

• 论 著 •

MKK6(E)融合蛋白通过调控 p38/ATF-2 通路对裸鼠卵巢癌移植瘤生长的抑制作用研究*

袁 金, 康佳丽, 王小霞

广州市第一人民医院/华南理工大学附属第二医院妇产科, 广东广州 510180

摘要:目的 探讨丝裂原活化蛋白激酶激酶 6 突变体(E)[MKK6(E)]融合蛋白对裸鼠卵巢癌移植瘤生长的抑制作用及其可能机制。方法 利用人卵巢癌 HO8910PM 细胞皮下注射构建裸鼠皮下移植瘤模型,采用随机数字表法将裸鼠分为模型组、紫杉醇(阳性对照, 3 mg/mL)组、MKK6(E)融合蛋白(1.2 mmol/L)组和 MKK6(E)融合蛋白+SB202190(p38 激动剂, 10 μ mol/L)组,各 6 只。连续尾静脉给药 21 d,每 3 天 1 次。给药结束后剥离瘤体并计算瘤体体积、质量和抑瘤率。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清糖类抗原(CA)125 水平,HE 染色检测瘤体组织病理,TUNEL 染色检测瘤体细胞凋亡,免疫组化法检测瘤体组织纤连蛋白(Fibronectin)、基质金属蛋白酶(MMP)2 和 MMP9 表达,蛋白质印迹法(Western blot)检测瘤体组织中凋亡和 p38/活化转录因子 2(ATF-2)通路相关蛋白表达。结果 与模型组比较,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组裸鼠瘤体体积、质量和血清 CA125 水平降低,抑瘤率和癌细胞凋亡率升高,移植瘤组织癌细胞体积缩小,细胞核淡染,分裂异质相较模型组减少,可见大面积片状坏死区和凋亡细胞,Fibronectin、MMP2 和 MMP9 表达减少,Bax 和 Cleaved caspase 3 表达上调,Bcl-2 表达及磷酸化 p38(p-p38)/p38 和磷酸化 ATF-2(p-ATF-2)/ATF-2 下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 MKK6(E)融合蛋白组相比,MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组裸鼠瘤体体积、质量和血清 CA125 水平升高,抑瘤率和癌细胞凋亡率降低,癌细胞状态较好,坏死区域减少,Fibronectin、MMP2 和 MMP9 表达增多,Bax 和 Cleaved caspase 3 表达下调,Bcl-2 表达及 p-p38/p38 和 p-ATF-2/ATF-2 上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。4 组磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)/ERK 和 p-JNK/JNK 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 MKK6(E)融合蛋白可抑制卵巢癌皮下移植瘤生长,其机制可能与抑制 p38/ATF-2 信号通路激活相关。

关键词:丝裂原活化蛋白激酶激酶 6 突变体(E)融合蛋白; 卵巢癌移植瘤; p38/ATF-2 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.11.005

中图法分类号:R737.31

文章编号:1673-4130(2025)11-1302-07

文献标志码:A

Inhibitory effect of MKK6(E) fusion protein on the growth of ovarian cancer graft tumors in nude mice by regulating the p38/ATF-2 pathway*

YUAN Jin, KANG Jiali, WANG Xiaoxia

Department of Obstetrics and Gynecology, Guangzhou First People's Hospital/the Second Affiliated Hospital of South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510180, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of MKK6(E) fusion protein on the growth of ovarian cancer graft tumors in nude mice and its possible mechanism. **Methods** A subcutaneous transplantation tumor model in nude mice was constructed using subcutaneous injection of human ovarian cancer HO8910PM cells, which were divided into model group, paclitaxel (positive control, 3 mg/mL) group, MKK6(E) fusion protein (1.2 mmol/L) group and MKK6(E) fusion protein+SB202190 (p38 agonist, 10 μ mol/L) group by numerical randomization table, each with 6 animals. The drug was administered continuously in the tail vein for 21 d, once every 3 d. At the end of the administration, the tumor was exfoliated and the tumor volume, mass and tumor inhibition rate were calculated. Serum carbohydrate antigen (CA) 125 level was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), histopathology of the tumor was detected by HE staining, and apoptosis of the tumor cells was detected by TUNEL staining. In addition, expression of Fibronectin, matrix metallo-peptidase (MMP)2, and MMP9 were detected by immunohistochemistry, apoptosis and the p38/ATF-2 pathway-related proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the

* 基金项目:广州市卫生健康科技项目(20241A011018)。

作者简介:袁金,女,主治医师,主要从事妇科肿瘤方向研究。

tumor volume, mass and serum CA125 level of nude mice in the paclitaxel group and the MKK6(E) fusion protein group were reduced, the tumor suppression rate and the apoptosis rate of cancer cells were increased, the volume of cancer cells in the transplanted tumor tissue was reduced, the nucleus was lightly stained, the dividing heterogeneity was reduced compared with that of the model group, and the large area of lamellar necrotic zone and apoptotic cells were seen, and the expression of Fibronectin, MMP2 and MMP9 was reduced. Bax and Cleaved caspase 3 expression was up-regulated, and Bcl-2 expression and phosphorylated p38 (p-p38)/p38 and p-ATF-2/ATF-2 were down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the MKK6(E) fusion protein group, nude mice in the MKK6(E) fusion protein + SB202190 group showed increased tumor volume, mass and serum CA125 levels, decreased tumor suppression and cancer cell apoptosis, better cancer cell status, decreased necrotic areas, increased expression of Fibronectin, MMP2 and MMP9, and down-regulated Bax and Cleaved caspase 3 expression was down-regulated, and Bcl-2 expression and p-p38/p38 and p-ATF-2/ATF-2 were up-regulated ($P < 0.05$). While p-ERK/ERK and p-JNK/JNK were compared among the 4 groups, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** MKK6(E) fusion protein inhibits the growth of ovarian cancer subcutaneous graft tumors, and its mechanism may be related to the inhibition of p38/ATF-2 signaling pathway activation.

