

文章编号: 1005-8982(2016)01-0024-06

论著

人 A431 皮肤鳞状细胞癌中丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶信号通路对 P53 的调节作用

郝玉琴¹, 康春义¹, 张鑫², 康淑霞², 刘侠²

(1. 内蒙古医科大学第三附属医院(包钢医院) 皮肤科, 内蒙古 包头 014010;

2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要:目的 观察丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)信号通路的活化及抑制对皮肤鳞状细胞癌(SCC)细胞增殖、凋亡情况的影响,探讨 MAPK/ERK 信号通路与抑癌基因 P53 在皮肤 SCC 中的相互作用机制。**方法** 培养人 A431 皮肤 SCC 细胞株,分为低、中、高浓度的 MAPK/ERK 通路抑制剂(PD98059+DMSO)组及激活剂(IGF+PBS)组、空白对照(DMSO)组。噻唑蓝法检测细胞体外增殖活力,流式细胞术(FCM)检测细胞的凋亡,Western blot 检测各组 A431 细胞中 P-ERK、P53 蛋白表达。**结果** 经不同浓度的抑制术 PD98059 处理 A431 细胞,细胞增殖受到抑制,呈浓度 - 效应和时间 - 效应关系($P < 0.05$);经不同浓度的激动剂胰岛素样生长因子(IGF)处理 A431 细胞,细胞增殖受到促进,呈浓度 - 效应和时间 - 效应关系($P < 0.05$)。FCM 检测结果显示,PD98059 作用于 A431 细胞,细胞凋亡率明显增高,呈浓度 - 效应关系($P < 0.05$);而 IGF 作用于 A431 细胞,细胞凋亡率明显降低,呈浓度 - 效应关系($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,PD98059 处理 A431 细胞,P-ERK 蛋白的表达降低,P53 蛋白的表达增强,随着 PD98059 浓度的增加,P-ERK 蛋白明显降低,P53 蛋白明显增强($P < 0.05$);而 IGF 处理 A431 细胞,P-ERK 蛋白的表达增强,P53 蛋白的表达降低,随着 IGF 浓度的增加,P-ERK 蛋白明显增强,P53 蛋白明显降低($P < 0.05$);经过 Pearson 相关性分析,P53 与 P-ERK 的表达呈负相关($P < 0.05$)。**结论** 人 A431 细胞中 MAPK/ERK 信号通路被 IGF 激活后,促凋亡因子 P53 表达降低,细胞增殖能力增强,凋亡能力降低;而该通路受抑制后,促凋亡因子 P53 表达增高,细胞增殖能力降低、凋亡能力增强。

关键词: 皮肤鳞状细胞癌;丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶信号通路;P53

中图分类号: R739.5

文献标识码: A

MAPK/ERK regulation of P53 in human epidermoid carcinoma cell line A431

Yu-qin Hao¹, Chun-yi Kang¹, Xin Zhang², Shu-xia Kang², Xia Liu²

(1. Department of Dermatology, Baogang Hospital, Inner Mongolia Medical College, Baotou,

Inner Mongolia 014010, China; 2. Inner Mongolia Medical College, Hohhot,

Inner Mongolia 010110, China)

Abstract: Objective To observe the impact of activation or inhibition of MAPK/ERK signaling pathway on the proliferation and apoptosis of human epidermoid carcinoma cell line A431 cells, and to investigate the interaction mechanism between MAPK/ERK signaling pathway and tumor suppression gene P53. **Methods** Human A431 cells were cultured and divided into MAPK/ERK inhibition groups of low-, medium- and high-concentration of inhibitor (PD98059 + DMSO), MAPK/ERK activation groups of low-, medium- and high-concentration of activator (IGF + PBS) and blank control group (DMSO). The in vitro cellular proliferation was detected by MTT assay, the cell apoptosis detected by flow cytometry (FCM) and the protein expression of p-ERK and p53 detected by Western blot in each group. **Results** The A431 cell proliferation was inhibited by

