

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.001

• 基础研究 •

MAPKs 对磷酸酶 MKP1-CD 催化的激活作用研究 *

刘文桐¹ 郭国光¹ 何倩倩¹ 徐 荣² 何青霞^{1Δ}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 苏州大学医学院 江苏 苏州 215123)

摘要 目的: 丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPKs) 是细胞内重要的信号传导通路, 双位点特异性磷酸酶 (Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatases, MKPs) 去磷酸化 MAPKs, 负调控 MAPKs 的信号传递。在 MKPs 去磷酸化 MAPKs 的过程中, MAPKs 同时会激活部分 MKPs 的催化能力, MKP1 便是其中之一。本文旨在比较三种经典 MAPKs 底物, ERK2、JNK1 和 p38 α 对 MKP1 磷酸酶催化能力的激活效果, 进一步理解 MAPKs 与 MKP1 的底物特异性机制。**方法:** 以 pNPP 为底物, 检测在不同浓度的非磷酸化 ERK2、JNK1 和 p38 α 存在下, MKP1-CD 催化结构域片段蛋白质去磷反应速度的变化, 对比所得的动力学参数以确定 MAPKs 对 MKP1 激活程度的差异。**结果:** ERK2 和 JNK1 能够激活 MKP1 的催化活力, 将催化速率提升 1.5~2 倍, 而 ERK2 与 MKP1 的结合力比 JNK1 弱约 6 倍; p38 α 则没有观察到对 MKP1 去磷酸化能力的激活效果。**结论:** 三种经典 MAPKs 中, ERK2 和 JNK1 能够激活 MKP1 催化活力, 而 p38 α 则无法激活 MKP1, 进一步揭示了 MAPKs 和 MKPs 间的特异性相互作用, 以及底物对 MKPs 活力的影响。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶; 双位点特异性磷酸酶; 催化结构域; 激活

中图分类号: Q-33; Q55; Q78; Q814; R918 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2019)18-3401-04

Effects of MAPKs Activation on MKP1-CD Catalysis *

LIU Wen-tong¹, GUO Guo-guang¹, HE Qian-qian¹, XU Rong², HE Qing-xia^{1Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123, China)

ABSTRACT Objective: MAPKs (Mitogen-activated Protein Kinases) are pivotal pathways of cellular signal transduction, they are dephosphorylated by MKPs (Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatases), the latter negatively regulate MAPKs signal delivery. During reactions of MKPs dephosphorylating MAPKs, MAPKs activate some MKPs catalytic abilities in turn. MKP1 is one of MKPs that can be activated by MAPKs. In this study, three typical MAPKs, ERK2, JNK1 and p38 α , are compared with their activation on MKP1 catalysis to facilitate understanding the substrate selective mechanisms between MAPKs and MKPs. **Method (s):** Use small molecular pNPP as substrate, adjust concentrations of present unphosphorylated ERK2, JNK1 and p38 α to determine different reactive velocities of MKP1 catalytic-domain fragments if catalytic velocities change. Compare and analyze enzymatic kinetic parameters to identify MAPKs activations on MKP1-CD catalytic activities. **Result (s):** ERK2 and JNK1 can activate the catalytic capacity of MKP1 and increase catalytic rates by 1.5 to 2 times, but binding affinity of ERK2 to MKP1 is 6 times weaker than that of JNK1. No activated effects observed by p38 α to MKP1 dephosphorylated activities. **Conclusion (s):** Among three typical MAPKs, MKP1 can be activated by ERK2 and JNK1, but not p38 α , which further reveals specific interactions between MAPKs and MKPs as well as substrate impacts on MKPs catalytic activities.

