

## p38 丝裂原活化蛋白激酶基因敲除对小鼠胚胎成纤维细胞增殖的影响

龚小卫 魏洁 李煜生 程蔚蔚 邓鹏 姜勇

**【摘要】** 目的 研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)基因敲除对小鼠胚胎成纤维细胞增殖的影响。方法 用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测小鼠胚胎成纤维细胞中 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 的表达;利用噻唑蓝(MTT)比色法绘制 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞的生长曲线,用流式细胞仪检测细胞周期各时相所占百分比。结果 绘制的生长曲线表明,p38<sup>-/-</sup> 细胞的生长速率明显下降,增殖受到抑制,细胞倍增时间延长,培养 96 h 时,p38<sup>-/-</sup> 细胞数量较 p38<sup>+/+</sup> 减少了 15.5%,说明 p38 基因敲除明显抑制了 G2/M 的进程。流式细胞仪检测结果显示,p38<sup>+/+</sup> 细胞中 G0/G1 期细胞占 34.47%,G2/M 期占 10.81%,S 期占 54.72%;p38<sup>-/-</sup> 细胞中 G0/G1 期占 48.49%,G2/M 期占 4.06%,S 期占 47.44%。与 p38<sup>+/+</sup> 细胞相比,G1 期的 p38<sup>-/-</sup> 细胞增加了 40.7%,S 期则减少了 13.3%,说明 p38 基因敲除抑制了 G1/S 的进程。结论 p38 基因敲除能够阻滞细胞周期进展,减慢细胞增殖速度。

**【关键词】** p38 丝裂原活化蛋白激酶; 基因敲除; 细胞增殖

**Effect of p38 mitogen-activated protein kinase gene knockout on cell proliferation of embryonic fibroblasts in mice** GONG Xiao-wei, WEI Jie, LI Yu-sheng, CHENG Wei-wei, DENG Peng, JIANG Yong. Department of Pathophysiology and Key Laboratory of Proteomics of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China  
Corresponding author: JIANG Yong (Email: yjiang@fimmu.com)

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene knockout on the proliferation of embryonic fibroblasts in mice (MEFs). Methods The expression of p38 in MEFs p38<sup>+/+</sup> and p38<sup>-/-</sup> cells were detected by Western blotting. The growth curves of p38<sup>+/+</sup> and p38<sup>-/-</sup> cells were plotted with the results of methylthiazole tetrazolium (MTT) colorimetric assay, and the ratios of different cell phases of p38<sup>+/+</sup> and p38<sup>-/-</sup> cells were analyzed by flow cytometry. Results The growth curves showed that the growth rate was notably retarded and cell double time elongated in p38<sup>-/-</sup> cells, and there was 15.5% decrease of the number of p38<sup>-/-</sup> cells in comparison with that of p38<sup>+/+</sup> cells in 96-hour culture. G2/M transition was inhibited in p38<sup>-/-</sup> cells. Meanwhile, G1/S transition was also inhibited in p38<sup>-/-</sup> cells, as shown by the results of flow cytometry. The ratios of G0/G1, G2/M, and S phases of p38<sup>+/+</sup> cells were 34.47%, 10.81%, and 54.72%, respectively; while those of p38<sup>-/-</sup> cells were 48.49%, 4.06%, and 47.44%, respectively. There were 40.7% increase and 13.3% decrease in the cell numbers of G1 and S phases of p38<sup>-/-</sup> cells in comparison with those of p38<sup>+/+</sup> cells, respectively. Conclusion p38 gene knockout in MEFs leads to cell cycle arrest and decreased cell proliferation.

