

MAPK 通路抑制剂对不同 PTEN 状态子宫内膜癌细胞作用及机制

肖 兰,龙腾飞,何 婵,周家德

摘要 目的 探讨 PTEN 缺失和表达下 p38MAPK 通路抑制剂(SB203580)对子宫内膜癌细胞 Ishikawa 及 HEC-1A 的作用及其机制。方法 PTEN 小分子干扰 RNA 及 PTEN 基因转染后,激光共聚焦显微镜检测 PTEN 蛋白表达;SB203580 干预 48 h,流式细胞术、MTT 法及 Western blot 法分别检测细胞干预后子宫内膜癌细胞早期凋亡、细胞增殖活性、p38MAPK 通路的磷酸化水平及其下游底物 4E-BP1 蛋白的磷酸化情况。结果 PTEN 小分子干扰 RNA 封闭与 PTEN 稳定转染使两株子宫内膜癌细胞(Ishikawa, HEC-1A) PTEN 表达水平改变。SB203580 干预使 PTEN 缺失 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞生长显著抑制,细胞发生早期凋亡;p38MAPK 通路磷酸化水平和磷酸化 4E-BP1 蛋白表达均显著下降;与 PTEN 表达两种细胞比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 内外源性 PTEN 缺失使两株子宫内膜癌细胞中

p38MAPK 通路活化,对 SB203580 敏感性增加,其机制可能与 PTEN 缺失导致 PTEN 对 p38MAPK 信号通路负性调控功能丧失,引发 p38MAPK 信号通路下游底物 4E-BP1 激活导致 p38MAPK 通路活化有关。

关键词 子宫内膜癌;PTEN;p38MAPK 通路抑制剂;敏感性
中图分类号 R 342.3; R 349.2; R 977

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0613-06

PTEN 作为一个抑癌基因,在细胞生长、凋亡中具有重要生物学功能。研究^[1]显示 PTEN 基因对整合多条上下游信号通路有重要作用。许多前期研究^[2]显示,相关信号通路仅在 PTEN 缺失情况下对相关信号通路抑制剂敏感,而 PTEN 基因是目前人子宫内膜癌中突变率最高的基因。因此,该研究主要探讨 MAPK 家族中 p38MAPK 通路特异性抑制剂 SB203580 对不同 PTEN 表达人子宫内膜癌细胞的作用,为选择以相关信号通路为靶点的子宫内膜癌治疗人群提高临床疗效提供一定依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2014-02-17 接收

基金项目:广东省自然科学基金(编号:7001568)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

作者简介:肖 兰,女,博士,副研究员,主治医师;

周家德,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-

mail:zhoujiade@sina.com

The interaction of different phenotype *Staphylococcus epidermidis* and the influence of LuxS gene on biofilm formation

Wang Xiancong, Liu Bao, Zhou Shusheng, et al

(Dept of ICU, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the interaction mechanisms between the different phenotype of *Staphylococcus epidermidis* and the role of LuxS in the process of biofilm formation. **Methods** SE ATCC35984 with the ability of biofilm formation and SE ATCC12228 without this ability was cultured respectively with TSB medium, SE ATCC12228 supernatant and SE ATCC35984 supernatant. After 18h, polysaccharide intercellular adhesion and the expression of LuxS in the strain were detected by semi-quantitative method and semi-quantitative PCR method. **Results** The strain of SE ATCC35984 cultured by TSB formed dense and compact biofilm, while the strain of SE ATCC12228 was unable to produce biological membrane. Cultured by SE ATCC35984 supernatant, the ability of SE ATCC12228 biofilm formation was increased, and the expression of LuxS in the strain was reduced. Similarly, the biofilm formation ability was reduced and the expression of LuxS was increased in the strain of SE ATCC35984 cultured by ATCC12228 supernatant. The differences among these groups were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** LuxS plays a key role in the process of biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, and the different phenotype of *Staphylococcus epidermidis* interact with each other.

