基于pcDNA3.1框架的p38β真核表达质粒的 构建及其功能研究

饶先玥,方 婧,吴体玲,汪 浩"

安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科, 安徽 合肥

收稿日期: 2025年4月12日; 录用日期: 2025年5月5日; 发布日期: 2025年5月13日

摘要

目的:为探究p38 β 在巨噬细胞炎症反应中的调控机制,建立鼠源pcDNA3.1-N-3×Flag-p38 β 真核表达质 粒,转染RAW264.7细胞建立实验模型。通过脂多糖(LPS)刺激,从细胞增殖、凋亡、促炎因子表达三个 方面研究该重组质粒的生物学功能。方法:通过PCR扩增p38 β 基因,构建基于pcDNA3.1框架的p38 β 真 核表达质粒。利用EcoRl/XhoI限制性位点双酶切,将纯化的目的片段进行体外重组,转化细菌感受态细 胞。经酶切鉴定、测序与比对分析后,将重组质粒转染至LPS刺激的RAW264.7细胞中,通过Western blot 和qRT-PCR技术及EdU法、ELISA法检测其对LPS诱导的RAW264.7细胞增殖和凋亡的影响,以及肿瘤坏 死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等炎症介质的分泌水平。其中,Western blot技术用于检测凋亡相关蛋白表达,qRT-PCR解析基因转录调控,EdU法检测DNA合成活性,ELISA法 检测炎症因子分泌量。结果:双酶切鉴定和Western blot结果显示pcDNA3.1-N-3×Flag-p38 β 真核表达 质粒构建成功并表达。EdU实验显示:LPS刺激RAW264.7细胞24h后,p38 β 过表达组的细胞存活率显著 低于空载体对照组。Western blot及PCR结果显示:p38 β 过表达组细胞的促凋亡蛋白Bax表达高于转染 空载体的对照组,抗凋亡蛋白Bcl-2及增殖蛋白PCNA表达低于空载体对照组(均P<0.05)。Western blot 和ELISA结果显示:pcDNA3.1-N-3×Flag-p38 β 质粒转染使RAW264.7细胞中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达 较对照组升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论:p38 β 能抑制LPS刺激的RAW264.7细胞增殖,并 促进其凋亡,同时能上调TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等炎症介质的表达。

关键词

p38β, RAW264.7细胞, 增殖, 凋亡, 肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素-6, 白细胞介素-1 β

Study on Construction and Functional Characterization of a pcDNA3.1-Based Eukaryotic Expression Plasmid for p38β

Xianyue Rao, Jing Fang, Tiling Wu, Hao Wang*

*通讯作者。

Department of Oncology Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Apr. 12th, 2025; accepted: May 5th, 2025; published: May 13th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the regulatory mechanism of $p38\beta$ in macrophage inflammatory responses, a murine pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38 β eukaryotic expression plasmid was constructed and transfected into RAW264.7 cells to establish an experimental model. Lipopolysaccharide (LPS) stimulation was used to study the biological functions of this recombinant plasmid in terms of cell proliferation, apoptosis, and pro-inflammatory cytokine expression. Methods: The $p38\beta$ gene was amplified by PCR to construct the p38 β eukarvotic expression plasmid based on the pcDNA3.1 framework. Purified target fragments were recombined in vitro using EcoRI/XhoI restriction sites and transformed into bacterial competent cells. After restriction enzyme digestion, sequencing, and comparative analysis, the recombinant plasmid was transfected into LPS-stimulated RAW264.7 cells. Western blot, gRT-PCR, EdU assay, and ELISA were employed to assess its effects on LPS-induced proliferation, apoptosis, and secretion levels of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α $(\text{TNF-}\alpha)$, interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β). Specifically, Western blot analyzed apoptosis-related protein expression, qRT-PCR elucidated transcriptional regulation, the EdU assay measured DNA synthesis activity, and ELISA quantified inflammatory cytokine secretion. Results: Restriction enzyme digestion and Western blot confirmed the successful construction and expression of the pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β plasmid. The EdU assay revealed that 24 h after LPS stimulation, cell viability in the p38 β over expression group was significantly lower than in the empty vector control group. Western blot and gRT-PCR results demonstrated that the p38ß overexpression group exhibited higher expression of the pro-apoptotic protein Bax and lower expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) compared to the control group (P < 0.05). Additionally, Western blot and ELISA showed that transfection with pcDNA3.1-N-3 × Flagp38 β significantly upregulated the expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in RAW264.7 cells compared to the control group (P < 0.05). Conclusion: p38 β inhibits LPS-induced proliferation and promotes apoptosis in RAW264.7 cells while upregulating the expression of inflammatory mediators such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β .

