

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.005

文章编号: 1005-8982(2017)24-0022-07

p38 δ 在宫颈癌细胞中的表达及其对缺氧 HeLa 细胞凋亡的影响

沈祥丽¹, 柳怡¹, 张勇武¹, 张勇²

(1. 四川省成都市锦江区妇幼保健院 妇产科, 四川 成都 610016;

2. 四川省绵阳市中心医院 妇产科, 四川 绵阳 621000)

摘要:目的 探讨 p38 δ 在宫颈癌组织细胞和 HeLa 细胞系中蛋白表达水平及 p38 δ 对缺氧诱导 HeLa 细胞凋亡的影响。**方法** 采用蛋白印迹法检测组织及细胞蛋白表达水平。采用慢病毒转染及细胞耐药性筛选构建稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株。采用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染色法检测细胞凋亡水平。**结果** 宫颈癌细胞系 HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平低于非癌性细胞系人胚肾 293 细胞及小鼠胚胎纤维细胞, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 宫颈癌组织细胞中 p38 δ 蛋白表达水平低于正常宫颈组织细胞, 差异有统计学意义($P < 0.05$); p38 δ 过表达提高缺氧条件下 HeLa 细胞凋亡水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$); p38 δ 过表达促进缺氧条件下 HeLa 细胞中凋亡相关因子 Bcl-2 蛋白表达水平下调及 Bax、p53 蛋白表达水平上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 在宫颈癌组织细胞和宫颈癌 HeLa 细胞中, p38 δ 的蛋白表达水平降低。HeLa 细胞中高表达 p38 δ 促进缺氧细胞凋亡。

关键词: 宫颈癌; HeLa 细胞; p38 δ ; 细胞凋亡; 缺氧

中图分类号: R737.3

文献标识码: A

Role of p38 δ on hypoxia-induced apoptosis in cervical cancer cells and its effect on hypoxia-mediated apoptosis of HeLa

Xiang-li Shen¹, Yi Liu¹, Yong-wu Zhang¹, Yong Zhang²

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, Jinjiang Maternity and Child Health Hospital, Chengdu, Sichuan 610016, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics,

Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of p38 δ in cervical cancer cells and its effect on hypoxia-mediated apoptosis of HeLa cells. **Methods** The expression level of p38 δ was identified by Western blot. HeLa cell models stably expressing p38 δ were established with lentivirus system. Hypoxia-induced apoptosis in HeLa cells was measured by Annexin V-FITC/PI double labeling system. **Results** p38 δ was significantly down-regulated in cervical cancer tissues and HeLa cells compared with that in normal cervical tissues and non-tumor cell lines, respectively ($P < 0.05$). Expression of p38 δ in cervical cancer tissues was significantly lower than that in normal cervical tissues. HeLa cells stably expressing p38 δ experienced a higher hypoxia-induced apoptosis when compared with control HeLa cells ($P < 0.05$). Under hypoxia conditions, the expression levels of p53 and Bax in HeLa cells stably expressing p38 δ were significantly increased, and Bcl-2 was decreased when compared with those in control HeLa cells ($P < 0.05$). **Conclusions** p38 δ is downregulated in cervical cancer. Overexpression of p38 δ promotes hypoxia-induced apoptosis.