Key words QS system; LuxS; semi-quantitative PCR; *Staphylococcus epidermidis*

1.1.1 细胞系及质粒 人子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 及 HEC-1A 由华中科技大学附属协和医院王泽华教授惠赠; pcDNA3.1-GFP/PTEN 质粒载体由华中科技大学附属同济医院张惠兰教授惠赠, G418 抗性; pSilence TM siRNA 表达载体 (3.12 H1 hygro 版本)、表达非特异 siRNA 的 pSilenceTM siRNA 表达载体购自英国 Ambion 公司, 试验中作为阴性对照, 亦表达 G418 抗性基因。

1.1.2 主要试剂 PTEN 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; p38MAPK、phospho-p38MAPK、4E-BP1 及 phospho-4E-BP1 购自美国 CST 公司; Annexin V-FITC 试剂盒购自北京宝赛生物技术公司; p38MAPK 抑制剂 SB203580 购自美国 Biomol 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Ishikawa 和 HEC-1A 细胞于含 10% 小牛血清 DMEM 培养液中培养。细胞在含 5% CO₂、饱和湿度及 37 °C 条件下进行培养。

1.2.2 PTEN 表达真核质粒和小分子干扰真核载体稳定转染 ① 小分子干扰真核载体转染: 无血清培养基洗涤 2 次, HEC-1A 细胞 90% 融合时行转染 pSilencerTM 3.1-siPTEN, 具体转染步骤按 Lipofectamine 2000 试剂说明书上操作, 置细胞培养箱中 4~6 h 更换完全培养基。转染 24 h 细胞置 400 μg/ml G418 培养液中培养, 约 4 周后筛选出抗 G418 的 HEC-1A-siPTEN 阳性克隆; ② PTEN 稳定转染: 以每孔 2.5×10^5 个 Ishikawa 细胞浓度种板, 细胞 90% 融合时转染 pcDNA3.1/PTEN。具体转染步骤按 Lipofectamine 2000 试剂说明书上操作, 转染 24 h 细胞置 400 μg/ml G418 培养液中培养, 约 4 周后筛选出抗 G418 的 Ishikawa-PTEN 阳性克隆。

1.2.3 干预实验分组 根据 PTEN 表达或缺失情况, 干预实验分组为 PTEN 表达或敲除 HEC-1A、HEC-1A + DMSO、HEC-1A + SB203580 (SB) 10 μmol/L; PTEN 缺失或表达 Ishikawa、Ishikawa + DMSO、Ishikawa + SB 10 μmol/L。

1.2.4 激光共聚焦显微镜检测 PTEN 蛋白表达 收集 Ishikawa、HEC-1A、PTEN 表达 Ishikawa、PTEN 缺失 HEC-1A 细胞, 每孔 2.5×10^4 个细胞浓度种板, 放入多聚赖氨酸处理过的盖片, 培养 24 h 后去培养液。预冷 100% 甲醇 -20 °C 固定细胞 5 min; 0.2% Triton-PBS 漂洗 3 次; 0.5% Triton-PBS 破膜 5~10 min。0.2% Triton-PBS 漂洗 3 次, 5% BSA 封闭 1 h, 单克隆 PTEN 抗体 (1:250) 4 °C 孵育过夜; 0.2% Triton-PBS 漂洗 3 次 × 10 min/次; 羊抗鼠 IgG-

FITC (1:1 000) 室温孵育 1 h (避光); 0.2% Triton-PBS 漂洗 3 次 × 10 min/次, PI 复染核 15 min, 封片, 激光共聚焦显微镜下观察照相。细胞质中 FITC 标记 PTEN 蛋白表达绿色荧光为表达阳性, DAPI 染细胞核表达蓝色荧光。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖 各组细胞以 1×10^4 /ml 的浓度种至 96 孔板, 每孔 100 μl, 每组设 3 个复孔。继续培养 24 h 后每孔加入 MTT (5 mg/ml) 10 μl 作用 2 h 后弃上清, 加入 150 μl DMSO 作用振荡 10~30 min, 在自动酶标平板阅读仪上以 570 nm 波长读取吸光度 (A) 值。计算细胞存活率 = (各浓度组 A 值/空白组 A 值) × 100%。