Keywords

p38 β , RAW264.7 Cells, Proliferation, Apoptosis, Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-6, Interleukin-1 β

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

1. 引言

细胞外信号调节激酶 p38β 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) p38 亚家族中的一个亚型,由丝裂原活化 蛋白激酶 11 (MAPK11)编码[1]-[3]。p38β 在人脑、心脏、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、睾丸、卵巢、前列腺 和胰腺等中均有表达,其主要是通过调节炎症信号通路发挥作用,与人类约一半的恶性肿瘤、感染、自 身免疫性疾病等引起的炎症过程存在显著关联[1] [4] [5]。肿瘤组织中存在炎症细胞和炎症介质(如趋化因 子、细胞因子等)是癌症相关炎症的特征之一,慢性炎症通过促进癌细胞异常增殖、诱导新生血管生成、 增强细胞侵袭能力以及促进转移扩散,在恶性肿瘤演进过程中发挥着关键调控作用[6]。作为免疫系统的 关键性吞噬细胞,巨噬细胞不仅负责清除病原体和摄取消化、吞噬处理衰老/损伤细胞,还能通过分泌多 种促炎因子参与微环境调控[7] [8]。研究表明,作为重要的信号传导通路,p38 MAPK 通过动态调节肿瘤 相关细胞产生的炎症介质的活性与表达,包括肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-a, TNF-a)、白细胞介 素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)等,从而介导肿瘤起始阶段的病理转化并 加速恶性进展过程[6] [9] [10]。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌外膜的主要成分,通过特 异性激活巨噬细胞表面 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)介导的 NF-κB 级联反应,触发促炎介质的合 成与释放,进而诱导炎症反应的发生发展[11]。故采用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,建立体外炎 症反应研究模型,研究并探讨 p38β 的功能。本实验将通过构建 p38β 过表达质粒,研究 p38β 对 LPS 刺 激的 RAW264.7 细胞模型中的调控作用,包括增殖、凋亡及炎症级联反应的影响。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

RAW264.7 细胞株(安徽医科大学药学院保存); 胎牛血清(美国 Gibco 公司); DMEM 培养基(北京沃 卡威生物技术有限公司); p38β 抗体(山东华安生物科技有限公司); Western blot 试剂盒、TRIzol Rragent RNA 提取试剂(上海 Beyotime 公司); ECL 化学发光试剂(上海雅酶生物医药科技有限公司); 细胞培养瓶、 培养板(无锡 NEST 公司); PVDF 膜(北京索莱宝科技有限公司); TNF-α 抗体、IL-6 抗体、IL-1β 抗体(武 汉三鹰生物技术有限公司); Lipofectamine 2000 试剂(美国 Invitrogen 公司); EcoRI、XhoI 内切酶(美国 Axygen 公司); ELISA 试剂盒(武汉基因美公司)。

2.2. 方法

2.2.1. p38β 真核表达质粒的构建与验证

通过 PCR 技术扩增 p38β 基因,并将其克隆至 pcDNA3.1 载体多克隆位点,构建 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 真核表达质粒。经双酶切验证后委托上海吉玛制药技术有限公司完成 DNA 测序鉴定。

2.2.2. p38β 过表达载体的转染与实验分组

将 RAW264.7 细胞按 1 × 10⁶ 个/孔的密度接种入 6 孔培养板内继续培养, 待细胞贴壁后进行转染操 作。制备转染复合物:将 A 液(含 2 µg pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38 β 质粒的 250 µL DMEM 培养基)与 B 液 (含 5 µL Lipofectamine 2000 脂质体的 250 µL DMEM 培养基)分别于无核酸酶 EP 管中静置 5 min 后,震荡充分混匀。经 20 min 室温孵育后,将其转移至 6 孔板中再补足培养基至 2 mL。转染 6 h 后更换完全培养基,继续培养 24 h 用于后续检测。本实验分为四个组进行对比分析:基础对照组:维持基础培养条件,未进行任何处理; LPS 刺激组:加入 100 ng/mL LPS 单刺激处理;空载体对照组: 100 ng/mL LPS 刺激 + pcDNA3.1-N-3 × Flag 空载体转染; p38 β 过表达组: 100 ng/mL LPS 刺激 + pcDNA3.1-N-3 × Flag 空载体转染。

