

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.22.004

阻断 p38 丝裂原活化蛋白激酶在细胞空泡形成中的作用*

张春燕¹,冯春红²,敬健雄²,段春燕¹,刘友平¹,夏先明²,李洪¹,代荣阳¹,陈绍坤^{3△}
(泸州医学院:1.生物化学教研室;2.肝胆外科;3.生物教研室,四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)通路与细胞空泡形成的关系。方法 应用茴香霉素、放线菌酮、p38 MAPK 抑制剂 SB203580、JNK 抑制剂 SP600125 处理 HepG2、LM3、QBC939、Hela 和 A549 细胞,光学显微镜和激光共聚焦显微镜观察细胞空泡化情况;Western blot 法检测 p38 MAPK 等通路相关分子的表达水平;内质网红色荧光探针标记内质网,激光共聚焦显微镜观察内质网结构变化;溶酶体红色荧光探针标记溶酶体,激光共聚焦显微镜观察溶酶体荧光染色情况。结果 (1)茴香霉素对 HepG2 细胞空泡有消除作用。(2)茴香霉素通过活化 p38 MAPK 消除细胞空泡。(3)阻断 p38 MAPK 诱导多种肿瘤细胞空泡形成。(4)阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成破坏内质网结构的整体性。(5)阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成具有可逆性。结论 p38 MAPK 通路在调节细胞空泡形成中发挥了重要作用。

关键词:细胞空泡;p38 丝裂原活化蛋白激酶;内质网;SB203580

中图分类号:R34

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)22-2841-04

The role of suppression of p38 MAPK in cellular vacuole formation*

Zhang Chunyan¹,Feng Chunhong²,Jing Jianxiong²,Duan Chunyan¹,Liu Youping¹,
Xia Xianming²,Li Hong¹,Dai Rongyang¹,Chen Shaokun^{3△}(1. Department of Biochemistry;2. Department of Hepatobiliary Surgery;3. Department of Biology,
Luzhou Medical College,Luzhou,Sichuan 646000,China)

Abstract: Objective To investigate the role of the p38 MAPK pathway in the formation of cytoplasmic vacuoles. **Methods** After treated with Anisomycin,SB203580 or SP600125,images of HepG2,LM3,QBC939,Hela and A549 cells were recorded by light microscopy and taken at a magnification of 400×. The effects of anisomycin,SB203580 and SP600125 on the activity of p38 and JNK were measured by Western blot. LM3 and A549 cells were stained with the ER-tracker red and the lyso-tracker red and subjected to confocal microscopy analysis. **Results** (1)Anisomycin could abolish cytoplasmic vacuolization of HepG2 cells. (2)p38 MAPK activation was responsible for anisomycin-induced cytoplasmic vacuolization abolishment. (3)p38 MAPK blocking initiated cytoplasmic vacuoles formation in various cancer cell lines. (4)p38 MAPK blocking-induced cytoplasmic vacuoles disrupted the integrity of endoplasmic reticulum. (5)p38 MAPK blocking reversibly induced cytoplasmic vacuoles formation. **Conclusion** These observations provide direct evidence for a role of p38 MAPK signaling in regulating the formation of cytoplasmic vacuoles.

Key words:cytoplasmic vacuoles;p38 MAPK;endoplasmic reticulum;SB203580

为了适应环境变化,细胞会发生一系列诸如皱缩、膨胀、分裂和空泡形成等形态学的改变。化学和生物活性物质诱导细胞形成的细胞质空泡是一种显著且常见的现象^[1-2],此外,细胞空泡也能自发形成^[3]。细胞空泡化的程度主要取决于细胞类型^[4-5],有些细胞极易发生空泡化,有些细胞则很难形成空泡。

