

木鳖子对羟基桂皮醛对小鼠黑素移植瘤生长的抑制作用及机制研究

于向艳¹, 崔雯萱², 孙士萍^{2,3}, 赵连梅², 张超², 单保恩^{2*}

1. 河北医科大学中医院 呼吸内科, 河北 石家庄 050016

2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011

3. 承德医学院附属医院 输血科, 河北 承德 067000

摘要: 目的 探讨木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛 (*p*-hydroxycinnamaldehyde, PHD) 对黑素瘤 B16 细胞体内生长的抑制作用。方法 应用 MTS 法检测 PHD 对 B16 细胞增殖的影响, 倒置相差显微镜下观察形态变化。构建黑素瘤 B16 细胞小鼠皮下移植瘤模型, 分为 2 组: 治疗组小鼠 ip 2 mg/kg PHD, 模型组注射相同体积的生理盐水。观察 2 组小鼠成瘤情况, 并测量肿瘤体积和质量; 免疫组织化学法检测肿瘤组织中酪氨酸酶 (Tyr)、S-100B、MMP-9、p-P38 和 p-ERK 蛋白的表达变化; 苏木精-伊红染色法 (HE) 分析小鼠肝和肺组织的形态学变化。结果 PHD 对黑素瘤 B16 细胞具有明显的生长抑制作用 ($P < 0.01$)。20 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 48 h 后, 细胞数量减少, 呈典型分化形态。PHD 治疗组的肿瘤体积和质量均明显低于模型组 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 治疗组小鼠肿瘤组织中 Tyr 和 p-P38 蛋白的表达水平升高, MMP-9、S-100B 和 p-ERK 蛋白表达水平则明显降低。治疗组小鼠肝和肺无明显组织形态学改变, 模型组小鼠肺部有肿瘤转移。结论 PHD 对小鼠体内黑素移植瘤的生长具有显著抑制作用。

关键词: 木鳖子; 对羟基桂皮醛; 黑素瘤 B16 细胞; 细胞增殖; 黑素移植瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)10-1740-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.10.018

Inhibitory effect of *p*-hydroxycinnamaldehyde from *Momordicae Semen* on growth of mouse melanoma xenograft *in vivo* and study on its mechanism

YU Xiang-yan¹, CUI Wen-xuan², SUN Shi-ping^{2,3}, ZHAO Lian-mei², ZHANG Chao², SHAN Bao-en²

1. Pneumology Department, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050016, China

2. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

3. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of *p*-hydroxycinnamaldehyde (PHD) from *Momordicae Semen* seeds on growth of mouse melanoma B16 cells *in vivo*. **Methods** The inhibitory effect of PHD on growth of mouse melanoma B16 cells was measured by MTS method. Morphological changes of B16 cells were observed by phase contrast microscope. The xenograft tumor models of B16 cells in mice were established and divided into two groups: The mice in treatment group were treated with PHD (2 mg/kg) and in control group (treated with equal volume of normal saline). The growth of xenograft tumors in mice was observed and their sizes and weights were measured. The expression of Tyr, MMP-9, S-100B, p-P38, and p-ERK in tumor tissues was detected by immunohistochemical method. Morphological changes of lung and liver tissues in mice were observed by HE staining. **Results** PHD had obvious inhibitory effect on the growth of B16 cells *in vitro* ($P < 0.01$). The morphological changes of B16 cells were typically differentiated after treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ PHD for 48 h. The average volume and weight of tumor tissues in mice of PHD treatment group were significantly decreased as compared with those of the control group ($P < 0.01$). Compared to the control group, the expression levels of Tyr and p-P38 in PHD treatment group were increased ($P < 0.05$), while the expression levels of MMP-9, S-100B, and p-ERK were decreased ($P < 0.05$). No obvious morphological changes were found in liver and lung tissues of mice in PHD treatment group and the control group. However, lung tumor metastasis was found in control group mice. **Conclusion** PHD has inhibitory effect on the growth of xenograft tumor of mouse melanoma cells in mice.

