

# MAPK 信号转导通路与生存素反义寡核苷酸诱导人胃癌细胞凋亡的关系

付 广, 王国斌, 卢晓明, 黄庆先, 郑 海

付广, 王国斌, 卢晓明, 黄庆先, 郑海, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022

付广, 男, 1971-08-30 生, 辽宁省建平县人, 汉族. 1994 年同济医科大学本科毕业, 2004 年武汉市华中科技大学同济医学院博士毕业, 主治医师, 主要从事胃癌的机制和治疗研究.

项目负责人: 付广, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. fuguang71@hotmail.com

电话: 027-85726201 传真: 027-85776334

收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-02-01

## MAPK signal transduction and apoptosis of human gastric carcinoma cells induced by liposomes of survivin antisense oligonucleotide

Guang Fu, Guo-Bin Wang, Xiao-Ming Lu, Qing-Xian Huang, Hai Zheng

Guang Fu, Guo-Bin Wang, Xiao-Ming Lu, Qing-Xian Huang, Hai Zheng, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Guang Fu, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fuguang71@hotmail.com  
Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To study the relation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction and apoptosis of human gastric carcinoma cells HS-746T induced by liposomes of survivin antisense oligonucleotide (ASODN).

**METHODS:** Survivin ASODN was designed and synthesised to transfect human gastric carcinoma cells HS-746T. The cultured cells were divided into 6 groups: vacuity control group, liposome and sense oligonucleotide (SODN) group, 100, 200 and 400 nmol/L ASODN group and P38MAPK, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor groups. Apoptotic index (AI) and proliferative index (PI) were examined by flow cytometry after transfection 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h. RT-PCR, immunocytochemical stain, Western blot, immuno-precipitation and kinase activity assay were used to detect protein expression and activity of P38MAPK, ERK1/2, survivin and survivin mRNA after transfection.

**RESULTS:** Expression of ERK1/2 and P38MAPK has not significantly different among vacuity control group, liposomes group and SODN group. The apoptotic cells increased in anisoconcentration survivin ASODN groups and AI was higher than that of other control group. Apoptotic cells decreased in P38MAPK inhibitor group while increased in ERK1/2. The protein and mRNA expression of survivin de-

creased when transfection concentration was increased. The phosphorylated and nonphosphorylated ERK1/2 showed a dose-and time-dependent decrease whereas protein level of p38MAPK remained unchanged, but activity increased.

**CONCLUSION:** Survivin ASODN can induce apoptosis of human gastric carcinoma cells in vitro though MAPK signal transduction including activating apoptosis-related signal P38MAPK and suppressing proliferation-related signal ERK1/2.

Fu G, Wang GB, Lu XM, Huang QX, Zheng H. MAPK signal transduction and apoptosis of human gastric carcinoma cells induced by liposomes of survivin antisense oligonucleotide. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(5):1034-1039

## 摘要

**目的:** 探讨分裂原激活的蛋白激酶家族(MAPK)信号转导通路与脂质体生存素(survivin)反义寡核苷酸转染诱导人胃癌细胞系 HS-746T 凋亡的关系.

**方法:** 设计合成 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)转染胃癌 HS-746T 细胞, 分空白对照组, 脂质体和正义链转染组, 100, 200, 400 nmol/L 反义链转染组及 P38MAPK、ERK1/2 抑制剂组. 用流质细胞仪检测转染后 2, 4, 8, 12, 24 和 48 h 各组细胞增生和凋亡指数. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫细胞化学染色法、Western blot 蛋白免疫印迹法、免疫沉淀法及激酶活性测定法检测各对照组及 ASODN 组转染后 survivin mRNA 和 P38MAPK, ERK1/2, survivin 蛋白表达和活性的变化.

**结果:** 不同时间空白组、脂质体和正义链转染组 ERK1/2, P38MAPK 表达均无明显差异, 各浓度 survivin ASODN 转染组凋亡细胞增多, 凋亡指数高于其他对照组. P38MAPK 抑制剂组凋亡细胞减少, ERK1/2 抑制剂组增多. Survivin mRNA 和蛋白表达随着转染浓度的增加而降低. 磷酸化和非磷酸化细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase/2, ERK1/2)的表达随药物浓度增加而减弱. P38MAPK 的表达在各组均相同, 但 ASODN 转染组活性增高.