收稿日期: 2015-08-14

* 基金项目: 2013 年内蒙古自治区卫生和计划生育委员会医疗卫生科研计划项目(No:201303116); 国家自然科学基金(No:81264007)

• 24 •

different concentrations of inhibitor PD98059 with a clear concentration-effect and time-effect relationship ($P < 0.05$), and the cell proliferation was promoted in the different concentrations of IGF with a clear concentration-effect and time-effect relationship ($P < 0.05$). The FCM result showed a significantly increased A431 cell apoptosis rate with increased PD98059 in a concentration-effect relationship ($P < 0.05$); while the apoptosis rate decreased significantly with increased IGF also in a concentration-effect relationship ($P < 0.05$). The Western blot results showed that after PD98059 treatment the protein expression of p-ERK was reduced and the protein expression of p53 was enhanced, additionally the change of both expressions became much bigger when the concentration of PD98059 increased further with significant differences ($P < 0.05$). For the A431 cells treated by IGF, the protein expression of p-ERK was enhanced and protein expression of p53 was reduced with increasing concentrations of IGF, for which the differences were significant ($P < 0.05$) compared with the control group. The protein expressions of p-ERK and p53 were negatively correlated by Pearson correlation analysis ($P < 0.05$). **Conclusions** The activation of MAPK/ERK signaling pathway by IGF in human epidermoid carcinoma cell line A431 cells could reduce the expression of apoptosis factor p53, enhance cell proliferation capacity and reduce apoptosis capacity, while the inhibition of MAPK/ERK signaling pathway results in the increased expression of p53, decreased cell proliferation and enhanced apoptosis.

Keywords: cutaneous squamous cell carcinoma; MAPK/ERK signaling pathway; p53

恶性肿瘤的发生、发展涉及一系列信号转导分子活性的改变。其中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)信号转导通路的持续活化是人类许多肿瘤的一个显著标志,其异常活化能导致细胞丧失凋亡和分化的能力,促使细胞恶性转化,异常增殖,产生肿瘤^[1]。所以认为,靶向破坏该通路中的任何一个环节都能阻断该信号途径,抑制肿瘤细胞的增殖。本课题组及其他学者通过对某些肿瘤细胞的体内外研究却发现,肿瘤细胞经某些抗肿瘤药物治疗后,可以引起 MAPK/ERK 转导通路的活化和转录,同时启动 P53 依赖性凋亡途径,进而促进肿瘤细胞凋亡^[2-4]。因此, MAPK/ERK 转导通路与抑癌基因 P53 在恶性肿瘤中增殖、凋亡平衡中的作用值得探索,为研究 MAPK/ERK 信号转导通路提出新的挑战。目前,有关皮肤鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)中 MAPK/ERK 信号通路与 P53 作用的研究未见报道。因此,本研究通过应用 MAPK/ERK 信号通路激活剂类胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)及抑制剂 PD98059 干预人 A431 皮肤 SCC 细胞株,观察 MAPK/ERK 信号通路的活化及抑制对皮肤 SCC 细胞增殖、凋亡的影响,探讨 MAPK/ERK 信号通路与抑癌基因 P53 在皮肤 SCC 中的相互作用机制,为补充 SCC 的发生机制及治疗策略具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

IGF-1 购自深圳晶美生物工程公司, PD98059 购自美国 Promega 公司,胎牛血清、无血清细胞冻存(dulbecco modified eagle medium, DMEM)高糖培养基、胰酶及无线电免疫沉淀(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)细胞裂解液为美国 Invitrogen 公司产品, Annexin-V-FITC 细胞凋亡试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品,四甲基偶氮唑蓝购于美国 Sigma 公司,兔抗鼠 p53(BA0521)及 P-ERK 一抗为武汉博士德生物工程有限公司产品,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒为美国 Amersham Life Sciences 公司产品,96 孔反应板购自德国 Roche 公司。