Key words: MKK6(E) fusion protein; ovarian cancer transplantation tumor; p38/ATF-2 signaling pathway

卵巢癌是常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一^[1],虽然近年来在卵巢癌的诊断和治疗方面取得了一些成果,但由于临床治疗方法的缺乏,化疗耐药、复发和转移仍然是难治性卵巢癌的关键问题,寻找新的基因作为突破点用于逆转耐药性卵巢癌化疗效果并抑制其转移和复发,已成为当前研究的热点^[2]。本课题组前期研究发现了一种能够靶向卵巢癌上皮细胞的具有强穿膜能力的丝裂原活化蛋白激酶激酶 6 突变体(E) [MKK6(E)] 融合蛋白转录反式激活因子(TAT)、卵巢癌特异性结合短肽(OSBP)——MKK6(E)^[3]。体外实验证实, MKK6(E)融合蛋白其能有效促进卵巢癌细胞凋亡,抑制增殖、侵袭和迁移^[4],但其可能的作用机制尚未明确。丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族与肿瘤的发生发展密切相关,通过一系列酶联反应,促进肿瘤细胞的存活、迁移或增强对化疗药物的耐药性^[5]。故本课题拟构建卵巢癌裸鼠动物模型探讨 MKK6(E)融合蛋白治疗卵巢癌的机制与 MAPK 通路的关系,以期对卵巢癌的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF 级雌性 Balb/c 裸鼠均购自上海斯莱克实验动物有限公司, 4~6 周龄, 体重 14~18 g, 许可证编号: SYXK(沪)2018-0032。将裸鼠饲养在特定无病原体条件下(23 ℃, 60% 相对湿度, 12 h 明暗循环), 自由饮食。

1.2 主要试剂 p38 激动剂(SB202190, 美国 Selleck Chemical 公司), 紫杉醇(美国 MedChemExpress 公司), 糖类抗原(CA)125 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海臻科生物科技有限公司), HE 染色检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), TUNEL 染色试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司), 纤连蛋白

(Fibronectin)、基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 和磷酸化活化转录因子 2(p-ATF-2)抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-13455R、bs-4599R、bs-4599R、bsm-52134R), ATF-2 抗体(美国 BioWorld 公司, 货号: BS1022), p38、p-p38、JNK 和 p-JNK 抗体(美国 CST 公司货号: 8690、4511、9258P 和 4668P), Bcl-2、Bax、Cleaved caspase 3 和 GAPDH 抗体(美国 Abcam 公司, 货号: ab182858、ab32503、ab106556 和 ab9485)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及悬液制备 人卵巢癌细胞株 HO8910PM 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。细胞复苏后, 转移至培养皿, 加入完全 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清及 1% 链霉素/青霉素), 置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养。待细胞处于对数生长期, 胰酶消化, 离心弃上清后重悬于不含胎牛血清的培养基中并计数, 稀释调整浓度为 2×10^7 个/200 μ L 细胞悬液备用。

1.3.2 模型构建及分组 按照数字随机表法将 24 只裸鼠分为模型组、紫杉醇(阳性对照)组、MKK6(E)融合蛋白组和 MKK6(E)融合蛋白 + SB202190 组, 各 6 只。所有小鼠均将 200 μ L 细胞悬液接种于左前肢腋下皮肤下, 注射局部出现明显皮丘。注射 7 d 后观察成瘤率, 并以肿瘤最大径 5~7 mm 为模型构建成功^[6]。紫杉醇组、MKK6(E)融合蛋白组和 MKK6(E)融合蛋白 + SB202190 组裸鼠分别于尾静脉注射 200 μ L 的紫杉醇(3 mg/mL)、MKK6(E)融合蛋白(1.2 mmol/L)或 SB202190(10 μ mol/L), 模型组仅给予等量生理盐水注射, 每 3 天 1 次, 共 21 d。

1.3.3 移植瘤体积、质量及抑瘤率测定 造模成功后, 每天观察裸鼠一般状态, 每 3 天用卡尺测量肿瘤

最长径(*a*)和最短径(*b*),计算移植瘤体积和 21 d 抑瘤率,公示如下:体积(mm³)= $\pi ab^2/6$;抑瘤率(%)=(1-治疗组肿瘤体积/对照组肿瘤体积)×100%。停药 24 h 后,处死裸鼠,眼球取血,剥取瘤组织并测量其体积和质量。