1.2.6 流式细胞术检测 各组子宫内膜癌细胞凋亡情况, 消化各组细胞, 1 000 r/min 离心 5 min 去除培养基, PBS 洗涤 1 次, 弃上清液, 收集细胞。100 μl PBS 重悬细胞, 分别加入 Annexin V-FITC 试剂 5 μl, 室温中避光孵育 30 min, 流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton-Dickinson 公司) 检测, Cell Quest 软件分析。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测细胞内 p38MAPK 及 phospho-p38MAPK、phospho-4E-BP1 及 4E-BP1 蛋白表达 提取细胞总蛋白并检测蛋白浓度, 取 30 μg 总蛋白, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 100 V, 电泳至溴酚蓝达分离胶, 加大电压至 200 V, 直至溴酚蓝达凝胶的底部, 半干电转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 1:500 稀释 p38MAPK 及 phospho-p38MAPK、phospho-4E-BP1 及 4E-BP1 一抗, 4 °C 孵育过夜, 加入 1:5 000 过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 2 h, 洗涤, ECL 显影。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 各组子宫内膜癌细胞中 PTEN 蛋白表达 激光共聚焦显微镜显示 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞 PTEN 蛋白表达分别为阳性和阴性, 其表达主要在细胞质中。PTEN 稳定转染 Ishikawa 细胞内表达 PTEN 蛋白, 而经 siPTEN 处理 HEC-1A 细胞 PTEN 表达受到抑制。见图 1。

2.2 Annexin V-FITC 检测不同 PTEN 表达各组细胞凋亡 PTEN 缺失情况下, SB203580 显著诱导 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞发生早期凋亡, 细胞早期凋亡率分别达 $(37.76 \pm 0.84)\%$ 及 $(32.75 \pm 1.36)\%$; 显著高于 SB203580 诱导 PTEN 表达 Ish-

ikawa 和 HEC-1A 细胞早期凋亡率 ($P < 0.01$); DMSO 作用 PTEN 表达或缺失 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞凋亡率无明显改变 ($P > 0.01$)。见表 1 和图 2、3。

表 1 细胞早期凋亡率比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN 表达	PTEN 缺失	t 值	P 值*
HEC-1A	1.21 ± 0.65	1.61 ± 0.42	-1.545	0.161
HEC-1A + DMSO	1.78 ± 0.66	2.22 ± 0.63	-1.607	0.147
HEC-1A + SB	3.32 ± 1.08	32.75 ± 1.36	-63.177	0.000
Ishikawa	1.42 ± 0.77	1.39 ± 0.75	0.892	0.398
Ishikawa + DMSO	1.25 ± 0.42	1.76 ± 0.56	-1.971	0.084
Ishikawa + SB	3.13 ± 0.72	37.76 ± 0.84	-138.729	0.000

* PTEN 缺失与 PTEN 表达各组细胞比较

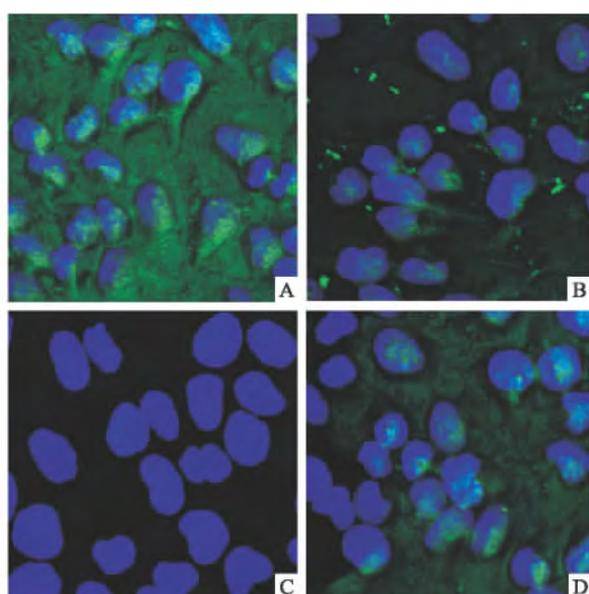


图 1 两株子宫内膜癌细胞转染前后 PTEN 蛋白免疫荧光表达 ×400

A: HEC-1A; B: HEC-1A 转染小分子干扰 RNA; C: Ishikawa; D: Ishikawa 转染 PTEN; 蓝色荧光为 DAPI 染色细胞核; 绿色荧光为 FITC 荧光二抗标记 PTEN 蛋白表达