Key words: MAPKs; MKPs; Catalytic; Activation

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q55; Q78; Q814; R918 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-3401-04

前言

MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) 是哺乳动物体内重要的信号传导通路, 它接受外界的环境刺激和信号, 并传递至细胞内靶标处, 调控细胞增殖、存活和死亡^[1,2]。MAPK 是进化上保守的丝/苏氨酸蛋白激酶, 上游激酶经过逐层联级式

磷酸化激活后, MAPKs 活化环上保守的苏氨酸和酪氨酸能被上游激酶双磷酸化而达到最大激酶活力, 调节下游驱动转录因子、激酶反应等^[3]。经典的 MAPKs 信号传导模块为细胞外信号调控激酶 (Extracellular signal regulated kinases 1/2, ERK1/2)、c-Jun N-端激酶 (c-Jun amino N-terminal kinases 1/2/3, JNK1/2/3), p38 激酶和 ERK5^[4]。同时, MAPK 磷酸酶 MKPs

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31770841)

作者简介: 刘文桐(1993-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 生物学, E-mail: liuwt16@mails.tsinghua.edu.cn

Δ 通讯作者: 何青霞(1992-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 生物学, E-mail: heqingx14@163.com

(收稿日期: 2019-05-15 接受日期 2019-06-09)

(MAPK Phosphatases) 能够去磷酸化 MAPKs 并使其失活,负向调控并阻碍 MAPKs 信号传递^[5]。MKPs 已确认的功能结构域包含位于 N 端的激酶结合结构域 (Kinase binding domain, KBD) 和位于 C 端的催化结构域 (Catalytic domain, CD),而在 CD 上也同时存在一段保守 FXF (Phe-X-Phe) 基序可识别 MAPKs^[6]。MKP1 是最早被发现的苏氨酸-酪氨酸双特异性磷酸酶家族成员,它下调 MAPKs 信号传导,与细胞终点的活动和肿瘤预后相关^[7]。不同 MKPs 能够去磷酸化的 MAPKs 底物特异性不尽相同,而不同底物对于同一 MKPs 的反应效率也有所差别。本研究通过 MAPKs 对 MKP1 催化结构域 CD 催化活力的影响而探究 MAPKs 对 MKP1 磷酸酶的底物特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

用于蛋白质表达的大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 购于天根生化科技(北京)有限公司,载体 pPMH 由实验室自 pETDuet-1 载体改造而成,于目的蛋白 N 端带有 MBP 标签和组氨酸标签;培养基中的成分胰蛋白胨 (Tryptone) 及酵母提取物 (Yeast Extract) 购于 OXOID 公司;蛋白质提纯时所用溶液原料如 Tris、氯化钠、咪唑、PMSF、Thrombin 等购于 Sigma 公司;酶活体系所用材料 MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid)、小分子底物 *p*NPP (*para*-Nitrophenolphosphate) 均购于 Sigma 公司;蛋白纯化所使用的镍离子亲和柱购于 QIAGEN 公司,离子交换柱、分子筛的柱材和 FPLC 仪器购于 GE Healthcare 公司;PCR 扩增仪购于 BIO-RAD 公司;分光光度仪购自于 Perkin Elmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 分子克隆 选择 MKP1 催化结构域 CD 的片段,目的蛋白质序列为 166-314, MKP1 功能结构域示意图如图 1。经 PCR 扩增后,使用限制性内切酶 *Nde*I 和 *Xho*I 处理,随后连接至双酶切后带有 MBP 标签和组氨酸标签的 pPMH 载体上,形成重组质粒,经 DNA 测序确定蛋白质序列正确。ERK2、JNK1 和 p38 α 的蛋白质克隆和表达纯化参见文献^[6,8,9]。

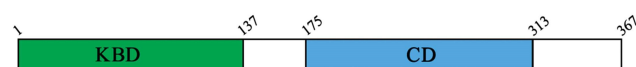


图 1 MKP1 磷酸酶区域组成示意图

Fig.1 Scheme of MKP1 domain organizations

1.2.2 蛋白质表达 将序列正确的重组质粒转化入 BL21 (DE3) 感受态细胞,于固体培养基上 37℃ 培养约 12 小时,选择单克隆菌落加入 100 mL 带有 0.1% 氨苄霉素的液体培养基中,于 37℃、200 rpm 的摇床中培养,直至菌液开始浑浊,测得 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右。将菌液接种至规模放大 100 倍的液体培养基中培养,待 OD₆₀₀ 值再次达到 0.4~0.6 时,摇床温度降至 18℃,加入 200 μ M IPTG 诱导大肠杆菌表达目的蛋白约 14 小时,4000 rpm 离心菌液,收集沉降的菌体。