Keywords: cervical cancer; HeLa cells; p38 δ ; apoptosis; hypoxia

宫颈癌是危害国内外妇女身体健康的主要疾病之一。了解宫颈癌的发病机制是诊断和治疗该疾病的前提。虽然现有研究发现,多种细胞信号通路参与调控宫颈癌的发生、发展,如 FAK 信号通路、ERK-CDK2/Cyclin 信号通路等^[1-4],但是人们对宫颈癌发生、发展机制的了解还不足以有效诊断与治疗该类疾病。细胞分裂素活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase,MAPK)p38 是细胞信号传导过程中的重要蛋白激酶家族。该家族蛋白主要包括 4 个亚型,p38 α (MAPK14)、p38 β (MAPK11)、p38 γ (MAPK12)及 p38 δ (MAPK13)^[5],其中,p38 α 是目前研究最广泛的一个亚型,而人们对 p38 δ 了解还知之甚少。多项研究结果显示,p38 δ 在肿瘤的发生、发展过程中具有重要的调控作用,并且在不同的肿瘤组织中,p38 δ 对肿瘤发生、发展的调控功能不同^[6]。已有报道指出,在宫颈癌源细胞 HeLa 细胞中 p38 δ 低表达^[7]。但是 p38 δ 在宫颈癌发生、发展中的调控功能,目前国内外还没有相关的研究报道。本研究主要初步探讨宫颈癌组织中 p38 δ 的蛋白表达水平,以及利用慢病毒转染构建稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株,并进一步探讨在缺氧条件下 p38 δ 对 HeLa 细胞凋亡的影响,从而为今后宫颈癌的筛查、诊断及治疗提供新的思路与策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HeLa 细胞、人胚肾 293 细胞(human embryonic kidney 293,HEK293) 及小鼠胚胎纤维细胞(mouse embryonic fibroblast,MEF)细胞(均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库),宫颈鳞状细胞癌组织标本(10 例),2009 年国际妇产科联盟(FIGO)分期标准为 II 期,中分化、正常宫颈组织标本(10 例)(四川大学华西第二医院妇产科),杜尔伯科改良伊格尔培养基 (dulbecco modified eagle medium,DMEM)、胎牛血清、0.25%胰酶消化液(购自美国 Gibco 公司),嘌呤霉素 (puromycin)、二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒及预染蛋白 Maker (购自美国 Thermo 公司),组织蛋白提取试剂盒及细胞蛋白提取试剂盒(购自上海碧云天生物技术有限公司),p38 δ 过表达慢病毒颗粒、对照慢病毒颗粒(购自上海吉凯基因化学技术有限公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin,BSA)(购自美国 Sigma 公

司),聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride,PVDF)膜(购自美国 Millipore 公司),p38 δ 兔单克隆抗体、 β -actin 鼠单克隆抗体、Bcl-2 兔多克隆抗体、Bax 兔多克隆抗体一抗及 p53 兔单克隆抗体(购自美国 Abcam 公司),荧光标记羊抗兔荧光二抗、羊抗鼠荧光二抗及羊抗兔 Alexa Fluor[®] 488 dye、细胞免疫荧光抗荧光淬灭剂(购自美国 Thermo 公司),膜联蛋白 (Annexin)V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate,FITC)/碘化丙啶(propidium iodide,PI)双染色细胞凋亡检测试剂盒(购自南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 仪器与设备

5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),Chemi Doc MP 全能型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),Nikon 50i 正置显微镜(带高清 CCD DP72 摄像头)(日本尼康公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将细胞从 -150 $^{\circ}$ C 冰箱中取出,迅速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中解冻,然后吸入离心管,加入 3 ml 细胞培养液(10%胎牛血清 DMEM 培养液),1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,将细胞重悬于 1 ml 细胞培养液,并转移至 10 cm 细胞培养皿中,加入 8 ml 细胞培养液,混匀后放入细胞培养箱进行培养(37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳 CO₂)。每天更换 1 次培养液。

1.3.2 蛋白印迹法检测蛋白表达水平 按照蛋白提取试剂盒说明书提取组织蛋白和细胞蛋白后,采用 BCA 法测定蛋白浓度。依照 Western blot 电泳系统进行蛋白电泳和转膜。5% BSA TBST 溶液室温封闭 1 h,一抗(1:500)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。二抗(1:1 000)避光室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。采用伯乐荧光成像系统扫描拍照。利用 Image J 软件分析目的条带灰度值,目的蛋白表达水平以目的蛋白/ β -actin 比值表示。

1.3.3 慢病毒感染及耐药性细胞株筛选 将 HeLa 细胞接种于 24 孔板(3 \times 10⁴ 个/孔)。细胞培养过夜后移除培养基,每孔加入 400 μ l DMEM 培养液和 100 μ l 病毒颗粒(病毒滴度为 5 \times 10⁷ TU/ml),培养 4 h 后更换为细胞培养液继续培养。48 h 后将细胞接种于 6 孔板中培养,细胞培养液中含有 1 μ g/ml 的嘌呤霉素,直至 6 孔板中细胞克隆形成。将具有 puromycin 抗性的细胞克隆消化并接种至新的培养皿中,进行扩大培养。Western blot 及细胞免疫荧光染色鉴定 p38 δ 表达情况。