2.3 不同 PTEN 表达各组细胞存活率 PTEN 缺失 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞经 SB203580 作用 48 h, 细胞生长明显受到抑制, 两株细胞存活率仅为 (49 ± 3.0)% 和 (46 ± 2.6)% 与 SB203580 作用 PTEN 表达 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); DMSO 作用 PTEN 表达或缺失 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞存活率无明显改变 ($P > 0.01$)。见表 2。

2.4 不同 PTEN 表达各组细胞 p38MAPK 及 phospho-p38MAPK、4E-BP1 及 phospho-4E-BP1 蛋白表达 SB203580 干预后, PTEN 缺失 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞 phospho-p38MAPK 表达下降, 两株细胞分别为 (28.2 ± 1.5)% 和 (24.1 ± 1.7)% 与

表 2 细胞存活率比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN 表达	PTEN 缺失	t 值	P 值*
HEC-1A	96.0 ± 1.7	97.0 ± 2.4	-0.209	0.840
HEC-1A + SB	90.0 ± 1.3	49.0 ± 3.0	8.200	0.000
HEC-1A + DMSO	95.8 ± 1.0	94.1 ± 2.2	0.423	0.121
Ishikawa	97.0 ± 2.5	96.0 ± 2.1	-0.207	0.841
Ishikawa + SB	89.0 ± 1.8	46.0 ± 2.6	9.383	0.000
Ishikawa + DMSO	96.0 ± 1.2	95.6 ± 0.9	0.701	0.192

* PTEN 缺失与 PTEN 表达各组细胞比较

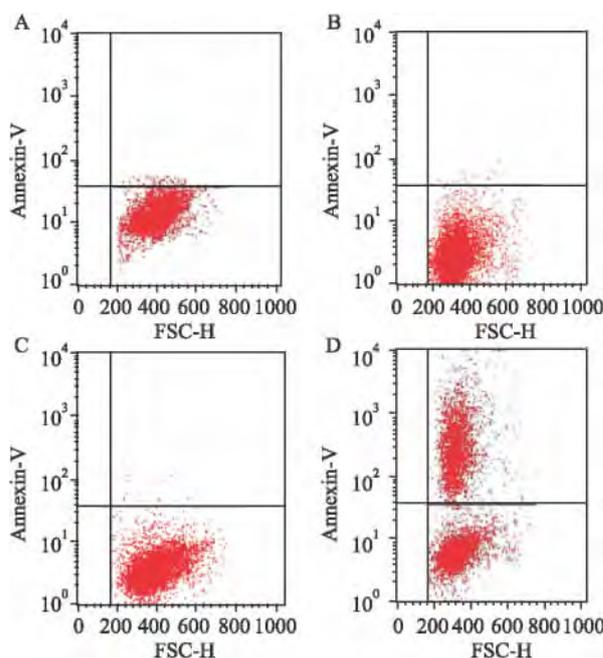


图 2 Ishikawa 细胞凋亡率比较

A: Ishikawa/PTEN + SB; B: Ishikawa/PTEN + DMSO; C: Ishikawa + DMSO; D: Ishikawa + SB