1.2.3 蛋白质纯化 所有蛋白质纯化步骤均于 4℃ 环境或冰浴操作,用裂解液 (50 mM Tris pH 8.0、200 mM NaCl) 将离心收集的菌体悬浮并稀释,加入 1 mM 蛋白酶抑制剂 PMSF、0.01 mg/mL DNA 酶、1 mg/mL 溶菌酶和 20 mM MgCl₂,充分反

应。使用超声法破碎大肠杆菌细胞,裂解后的菌液于 4℃、13000 rpm 高速离心 50 分钟,收集上清。上清液中的目的蛋白经过镍离子亲和柱后,使用 50 mM Tris pH 8.0、250 mM 咪唑缓冲液洗脱。再经离子交换柱纯化后,利用由无盐缓冲液 (50 mM Tris pH 8.0、2 mM DTT) 和高盐缓冲液 (50 mM Tris pH 8.0、1 M NaCl、2 mM DTT) 混合产生的盐浓度梯度而洗脱。最后,使用分子筛凝胶过滤柱得到高纯度和高浓度的目的蛋白质溶液,液氮速冻后储存于 -80℃ 冰箱。

1.2.4 蛋白磷酸酶活力测定 酶活力测定的反应体系为 25℃、1.8 mL,缓冲液成分为 50 mM MOPS pH7.0、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂ 和 0.1 mM EDTA。使用带有磁力搅拌装置的 Lambda45 分光光度计实时监测透光比色皿中吸光值的变化。磷酸酶能直接催化小分子底物 *p*NPP,反应释放的产物 *p*-硝基酚 (*p*-Nitrophenol) 在 410 nm 处有光吸收变化,其摩尔消光系数为 18,000 cm²mol⁻¹^[10]。反应速度由特定范围内时间曲线的切线斜率表示。测定 MKP1-CD 对 *p*NPP 活力时,使用米氏方程(公式 1.1)拟合得结合常数 K_m 值和转换数 k_{cat} , [E] 和 [S] 代表酶浓度和底物浓度。MAPKs 激活 MKPs 的活力量化则选用公式 1.2,由初速度 v_0 和 MAPKs 浓度拟合而得激活后的最大速率 v_{max} 和结合常数 K_d ,比较速率放大的比例,并比较反应速率被激活的倍数。

$$v = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_m + [S]} \quad (\text{公式 1.1})$$

$$v = \frac{v_0 + (v_{max} - v_0)[S]}{(K_d + [S])} \quad (\text{公式 1.2})$$

1.3 统计学分析

使用 SigmaPlot 软件进行动力学数据分析和作图,试验结果以平均数 $\pm$ 标准差表示,误差线标注于图上。

2 结果

2.1 MKP1-CD 具有催化 *p*NPP 的活力

经过提纯得到在大肠杆菌中过表达的 MKP1-CD 蛋白质片段,在 25℃、1.8 mL 的酶活反应体系中,对 MKP1-CD 催化 *p*NPP 的酶活力进行检测。体系内含有 0.3 μ M MKP1-CD,由加入不同浓度的 *p*NPP 起始反应,初速度由截取反应初始阶段所得的斜率代表。结果如图 2 所示,随着底物浓度增大至饱和程度,催化反应的初速度逐渐达到最大值。利用米氏方程对反应初速度和底物浓度进行拟合,得到结合常数 K_m 为 11.78 mM,转换数 k_{cat} 为 0.06 s⁻¹。