1.3.4 细胞免疫荧光染色 将对照组 HeLa 细胞或稳定表达 p38 δ HeLa 细胞接种于 24 孔板内的细胞培养玻片上(1×10^5 个/孔),细胞培养过夜。PBS 洗 1 次,4%多聚甲醛 PBS 溶液固定细胞 15 min,0.2% Triton-X-100 PBS 溶液透膜 20 min,5% BSA 封闭液封闭 1 h,p38 δ 兔单克隆抗体(1:200)室温孵育 2 h,羊抗兔 Alexa Fluor[®] 488 dye(1:1 000)室温避光孵育 1 h,DAPI(1 μ g/ml)染核 5 min,树脂封闭,荧光显微镜下观察拍照。

1.3.5 细胞缺氧处理 将对照组 HeLa 细胞或稳定表达 p38 δ HeLa 细胞接种于 24 孔板(1×10^5 个/孔),细胞正常培养过夜。然后更换细胞培养液,将缺氧处理组置入三气培养箱(5%CO₂-1%O₂-94%N₂,37 $^{\circ}$ C)中缺氧培养 24 h,对照组置入正常培养箱中培养。取出缺氧培养或正常培养后的细胞,进行蛋白提取或细胞凋亡检测。

1.3.6 Annexin V-FITC/PI 双染色检测细胞凋亡 将对照组 HeLa 细胞或稳定表达 p38 δ HeLa 细胞接种于 24 孔板(1×10^5 个/孔)。细胞经缺氧处理后,按照 Annexin V-FITC/PI 染色细胞凋亡检测试剂盒说明书收集细胞,PBS 溶液洗涤细胞 2 次。将细胞重悬于 400 μ l Binding buffer(试剂盒提供),加入 5 μ l Annexin V-FITC 及 10 μ l PI 染色液,室温染色 15 min。按照试剂盒说明书将染色后的细胞重悬于 50 μ l Binding buffer,取 5 μ l 重悬液滴于干净载玻片,扣盖盖玻片,荧光显微镜下观察并拍照,其中,Annexin V-FITC 采用波长 488 nm 激发光,PI 采用波长 568 nm 激发光。Annexin V 阳性细胞代表凋亡发生细胞。采用 Image J 软件对细胞进行计数。本实验细胞凋亡水平以 Annexin V 阳性细胞百分数表示。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p38 δ 在宫颈癌 HeLa 细胞中的表达情况

蛋白印迹法检测结果显示,非癌源细胞系 HEK293 细胞、MEF 细胞及宫颈癌 HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平分别是 (0.78 ± 0.07)、(0.81 ± 0.02)及(0.09 ± 0.02),经 *t* 检验,HEK293 细胞和 HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平差异有统计学意义($t = 22.980, P = 0.002$),HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平

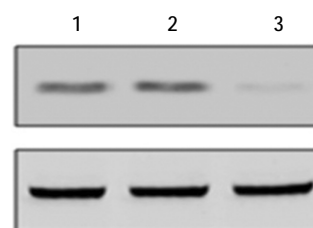
降低;同时 MEF 细胞和 HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平差异有统计学意义($t = 50.040, P = 0.000$),HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平也降低。见图 1。

2.2 p38 δ 在宫颈癌组织中低表达

蛋白印迹法结果显示,正常宫颈组织与宫颈癌组织中 p38 δ 蛋白表达水平分别是 (1.25 ± 0.09)、(0.31 ± 0.04),正常宫颈组织中 p38 δ 蛋白表达水平与宫颈癌组织中 p38 δ 蛋白表达水平经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 18.570, P = 0.000$),宫颈癌组织中 p38 δ 蛋白表达水平降低。此外,蛋白印迹结果同时显示,与正常宫颈组织比较,宫颈癌组织中 p38 α 蛋白表达水平变化不大。见图 2。

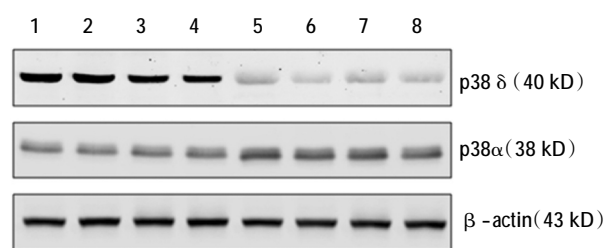
2.3 成功构建 p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株