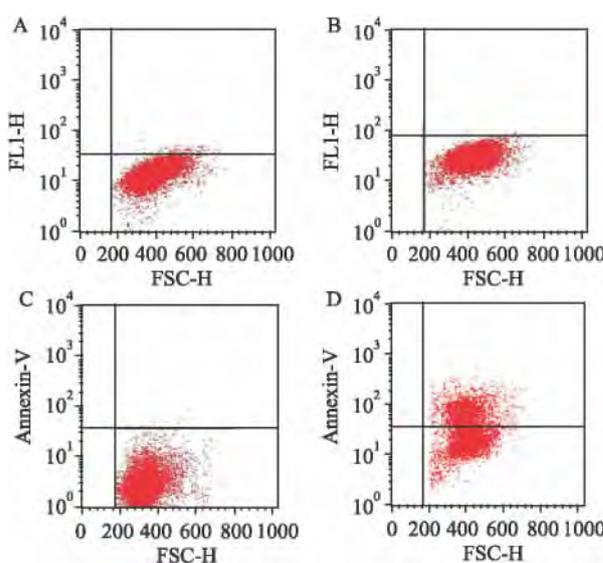


图 3 HEC-1A 细胞凋亡率比较

A: HEC-1A + SB; B: HEC-1A + DMSO; C: PTEN 敲除 HEC-1A + DMSO; D: PTEN 敲除 HEC-1A + SB

PTEN 表达 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞比较 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对磷酸化 4E-BP1 蛋白 Western blot 条带灰度值分析发现:PTEN 缺失 HEC-1A 和 Ishikawa 细胞 phospho-4E-BP1 蛋白 Western blot 条带灰度值下降至 ($117\ 150 \pm 2\ 423$) 和 ($98\ 885 \pm 8\ 055$), 与 PTEN 表达 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞 ($370\ 120 \pm 1\ 903$) 和 ($410\ 051 \pm 1\ 009$) 比较, 差异有统计学意义。SB203580 干预前后, PTEN 缺失或表达 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞总 4E-BP1 蛋白无明显改变。见图 4、5 和表 3。

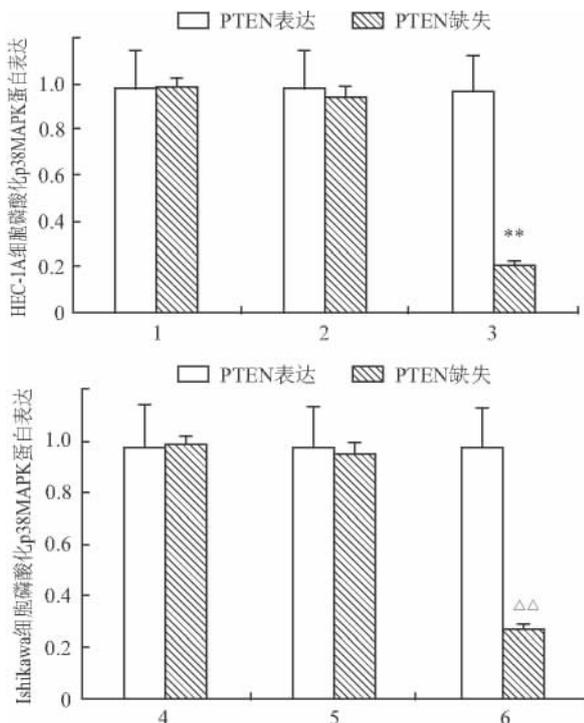


图4 SB203580 干预前后不同 PTEN 表达两株细胞 phospho-p38MAPK 蛋白表达比较

1: HEC-1A; 2: HEC-1A + DMSO; 3: HEC-1A + SB; 4: Ishikawa; 5: Ishikawa + DMSO; 6: Ishikawa + SB; 与 PTEN 表达 HEC-1A + SB 比较: ** $P < 0.01$; 与 PTEN 表达 Ishikawa + SB 比较: △△ $P < 0.01$

