

α 1, 2-岩藻糖转移酶基因转导对人卵巢癌细胞 RMG-I p38MAPK 信号通路介导的凋亡的影响*

丛建萍 林 蓓** 刘娟娟 刘 晴 李飞飞 刘水策 高 嵩 张淑兰

(中国医科大学附属盛京医院妇产科, 沈阳 110004)

摘要 以 α 1, 2-岩藻糖转移酶基因转染前后卵巢癌细胞 RMG-I、RMG-I-H 为细胞模型, 用细胞免疫荧光方法检测转染前后细胞 p38MAPK 和 p-p38MAPK 的细胞内定位, RT-PCR 和 Western blot 方法从 mRNA 和蛋白质两个水平检测转染前后细胞 p38MAPK 表达的变化; 以兔抗人 IgG 抗体处理组为对照, 分别利用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 Lewis y 单克隆抗体处理前后 RMG-I-H 细胞 p38MAPK mRNA 和蛋白质表达水平的变化; 以 0.1% DMSO 为对照, 用流式细胞仪(FCM)检测 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理后 RMG-I-H 凋亡比率的变化, 并利用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 caspase-3 的 mRNA 和蛋白质水平的变化; 用 RT-PCR 方法检测卡铂和 SB203580 处理后 p38MAPK 及 caspase-3 表达的变化。结果表明, RMG-I 与 RMG-I-H 的 p38MAPK 蛋白主要定位在细胞质, p-p38MAPK 蛋白定位在细胞核, 转染后 p38MAPK 的 mRNA 水平明显高于转染前($P < 0.05$); Lewis y 单克隆抗体处理后 RMG-I-H 细胞 p38MAPK mRNA 水平降低($P < 0.05$), 不同浓度 SB203580(0.1 mmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L)作用下 RMG-I-H 细胞的凋亡率分别为(15.927 $\pm$ 0.861)%、(18.187 $\pm$ 0.481)%及(33.565 $\pm$ 0.912)%, 明显高于空白组和对照组($P < 0.05$), SB203580 处理后 caspase-3 的 mRNA 和蛋白质水平均明显高于空白组和对照组($P < 0.05$), 卡铂处理后 p38MAPK 及 caspase-3 mRNA 水平均增加, SB203580 处理后, caspase-3 mRNA 水平增加。说明 Lewis y 抗原介导的卵巢癌细胞凋亡与 p38MAPK 信号通路有关, 可能通过 p38MAPK 信号通路抑制卵巢癌细胞凋亡, 引起耐药性。

关键词 卵巢癌, Lewis y 抗原, p38MAPK, 凋亡

学科分类号 R737.31, R737.32

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00459

卵巢癌是妇科死亡率最高的恶性肿瘤, 化学药物治疗仍是术后治疗的主要手段, 虽然以铂类为主的联合化疗提高了卵巢癌患者的总体反应率, 但随之而来的肿瘤细胞的耐药性成为困扰临床治疗的主要障碍。因此了解卵巢癌细胞的发生、发展及耐药机制, 有助于探索对卵巢癌治疗的新靶点, 提高卵巢癌的生存率。

Lewis y 抗原是双岩藻糖基化的寡糖, 可能参与许多细胞功能, 包括黏附、识别和信号转导等, 有利于肿瘤的侵袭和播散。75%的上皮性卵巢癌出现 Lewis y 不同程度的过量表达, 且表达增加的患者预后不佳^[1-2]。我们利用建立的 α 1, 2-岩藻糖转移酶(α 1, 2-fucosyltransferase, α 1, 2-FT) 基因及 Lewis y 稳定高表达细胞模型^[3-4], 研究发现, Lewis y 表达增加的同时, 细胞的增殖、黏附等恶性生物学行为增强^[4], 对 5-FU、卡铂、紫杉醇等多种化疗药物的

耐药性也明显增强, 凋亡率明显下降^[3, 5]。Lewis y 抗体可以抑制上述变化^[6]。Klinger 等^[7]研究发现, 抗 Lewis y 抗体 IGN311 和 ABL364 能抑制 EGF 受体介导的信号转导通路, 抑制 Ras 的激活和 MAPK 的磷酸化, 促进肿瘤细胞的凋亡, 表明 Lewis y 与 MAPK 信号转导通路家族的相关性。因此, 我们推测 Lewis y 可能通过 p38MAPK 信号转导通路影响细胞的生存与凋亡, 进而导致卵巢癌细胞的耐药性。

* 国家自然科学基金(30170980, 30571958, 30872757), 辽宁省教育厅攻关项目(20121268), 辽宁省自然基金(20052107), 教育部博士点基金(20070159023), 辽宁省教育厅重点实验室项目(2008S247)和盛京自由研究者计划(200807)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 024-83956387, E-mail: linbei88@hotmail.com

收稿日期: 2009-07-28, 接受日期: 2009-12-01

本文探讨了 Lewis y 抗原与 p38 丝裂原活化的蛋白激酶(p38mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号途径的关系和 Lewis y 抗原致卵巢癌耐药性的机制, 为进一步阐明卵巢癌的耐药性机制提供理论依据, 为卵巢癌的临床治疗提供新的方法和途径.

1 材 料

1.1 卵巢癌细胞株

细胞株 RMG-I 源于卵巢透明细胞癌组织, RMG-I-H 细胞株为 1, 2-FT 及 Lewis y 抗原高表达细胞系, 由本实验室建立, 方法如下: 利用 PCR 的方法克隆人 1, 2-FT 基因的编码区 HFUT-H, 构建表达载体 pcDNA3.1-HFUT-H, 利用磷酸钙法将其转染入卵巢癌细胞系 RMG-I, 利用 G₄₁₈ 筛选单克隆细胞, 建立 1, 2-FT 基因稳定高表达细胞株 RMG-I-H^[4].