1.3.4 ELISA 检测血清 CA125 水平 将收集到的各组裸鼠全血室温下静置 1 h,转入高速离心机,4 ℃ 3 000 r/min 离心 20 min,取上层血清。根据 CA125 ELISA 检测试剂盒说明书进行血清 CA125 水平检测。

1.3.5 HE 染色检测移植瘤病理结构 将部分瘤组织置于 4%多聚甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水后,行二甲苯透明、浸蜡、包埋,作 4 μm 厚切片。根据 HE 染色试剂盒说明书,对各组瘤组织切片进行 HE 染色,倒置显微镜下观察瘤组织病理结构。

1.3.6 TUNEL 染色检测移植瘤癌细胞凋亡 切片用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,滴加蛋白酶 K (20 mg/L)透化 30 min。再次清洗后,滴加 TUNEL 反应液孵育 60 min,过氧化氢冲洗淬灭酶活性后联合抗生物蛋白过氧化氢酶和二氨基联苯胺覆盖,最后滴加显色底物 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐/硝基四氮唑蓝 10 min,终止反应,脱水,透明,封片。在荧光显微镜下观察并计数凋亡细胞,计算细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.3.7 免疫组化法检测移植瘤组织中 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 表达 组织切片经脱蜡,抗原修复后用 3%过氧化氢孵育以阻断内源性过氧化物酶的活性,分别与 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 抗体 4 ℃孵育过夜。次日,与山羊抗兔 IgG 二抗在室温下孵育 1 h。DAB 可视化显色,镜下控制反应时间(1~2 min)。每组准备 5 张切片,从每张切片中随机选取 5 个区域进行分析,应用 Image-Pro Plus 6.0 测定有 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 阳性区域光密度值(OD)。

1.3.8 蛋白质印迹法(Western blot)检测移植瘤组织相关蛋白表达 取适量移植瘤组织,提取总蛋白并

检测蛋白表达水平。通过 10%凝胶电泳分离 20 μg 蛋白裂解物,并将从上清液中分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,4 ℃下用相应一抗孵育过夜。次日,将膜放入含辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 的二抗稀释液中孵育 1 h。使用电化学发光试剂盒显影蛋白条带,以 GAPDH 为内参计算目的蛋白相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组裸鼠瘤体体积和质量比较 与模型组相比,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组裸鼠卵巢癌移植后第 3、6、9、12、15、18、21 天的瘤体体积和质量均减小(*P* < 0.05)。与 MKK6(E)融合蛋白组相比,MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组裸鼠卵巢癌移植后第 3、6、9、12、15、18、21 天的瘤体体积和质量均增大(*P* < 0.05)。见图 1、表 1。

2.2 各组裸鼠抑瘤率比较 以模型组(0%)为对照,计算紫杉醇组、MKK6(E)融合蛋白组和 MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组的抑瘤率,结果显示 3 组抑瘤率分别为 78.91%、81.80%和 51.48%。与模型组相比,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组的抑瘤率均升高(*P* < 0.05)。与 MKK6(E)融合蛋白组相比,MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组的抑瘤率降低(*P* < 0.05)。

2.3 各组裸鼠血清 CA125 水平及移植瘤组织细胞凋亡率比较 与模型组相比,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组 CA125 水平均降低(*P* < 0.05),移植瘤组织中细胞凋亡率升高(*P* < 0.05)。与 MKK6(E)融合蛋白组相比,MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组 CA125 水平升高(*P* < 0.05),移植瘤组织中细胞凋亡率降低(*P* < 0.05)。见图 2、表 2。

表 1 各组裸鼠移植瘤体积和质量比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	第 3 天体积(mm ³)	第 6 天体积(mm ³)	第 9 天体积(mm ³)	第 12 天体积(mm ³)
模型组	164.28±3.28	219.38±4.76	308.28±13.28	479.38±15.46
紫杉醇组	155.83±3.44 ^a	157.28±2.77 ^a	160.36±4.37 ^a	158.29±3.49 ^a
MKK6(E)融合蛋白组	147.28±3.87 ^a	146.33±3.56 ^a	148.29±4.83 ^a	146.11±4.22 ^a
MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组	152.37±3.64 ^b	186.37±5.36 ^b	198.27±4.31 ^b	209.83±6.74 ^b

组别	第 15 天体积(mm ³)	第 18 天体积(mm ³)	第 21 天体积(mm ³)	第 21 天质量(g)
模型组	534.38±16.29	687.36±16.37	798.27±14.34	0.74±0.09
紫杉醇组	163.28±3.65 ^a	162.37±3.23 ^a	168.37±4.37 ^a	0.24±0.05 ^a
MKK6(E)融合蛋白组	143.57±4.32 ^a	142.39±3.77 ^a	145.28±4.38 ^a	0.21±0.06 ^a
MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组	238.29±12.11 ^b	298.37±8.78 ^b	387.29±13.22 ^b	0.47±0.05 ^b

