

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.003

MAPK 信号通路调控子宫内膜癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

翁亚茜, 鲍伟杰, 梁瑞敏, 常子涛

(鹤壁市人民医院病理科, 河南 鹤壁 458030)

[摘要] 目的: 探讨丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路对人子宫内膜癌细胞HEC-1-B增殖、侵袭和迁移的影响。方法: 体外培养人子宫内膜癌细胞HEC-1-B, 采用MTT法检测增殖能力, 流式细胞仪检测细胞周期, Transwell试验检测细胞侵袭能力, 划痕试验检测细胞迁移能力, Western印迹法检测细胞中磷酸化的p38丝裂原活化蛋白激酶(p-p38MAPK)、增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)蛋白表达水平的影响。结果: p38MAPK信号通路抑制剂SB203580对子宫内膜癌细胞HEC-1-B的增殖具有抑制作用, 且随着作用浓度的升高抑制作用增强($P<0.05$)。与对照组比, 施加抑制剂SB203580能够导致 G_0/G_1 期HEC-1-B细胞比例增多, S期和 G_2/M 期细胞比例减少, 细胞侵袭抑制率升高, 细胞划痕愈合率降低, 细胞中p-p38MAPK, PCNA, MMP-2蛋白表达下调, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。且抑制剂SB203580组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论: 抑制MAPK信号通路能够抑制人子宫内膜癌细胞HEC-1-B细胞增殖、侵袭和迁移, 其作用机制可能与下调细胞中PCNA, MMP-2蛋白表达有关。

[关键词] MAPK信号通路; 子宫内膜癌细胞; 增殖; 侵袭; 迁移

MAPK signaling pathway regulates proliferation, invasion and migration of endometrial carcinoma cells

WENG Yahan, BAO Weijie, LIANG Ruimin, CHANG Zitao

(Department of Pathology, People's Hospital of Hebi, Hebi Henan 458030, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway on proliferation, invasion and migration of human endometrial cancer cell line HEC-1-B. **Methods:** Human endometrial cancer cell line HEC-1-B was cultured in vitro. The proliferation of HEC-1-B cells was detected by MTT assay. The cell cycle of HEC-1-B was detected by flow cytometry. Transwell assay detects the invasive ability of HEC-1-B cells. The scratch test examined the migration ability of HEC-1-B cells. Western blot analysis of p-p38MAPK, PCNA and MMP-2 protein expression levels in cells. **Results:** p38MAPK signaling pathway inhibitor SB203580 inhibited the proliferation of endometrial cancer cell line HEC-1-B, and the inhibitory effect increased with the increase of concentration ($P<0.05$). Compared with the control group, the application of the inhibitor SB203580 resulted in an increase in the proportion of G_0/G_1 phase HEC-1-B cells, a decrease in

收稿日期 (Date of reception): 2018-09-27

通信作者 (Corresponding author): 翁亚茜, Email: 2123692743@qq.com

the proportion of cells in the S phase and the G₂/M phase, an increase in the inhibition rate of cell invasion, and a decrease in the rate of cell scratch healing. The expression of p-p38MAPK, PCNA and MMP-2 protein was down-regulated, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The difference between the inhibitors of SB203580 was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Inhibition of MAPK signaling pathway can inhibit the proliferation, invasion and migration of human endometrial carcinoma HEC-1-B cells, and its mechanism may be related to down-regulation of PCNA and MMP-2 protein expression.

Keywords MAPK signaling pathway; endometrial cancer cells; proliferation; invasion; migration

子宫内膜癌又称子宫体癌, 是起源于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤, 好发于绝经后和围绝经期的女性, 是女性生殖系统恶性肿瘤之一^[1]。子宫内膜癌的发病率近年来在全球范围内呈升高趋势, 严重威胁着女性健康和生命。关于子宫内膜癌内在发病机制目前尚不十分清楚^[2]。目前治疗子宫内膜癌的原则是早期以手术为主, 进展期以手术、放射治疗(以下简称放疗)以及化学药物治疗(以下简称化疗)等综合治疗为主, 但进展期患者癌细胞往往发生转移导致治疗效果欠佳^[3]。因此研究子宫内膜癌的发病机制以及寻找新的治疗方法对子宫内膜癌的治疗具有重要意义^[4]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路是目前研究较多且最透彻的信号通路之一, 参与多数生物细胞的增殖、分化、发育、凋亡等生理和病理过程^[5]。p38MAPK信号通路是MAPK家族重要成员之一, 在多种肿瘤中异常激活, 能够调控细胞增殖、凋亡、细胞周期进展以及侵袭和迁移等生物学过程, 参与肿瘤的发生和发展^[6-8]。研究^[9-10]显示: 多种因素能够激活子宫内膜癌中MAPK信号通路, 促进子宫内膜癌的发病及进展。本实验通过施加p38MAPK信号通路特异性抑制剂抑制子宫内膜癌HEC-1-B细胞中MAPK信号通路, 观察该通路对HEC-1-B细胞增殖、侵袭和迁移的影响, 并对其作用机制进行初步探讨, 为临床上治疗子宫内膜癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人子宫内膜癌细胞HEC-1-B购自上海安妍生物有限公司; DMEM培养基、p38MAPK信号通路抑制剂SB203580购自美国Sigma公司; 胰蛋白酶购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; CCK-8检测试剂盒购自日本化学研究所; 碘化吡啶 (PI)和Rnase A购自上海源叶生

