18（2）: 95-97.

[21] Hiroaki Ikushima, Kohei Miyazono. Cellular context-dependent" colors" of transforming growth factor-βsignaling[J]. Cancer Science, 2010, 101(2): 306-312.

[22] Jianqiao zhongab, Nianfang Hua, Xia Xiong, et al. A novel promising therapy for skin aging: Dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF-β/Smad and p38 MAPK signalingpathway[J]. Medical Hypotheses, 2011, 76(3): 343-346.

[23] Irina Kolosova1, David Nethery2, Jeffrey A. Kern3, et al. Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells[J]. Journal of Cellular Physiology, 2011, 226(5): 1248-1254.

[24] Dziembokwska M, Danilkiewicz M, Wesolowska A, et al. Cross-talk between Smad and p38 MAPK signaling in transforming growth factor beta signal transduction in human glioblastoma cells[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2007, 354(4): 1101-1106.

[25] Hendrik Ungefroren, Stephanie Groth, Susanne Sebens. Derential Roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF-β1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1. [J]. Molecular Cancer, 0: 671, 2011.

[26] Andrei V. Bakin, Cammie Rinehart, Anne K. Tomlinson and Carlos L. Arteaga. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF-β-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. Journal of Cell Science 115, 3193-3206, 2002.

[27] Michal Grzmil, Pier Morin, Jr, Maria Maddalena Lino, et al. MAP Kinase-Interacting Kinase 1 Regulates SMAD2-Dependent TGF-βSingaling Pathway in Human Glioblastoma. Cancer Res. 71: 2392-2402, 2011.

**综述**

**P38MAPK信号转导通路及其在肿瘤细胞中的研究进展**

1引言

近年来恶性肿瘤是对人类健康威胁极大的疾病之一，它的发生发展是多步骤的演变过程。首先机体有肿瘤细胞的异常增生，在多种因素的作用下逐渐发生恶变，生物学功能表现为对周围组织高度的侵袭性。在肿瘤形成的复杂过程中，机体内信号分子发挥了其不可缺少的重要作用，成为细胞信号转导过程中外源性蛋白作用的靶目标，通过细胞内复杂的级联反应最终改变组织细胞正常的生理活动。目前研究表明，细胞信号转导的主要通路有以下几条：（1）G蛋白介导的信号转导途径；（2）非受体酪氨酸蛋白激酶途径；（3）受体酪氨酸蛋白激酶（receptor tyrosine kinase, RTPK）信号转导途径；（4）受体鸟苷酸环化酶信号转导途径；（5）核受体信号转导途径。其中有研究证实，受体酪氨酸蛋白激酶（RTPK）信号转导途径与机体细胞的增殖肥大和肿瘤的发生有着密切的关系。RTPK的下游信号转导主要通过三种蛋白激酶的级联激活，这三种蛋白激酶均属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，包括激活丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）、激活蛋白激酶C（protein kinase C, PKC）以及激活磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）。在以上三种蛋白激酶中，MAPK级联是细胞内最重要的信息传递系统。它主要参与机体内细胞的生长、细胞的发育、细胞的分裂和分化、细胞的死亡以及细胞间功能的同步等多种生理过程，特别是在基因的表达调控中发挥关键作用。经过多年的深入研究，到目前为止，在哺乳动物细胞中已发现的信号通路有以下5个亚族，分别为：（1）细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路；（2）c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) /应激活化蛋白激酶（stress-activated protein kinase，

SAPK)通路；(3) P38MAPK通路；(4)细胞外信号调节蛋白激酶5(extracellular-signal regulated protein kinase 5, ERK5) /大丝裂素活化蛋白激酶1(big mitogen-activated protein kinase 1, BMK1)通路。它们之间相互关联，纵横交错，共同构成了复杂而又调节有序的MAPK信号转导系统。在这众多的MAPK系统的分支中，P38MAPK信号转导途径是MAPK 家

族中的重要组成成员。激活后的P38MAPK进入机体细胞核内，磷酸化核转录调节因子，调节机体细胞的基因转录，从而引起包括细胞生长、细胞增殖、细胞分化及细胞凋亡在内的多种生理过程。因此，有研究表明在细胞转导的复杂网络系统内，P38MAPK是细胞信息传递的交汇点或者共同通路。