HeLa 细胞经对照病毒颗粒(不含目的基因)和表达 p38 δ 病毒颗粒(含有 p38 δ 基因)感染后,进行嘌呤霉素耐药性克隆筛选。然后采用蛋白印迹和免疫荧光染色检测细胞中 p38 δ 表达情况。蛋白印迹



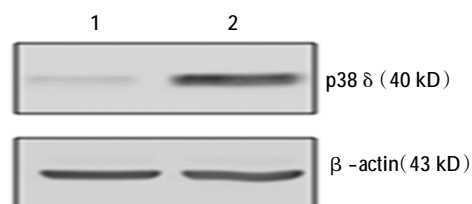
1:HEK293 细胞;2:MEF 细胞;3:HeLa 细胞

图 1 HeLa 细胞、HEK293 细胞及 MEF 细胞中 p38 δ 蛋白表达水平 (Western blot)



1~4:正常宫颈组织;5~8:宫颈癌组织

图 2 正常宫颈组织和宫颈癌组织中 p38 δ 蛋白表达水平 (Western blot)



1:对照 HeLa 细胞株;2:p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株

图 3 p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株中 p38 δ 蛋白水平 (Western blot)

法检测结果显示,p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株中 p38 δ 蛋白成功高表达,而对照细胞株中 p38 δ 蛋白表达较低(见图 3)。细胞免疫荧光染色结果显示,p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株中细胞均为 p38 δ 阳性克隆,且各个细胞间 p38 δ 蛋白表达水平均一(见图 4)。结果表明,p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株构建成功。

2.4 p38 δ 过表达对 HeLa 细胞缺氧条件下细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染色细胞凋亡检测实验

结果显示,在常氧处理条件下,对照组 HeLa 细胞株和稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株细胞凋亡水平分别是(6.99 \pm 1.21)%和(19.52 \pm 1.93)%(见图 5),经 *t* 检验,差异有统计学意义($t=23.610, P=0.002$),后者细胞凋亡水平升高;在缺氧处理条件下,对照组 HeLa 细胞株和稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株细胞凋亡水平分别是(20.37 \pm 2.47)%和(47.23 \pm 3.42)%(见图 5),经 *t* 检验,差异有统计学意义($t=8.720, P=0.013$),后者细胞凋亡水平升高。本结果表明,HeLa 细胞中过表达 p38 δ 促进细胞凋亡。