物科技有限公司; Transwell小室购自美国Corning公司; Matrigel基底膜胶购自美国BD公司; BCA蛋白定量检测试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; ELC发光检测试剂盒购自日本TaKaRa公司; p-p38MAPK抗体购自美国Novus Biologicals公司; 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体、MMP-2抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国CST公司。

1.2 细胞培养

人子宫内膜癌细胞HEC-1-B培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 其中含浓度为100 U/mL的青霉素和浓度为100 U/mL的链霉素, 置于体积分数为5%的CO₂饱和湿度的37 °C恒温培养箱中培养。根据细胞生长状态定期换液, 待细胞融合率达80%时以胰蛋白酶进行消化传代培养。取对数增殖期的细胞用于后续实验。

1.3 CCK-8 检测细胞增殖能力

以对数生长期的HEC-1-B细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度, 接种于96细胞培养板中, 接种细胞数为 8×10^3 个/孔, 置于37 °C, 5%CO₂培养箱中过夜培养。细胞贴壁生长后, 用微量移液器吸去细胞培养液, 向每孔细胞分别添加含终浓度为0, 5, 10, 20 μmol/L SB203580的培养液, 每组浓度设置5个复孔。置于5% CO₂, 37 °C培养箱中培养48 h, 向每孔细胞中加10 μL CCK-8试剂, 置37 °C培养箱孵育2 h, 用酶标仪检测在波长为490 nm处吸光度值。统计细胞增殖抑制率, 增殖抑制率=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。

1.4 流式细胞仪检测 SB203580 对细胞周期的影响

用0.25%胰蛋白酶消化对数生长期HEC-1-B细胞, 以DMEM培养基重悬细胞制成浓度为 1×10^5 /mL的细胞悬液。吸取1 mL细胞悬液种植在96孔板中, 置于37 °C培养箱中继续培养, 待HEC-1-B细

胞接近融合密度时, 除去细胞培养上清液, 添加含终浓度为5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ SB203580的培养液, 对照组添加等量不含SB203580的培养液。置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养48 h, 分别收集各组细胞, 以预冷的70%乙醇置4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固定12 h。去除固定液, 用PBS洗涤细胞2次, 以PBS重悬细胞, 加入15 μL 浓度为10 mg/mL的Rnase A溶液后混匀, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育30 min, 再加入PI染液混匀, 避光孵育30 min, 以300目滤网过滤细胞, 将过滤的细胞用流式细胞仪分析细胞周期细胞所占比例。实验重复3次, 取平均值。

1.5 Transwell 试验检测细胞侵袭能力

在超净工作台中将稀释过的Matrigel基质胶包被Transwell小室的上室基底膜, 保证基质胶胶面平整, 铺胶结束后风干备用。对数生长期的HEC-1-B细胞分别以不含血清含0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ SB203580的培养基制备单细胞悬液, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。分别取各组细胞悬液200 μL 加入到Transwell小室的上室, 下室加入500 μL 含20%胎牛血清的培养基。每组设置5个复孔, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养48 h。取出Transwell小室, 用棉签拭去上室细胞, 下室细胞以95%乙醇固定30 min, 以结晶紫染色15 min, 在 $\times 200$ 倒置显微镜下随机选取6个视野进行观察, 计数穿膜细胞数, 实验重复3次。侵袭抑制率 $= (1 - \text{实验组侵袭细胞数} / \text{对照组侵袭细胞数}) \times 100\%$ 。

1.6 划痕试验检测细胞迁移能力

子宫内膜癌HEC-1-B细胞以 1×10^6 个/mL接种在6孔板, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养。待细胞生长汇合度达100%时进行划痕, 用PBS洗涤细胞板, 除去悬浮细胞, 分别用含0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ SB203580的培养基培养细胞, 培养48 h后观察划痕愈合情况, 选取0和48 h时划痕区域统计划痕愈合率。划痕愈合率 $(\%) = (0 \text{ h划痕面积} - 48 \text{ h划痕面积}) / 0 \text{ h划痕面积} \times 100\%$ 。实验重复3次, 取均值, 以划痕愈合率表示细胞迁移能力。