2.2 ERK2 对 MKP1-CD 的催化能力有激活作用

作为 MKPs 的底物,ERK2 具有将非活性的 MKP3 激活至活性构象的能力^[11]。为了探究 ERK 底物是否激活具有催化活力的 MKP1,与非磷酸化 ERK2 结合的 MKP1-CD 被用于进行 *p*NPP 催化反应的检测。反应中磷酸酶 MKP1-CD 的浓度是 0.3 μ M, *p*NPP 浓度为 20 mM。如图 3 所示,在不断增加 ERK2 的反应浓度下, MKP1-CD 去磷酸化速率逐渐加大,最终趋近于被激活后的最大速率。经公式拟合后,反应的最大速度提升为原本初速度的 1.5 倍, ERK2 对于活性的 MKP1-CD 的催化效率有 50% 的提高,与 MKP1-CD 的解离常数 K_d 为 22.97 μ M。

2.3 JNK1 能够激活 MKP1-CD 的催化活力

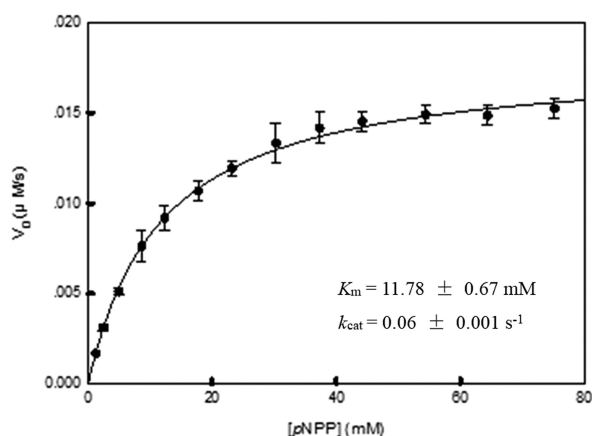


图2 MKP1-CD 动力学反应

Fig.2 Kinetics reactions of MKP1-CD

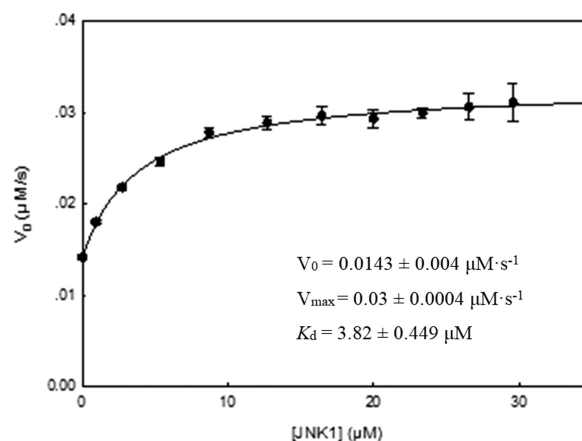


图4 JNK1 激活 MKP1-CD 催化反应

Fig.4 Catalytic activation of MKP1-CD by JNK1

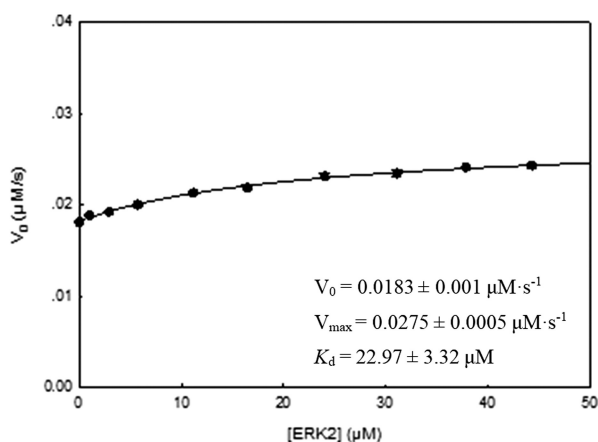


图3 ERK2 激活 MKP1-CD 催化反应

Fig.3 Catalytic activation of MKP1-CD by ERK2

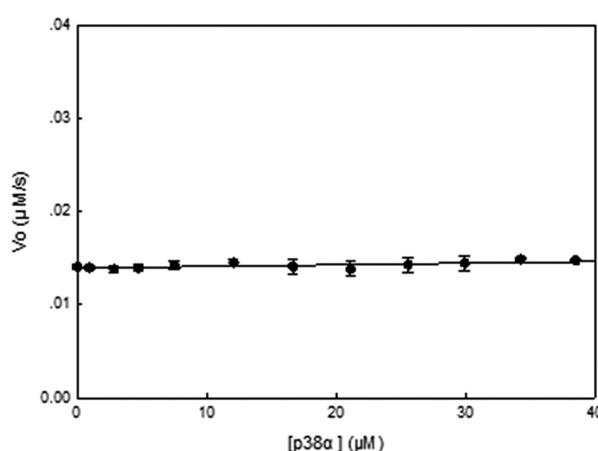


图5 p38α 对 MKP1-CD 催化反应没有激活

Fig.5 No catalytic activation of MKP1-CD by p38α

三个经典的 MAPKs 均为 MKP1 的底物, JNK1 通过 CD 结构域与 MAPKs 识别并催化^[6]。因此, JNK1 对于 MKP1-CD 的结合力是三者中最强的。在 0.3 μM MKP1-CD 去磷酸化 pNPP 的反应中, 非磷酸化的 JNK1 也存在对反应速率增强的现象, pNPP 浓度为 20 mM。结果显示于图 4, MKP1-CD 的反应速度由最初的 0.0143 μM·s⁻¹ 增加至 0.03 μM·s⁻¹, 激活至原本的 2 倍。JNK1 与 MKP1-CD 的 K_d 值为 3.82 μM, 对比图 3 所得 ERK2 与 MKP1-CD 的 K_d 值 (22.97 μM), JNK1 对 MKP1-CD 的亲合力约为 ERK2 的 6 倍。