1.2 细胞培养

人 A431 皮肤 SCC 细胞株 [购于南通百奥迈科(Biomics)生物技术有限公司,货号:CRL-1555,来源于美国 ATCC 公司]贴壁培养于 DMEM(高糖型)完全培养基(含 10%小牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)中,置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%二氧化碳 CO₂ 培养箱内培养,每 1~2 d 换液 1 次,细胞单层贴壁生长,待长满瓶底时,用 0.25%胰蛋白酶消化液消化成单个细胞,取对数生长期的细胞准备实验。

1.3 试验方法

实验分为低、中、高浓度的抑制剂(PD98059+

DMSO)组及激活剂(IGF+PBS)组、空白对照(DMSO)组。抑制剂组 PD98059 浓度依次为 25、50 及 100 $\mu\text{mol/L}$; 激活剂组 IGF 浓度依次为 40、80 及 120 ng/ml 。

1.3.1 噻唑蓝比色法检测细胞体外增殖活力 取处于对数生长期、生长状态良好的 A431 细胞以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔培养基体积 200 μl 。待 A431 细胞贴壁 24 h 后,将不同浓度的药物 PD98059 或 IGF 加入 A431 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养至 24、48 及 72 h,每孔加 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,弃上清液,每孔加 150 μl DMSO,振荡 10 min,酶标仪测 490 nm 各孔光吸收值 OD,实验重复 3 次,取 3 次结果的平均值,记录结果,以未加药细胞组作为空白对照组,计算细胞增殖抑制率/存活率,增殖抑制率(proliferation inhibitory rate,PIR)=(1- 药物组 OD/ 对照组 OD) \times 100%;存活率(survival rate,SR)= 药物组 OD/ 对照组 OD \times 100%,对照组 SR 为 100%。

1.3.2 流式细胞术(flow cytometry,FCM)检测细胞凋亡 取生长状态良好的 A431 细胞加入 PD98059 或 IGF 药物 48 h 后进行流式凋亡检测,独立实验 3 次。具体步骤如下:各组细胞经 0.2%胰酶处理,离心收集细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤 2 次,调节其浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取 100 μl 细胞悬浮于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide,PI)混匀,于室温避光孵育 15 min。随后重悬于 400 μl PBS,400 目筛网过滤,加样于流式细胞仪检测细胞凋亡。激发波长 Ex=488 nm,发射波长 Em=530 nm。获得细胞凋亡数据后用 ModFit LT 软件进行细胞凋亡相对定量分析。

1.3.3 凋亡相关因子的测定 采用 Western blot 检测 P53、P-ERK 蛋白的表达,取生长状态良好的 A431

细胞加入 PD98059 或 IGF 药物 48 h 后进行 Western blot 检测。RIPA 细胞裂解液抽提各组细胞总蛋白,按 BCA 试剂盒说明书操作步骤测定总蛋白含量后分装,置入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻待用。分别取 50 μg 各组蛋白,煮沸 10 min 变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离,电泳结束后,通过电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜在含 10%脱脂奶粉的 PBST 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜后,PBST 充分漂洗(10 min \times 3 次),分别加入兔抗鼠 P53、P-ERK(1 : 300 稀释)和兔抗鼠 β -actin 抗体(1 : 800 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,PBST 充分漂洗(10 min \times 3 次),加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1 : 1 000 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,PBST 充分漂洗(10 min \times 3 次)后,化学荧光法(ECL 试剂盒,美国 Amersham Life Sciences 公司产品)显色,利用 Image J 灰度分析软件对 Western blot 检测结果作半定量分析。每份样品均设 3 个重复。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间数据的比较用方差分析及 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAPK/ERK 信号通路的活化或抑制对细胞增殖的作用

MTT 结果显示,不同浓度的 MAPK/ERK 通路抑制剂 PD98059 处理不同时间的 A431 细胞,细胞增殖均受抑制。随着 PD98059 浓度的增加和作用时间的延长,PIR 逐渐增加,呈浓度-效应和时间-效应关系