1.7 Western 印迹法检测 HEC-1-B 细胞中 p-p38 MAPK, PCNA 和 MMP-2 蛋白表达水平

对数增殖期的HEC-1-B细胞以 2×10^5 个/mL的密度接种于6孔板中, 每孔接种2 mL, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养24 h, 之后更换成含0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$

SB203580的培养基, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养48 h。收集各浓度的细胞提取蛋白, 以BCA检测试剂盒测定所提蛋白浓度。用5 \times 蛋白上样缓冲液与蛋白质混合, 加热至变性。取50 μg 变性蛋白加样至SDS-GAGE电泳分离蛋白, 采用半干法转移蛋白至PVDF膜上。5%胎牛血清室温封闭2 h, 分别加入一抗, p-p38 MAPK一抗1:800稀释, PCNA一抗1:800稀释, MMP-2一抗1:1 000稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜杂交。用TBST洗膜3次, 加入二抗1:5 000稀释, 室温孵育2 h, 用TBST洗膜3次。以ECL试剂化学发光, 显影、曝光。转移至暗室中用凝胶成像仪拍照, 以Image J图像分析系统分析各条带灰度值, 以 β -actin为内参, 以二者相对灰度值表示HEC-1-B细胞中p-p38 MAPK, PCNA和MMP-2蛋白相对表达水平。

1.8 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析, 所得数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 组间差异比较以SNK-*q*检验分析, 两组间差异比较以*t*检验分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 SB203580 对子宫内 膜癌 HEC-1-B 细胞增殖的影响

5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的SB203580对HEC-1-B细胞增殖抑制率分别为(17.68 \pm 2.01)%, (32.14 \pm 3.89)%, (67.21 \pm 5.11)%, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。随着SB203580浓度的升高, 对HEC-1-B细胞增殖抑制率逐渐升高, 组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 抑制 MAPK 信号通路对 HEC-1-B 细胞周期的影响

与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期HEC-1-B细胞百分比升高, S期和 G_2/M 期细胞百分比降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期HEC-1-B细胞百分比升高, S期和 G_2/M 期细胞百分比降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期HEC-1-B细胞百分比升高, S期和 G_2/M 期细胞百分比降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

表1 不同浓度的SB203580对HEC-1-B细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of different concentrations of SB203580 on proliferation of HEC-1-B cells ($\bar{x} \pm s$)

SB203580浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	增殖抑制率/%
0	0.00
5	17.68 \pm 2.01*
10	32.14 \pm 3.89* ^{&}
20	67.21 \pm 5.11* ^{&#}
F	215.416
P	<0.001

与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_1=6.436$, $t_2=11.699$, $t_3=24.465$, * $P<0.05$; 与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_1=5.263$, $t_2=18.029$, [&] $P<0.05$; 与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t=12.766$, * $P<0.05$ 。

Compared with group 0 $\mu\text{mol/L}$, $t_1=6.436$, $t_2=11.699$, $t_3=24.465$, * $P<0.05$; compared with group 5 $\mu\text{mol/L}$, $t_1=5.263$, $t_2=18.029$, [&] $P<0.05$; compared with group 10 $\mu\text{mol/L}$, $t=12.766$, * $P<0.05$ 。

2.3 抑制 MAPK 信号通路对 HEC-1-B 细胞侵袭能力的影响

0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞侵袭抑制率分别为0.00%, (24.67 \pm 2.14)%, (47.62 \pm 3.84)%, (75.23 \pm 6.04)%。与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组HEC-1-B细胞侵袭抑制率均升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。随着SB203580浓度的升高, 对细胞侵袭抑制率也逐渐升高, 组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$, 图2, 表2)。

2.4 抑制 MAPK 信号通路对 HEC-1-B 细胞迁移能力的影响

0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞划痕愈合率分别为100.00%, (74.28 \pm 5.38)%, (50.39 \pm 4.72)%, (28.95 \pm 2.84)%。与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组HEC-1-B细胞划痕愈合率降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组HEC-1-B细胞划痕愈合率降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组HEC-1-B细胞划痕愈合率降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图3)。