注:与模型组相比,^a*P* < 0.01;与 MKK6(E)融合蛋白组相比,^b*P* < 0.01。

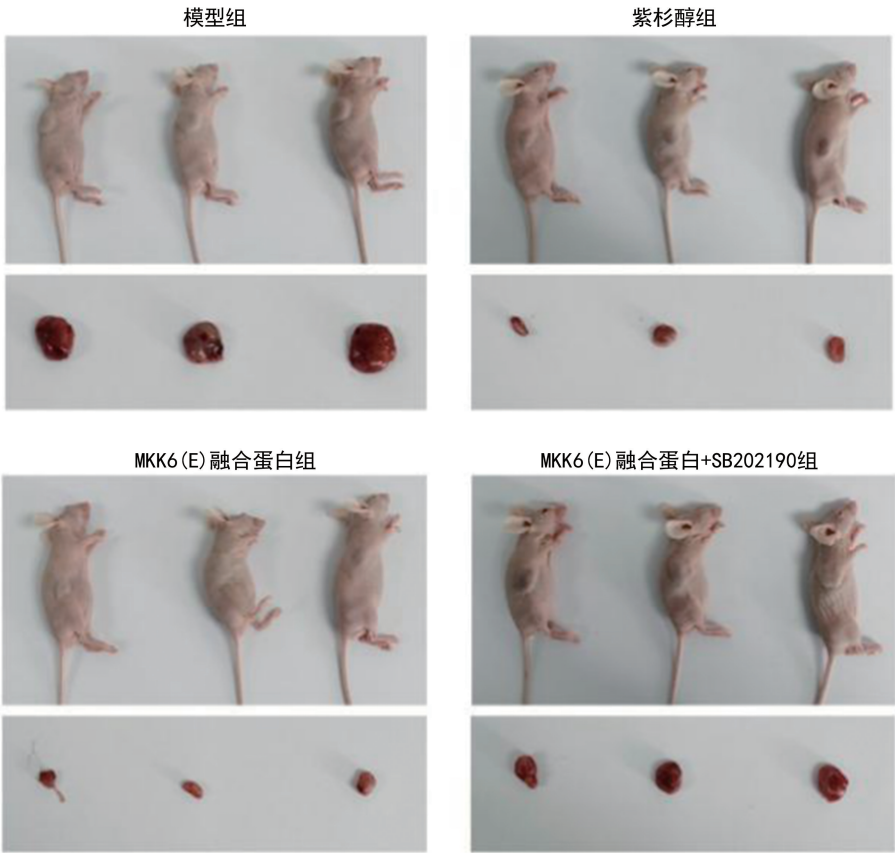


图 1 各组裸鼠移植瘤

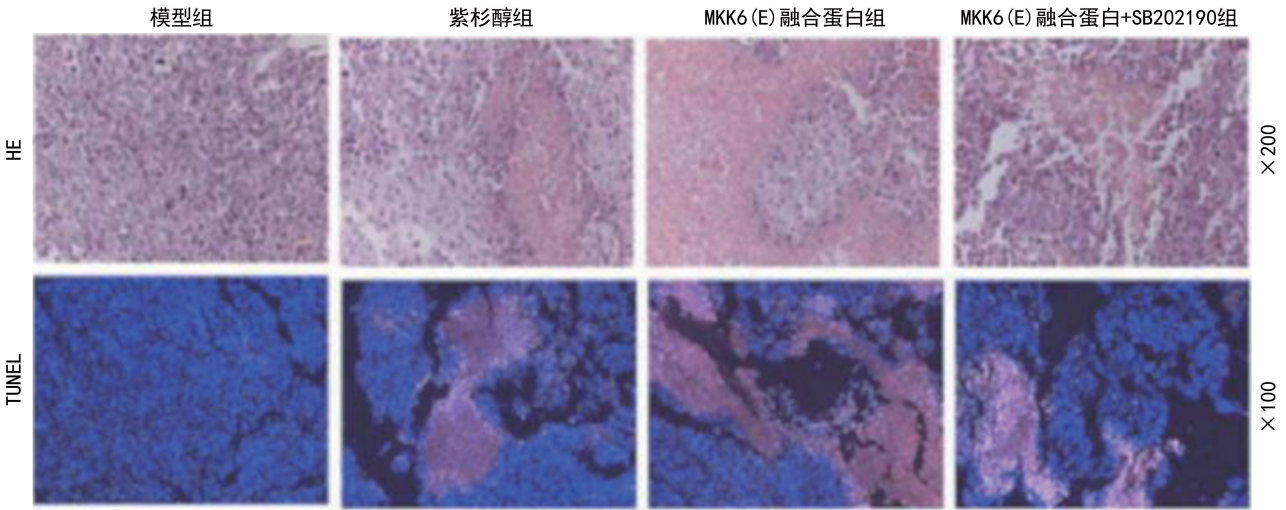


图 2 各组裸鼠移植瘤组织 HE 和 TUNEL 染色

表 2 各组裸鼠血清 CA125 和组织细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别	CA125(U/mL)	细胞凋亡率(%)
模型组	3 934.72±367.37	4.11±0.25
紫杉醇组	3 227.39±373.48 ^a	41.29±4.33 ^a
MKK6(E)融合蛋白组	3 063.27±323.45 ^a	53.78±6.64 ^a
MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组	3 682.39±105.47 ^b	38.29±5.56 ^b