有报道表明^[6-7],细胞空泡就好比是细胞内帮助消化的酸性区域。这个酸性区域的组成、来源及形成机制除了取决于细胞类型,也取决于细胞空泡的诱导剂。有学者认为^[8-9],细胞的自体吞噬介导了空泡形成,细胞空泡可能代表了某种典型的自体吞噬。但是,有的细胞空泡并非来自于自体吞噬,自体吞噬也并非总是介导空泡形成^[10-11]。也有学者认为^[12-13],细胞空泡与细胞凋亡密切相关。有些凋亡诱导剂可诱导细胞空泡化,并通过空泡形成参与细胞凋亡的调控。值得注意的是^[14],有的细胞空泡并不是因凋亡而产生,有些空泡诱导剂诱导了细胞空泡形成,但并不引发细胞凋亡。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK),如 p38 MAPK 是细胞内重要信号通路,MAPK 通路在细胞炎症反应、凋亡、生长和细胞应激等多种生理和病理过程中起着重要的调节作用。虽然

目前已明确细胞空泡与细胞应激反应密切相关^[15],但是,细胞空泡的形成是否受到细胞应激反应信号通路 p38 MAPK 的调节尚不清楚。

本实验旨在探讨 p38 MAPK 是否参与了细胞空泡形成。研究发现细胞空泡可在 HepG2 细胞中自发形成,这些空泡可被茴香霉素(Anisomycin)通过活化 p38 MAPK 而消除。此外,阻断 p38 MAPK 可诱导多种肿瘤细胞空泡形成。本实验结果表明 p38 MAPK 在调节细胞空泡形成中发挥了重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料 Anisomycin、放线菌酮(Cycloheximide,CHX)、SB203580、SP600125 购自 Merck 公司;细胞培养试剂购自 Gibco 公司;β-actin、p-MAPKAPK2、MAPKAPK2、p38 MAPK、磷酸化 c-Jun 抗体购自 CST 公司;内质网红色荧光探针及溶酶体红色荧光探针购自 Invitrogen 公司;电泳试剂均购自 Bio-Rad 公司;其他为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及处理 肿瘤细胞株 HepG2、LM3、QBC939、Hela 和 A549 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000886);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-1058);四川省杰出青年学术技术带头人培育计划(2013JQ0045);四川省卫生厅资助项目(090193)。作者简介:张春燕(1981-),硕士,讲师,主要从事生物化学与分子生物学、细胞信号转导研究。△ 通讯作者,Tel:(0830)3160073;E-mail:luyiesk@163.com。

选取对数生长期细胞进行后续实验。培养细胞分别用 anisomycin(0.25、0.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SB203580(0、2.5、5.0、10.0 μmol)、SP600125(20 nmol)及 CHX(5、10、15 μmol)处理,并按在对应时间点观察细胞空泡化情况。

1.2.2 Western blot 法检测 p38 MAPK 等通路相关分子的表达水平 HepG2 细胞常规培养,各实验组给予不同的处理因素后,收集细胞,提取各组细胞蛋白,进行 Western blot 检测。总蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移到 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭,加 I 抗: β -actin、p-MAPKAPK2、MAPKAPK2、p38 MAPK、p-c-jun、c-Jun,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜 3 次,加 II 抗孵育 1 h, ECL 法显色,凝胶成像系统扫描分析结果。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察内质网及溶酶体形态 LM3、A549 细胞常规培养,各实验组给予不同的处理因素后,对照组用二甲基亚砜(DMSO)做相同处理,用内质网红色荧光探针和 DAPI 探针标记内质网,得到内质网断层扫描图像;溶酶体红色荧光探针标记溶酶体,得到溶酶体荧光染色图像,再经激光共聚焦显微镜观察分析。

2 结 果

2.1 Anisomycin 对 HepG2 细胞空泡的消除作用 实验组应用不同剂量的 p38 MAPK 和 JNK 的激活剂 Anisomycin(0.25、0.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用于 HepG2 细胞 12 h,对照组用 DMSO 做相同处理。光学显微镜下观察比较,可见 Anisomycin 对 HepG2 细胞内自发形成的空泡有消除作用,呈剂量-效应关系,见图 1A。应用 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anisomycin 分别作用于 HepG2 细胞 0、3、6、12 h,该消除作用呈时间-效应关系,见图 1B。该结果表明 Anisomycin 能有效消除 HepG2 细胞空泡, p38 MAPK 和 JNK 信号通路可能参与了细胞空泡化的调节。