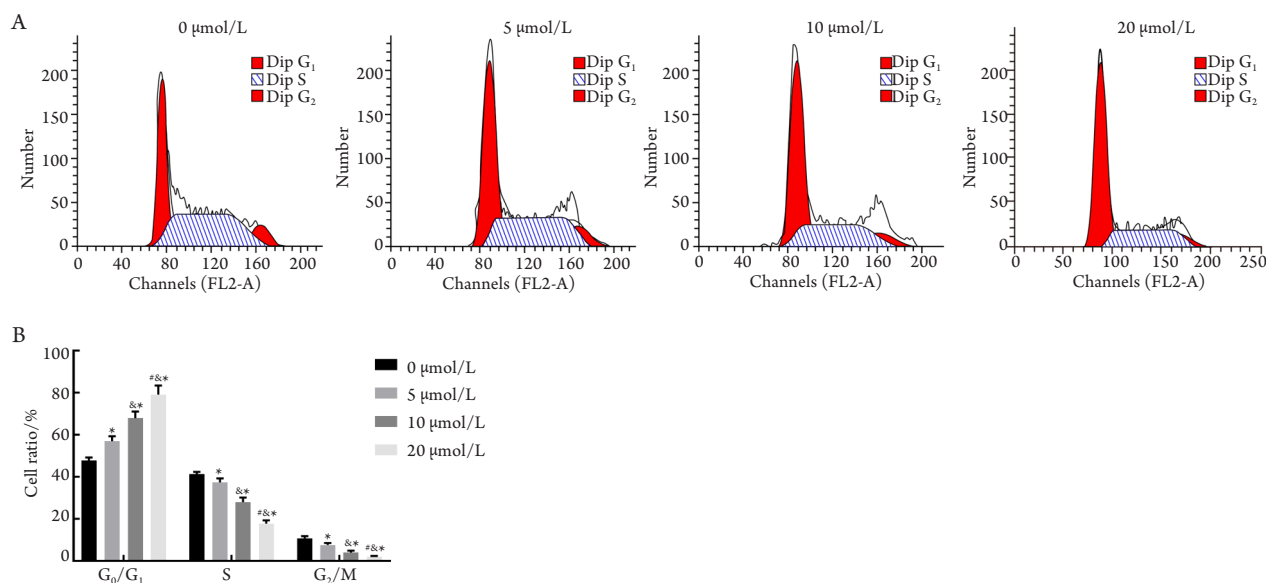


图1 不同浓度的SB203580对HEC-1-B细胞周期的影响

Figure 1 Effect of different concentrations of SB203580 on cell cycle of HEC-1-B

(A)流式细胞仪检测不同浓度的SB203580对HEC-1-B细胞周期的影响; (B)各组HEC-1-B细胞周期细胞比例比较。与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, * $P<0.05$; 与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, [&] $P<0.05$; 与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, * $P<0.05$ 。

(A) Flow cytometry to detect the effect of different concentrations of SB203580 on the cell cycle of HEC-1-B; (B) Comparison of the proportion of HEC-1-B cell cycle cells in each group. Compared with group 0 $\mu\text{mol/L}$, * $P<0.05$; compared with group 5 $\mu\text{mol/L}$, [&] $P<0.05$; compared with group 10 $\mu\text{mol/L}$, * $P<0.05$ 。

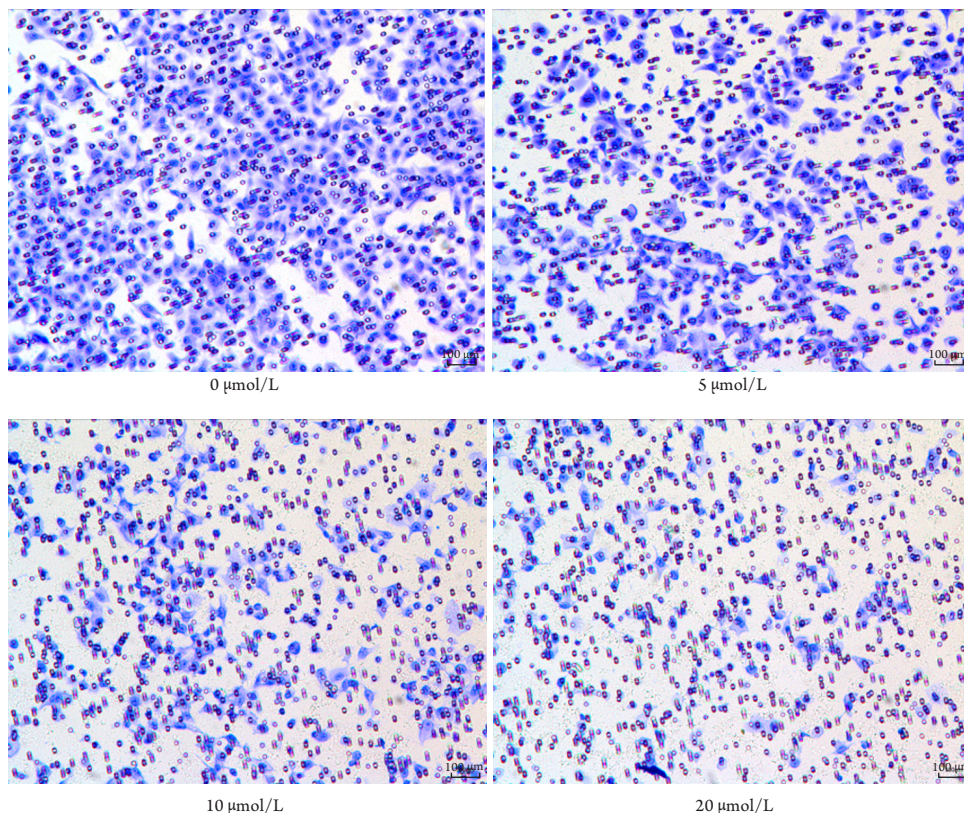


图2 不同浓度的SB203580对HEC-1-B细胞侵袭能力的影响($\times 200$)