2.2.3. Western Blot 实验

完成细胞处理后,吸弃 6 孔板中的培养基,用 PBS 缓冲液进行 3 次梯度漂洗。加入预冷的 RIPA 裂 解液(含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂),在冰上裂解细胞,离心提取总蛋白。使用 BCA 法对蛋白样品进行定 量分析,测蛋白质浓度。经 12% SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳分离后,在恒定电流(200 mA)条件下湿式转膜 60 min,使蛋白样品定向迁移至 PVDF 膜。转印完成后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液于室温封闭 2 h 后,TBST 在摇床上进行 3 次间隔洗涤(每次 10 min),并在相应的一抗中 4℃孵育过夜,一抗稀释的浓度分 别为 p38β (1:500), TNF-α (1:1000), IL-6 (1:1000)、IL-1β (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:1000)、PCNA (1:1000)。 经严格洗膜后,与 HRP 偶联二抗(1:5000)于室温孵育 1 h。严格清洗 3 次去除游离抗体,采用 ECL 化学发 光试剂盒进行蛋白条带显影及图像采集,所有结果均以β-actin 抗体(1:5000)作为内参蛋白对照。

2.2.4. EdU 检测

采用胰蛋白酶解离法获取处于对数生长期的 RAW264.7 单细胞悬液,以1×10⁵个/孔的密度接种于 96 孔培养板中。在 37℃、5% CO₂恒温培养箱中预培养 12 h 后,向各孔加入 EdU 检测试剂,继续孵育 2 h 完成细胞增殖标记。弃旧培养基,PBS 清洗 2 遍。每孔加入 50 µL 4%多聚甲醛固定液固定 30 min,经 PBS 清洗后进行膜透化处理。每孔加入含 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液 100 µL,室温处理 15 min 后弃液, PBS 清洗 3 遍。向各孔滴加 Click-iT™反应缓冲液,于室温避光反应 30 min,随后补加 1 µg/mL DAPI 核 染液室温染色 10 min。经 PBS 清洗后在荧光显微镜下采集各组细胞图像,细胞增殖率 = EdU 阳性细胞 数/DAPI 阳性细胞数。

2.2.5. RNA 提取和 qRT-PCR

按照 RNA 纯化试剂盒说明书分离细胞总 RNA。逆转录合成 cDNA, 在 StepOnePlus™实时荧光定量 PCR 系统中进行目标基因扩增。目标基因表达水平通过 ΔΔCt 法计算, 以β-actin 作为内参进行标准化校正。

2.2.6. ELISA 检测炎症因子的分泌

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1 × 10⁶ 个/孔的密度接种于 6 孔培养板,分别转染空载体 (pcDNA3.1-N-3×Flag)和 p38β 过表达载体(pcDNA3.1-N-3×Flag-p38β),6h 后更换为含 100 ng/mL LPS 的 完全培养基,继续孵育 24 h。终止培养后,收集细胞悬液经离心分离获得上清液,严格参照 ELISA 试剂 盒操作规范检测细胞上清液中炎症介质 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的浓度。

2.3. 统计学分析方法

本研究中所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行系统分析,计量资料均以"均数 ± 标准差"(x ± s)表示,选用 t 检验进行两独立样本均数比较,选用单因素方差分析进行多组间数据比较。显著性水平设 为 α = 0.05 (双侧), P < 0.05 判定为差异显著。

3. 结果

3.1. p38β 真核表达质粒的构建与验证

为了构建 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 真核表达质粒,通过 PCR 法扩增目的基因片段。将 pcDNA3.1-N-3 × Flag 载体与目的片段经 EcoRI/XhoI 双酶切后纯化,通过 T4 DNA 连接酶构建重组质粒,转化 TG1 感受态细胞。随机选取 8 个单克隆菌落进行液体振荡培养,最终采用质粒纯化试剂盒提取重组质粒。经 EcoRI/XhoI 双酶切验证显示: pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒成功构建。如图 1 所示,阳性克隆经 琼脂糖凝胶电泳分析,在预期分子量位置呈现特异性条带,与双酶切产生的片段大小一致。进一步筛选 经限制性内切酶验证的重组克隆,委托专业测序机构(上海吉玛制药技术有限公司)进行 DNA 序列比对。