2 P38MAPK信号转导通路的特点

2.1 P38MAPK信号转导通路的发现及构成

P38MAPK信号转导通路的发现可追溯到1993年，由Brewster等[1]首次发现P38MAPK。1994年Han等[2]首先在受到高渗和内毒素作用后的小鼠的肝脏细胞，分离纯化出P38MAPK，一种酪氨酸磷酸化蛋白激酶，它的分子量为38kDa。它是由360个氨基酸残基组成的蛋白，相对分子质量为

38000，并且定位于细胞质与细胞核，属于应激激活的蛋白激酶。经过多年来深入的研究，Northern实验结果显示，在小鼠的巨噬细胞、T细胞和B细胞中，P38MAPK mRNA呈现出高表达状态。在对P38MAPK功能的研究中表明，哺乳动物P38MAPK与酵母HOG1基因编码的MAPK分子的功能十分相似。P38MAPK主要有6种同型异构体，分别为：p38α1 、p38α2 、

p38β1、p38β2 、p38γ和p38δ。p38α和p38β在机体所有的组织几乎均有产生，而p38γ则主要产生在骨骼肌组织中，在肺、肾、肠、唾液腺的表皮细胞和睾丸、卵巢、肾上腺、垂体中，p38δ的表达比较多。尽管在不同亚型的P38MAPK中，氨基酸的个数不同，但它们却超过了50%的同源性。虽然P38MAPK各型异构体在序列上具有高度的同源性，但它们的功能不同，磷酸化的底物也不尽相同。通常认为，磷酸化的P38MAPK（P-P38MAPK）可以反映P38MAPK的活性。有研究显示，P38MAPK中的不同亚型在组织的分布、上游激酶的调节、下游底物的作用以及对细胞外刺激的反应等方面均具有明显的特异性[3]。但不同亚型的激酶之间具有一些相似性，表现在氨基酸序列非常相近，都含有“T-G-Y”三肽序列[4]，都能被TNF-α、IL-1 和FGF等致炎因子激活。

2.2 P38MAPK信号转导通路的激活及调控

P38MAPK信号转导通路可通过渗透压的改变、炎性细胞因子、休克、细菌脂多糖（Lipopolysaccharides, LPS）、紫外线照射、生长因子受体、

G蛋白受体与环境心理等因素激活。作为P38MAPK信号转导通路的上游

激酶，丝裂原活化蛋白激酶激酶6/丝裂原活化蛋白激酶激 酶

3(MKK6/MKK3)可以特异性地激活P38MAPK. MAPK信号的传导途径和激活途径都是三级酶促级联反应。首先，MAPKKK发生磷酸化激活

MAPKK,然后MAPKK对MAPK进行双位点磷酸化，从而激活

P38MAPK[5]。在信息传递的途径中，位于P38MAPK信号通路的上游激酶有：MAPKKK丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶（ASK1、TAO kinase1-3、

MLK3)、促分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶-激酶2-4(mitogen-activatedprotein/extraeellular signal regulated kinase-kinase2-4, MEKK2-4)、Tpl-2和TBK1(TANK-binding kinase1)[6]。由MAPKKK直接介导的P38MAPK激活机制可能是依赖于各种受体之间特殊的相互作

用。MAPKKK被各种受体激活的转导机制可能包括以下几方面：（1）与小GTP酶（如Cdc42和Rac）结合[7]；（2）与MyD88和肿瘤坏死因子受体相关因子6的相互作用；（3）Gadd45的结合；（4）MAPKKK自身磷酸化。P38MAPK作用的底物家族包括转录因子、MAPKAP激酶以及其他酶类。

P38MAPK可以直接磷酸化多种转录因子，还可以以直接或间接地方式磷酸化某些酶的底物，如胞质磷脂酶A2和Cdc25磷酸酶。这两个酶都参与了细胞周期蛋白激酶的活性和细胞周期的调节[8]。P38MAPK与ATP结合域结合的3个活性残基分别为：106位的苏氨酸、109位的蛋氨酸和157位的丙氨酸。经过多年的研究表明，106位的苏氨酸可能与P38MAPK抑制剂的特异性有关。MAPK的灭活主要是通过促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶

（mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKPS）使苏氨酸和酪氨酸去磷酸化来恢复基态的。

3 P38MAPK信号转导通路在生物学方面的作用

经过多年的实验研究表明，P38MAPK信号转导通路在生物学方面的作用主要有：（1）P38MAPK可以使细胞核内c-myc基因的表达增强，发挥抑癌基因的功能，使细胞凋亡。这一生物学作用在Stoneley M等[9]的研究中已充分证明；（2）P38MAPK可以使P53发生磷酸化，诱导细胞凋亡[10]；