Figure 2 Effect of different concentrations of SB203580 on the invasive ability of HEC-1-B cells ($\times 200$)

表2 不同浓度的SB203580对HEC-1-B细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of different concentrations of SB203580 on the invasive ability of HEC-1-B cells ($\bar{x} \pm s$)

SB203580浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	侵袭抑制率/%
0	0.00
5	24.67 \pm 2.14*
10	47.62 \pm 3.84* ^{&}
20	75.23 \pm 6.04* ^{&#}
F	221.857
P	<0.001

与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_1=8.089$, $t_2=15.614$, $t_3=24.667$, $*P<0.05$; 与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_1=7.525$, $t_2=16.578$, $^{\&}P<0.05$; 与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t=9.053$, $^{\#}P<0.05$ 。

Compared with group 0 $\mu\text{mol/L}$, $t_1=8.089$, $t_2=15.614$, $t_3=24.667$, $*P<0.05$; compared with group 5 $\mu\text{mol/L}$, $t_1=7.525$, $t_2=16.578$, $^{\&}P<0.05$; compared with group 10 $\mu\text{mol/L}$, $t=9.053$, $^{\#}P<0.05$.

2.5 HEC-1-B 细胞中 p-p38MAPK, PCNA 和 MMP-2 蛋白表达水平的比较

与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组HEC-1-B 细胞中p-p38MAPK, PCNA和MMP-2蛋白水平下

调, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。随着SB203580 浓度的升高, HEC-1-B细胞中p-p38MAPK, PCNA 和MMP-2蛋白水平逐渐降低, 组间比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 表3, 图4)。

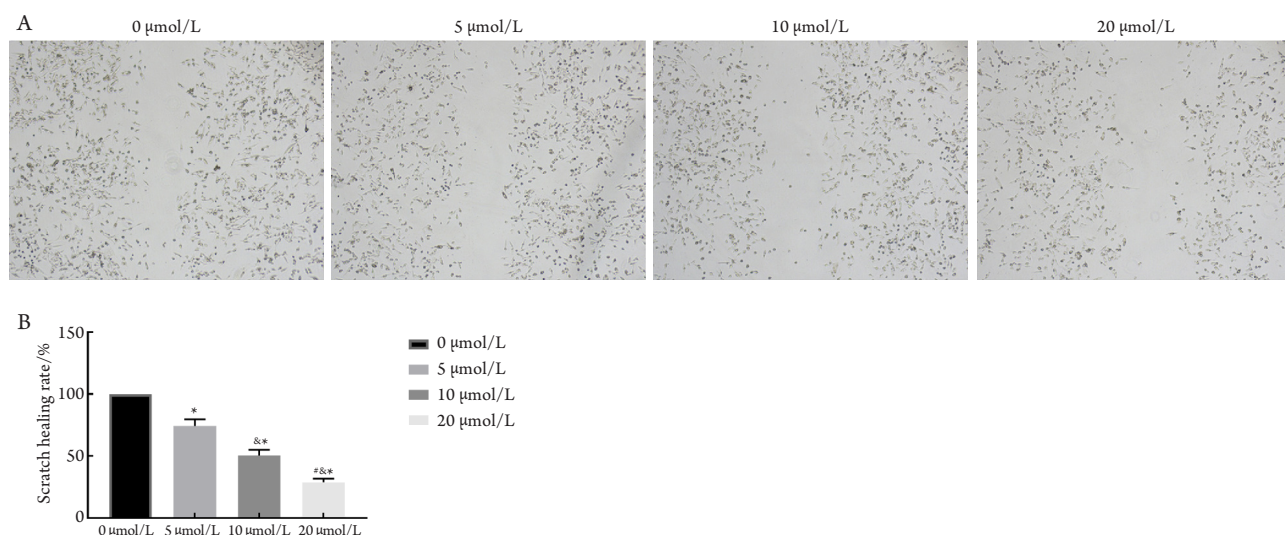


图3 不同浓度的SB203580对HEC-1-B细胞迁移能力的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of SB203580 on the migration ability of HEC-1-B cells