注:与模型组相比,^a $P < 0.001$;与 MKK6(E)融合蛋白组相比,^b $P < 0.01$ 。

2.4 各组裸鼠移植瘤组织病理学比较 模型组裸鼠

移植瘤组织中癌细胞状态良好,细胞核深染且较大,异型性明显。治疗第 21 天,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组裸鼠移植瘤组织癌细胞体积缩小,细胞核淡染,分裂异质相较模型组减少,可见大面积片状坏死区和凋亡细胞。然而,与 MKK6(E)融合蛋白组相比,MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组移植瘤组织中癌细胞状态较好,坏死区域减少。见图 2。

2.5 各组裸鼠移植瘤组织中 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 表达比较 与模型组相比,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组裸鼠移植瘤组织中 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 表达降低($P < 0.05$)。与 MKK6

(E) 融合蛋白组相比, MKK6 (E) 融合蛋白 + SB202190 组裸鼠移植瘤组织中 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 表达升高($P<0.05$)。见图 3、表 3。

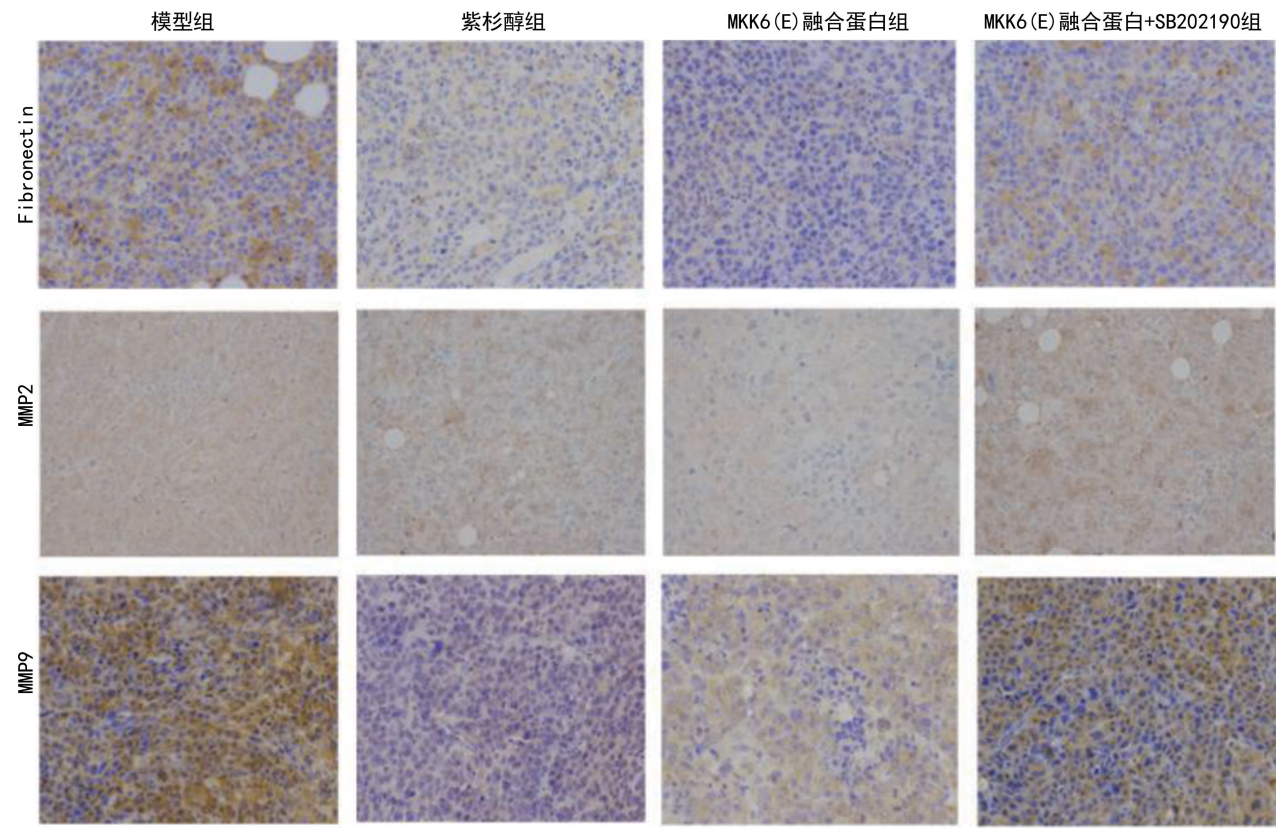


图 3 各组裸鼠移植瘤组织 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 免疫组化检测(×100)

表 3 各组裸鼠移植瘤组织中 Fibronectin、MMP2 和 MMP9 的 IOD 值比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Fibronectin	MMP2	MMP9
模型组	195.78±13.28	368.29±14.46	397.28±16.37
紫杉醇组	61.28±5.98 ^a	134.28±9.87 ^a	147.38±6.82 ^a
MKK6(E)融合蛋白组	36.27±4.37 ^a	78.39±7.34 ^a	89.37±6.31 ^a
MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组	133.28±5.22 ^b	226.37±17.29 ^b	267.77±11.39 ^b

注:与模型组相比,^a $P<0.001$;与 MKK6(E)融合蛋白组相比,^b $P<0.001$ 。

2.6 各组裸鼠移植瘤组织中凋亡和 MAPKs/ATF-2 通路相关蛋白表达 与模型组比较,紫杉醇组和 MKK6(E)融合蛋白组裸鼠移植瘤组织中 Bax 和 Cleaved caspase 3 表达上调,Bcl-2 表达及 p-p38/p38 和 p-ATF-2/ATF-2 下调($P<0.05$)。与 MKK6(E)