Key words: *Momordicae Semen*; *p*-hydroxycinnamaldehyde; melanoma B16 cells; proliferation; xenograft model

收稿日期: 2015-11-02

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (H2015206376); 河北省医学科学研究重点课题计划项目 (20120120)

作者简介: 于向艳 (1981—), 女, 硕士, 研究方向为中药新药研发。Tel: (0311)86095290 E-mail: 1308100042@qq.com

*通信作者 单保恩 Tel: (0311)86095283 E-mail: shanbaoen@163.com

恶性黑素瘤是死亡率最高的皮肤恶性肿瘤^[1], 恶性程度高且广泛耐药, 转移早, 进展快, 平均生存期为 8~9 个月, 3 年生存率不到 15%^[2], 急需寻找一种新的有效治疗恶性黑素瘤的方法^[3]。诱导恶性肿瘤细胞向正常或接近正常的细胞方向分化逆转, 作为恶性肿瘤的一种新型治疗方法, 为抗肿瘤研究开辟了一条崭新的途径。我国丰富的中药资源是开发肿瘤分化诱导剂的优势之一, 很多动、植物中提取的生物活性成分都被证实具有分化诱导作用, 研究显示, 人参总皂苷可以诱导人肝癌细胞分化^[4]; 葛根有效成分 S86019 可使 HL-60 细胞沿粒细胞系统定向分化^[5]。

木鳖子 *Momordicae Semen* 为葫芦科植物木鳖 *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. 的成熟种子, 始载于宋代《开宝本草》, 具有消肿散结、祛毒之功效, 用于治疗痈肿、疔疮和无名肿毒等。本课题组前期研究发现, 木鳖子醇提物具有抑制黑素瘤 B16 细胞增殖和诱导其分化的作用, 且以对羟基桂皮醛 (*p*-hydroxycinnamaldehyde, PHD) 成分的抑瘤效果最为明显^[6-8]。研究还发现, PHD 能降低 p-ERK 蛋白的表达水平, 提高 p-P38 蛋白的表达水平, 激活黑色素合成相关基因, 从而发挥诱导细胞分化的作用^[9-10]。本研究旨在探讨木鳖子单体化合物 PHD 体内对黑素瘤细胞增殖的影响及其可能的作用机制, 为开发肿瘤分化诱导剂提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

木鳖子购自北京同仁堂药店, 经河北医科大学药学院生药教研室杜肖娜副教授鉴定为葫芦科植物木鳖 *Momordica Cochinchinensis* (Lour) Spreng 的成熟种子; PHD 由华北制药集团新药研究开发有限责任公司从木鳖子中提取并鉴定, 质量分数≥96%。RPMI 1640 培养液和 0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 青霉素、链霉素购自上海博光生物科技有限公司; MTS 购自美国 Sigma 公司; 免疫组织化学 SP 法检测试剂盒 (包含生物素标记的山羊抗兔二抗及辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素三抗) 和二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗人酪氨酸酶 (Tyr)、MMP-9 和 S-100B 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗人 p-P38 和 p-ERK 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 主要仪器

台式离心机, 德国 Heraeus 公司; LH50A 型倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司; 无菌滤器, 日本 Millipore 公司; JA5003 电子分析天平, 上海精科天平厂; 全自动高压蒸汽消毒器, 日本三洋公司; SCR20B 型低温高速离心机, 日本日立公司; HT2 型酶标仪, 奥地利 Anthos 公司。

1.3 细胞

小鼠黑素瘤 B16 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.4 实验动物

C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 共 12 只, 均为雄性, 5~6 周龄, 体质量为 (22.1±0.3) g。所有小鼠均在河北医科大学第四医院动物实验中心无特定病原体级屏障系统 (SPF) 条件下饲养, 动物使用许可证号 SYXK (冀) 2013-0051。本研究设计已经河北医科大学动物管理使用委员会和伦理委员会批准。