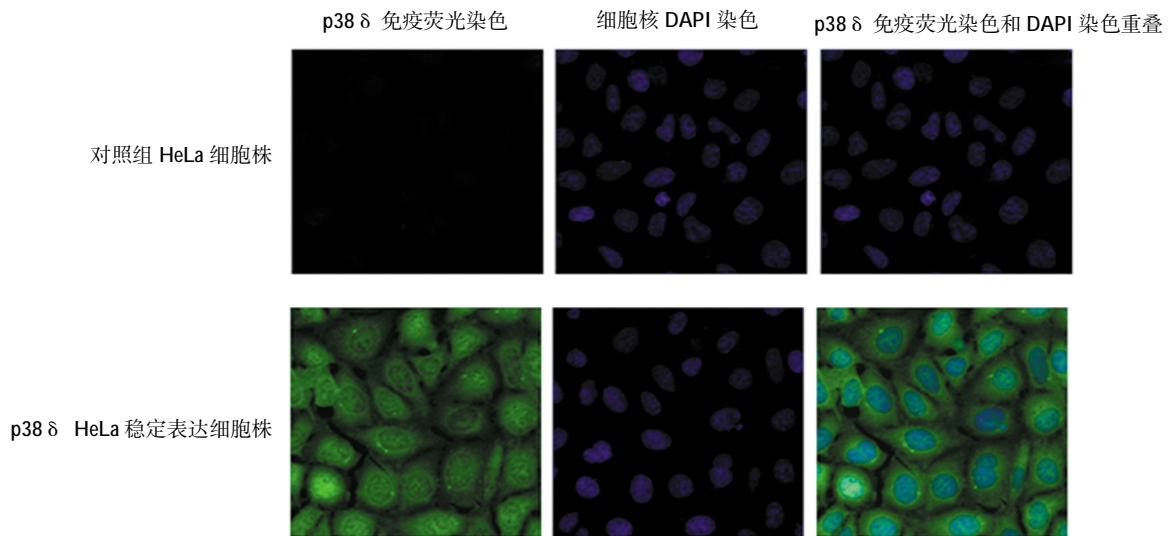
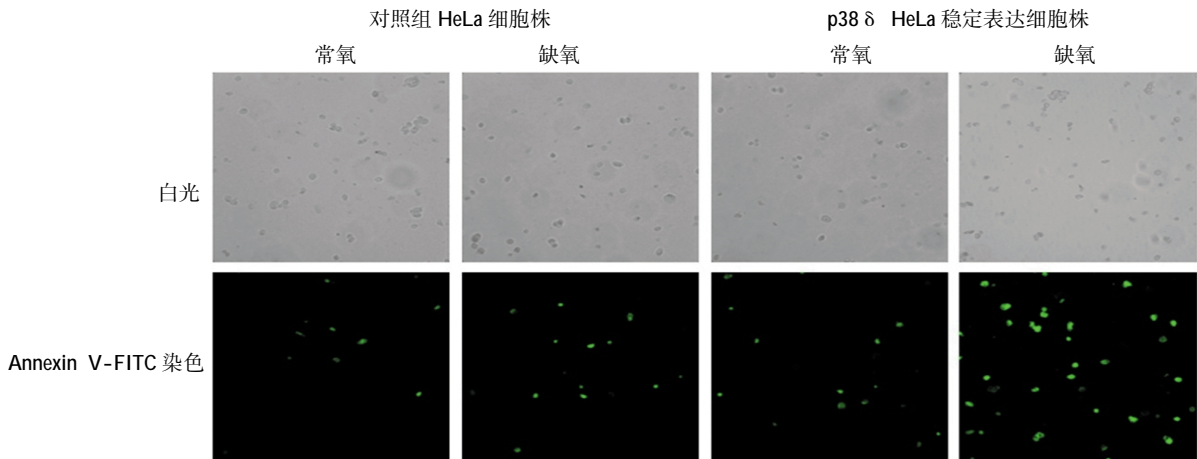


图 4 p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株中 p38 δ 蛋白表达 (细胞免疫荧光染色 \times 400)

2.5 p38 δ 过表达对 HeLa 细胞缺氧条件下 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白表达水平的影响

蛋白印迹结果显示,在常氧处理条件下,对照组 HeLa 细胞株和稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平差异不大;p53 蛋白表达水平经 *t* 检验,差异有统计学意义($P=0.003$),稳定

表达 p38 δ HeLa 细胞株中 p53 蛋白表达水平提高(见附表和图 6)。在缺氧处理条件下,对照组 HeLa 细胞株中 Bcl-2 蛋白表达水平和稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株中 Bcl-2 蛋白表达水平经 *t* 检验,差异有统计学意义($P=0.001$),稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株中 Bcl-2 蛋白表达水平上升;经 *t* 检验,稳定表达