**结论:** Survivin 基因反义寡核苷酸在体外可能通过 MAPK 信号转导通路激活凋亡相关的信号途径 P38MAPK, 阻断与细胞增生相关的信号途径 ERK1/2 来诱导胃癌细胞凋亡, 抑制人胃癌细胞的增生.

付广, 王国斌, 卢晓明, 黄庆先, 郑海. MAPK 信号转导通路与生存素反义寡核苷酸诱导人胃癌细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1034-1039  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1034.asp>

## 0 引言

生存素(survivin)是细胞内凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis family of protein, IAPs)的一个新成员, 他可以通过有丝分裂促进细胞增生, 抑制细胞凋亡. 研究表明, 应用反义策略阻断 survivin 表达在体外可明显抑制胃癌细胞的生长. 分裂原激活的蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通过三级酶促级联反应激活并调节特定的基因表达, 他所介导的信号转导通路是将细胞外丝裂原信号传递给细胞核并产生反应的重要通路, 在细胞增生和凋亡的调节中起重要作用. 我们在观察了 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)诱导胃癌细胞 HS-746T 凋亡的基础上, 进一步探讨其与 MAPK 信号转导通路的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 脂质体 Lipofectin 购自 LifeTechnologies 公司; 人胃癌细胞系 HS-746T 购自武汉大学培养物保存中心; RPMI1640 购自 GIBCO 公司; ECL 显色试剂盒购自武汉亚法生物工程公司. 抗磷酸化 ERK1/2 和磷酸化 p38MAPK 的抗体, 抗总 ERK1/2 和总 p38MAPK 蛋白的抗体及 PD98059, SB203580 购自美国 Sigma 公司. 根据生存素的基因序列(Genbank Accession Number: U75285), 应用 primer 5.0 软件设计互补于生存素 mRNA 的 232-251 序列的 20 个碱基组成的 ASODN 链, 序列为 5' -CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3', 同时合成正义链, 序列为 5' -CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3', 两序列在合成时均用巯基取代寡核苷酸片段磷上的羟基修饰. 在 Genbank 中行 Blastn 证实 ASODN 及 SODN 与任何已知哺乳动物基因无匹配. ASODN 5' 端以绿色荧光蛋白标记, 由上海生工生物公司合成.

1.2 方法 水浴复苏人胃癌细胞系 HS-746T 后接种于 30 mL 培养瓶及铺有无菌盖玻片的 6 孔培养板上, 在 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养, 胰蛋白酶消化细胞并计数, 培养至 80% 融合后取对数生长期细胞进行转染. 实验共分 6 组, 为空白对照组, 脂质体转染对照组, SODN 转染对照组和 100, 200, 400 nmol/L 三种浓度的 ASODN 转染组, 每组设 3 个复孔. 另设置 6 组转染时分别加入 ERK1/2 和 p38MAPK 特异性抑制剂 10 μmol/L PD98059, SB203580, 转染结束后再根据转染进行 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 分为 6 组, 收集不同时间的细胞进行检测. 采用阳离子脂质体 Lipofectin 进行转染, 将接种于 6 孔板培养至 80% 汇片的 HS-746T 细胞去除培养基, 用温热无血清的 RPMI 1640 漂洗细胞 2 次. 分别将寡核苷酸及 Lipofectin 10 mL 溶于预暖的无血清 RPMI 1640 100

和 90 μL, 室温下静置 30 min 后轻柔混合二者, 孵育 15 min, 不加抗生素, 用 800 μL 无血清 RPMI 1640 稀释后轻铺于细胞上, 在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育. 8 h 后去除转染液, 继续以含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养. 培养过程中常规用台盼蓝染色法检测各组细胞死亡率均小于或等于 5%.

1.2.1 免疫细胞化学染色 按 SP 法操作, 制作培养的各组胃癌细胞爬片用冷丙酮固定, 加 3 mL/L 甲醇于室温封闭 30 min, 室温振荡 3 次, 用含 100 mL/L 山羊血清的 PBS 室温封闭 30 min. 分别加入一抗, 湿盒中 4 °C 过夜, 再加入通用型生物素化二抗 37 °C 孵育 30 min, 最后加入辣根酶标记的链霉亲和素, 37 °C 孵育 30 min. DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水, 透明, 中性树脂胶封片, 设置 PBS 代替一抗作为阴性对照. 稀释度为: 抗 ERK1/2 : 1 : 200; 抗 p38 : 1 : 200; 抗 p-ERK1/2 : 1 : 100; 抗 p-p38 : 1 : 100.