2.4 p38α 对 MKP1-CD 的催化活力没有激活效果

在相同的动力学反应体系中, 无论加入的 p38α 剂量多少, MKP1-CD 去磷酸化 pNPP 始终不改变, 维持恒定的速率。反应中 MKP1-CD 浓度保持 0.3 μM, pNPP 浓度为 20 mM。如图 5 所示, 反应体系内非磷酸化 p38α 的浓度从一开始的 0 μM, 逐步增加至近 40 μM, pNPP 产物生成的速度值始终稳定在 0.0143 μM·s⁻¹ 的水平, 因而 p38α 对 MKP1-CD 的催化能力没有激活作用。

3 讨论

MAPKs 控制真核生物细胞内有丝分裂的信号传导, 通路中的激酶在响应细胞外界的信号和刺激后, 通过协同的方式调

节生理功能和病理反应^[12,13]。这些激酶关系着体内基因表达、蛋白质翻译、蛋白质活性等, 影响着细胞增殖、分化和凋亡^[14]。因此, MAPKs 与广泛的生理反应相关, 例如胚胎形成、先天性和适应性免疫应答、体内代谢平衡、心脏和神经元的发育等。同时, 研究表明 MAPKs 信号的异常是糖尿病、类风湿性关节炎、神经退行性疾病和癌症产生的重要因素之一^[15-19]。MAPKs 通路构架为三层激酶级联式反应, 最上层的 MAPKKK (MAPK kinase kinase) 接受外界刺激激活后磷酸化下游的 MAPKK (MAPK kinase), 而后 MAPKs 受激活的 MAPKK 磷酸化而激活。哺乳动物中经典的 MAPKs 信号通路模块为细胞外信号调控激酶 (Extracellular signal regulated kinases 1/2, ERK1/2)、c-Jun N-端激酶 (c-Jun N-terminal kinases 1/2/3, JNK1/2/3)、p38 激酶 (p38α、p38β、p38γ、p38δ) 和 ERK5, 它们活化环上存在保守的苏氨酸-X-酪氨酸 (Thr-X-Tyr) 基序, 上游 MAPKK 磷酸化这两个氨基酸后, 激酶达到最大活力, 介导和启动目标转录因子的运作^[20]。同时, 双位点特异性磷酸酶 MKPs 识别并去磷酸化 MAPKs 上的苏氨酸和酪氨酸, 是 MAPKs 信号通路的特异性负调控因子, 对于信号通路的正确传递具有重要调节作用。