1.2 主要试剂

DMEM 和胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品; 胰蛋白酶、二乙烯四乙酸二钠(EDTA)为美国 Amresco 公司产品; 二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC 试剂盒为晶美生物工程有限公司产品; p-p38MAPK(phosph-p38MAPK)、p38MAPK 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteiny aspartate specific protease, caspase-3)抗体均购自美国 Santa cruz 公司; 抗 Lewis y 单克隆抗体(clone A70-C/C8)购于英国 Abcam 公司, 在细胞培养液中的终浓度是 10 mg/L, 无交叉反应, 该抗体适合做免疫组化; p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 购自英国 Promage 公司; RT-PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Pierce

公司.

1.3 主要仪器

流式细胞仪 FACSCalibur 为美国 Becton Dickinson 公司产品; 倒置荧光显微镜 IX71 为日本 OLYMPUS 公司产品; PCR 仪为日本 TaKaRa 公司产品.

2 方 法

2.1 细胞培养及制备

细胞在含 10%胎牛血清 DMEM 培养液中培养, 0.25%胰蛋白酶及 0.02% EDTA 消化传代, 取指数生长期细胞用于实验.

2.2 荧光染色法

取指数生长期细胞, 接种于 6 孔板, 接种浓度保证细胞在同一时间生长至约占底面积 1/3, 行同步化处理. p38MAPK 抗体终浓度为 2 mg/L, p-p38MAPK 抗体终浓度为 4 mg/L, 二抗浓度均为 2 mg/L, 另设阴性对照组. 弃上清, 每孔加入 4%多聚甲醛 300 μ l, 室温 20 min 后加入封闭用羊血清工作液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min, 加一抗 50 μ l 4 $^{\circ}$ C 过夜, 避光加二抗 30 μ l, 荧光倒置显微镜 (400 $\times$)观察并照相.

2.3 RT-PCR 法

分别提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, RT-PCR 操作按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行. PCR 扩增条件见表 1. 同时扩增管家基因 β -actin 作为对照验证, 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下观察并拍照, 每个样本重复 3 次, 进行图像分析.

Table 1 Sequences of the primers, annealing temperature, cycles used for RT-PCR and product size

Transcript	Primer sequences	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C	Cycles	Product size/bp
FUT-1	Sense 5' AGGGCGATGTGACGTTTG 3'	56	30	168*
	Antisense 5' CTGGCAGGGTGAAGTTGG 3'			
p38MAPK	Sense 5' AGGGCGATGTGACGTTTG 3'	54	30	1083*
	Antisense 5' CTGGCAGGGTGAAGTTGG 3'			
Caspase-3	Sense 5' AGCAAACCTCAGGGAACCT 3'	60	27	278
	Antisense 5' GGCAGGCCTGAATAATGAAA 3'			
β -Actin	Sense 5' GGCATCCACGAACTACCT 3'	56	30	480*
	Antisense 5' GCTGTACCTTCACCGTTC 3'			

* Designed by primer 5.0 designing software.

2.4 Western blot 法

取指数生长期细胞, 每瓶加 0.5 ml 细胞裂解液, 上清液用 BCA 法测定蛋白质浓度. 准确吸取

不同转染细胞的样品各 50 μ g, 进行 SDS-PAGE, 然后将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质通过电转移印迹到 NC 膜上, 80 V 转移 50 min. 用 5%牛血清白蛋

白封闭 NC 膜 1 h, 加 1:2 000 稀释的抗 p38MAPK、p-p38MAPK、caspase-3 抗体, 室温 3 h, 然后用 1:8 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔或山羊抗鼠 IgG 二抗室温 3 h. ECL 试剂显色: 等比例混合 ECL 试剂盒中的 A 液、B 液, 与膜反应 1 min, 显影, 定影, 测蛋白质条带的灰度值.

2.5 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡

p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理 RMG-I-H 细胞, 选取指数生长期 RMG-I-H 细胞制成单细胞悬液, 以 2×10^5 个 / 培养皿, 接种于 35 mm 培养皿中, 培养细胞接种至培养皿 36 h 后弃去 10% 胎牛血清的培养液, 加入含 0.1% DMSO 的 SB203580 培养液, 浓度分别为 0.1 mmol/L、1 mmol/L、10 mmol/L, 另设同样浓度的 0.1% DMSO 为对照组, 继续培养 24 h, 收集细胞. 按 Annexin-V- FICT/PI 试剂盒操作说明染色, 利用流式细胞仪进行检测.

2.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析. 计数资料用 t 检验. $P < 0.05$ 视为有统计学意义.

3 结 果

3.1 p38MAPK、p-p38MAPK 在细胞内的定位分析

利用荧光染色法检测 RMG-I 与 RMG-I-H 细胞 p38MAPK、p-p38MAPK 表达的定位, 结果显示, RMG-I 与 RMG-I-H 的 p38MAPK 蛋白定位在细胞质和细胞核, 以细胞质为主(图 1a, b), p-p38MAPK 蛋白定位在细胞核(图 1c, d).

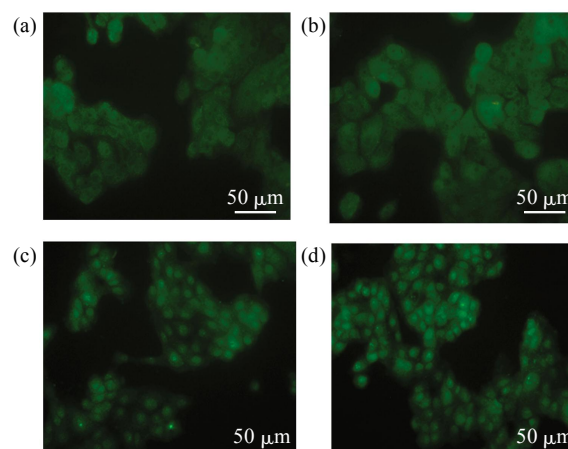


Fig. 1 Localization of p38MAPK and p-p38MAPK in RMG-I and RMG-I-H cells

(a) Localization of p38MAPK of RMG-I cells. (b) Localization of p38MAPK of RMG-I-H cells. (c) Localization of p-p38MAPK of RMG-I cells. (d) Localization of p-p38MAPK in RMG-I-H cells. Immunofluorescence staining of p38MAPK in RMG-I and RMG-I-H cells of showing cytoplasmic localization and nuclear localization, mainly cytoplasmic localization, while p-p38MAPK showing nuclear localization.

