

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2001)03-0211-03

p38MAPK 基因诱导胶质瘤细胞凋亡

章必成¹, 李青¹, 巩西启², 叶菁¹, 陈广生¹, 王映梅¹, 林圣彩³ (¹ 第四军医大学西京医院病理科, 陕西 西安 710033, ² 北京卫戍区三师医院, 北京, ³ 新加坡国立大学分子细胞生物学研究所, 新加坡)

关键词: p38 分裂原激活蛋白激酶; 基因转染; 胶质瘤; 凋亡; 大鼠

中图分类号: R739.41 文献标识码: A

摘要: 目的 研究 p38MAPK 基因转染大鼠胶质瘤细胞系 C6 后对其生物学特性的影响 方法 利用脂质体介导法将 p38MAPK 基因导入大鼠胶质瘤细胞系 C6 中, 用免疫细胞化学染色检测其在细胞转染前后的表达情况, 用 HE 染色、流式细胞仪等方法研究其对细胞形态、粘着状况和生长周期的影响 结果 转染 pCMV5-p38MAPK 质粒组 p38MAPK 蛋白表达阳性, 细胞形态发生变化, 贴壁性降低, 出现大量凋亡细胞 结论 转染 p38MAPK 基因可诱导胶质瘤细胞凋亡

p38MAPK induces apoptosis of glioma cell

ZHANG Bi-Cheng¹, LI Qing¹, GONG Xi-Qi², YE Jing¹, CHEN Guang-Sheng¹, WANG Ying-Mei¹, LIN Sheng-Cai³

¹Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Third Division Headquarters Hospital, Beijing Garrison Command, Beijing, ³Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore, Singapore

Keywords: p38MAPK; gene transfection; glioma; apoptosis; rats

Abstract: **AM** To study the effect of p38MAPK transfection on the biological characteristics of glioma cell C6 **METHODS** p38MAPK was transfected into glioma cell C6 by lipofectin Expression of p38MAPK was detected by

收稿日期: 2000-06-14; 修回日期: 2000-08-29

基金项目: 高等学校骨干教师计划资助

作者简介: 章必成(1976-), 男(汉族), 湖北省黄冈市人 硕士生(导师李青). Tel (029) 3374541 Ext 102 Email zhangbicheng@sina.com

immunocytochemistry HE staining and flow cytometry were adopted to measure the cell morphology, adhesion and cell cycle **RESULTS** p38MAPK was expressed in transfected glioma cells, with cell biological characteristics changing and apoptotic cells emerging **CONCLUSION** Apoptosis of glioma cell could be induced by p38MAPK transfection

0 引言

蛋白质的磷酸化与去磷酸化是传递细胞各种信息的重要转导机制 蛋白激酶催化磷酸基团与蛋白质内特异的氨基酸共价结合 一系列的蛋白激酶及其磷酸化活化构成了信号转导级联反应 丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路是近年来研究较多的蛋白激酶通路 在真核细胞中, 已鉴定出 4 条, 即细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)通路, 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, ERK5/大丝裂素活化蛋白激酶 1(big MAP kinase, BMK1)通路和 p38MAPK 通路 它们参与了细胞生长、发育、分裂及细胞间的功能同步等多种生理过程, 并参与细胞的恶性转化等病理过程 p38MAPK 除在细胞应激、炎症反应中具有重要作用外, 也与细胞的发育、分化和凋亡密切相关 胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, p38MAPK 对其生长的调节作用尚不了解 我们将外源性 p38MAPK 基因转染大鼠胶质瘤细胞系 C6, 以期研究其对胶质瘤细胞生物学特性的影响, 为充实信号转导在胶质瘤中的作用提供理论依据

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠胶质瘤细胞系 C6 由本教研室保存 pCMV5-p38MAPK 质粒和兔抗鼠 p38MAPK 抗体由新加坡国立大学林圣彩教授惠赠 pCMV5 质粒由本校生化教研室孙强惠赠 脂质体购自 Gibco 公司 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司