**【Key words】** p38 mitogen-activated protein kinase; gene knockout; cell proliferation

p38 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中的一个成员,在多种生理和病理过程的调节中具有重要作用<sup>[1]</sup>。p38 MAPK 可通过不同方式活化以介导多种细胞生理功能。被不同刺激激活的 p38 可分别通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物来调节炎症、应激、凋亡和细胞生长、分化等生理过程,从而参与了脓毒性休克、全身炎症反应综

合征(SIRS)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)及肿瘤等疾病的发生发展<sup>[2-3]</sup>。p38 MAPK 对细胞周期的调控是其生理学功能的重要方面。尽管 p38 在细胞周期中的作用已有报道,但由于研究方法的差异,使得研究结果存在着一定的争议。为了阐明 p38 在细胞周期和增殖中的确切作用,我们利用 p38 基因敲除小鼠的胚胎成纤维细胞研究了 p38 基因敲除对细胞周期和增殖的影响,报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 材料:**小鼠胚胎成纤维细胞 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞系由美国 Scripps 研究所韩家准博士馈赠,噻唑蓝(MTT)和血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)为美国 Calbiochem 公司产品,碘化丙啶(PI)购自

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670828,30572151);广东省科技计划项目(A1090202)

作者单位:510515 广东广州,南方医科大学病理生理学教研室,广东省蛋白质组学重点实验室

通讯作者:姜勇,教授,博士生导师,Email:yjiang@fimmu.com

作者简介:龚小卫(1976-),男(汉族),湖北省人,医学博士,副教授,硕士生导师。

美国 Sigma-Aldrich 公司,胎牛血清(FBS)购自美国 HyClone 公司。Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)为美国 Gibco BRL 公司产品, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、p38 和磷酸化 p38(p-p38)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)耦联的抗兔 IgG 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

**1.2 细胞培养:** p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞系加用含有体积分数为 10% FBS 的 DMEM, 在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

**1.3 生长曲线:** p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞按 1 × 10<sup>3</sup>/孔接种于 96 孔板, 24 h 后加入 MTT 0.5 g/L, 37 °C 下继续孵育 4 h, 再加入十二烷基硫酸钠(SDS)脱色液(含质量分数为 10% 的 SDS 和 10 mmol/L HCl)处理过夜; 以 DMEM 作为空白对照。在波长 570 nm 处读取吸光度(A)值, 每隔 24 h 测定 1 次, 共测定 96 h, 每次取 4 个平行孔的平均值。

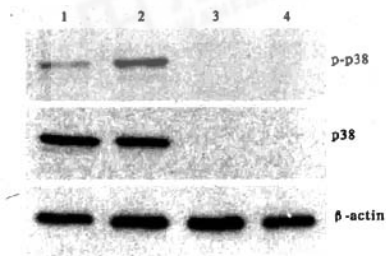
**1.4 细胞周期分析:** 将处于对数生长期的 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞用胰蛋白酶消化并计数, 各取 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞离心弃去培养基, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后, 加入冰乙醇(体积分数为 70%)固定, 4 °C 过夜。离心弃去固定液, PBS 重悬后再离心 5 min, 弃去 PBS, 用 RNA 酶(1 g/L)于 37 °C 下处理 30 min。加入 PI(50 mg/L), 在 4 °C 下避光染色 30 min 后, 用 Calibur 流式细胞仪分析细胞周期各时相细胞所占的百分比。

**1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测:** 将 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞按每皿 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 60 mm 细胞培养皿中, 生长至约 80%~90% 融合。细胞用 PBS 洗涤 1 次, 在含体积分数为 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的无血清 DMEM 中孵育 16 h 后, 加入 30  $\mu$ g/L PDGF-BB 作用 30 min。细胞用 PBS 洗涤后, 各加入 150  $\mu$ l 细胞裂解液[20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 乙二醇四乙酸酯(EGTA), 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 1% 曲拉通 X-100, 1 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/L 苯甲磺酰氨, 1 g/L 亮肽素和 1 g/L 抑肽酶]冰上裂解 20 min。取细胞裂解物上清液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 并将蛋白转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 膜用奶粉封闭 1 h, 依次与 1 : 1 000 稀释的一抗 4 °C 孵育过夜, 以及 1 : 2 000 稀释的 HRP 耦联的抗兔 IgG 室温孵育 1 h 后, 采用 Kodak IS2000R 图像工