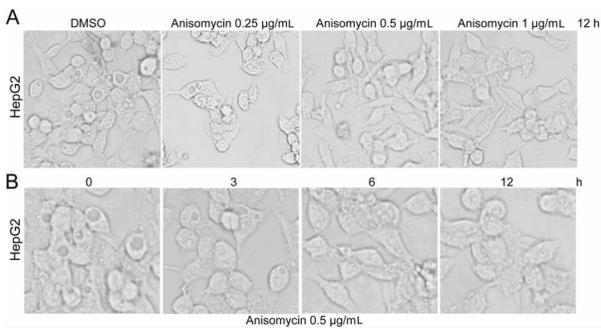


图 1 Anisomycin 对 HepG2 细胞空泡的消除作用($\times 400$)

2.2 Anisomycin 通过活化 p38 MAPK 消除细胞空泡 p38 MAPK 抑制剂(SB)组和 JNK 抑制剂(SP)组分别应用 5.0 μmol SB203580、20 nmol SP600125 作用于 HepG2 细胞 12 h,对照组用 DMSO 做相同处理, Anisomycin 组应用 0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ Anisomycin 作用 12 h, Anisomycin+SB 组和 Anisomycin+SP 组分别应用 5.0 μmol SB203580、20 nmol SP600125 对 HepG2 细胞预处理 1 h,再 0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ Anisomycin 共同作用 12 h。光学显微镜下观察比较,可见 Anisomycin+SB 组的明显空泡化, Anisomycin+SP 组与 Anisomycin 组比较,差异无统计学意义(图 2A)。表明 SB203580 能阻断 Anisomycin 对 HepG2 细胞空泡的消除作用, SP600125 却不能阻断该消除作用。Western blot 结果显示, Anisomycin 对 p38 MAPK 和 JNK 的下游效应产物 p-MAPKAPK2 和 p-c-jun 的表达水平均有上调作用。这表明了 Anisomycin 能活化 HepG2 细胞内 p38 MAPK 和 JNK 通路, SB203580 选择性抑制 p38 MAPK 通路, SP600125 选择性抑制 JNK 通路。结果表明 Anisomycin 是通

过活化 p38 MAPK 消除细胞空泡。

实验组应用不同剂量的蛋白合成抑制剂 CHX(5、10、15 μmol)作用于 HepG2 细胞 12 h,对照组用 DMSO 做相同处理。光学显微镜下观察比较, CHX 不能消除 HepG2 细胞空泡,表明 Anisomycin 对空泡的消除作用与它的抑制蛋白合成作用无关(图 2B)。

2.3 阻断 p38 MAPK 诱导 LM3 细胞空泡形成 应用不同剂量的 p38 MAPK 选择性抑制剂 SB203580(0、2.5、5.0、10.0 μmol)作用于 LM3 细胞 12 h,诱导空泡形成,呈剂量-效应关系(图 3A)。应用 5.0 μmol SB203580 分别作用于 LM3 细胞 0、6、12、24 h,诱导空泡形成,呈时间-效应关系(图 3B)。该结果表明阻断 p38 MAPK 可诱导 LM3 细胞空泡形成,呈剂量-时间双重效应关系。