1.2 基因转染 大鼠胶质瘤细胞系 C6 在含 $150 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 小牛血清的 RPM I 1640 培养液中常规培养, 细胞生长至对数期时以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板, 培养 24 h. 将 $2 \mu\text{g}$ pCMV 5-p38MAPK, $10 \mu\text{L}$ 脂质体分别溶于 $100 \mu\text{L}$ 无血清培养基, 两溶液缓慢混匀, 室温放置 30 min, 加入 0.8 mL 无血清培养基, 混匀后加入上述培养细胞内, 常规培养 4 h 后, 加入 1 mL 含 $150 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 小牛血清的培养液, 继续培养 24 h. 同法转染 pCMV 5 质粒及未转染 C6 细胞作为对照

1.3 形态学检测 转染同时制备细胞爬片, 转染后 30 h 取出, PBS 洗涤 2 次, $950 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇固定 15 min, HE 染色

1.4 免疫细胞化学染色 细胞爬片处理同上. 一抗为兔抗鼠 p38MAPK 抗体 (1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入二抗, 室温 30 min, 加入 SABC 复合物, DAB 显色, 苏木素衬染

1.5 细胞周期分析 3 组细胞各约 1×10^6 个, 经胰酶消化成单细胞悬液, PBS 洗涤 2 次, $700 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 冷乙醇固定过夜, 用 DAPI 进行染色, 于流式细胞仪进行细胞周期分析

2 结果

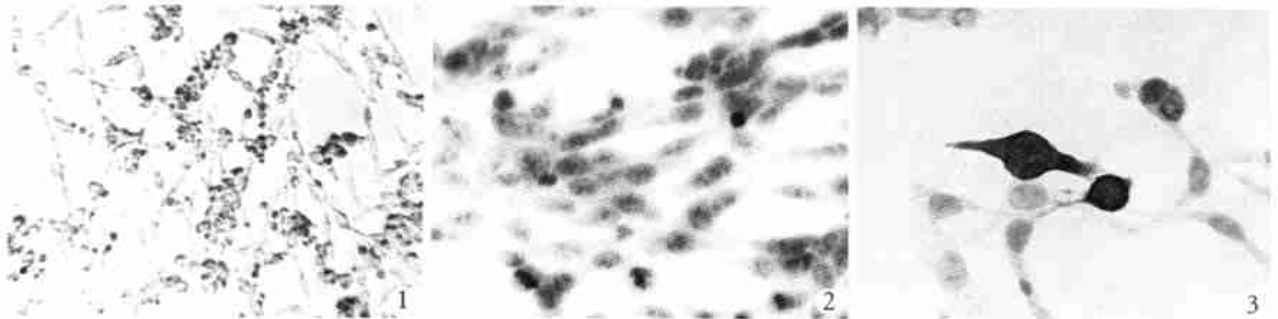


图 1 转染 pCMV 5-p38MAPK 后细胞形态发生变化

Fig 1 Changes of cell morphology after pCMV 5-p38MAPK transfection $\times 100$

图 2 转染 pCMV 5-p38MAPK 后出现凋亡细胞

Fig 2 Apoptotic cells after pCMV 5-p38MAPK transfection HE $\times 400$

图 3 转染细胞 p38MAPK 免疫组织化学染色阳性

Fig 3 p38MAPK positive signals in the transfected cells ICC $\times 400$

3 讨论

p38MAPK 通路是 1993 年发现的一类 MAPK 通路. 研究表明, 细菌脂多糖 (LPS)、紫杉醇 (taxol) 和蛋白激酶 C (PKC) 的特异激活剂 PMA 可以快速诱导某些细胞内的 p38MAPK 发生酪氨酸磷酸化^[1]. 1994 年, Han 等^[2] 首先在小鼠肝脏细胞中克隆了 p38MAPK 基因, 同时发现, p38MAPK 在小鼠巨噬