1.2.2 分析细胞凋亡比率及细胞周期 收集  $1.0 \times 10^6$  个细胞, 70 mL/L 冷乙醇 4 °C 固定, 加 RNase A 37 °C 孵育 1 h, 碘化丙啶(PI) 避光冰浴染色 1 h. 采用 Beckon/Dickinson Facsort 型流式细胞仪, 在 488 nm 波长处进行检测, 用 multicycle 软件分析凋亡指数, DNA 含量及细胞周期, 细胞凋亡指数(AI)= 亚二倍峰细胞数 / 总细胞数  $\times 100\%$ , 细胞增生指数(PI)=(S+G2/M)/(G0/G1+S+G2/M)  $\times 100\%$ .

1.2.3 检测胃癌细胞 Survivin, ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达 将转染后继续培养 4, 12, 24 h 的胃癌细胞用 PBS 液漂洗 3 次后加入预冷至 4 °C 的 50 μL 裂解缓冲液, 冰上作用 20 min, 4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液保存于 -20 °C. 采用 BCA 法测定蛋白质浓度, 用 40 μg/孔上样, 120 g/L SDS PAGE 凝胶电泳分离, 通过电转移法将蛋白质从 SDS PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜后在含 50 g/L 脱脂奶粉的 TTBS 中 37 °C 封闭 90 min, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜, TTBS 漂洗后(10 min  $\times$  3 次), 加入二抗, 7 °C 作用 40 min, TTBS 充分漂洗(10 min  $\times$  3 次), 洗膜后加入增强化学发光底物 ECL 试剂. X 线片暗室曝光, 常规显影定影. 图像以 Bio Rad 图像分析系统分析, 用蛋白条带的平均光强度值表示 survivin, ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达的相对强度.

1.2.4 检测胃癌细胞 survivin mRNA 表达 取转染后继续培养 24 h 的  $1 \times 10^6$  个胃癌细胞用 PBS 液漂洗 2 次, 以 Trizol 试剂提取总 RNA, 用紫外分光光度计检验纯度并定量. 在 1% 甲醛变性凝胶上电泳验证 RNA 完整性后逆转录为 cDNA, 产物进行 PCR, 设 GAPDH 为内参照, 对样品模板用量标准化, Survivin 和 GAPDH 分管扩增, 引物由上海生工公司合成. Survivin 引物(扩增产物 727 bp)序列: 上游 5' -GGGACCCGTTGGCAGAG-3', 下游 5' -AAAATGAGCCCCCAAAAAGA-3'; GAPDH 引物(扩增产物 372 bp)序列: 上游 5' -CACCATTCTCCAGGAGCGAG-3', 下游 5' -TCACGCCACA

GTTTCCCGGA-3'. RT-PCR 条件: 50 °C 逆转录 30 min, 94 °C 变性 2 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35(survivin)或26(GAPDH)个循环, 72 °C 充分延伸 10 min. PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 Fluor S 多功能成像系统扫描拍照分析, 用以下公式计算其相对抑制率. 抑制率 =  $[1 - (\text{实验样品} / \text{实验内参}) / (\text{空白对照样品} / \text{空白对照内参})] \times 100\%$ .

1.2.5 ERK1/2, p38 MAPK 活性分析 参照李田昌 et al(基础医学与临床 1996;16:78-80)的方法, 将提取的各组胃癌细胞质蛋白稀释至 1.3 g/L, 分别与浓度为 0.5 g/L 的抗 ERK1/2, p38MAPK 抗体 4 °C 共同孵育 4 h, 加入激酶缓冲液 25 μL, 在 25 °C 水浴孵育 30 min, 加入 20 μmol/L ATP, 1.85 MBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 启动磷酸化反应, 然后进行放射自显影, β 液闪测定仪上测 cpm 值计数, 测定 <sup>32</sup>P 的放射活性, 以每克蛋白质 <sup>32</sup>P 的掺入量 [pkat/g] 表示 ERK1/2, p38MAPK 活性.

统计学处理 各组实验数据以平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 多个样本间比较行单因素方差分析, 组间两两比较用 q 检验.  $P < 0.05$ , 差异在统计学上有显著性意义.

## 2 结果

2.1 Survivin ASODN 转染及 p38MAPK, ERK 抑制剂对胃癌细胞形态的影响 倒置荧光显微镜下观察各组胃癌细胞的变化, 不同浓度的 ASODN 转染组细胞可见清晰的绿色荧光, 空白对照组, 脂质体转染对照组, SODN 转染对照组则未见到(图 1). 光镜下见 ASODN 转染组 2 h 后有部分细胞贴壁性降低, 细胞变圆漂起, 突起收缩, 形成凋亡小体, 24 h 后达到高峰, 有大量坏死细胞漂浮(图 2 A, B). 加入 p38MAPK, ERK 抑制剂 SB203580, PD98059 后, ERK 组坏死细胞增多, 贴壁细胞减少; 而 p38MAPK 组效应则相反(图 2 C, D).