表3 SB203580 干预前后不同 PTEN 表达两株细胞 phospho-p38MAPK 蛋白表达率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN 表达	PTEN 缺失	t 值	P 值*
HEC-1A	97.0 ± 1.9	98.0 ± 1.0	-0.125	0.616
HEC-1A + SB	96.0 ± 1.8	24.1 ± 1.7	61.310	0.000
HEC-1A + DMSO	97.8 ± 0.9	93.6 ± 2.1	1.347	0.278
Ishikawa	98.0 ± 1.1	97.5 ± 1.4	0.183	0.092
Ishikawa + SB	96.4 ± 2.3	28.2 ± 1.5	46.500	0.000
Ishikawa + DMSO	95.8 ± 1.2	96.0 ± 0.6	0.571	0.147

* PTEN 缺失与 PTEN 表达各组细胞比较

3 讨论

子宫内膜癌是女性生殖道最为常见恶性肿瘤之

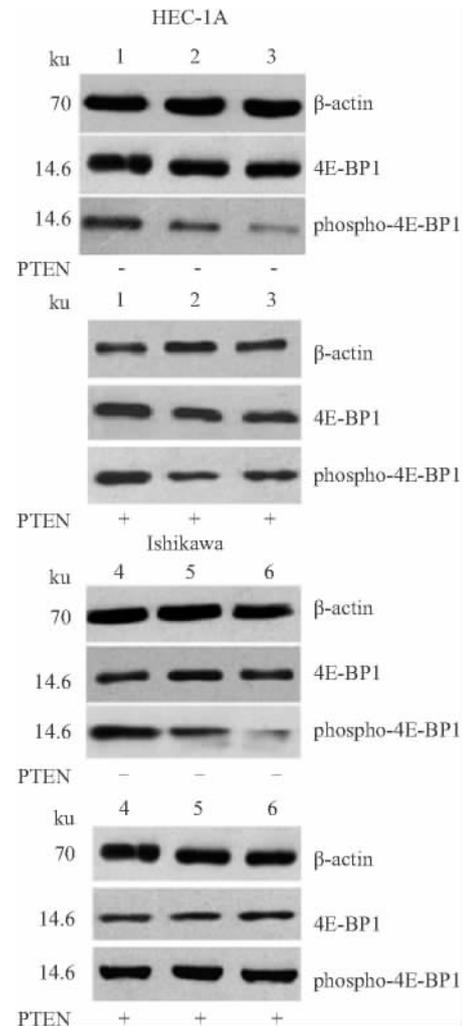


图5 SB203580 干预前后不同 PTEN 表达两株细胞 4E-BP1 及 phospho-4E-BP1 蛋白表达

1: HEC-1A; 2: HEC-1A + DMSO; 3: HEC-1A + SB; 4: Ishikawa; 5: Ishikawa + DMSO; 6: Ishikawa + SB

一^[3], 占女性生殖道恶性肿瘤的 20% ~ 30% , 研究^[4] 显示在其发生发展过程中抑癌基因失活、突变导致的信号通路异常激活可能发挥了重要作用。MAPKs 信号通路是一类在肿瘤形成、进展和转移中扮演着重要角色的蛋白激酶^[5] , p38MAPK 通路是 MAPK 家族重要成员, 在多数肿瘤中都存在不正常激活或异常表达^[6] , 其主要通过细胞周期调控及诱导细胞凋亡发挥肿瘤抑制作用。

具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因 PTEN 在维持基因组稳定性方面起着重要作用。PTEN 缺失可能导致肿瘤细胞对相关化疗、放疗敏感性降低^[7-8]。但亦有一些研究^[9-10] 显示 PTEN 缺失或突变可导致肿瘤细胞对特异性信号通路抑制剂产生耐受。PTEN 在人子宫内膜癌中丢失率可高达 60% ~