作站进行化学发光检测。

**2 结果**

**2.1 Western blotting 检测结果(图 1):** p38<sup>+/+</sup> 细胞样品中有一非常显著的条带, 而 p38<sup>-/-</sup> 细胞样品的相应位置没有任何条带, 说明该细胞系中 p38 基因确实被成功敲除。而且在 PDGF 刺激下, p38 的磷酸化程度明显增加。作为内参照的  $\beta$ -actin 量相互间基本一致。



1,2:p38<sup>+/+</sup> 细胞; 3,4:p38<sup>-/-</sup> 细胞; 2,4:PDGF 刺激下  
图 1 Western blotting 检测 p38 基因敲除小鼠胚胎成纤维细胞 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞中 p38 的表达

**2.2 p38 基因敲除细胞中 G2/M 的进程(图 2):** p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中的生长状况表明, p38 基因敲除明显抑制了细胞增殖。与 p38<sup>+/+</sup> 细胞相比, p38<sup>-/-</sup> 细胞的生长速率明显下降, 增殖受到抑制, 细胞倍增时间延长。培养 96 h 后, p38<sup>-/-</sup> 细胞数量较 p38<sup>+/+</sup> 细胞减少了 15.5%。实验重复 3 次, 结果均相似。

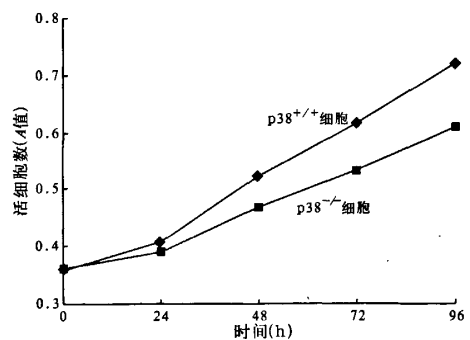
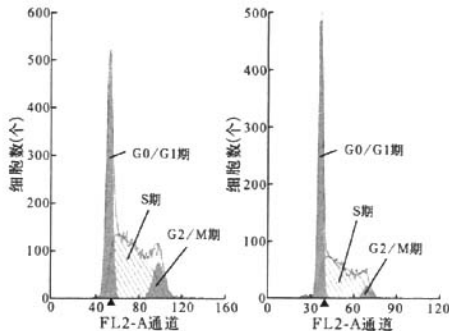


图 2 p38 基因敲除小鼠胚胎成纤维细胞 p38<sup>+/+</sup> 和 p38<sup>-/-</sup> 细胞的生长曲线

**2.3 p38 基因敲除细胞中 G1/S 的进程:** 流式细胞仪检测结果显示, p38<sup>+/+</sup> 细胞中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞占 34.47%, G<sub>2</sub>/M 期细胞占 10.81%, S 期细胞占 54.72%; 而 p38<sup>-/-</sup> 细胞中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、G<sub>2</sub>/M 期和 S 期细胞分别占 48.49%、4.06% 和 47.44% (图 3)。

与 p38<sup>+/+</sup> 细胞相比,处于 G1 期的 p38<sup>-/-</sup> 细胞增加了 40.7%,而 S 期细胞则减少了 13.3%。实验重复 3 次,结果均相似。



注:▲表示正常二倍体细胞在 FL2-A 通道中的位置  
图 3 流式细胞仪检测 p38 基因敲除小鼠胚胎成纤维细胞 p38<sup>+/+</sup>(左)和 p38<sup>-/-</sup>(右)细胞周期结果