(A) 划痕试验检测各组HEC-1-B细胞迁移能力($\times 40$); (B) 各组HEC-1-B细胞划痕愈合率比较。与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_1=8.182$, $t_2=15.782$, $t_3=22.602$, $*P<0.05$; 与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_1=7.600$, $t_2=14.420$, $^{\&#x2122}P<0.05$; 与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t=6.821$, $^{\#}P<0.05$ 。

(A) Scratch test to detect the migration ability of HEC-1-B cells in each group ($\times 40$); (B) Comparison of scratch healing rate of HEC-1-B cells in each group. Compared with group 0 $\mu\text{mol/L}$, $t_1=8.182$, $t_2=15.782$, $t_3=22.602$, $*P<0.05$; compared with group 5 $\mu\text{mol/L}$, $t_1=7.600$, $t_2=14.420$, $^{\&#x2122}P<0.05$; compared with group 10 $\mu\text{mol/L}$, $t=6.821$, $^{\#}P<0.05$ 。

表3 HEC-1-B细胞中p-p38MAPK, PCNA和MMP-2蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3 p-p38MAPK, PCNA and MMP-2 protein expression levels in HEC-1-B cells ($\bar{x} \pm s$)

SB203580浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	p-p38MAPK	PCNA	MMP-2
0	0.15 \pm 0.02	1.04 \pm 0.15	0.24 \pm 0.03
5	0.10 \pm 0.01*	0.68 \pm 0.05*	0.16 \pm 0.02*
10	0.06 \pm 0.01*&#x2122	0.38 \pm 0.04*&#x2122	0.10 \pm 0.02*&#x2122
20	0.01 \pm 0.01*&#x2122™	0.21 \pm 0.02*&#x2122™	0.03 \pm 0.01*&#x2122™
F	60.571	59.033	53.056
P	<0.001	<0.001	<0.001

与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_{p-p38MAPK-1}=4.629$, $t_{p-p38MAPK-2}=8.332$, $t_{p-p38MAPK-3}=12.962$, $t_{PCNA-1}=5.367$, $t_{PCNA-2}=9.839$, $t_{PCNA-3}=12.373$, $t_{MMP-1}=4.619$, $t_{MMP-2}=8.083$, $t_{MMP-3}=12.124$, $*P<0.05$ 。与5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_{p-p38MAPK-1}=3.703$, $t_{p-p38MAPK-2}=8.332$, $t_{PCNA-1}=4.472$, $t_{PCNA-2}=7.006$, $t_{MMP-1}=3.464$, $t_{MMP-2}=7.506$, $^{\&#x2122}P<0.05$ 。与10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $t_{p-p38MAPK}=4.629$, $t_{PCNA}=2.534$, $t_{MMP}=4.042$, $^{\#}P<0.05$ 。Compared with group 0 $\mu\text{mol/L}$, $t_{p-p38MAPK-1}=4.629$, $t_{p-p38MAPK-2}=8.332$, $t_{p-p38MAPK-3}=12.962$, $t_{PCNA-1}=5.367$, $t_{PCNA-2}=9.839$, $t_{PCNA-3}=12.373$, $t_{MMP-1}=4.619$, $t_{MMP-2}=8.083$, $t_{MMP-3}=12.124$, $*P<0.05$. Compared with group 5 $\mu\text{mol/L}$, $t_{p-p38MAPK-1}=3.703$, $t_{p-p38MAPK-2}=8.332$, $t_{PCNA-1}=4.472$, $t_{PCNA-2}=7.006$, $t_{MMP-1}=3.464$, $t_{MMP-2}=7.506$, $^{\&#x2122}P<0.05$. Compared with group 10 $\mu\text{mol/L}$, $t_{p-p38MAPK}=4.629$, $t_{PCNA}=2.534$, $t_{MMP}=4.042$, $^{\#}P<0.05$ 。

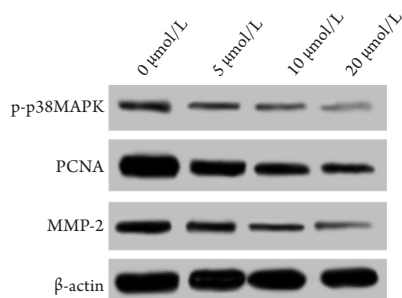


图4 Western印迹法检测各组HEC-1-B细胞中p-p38MAPK, PCNA和MMP-2蛋白水平

Figure 4 Western blot analysis of p-p38MAPK, PCNA and MMP-2 protein levels in HEC-1-B cells