80%^[11], PTEN 基因缺失突变与子宫内膜癌发生发展有着密切联系。目前有关子宫内膜癌 PTEN 缺失与相关信号通路关系的研究还未见报道。

因此,本研究采用稳定转染和小分子干扰 RNA 敲除改变 Ishikawa 和 HEC-1A 两株子宫内膜细胞 PTEN 表达,观察 p38MAPK 通路抑制剂诱导不同 PTEN 表达人子宫内膜癌细胞增殖、凋亡等情况。结果显示 SB203580 干预后,PTEN 表达缺失子宫内膜癌细胞生长明显减缓,细胞发生显著早期凋亡,而 PTEN 表达子宫内膜癌细胞则无此趋势,说明 p38MAPK 信号通路是调控 PTEN 表达缺失子宫内膜癌细胞增殖的关键信号分子。蛋白定量结果显示,子宫内膜癌细胞中 p38MAPK 途径异常激活与 PTEN 缺失相关;p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可显著下调 PTEN 表达缺失子宫内膜癌细胞中 p38MAPK 通路及 4E-BP1 蛋白磷酸化水平。分析以上结果显示,子宫内膜癌细胞中 PTEN 缺失使 p38MAPK 通路活化,其机制可能与 PTEN 缺失导致 PTEN 对 p38MAPK 信号通路负性调控功能丧失,引起 PTEN 下游靶基因 4E-BP1 转录改变有关。以上结果显示 PTEN 表达缺失时,子宫内膜癌细胞对 p38MAPK 信号通路抑制剂敏感性明显增加,提示 PTEN 水平可成为预测相关信号通路抑制剂敏感与否的标志物之一。

参考文献

- [1] Blanco-Aparicio C, Refiner O, Leal J F, et al. PTEN, more than the AKT pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28 (7): 1379 - 86.
- [2] Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi P P. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3):

629 - 33.

- [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59 (4): 225 - 49.
- [4] Xiao L, Yang Y B, Li X M, et al. Differential sensitivity of human endometrial carcinoma cells with different PTEN expression to mitogen-activated protein kinase signaling inhibitors and implications for therapy [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 36 (7): 1089 - 99.
- [5] Dhillon A S, Hagan S, Rath O, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (22): 3279 - 90.
- [6] Davidson B, Konstantinovskiy S, Kleinberg L, et al. The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 102 (3): 453 - 61.
- [7] Lee S, Choi E J, Jin C, et al. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 97(1): 26 - 34.
- [8] Jiang Z, Pore N, Cerniglia G J, et al. Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (9): 4467 - 73.
- [9] Wang Z H, Gao Q Y, Fang J Y. Loss of PTEN expression as a predictor of resistance to anti-EGFR monoclonal therapy in metastatic colorectal cancer: evidence from retrospective studies [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69 (6): 1647 - 55.
- [10] Paraiso K H, Xiang Y, Rebecca V W, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (7): 2750 - 60.
- [11] Akiyama-Abe A, Minaguchi T, Nakamura Y, et al. Loss of PTEN expression is an independent predictor of favourable survival in endometrial carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109 (6): 1703 - 10.

Effects of MAPK signal transduction inhibitors on endometrial carcinoma cells with different PTEN status and its mechanism

Xiao Lan, Long Tengfei, He Chan, et al

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore whether sensitivity to p38MAPK inhibitors are specifically due to status of PTEN in endometrial cancer Ishikawa and HEC-1A cells, and its related mechanisms. **Methods** Vector mediated PTEN-siRNA and PTEN gene were transfected into two endometrial cancer cells. The expression of PTEN protein was detected by confocal spectral microscopy. SB203580 treated for 48 hours, cell proliferation, cell early apoptosis, were studied by MTT method and flow cytometry (FCM), respectively. The activation of p38MAPK and 4E-BP1 was examined by Western blot. **Results** The PTEN protein expression in two endometrial carcinoma cells (Ishikawa, HEC-1A) was exchanged by vector mediated PTEN siRNA and PTEN plasmid stable transfection. SB203580 could inhibit cell viability, induce cell early apoptosis of PTEN loss Ishikawa and HEC-1A cells after the cells exposed to