融合蛋白组比较,MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组裸鼠移植瘤组织中 Bax 和 Cleaved caspase 3 表达下调,Bcl-2 表达及 p-p38/p38 和 p-ATF-2/ATF-2 上调($P<0.05$)。而 4 组 p-ERK/ERK 和 p-JNK/JNK 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4、图 4。

表 4 各组裸鼠移植瘤组织中凋亡和 MAPKs/ATF-2 通路相关蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Bcl-2	Bax	Cleaved caspase 3	p-p38/p38	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK	p-ATF-2/ATF-2
模型组	1.01±0.03	0.99±0.04	1.02±0.08	1.01±0.03	1.01±0.04	1.04±0.03	1.03±0.02
紫杉醇组	0.54±0.05 ^a	1.74±0.06 ^a	1.98±0.06 ^a	0.38±0.05 ^a	0.99±0.03	0.97±0.04	0.41±0.04 ^a
MKK6(E)融合蛋白组	0.48±0.04 ^a	1.70±0.05 ^a	1.90±0.08 ^a	0.33±0.07 ^a	1.03±0.04	1.01±0.02	0.35±0.04 ^a
MKK6(E)融合蛋白+SB202190 组	0.77±0.04 ^b	1.37±0.03 ^b	1.43±0.09 ^b	0.72±0.04 ^b	0.97±0.04	0.96±0.05	0.72±0.03 ^b

注:与模型组相比,^a $P<0.001$;与 MKK6(E)融合蛋白组相比,^b $P<0.001$ 。

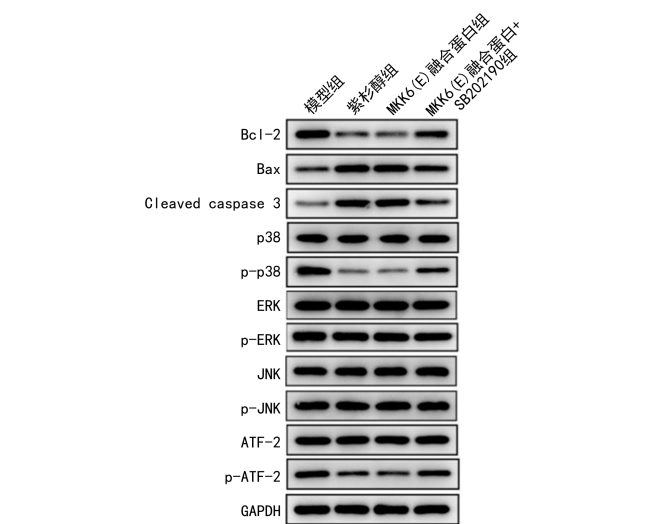


图 4 各组裸鼠移植瘤组织 Western blot 检测结果

3 讨 论

卵巢癌被认为是最致命的妇科恶性肿瘤^[1]。近年来,虽然临床和基础研究在卵巢癌的诊断和治疗方面取得了一些成果,但由于治疗方法缺乏,化疗耐药、复发和转移仍然是难治性卵巢癌的关键问题^[2]。除了传统的手术、化疗和放疗外,迫切需要开发新颖、有效且高度特异性的卵巢癌治疗方法。

细胞凋亡或程序性死亡在维持细胞内环境稳态和防止肿瘤发生方面发挥着至关重要的作用^[7]。癌细胞无法按程序死亡或凋亡可能是导致恶性转化和肿瘤发生的关键原因之一。因此,促进肿瘤细胞凋亡已被证明具有抗肿瘤功效^[8]。许多细胞调控因子在细胞增殖和凋亡方面发挥着重要作用,如 MAPKs,包括细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun NH2-末端激酶或应激活化蛋白激酶、p38 MAPK 等^[9]。据报道,作为 p38 MAPK 的上游因子,MKK6 可选择性地使 p38 磷酸化,从而促进细胞凋亡进程^[10]。DI ROCCO 等^[11]研究发现,靶向 MEK/ERK 诱导的 MKK6/p38/AKT 轴,能够发挥对胚胎横纹肌肉瘤的抗癌和促肌作用。WANG 等^[12]研究发现,一种新的抗肿瘤肽 SB202190 可通过调节 MKK6/p38 信号通路抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移并促进细胞凋亡。但与野生型 MKK6 相比,用 Glu 取代其 Ser207 和 Thr211 的突变型 MKK6,即 MKK6(E),具有更高的活性^[13]。此外,感染病毒重组 MKK6(E)可增强 p38 MAPK 的活性,诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。因此,MKK6(E)可作为一种有前景的抗肿瘤药物。然而,病毒基因可能会与宿主染色质整合,导致长期不良后果。这一问题引起了人们对病毒重组 MKK6(E)作为一种肿瘤治疗策略的安全性的严重关切,可能会阻碍其临床应用。作为替代方案,合成 MKK6(E)蛋白似乎比病毒重组蛋白更安全。本课题组前期成功合成的重组性融合蛋白 TAT-OSBP-MKK6(E)具有高效、强特异性、高穿膜性等优点,能有效促进卵巢癌细胞死亡^[3-4],但其在