3 讨论

MAPK信号通路受细胞外刺激激活,引起细胞内不同细胞生物学反应,介导细胞生长、转化、分化、发育等过程。大量研究^[11-13]表明:MAPK信号通路介导恶性肿瘤细胞的增殖、浸润等生物学行为促进恶性肿瘤的发生和进展。目前已鉴定出4条MAPK信号通路,包括p38MAPK, ERK1/2, JNK和ERK5,其中p38MAPK途径在多数肿瘤中异常激活,与人类肿瘤关系密切。p-p38MAPK是磷酸化的p38MAPK,是具有活性的活化形式。p-p38MAPK可促进多种因子和基因转录和表达,调节细胞增殖、存活、凋亡、迁移等发生^[14-15]。免疫组织化学法检测子宫内膜癌组织中p38MAPK的表达水平,结果显示子宫内膜癌患者p38MAPK的阳性表达率显著高于内膜增生组织和正常子宫内膜组织^[16]。本实验用p38MAPK信号通路特异性抑制剂SB203580处理人子宫内膜癌HEC-1-B细胞,结果显示:加入抑制剂后HEC-1-B细胞中p-p38MAPK蛋白表达水平下调,说明抑制剂SB203580能够抑制p38MAPK信号通路的激活。CCK-8检测细胞增殖情况,结果发现HEC-1-B细胞增殖能力降低,随着抑制剂SB203580浓度的升高,对细胞增殖抑制能力越强。流式细胞术检测细胞周期显示:细胞周期阻滞于G₀/G₁期。PCNA又称细胞周期蛋白,是脱氧核苷酸的合成和复制过程必须的物质,因其只存在于正常分裂增殖的细胞内,故将其作为细胞增殖的指标分子之一。PCNA的表达水平能够反映肿瘤细胞周期进程以及增殖的状态^[17-18]。本实验中施加抑制剂

SB203580后,HEC-1-B细胞中PCNA蛋白的表达水平明显降低,进一步说明抑制MAPK信号通路能够抑制子宫内膜癌细胞增殖,阻滞细胞周期的进展。

肿瘤的侵袭和迁移是十分复杂的过程,其中细胞外基质是肿瘤发生侵袭和迁移的屏障^[19]。细胞外基质的降解能够导致细胞基底膜的连续性和完整性受到破坏,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMPs)属于蛋白水解酶,能够特异性降解IV型胶原,破坏细胞外基质,在肿瘤浸润、侵袭和转移中发挥关键性作用^[20-21]。MMP-2是基质金属蛋白酶家族中重要成员之一,在降解细胞外基质中发挥“钻头”作用^[22]。本实验通过p38MAPK信号通路特异性抑制剂SB203580处理HEC-1-B细胞后,Transwell试验结果显示侵袭抑制率随着抑制剂SB203580浓度的升高逐渐升高,说明抑制HEC-1-B细胞中p38MAPK信号通路能够抑制细胞侵袭能力。划痕试验显示施加抑制剂SB203580后HEC-1-B细胞划痕愈合率降低,提示抑制p38MAPK信号通路对细胞迁移能力具有抑制作用。Western印迹法检测结果显示:HEC-1-B细胞中MMP-2蛋白水平随抑制剂SB203580浓度的升高呈下降趋势。提示抑制p38MAPK信号通路通过下调MMP-2蛋白水平阻碍细胞侵袭和迁移。这与Cheng等^[23]的研究类似,巴黎皂甙VII通过p38MAPK信号通路抑制MMP-2/9的产生,从而抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭。Lu等^[24]报道水飞蓟宾通过p38MAPK信号通路下调MMP-2和MMP-9的表达,抑制人胃癌SGC7901细胞的迁移和侵袭。此外,Wang等^[25]研究指出:LncRNA BANCR通过ERK/MAPK信号通路调节MMP-2的表达,促进子宫内膜癌细胞的增殖和侵袭。综合上述研究,提示抑制MAPK信号通路通过下调MMP-2的表达抑制子宫内膜癌细胞侵袭和迁移。

总之,抑制人子宫内膜癌HEC-1-B细胞中MAPK信号通路可以抑制HEC-1-B细胞的增殖,阻滞细胞周期于G₀/G₁期,阻碍细胞的侵袭和迁移,其作用机制与下调PCNA和MMP-2蛋白的表达有关。抑制MAPK信号通路的活化,敲低PCNA和MMP-2的表达,抑制子宫内膜癌细胞的增殖、侵袭和转移,有望作为治疗子宫内膜癌分子作用靶点。