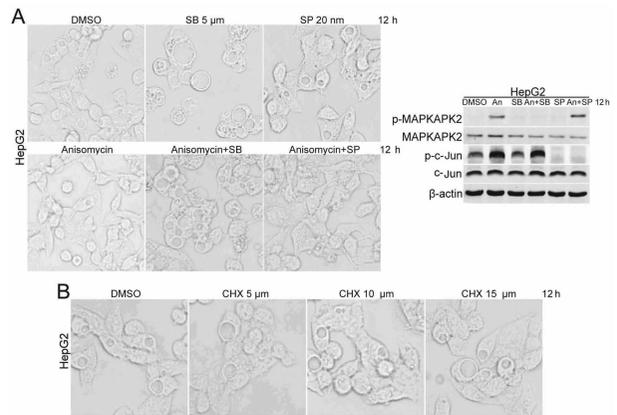


图 2 Anisomycin 通过活化 p38 MAPK 消除细胞空泡($\times 400$)

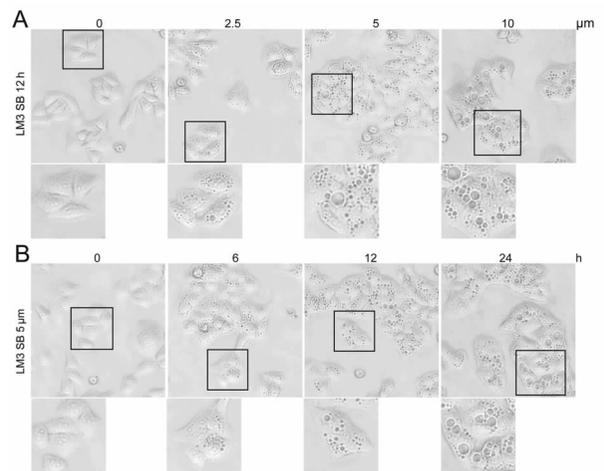


图 3 阻断 p38 MAPK 诱导细胞空泡形成($\times 200$)

2.4 阻断 p38 MAPK 诱导多种肿瘤细胞空泡形成 实验组应用 5.0 μmol SB203580 分别作用于 QBC939、LM3、Hela 细胞 12 h,对照组用 DMSO 做相同处理。光学显微镜下观察比较,可见实验组细胞内大量空泡形成(图 4)。表明阻断 p38 MAPK 可诱导多种肿瘤细胞的空泡形成。

2.5 阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成破坏内质网结构的整体性 实验组应用 5.0 μmol SB203580 分别作用于 LM3、A549 细胞 12 h,对照组用 DMSO 做相同处理,进行内质网红色荧光探针和 DAPI 探针标记内质网,得到内质网断层扫描图像。再经激光共聚焦显微镜观察分析,显示对照组细胞的内质网结构完整,实验组细胞的内质网结构不完整(图 5)。表明阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成破坏了内质网结构的整体性。

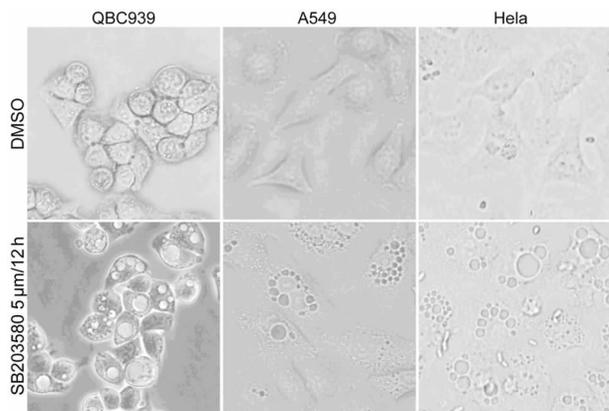


图 4 阻断 p38 MAPK 诱导多种肿瘤细胞空泡形成 (×400)