表 1 PD98059 对 A431 细胞增殖抑制率的作用

PD98059 浓度	24 h		48 h		72 h	
	OD	PIR/%	OD	PIR/%	OD	PIR/%
0 $\mu\text{mol/L}$	0.521 \pm 0.008	0	0.674 \pm 0.024	0	0.881 \pm 0.036	0
25 $\mu\text{mol/L}$	0.428 \pm 0.004	17.83 \pm 0.51 [†]	0.469 \pm 0.014	30.32 \pm 0.45 [†]	0.420 \pm 0.010	52.27 \pm 1.26 [†]
50 $\mu\text{mol/L}$	0.401 \pm 0.006	23.04 \pm 0.37 [†]	0.386 \pm 0.017	42.66 \pm 0.65 [†]	0.328 \pm 0.017	62.78 \pm 0.68 [†]
100 $\mu\text{mol/L}$	0.329 \pm 0.024	36.86 \pm 3.63 [†]	0.232 \pm 0.026	65.69 \pm 2.70 [†]	0.197 \pm 0.007	77.59 \pm 0.26 [†]
F 值	205.105		1132.190		6507.833	
P 值	0.000		0.000		0.000	

注:† 与对照组比较, $P < 0.05$

表 2 IGF 对 A431 细胞存活率的作用

IGF 浓度	24 h		48 h		72 h	
	OD	SR/%	OD	SR/%	OD	SR/%
0 ng/ml	0.447 ± 0.058	100	0.648 ± 0.082	100	0.816 ± 0.067	100
40 ng/ml	0.462 ± 0.058	103.53 ± 1.90 [†]	0.711 ± 0.083	109.79 ± 2.92 [†]	0.990 ± 0.074	121.29 ± 1.14 [†]
80 ng/ml	0.486 ± 0.057	108.84 ± 1.34 [†]	0.803 ± 0.098	124.04 ± 3.09 [†]	1.1656 ± 0.078	142.89 ± 2.12 [†]
120 ng/ml	0.514 ± 0.057	115.18 ± 2.25 [†]	0.887 ± 0.077	137.41 ± 5.60 [†]	1.378 ± 0.059	169.18 ± 9.16 [†]
F 值	3 450.039		961.224		748.993	
P 值	0.000		0.000		0.000	

注:† 与对照组比较, P<0.05

(P<0.05)。见表 1。

经不同浓度的 MAPK/ERK 通路激动剂 IGF 处理不同时间的 A431 细胞, 可促进细胞增殖。随着 IGF 浓度的增加和作用时间的延长, SR 逐渐增加, 呈浓度 - 效应和时间 - 效应关系 (P<0.05)。见表 2。

2.2 MAPK/ERK 信号通路的活化或抑制对细胞凋亡的作用

FCM 检测结果显示, MAPK/ERK 通路抑制剂 PD98059 作用于 A431 细胞, 细胞凋亡率明显增高, 随着药物浓度的增加, 凋亡率明显增加, 呈浓度 - 效应关系, 各组与空白对照组比较, 差异有统计学意义 (P<0.05); 而 MAPK/ERK 通路激动剂 IGF 作用于 A431 细胞, 细胞凋亡率明显降低, 随着药物浓度的增加, 凋亡率明显降低, 呈浓度 - 效应关系, 其中中剂量、高剂量组与对照组比较, 差异有统计学意义