3.2. pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 真核表达质粒的表达验证

为了检测 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 质粒在 RAW264.7 细胞中的表达效率,采用 Western blot 技术 进行蛋白水平检测。结果显示:与基础对照组相比,LPS 刺激组中 p38β 蛋白表达水平显著升高(P<0.01); 过表达组的 p38β 蛋白表达量高于转染空载体的对照组(P<0.01)。该结果表明 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒成功实现功能性表达,见图 2。



M1、M2: DNA Marker

Figure 1. Restriction enzyme digestion verification of the pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β recombinant plasmid 图 1. pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒的酶切验证



Figure 2. Protein expression of the pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38 β recombinant plasmid. A: Western blot detection of the protein expression of the pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38 β plasmid; B: Histogram of p38 β protein expression. Compared with the basic control group: *P < 0.05; compared with the empty vector control group: *P < 0.01.

图 2. pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒的蛋白表达。A:Western blot 检测 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 质粒的蛋白表 达; B:p38β 蛋白表达柱状图; 与基础对照组比较: *P < 0.05; 与空载体对照组比较: **P < 0.01。

3.3. p38β 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

为了检测 pcDNA3.1-N-3×Flag-p38β 质粒转染后对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响,采用 EdU 染色 法进行检测。结果显示,相较于 LPS 刺激组和空载体对照组,p38β 过表达组的 EdU 阳性细胞率明显降 低,差异具有统计学意义(P<0.01)。这表明在 LPS 刺激的炎症反应中,p38β 的过表达可通过靶向调控细 胞周期来抑制 RAW264.7 细胞的增殖活性,见图 3。

3.4. p38β 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响

为了检测 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38 β 质粒转染至 RAW264.7 各组细胞后对细胞凋亡的影响,分别采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Bcl-2、PCNA 和 Bax 的 mRNA 和蛋白水平相对表达量。结果显示,相较于 LPS 刺激组及空载体对照组,p38 β 过表达组抗凋亡因子 Bcl-2 的转录水平与蛋白丰度均下调(P < 0.01),促凋亡因子 Bax 的表达量则呈现上调(P < 0.01)。同时,增殖标志物 PCNA 的表达亦受抑制(P < 0.05)。该结果表明过表达 p38 β 可通过调节 Bcl-2/Bax 平衡及抑制增殖相关蛋白表达,促进 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡,见图 4。

	DAPI	EdU	Merge
Normal			
LPS			
pEGFP-C1-p38β		20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 2	
pEGFP-C1		and a second second Second second second Second second second Second second	

Figure 3. Detection of cell proliferation activity by EdU assay 图 3. EdU 法检测细胞增殖活性



*, **分别代表 P < 0.05, P < 0.01。

Figure 4. Expression of apoptosis-related proteins after transfection with pcDNA3.1-N-3 \times Flag-p38 β recombinant plasmid. A. Western blot detection of apoptosis-related protein expression; B. Analysis of mRNA levels for Bax, PCNA, and Bcl-2; C. Analysis of protein levels for Bax, PCNA, and Bcl-2

图 4. pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒转染后凋亡相关蛋白的表达。A. Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达; B. Bax、PCNA 和 Bcl-2 的 mRNA 水平分析; C. Bax、PCNA 和 Bcl-2 的蛋白水平分析

3.5. p38ß 对 RAW264.7 细胞炎症介质表达的影响

为了检测 pcDNA3.1-N-3×Flag-p38 β 质粒转染后对 RAW264.7 细胞炎症应答的调控作用,采用 qRT-PCR 技术定量分析关键促炎介质(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的 mRNA 转录水平,Western blot 检测相应蛋白的 表达量。结果显示:与空载体对照组相比,p38 β 过表达组中的 TNF- α 和 IL-6 的表达量均上调(P<0.001, P<0.01)。IL-1 β 的 mRNA 与蛋白表达亦呈现上调趋势(P<0.01)。这表明在 RAW264.7 细胞模型中,p38 β 的基因过表达显著驱动促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 的转录激活与胞外分泌,见图 5。



^{*, **}分别代表 P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001。

Figure 5. Expression of inflammatory factors after transfection with pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β recombinant plasmid. A. Western blot detection of the expression of inflammatory factors; B. Quantitative analysis of the mRNA levels of TNF-α, IL-6, and IL-1β; C. Quantitative analysis of the protein levels of TNF-α, IL-6, and IL-1β **S 5.** pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒转染后炎症因子的表达。A. Western blot 检测炎症因子的表达; B. TNF-α, IL-6 和 IL-1β 的 mRNA 水平定量分析; C. TNF-α, IL-6 和 IL-1β 的蛋白水平定量分析