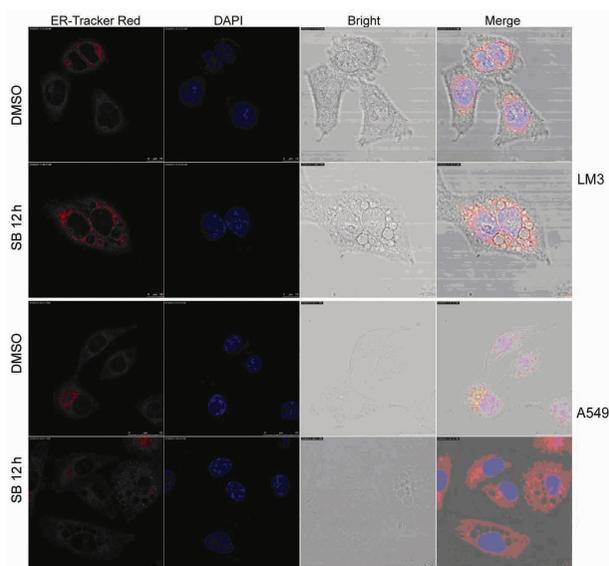


图 5 阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成破坏内质网结构的完整性

2.6 阻断 p38 MAPK 形成空泡的泡内 pH 值 应用 5.0 μmol SB203580 分别作用于 LM3、A549 细胞 12 h, 进行溶酶体红色荧光探针标记溶酶体, 经激光共聚焦显微镜观察分析, 显示阻断 p38 MAPK 形成的空泡之中, 只有很少一部分呈现荧光染色(图 6)。表明阻断 p38 MAPK 形成的空泡, 只有少数的泡内 pH 值为酸性。

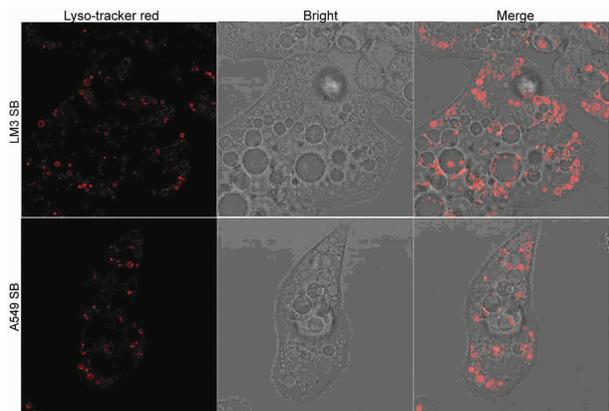


图 6 阻断 p38 MAPK 形成空泡的泡内 pH 值

2.7 阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成具有可逆性 实验组应用 5.0 μmol SBF203580 分别作用于 LM3、A549 细胞 12 h,

再换不含 SB203580 的培养基继续培养 6 h, 对照组用 DMSO 做相同处理。光学显微镜下观察, 可见实验组经 SB203580 作用 12 h, 与对照组相比, 细胞内有大量空泡形成; 而换不含 SB203580 的培养基 6 h 后, 与对照组比较, 细胞内空泡化无明显差异(图 7)。表明阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成具有可逆性。

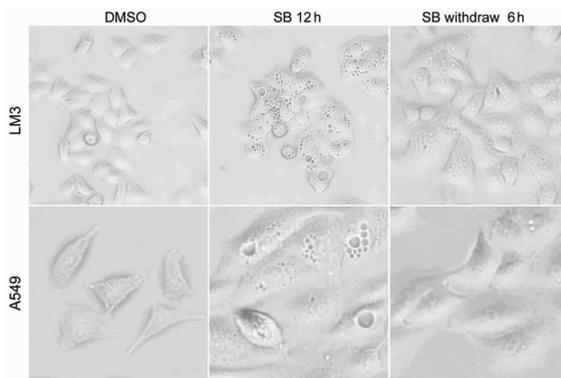


图 7 阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成具有可逆性

3 讨论

细胞空泡化是发生在哺乳类动物细胞中常见的形态学现象之一。细胞局部环境的改变是引起细胞空泡化的根本原因, 细胞空泡可自发形成或经诱导刺激而形成。但是, 细胞应激信号通路是否参与细胞空泡化, 目前尚不明确。本实验旨在探讨 p38 MAPK 通路是否参与了细胞空泡形成。通过研究发现 p38 MAPK 在调节细胞空泡形成中具有重要作用。