3.2 两种细胞系中 FUT-1、p38MAPK、caspase-3 基因的表达

利用 RT-PCR 法分别检测 RMG-I 与 RMG-I-H 细胞中 FUT-1、p38MAPK、caspase-3 基因的表达情况, 结果显示, FUT-1 基因在 RMG-I-H 细胞中的相对表达强度明显高于 RMG-I ($P < 0.05$, 图 2a),

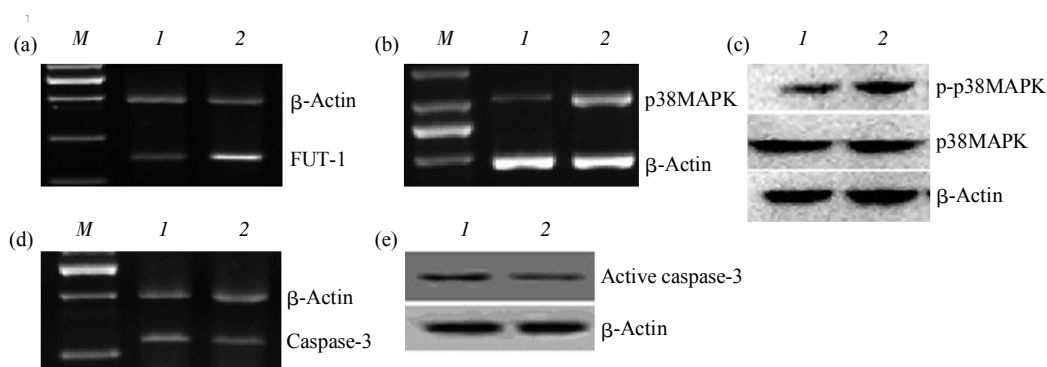


Fig. 2 Expression of FUT-1, p38MAPK and p-p38MAPK in RMG-I and RMG-I-H cells

(a) Expression of FUT-1 on mRNA level. (b) Expression of p38MAPK on mRNA level. (c) Expression of p38MAPK and p-p38MAPK on protein level. (d) Expression of caspase-3 on mRNA level. (e) Expression of caspase-3 on protein level. The expression of p-p38MAPK on mRNA and protein level decreased with anti-Lewis y antibody treated ($P < 0.05$). The relative expression of FUT-1 and p38MAPK on mRNA level in RMG-I-H cells was higher than that in RMG-I cells, while caspase-3 of mRNA level and protein level in RMG-I-H cells were lower than that of RMG-I cells. The expression of p38MAPK on protein level was no statistical difference between the RMG-I and RMG-I-H ($P > 0.05$), while p-p38MAPK was higher than that of RMG-I cells. M: DL-2000 marker; 1: RMG-I; 2: RMG-I-H.

p38MAPK 基因在 RMG-I-H 细胞相对表达强度也明显高于 RMG-I ($P < 0.05$, 图 2b), 而 caspase-3 基因在 RMG-I-H 的相对表达强度明显低于 RMG-I ($P < 0.05$, 图 2d).

3.3 两种细胞系中 p38MAPK、p-p38MAPK、caspase-3 蛋白的表达

利用 Western blot 法检测 RMG-I 与 RMG-I-H 细胞 p38MAPK、p-p38MAPK 及 caspase-3 蛋白的表达, 结果显示, RMG-I-H 细胞 p38MAPK 相对表达强度虽然没有显著差异 ($P > 0.05$), 但其磷酸化形式 p-p38MAPK 相对表达强度明显高于 RMG-I ($P < 0.05$, 图 2c), 而 caspase-3 与基因的变化相一致, RMG-I-H 其相对表达强度明显低于 RMG-I ($P < 0.05$, 图 2e).

3.4 抗 Lewis y 抗体处理后 p38MAPK 表达减少

实验分三个组: 实验组(加入 Lewis y 抗体)、空白组、对照组(加入兔抗人 IgG). 利用抗 Lewis y 抗体处理转染后细胞 RMG-I-H, 结果显示: 与空白组和对照组比较, 处理后细胞 p38MAPK 基因的表达强度明显降低 ($P < 0.05$), 并随着 Lewis y 单克隆抗体作用时间的延长而逐渐降低 ($P < 0.05$, 图 3a, 4b), 对照组和空白组间差异无显著性 ($P > 0.05$); 转染后细胞 p38MAPK 相对表达强度虽然没有显著差异, 但其磷酸化形式 p-p38MAPK 相对表达强度明显下降 ($P < 0.05$), 其强度随着抗体作用时间的延长逐渐减少 ($P < 0.05$, 图 3c, 4d), 对照组和空白组比较差异无显著性 ($P > 0.05$).