2.1 形态学检测 转染 pCMV 5-p38MAPK 质粒后, 细胞由原来的多突起形逐渐变为双极或圆形, 体积缩小, 细胞内空泡增多 (Fig 1), 贴壁性降低, 36 h 后可见部分细胞漂浮于培养液中. pCMV 5 质粒组和空白对照组无明显变化. HE 染色显示 pCMV 5 质粒组和空白对照组细胞形态一致, 可见大量核分裂象, 转染 pCMV 5-p38MAPK 质粒组核分裂象明显减少, 细胞形态改变, 密度减低, 部分细胞固缩变圆, 深染, 胞核染色质浓集, 呈环状、碎块状或新月体状, 可见胞质“出泡”现象, 此即凋亡细胞 (Fig 2).

2.2 免疫细胞化学染色 转染 pCMV 5-p38MAPK 质粒组 p38MAPK 蛋白表达阳性, 主要定位于胞质或 (和) 胞核, 凋亡细胞阳性稍强, 部分凋亡细胞胞核也可见阳性表达 (Fig 3). pCMV 5 质粒组和空白对照组均未见 p38MAPK 蛋白表达. 证实转染 pCMV 5-p38MAPK 质粒组有外源性 p38MAPK 基因的表达, 而 pCMV 5 质粒组和空白对照组则无外源性 p38MAPK 基因.

2.3 细胞周期分析 转染 pCMV 5-p38MAPK 质粒组, pCMV 5 质粒组和空白对照组 G1/G2 无明显变化, 但转染 pCMV 5-p38MAPK 质粒组出现明显凋亡峰, 凋亡细胞占总数的 34.1% (Fig 4).

细胞和淋巴细胞中均有表达. p38MAPK 通常由紫外线、高渗环境、砷盐、热休克、 H_2O_2 、细胞因子和生理应激等激活, 之后移位作用于相应的转录因子, 启动某些基因转录. ATF2, MEF2C, CHOP10 和 SAP1 等是 p38MAPK 的生理作用目标^[3].

p38MAPK 除在炎症反应中起重要作用外, 还参与细胞的增殖和分化. Sen 等^[4] 发现 L-1 和 TNF- α

可以激活胸腺细胞中的 p38MAPK, 并诱导胸腺细胞中 AP-1, NF-AT 和 NF- κ B 转录, 但不能激活 JNK/SAPK, 说明 p38MAPK 参与胸腺细胞的发育和分化。在对凋亡的调节中, p38MAPK 也发挥了重要的作用。Xia 等^[5]发现 p38MAPK 通路的激活可导致神经细胞凋亡, 而 ERK 通路的激活则抑制其凋亡。