体效果尚未可知。本研究结果显示,MKK6(E)融合蛋白可降低裸鼠移植瘤体积和质量,抑瘤率升高且血清肿瘤标志物 CA125 水平降低,并升高肿瘤细胞凋亡率。这些结果再次强调了 MKK6(E)融合蛋白对卵巢癌裸鼠移植瘤生长具有抑制作用,提示其对卵巢癌具有较好的治疗效果。

侵袭是肿瘤侵袭-转移多步骤级联反应的第一步,而在肿瘤细胞生存所必需的肿瘤微环境中,细胞外基质(ECM)是其形成的必需物质,其合成和降解过程在肿瘤侵袭和转移中发挥重要作用^[14]。MMP 是 ECM 降解涉及不同蛋白酶中的主要类型,可降解包括结缔组织和基底膜成分在内的几乎所有类型 ECM 蛋白。MMP2 和 MMP9 是与 ECM 降解主要相关的 MMPs 类型,并能够促进肿瘤细胞的侵袭和转移。刘雪柔等^[15]研究发现,阿美替尼能够通过下调 MMP2 和 MMP9 蛋白表达,从而抑制神经母细胞瘤侵袭和迁移。曹振^[16]研究发现,TXNDC9 通过上调 MMP2 及 MMP9 表达促进肝细胞癌侵袭转移。本研究结果同样发现,MKK6(E)融合蛋白能够显著抑制 MMP2 和 MMP9 表达水平。Fibronectin 参与肿瘤的侵袭和转移,细胞表面 Fibronectin 高表达的肿瘤细胞可以通过细胞膜表面各种黏附分子的作用,增强肿瘤细胞之间的黏附及细胞对基质和基膜的锚定黏附能力,而不脱落和转移^[17]。在本研究中,MKK6(E)融合蛋白亦可抑制 Fibronectin 表达。这些结果提示 MKK6(E)融合蛋白对卵巢癌转移也可能具有一定的抑制作用。MAPK 是由 JNK、ERK 和 p38 MAPK 组成,可调控包括基因表达、细胞增殖、运动和凋亡等广泛的细胞生物学过程^[5]。有研究已证实,MAPK 可调控 MMP2 和 MMP9 蛋白表达和细胞凋亡,司马玲等^[18]研究发现,荔枝核总黄酮可通过调控 MAPK 通路,抑制 MMP2 水平,发挥抗肝纤维化生物学效应。郭志青等^[19]研究发现,丹参多糖可通过 MAPK/ERK 信号轴诱导肺癌 A549 细胞凋亡,降低 MMP9 水平,抑制细胞增殖和迁移。基于以上研究和 MKK6(E)融合蛋白对 MMP2 和 MMP9 的抑制作用,推测 MKK6(E)融合蛋白对其上游 MAPK 通路具有可能的调控作用。本研究评估了 MKK6(E)融合蛋白的可能靶向 MAPK 类型,结果发现 MKK6(E)融合蛋白仅磷酸化 p38 MAPK,而对 JNK 和 ERK 无影响。有研究表明,p38 MAPK 在调节 MMP 的表达中起着核心作用^[20]。本研究发现,使用 p38 MAPK 激动剂后,MKK6(E)融合蛋白在卵巢癌中通过抑制 p38 MAPK 降低 MMP2 和 MMP9 的表达,但其调控机制尚不明确。

众所周知,ATF-2 作为 p38 MAPK 下游的重要信号底物,可以被 p38 MAPK 靶向磷酸化并激活,在癌症的恶性行为进展中具有潜在重要作用^[21]。ATF-2 属于激活因子(AP-1)转录因子家族,研究发现,当 p38 MAPK 被激活后,ATF-2(Try307)能够迅速发生

磷酸化改变,与其他 AP-1 家族成员(如 Jun)相互作用形成同二聚体或异二聚体,调控下游靶基因(如 MMP2 和 MMP9)的转录过程,介导癌细胞增殖、侵袭和存活,在肿瘤发生中发挥重要作用^[22]。有研究表明,肺腺癌细胞中 ANKRD49 过度表达可进一步激活 p38 MAPK/ATF-2 通路,从而促进癌细胞侵袭和转移,并抑制凋亡^[23]。ZHANG 等^[24]研究发现,羟基红花黄 A 可通过下调 p38 MAPK/ATF-2 信号通路,抑制肝细胞癌细胞活力、增殖、迁移和血管生成。本研究结果发现,MKK6(E)融合蛋白抑制了 ATF-2 的表达及其磷酸化程度,这提示 MKK6(E)融合蛋白可能通过 p38 MAPK/ATF-2 信号通路介导其卵巢癌保护作用。

然而,本研究尚存在一定的局限性。ATF-2 活性的调节取决于其磷酸化或亚细胞定位和稳定性,本研究尚需进一步明确 MKK6(E)融合蛋白对于 p38 MAPK/ATF-2 通路亚细胞层面的潜在调控机制。综上所述,MKK6(E)融合蛋白对卵巢癌裸鼠移植瘤生长起到抑制作用,其机制可能与抑制 p38 MAPK/ATF-2 信号通路相关,这为临床开发治疗卵巢癌的分子治疗药物并提高患者疗效预后提供理论参考。

参考文献

[1] 冯征,郭勤浩,朱俊,等. 2023 年度妇科恶性肿瘤治疗进展及展望[J]. 中国癌症杂志,2024,34(4):340-360.