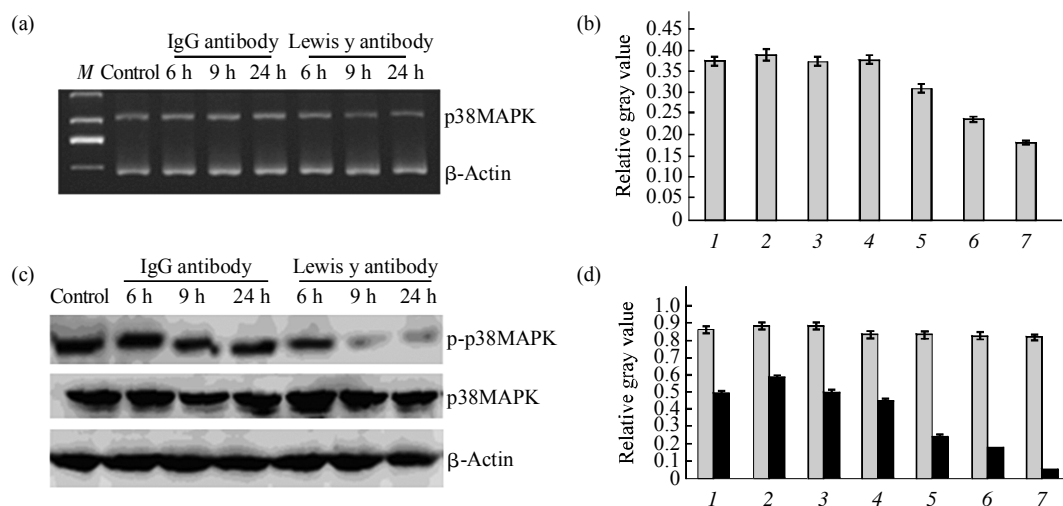


Fig. 3 The expression change of p38MAPK and p-p38MAPK in different periods ranging from 6, 9 and 24 h in RMG-I-H cells of treatment with 0.1%DMSO or SB203580

(a) Effect of anti-Lewis y antibody on p38MAPK on mRNA level in RMG-I-H cells. (b) Relative gray values of mRNA level. (c) Effect of anti-Lewis y antibody on p38MAPK and p-p38MAPK on protein level in RMG-I-H cells. (d) Relative gray values of protein level. The expression of p38MAPK on mRNA level decreased with anti-Lewis y antibody treated ($P < 0.05$), while that on protein level was no significant statistical difference. The expression of p-p38MAPK on protein level decreased with anti-Lewis y antibody treated ($P < 0.05$). However, there was no statistical difference between the control and RMG-I-H with IgG antibody treated ($P > 0.05$). □: p38MAPK; ■: p-p38MAPK; 1: Control; 2: IgG antibody 6 h; 3: IgG antibody 9 h; 4: IgG antibody 24 h; 5: Lewis y antibody 6 h; 6: Lewis y antibody 9 h; 7: Lewis y antibody 24 h.

3.5 SB203580 作用后 RMG-I-H 细胞凋亡率、p38MAPK 和 caspase-3 的变化

3.5.1 细胞凋亡率增加. 用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色后, 正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色(图左下象限); 凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色, 碘化丙啶染色呈阴性(图右下象限); 坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色(图右上象限). 图左上象限出现的是许可范围内的检测

误差. 每个样本计数 1×10^4 个细胞, 在 SB203580 0.1 mmol/L, 1 mmol/L 及 10 mmol/L 三个不同浓度作用下实验组细胞 RMG-I-H 的凋亡率分别为 $(15.927 \pm 0.861)\%$ 、 $(18.187 \pm 0.481)\%$ 及 $(33.565 \pm 0.912)\%$, 明显高于对照组和空白组 ($P < 0.05$), 随着 SB203580 作用浓度增加, 细胞的凋亡率增加 ($P < 0.05$), 而对照组三组间及其和空白组间的凋亡率无明显差别 ($P > 0.05$, 图 4).

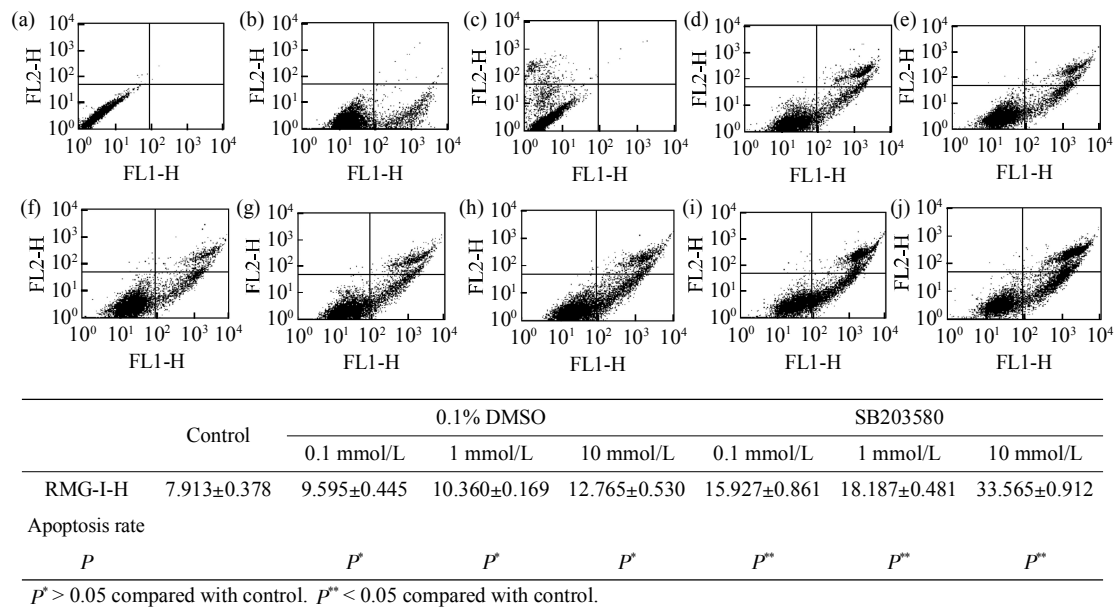


Fig. 4 Flow cytometric analysis of apoptosis

Flow cytometric analysis of cells after treatment with 0.1% DMSO and with SB203580. In the spot map of the flow cytometry, the spots represented normal cells in left inferior quadrant (FITC- /PI-), the spots represented advanced apoptotic and necrosis cells in right superior quadrant (FITC+/PI+), the spots represented viable apoptotic cells in lower right quadrant (FITC- /PI+) and the spots represented mechanical necrosis cells in left superior quadrant (FITC+ /PI+). Cells cultured with 0.1% DMSO (e, f, g) and with SB203580 (h, i, j) for 24 h were stained with annexin-V-FITC/PI according to the manufacturer's instructions and then analyzed with a FACS Calibur. (a) Negative control staining (no FITC or PI). (b) FITC staining. (c) PI staining; (d) Control. (e, f, g) Corresponding to DMSO 0.1 mmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L. (h, i, j) Corresponding to SB203580 0.1 mmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L. Apoptosis rate of cells: The detailed statistical results were showed in Table. There was a significant statistical difference ($P < 0.05$) in the RMG-I-H with SB203580 treated and control. However, there was no statistical difference between the RMG-I-H with 0.1% DMSO treated and control ($P > 0.05$).