表 3 PD98059/IGF 诱导 A431 细胞凋亡

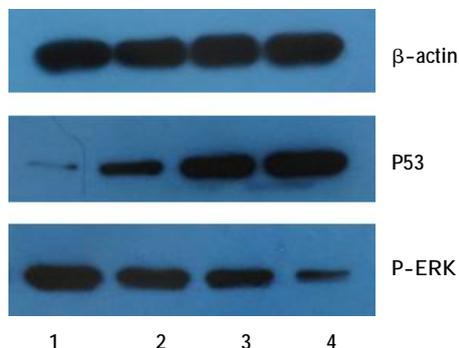
项目	凋亡率
PD98059	
0 μmol/L	19.33 ± 4.08
25 μmol/L	25.90 ± 0.46 [†]
50 μmol/L	33.87 ± 2.89 [†]
100 μmol/L	39.40 ± 1.95 [†]
F 值	32.155
P 值	0.000
IGF	
0 ng/ml	19.33 ± 4.08
40 ng/ml	16.13 ± 2.12
80 ng/ml	12.40 ± 1.75 [†]
120 ng/ml	9.40 ± 0.87 [†]
F 值	9.019
P 值	0.000

注:† 与对照组比较, P<0.05

(P<0.05)。见表 3。

2.3 相关凋亡因子 P53、P-ERK 蛋白的表达

2.3.1 Western blot 检测各抑制剂组 P-ERK、P53 蛋白的表达 经不同浓度的 MAPK/ERK 通路抑制剂 PD98059 处理 A431 细胞, P-ERK 蛋白的表达均降低, P53 蛋白的表达均增强。随着 PD98059 浓度的增加, P-ERK 蛋白明显降低, P53 蛋白明显增强, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($F_{P-ERK} = 82.376$, $F_{P53} = 737.821$, P<0.05)(见图 1 和表 4)。



1: 空白组; 2: PD98059 低浓度组; 3: PD98059 中浓度组; 4: PD98059 高浓度组

图 1 PD98059 各抑制剂组 P53 和 P-ERK 蛋白的表达

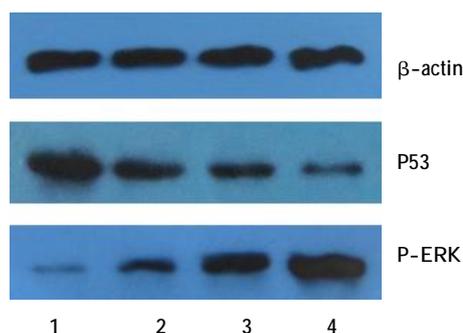
表 4 不同浓度 PD98059 对 A431 细胞 P-ERK、P53 蛋白表达的作用 (x ± s)

PD98059	P-ERK/β-actin 蛋白的表达	P53/β-actin 蛋白的表达
0 μmol/L	0.887 ± 0.070	0.155 ± 0.006
25 μmol/L	0.725 ± 0.037 [†]	0.436 ± 0.014 [†]
50 μmol/L	0.548 ± 0.066 [†]	0.843 ± 0.134 [†]
100 μmol/L	0.247 ± 0.018 [†]	0.998 ± 0.038 [†]
F 值	82.376	737.821
P 值	0.000	0.000

注:† 与对照组比较, P<0.05

2.3.2 Western Blot 法检测各激动剂组 P-ERK、P53 蛋白的表达 经不同浓度的 MAPK/ERK 通路激动剂 IGF 处理 A431 细胞, P-ERK 蛋白的表达均增强, P53 蛋白的表达均降低。随着 IGF 浓度的增加, P-ERK 蛋白明显增强, P53 蛋白明显降低, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($F_{P-ERK} = 534.577, F_{P53} = 174.292, P < 0.05$) (见图 2 和表 5)。

2.3.3 各组 A431 细胞中 P53 与 P-ERK 蛋白表达的相关性分析 通过观察发现, PD98059 处理 A431 细胞, 随 P-ERK 蛋白表达的降低, P53 蛋白的表达升高, 经过 Pearson 相关性分析, P53 与 P-ERK 的表达呈负相关 ($r_{PD98059} = -0.955, P_{PD98059} = 0.040$)。IGF 处理 A431 细胞, 随 P-ERK 蛋白表达的升高, P53 蛋白的表达降低, 经过 Pearson 相关性分析, P53 与 P-ERK 的表达呈负相关 ($r_{IGF} = -0.987, P_{IGF} = 0.010$)。