应用 Anisomycin 能有效消除 HepG2 细胞空泡, 因为 Anisomycin 是 p38 MAPK 和 JNK 的共同激活剂, 这就提示 p38 MAPK 和 JNK 信号通路可能参与了细胞空泡化。由于阻断 p38 MAPK 可抑制 Anisomycin 对细胞空泡的消除作用, 阻断 JNK 却不能抑制 Anisomycin 的消除作用, 提示 Anisomycin 是通过活化 p38 MAPK 消除细胞空泡的, 而不是活化 JNK。又因 Anisomycin 是一种蛋白合成抑制剂, 为了确认它对空泡的清除作用是否与抑制蛋白合成有关, 本实验应用了另一种经典的蛋白合成抑制剂 CHX 作用于 HepG2 细胞, 发现 CHX 不能消除 HepG2 细胞空泡, 表明 Anisomycin 对空泡的消除作用与它的抑制蛋白合成作用无关, 进一步证明了 Anisomycin 对空泡的清除作用是通过活化 p38 MAPK 来实现的。

本实验应用 p38 MAPK 通路的选择性抑制 SB203580 阻断 p38 MAPK 通路, 发现可诱导多种肿瘤细胞空泡形成, 表明阻断 p38 MAPK 在细胞空泡形成中发挥了重要作用。最近有研究报道^[14]SB202190 可以不依赖 p38 MAPK 信号通路介导细胞空泡形成, 分析原因可能是因为所用细胞类型和本实验不同。细胞空泡可在 HepG2 细胞中自发形成, 却不能自发形成于 LM3、A549 细胞, 可能是不同细胞类型中 p38 MAPK 的活化情况不同。此外, 不同细胞类型中的 p38 MAPK 通路的功能也不相同, p38 MAPK 通路并不是惟一调节细胞空泡形成的通路。因此, p38 MAPK 通路在细胞空泡化的作用, 主要取决于细胞类型, 而 p38 MAPK 活化或阻断的程度, 在很大程度上也取决于细胞类型。

本实验通过激光共聚焦显微镜观察分析内质网断层扫描图像, 发现阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成破坏了内质网结构的整体性。内质网结构完整性的破坏提示空泡化可能与内质网的应激反应有关。已有报道表明^[6-7], 细胞空泡就好比是细胞内帮助消化的酸性小区域。本实验对阻断 p38 MAPK 形成的空泡进行溶酶体红色荧光探针标记溶酶体, 经激光共聚焦

显微镜观察分析,显示阻断 p38 MAPK 形成的空泡之中,只有很少一部分呈现荧光染色。表明阻断 p38 MAPK 形成的空泡,只有少数的泡内 pH 值为酸性。另外,阻断 p38 MAPK 可介导空泡形成,当去除阻断剂细胞空泡则可消除,表明阻断 p38 MAPK 介导的空泡形成具有可逆性。

本实验结果提示 p38 MAPK 在调节细胞空泡形成中的重要作用,p38 MAPK 在调节细胞空泡形成中的分子机制有待于后续实验进一步探讨。

参考文献:

- [1] Morissette G, Moreau E, C-Gaudreault R, et al. Massive cell vacuolization induced by organic amines such as procainamide[J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310(1): 395-406.
- [2] Wang C, Chen T. Intratumoral injection of taxol in vivo suppresses A549 tumor showing cytoplasmic vacuolization[J]. *Cell Biochem*, 2012, 113(4): 1397-1406.
- [3] Kar R, Singha PK, Venkatachalam MA, et al. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells[J]. *Onco Gene*, 2009, 28(28): 2556-2568.
- [4] Ohkuma S, Poole B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances[J]. *Cell Biol*, 1981, 90(3): 656-664.
- [5] Henics T, Wheatley DN. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features[J]. *Biol Cell*, 1999, 91(7): 485-498.
- [6] Hiruma H, Kawakami T. Characteristics of weak base-induced vacuoles formed around individual acidic organelles[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2011, 49(2): 272-279.
- [7] Funakoshi T, Aki T, Unuma K, et al. Lysosome vacuolation disrupts the completion of autophagy during

norephedrine exposure in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *Brain Res*, 2012, 1490(15): 9-22.