3.5.2 p38MAPK 和 caspase-3 基因的表达变化.
p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理后, 与空

白组 and 对照组比较, 实验组 p38MAPK 基因的表达
逐渐减少($P < 0.05$, 图 5a, c), 凋亡因子 caspase-3

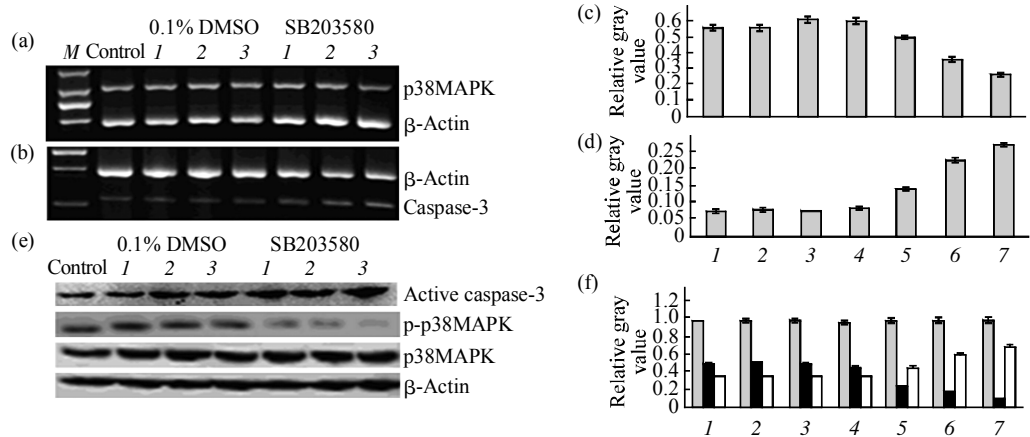


Fig. 5 The expression change of p38MAPK, p-p38MAPK and caspase-3 in RMG-I-H cells in different dose of treatment with 0.1%DMSO or SB203580

(a) Expression of p38MAPK on mRNA level. (b) Expression of caspase-3 on mRNA level. M: DL-2000 marker; 1: 0.1 mmol/L; 2: 1 mmol/L; 3: 10 mmol/L. (c) Relative gray values of p38MAPK on mRNA level. (d) Relative gray values of caspase-3 on mRNA level. (e) Effect of SB203580 on p38MAPK, p-p38MAPK and caspase-3 on protein level in RMG-I-H cells. 1: 0.1 mmol/L; 2: 1 mmol/L; 3: 10 mmol/L. (f) Relative gray values on protein level. 1: Control; 2: DMSO 0.1 mmol/L; 3: DMSO 1 mmol/L; 4: DMSO 10 mmol/L; 5: SB203580 0.1 mmol/L; 6: SB203580 1 mmol/L; 7: SB203580 10 mmol/L. The expression of p38MAPK on mRNA level decreased with SB203580 treated ($P < 0.05$), while that of protein level was no significant statistical difference. The expression of p-p38MAPK on protein level decreased with SB203580 treated ($P < 0.05$). The expression of caspase-3 on mRNA and protein level increased with SB203580 treated ($P < 0.05$). However, there was no statistical difference between the control and RMG-I-H with 0.1%DMSO treated ($P > 0.05$). □: caspase-3; ▤: p38MAPK; ■: p-p38MAPK.

基因表达逐渐增多($P < 0.05$, 图 5b, d), 而对照组三组间及其和空白组间无统计学差异($P > 0.05$).

3.5.3 p38MAPK、p-p38MAPK 和 caspase-3 蛋白的表达变化. p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理后, p38MAPK 相对表达强度虽然没有显著差异, 但其磷酸化形式 p-p38MAPK 相对表达强度明显下降($P < 0.05$), 并随着 SB203580 浓度增加逐渐减少($P < 0.05$), 而凋亡因子 caspase-3 蛋白表达明显增高($P < 0.05$), 并随着 SB203580 浓度增加逐渐增高($P < 0.05$, 图 5e, f). 对照组三组间及其和空白组间无差异性($P > 0.05$).

3.6 卡铂和 SB203580 作用后 p38MAPK 基因表达的变化

分别取指数生长期卵巢癌细胞系 RMG-I 和 RMG-I-H 细胞, 实验分 6 个组: 单加卡铂组(其终浓度为 60 mg/L); 加 SB203580+卡铂组(加入 SB203580

使其终浓度为 10 mmol/L, 预孵育 45 min, 加入卡铂使其终浓度为 60 mg/L); 两细胞系分别另设阴性对照组, 继续培养 72 h, 收集细胞. 利用 RT-PCR 法检测 RMG-I 细胞与 RMG-I-H 细胞的 p38MAPK 基因的表达(图 6), 结果表明, 两细胞系在卡铂作用下 p38MAPK 相对表达强度明显高于相对的阴性对照组($P < 0.05$); 且转染后 RMG-I-H 细胞 p38MAPK 相对表达强度明显高于未转染的 RMG-I 细胞($P < 0.05$); 两细胞系 SB203580+卡铂组 p38MAPK 相对表达强度均明显低于单用卡铂组($P < 0.05$). 两细胞系在卡铂作用下 caspase-3 相对表达强度明显高于相对的阴性对照组($P < 0.05$); 且转染后 RMG-I-H 细胞 p38MAPK 相对表达强度明显低于未转染的 RMG-I 细胞($P < 0.05$); 两细胞系 SB203580+卡铂组 caspase-3 相对表达强度均明显高于单用卡铂组($P < 0.05$).