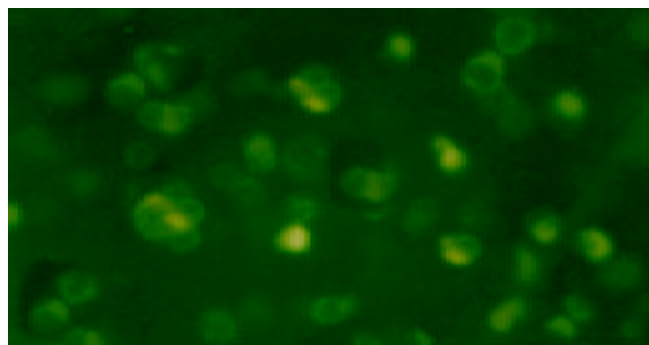


图 1 ASODN 转染后胃癌细胞 倒置荧光显微镜 × 200

2.2 免疫细胞化学检测结果 免疫组化染色后未见加抑制剂的对照组 p38MAPK, ERK 蛋白主要位于胃癌细胞核周区, 染色较弱, 呈淡黄色颗粒. ASODN 实验组中 p38MAPK 与其无明显差别, 而 ERK 蛋白则分布于胞核及胞质内, 黄染减弱(图 3 A, B). 加抑制剂的对照组和实验组中, 二者表达均减低.

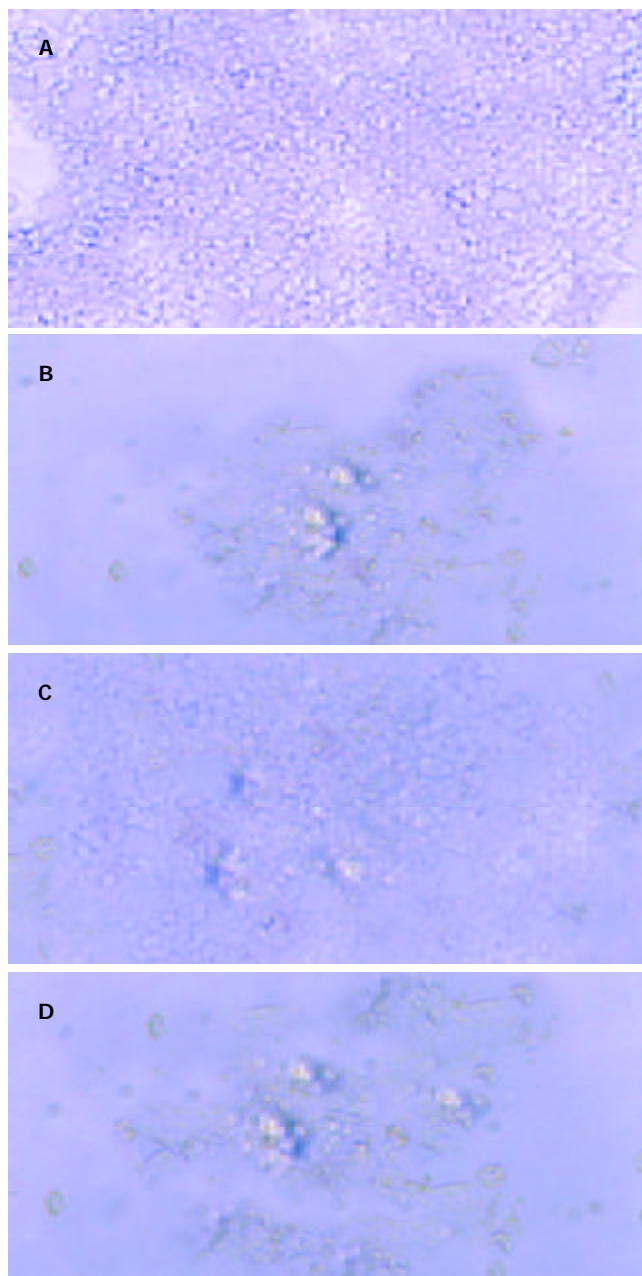


图2 胃癌细胞系HS-746T LM × 200. A: 空白对照组正常生长; B: ASODN 转染组; C: 转染后 p38MAPK 抑制剂组 D: 转染后 ERK 抑制剂组.