（3）P38MAPK参与了Fas/Fasl诱导的细胞凋亡过程[11]；(4) P38MAPK可以通过激活c-jun和c-fos，进而调节激活蛋白1的激活[12]；(5) P38MAPK可以通过诱导bax转位，使神经元细胞死亡[13]；（6）通过增强TNF-α的表达，促进P38MAPK的活化，诱导细胞凋亡来发挥P38MAPK的生物学作用。大多数

研究表明，在单核巨噬细胞、内皮细胞及滑液细胞中，P38MAPK信号转导通路可以激活多种前炎性细胞因子，如白细胞介素( interleukin, IL) 1、IL-6、IL-8和肿瘤坏死因子α；还可以诱导起关键作用的炎症合酶，如环氧化酶2、诱导型一氧化氮合酶，后两者是炎症发生部位一氧化氮的主要来源；除以上生物学作用外，有研究表明，P38MAPK信号转导通路还可以调节基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13的表达；亦可通过调节RANKL的表达，来调控破骨细胞的分化和骨吸收[14]。在

P38MAPK的不同亚型中，p38α是P38MAPK家族中免疫和炎性反应最主要的亚型，而p38γ和p38δ的生物学作用目前尚不完全清楚。

4 P38MAPK信号转导通路在肿瘤细胞形成中的作用

4.1 P38MAPK信号转导通路参与肿瘤细胞的增殖和转移

细胞的增殖受多种调节因子的控制，其中肿瘤生长因子（tumor growth

factor，TGF）在肿瘤发生的早期阶段起着重要的作用。TGF能够抑制正常细胞的生长，而表现为促进肿瘤细胞的增殖与侵袭。有研究表明，TGF可以通过激活P38MAPK和ERK1/2信号转导通路，使MCF10A细胞的形态学发生改变，并伴随E-cadherin的下调，同时促进细胞的生长、转移及侵袭。这与Kim等[15]人的研究结果相一致。在Hsieh等[16]关于MAPK通路的活化在蛋白激酶CA(PKCA)介导的人类肝癌细胞株(HCC)转移和侵袭作用的研究中，亦发现P38MAPK在肝癌细胞侵袭性的形成中起重要作用。表现为

PKCA低表达的细胞株siPKCA-SK的细胞增殖能力、侵袭性均显著降低，同时伴有P38MAPK磷酸化水平的降低。此外经P38MAPK抑制 剂

SB203580作用后的细胞株SK-Hep-1的细胞侵袭和转移能力也明显降低。亦有研究报道，在某些恶性肿瘤中MAPK高度活化，并且MAPK的活化可能是通过细胞过度增殖来参与致癌过程的。有学者曾报道，MAPK的活性在结直肠腺瘤和癌中均降低，但在结直肠癌中MAPK的活性明显高于结直肠腺瘤，说明MAPK可能参与肿瘤的进展[17]。

4.2 P38MAPK信号转导通路与肿瘤血管的生成

细胞的生长与增殖通常是依赖于多种生长因子等外源性信号。这些信号与细胞内相应受体结合，使细胞内特定分子发生有序的相互作用，最终产生特定的生物学效应。多种生长因子通过细胞信号转导过程，激活细胞内的转录因子，从而诱发肿瘤的形成。毛华等[18-20]在肝癌转移的研究中发

现，血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可通过

P38MAPK信号转导通路来诱导肝癌细胞的转移，阻断P38MAPK信号转导通路则可以抑制肝癌细胞的转移。由此可见，VEGF促进肝癌细胞的转移主要是通过P38MAPK信号转导通路而发挥作用的。White SR等[21]的研究表明，激活P38MAPK信号转导通路可以诱导血管平滑肌细胞产生血管内皮生长因子(VEGF)，而P38MAPK特异性抑制剂SB203580及抗VEGF抗体均可抑制细胞的迁移。

