

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.005

文章编号: 1005-8982(2017)24-0022-07

## p38 $\delta$ 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<sup>1</sup>, 柳怡<sup>1</sup>, 张勇武<sup>1</sup>, 张勇<sup>2</sup>

(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 $\delta$  在宫颈癌组织细胞和 HeLa 细胞系中蛋白表达水平及 p38 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  的蛋白表达水平降低。HeLa 细胞中高表达 p38 $\delta$  促进缺氧细胞凋亡。

**关键词:** 宫颈癌; HeLa 细胞; p38 $\delta$ ; 细胞凋亡; 缺氧

**中图分类号:** R737.3

**文献标识码:** A

## Role of p38 $\delta$ on hypoxia-induced apoptosis in cervical cancer cells and its effect on hypoxia-mediated apoptosis of HeLa

Xiang-li Shen<sup>1</sup>, Yi Liu<sup>1</sup>, Yong-wu Zhang<sup>1</sup>, Yong Zhang<sup>2</sup>

(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 $\delta$  in cervical cancer cells and its effect on hypoxia-mediated apoptosis of HeLa cells. **Methods** The expression level of p38 $\delta$  was identified by Western blot. HeLa cell models stably expressing p38 $\delta$  were established with lentivirus system. Hypoxia-induced apoptosis in HeLa cells was measured by Annexin V-FITC/PI double labeling system. **Results** p38 $\delta$  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 $\delta$  in cervical cancer tissues was significantly lower than that in normal cervical tissues. HeLa cells stably expressing p38 $\delta$  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 $\delta$  were significantly increased, and Bcl-2 was decreased when compared with those in control HeLa cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** p38 $\delta$  is downregulated in cervical cancer. Overexpression of p38 $\delta$  promotes hypoxia-induced apoptosis.

**Keywords:** cervical cancer; HeLa cells; p38 $\delta$ ; 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<sup>[1-4]</sup>,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 $\alpha$  (MAPK14)、p38 $\beta$  (MAPK11)、p38 $\gamma$  (MAPK12) 及 p38 $\delta$  (MAPK13)<sup>[5]</sup>, 其中, p38 $\alpha$  是目前研究最广泛的一个亚型, 而人们对 p38 $\delta$  了解还知之甚少。多项研究结果显示, p38 $\delta$  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 $\delta$  对肿瘤发生、发展的调控功能不同<sup>[6]</sup>。已有报道指出, 在宫颈癌源细胞 HeLa 细胞中 p38 $\delta$  低表达<sup>[7]</sup>。但是 p38 $\delta$  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 $\delta$  的蛋白表达水平, 以及利用慢病毒转染构建稳定表达 p38 $\delta$  HeLa 细胞株, 并进一步探讨在缺氧条件下 p38 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  兔单克隆抗体、 $\beta$ -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<sup>®</sup> 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 CO<sub>2</sub>)。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。采用百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 /  $\beta$ -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  $\times$  10<sup>4</sup> 个 / 孔)。细胞培养过夜后移除培养基, 每孔加入 400  $\mu$ l DMEM 培养液和 100  $\mu$ l 病毒颗粒 (病毒滴度为 5  $\times$  10<sup>7</sup> 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  $\mu$ 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 $\delta$  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  $\delta$  HeLa 细胞接种于 24 孔板内的细胞培养玻片上( $1 \times 10^5$  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  $\delta$  兔单克隆抗体(1:200)室温孵育 2 h,羊抗兔 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye(1:1 000)室温避光孵育 1 h,DAPI(1  $\mu$ 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  $\delta$  HeLa 细胞接种于 24 孔板( $1 \times 10^5$  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%CO<sub>2</sub>-1%O<sub>2</sub>-94%N<sub>2</sub>,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  $\delta$  HeLa 细胞接种于 24 孔板( $1 \times 10^5$  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  $\mu$ l Binding buffer(试剂盒提供),加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 及 10  $\mu$ 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  $\mu$ l Binding buffer,取 5  $\mu$ 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 $\delta$ 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  $\delta$  蛋白表达水平分别是 ( $0.78 \pm 0.07$ )、( $0.81 \pm 0.02$ )及( $0.09 \pm 0.02$ ),经 *t* 检验,HEK293 细胞和 HeLa 细胞中 p38  $\delta$  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  $\delta$  蛋白表达水平