### 3 讨论

在不同刺激下,p38 MAPK 通过对不同底物的磷酸化来介导不同的细胞生理反应。如 p38 MAPK 可被生长因子类刺激激活来参与细胞分化与增殖的调控<sup>[4-6]</sup>。另外,p38 MAPK 还可被应激刺激和病理性损伤信号所激活,以此来介导细胞凋亡反应<sup>[1,7]</sup>。因此,在不同细胞类型、不同刺激种类或强度下,p38 MAPK 活化所导致的细胞生物学效应可能有所不同,有时甚至完全相反。另外,当使用的研究方法不同时,得出的结果可能也大相径庭。以往利用 p38 无活性突变体或 p38 特异性抑制剂 SB203580 进行的大量研究都表明,在多种刺激下,p38 被磷酸化激活来介导细胞凋亡。但也有报道在某些情况下 p38 对细胞凋亡具有保护作用,如 Park 等<sup>[8]</sup>的研究证实,炭疽热致死因子可通过抑制 p38 来诱导巨噬细胞凋亡。基因敲除作为一种重要的蛋白质功能研究手段,其结果相对其他方法而言更为可靠,对于阐明蛋白质的功能具有结论性作用。因此,针对 p38 功能的争议,有必要利用 p38 基因敲除的细胞或动物来阐明其在不同条件下的确切生理功能。

一般而言,在丝裂原作用下,p38 MAPK 被磷酸化激活后可介导细胞增殖反应。Chen 等<sup>[9]</sup>的研究表明,在高血压的发病中,p38 可介导动脉平滑肌细胞增殖,而具有重要作用。Kim 等<sup>[10]</sup>也证实,p38 能促进淋巴细胞发育和增殖。而 Engel 等<sup>[11]</sup>的研究则表明,抑制 p38 的活性可促进成年哺乳动物的心肌细胞增殖<sup>[11]</sup>。本实验中,在 PDGF 等生长因子类刺激下,p38 能被磷酸化激活,而且通过利用 p38 基因

敲除的小鼠胚胎成纤维细胞来描绘生长曲线及进行细胞周期分析,发现 p38 基因敲除抑制了细胞 G1/S 期和 G2/M 期的进程,说明 p38 基因敲除使细胞周期阻滞,细胞增殖受到抑制,这证实了 p38 MAPK 确实在细胞增殖中起促进作用。Engel 等<sup>[11]</sup>的研究结果可能是 p38 MAPK 在细胞增殖调控中的一个特例,阐明了抑制 p38 活性可使失去增殖能力的成年哺乳动物心肌细胞重新获得增殖能力,而不是一般意义上的对细胞增殖的影响。我们通过基因敲除的方法,发现 p38 基因的敲除会导致细胞周期抑制,从而证实了 p38 在细胞增殖的调控中起促进作用。这对于解决以往关于 p38 MAPK 在细胞增殖调控中的功能争议具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] 龚小卫,姜勇. 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)生物学功能的基础[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2003,19(1):5-11.
- [2] 马中富,乐胜,梁艳冰,等. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对脓毒症大鼠多器官损伤的保护作用研究[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(4):211-213.
- [3] 王振辉,常晓彤,付小兵,等. 不同发育阶段大鼠小肠上皮细胞 c-jun、p38 基因表达的特征及其与肠损伤修复的关系[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(2):77-80.
- [4] Khalil N, Xu YD, O'Connor R, et al. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK [J]. J Biol Chem,2005,280(52):43000-43009.
- [5] Halawani D, Mondeh R, Stanton LA, et al. p38 MAP kinase signaling is necessary for rat chondrosarcoma cell proliferation [J]. Oncogene,2004,23(20):3726-3731.
- [6] Xiu M, Kim J, Sampson E, et al. The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation [J]. Mol Cell Biol,2003,23(23):8890-8901.
- [7] Tenhunen O, Rysä J, Ilves M, et al. Identification of cell cycle regulatory and inflammatory genes as predominant targets of p38 mitogen-activated protein kinase in the heart [J]. Circ Res,2006,99(5):485-493.
- [8] Park JM, Greten FR, Li ZW, et al. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition [J]. Science,2002,297(5589):2048-2051.
- [9] Chen S, Qiong Y, Gardner DG. A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation [J]. Hypertension,2006,47(2):252-258.
- [10] Kim JM, White JM, Shaw AS, et al. MAPK p38 alpha is dispensable for lymphocyte development and proliferation [J]. J Immunol,2005,174(3):1239-1244.
- [11] Engel FB, Schebesta M, Duong MT, et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes [J]. Genes Dev,2005,19(10):1175-1187.

(收稿日期:2008-02-17)

(本文编辑:李银平)