4.3 P38MAPK信号转导通路与细胞外基质（extracellular matrixc, ECM）和基底膜（basement membrane, BM）的降解

恶性肿瘤细胞的一个重要的生物学特征是细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间粘附特性的异常。这种粘附特性的异常使肿瘤细胞具备了从原发部位脱落向周围组织侵袭及向远处器官转移的能力。肿瘤细胞通过释放细胞内的蛋白水解酶来降解细胞外基质（ECM）和基底膜（BM），进而侵蚀到周围组织中，通过血管和淋巴管迁移到远处形成转移灶。基质金属蛋白酶( matrix metalloproteinases, MMPs)就是一类作用于细胞外基质和基底膜中纤维网架分子的蛋白水解酶。经过多年的研究发现，具备恶性转化能力的滋养细胞能分泌较多的MMPS，而基质金属蛋白酶抑制剂

（tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP）未能相应地增加，可导致子宫内膜的基质破坏，为肿瘤细胞的进一步生长提供空间，最终发展为侵蚀性葡萄胎或绒毛膜癌。石一复[22]等的研究发现，MMP-2、MMP-9在葡萄胎发生恶变组的表达明显高于正常绒毛组和葡萄胎未发生恶变组，而TIMP-1、TIMP-2在正常绒毛组和葡萄胎组之间表达无显著性差异，MMP-2/TIMP-2、MMP-9/TIMP-1在葡萄胎恶变组织中的表达亦高于在正常绒毛组织中的表达。在抑制前列腺癌细胞侵袭[23]的研究中发现，

P38MAPK的特异性抑制剂SB203580可以阻断TGF-β诱导的MMP-2的表达。

尿激酶型纤溶酶原激活物（urokinase-type plasminogen activator, uPA）是一种丝氨酸蛋白水解酶，它与细胞表面受体结合后可使纤溶酶原激活转变为纤溶酶。这种uPA激活的级联酶促反应可以直接引起ECM和BM的水解，同时还可以激活无活性的MMP，进而间接地水解ECM，由此引起的直接、间接的作用结果，可使几乎全部的ECM降解，从而导致细胞的迁

移和浸润。研究表明，在多种恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌中

uPA和uPAR的过度表达对维持这些肿瘤的侵袭和转移是必需的；

P38MAPK信号转导通路通过调节uPA的表达来影响VEGF诱导的人脐静脉内皮细胞的迁移活动[24]。Lee[25]在研究胃癌细胞系NUGC-3和MKN-28时发现，在肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的作用下，uPA表达上调，发挥促进肿瘤细胞侵袭、迁移的作用。ERK上游激酶MEK-1的特异性抑制剂PD98059可以抑制HGF诱导的细胞增殖，从而减少uPA的分泌。以上研究结果提示这两种胃癌细胞系的转移过程可能主要接受ERK信号转导通路的调控，而P38MAPK则通过灭活ERK来发挥抑制肿瘤细胞转移的作用。

4.4 P38MAPK信号转导通路与肿瘤细胞的衰老与凋亡

细胞凋亡是由体内外因素共同触发细胞内预存的死亡程序，从而导致细胞的主动性死亡方式。细胞凋亡在肿瘤的发生发展中发挥着非常重要的作用。P38MAPK在诸如结肠癌[26]，食管癌[27]，乳腺癌[28]等多种肿瘤中呈持续激活状态。国外研究发现，P38MAPK的活性在肝癌大病灶组(> 20mm)显示出低水平活性，由此可以说明P38MAPK活性的降低可以抑制凋亡，导致肝癌细胞的生长[29]。P38MAPK信号通路对凋亡的调节可能与P38MAPK激活的时程有关，有研究发现，P38MAPK通路的短期激活可以使造血肿瘤细胞SKT6分化，而P38MAPK通路的长期激活则可以促进其凋亡。在Kim

BJ[30]等的研究中发现，P38MAPK可使磷酸化Bcl-2家族中Bax第167位苏氨酸，使Bax在线粒体内发生易位，从而诱导凋亡的发生。近年来，关于

MAPK在凋亡中作用的研究主要集中在MAPK调节诸如c-myc等凋亡相关基因的表达机制方面的研究。此外，P38MAPK途径[31]还参与环氧化酶2(COX-2)和前列腺素E2(PGE2)的合成与细胞迁移、肝癌细胞黏附等过程。

5结论

P38MAPK信号转导通路在肿瘤的发生、发展、转移以及凋亡中发挥着非常重要的作用。随着对P38MAPK信号转导通路在肿瘤调控等方面的深入研究，逐渐认识到P38MAPK信号通路可引起多种细胞生物学效应，体现出自身具有的细胞类型特异性和刺激种类特异性。但P38MAPK信号转导通路在人体组织中是如何发挥自身的生物学效应以及P38MAPK信号

转导通路与其他细胞内信号通路是否存在“交谈”等作用，还有待进一步探索研究。目前对P38MAPK信号转导通路及其抑制剂的不断深入的研究，使P38MAPK抑制剂有望成为肿瘤治疗的新靶点，为肿瘤临床治疗提供新的思路。

参考文献

[1] Brewster JL, Valoir T, Dwyer ND, et al. An osmosensing signal, transduction pathway in yeast [J]. Science, 1993, 259 (5102): 1760-1763.