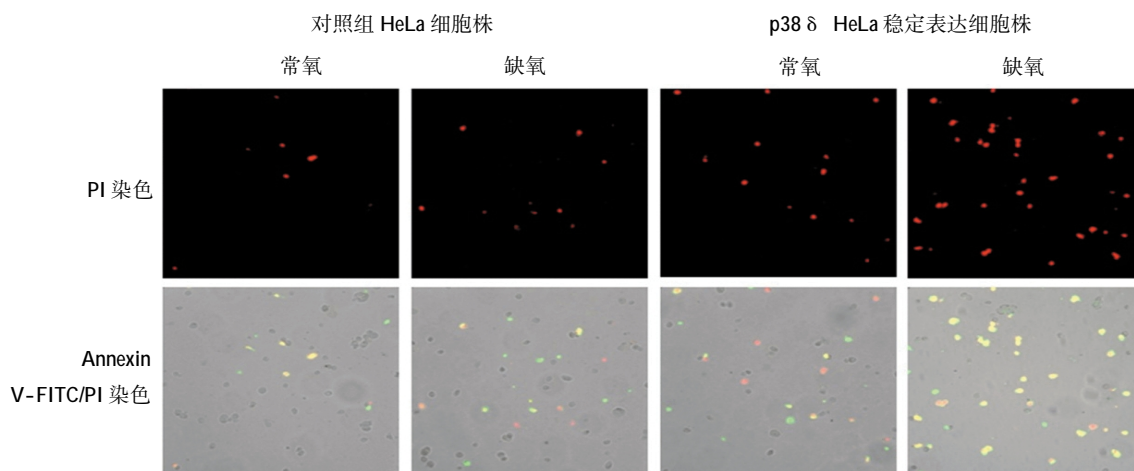


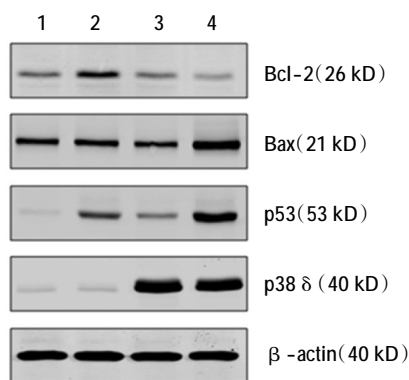
图 5 Annexin V-FITC/PI 双染色和荧光显微镜观察检测 p38 δ 过表达对缺氧 HeLa 细胞凋亡的影响 (× 200)

p38 δ HeLa 细胞株中 Bax 和 p53 蛋白表达高于对照组 HeLa 细胞株,差异有统计学意义($P < 0.01$)(见附表和图 6)。结果表明,p38 δ 可能通过调控凋亡相

关因子 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白表达水平来调控 HeLa 细胞凋亡的发生。

附表 p38 δ 过表达对缺氧条件下 HeLa 细胞中 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白表达水平的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	蛋白表达水平					
	Bcl-2(Bcl-2/ β -actin)		Bax(Bax/ β -actin)		p53(p53/ β -actin)	
	常氧	缺氧	常氧	缺氧	常氧	缺氧
对照组 HeLa 细胞株	0.34 ± 0.03	0.75 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.59 ± 0.05
稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株	0.34 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.65 ± 0.03	1.21 ± 0.01	0.32 ± 0.01	1.16 ± 0.06
t 值	0.160	29.210	4.110	64.050	11.670	18.060
P 值	0.891	0.001	0.054	0.000	0.007	0.003



1:对照组 HeLa 细胞株常氧处理;2:对照组 HeLa 细胞株缺氧处理;3:p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株常氧处理;4:p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株缺氧氧处理

图 6 p38 δ 过表达对缺氧条件下 HeLa 细胞中 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白表达水平的影响

3 讨论

p38 蛋白家族是生理病理过程中重要的中枢调控蛋白激酶,其参与多种细胞行为调控,如细胞增

殖、细胞凋亡及细胞迁移等。虽然,p38 家族蛋白之间存在高度的保守性,但是其在组织中的表达水平不尽相同,其调控功能也不尽相同。p38 α 和 p38 β 在多种组织细胞中广泛表达,而 p38 γ 和 p38 δ 的表达依赖于组织细胞的类型^[9]。在人类原发性皮肤鳞状细胞癌细胞、胆管癌细胞等肿瘤细胞中 p38 δ 高表达,并且 p38 δ 表达水平的升高和激酶活性的增强与该肿瘤的侵袭、迁移相关^[9-11];而在食管鳞状细胞癌、原发性皮肤黑色素瘤等癌细胞中 p38 δ 表达受抑制,并且进一步的研究发现在该癌细胞中 p38 δ 的低表达促进癌细胞的增殖、迁移及侵袭^[12-15]。有研究报道指出,在宫颈癌 HeLa 细胞中,p38 δ 蛋白表达水平极低^[7]。本实验发现,与非癌性细胞 HEK293、MEF 细胞相比,HeLa 细胞中 p38 δ 蛋白表达量极低,这与上述报道一致。此外,本实验还发现,在宫颈癌实体瘤组织中,p38 δ 蛋白表达水平降低。本结果说明,在宫颈癌发生、发展过程中,p38 δ 的表达受到特异性的下调。但是 p38 δ 蛋白表达水平降低的