哺乳动物中, 10 种经典的双特异性磷酸酶 MKPs 可分为三小组, 蛋白质结构均包含负责识别 MAPKs 的激酶结合域

KBD 和催化结构域 CD。不同小组对于 MAPKs 的识别具有选择性。第一组为在细胞核内出现的 MKP1、MKP2、PAC1 和 hVH3, 去磷酸化 ERK、JNK 和 p38; 第二组为定位在细胞质内的 MKP3、MKP4 和 MKP5, 只能识别和催化 ERK; 而最后一组是在细胞核和细胞质内均被发现的 MKP6、MKP7 和 hVH5, 去磷酸化 JNK 和 p38^[21]。研究发现, 当 ERK 结合非活性的 MKP3 后, MKP3 的活力能够提高约 30 倍^[22]。不同组的 MKPs 受 MAPKs 底物激活的效果不同, 第一组的 MKPs 能够被 MAPKs 激活, 第二组的 MKPs 被 ERK 激活的效果最为明显, 而第三组 MKPs 则无法被 MAPKs 激活^[23, 24]。然而, 对于具体的底物激活机制的研究尚不清楚。

本研究选择了能够与三种经典的 MAPKs 结合和催化的 MKP1-CD 作为研究对象, MKP1-CD 本身具有识别和去磷酸化 MAPKs 的活性(图 2), ERK2、JNK1 和 p38 α 作为激活剂, 通过酶动力学原理量化 MAPKs 对 MKP1-CD 催化活力的影响, 以探讨 MAPKs 对 MKPs 的激活效果差别和底物对磷酸酶的特异性。MKPs 的 CD 上存在保守的 FXF (Phe-X-Phe) 基序, 使单独的 CD 也能够识别 MAPKs, 而这也是 JNK1 结合 MKPs 的主要位置^[6]。试验结果表明, ERK2 和 JNK1 均能激活 MKP1-CD。ERK2 将 MKP1-CD 的催化活力提高至 1.5 倍, 然而它与 MKP1-CD 结合的 K_d 值为 22.97 μ M, 是 JNK1 与 MKP1-CD 的 K_d 值(3.82 M) 的 6 倍。ERK2 对 MKP1-CD 的结合能力较 JNK 弱 6 倍, 侧面说明 ERK2 结合的模式为与 MKP1-KBD 作用, CD 主要负责催化, 对 ERK2 的结合作用很弱。JNK1 与 MKPs 通过结合 CD 而相互作用, 因此其结合能力是三个 MAPKs 中最强的, 对于 CD 活力的激活也达到原有水平的 2 倍。同时, 试验证明 p38 α 对 CD 已有的催化活力没有促进作用, 无论反应中加入 p38 α 多寡, MKP1-CD 催化速度保持原本的水平。此前, 研究报道 ERK2、JNK1 和 p38 α 对全长的 MKP1 有激活作用, 激活的强度为 JNK > ERK $\geq$ p38 α ^[23]。本次试验所得 MAPKs 对 MKP1-CD 的激活效果顺序基本与全长的 MKP1 一致, 仅 p38 α 表现出对 MKP1-CD 不激活的特性。其只对全长 MKP1 激活的原因, 可能与除 MKP1-CD 外的 KBD 区域和蛋白质羧基末端的一段柔性区域有关, p38 α 促进对 MKP1 的结合力, 而蛋白质羧基末端区域参与底物的激活反应, 因而表现出磷酸酶活性增强的现象。MAPKs 对于磷酸酶的激活作用体现了它们对 MKPs 结合的差异性, 以及对于 MKPs 不同作用区域的选择性。后续可进行实验判定 MAPKs 在 KBD 以及羧基末端区域是否对 MKP1 的亲合度和催化力产生影响, 同时确定 MAPKs 作用于 MKP1-CD 上的详细激活位点, 进一步揭示不同 MAPKs 底物与 MKPs 功能区域间的相互作用, 为探究可能的促进或抑制的机制提供理论基础。