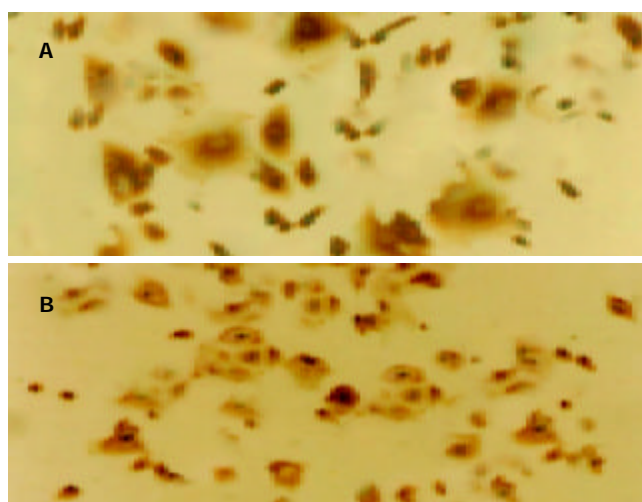


图3 胃癌细胞免疫组化 SP × 200. A: 对照组 p38MAPK B: ASODN 实验组 ERK.

**2.3 转染 survivin ASODN 对胃癌细胞凋亡和增生的影响** 用流式细胞仪定量检测发现各对照组不同时间人胃癌细胞凋亡指数(AI)无显著性差异, 不同浓度 ASODN 转染组 DNA 直方图可见二倍体峰减少,  $G_1$  峰左侧出现明显的亚二倍体凋亡峰, 转染 24 h 后测空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组细胞凋亡率分别为 0.8%, 1.0%, 1.3%, 14.8%, 19.4% 及 53.8%。400 nmol/L ASODN 转染组诱导凋亡最为明显, 各 ASODN 转染组细胞 AI 明显高于各对照组, 差异在统计学上有显著意义( $P < 0.05$ )。400 nmol/L 组 AI 明显高于 100, 200 nmol/L 组, 差异在统计学上也有显著意义( $P < 0.05$ )。

**2.4 转染 survivin ASODN 对胃癌细胞 survivin 蛋白及 mRNA 表达的影响** Western blot 印迹法显示各对照组不同时间人胃癌细胞内 survivin 蛋白表达无明显差异, 不同浓度 ASODN 转染组 survivin 蛋白表达均较各对照组低。应用计算机对条带净密度进行分析发现, ASODN 转染对 survivin 蛋白的抑制作用有明显的剂量依赖性, survivin 蛋白表达随着转染浓度的增加而降低, 转染 24 h 后 400 nmol/L 转染组蛋白表达仅为空白对照组的 30.5% (图 4 A)。RT-PCR 产物电泳结果显示出 372 bp 的 GAPDH DNA 片段和 727 bp 的 survivin 基因片段, 不同时间对照组人胃癌细胞内 survivin mRNA 表达量差异无显著意义。与各对照组相比较, 各浓度 ASODN 转染组 survivin mRNA 表达量均显著降低, 而且随着 ASODN 浓度增加, Survivin mRNA 表达量逐渐下降, 对 mRNA 表达相对抑制率逐渐升高, 转染 24 h 后 400 nmol/L 转染组相对抑制率可达 68.3%, ASODN 的抑制作用具有明显的剂量依赖性, 他可有效抑制人胃癌细胞内 survivin mRNA 表达(图 4 B)。

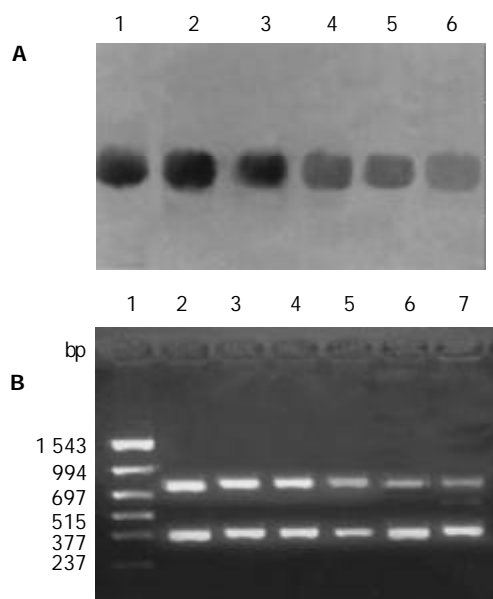


图 4 转染后 24 h 胃癌细胞 survivin 蛋白及 mRNA 表达。A: 1-6: 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组; B: 1-7: Marker, 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组和 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组。