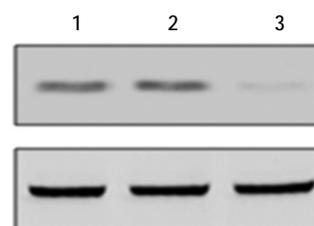
降低;同时 MEF 细胞和 HeLa 细胞中 p38  $\delta$  蛋白表达水平差异有统计学意义( $t = 50.040, P = 0.000$ ),HeLa 细胞中 p38  $\delta$  蛋白表达水平也降低。见图 1。

### 2.2 p38 $\delta$ 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  $\delta$  蛋白表达水平分别是 ( $1.25 \pm 0.09$ )、( $0.31 \pm 0.04$ ),正常宫颈组织中 p38  $\delta$  蛋白表达水平与宫颈癌组织中 p38  $\delta$  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  $\delta$  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  $\alpha$  蛋白表达水平变化不大。见图 2。

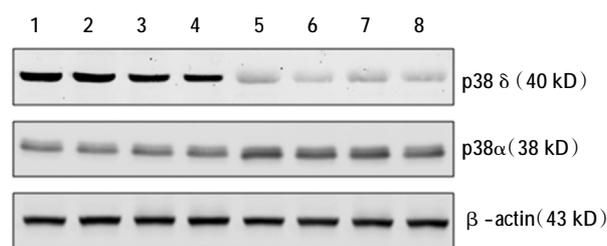
### 2.3 成功构建 p38 $\delta$ 稳定表达 HeLa 细胞株

HeLa 细胞经对照病毒颗粒(不含目的基因)和表达 p38  $\delta$  病毒颗粒(含有 p38  $\delta$  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  $\delta$  表达情况。蛋白印迹



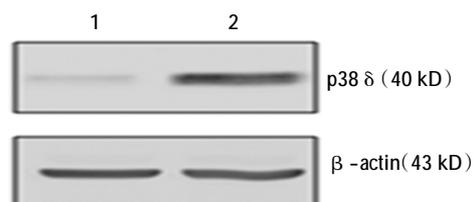
1:HEK293 细胞;2:MEF 细胞;3:HeLa 细胞

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



1:对照 HeLa 细胞株;2:p38  $\delta$  稳定表达 HeLa 细胞株

图 3 p38  $\delta$  稳定表达 HeLa 细胞株中 p38  $\delta$  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 ± 1.21)%和(19.52 ± 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 ± 2.47)%和(47.23 ± 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。