分子机制,还需进一步的研究揭示。

p38 δ 在细胞凋亡方面具有重要的调控作用。在角质细胞中,软海绵酸可以激活 p38 δ ,并且诱导角质细胞凋亡;进一步研究证明该过程中,p38 α 和 p38 β 并不参与角质细胞凋亡的诱导^[6]。另外,在食管鳞状细胞癌中过表达 p38 δ 将会提高细胞在顺铂处理条件下的凋亡水平,从而提高细胞对顺铂的敏感性^[13]。本实验中,利用慢病毒转染技术及细胞耐药性筛选技术成功构建稳定表达 p38 δ HeLa 细胞株。进一步的研究发现 HeLa 细胞中高表达 p38 δ 促进细胞凋亡的发生。这与 p38 δ 在角质细胞、食管鳞状细胞癌细胞中调控细胞凋亡的功能一致。肿瘤细胞规避细胞凋亡的调控,是其癌化及肿瘤迁移侵袭的关键。肿瘤在发生、发展过程中,由于其生长速度及微环境的改变,肿瘤组织中供氧供血能力低于正常组织。对低氧环境的耐受,是肿瘤生长的一个重要特性^[17]。本实验发现,在低氧环境中,p38 δ 促进 HeLa 细胞凋亡的发生,说明宫颈癌细胞在生长过程中对细胞凋亡调控的耐受与 p38 δ 蛋白表达量下调有关。除细胞凋亡之外,细胞迁移与细胞侵袭也是肿瘤发生、发展的关键。宫颈癌细胞中 p38 δ 表达量的下调是否与宫颈癌细胞增殖迁移及侵袭有关,还需进一步的实验研究来揭示。

细胞凋亡是众多细胞信号通路相互作用的结果。Bcl-2 是一个主要的抗凋亡因子,其能够与促凋亡因子 Bax 相互作用,抑制 Bax 的促凋亡活性^[18]。HeLa 细胞中,顺铂、双氢青蒿素(dihydroartemisinin)、人参皂苷 Rg3(ginsenoside Rg3)对细胞凋亡的诱导依赖于 Bcl-2 基因表达水平的降低和 Bax 表达水平的上升^[19-21]。本研究发现在缺氧条件下,HeLa 细胞中过表达 p38 δ 将诱导 Bcl-2 蛋白表达量下调和 Bax 蛋白表达量上调。这与 Bcl-2/Bax 调控细胞凋亡模型一致。此外,p53 蛋白也是一个重要的细胞凋亡调控因子。在宫颈癌组织细胞中,利用腺病毒转染野生型 p53 基因,可以诱导宫颈癌细胞的凋亡,从而达到肿瘤治疗的效果^[22]。非编码 RNA VTRNA2-1-5p 可以通过作用 p53 mRNA 的非编码区,降低 p53 的表达水平,从而降低宫颈癌细胞的凋亡水平,促进宫颈癌细胞的增殖与侵袭^[23]。在 HeLa 细胞中,SIRT2 基因敲低后,将会诱导细胞凋亡的发生,在该过程中 p53 蛋白的表达水平上调,并且 p53 蛋白的积累依赖于 p38 蛋白激酶的激活^[24]。本实验发现,HeLa 细胞中过表达 p38 δ 蛋白将会诱导 p53 蛋白

表达水平的升高,且缺氧处理将会进一步诱导 p53 蛋白积累。本结果提示在常氧条件及缺氧条件下,p38 δ 调控 HeLa 细胞凋亡可能与 p53 蛋白积累有关。但对于 p38 δ 调控 Bcl-2、Bax 及 p53 蛋白表达水平的具体分子机制,还需进一步深入研究来揭示。

通过以上实验,本研究发现宫颈癌发生、发展过程中,p38 δ 的表达量特异性下调,而且 p38 δ 表达水平的这一改变,与宫颈癌细胞规避细胞凋亡相关。外源性过表达 p38 δ ,能够提高 HeLa 细胞对低氧环境的敏感度,上调细胞凋亡水平。本研究将帮助人们更好的了解 p38 δ 对细胞行为的调控功能,同时为宫颈癌的筛查、诊断及临床治疗提供新的思路与策虑。

参 考 文 献:

- [1] CHEN H, WANG D, LIU Y. SASH1 inhibits cervical cancer cell proliferation and invasion by suppressing the FAK pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3613-3618.
- [2] MING P, CAI T, LI J, et al. A novel arylbenzofuran induces cervical cancer cell apoptosis and G/S arrest through ERK-mediated Cdk2/cyclin-A signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 41843-41856.
- [3] FU L, ZHANG S, ZHANG L, et al. Systems biology network-based discovery of a small molecule activator BL-AD008 targeting AMPK/ZIPK and inducing apoptosis in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(10): 8071-8088.
- [4] 冀静,顾婷婷,郑鹏生. mTOR/P70S6K 信号通路在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 西安交通大学学报医学版, 2010, 31(1): 10-13.
- [5] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [6] O'CALLAGHAN C, FANNING L J, BARRY O P. p38 δ MAPK: emerging roles of a neglected isoform[J]. Int J Cell Biol, 2014, (2014): 272689.
- [7] YONG J, GRAM H, MING Z, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ [J]. J Biol Chem, 1997, 272(48): 30122-30128.
- [8] ONO K, HAN J. The p38 signal transduction pathway activation and function[J]. CELL SIGNAL, 2000, 12(1): 1-13.
- [9] ZUR R, GARCIAIBANEZ L, NUNEZBUIZA A, et al. Combined deletion of p38 γ and p38 δ reduces skin inflammation and protects from carcinogenesis[J]. Oncotarget, 2015, 6(15): 12920-12935.
- [10] JUNTILA M R, ALAAHO R, JOKILEHTO T, et al. p38 α Ipha and p38 δ delta mitogen-activated protein kinase isoforms reg. late invasion and growth of head and neck squamous car-

- cinoma cells[J]. *Oncogene*, 2007, 26(36): 5267-5279.
- [11] TAN F L, OOI A, HUANG D, et al. p38 δ as a diagnostic marker for cholangiocarcinoma and its involvement in cell motility and invasion[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(10): 2353-2361.
- [12] CAROL O, FANNING L J, BARRY O P. Hypermethylation of p38 δ promoter in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with loss of p38 δ MAPK expression[J]. *Cancers*, 2015, 7(4): 2124-2133.
- [13] O'CALLAGHAN C, FANNING L J, HOUSTON A, et al. Loss of p38 δ mitogen-activated protein kinase expression promotes oesophageal squamous cell carcinoma proliferation, migration and anchorage-independent growth [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43 (2): 405-415.
- [14] O'CALLAGHAN, CAROL, FANNING, et al. p38 δ MAPK phenotype: an indicator of chemotherapeutic response in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Anti-cancer drugs*, 2015, 26(1): 46-55.
- [15] GAO L, SMIT M A, OORD J J V D, et al. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK 13, in primary cutaneous melanoma [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26(4): 542-554.
- [16] KRAFT C A, EFIMOVA T, ECKERT R L. Activation of PKC delta and p38 δ MAPK during okadaic acid dependent keratinocyte apoptosis[J]. *Arch Dermatol Res*, 2007, 299(2): 71-83.
- [17] OSINSKY S, ZAVELEVICH M, VAUPEL P. Tumor hypoxia and malignant progression[J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(2): 335-354.
- [18] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.
- [19] LIU J, YANG L, ZHANG J, et al. Knock-down of NDRG2 sensitizes cervical cancer HeLa cells to cisplatin through suppressing Bcl-2 expression[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 1-8.
- [20] HU C, ZHOU L, CAI Y. Dihydroartemisinin induces apoptosis of cervical cancer cells via upregulation of RKIP and downregulation of Bcl-2[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(3): 279-288.
- [21] 熊明华. 人参皂苷 Rg3 对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 Bcl-2/bax 基因 mRNA 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(3): 34-36.
- [22] HAMADA K, ALEMANY R, ZHANG W W, et al. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (13): 3047-3054.
- [23] KONG L, HAO Q, WANG Y, et al. Regulation of p53 expression and apoptosis by valt RNA2-1-5p in cervical cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 28371-28388.
- [24] LI Y, MATSUMORI H, NAKAYAMA Y, et al. SIRT2 downregulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis[J]. *Genes Cells*, 2011, 16(1): 34-45.

(王荣兵 编辑)