**2.5 ERK1/2 和 p38MAPK 特异性抑制剂对胃癌细胞凋亡和增生的影响** 流式细胞术定量检测发现转染 survivin ASODN 24 h 后, 在用 p38MAPK 抑制剂 SB203580 组中, 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组细胞凋亡率分别为 0.7%, 0.9%, 1.1%, 11.3%, 13.2% 及 31.5%, 均比未用抑制剂者减低。而在用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 组中, 各组细胞凋亡率分别为 0.9%, 1.2%, 1.4%, 17.3%, 23.4% 及 63.5%, 均比未用抑制剂者增高。各 ASODN 转染组之间的差异在统计学上有显著意义( $P < 0.05$ )。

**2.6 转染 survivin ASODN 对胃癌细胞 ERK1/2 及 P38MAPK 活性及蛋白表达的影响** Western blot 法检测细胞转染后 4, 12, 24 h 的 ERK1/2 及 P38MAPK 活性(磷酸化水平), 同时检测非磷酸化的 ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达情况作为对照。结果显示, 各对照组不同时间人胃癌细胞内磷酸化和非磷酸化的 ERK1/2, P38MAPK 蛋白表达无明显差异, 不同浓度 ASODN 转染组 p-ERK1/2 及 ERK1/2 表达均较各对照组低, 且随着时间延长和浓度增高而降低; 而 P38MAPK 蛋白在不同时间表达均相同, 但 p-P38MAPK 较各对照组高。应用计算机对条带净密度进行分析发现, p-ERK1/2, ERK1/2, p-P38MAPK 蛋白表达对 ASODN 转染浓度有明显的剂量依赖性, 转染 24 h 后 400 nmol/L 转染组 p-ERK1/2, ERK1/2, p-P38MAPK 表达为空白对照组的 50.5%, 45.6%, 180.7%(图 5)。

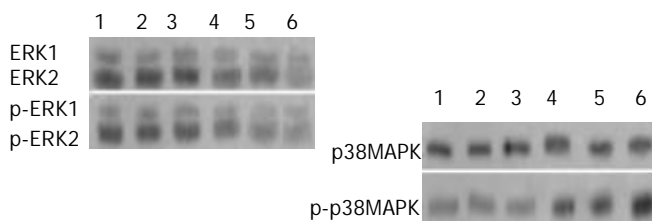


图 5 转染 survivin ASODN 后 24 h 磷酸化和非磷酸化的 ERK1/2, P38MAPK 蛋白表达。1-6: 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组。

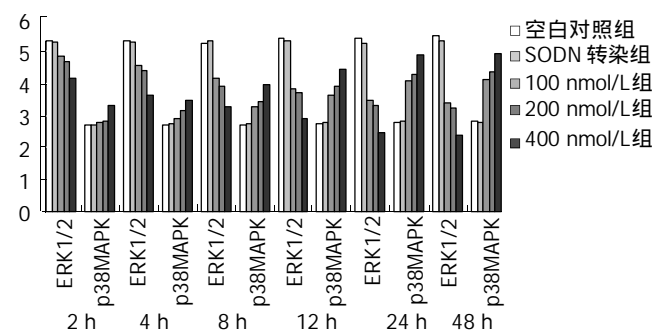


图 6 转染 survivin ASODN 后不同时间 ERK1/2 及 P38MAPK 的活性 pkat/g。

**2.7 ERK1/2 及 P38MAPK 活性的检测** 激酶活性检测结果显示, 转染 survivin ASODN 后 P38MAPK 活性随时间延长逐渐增高, 24 h 后增势减缓; 而 ERK1/2 活性则具



有与 P38MAPK 活性变化相反的趋势. 各对照组 ERK1/2 及 P38MAPK 活性变化不大, 与各实验组相比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 图 6).

### 3 讨论

近年研究显示, 利用反义技术, 抑制或封闭基因的表达, 干扰致病蛋白质的产生, 对肿瘤具有良好的治疗作用<sup>[1-4]</sup>. Survivin 基因是细胞内凋亡抑制蛋白家族的一个新成员, 他与胃癌的形成和发展有着较大的关系<sup>[5-9]</sup>. 我们以 survivin 为靶分子, 利用脂质体反义寡核苷酸在体外能够通过下调 survivin mRNA 和蛋白的表达, 诱导胃癌细胞凋亡, 抑制人胃癌细胞的增生能力. 由于 survivin 基因表达的蛋白定位于细胞有丝分裂的纺锤体, 而分裂原激活的蛋白激酶家族(MAPK)活性的异常又与肿瘤的发生和细胞凋亡的信号转导关系密切<sup>[10-13]</sup>, 所以推测 MAPK 通路可能参与了反义寡核苷酸诱导胃癌细胞凋亡的过程. 实验结果显示, 在 ASODN 实验组中加入 p38MAPK, ERK 抑制剂能够影响胃癌细胞凋亡率的变化, 且磷酸化和非磷酸化的 p38MAPK, ERK1/2 蛋白表达及二者的活性在实验组和对照组中均有不同, 这提示了 MAPK 通路中的 p38MAPK、ERK1/2 途径与 survivin ASODN 诱导胃癌细胞凋亡的过程有很大关系.