1: 空白组; 2: IGF 低浓度组; 3: IGF 中浓度组; 4: IGF 高浓度组

图 2 IGF 各激动剂组 P53 和 P-ERK 蛋白的表达

表 5 不同浓度 IGF 对 A431 细胞 P-ERK、P53 蛋白表达的作用 ($\bar{x} \pm s$)

IGF	P-ERK/ β -actin 蛋白的表达	P53/ β -actin 蛋白的表达
0 ng/ml	0.138 \pm 0.017	0.785 \pm 0.039
40 ng/ml	0.416 \pm 0.032 [†]	0.521 \pm 0.044 [†]
80 ng/ml	0.641 \pm 0.029 [†]	0.328 \pm 0.029 [†]
120 ng/ml	0.909 \pm 0.016 [†]	0.208 \pm 0.006 [†]
F 值	534.577	174.292
P 值	0.000	0.000

注: [†] 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤的发生、发展与诸多因素相关, 而细胞凋亡能力的异常降低与增殖能力的异常增强是其中一个关键因素。MAPK/ERK 信号转导通路是将细胞

表面信号转导至细胞核的重要传递者, 在多数细胞的增生和程序化死亡的调节中具有重要意义。

本研究应用 MAPK/ERK 信号转导通路激动剂 IGF 作用于皮肤鳞癌 A431 细胞, P-ERK 蛋白的表达升高, 随 IGF 浓度的升高, P-ERK 蛋白升高的更加明显, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而使用 MAPK/ERK 信号转导通路抑制剂 PD98059 作用于 A431 细胞, P-ERK 蛋白的表达降低, 随着 PD98059 浓度的升高, P-ERK 蛋白明显降低, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。该结果验证 IGF、PD98059 可以分别做为 MAPK/ERK 信号通路的激动剂、抑制剂用于后续的实验。

本实验应用不同浓度 MAPK/ERK 转导通路激动剂 IGF 及抑制剂 PD98059 作用于皮肤鳞癌 A431 细胞中, 采用噻唑蓝及流式细胞术检测细胞的增殖及凋亡情况, 结果显示, IGF 促使 MAPK/ERK 传导通路活化后, 可使 A431 细胞增殖能力增强, 凋亡能力降低, 且随着 IGF 浓度的增加和作用时间的延长, 细胞存活率逐渐升高, 凋亡率逐渐降低, 呈浓度 - 效应和时间 - 效应关系; PD98059 促使 MAPK/ERK 传导通路抑制后, 可使 A431 细胞增殖能力降低, 凋亡能力增强, 并且随着 PD98059 浓度的增加和作用时间的延长, 细胞增殖抑制率和凋亡率逐渐升高, 呈浓度 - 效应和时间 - 效应关系。该结果与其他研究者在其他肿瘤中的研究结果一致, 即 MAPK/ERK 信号转导通路的持续活化可使 SCC 细胞丧失凋亡和分化的能力, 异常增殖, 产生肿瘤, 而抑制该通路的活化可以使 SCC 细胞增殖抑制, 凋亡能力增强, 抑制肿瘤生长。

由于许多肿瘤组织中可检测到 p-ERK 表达水平的增高^[1], 所以, 目前在临床恶性肿瘤的化疗中, 有许多药物是通过抑制 ERK 的活化来抑制肿瘤的生长。如用全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid/A-TRA) 处理乳腺癌细胞系 SKBR-3 后, ERK 的磷酸化水平降低, 导致 SKBR-3 细胞的细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 从而抑制 SKBR-3 乳腺癌细胞的生长^[2]。又比如, Lin 等^[3]通过对人类结肠癌 HT-29 细胞系的研究发现, 番茄红素通过抑制 P-ERK 的活化从而抑制基质金属蛋白酶 -7 (matrix metalloproteinase, MMP-7) 的表达及 HT-29 细胞侵袭。而 Chang 等^[4]研究发现, Mesothelin 蛋白在卵巢癌中高表达且与预后不良相关, Mesothelin 可以通过活化 MAPK/ERK 通路,