MKP1 是第一个被确认的 MAPKs 磷酸酶, 也是研究 MKPs 磷酸酶家族的原型^[25]。MKP1 在癌症方面的研究进展迅速, 它在体内的过表达关系着前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌和胰腺癌等的发展, 是重要的癌症预后标志物^[26-30]。本研究探讨 MKP1 的底物 MAPKs 对其催化活力的激活作用, 结论可以由点至面地推及底物对其他 MKPs 类似的激活模式, 对了解以及区分 MKPs 的特点具有指导意义。同时, MKPs 在底物结合的情况下

活力会被加强, 对抑制药物的研发提供辅助信息, 如何在研制特异性药物的同时避免 MKPs 的活性增加, 更需要后续研究以对激活机制能够透彻理解。

参考文献(References)

- [1] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades[J]. Nature, 2001, 410(6824): 37-40
- [2] Chen Z, Gibson TB, Robinson F, et al. MAP kinases [J]. Chem Rev, 2001, 101(8): 2449-2476
- [3] English JM, Pearson GW, Wilsbacher JL, et al. New insights into the control of MAP kinase pathways [J]. Exp Cell Res, 1999, 253 (1): 255-270
- [4] Sun Y, Liu W, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. J Recept Signal Transduct, 2015, 35(6): 600-604
- [5] Caunt C J, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) Shaping the outcome of MAP kinase signalling [J]. FEBS J, 2013, 280(2): 489-504
- [6] Liu X, Zhang CS, Lu C, et al. A conserved motif in JNK/p38-specific MAPK phosphatases as a determinant for JNK1 recognition and inactivation[J]. Nat. Commun, 2016, 7: 10879
- [7] Shen J, Zhang Y, Yu H, et al. Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy[J]. Cancer Med-US, 2016, 5(8): 2061-2068
- [8] Zhang Y, Wu J, Wang Z. A Distinct Interaction Mode Revealed by the Crystal Structure of the Kinase p38 α with the MAPK Binding Domain of the Phosphatase MKP5[J]. Sci Signal, 2011, 4(204): ra88
- [9] Xiao Y, Lee T, Latham MP, et al. Phosphorylation releases constraints to domain motion in ERK2[J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 2014, 111 (7): 2506-2511
- [10] Zhou B, Zhang Z Y. Mechanism of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 activation by ERK2 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(50): 35526-35534
- [11] Zhao Y, Zhang ZY. The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3[J]. J Biol Chem, 2001, 276(34): 32382-32391
- [12] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3100-3112
- [13] Kim E, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(4): 396-405
- [14] Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events[J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3240-3253
- [15] Nandipati KC, Subramanian S, Agrawal DK. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 426(1-2): 27-45
- [16] Lee JK, Kim NJ. Recent Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease [J]. Molecules, 2017, 22(8): 1287
- [17] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update [J]. Physiol Rev, 2012, 92(2): 689-737