3.6. p38β 对 RAW264.7 细胞炎症介质分泌的影响

为了检测 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 质粒对 RAW264.7 巨噬细胞炎症介质分泌的调控,通过高敏 ELISA 法检测上清液中促炎因子水平。结果显示:相较于空载体对照组,p38β 过表达组中的 TNF-α 释放

量升高(P<0.01); IL-6 和 IL-1β 的分泌水平也均较转染空载体对照组升高(P<0.05)。这表明在 RAW264.7 细胞中,过表达 p38β 显著促进 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 等促炎介质的合成与分泌,见图 6。



Figure 6. Detection of the levels of inflammatory factors in the supernatant after transfection with pcDNA3.1-N-3 × Flagp38 β recombinant plasmid by ELISA

图 6. ELISA 法检测 pcDNA3.1-N-3 × Flag-p38β 重组质粒转染后上清液中炎症因子的水平

4. 讨论

丝裂原活化蛋白激酶 p38 家族是存在于各种生物细胞中一条重要的信号传导通路,作为丝裂原活化 蛋白激酶(MAPK)家族的核心成员,其在炎症调控和肿瘤发生发展中的双重作用近年来备受关注[12]。有 研究证实,在巨噬细胞介导的炎症反应中,通常在病原体或 LPS 刺激后,p38 MAPK 被迅速磷酸化和激 活,促进多种促炎介质的表达[13] [14]。p38β 可能主要通过激活 MAPK AP-K2 和 ATF-2 等下游效应分子 调控细胞应激反应,同时可能通过 MSK1 通路影响炎症因子的转录调控[15] [16]。炎症是多种生理和病 理过程的基础,过度或持续的炎症稳态失衡会导致多种疾病,比如自身免疫性疾病、感染、癌症等[17]。 本研究通过构建 p38β 过表达质粒,建立 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型,揭示其在 RAW264.7 巨噬细胞中的功能调控网络。

实验数据显示, p38β 过表达显著抑制 LPS 诱导的细胞增殖(EdU 阳性率下降, P<0.01)。分子机制研 究发现, qRT-PCR 和 Western blot 检测质粒转染后细胞凋亡相关蛋白表达,结果显示 p38β 过表达后能够 上调细胞凋亡相关蛋白 Bax 的表达,下调抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 及增殖相关蛋白 PCNA 的表达,从而促 进 RAW264.7 细胞的凋亡。此外,该亚型同时表现出促炎特性。Western blot 检测结果显示 p38β 过表达 使细胞中炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的蛋白表达水平上调; ELISA 结果显示细胞上清中炎症因子分 泌量显著升高,进一步表明 p38β 通过转录 - 分泌双途径促进炎症反应。综合实验数据分析, p38β 对 RAW264.7 细胞表现出双重调控作用:抑制 RAW264.7 细胞的增殖并促进其凋亡;同时也可上调 TNF-α、 IL-6 及 IL-1β 等促炎细胞因子的分泌水平。该基因过表达在 RAW264.7 细胞中呈现"增殖抑制 - 凋亡增 强 - 炎症加剧"的三联效应。

虽然 p38β 在人类细胞中的确切分子功能尚未完全阐明,但它参与细胞转化和癌症的过程,影响细胞 对化疗和放疗的反应,在多种肿瘤类型中具有双重调控作用,以 p38β 为靶点研发药物抑制炎症因子的表 达和分泌,为今后炎症及肿瘤治疗提供了新的思路[18]。本研究证实其同时具有促凋亡和促炎特性,这种 特双效性提示靶向 p38β 可通过重塑肿瘤免疫微环境发挥治疗作用,但也可能过度激活炎症反应而带来相 应的副作用。但本研究存在一定局限性,实验模型基于体外培养的 RAW264.7 细胞系,缺乏在原代巨噬 细胞和条件性敲除动物模型中进一步验证;其次,本研究发现的 p38β 调控网络主要集中于已知的 NF-κB 和 AP-1 信号通路,未深入解析 p38β 特异性调控的转录因子网络,未能揭示新的作用靶点或调控机制, 这可能导致研究创新性受限。再者,p38β 与其他亚型(如 p38α)的交互作用尚未阐明,与其他 MAPK 通路 成员(如 ERK、JNK)的交叉对话可能产生补偿效应。后续研究将建立多维度评价体系,在条件性敲除动物 模型中验证 p38β 的体内功能,并通过蛋白质组学筛选其新型互作蛋白,为开发精准靶向 p38β 的疾病干 预策略提供理论依据。