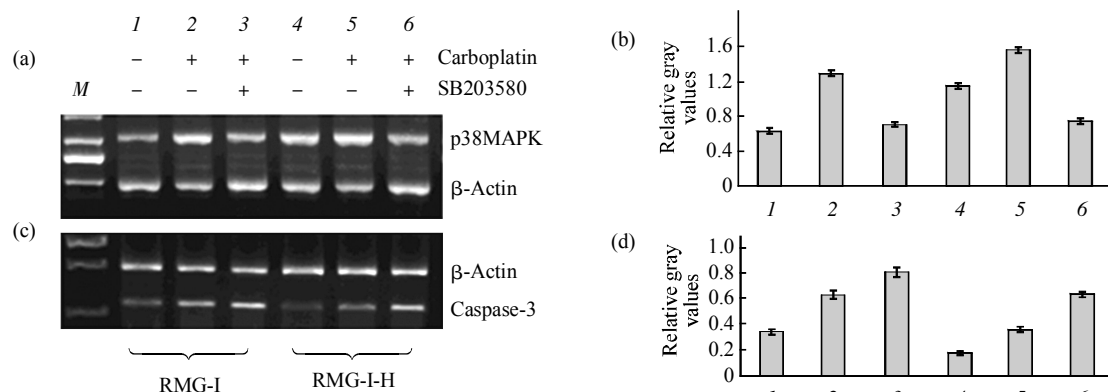


Fig. 6 The mRNA level expression change of p38MAPK and caspase-3 in RMG-I-H cells of treatment with Carboplatin or SB203580

(a) Expression of p38MAPK on mRNA level. *M*: . (b) Relative gray values of p38MAPK. (c) Expression of caspase-3 on mRNA level. (d) Relative gray values of caspase-3. The expression of p38MAPK and caspase-3 on mRNA level in RMG-I-H and RMG-I cells in the Carboplatin (+) /SB203580(-) groups was higher than that of in Carboplatin (-) /SB203580(-) groups ($P < 0.05$). The expression of p38MAPK on mRNA level in RMG-I-H and RMG-I cells in the Carboplatin (+) /SB203580(+) groups was lower than that of in Carboplatin (+) /SB203580(-) groups ($P < 0.05$), while the expression of caspase-3 on mRNA level in RMG-I-H and RMG-I cells in the Carboplatin (+) /SB203580(+) groups was higher than that of in Carboplatin (+) / SB203580 (-) groups ($P < 0.05$). 1~3: RMG-I, 4~6: RMG-I-H. 1: Carboplatin -SB203580-; 2: Carboplatin +SB203580-; 3: Carboplatin+SB203580+; 4: Carboplatin - SB203580-; 5: Carboplatin+SB203580-; 6: Carboplatin+SB203580+.

4 讨 论

恶性肿瘤耐药性的产生是极其复杂的多因素的过程, 其发生机理尚不清楚, 目前认为, 可能与进入细胞内药物的外排增加、细胞内解毒物质的增多、药物靶位点的变异或药物损伤后的靶位点修复的增强以及细胞凋亡的减弱等多种机制有关. 我们在前期研究中发现, 细胞表面 Lewis y 增加卵巢癌 RMG-I 对卡铂、5-Fu 及紫杉醇的耐药性^[3, 5], 但是

Lewis y 引起耐药性的具体机理目前尚不清楚.

Lewis y 抗原是双岩藻糖基化的寡糖, 属于 A, B, O, Lewis 血型家族成员. 75% 的上皮性卵巢癌出现 Lewis y 不同程度的过量表达, 且表达增加的患者预后不佳^[1-2], 我们利用基因转染的方法将人 $\alpha 1,2$ -FT 基因转入人卵巢癌细胞系 RMG-I 建立 Lewis y 抗原稳定高表达细胞系 RMG-I-H^[3], 利用细胞免疫化学染色法检测 RMG-I-H 和 RMG-I 细胞膜上 Lewis y 抗原的表达, 结果显示, RMG-I-H 的

Lewis y 表达明显高于 RMG-I^[4], 并利用该细胞系进一步证明了 Lewis y 抗原的表达与卵巢癌的恶性生物学行为有关^[4, 6]. 本实验通过 RT-PCR 方法证明 RMG-I 细胞转染 $\alpha 1, 2$ -FT 基因后 FUT-1 mRNA 及 Lewis y 抗原水平显著增加的同时, caspase-3 凋亡因子 mRNA 和蛋白质水平显著减少, 另外, 在前期的研究中我们用流式细胞仪也检测出转染后细胞 RMG-I-H 的凋亡率减少^[4], 提示转染后 Lewis y 抗原高表达的同时细胞凋亡减弱.

我们利用基因芯片的方法研究发现, $\alpha 1, 2$ -FT 基因转染后的人卵巢癌细胞系 RMG-I-H 与转染前的细胞系 RMG-I 相比, 有 88 种差异性表达基因, 其中 60 种基因表达增强, 差异表达的基因参与了细胞增殖、信号转导、细胞黏附等多方面^[8]. 我们还发现, $\alpha 1, 2$ -FT 基因转染后 RMG-I-H 细胞的部分耐药蛋白在基因及蛋白质水平表达明显增高(如 MDR-1、MRP-1、MRP-2、PKC- α 、Topo I), 其变化与 Lewis y 抗原表达密切相关^[9], 其中 PKC- α 作为细胞传导通路中经典的蛋白激酶, 可激活抗凋亡的信号传导通路进而参与多种肿瘤细胞的耐药性. 另外, Hsieh 等^[10]研究结果发现, 蛋白激酶 C- α (protein kinase C alpha, PKC- α)低表达的细胞株细胞增殖能力、侵袭性均降低, 且 p38MAPK 磷酸化水平降低, 经 p38MAPK 抑制剂 SB203580 作用后细胞株的增殖侵袭及转移能力也降低, 提示 p38MAPK 参与 PKC- α 介导的肝癌细胞增殖和侵袭. 因此我们推测, Lewis y 抗原可能作为细胞表面信号传导系统的重要组成成分, 参与细胞的耐药性.