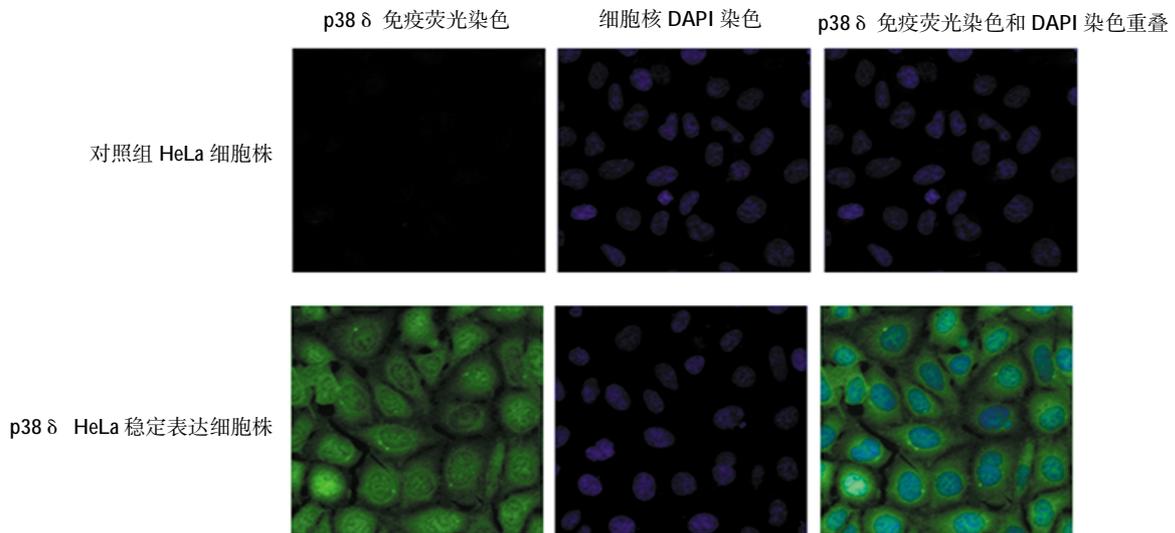
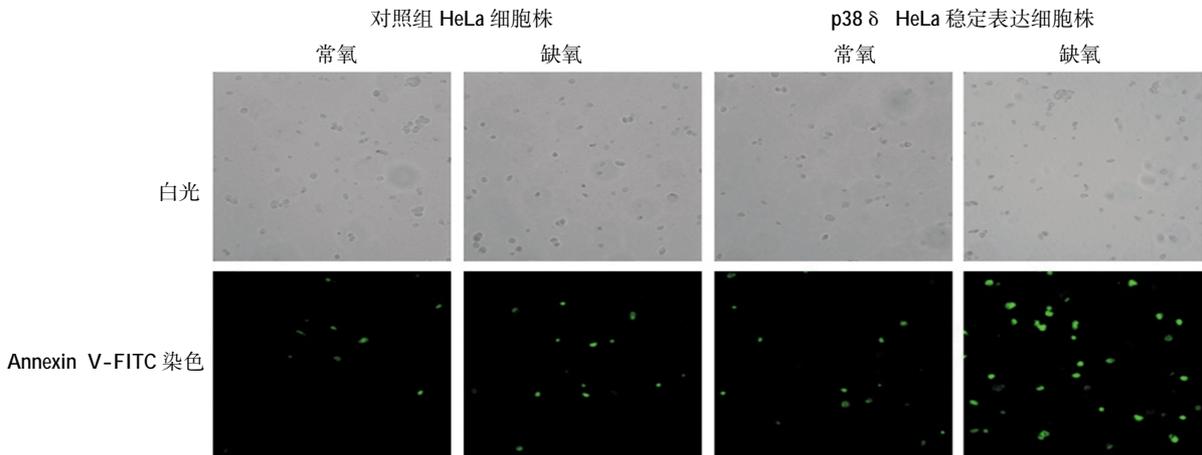


图 4 p38 δ 稳定表达 HeLa 细胞株中 p38 δ 蛋白表达 (细胞免疫荧光染色 × 400)