宫内暴露邻苯二甲酸二酯对子代雌性成年大鼠心脏的影响

赵青松¹, 方瑞², 吴德¹, 都鹏飞²

摘要 目的 探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)宫内暴露对子代雌性大鼠心脏的影响。方法 自妊娠第1天直至分娩,SD妊娠大鼠分别予以灌胃玉米油、低剂量[10 mg/(kg·d)]DEHP、高剂量[100 mg/(kg·d)]DEHP。观察各组子代雌性大鼠一般状况(体重)、心肌组织学以及心脏的血流动力学指标。结果 ①与正常对照组比较,DEHP染毒组雌性仔鼠自出生至生后70 d的体重增长明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②高剂量组的心率(HR)、左室舒张压(LVEDP)明显高于正常对照组及低剂量组,而左室收缩压(LVSP)、左室最大上升速率($+dp/dt_{max}$)及左室最大下降速率($-dp/dt_{max}$)明显低于正常对照组及低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。③光镜下高剂量组子代雌性大鼠的心肌细胞肥大,心肌纤维排列紊乱,大量心肌细胞核核固缩、深染;电镜示大量心肌细胞核固缩、深染,心肌纤维排列紊乱、断裂,线粒体嵴排列大部分断裂、模糊。然而,正常对照组和低剂量组病理变化不明显。结论 怀孕期间大剂量的DEHP接触可引起子代雌性大鼠体重增加、血流动力学异常和心肌细胞结构紊乱。

关键词 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;胚胎期;心肌细胞;心功能

中图分类号 R 725.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0618-04

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]是一种工业上添加到聚氯乙烯中使用最广和产量最大的塑化剂,占全世界邻苯二甲

酸酯类消费的80%^[1],在成品塑料中占据40%的比例。DEHP被广泛应用在食品包装、玩具、化妆品和医疗制品等众多领域,可通过皮肤接触、消化道和呼吸道被吸收^[2],也可以通过胎盘屏障影响胎儿。DEHP作为一种环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs),其生殖毒性已经得到研究者的公认。但DEHP对心肌细胞及心脏功能的影响报道甚少。该研究主要通过胚胎期暴露于不同剂量的DEHP,观察子代雌性大鼠心脏组织形态学及测定其血流动力学,为今后DEHP心脏毒性的研究及干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 DEHP:分析纯,纯度98.6%(美国Sigma公司);玉米油:市售,金龙鱼牌;BL-420s生物机能试验系统、压力换能器(成都泰盟科技有限责任公司);Tecnaï F20透射电子显微镜(中国科技大学集成影像中心)。

DEHP染毒溶液的配制:用移液管分别吸取1 ml DEHP,用玉米油分别稀释100倍、10倍,颠倒混匀,配置成10、100 mg/ml的DEHP溶液。

1.2 实验动物分组及染毒方法 选择健康成年清洁级SD大鼠9只,体重为220~250 g,雌:雄为2:1,由安徽医科大学实验动物中心提供。动物可自由饮水、摄食,饲料由安徽医科大学实验动物中心提供。动物室温度为18~23℃,相对湿度为45%~55%。适应性饲养7 d后,将大鼠按雌雄2:1进行合笼后,以发现阴栓当日为妊娠第1天,将孕鼠按体重随机分为3组:正常对照组、低剂量(10 mg/kg)DEHP染毒组、高剂量(100 mg/kg)DEHP染毒组。根据大鼠生活习性,自妊娠第1天起,8:00禁食,

2014-01-05 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点项目(编号:KJ2007A096)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

²安徽医科大学第二附属医院儿科,合肥 230601

作者简介:赵青松,女,硕士研究生;

都鹏飞,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:dpf.ayfy@163.com

SB203580. The expression of phosphorylation of p38MAPK and 4E-BP1 protein in PTEN loss Ishikawa and HEC-1A cells was significantly decreased. Compared with PTEN intact Ishikawa and HEC-1A cells the difference was significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Loss of PTEN results in the activation of p38MAPK signal pathway, and due to sensitive to p38MAPK signal transduction inhibitors in endometrial carcinoma cells. Those results suggest that cells with loss of PTEN have a feedback downregulation of receptor p38MAPK signalling pathway, which leads to PTEN inactivation of p38MAPK signaling pathway, the transcription change of the downstream gene targeted p38MAPK.

Key words endometrial carcinoma; PTEN; p38MAPK signal transduction inhibitor; sensitivity