2004 年 Klinger 等^[7]发现抗 Lewis y 抗体能通过抑制 EGFR 介导的信号转导通路 MAPK 的磷酸化, 促进肿瘤细胞的凋亡. p38MAPK 信号转导通路是 MAPK 家族中的重要组成部分, 其主要在一系列应激、凋亡和分化反应中起作用. 目前已知一些促炎因子、应激刺激可激活 p38MAPK, 此外, p38MAPK 还可被脂多糖及 G⁺细菌细胞壁成分所激活. 本实验通过 RT-PCR, Western blot 法证实人卵巢癌 RMG-I 细胞转染 $\alpha 1, 2$ -FT 基因后 p38MAPK mRNA 表达量明显增加. 虽然转染前后细胞系 p38MAPK 表达量没有明显的变化($P > 0.05$), 但是其磷酸化形式表达量却明显增加($P < 0.05$). 抗 Lewis y 单克隆抗体可以阻断 p38MAPK 的磷酸化, 而且阻断效应随着时间的增加而加强($P < 0.05$), 说明 Lewis y 抗原与 p38MAPK 信号通路密切相关.

p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 作用后细胞凋亡明显增加, 而凋亡因子 caspase-3 在 mRNA 和蛋白质水平都随着抑制剂浓度的增加而显著增加, 提示了卵巢癌 RMG-I-H 细胞表面的 Lewis y 抗原是通过激活 p38MAPK 信号通路起到抑制凋亡的作用.

我们前期研究发现, $\alpha 1, 2$ -FT 基因转染后卵巢癌细胞 RMG-I-H 对卡铂的耐药性明显增强^[9]. 本实验利用卡铂和 SB203580+卡铂作用于两细胞系, 结果显示: 两组细胞单用卡铂组 p38MAPK 及 caspase-3 相对表达强度均明显高于其相对的阴性对照组($P < 0.05$), 而转染后 RMG-I-H 细胞单用卡铂组 p38MAPK 及 caspase-3 相对表达强度均明显高于未转染 RMG-I 细胞单用卡铂组($P < 0.05$), 两细胞系 SB203580+卡铂组 p38MAPK 相对表达强度均明显低于相对的单用卡铂组($P < 0.05$), 同时 caspase-3 相对表达强度均明显高于相对的单用卡铂组($P < 0.05$), 而两细胞系 SB203580+卡铂组间 p38MAPK 及 caspase-3 相对表达强度没有明显的差异($P > 0.05$), 进一步提示, 细胞通过 p38MAPK 途径抑制凋亡, 参与细胞对卡铂的耐药性. 而 Lewis y 作为 EGFR 上的重要组成部分(结果未显示), 参与上述细胞的耐药性.

关于 p38MAPK 信号通路与细胞凋亡的关系, 目前并没有统一说法. 本实验通过 RT-PCR、Western blot 法和流式细胞检测证实, 卵巢癌 RMG-I-H 细胞表面的 Lewis y 抗原通过激活 p38MAPK 信号通路起到抑制凋亡的作用, 在 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 作用后细胞凋亡明显增加, 而凋亡因子 caspase-3 在 mRNA 和蛋白质水平都随着抑制剂浓度的增加而显著增加. Flacke 等^[11]报道 p38MAPK 和 Akt 激酶的短暂激活导致凋亡细胞的数量、caspase-3 分裂和 Bcl-xL 过表达都显著地减少, 这些作用能被 Akt- 或者 p38-磷酸化形式的阻碍而阻断. Tsuchiya 等^[12]报道在结肠癌 DLD-1 和 SW480 细胞系中, p38MAPK 的抑制剂 FR167653 能剂量依赖方式抑制细胞的增殖, 增加细胞凋亡, 同时激活 caspase-3, 8, 9, 这些说明 p38MAPK 信号通路有抑制细胞凋亡的作用. 另外, 还有研究表明 p38MAPK 有诱导细胞凋亡的作用, Tikhomirov 等^[13]认为, 乳腺癌细胞中 EGFR 和 ErbB-2 的高表达可导致 p38MAPK 的持续激活, 激活的 p38MAPK 直接结合并磷酸化 Bcl-2, 进一步诱导下游 caspases 的活化, 引发细胞凋亡.

Liu 等^[4]发现, 邻乙汞硫基苯酸钠通过磷酸化 p38MAPK 介导 caspase-3 的活化, 诱导 SCM1 细胞 Ca^{2+} 非依赖性凋亡. 由此可见, 虽然 p38MAPK 在不同的细胞系中参与凋亡机制有所不同, 这可能由细胞系的不同或者细胞周边环境的不同而引起, 但值得关注的是 p38MAPK 确实与肿瘤细胞凋亡密切相关, 这有利于我们研究肿瘤耐药性的机制, 有助于我们探索对癌症治疗的新发现.

综上所述, 本实验证实了细胞系 RMG-I-H 表面的 Lewis y 抗原在通过 p38MAPK 通路抑制凋亡、引起细胞耐药性等方面起着重要的作用, 我们认为, Lewis y 抗原可能成为卵巢癌治疗及卵巢癌耐药性机制研究的新靶点, 将有利于改善临床卵巢癌的基因治疗和预后, 其机制还有待于进一步的研究.