### 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



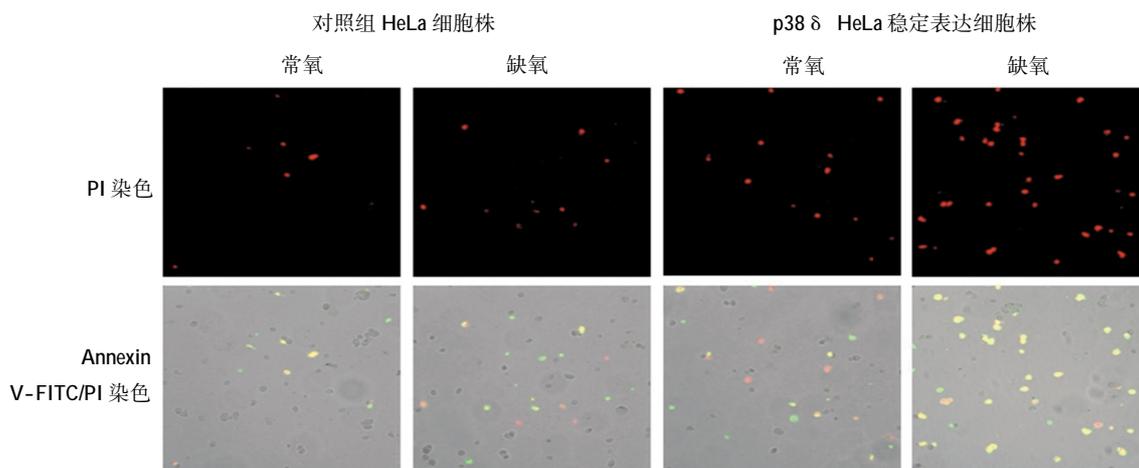


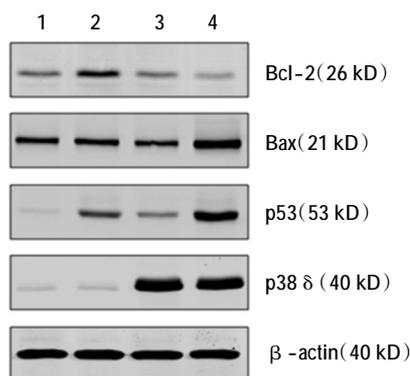
图 5 Annexin V-FITC/PI 双染色和荧光显微镜观察检测 p38  $\delta$  过表达对缺氧 HeLa 细胞凋亡的影响 (× 200)

p38  $\delta$  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  $\delta$  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  $\delta$  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/ $\beta$ -actin)		Bax(Bax/ $\beta$ -actin)		p53(p53/ $\beta$ -actin)	
	常氧	缺氧	常氧	缺氧	常氧	缺氧
对照组 HeLa 细胞株	0.34 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.05
稳定表达 p38 $\delta$ HeLa 细胞株	0.34 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01	1.16 $\pm$ 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  $\delta$  稳定表达 HeLa 细胞株常氧处理; 4: p38  $\delta$  稳定表达 HeLa 细胞株缺氧处理

图 6 p38  $\delta$  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  $\alpha$  和 p38  $\beta$  在多种组织细胞中广泛表达, 而 p38  $\gamma$  和 p38  $\delta$  的表达依赖于组织细胞的类型<sup>[9]</sup>。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  $\delta$  高表达, 并且 p38  $\delta$  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<sup>[9-11]</sup>; 而在食管鳞状细胞癌、原发性皮肤黑色素瘤等癌细胞中 p38  $\delta$  表达受抑制, 并且进一步的研究发现在该癌细胞中 p38  $\delta$  的低表达促进癌细胞的增殖、迁移及侵袭<sup>[12-15]</sup>。有研究报道指出, 在宫颈癌 HeLa 细胞中, p38  $\delta$  蛋白表达水平极低<sup>[7]</sup>。本实验发现, 与非恶性细胞 HEK293、MEF 细胞相比, HeLa 细胞中 p38  $\delta$  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  $\delta$  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  $\delta$  的表达受到特异性的下调。但是 p38  $\delta$  蛋白表达水平降低的

分子机制,还需进一步的研究揭示。

p38 $\delta$  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 $\delta$ ,并且诱导角质细胞凋亡;进一步研究证明该过程中,p38 $\alpha$  和 p38 $\beta$  并不参与角质细胞凋亡的诱导<sup>[6]</sup>。另外,在食管鳞状细胞癌中过表达 p38 $\delta$  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<sup>[13]</sup>。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 $\delta$  HeLa 细胞株。进一步的研究发现 HeLa 细胞中高表达 p38 $\delta$  促进细胞凋亡的发生。这与 p38 $\delta$  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<sup>[17]</sup>。本实验发现,在低氧环境中,p38 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  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<sup>[18]</sup>。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<sup>[19-21]</sup>。本研究发现在缺氧条件下,HeLa 细胞中过表达 p38 $\delta$  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<sup>[22]</sup>。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<sup>[23]</sup>。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<sup>[24]</sup>。本实验发现,HeLa 细胞中过表达 p38 $\delta$  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 $\delta$  调控 HeLa 细胞凋亡可能与 p53 蛋白积累有关。但对于 p38 $\delta$  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 $\delta$  的表达量特异性下调,而且 p38 $\delta$  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 $\delta$ ,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 $\delta$  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 $\delta$  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 $\delta$  [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 $\gamma$  and p38 $\delta$  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 $\alpha$  Ipha and p38 $\delta$  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  $\delta$  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  $\delta$  promoter in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with loss of p38  $\delta$  MAPK expression[J]. *Cancers*, 2015, 7(4): 2124-2133.
- [13] O'CALLAGHAN C, FANNING L J, HOUSTON A, et al. Loss of p38  $\delta$  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  $\delta$  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  $\delta$  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)