[2] Han J, Lee J D, Bibbs I, et al. A MAP Kinase targeted by endotoxn, andhyperosmolarityinmammaliancells[J]. Science, 1994, 265(5173): 808-811.

[3] Coulthard LR, White DE, Jones DL, et al. p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics[ J]. Cell, 2009, 15( 8): 369-379.

[4] 熊昌艳, 张荆, 官大威, 等. P38MAPK信号转导通路与组织损伤, [J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(6): 397-400.

[5] Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory, cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation ontyrosine and threonine. J Biol Chem 1995; 270: 7420-7426

[6] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs[ J]. Oncogene, 2007, 26( 22): 3100-3112.

[7] Du Y, Bock BC, Schachter KA, et al. Cdc42 induces activation loop phosphorylation and membrane targeting of mixed lineage kinase 3 [J]. J Biol Chem, 2005, 280( 52): 42984-42993 .

[8] Kittipatarin C, Li WQ, Bulavin DV, et al. Cell cycling through Cdc25A: transducer of cytokine proliferative signals [J]. Cell Cycle, 2006, 5 ( 9): 907-912.

[9] Stoneley M, Chappell SA, Jopling CL, et al. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20( 4): 1162-1169.

[10] Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinatesN-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation[J]. EMBO, 1999, 18( 23): 6845-6854.

[11] Kommann M, Ishiwat a T, Kleeff J, et al. Fas and Fas-ligand expression

In human pancreatic cancer [J]. Ann Surg 2000, 231( 3): 368-379.

[12] Han J, Jiang Y, Li Z, et al. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation [J]. Nature, 1997, 386( 6622): 296-299.

[13] Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, et al. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitricoxide-induced apoptosis in neurons [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2000, 150( 2): 335-347.

[14] Mbalaviele G, Anderson G, Jones A, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase prevents inflammatory bone destruction [J]. J Pharmaclo Exp Ther, 2006, 317( 3): 1044-1053.

[15] Kim M S, Lee E J, Kim HR, et al. p38 kinase is a key signaling m olecule for H-ras-induced cellmotility and invasive phenotype in human breast epithelial cell[J]. Dancer R es, 2003, 63( 17): 5454.

[16] Hsieh YH, Wu TT, Huang CY. p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells [J]. C ancer Res, 2007, 67( 9): 4320- 7.

[17] ParkKS, KimNG, KimJJ, etal. Differentialre gulation of MAP kinasecascade in human colorectal tumorigenesis[J]. BrJCancer, 1999, 81 (7): 111621121.

[18] 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. 中华肝胆外科杂志, 2001; 7: 34-36

[19] 毛华, 袁爱力, 赖卓胜. P38MAPK信号通路特异性阻断剂SB203580抑制VEGF诱导肝癌转移的实验研究. 现代消化及介入诊疗杂志1999; 4: 43-45

[20] 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 分裂原激活蛋白激酶, P38信号传导通路在抑制血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. 中华消化杂志2000; 20: 14-16

[21] White SR, Tse R, Marroqu in BA. Strerss-activated protein kinases mediate cell migration in human airway epithelialcells[J]. Am Resp ir CelMol Bio, l 2005, 32( 4): 301.

[22] 傅晓华, 石一复, 崔金生. MMPs及TIMPs在滋养细胞疾病中表达的

研究.实用妇产科杂志, 2004,20（4）: 231-233

[23] Huang X, Chen S, Xu L, et al. Genistein inhibits p38mapk inase activation, matrix metal lop roteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells[J]. Cancer Res, 2005, 65 ( 8): 3470.

[24] Yu J, B ian D, M ah an ivong C, et al. lp38Mitogen-activated protein kinase regulation of endothelial cell migration depends on urokinasep lasminogen activator expression1 [2]. J B iol Ch em, 2004, 279 ( 48 ): 50446.