上调 MMP-7 的表达,从而增强卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力。在体外实验中,通过应用 ERK1/2 抑制剂可以抑制 MMP-7 的表达。在动物体内实验中,小鼠应用 MAPK/ERK 抑制剂,可以减少肿瘤组织中 MMP-7 的表达,延缓肿瘤的生长,延长小鼠的生存期。所以 Chang 等^[10] 研究者认为,通过阻断 Mesothelin 相关的 MAPK/ERK 信号途径的转导对于卵巢癌的治疗具有重大意义。此外,MAPK/ERK 通路抑制剂 PD-0325901 的一期药代动力学及药效学研究已应用于晚期癌症患者^[11]。

野生型 p53 作为一种经典的抑癌基因,通过下调凋亡因子 Bcl-2,上调促凋亡因子 Bax,使 Bcl-2/Bax 比值下降,降低线粒体的跨膜电位,从而激活凋亡执行因子 caspase-3 引起细胞凋亡。

本实验 Western blot 检测结果显示,使用 MAPK/ERK 信号传导通路激动剂 IGF 作用于 A431 细胞,P53 蛋白的表达降低,随着 IGF 浓度的升高,P53 蛋白明显降低,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而使用 MAPK/ERK 信号传导通路抑制剂 PD98059 作用于 A431 细胞,P53 蛋白的表达升高,随着 PD98059 浓度的升高,P53 蛋白明显升高,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。且在激动剂各组及抑制剂各组中 P-ERK 的表达与 P53 的表达呈负相关。Western blot 检测结果结合本实验 MTT 及流式细胞术结果,笔者认为,在皮肤 SCC 中,P-ERK 维持在一定的水平,当 IGF 使 MAPK/ERK 信号通路进一步活化后,促凋亡因子 P53 蛋白水平降低,诱导细胞分化和凋亡的功能受抑,细胞异常增殖,产生肿瘤;反之,当使用 PD98059 阻断 MAPK/ERK 信号通路的活化,促凋亡因子 P53 蛋白水平增高,诱导细胞分化和凋亡,抑制肿瘤生长。

所以,明确皮肤 SCC 中 MAPK/ERK 信号通路与抑癌基因 P53 的相互作用机制,对于补充 SCC 的发生机制及治疗策略具有重要意义。

参 考 文 献:

- [1] Aebersold Dm, Burri P, Beer Kt, et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 2911-2916.
- [2] Lin HY, Tang HY, Davis FB, et al. Resveratrol and apoptosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1215(1): 79-88.
- [3] Shih A, Davis FB, Lin HY, et al. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK-and p53-dependent mechanism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(3): 1223-1232.
- [4] Lin C, Crawford DR, Li S, et al. Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(1): 19-26.
- [5] She QB, Bode AM, Ma WY, et al. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1604-1610.
- [6] 郝玉琴,黄维星,宁晓洪. MAPK/ERK 信号转导通路在白藜芦醇抑制人皮肤鳞状细胞癌 A431 裸鼠移植瘤生长中的作用机制研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2013, 46(4): 248-252.
- [7] Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms of providing signaling specificity [J]. J Cell Sci, 2005, 118 (14): 2997-3002.
- [8] Nakagawa S, Fujii T, Yokoyama G, et al. Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase [J]. Mol Carcinog, 2003, 38(3): 106-116.
- [9] Lin MC, Wang FY, Kuo YH, et al. Cancer chemopreventive effects of lycopene: suppression of MMP-7 expression and cell invasion in human colon cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(20): 11304-11318.
- [10] Chang MC, Chen CA, Chen PJ et al. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways [J]. Biochem J, 2012, 442 (2): 293-302.
- [11] Lorusso PM, Krishnamurthi SS, Rinehart JJ, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral MAPK/ERK kinase inhibitor PD-0325901 in patients with advanced cancers[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(6): 1924-1937.

(王荣兵 编辑)