MAPK 信号转导通路是介导细胞反应的重要信号系统<sup>[14-23]</sup>, MAPK 的活化能将细胞生长因子等丝裂原信号传递到细胞核内诱导大多数真核细胞增生分化. 现在已经确定哺乳动物细胞中 MAPKs 途径大致分为 4 种: ERK1/2 途径, ERK5 途径, JNK 途径, p38 途径. 其中 p38MAPK 通路被称为应激激活的 MAPK 通路, 其被激活的磷酸化级联反应是: MLK(DLK)/TAK/ASK-MEK3/6-p38 MAPK, 主要增强细胞对应激原的抵抗力并介导细胞凋亡的信号转导;而细胞外信号调节激酶(ERK1/2)为分裂原激活的 MAPK 通路, 其级联反应是: Raf mos/TPL-1/2-ERK1/2, 主要介导细胞增生和分化的信号转导. MAPK 级联反应非常复杂, 这些通路可被不同的细胞外信号所激活, 然后将特异的细胞外刺激信号诱发的蛋白激酶酪氨酸磷酸化转变为蛋白激酶丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 从而使信号向下游传导. 因此他位于许多细胞因子信号传导途径中的汇聚点. ERK1/2 主要与细胞的增生通路有关, 而 p38 主要在诱导细胞凋亡的信号传导途径中起作用, 两种途径可以独立或同时被激活. 在我们的研究中发现, ASODN 实验组中加入 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后, 胃癌细胞凋亡减少;而加入 ERK 抑制剂 PD98059 后, 细胞凋亡增多, 二者呈现相反的效应. 对转染 survivin ASODN 后不同时间胃癌细胞 ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达及活性分析显示, 不同浓度 ASODN 转染组 p-ERK1/2, ERK1/2 蛋白表达及激酶活性均较各对照组低, 且呈时间和剂量依赖性. 而 P38MAPK 的表达情况则与 ERK1/2 明显不同, 非磷酸化的 P38MAPK 蛋白无论在各对照组还是 ASODN

实验组, 表达均差异不大, 统计学上无显著性意义;但磷酸化的 P38MAPK 蛋白及激酶活性却明显增高, 也呈时间和剂量依赖性. 这些结果说明了 P38MAPK 蛋白在胃癌细胞中表达较稳定, 虽然 survivin ASODN 转染不能引起他的变化, 但他可致 P38MAPK 活性的增高, ERK1/2 蛋白表达及激酶活性的降低. Survivin ASODN 转染诱导胃癌细胞凋亡可能是通过促进 P38MAPK 活性, 抑制 ERK1/2 蛋白表达及活性, 产生相互协同效应来实现.

MAPK 通路的激活导致细胞增生主要是通过激活 raf1, 然后依次使 MEK 磷酸化, 激活 ERK1/2, 抑制 P38MAPK, 诱导细胞周期素, 激活细胞周期素依赖激酶, 促使 Rb 蛋白磷酸化, 从而导致细胞增生. Survivin 反义寡核苷酸抑制胃癌细胞的增生能力可能是通过抑制 survivin mRNA 及蛋白的产生, 使有丝分裂原形成减少, 从而抑制上述的过程, 提高 P38MAPK 的活性, 导致胃癌细胞增生减少, 凋亡增加. 总之, 胃癌在我国常见<sup>[24-35]</sup>, 利用反义技术诱导癌细胞凋亡的信号转导是一个复杂的过程, 其确切机制还有待进一步研究.