- [8] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2008, 10(3): 216-223.
- [9] Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, et al. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 797: 111-125.
- [10] Tasdemir E, Maiuri MC, Tajeddine N, et al. Cell cycle-dependent induction of autophagy, mitophagy and reticulophagy[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(18): 2263-2267.
- [11] Zhang Y, Yu C, Huang G, et al. Nano rare-earth oxides induced size-dependent vacuolization: An independent pathway from autophagy[J]. *Int J Nanomed*, 2010, 5(1): 601-609.
- [12] Dutta R, Das N. Immunomodulation of serum complement (C3) and macrophages by synthetic pyrethroid fenvalerate[J]. *In vitro study Toxicology*, 2011, 285(3): 126-132.
- [13] Wang WB, Feng LX, Yue QX, et al. Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90[J]. *Cell Physiol*, 2012, 227(5): 2196-2206.
- [14] Menon MB, Kotlyarov A, Gaestel M. SB202190-induced cell typespecific vacuole formation and defective autophagy do not depend on p38 MAP kinase inhibition[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23054.
- [15] Takebe K, Nishiyama T, Hayashi S, et al. Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(3): 329-335.

(收稿日期:2014-02-04 修回日期:2014-04-09)

(上接第 2840 页)

- mineral density by heii ultrasound and forearm DXA in clinical practice[J]. *Ceska Gynecologie*, 2010, 75(4): 340-344.
- [5] 中国老年学学会骨质疏松委员会“骨质疏松诊断标准”学科组. 中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(1): 1-3.
 - [6] 崔寿昌. 骨质疏松症的预防[J]. *中国健康教育*, 2006, 22(7): 528-530.
 - [7] 孙洪勋, 王乃宏. 原发性骨质疏松症研究进展[J]. *中国中西医结合影像学杂志*, 2005, 3(1): 44-47.
 - [8] 何敏, 姚珍薇, 唐良苕, 等. 中老年人腰椎骨密度变化的临床观察[J]. *重庆医学*, 2012, 41(29): 3041-3042.
 - [9] 栗平, 银和平. 呼和浩特地区中老年人腰椎和髌部骨密度测量值差异的比较[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(11): 833-835.
 - [10] 吴骞, 陈建庭, 钟招明, 等. 中老年人正位腰椎及髌部骨密度扫描对骨质疏松诊断敏感性的比较[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(12): 939-941.
 - [11] Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry[J]. *Osteoporosis Int*, 2000, 11(3): 192-202.

- [12] 张颖, 裴育, 齐方, 等. 男性骨密度检测中不同部位骨质疏松检出率差异的比较[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(1): 45-47.
- [13] 刘忠海. 骨矿与临床[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 256.
- [14] 何忠华, 程敏, 曹丽瑾. 422 例中老年骨密度检测及危险因素分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(8): 595-597.
- [15] 陈巧聪, 楼慧玲, 彭程, 等. 中老年人骨密度变化及骨质疏松患病率分析[J]. *广东医学*, 2011, 32(5): 620-623.
- [16] 张昕, 王峻, 苏晋生. 定量 CT 与双能 X 线吸收测定仪测量腰椎各椎体间骨密度差异性研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2011, 19(12): 884-886.
- [17] 李娜, 李新民, 孙伟杰. 腰椎定量 CT 与双能 X 线骨密度测量对老年患者骨质疏松检出率的比较分析[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2012, 5(2): 83-88.
- [18] 刘珺, 王维, 童琼娟. 双能 X 线骨密度仪(DXA)与定量 CT(QCT)测量骨密度的比较研究[J]. *临床放射学杂志*, 2007, 26(5): 504-507.

(收稿日期:2014-01-20 修回日期:2014-03-13)