- acid)s copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery[J]. Chemical Communications, 2008, (48): 6570-6572
- [8] Li Y, Xiao K, Luo J, Xiao W, et al. Well-defined, reversible disulfide cross-linked micelles for on-demand paclitaxel delivery [J]. Biomaterials, 2011, 32(27): 6633-6645
- [9] Wu J, Zhao L, Xu X, et al. Hydrophobic cysteine poly (disulfide) based redox hypersensitive nanoparticle platform for cancer theranostics[J]. Angewandte Chemie, 2015, 54(32): 9218-9223
- [10] Chiang YT, Yen YW, Lo CL. Reactive oxygen species and glutathione dual redox-responsive micelles for selective cytotoxicity of cancer[J]. Biomaterials, 2015, 61: 50-161
- [11] Kamaly N, Yameen B, Wu J. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release [J]. Chemical Reviews, 2016, 116(4): 2602-2663
- [12] 许利娜, 马培培, 陈强, 等. 甲基丙烯酸乙基磺基甜菜碱类聚合物的生物应用[J]. 化学进展, 2013, 26(0203): 366-374
- [13] Men Y, Peng S, Yang P, et al. Biodegradable Zwitterionic Nanogels with Long Circulation for Antitumor Drug Delivery[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(28): 23509-23521
- [14] Cheng G, Mi L, Cao Z, et al. Functionalizable and ultrastable zwitterionic nanogels [J]. Langmuir the ACS Journal of Surfaces & Colloids, 2010, 26(10): 6883-6886
- [15] Zhang L, Xue H, Cao Z, et al. Multifunctional and degradable zwitterionic nanogels for targeted delivery, enhanced MR imaging, reduction-sensitive drug release, and renal clearance[J]. Biomaterials, 2011, 32(20): 4604-4608
- [16] Fan M, Wang F, Wang CC, et al. Reflux Precipitation Polymerization: A New Platform for the Preparation of Uniform Polymeric Nanogels for Biomedical Applications [J]. Macromolecular Bioscience, 2018, 18(8): 1800077
- [17] Jo DH, Kim JH, Lee TG, et al. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases [J]. Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine, 2015, 11(7): 1603-1611
- [18] Raemdonck K, Demeester J, Smedt SD. Advanced nanogel engineering for drug delivery[J]. Soft Matter, 2009, 5(4): 707-715
- [19] Schöttler S, Landfester K, Mailänder V. Controlling the stealth effect of nanocarriers through understanding the protein corona [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(31): 8806-8815
- [20] Mahmoudi M, Bertrand N, Zope H, et al. Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces [J]. Nano Today, 2016, 11(6): 817-832
- [21] Obst K, Yealland G, Balzus B, et al. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity, and drug release properties [J]. Biomacromolecules, 2017, 18(6): 1762-1771
- [22] Zhang HJ, Wu TM, Yu WQ, et al. Gao, interfaces, Ligand size and conformation affect the behavior of nanoparticles coated with in vitro and in vivo protein corona [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(10): 9094-9103
- [23] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts[J]. PNAS, 2008, 105(38): 14265-14270

(上接第 3404 页)

- [18] Low HB, Zhang Y. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer[J]. Immune Netw, 2016, 16(2): 85-98
- [19] Malemud CJ. Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis[J]. J Clin Cell Immunol, 2013, 4(4): 160
- [20] Morrison DK. MAP Kinase Pathways[J]. Cold Spring Harb. Perspect Biol, 2012, 4(11): a011254
- [21] Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(2): 253-261
- [22] Camps M, Nichols A, Gillieron C, et al. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase [J]. Science, 1998, 280(5367): 1262-1265
- [23] Slack DN, Seternes O, Gabrielsen M, et al. Distinct Binding Determinants for ERK2/p38 α and JNK MAP Kinases Mediate Catalytic Activation and Substrate Selectivity of MAP Kinase Phosphatase-1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(19): 16491-16500
- [24] Chen P, Hutter D, Yang X, et al. Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29440-29449
- [25] Guan KL, Broyles SS, Dixon JE. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus[J]. Nature, 1991, 350(6316): 359-362
- [26] Magigalluzzi C, Mishra R, Fiorentino M, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis[J]. Lab Invest, 1997, 76(1): 37-51
- [27] Denkert C, Schmitt WD, Berger S, et al. Expression of mitogen activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma[J]. Int J Cancer, 2002, 102(5): 507-513
- [28] Wang H, Cheng Z, Malbon CC. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer[J]. Cancer Lett, 2003, 191(2): 229-237
- [29] Liao Q, Guo J, Kleeff J, et al. Down-Regulation of the Dual-Specificity Phosphatase MKP-1 Suppresses Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cells[J]. Gastroenterology, 2003, 124(7): 1830-1845
- [30] Candas D, Lu C, Fan M, et al. Mitochondrial MKP1 Is a Target for Therapy-Resistant HER2-Positive Breast Cancer Cells[J]. Cancer Res, 2014, 74(24): 7498-7509