[25] Lee KH, Choi EY, Kim MK, et al. Regulation of hepatocyte growth factormediated urokinase plasminogen activator secretion by MEK /ERK activation in human stomach cancer cell lines[J]. E xp M olM ed, 2006, 38( 1 ): 27- 35.

[26] 孙泽群, 徐少勇, 邓长生, 等. P38蛋白在大肠癌中的表达及其临床意义. 中国肿瘤临床, 2005, 32: 635-637.

[27] 张剑, 王树俊, 裘宋良, 等. ERK1和P38在食管鳞癌组织中的表达. 肿瘤基础与临床, 2006, 19: 177-179, 182.

[28] 尹为华, 马雅, 余光银, 等. 乳腺癌P38表达及临床病理意义. 中国煤炭工业医学杂志, 2005, 8: 698-699.

[29] 毛华, 黄纯炽, 赵敏芳, 等. P38MAPK信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞黏附作用. 世界华人消化杂志, 2006; 14: 778-783.

[30] Kim BJ, Ryu SW, Song B J, et al. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochond rial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells[J]. J B iol Chem, 2006, 81 ( 30): 21256- 21265.

[31] Mayoral R, Fernandez-Martinez A, Bosca L, Martin-Sanz P. Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinomacells. Carcinogenesis2005; 26: 753-7

致**谢**

时光荏苒，转眼间三年的硕士研究生生活即将结束。在这短暂而又有意义的三年时间里，我敬爱的导师李玉红教授不仅在学业上给我极大的帮助，在生活中也给了我无微不至的关怀。在即将毕业之际，谨向我尊敬的导师李玉红教授表达最真诚地感谢。本文是在李玉红教授的悉心指导下完成的。李玉红教授以她严谨求实的治学态度、一丝不苟的工作作风和开拓进取的创新精神深深地影响着我。她在科研领域里刻苦钻研，以开阔的视野、敏锐的思维指导着我在基础医学领域里不断学习前沿知识，为基础医学的科研工作贡献自己的微薄之力。在此，再次向我敬爱的导师李玉红教授表达最崇高的敬意。

在我硕士研究生的三年学习中，衷心感谢曾给予我帮助的唐世英老师、毛淑芳老师、李欣老师、周晓慧老师、许倩老师、王小杰老师、张宝军老师、王志清老师、张明茹老师、刘朝晖老师、王文勇老师、刘镭老师、赵淑敏老师、姜振儒老师、刘宇红老师等。衷心感谢承德医学院研究生处的乔跃兵老师、李德臣老师、张晓英老师、周颖老师等给予我的关心和帮助。

在承德医学院基础研究所做实验期间，特别感谢我的同学谭宇思、毛晓丹、李建玲、张艳、刘东坡、曲英杰、张扬、孔易、郭明、孙念霞、崔亚迪、常红敏、赵香菊及我的师姐史长华、张卓给予我的无私帮助，使我能够顺利地完成实验。在此，也对我家人给予的支持和理解表示衷心的感谢。

最后，再次向我的导师李玉红教授及关心、帮助过我的老师、同学及家人致以由衷地感谢！

**个人简历**

**一、个人基本情况**

姓名张孔雁性别女民族满族

出生日期1981年4月29日籍贯河北省承德市

**二、个人经历**

2000年9月—2005年7月承德医学院临床医学专业学习

2005年7月—2011年9月承德医学院附属医院工作

2011年9月—至今承德医学院攻读病理与病理生理学硕士研

究生

**三、论文发表情况**1．《TGF-β1对绒毛膜癌JEG-3细胞侵袭能力及其uPA、uPAR、PAI-1蛋白表达的影响》，中国妇幼保健，2014, 29（5）：777-780.第一作者 2。《人早孕绒毛细胞滋养层细胞培养方法的改良》，解剖学报，2013, 6：

861-864.第二作者

3. 《Cross-talk between P38 and Smad3 through TGF-β1 in JEG-3 choriocarcinoma cells》，International Journal of Oncology, 2013, 43

（4）:1187-1193.第三作者

4.《Cross-talk between P38 and TGF-βsignal pathway through TβRI, TβRII and smad3 expression in plancental choriocarcinoma JEG-3 cell line》，SCI已收录.第五作者

**四、获奖情况**

**五、承担或主研课题情况**

1.河北省自然科学基金资助项目[项目编号H2012406010]

2.河北省教育厅课题资助项目[项目编号2010103]