参考文献

- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., *et al.* (1996) Characterization of the Structure and Function of a New Mitogen-Activated Protein Kinase (p38β). *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 17920-17926. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17920</u>
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., *et al.* (1997) Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-Activated Protein Kinases, p38δ. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 30122-30128. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30122</u>
- [3] Lisnock, J., Tebben, A., Frantz, B., O'Neill, E.A., Croft, G., O'Keefe, S.J., et al. (1998) Molecular Basis for P38 Protein Kinase Inhibitor Specificity. *Biochemistry*, 37, 16573-16581. <u>https://doi.org/10.1021/bi981591x</u>
- [4] Kim, E.K. and Choi, E. (2010) Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1802**, 396-405. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009</u>
- [5] Stein, B., Yang, M.X., Young, D.B., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, B.W., et al. (1997) P38-2, a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase with Distinct Properties. Journal of Biological Chemistry, 272, 19509-19517. https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19509
- [6] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) Cancer-Related Inflammation. *Nature*, 454, 436-444. <u>https://doi.org/10.1038/nature07205</u>
- [7] 张一凡, 刘萍. 丹酚酸 B 通过 STAT3/NF-κB 信号通路改善动脉粥样硬化小鼠及 RAW264.7 细胞炎症反应[J]. 中 华中医药杂志, 2023, 38(1): 141-147.
- [8] Zhang, T., Guo, J., Gu, J., Chen, K., Li, H. and Wang, J. (2019) Protective Role of mTOR in Liver Ischemia/Reperfusion Injury: Involvement of Inflammation and Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, Article ID: 7861290. <u>https://doi.org/10.1155/2019/7861290</u>
- [9] Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., *et al.* (1994) A Protein Kinase Involved in the Regulation of Inflammatory Cytokine Biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746. <u>https://doi.org/10.1038/372739a0</u>
- [10] Hansen, T.E. and Jørgensen, J.B. (2007) Cloning and Characterisation of P38 MAP Kinase from Atlantic Salmon. *Molecular Immunology*, 44, 3137-3146. <u>https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.006</u>
- [11] Zhu, T., Zhang, W., Feng, S. and Yu, H. (2016) Emodin Suppresses LPS-Induced Inflammation in RAW264.7 Cells through a PPARy-Dependent Pathway. *International Immunopharmacology*, 34, 16-24. <u>https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.014</u>
- [12] Khavari, T.A. and Rinn, J.L. (2007) Ras/Erk MAPK Signaling in Epidermal Homeostasis and Neoplasia. Cell Cycle, 6, 2928-2931. <u>https://doi.org/10.4161/cc.6.23.4998</u>
- [13] Garcia, J., Lemercier, B., Roman-Roman, S., et al. (1998) A Mycoplasma fermentans-Derived Synthetic Lipopeptide Induces AP-1 and NF-κB Activity and Cytokine Secretion in Macrophages via the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. Journal of Biological Chemistry, 273, 34391-34398. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34391</u>
- [14] Byeon, S.E., Lee, J., Yoo, B.C., Sung, G.H., Kim, T.W., Park, H.J., et al. (2010) P38-Targeted Inhibition of Interleukin-12 Expression by Ethanol Extract from Cordyceps bassiana in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 33, 90-96. <u>https://doi.org/10.3109/08923973.2010.482137</u>
- [15] Cicenas, J., Zalyte, E., Rimkus, A., Dapkus, D., Noreika, R. and Urbonavicius, S. (2017) JNK, P38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer. *Cancers*, 10, Article 1. <u>https://doi.org/10.3390/cancers10010001</u>
- [16] Johnson, G.L. and Lapadat, R. (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and P38 Protein Kinases. *Science*, 298, 1911-1912. <u>https://doi.org/10.1126/science.1072682</u>
- [17] Guo, H., Callaway, J.B. and Ting, J.P. (2015) Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nature Medicine*, 21, 677-687. <u>https://doi.org/10.1038/nm.3893</u>
- [18] Roche, O., Fernández-Aroca, D.M., Arconada-Luque, E., García-Flores, N., Mellor, L.F., Ruiz-Hidalgo, M.J., *et al.* (2020) P38β and Cancer: The Beginning of the Road. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, Article 7524. <u>https://doi.org/10.3390/ijms21207524</u>