[2] KONSTANTINOPOULOS P A, MATULONIS U A. Clinical and translational advances in ovarian cancer therapy[J]. Nat Cancer,2023,4(9):1239-1257.

[3] 周聪,康佳丽,王小霞,等. 全细胞差减筛选法筛选与人卵巢癌细胞特异性结合的短肽[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(10):1098-1101.

[4] LIAO H, KANG J L, JIANG W Y, et al. Delivery of constitutively active mutant MKK6(E) with TAT-OSBP induces apoptosis in human ovarian carcinoma HO8910 cells[J]. Int J Gynecol Cancer,2015,25(9):1548-1556.

[5] BAHAR M E, KIM H J, KIM D R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies [J]. Signal Transduct Target Ther,2023,8(1):455.

[6] 冯晓玲,孙佳宁,赵小萱. 红景天苷联合顺铂对人卵巢癌 SKOV-3 裸鼠移植瘤生长影响及其机制研究[J]. 中华中医药杂志,2021,36(7):3851-3855.

[7] TONG X, TANG R, XIAO M, et al. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research [J]. J Hematol Oncol,2022,15(1):174.

[8] MORANA O, WOOD W, GREGORY C D. The apoptosis paradox in cancer[J]. Int J Mol Sci,2022,23(3):1328.

[9] BURGERMEISTER E. Mitogen-activated protein kinase and exploratory nuclear receptor crosstalk in cancer immunotherapy[J]. Int J Mol Sci,2023,24(19):14546.

[10] JUYOUX P, GALDADAS I, GOBBO D, et al. Architecture of the MKK6-p38 α complex defines the basis of MAPK specificity and activation[J]. Science,2023,381(6663):1217-1225.

[11] DI ROCCO A, CAMERO S, BENEDETTI A, et al. Anti-oncogenic and pro-myogenic action of the MKK6/p38/AKT axis induced by targeting MEK/ERK in embryonal rhabdomyosarcoma[J]. Oncol Rep,2022,48(3):151.

[12] WANG R, LI B W, SHAO N Y, et al. A novel antitumor peptide inhibits proliferation and migration and promotes apoptosis in glioma cells by regulating the MKK6/p38 signaling pathway[J]. Neoplasma,2021,68(4):732-741.

[13] BURTON J C, ANTONIADES W, OKALOVA J, et al. Atypical p38 signaling, activation, and implications for disease[J]. Int J Mol Sci,2021,22(8):4183.

[14] GARG M. Emerging roles of epithelial-mesenchymal plasticity in invasion-metastasis cascade and therapy resistance[J]. Cancer Metastasis Rev,2022,41(1):131-145.

[15] 刘雪柔,杨玉梅,蔡慧,等. 阿美替尼具有较好的抗神经母细胞瘤作用:基于下调 MMP2 和 MMP9 的表达[J]. 南方医科大学学报,2023,43(9):1493-1499.

[16] 曹振. TXNDC9 通过上调 MMP2 及 MMP9 表达促进肝细胞癌侵袭转移[D]. 赣州:赣南医学院,2024.

[17] BEKSAÇ B, GLEASON L, BAIK S, et al. Dermal fibroblasts promote cancer cell proliferation and exhibit fibronectin overexpression in early mycosis fungoides[J]. J Dermatol Sci,2022,106(1):53-60.

[18] 司马玲,梁瀚云,龚俊文,等. 基于 MAPK 信号通路探讨荔枝核总黄酮对 HSC-T6 细胞的作用[J]. 现代中西医结合杂志,2024,33(3):299-305.

[19] 郭志青,支学军,王布,等. 丹参多糖经 MAPK/ERK 信号轴抑制对肺癌细胞 A549 增殖、迁移和凋亡的影响[J]. 中国药业,2024,33(1):40-44.

[20] SARG N H, ZAHER D M, ABU JAYAB N N, et al. The interplay of p38 MAPK signaling and mitochondrial metabolism, a dynamic target in cancer and pathological contexts[J]. Biochem Pharmacol,2024,225(4):116307.

[21] HUEBNER K, PROCHÁZKA J, MONTEIRO A C, et al. The activating transcription factor 2: an influencer of cancer progression[J]. Mutagenesis,2019,34(5/6):375-389.

[22] WEI T H, HSIEH C L. Effect of acupuncture on the p38 signaling pathway in several nervous system diseases: a systematic review[J]. Int J Mol Sci,2020,21(13):4693.

[23] LIU Y H, YUAN M, XU B X, et al. ANKRD49 promotes the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma via a P38/ATF-2 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med,2022,26(16):4401-4415.

[24] ZHANG J, LI J, SONG H, et al. Hydroxysafflor yellow A suppresses angiogenesis of hepatocellular carcinoma through inhibition of p38 MAPK phosphorylation[J]. Biomed Pharmacother,2019,109:806-814.