参 考 文 献

- [1] 刁 斌, 黄金双, 林 蓓, 等. Le y 抗原在卵巢上皮性肿瘤中的表达及意义. 现代肿瘤医学, 2008, **6**(5): 555-558
Diao B, Huang J S, Lin B, *et al.* J Modern Oncology, 2008, **16**(5): 555-558
- [2] David C C, Cristina R B, Lynya I T, *et al.* Expression of CEA, Tag-72, and Lewis-Y antigen in primary and metastatic lesions of ovarian carcinoma. Hum Pathol, 2003, **34**(10): 1016-1021
- [3] Iwamori M, Tanaka K, Lin B, *et al.* Alterations in the glycolipid composition and cellular properties of ovarian carcinoma-derived RMG-1 cells on transfection of the alpha1, 2-fucosyltransferase gene. Cancer Sci, 2005, **96**(1): 26-30
- [4] 郝莹莹, 林 蓓, 赵 越, 等. $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因转染对卵巢癌细胞生物学行为的影响. 分子细胞生物学报, 2008, **41**(6): 435-442
Hao Y Y, Lin B, Zhao Y, *et al.* J Mol Cell Biol, 2008, **41**(6): 435-442
- [5] 赵 越, 林 蓓, 郝莹莹, 等. 卵巢癌细胞系 RMG-I Lewis (y) 抗原含量变化影响其对卡铂的耐药性. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(10): 1175-1182
Zhao Y, Lin B, Hao Y Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(10): 1175-1182
- [6] 李飞飞, 林 蓓, 郝莹莹, 等. Lewis y 抗体对 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因转染后卵巢癌细胞的体外抑制作用. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, **24**(3): 267-269
Li F F, Lin B, Hao Y Y, *et al.* Chin J Cell Mol Immun, 2008, **24**(3): 267-269
- [7] Klinger M, Farhan H. Antibodies directed against Lewis-y antigen inhibit signaling of Lewis-Y modified ErbB receptors. Cancer Res, 2004, **64**(3): 1087-1093
- [8] 朱连成, 林 蓓, 郝莹莹, 等. 转染 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因对人卵巢癌细胞系 RMG-I 癌相关基因表达的影响. 癌症, 2008, **27**(9): 934-941
Zhu L C, Lin B, Hao Y Y, *et al.* Chin J Cancer, 2008, **27**(9): 934-941
- [9] 刘 晴, 林 蓓, 王朋丽, 等. Lewis y 抗原对人巢癌细胞 RMG-I-H 部分耐药相关蛋白基因表达的影响. 中国医学科学院学报, 2009, **31**(4): 481-487
Liu Q, Lin B, Wang P L, *et al.* Acta Acad Med Sin. 2009, **31**(4): 481-487
- [10] Hsieh Y H, Wu T T, Huang C Y. p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res, 2007, **67**(9): 4320-4327
- [11] Flacke J P, Kumar S, Kostin S, *et al.* Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression. Apoptosis, 2009, **14**(1): 90-96
- [12] Tsuchiya T, Tsuno N H, Asakage M, *et al.* Apoptosis induction by p38 MAPK inhibitor in human colon cancer cells. Hepatogastroenterology, 2008, **55**(84): 930-935
- [13] Tikhomirov O, Carpenter G. Ligand-induced p38-dependent apoptosis in cells expressing high levels of epidermal growth factor receptor and ErbB-2. J Biol Chem, 2004, **279**(13): 12988-12996
- [14] Liu S I, Huang C C, Huang C J. Thimerosal- induced apoptosis in human SCM1 gastric cancer cells: activation of p38 MAPkinase and caspase-3 pathways without involvement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. Toxicol Sci, 2007, **100**(1): 109-117

The Effect of α 1, 2-Fucosyl Transferase Gene Transfection on p38MAPK Signaling Pathway-mediated Apoptosis of Ovarian Carcinoma RMG-I Cells*

CONG Jian-Ping, LIN Bei**, LIU Juan-Juan, LIU Qing, LI Fei-Fei, LIU Shui-Ce, GAO Song, ZHANG Shu-Lan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract To study the effect of α 1,2-fucosyltransferase gene transfection on p38MAPK signaling pathway-mediated apoptosis in ovarian carcinoma RMG-I cells. The localization of p38MAPK and p-p38MAPK was detected by immunofluorescence in RMG-I and RMG-I-H cells. The expression of p38MAPK and p-p38MAPK was analyzed by RT-PCR and Western blot, respectively. For inhibition assay, anti-Lewis y antibody was used to assess the change of p38MAPK of mRNA level in RMG-I-H cells by RT-PCR and Western blot. Using 0.1% DMSO as control, the apoptosis rate was detected by flow cytometry (FCM) in SB203580 treated RMG-I-H cells. Simultaneously, the expression of p38MAPK and caspase-3 was analyzed by RT-PCR and Western blot. Furthermore, the expression of p38MAPK and caspase-3 by RT-PCR after Carboplatin and/or SB203580 treatment were studied. Results showed that immunofluorescence staining of p38MAPK and p-p38MAPK in RMG-I and RMG-I-H cells showed cytoplasmic localization and nuclear localization, respectively, and the level of p-p38MAPK mRNA in RMG-I-H cells is significantly higher than that in RMG-I cells ($P < 0.05$), while the expression of p-p38MAPK mRNA decreased after anti-Lewis y antibody treatment ($P < 0.05$). FCM showed that the apoptosis rate increased in SB203580 treated RMG-I-H cells ($P < 0.05$). The mRNA level of p38MAPK and caspase-3 increased by treatment with Carboplatin. The mRNA level of caspase-3 also elevated by treatment with SB203580. In conclusion, high expression of Lewis y inhibits apoptosis in ovarian cancer cells, probably due to involvement of Lewis y in regulating p38MAPK signaling pathway, thereby causing drug resistance.

Key words ovarian cancer, Lewis y antigen, p38MAPK, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00459

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30170980, 30571958, 30872757), Educational Department Science Foundation of Liaoning Province (20121268), Liaoning Natural Science Foundation (20052107), Educational Department Doctor Startup Fund (20070159023), Educational Department Key Laboratory of Liaoning Province (2008S247) and Shengjing Freedom Researchers Plan (200807).

**Corresponding author.

Tel: 86-24-83956387, E-mail: linbei88@hotmail.com

Received: July 28, 2009 Accepted: December 1, 2009