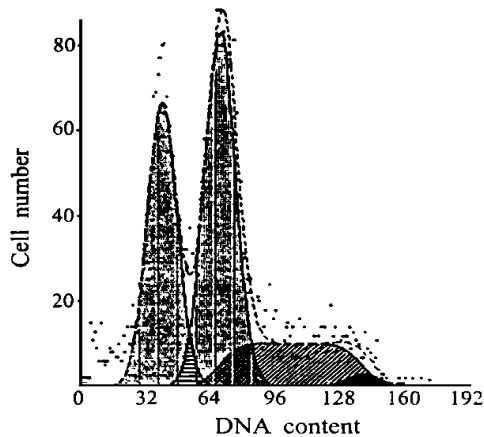


图 4 转染 pCMV 5p38MAPK 后细胞周期发生变化

Fig 4 Changes of cell cycle after pCMV 5p38MAPK transfection

p38MAPK 在肿瘤发生发展和生长周期中的作用尚不清楚。已有的研究证实 p38MAPK 在肿瘤中活性升高并能诱导凋亡的发生。对胶质瘤的研究显示, 多巴胺、高渗、内源性 δ 鸦片受体 (DOR) 及鸦片受体样受体 1 (ORL1)^[6], LPS 及肺炎球菌胞壁成分 (PCW)^[7] 等可激活 p38MAPK。Hernandez 等^[8]曾在人星形胶质瘤细胞株中发现, p38MAPK 可使 TNF- α 诱导胞质磷酸酶 A2 磷酸化, 参与维甲酸的代谢, 提示 p38MAPK 在人胶质瘤细胞中表达并发挥作用。在 PKC 特异性抑制剂 calphostin C 诱导人胶质瘤凋亡的研究中, Ozaki 等^[9]检测到 p38MAPK 的活性升高但并非 calphostin C 诱导凋亡所必需。我们利用脂质体转染的方法, 成功地将 p38MAPK 基因导入胶质瘤细胞, 发现其细胞形态和粘着状况均发生明显变化。经 HE 染色和流式细胞仪检测, 发现有典型的凋亡细胞出现。p38MAPK 诱导胶质瘤细胞凋亡的作用机制尚不清楚, 推测可能是: p38MAPK 通过转染进入胞核后, 启动某些癌基因如 *c-myc/smyc*, *c-fos*, *c-jun* 和 *fas* 等发生转录^[10]。*c-myc/smyc* 可以诱导 caspase 的表达, 后者被认为是凋亡程序的执行者; *c-myc*, *c-fos* 和 *c-jun* 则构成凋亡信号网络; *fas* 及其配体 *fasL* 是近年来受到普遍重视的介导细胞凋亡的信号转导系统。诱导某些癌基因蛋白如 p53 发生磷酸化^[11]。p53 蛋白是公认的和凋亡密切相关

的分子。增加 TNF- α 等基因转录活性^[12]。TNF- α 与其受体结合后, 以与 *fas* 受体类似的途径导致细胞凋亡。有关此方面的研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14 [J]. *J Biol Chem*, 1993; 268(33): 25009- 25014
- [2] Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells [J]. *Science*, 1994; 265(5173): 808- 811.
- [3] Janknecht R, Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap1a [J]. *EMBO J*, 1997; 16: 1620- 1627.
- [4] Sen J, Kapeller R, Frago R, Sen R, Zon LI, Burakoff SJ. Intrathymic signals in thymocytes are mediated by p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Immunol*, 1996; 156 (12): 4535- 4538
- [5] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK/p38MAP kinases on apoptosis [J]. *Science*, 1995; 270(5240): 1326- 1331.
- [6] Zhang Z, Xin SM, Wu GX, Zhang WB, Ma L, Pei G. Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C [J]. *J Neurochem*, 1999; 73(4): 1502- 1509.
- [7] Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB, Weber JR. Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen-activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes [J]. *Glia*, 1998; 22(3): 295- 305.
- [8] Hernandez M, Bayon Y, Sanchez Crespo M, Nieto ML. Signaling mechanisms involved in the activation of arachidonic acid metabolism in human astrocytoma cells by tumor necrosis factor- α : Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and transactivation of cyclooxygenase-2 [J]. *J Neurochem*, 1999; 73(4): 1641- 1649.
- [9] Ozaki I, Tani E, Ikemoto H, Kitagawa H, Fujikawa H. Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase and p38 kinase in calphostin C-induced apoptosis requires caspase-3-like proteases but is dispensable for cell death [J]. *J Biol Chem*, 1999; 274(9): 5310- 5317.
- [10] Noguchi K, Yamana H, Kitanaka C, Mochizuki T, Kokubu A, Kuchino Y. Differential role of the JNK and p38MAPK pathway in c-Myc- and s-Myc-mediated apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 267(1): 221- 227.
- [11] Keller D, Zeng X, Li X, Kapoor M, Jordanov MS, Taya Y, Lozano G, Magun B, Lu H. The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 261(2): 464- 471.
- [12] Morita Y, Naka T, Kawazoe Y, Fujimoto M, Narazaki M, Nakagawa R, Fukuyama H, Nagata S, Kishimoto T. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97 (10): 5405- 5410.

编辑 王睿