参考文献

1. Morice P, Leary A, Creutzberg C, et al. Endometrial cancer[J]. *Lancet*, 2016, 387(10023): 1094-1108.
2. Matsuo K, Moeini A, Machida H, et al. Tumor characteristics and survival outcome of endometrial cancer arising in adenomyosis: an exploratory analysis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(3): 959-967.
3. 焦思萌, 孔为民, 宋丹, 等. 83例子宫内膜腺癌单纯放射治疗疗效及其影响因素分析[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(2): 119-124.
JIAO Simeng, KONG Weimin, SONG Dan, et al. Efficacy and influencing factors of radiotherapy for 83 cases of endometrial adenocarcinoma[J]. *Journal of Oncology*, 2018, 24(2): 119-124.
4. Lee YC, Lheureux S, Oza AM. Treatment strategies for endometrial cancer: current practice and perspective[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2017, 29(1): 47-58.
5. Haston S, Pozzi S, Carreno G, et al. MAPK pathway control of stem cell proliferation and differentiation in the embryonic pituitary provides insights into the pathogenesis of papillary craniopharyngioma[J]. *Development*, 2017, 144(12): 2141-2152.
6. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective[J]. *Cancer*, 2014, 120(22): 3446-3456.
7. Akrami H, Mahmoodi F, Havasi S, et al. PI3K/Akt and p38MAPK pathways[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(3): 173-180.
8. Zhao HG, Zhou SL, Lin YY, et al. Toxicaricoid N induces apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cell by activating the p38MAPK pathway[J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(1): 71-78.
9. Wang J, Sun X, Zhang H, et al. MPA influences tumor cell proliferation, migration, and invasion induced by RANKL through PRB involving the MAPK pathway in endometrial cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(2): 799-809.
10. 刘子瑗, 蔡志福, 张洁清, 等. 雌二醇对子宫内膜癌细胞MAPK通路的激活及其对增殖与迁移的影响[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(2): 181-185.
LIU Ziyuan, CAI Zhifu, ZHANG Jieqing, et al. Activation of MAPK signaling pathway through estradiol and its effects on proliferation and migration in endometrial cancer cells[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2016, 32(2): 181-185.
11. Buchegger K, Silva R, López J, et al. The ERK/MAPK pathway is overexpressed and activated in gallbladder cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(5): 476-482.
12. Ahronian LG, Sennott EM, Van Allen EM, et al. Clinical acquired resistance to RAF inhibitor combinations in BRAF-mutant colorectal cancer through MAPK pathway alterations[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(4): 358-367.
13. Huang M, Wang YP, Zhu LQ, et al. MAPK pathway mediates epithelial-mesenchymal transition induced by paraquat in alveolar epithelial cells: MAPK pathway mediates EMT induced by Pq in alveolar epithelial cells[J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(11): 1407-1414.
14. Brichkina A, Bertero T, Loh HM, et al. p38MAPK builds a hyaluronan cancer niche to drive lung tumorigenesis[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(23): 2623-2636.
15. Xu L, Zhang X, Li Y, et al. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/ JNK activation[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8721-8729.
16. 周海霞, 时志民, 王蕾, 等. 子宫内膜癌中E2F-1和p-p38的表达及意义[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(2): 123-124.
ZHOU Haixia, SHI Zhimin, WANG Lei, et al. Expression and significance of E2F-1 and p-p38 in endometrial carcinoma[J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2013, 22(2): 123-124.
17. Juríková M, Danihel L, Polák Š, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer[J]. *Acta Histochemica*, 2016, 118(5): 544-552.
18. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, et al. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2013, 18(2): e174-e179.
19. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis[J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(1): 229-236.
20. Abba M, Patil N, Allgayer H. MicroRNAs in the regulation of MMPs and metastasis[J]. *Cancers*, 2014, 6(2): 625-645.
21. 胡梅艳, 孙晓红. 细胞外基质、基质金属蛋白酶与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. *肿瘤药学*, 2016, 6(1): 26-30.
HU Meiyang, SUN Xiaohong. Advances in the relationship between extracellular matrix, matrix metalloproteinases and malignant tumors[J]. *Anti-Tumor Pharmacy*, 2016, 6(1): 26-30.
22. Sato M, Kawana K, Adachi K, et al. Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2): 829-835.
23. Cheng G, Gao F, Sun X, et al. Paris saponin VII suppresses osteosarcoma cell migration and invasion by inhibiting MMP-2/9 production via the p38 MAPK signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3199-3205.
24. Lu S, Zhang Z, Chen M, et al. Silibinin inhibits the migration and

invasion of human gastric cancer SGC7901 cells by downregulating MMP-2 and MMP-9 expression via the p38MAPK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7577-7582.

25. Wang D, Wang D, Wang N, et al. Long non-coding RNA BANCR

promotes endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating MMP2 and MMP1 via ERK/MAPK signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4): 644-656.

本文引用: 翁亚茜, 鲍伟杰, 梁瑞敏, 常子涛. MAPK信号通路调控子宫内膜癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(3): 470-478. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.003

Cite this article as: WENG Yahan, BAO Weijie, LIANG Ruimin, CHANG Zitao. MAPK signaling pathway regulates proliferation, invasion and migration of endometrial carcinoma cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(3): 470-478. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.003