### 4 参考文献

- 1 Abaza MS, Al-Attayah RJ, Al-Saffar AM, Al-Sawan SM, Moussa NM. Antisense oligodeoxynucleotide directed against c-myc Has anticancer activity and potentiates the antiproliferative effect of conventional anticancer drugs acting by different mechanisms in human colorectal cancer cells. *Tumour Biol* 2003;24:241-257
- 2 Zang XP, Lerner MR, Dunn ST, Brackett DJ, Pento JT. Antisense KGF oligonucleotide inhibition of KGF-induced motility in breast cancer cells. *Anticancer Res* 2003;23:4913-4919
- 3 Du QY, Wang XB, Chen XJ, Zheng W, Wang SQ. Antitumor mechanism of antisense c-myc targeting human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol* 2003;9:2030-2035
- 4 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 5 Yang XY, Wang MW, Wang GS, You WD. Expression of human anti-apoptotic gene survivin and its splice in normal human gastric tissue and gastric cancer. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2003;20:75-76
- 6 Wakana Y, Kasuya K, Katayanagi S, Tsuchida A, Aoki T, Koyanagi Y, Ishii H, Ebihara Y. Effect of survivin on cell proliferation and apoptosis in gastric cancer. *Oncol Rep* 2002;9:1213-1218
- 7 Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- 8 Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer* 2002;86:737-743
- 9 Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-116
- 10 Zhao Y, Wu K, Yu Y, Li G. Roles of ERK1/2 MAPK in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Weisheng Yanjiu* 2003;32:573-575
- 11 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36

- 12 Park MT, Choi JA, Kim MJ, Um HD, Bae S, Kang CM, Cho CK, Kang S, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:50624-50634
- 13 Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Lee TK, Fan TY, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* 2002;21:8498-8505
- 14 Sawafuji K, Miyakawa Y, Weisberg E, Griffin JD, Ikeda Y, Kizaki M. Aminopeptidase inhibitors inhibit proliferation and induce apoptosis of K562 and STI571-resistant K562 cell lines through the MAPK and GSK-3 $\beta$  pathways. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1987-1996
- 15 Wu J, Haugk K, Plymate SR. Activation of pro-apoptotic p38-MAPK pathway in the prostate cancer cell line M12 expressing a truncated IGF-IR. *Horm Metab Res* 2003;35:751-757
- 16 Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Raanani P, Avigdor A, Ben-Bassat I, Witz IP. cDNA microarray analysis reveals an overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Methods Enzymol* 2003;366:103-113
- 17 Zhu KQ, Zhang SJ. Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G1-S arrest. *World J Gastroenterol* 2003;9:2073-2077
- 18 Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2513-2518
- 19 Wang CH, Tang CW, Liu CL, Tang LP. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1904-1908
- 20 Nemeth ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Sperlagh B, Virag L, Vizi ES, Szabo C, Hasko G. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:883-888
- 21 Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores SL, Brugge J, Rosen FS, Swat W. Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* 2003;198:1595-1608
- 22 Lee KH, Hyun MS, Kim JR. Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction in uPA synthesis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:499-505
- 23 Kundu AK, Nagaoka M, Chowdhury EH, Hirose S, Sasagawa T, Akaike T. IGF-1 induces growth, survival and morphological change of primary hepatocytes on a galactose-bared polymer through both MAPK and beta-catenin pathways. *Cell Struct Funct* 2003;28:255-263
- 24 Lu JB, Sun XB, Dai DX, Zhu SK, Chang QL, Liu SZ, Duan WJ. Epidemiology of gastroenterologic cancer in Henan Province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2400-2403
- 25 Zhang C, Liu ZK. Gene therapy for gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2003;9:2390-2394
- 26 Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1435-1438
- 27 Wang LD, Zheng S, Zheng ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1156-1164
- 28 Yin GY, Zhang WN, Shen XJ, Chen Y, He XF. Ultrastructure and molecular biological changes of chronic gastritis, gastric cancer and gastric precancerous lesions: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2003;9:851-857
- 29 Guo HQ, Guan P, Shi HL, Zhang X, Zhou BS, Yuan Y. Prospective cohort study of comprehensive prevention to gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:432-436
- 30 Xi WD, Zhao C, Ren GS. Endoscopic ultrasonography in pre-operative staging of gastric cancer: determination of tumor invasion depth, nodal involvement and surgical resectability. *World J Gastroenterol* 2003;9:254-257
- 31 Chen C, Liu FK, Qi XP, Li JS. The study of chemiluminescence in gastric and colonic carcinoma cell lines treated by anti-tumor drugs. *World J Gastroenterol* 2003;9:242-245
- 32 Cai L, Zheng ZL, Zhang ZF. Risk factors for the gastric cardia cancer: a case-control study in Fujian Province. *World J Gastroenterol* 2003;9:214-218
- 33 Hu JK, Chen ZX, Zhou ZG, Zhang B, Tian J, Chen JP, Wang L, Wang CH, Chen HY, Li YP. Intravenous chemotherapy for resected gastric cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol* 2002;8:1023-1028
- 34 Niu WX, Qin XY, Liu H, Wang CP. Clinicopathological analysis of patients with gastric cancer in 1200 cases. *World J Gastroenterol* 2001;7:281-284
- 35 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804