2 方法

2.1 PHD 对细胞增殖的影响

小鼠黑素瘤 B16 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。每 1~2 d 换液 1 次, 细胞生长至融合度为 70%~80%时, 用 0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代。取对数生长期黑素瘤 B16 细胞, 制成 1×10⁵/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 90 μL, 待细胞贴壁后, 各孔加 0、100、200、400 μmol/L PHD 10 μL, 使其终浓度为 0、10、20、40 μmol/L。37 °C、5% CO₂ 条件下作用 24、48、72 h, 每组设 3 个复孔。分别于药物作用 B16 细胞 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μL MTS, 继续培养 2.5 h 后, 用酶标仪于 490 nm 波长检测各孔吸光度 (A) 值。计算细胞增殖率。

细胞增殖率=实验组 A 值/对照组 A 值

2.2 PHD 对 B16 细胞形态的影响

取对数生长期的 B16 细胞, 调整细胞浓度为 5×10⁴/mL, 接种于 6 孔培养板中, 每孔 2 mL, 待细胞贴壁后, 分别用终体积分数 0.01%的二甲基亚砜 (DMSO) 和 20 μmol/L PHD 作用 B16 细胞 48 h, 倒置相差显微镜下观察 B16 细胞形态的变化, 并计数 2 组的细胞数量。

2.3 PHD 对黑素瘤 B16 移植性肿瘤小鼠的影响

2.3.1 模型制备、分组及给药 于 C57BL/6 小鼠

右侧腋窝处 sc 0.1 mL 黑素瘤 B16 细胞(含 1×10^6 个细胞), 当肿瘤体积增长至约 50 mm^3 时, 将小鼠随机分为 2 组, 每组 6 只。PHD 组每只小鼠 ip 2 mg/kg PHD (预试验显示 2 mg/kg 有效), 模型组小鼠 sc 相同体积的 0.9% 氯化钠溶液, 每 2 天给药 1 次, 共 12 次 22 d; 从注射药物的第 5 天开始, 每 3 天测量 1 次肿瘤长短径, 按公式计算肿瘤体积: 肿瘤体积 = $1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。末次注射药物后第 4 天, 即药物治疗第 25 天时以颈椎脱臼法处死小鼠, 切取移植瘤组织标本, 称取瘤体质量, 并拍照。

2.3.2 免疫组织化学法检测 Tyr、MMP-9、S-100B、p-P38 和 p-ERK 蛋白表达 裸鼠移植瘤标本用适量中性甲醛溶液固定 24 h, 然后经固定、脱水和浸蜡后, 行包埋及切片, 置于 65°C 烤箱中 30 min, 以常规脱蜡, 最终制成 $5 \mu\text{m}$ 厚的病理切片, 然后按 SP 免疫组织化学试剂盒说明书所述方法检测 Tyr、MMP-9、S-100B、p-P38 和 p-ERK 蛋白的表达情况。生物素标记的山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素三抗均为试剂盒中的原液。DAB 试剂显色后, 用苏木精对比染色, 中性树胶封片。在光学显微镜下观察阳性细胞为相比核/细胞质着色, 呈棕黄色颗粒状分布。选取 5 个高倍视野, 每个视野计数 500 个细胞, 以阳性细胞所占百分率进行评分: $\leq 10\%$ 为 0 分, $> 10\%$ 且 $\leq 50\%$ 为 1 分, $> 50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为 2 分, $> 75\%$ 为 3 分; 再按染色强度进行评分: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。上述 2 项评分相加: 0 分为“-”, 1~2 分为“+”, 3~4 分为“++”, 5~6 分为“+++”。将“-”和“+”定义为阴性表达, “++”和“+++”定义为阳性表达。

2.3.3 苏木精-伊红 (HE) 染色法检测肝和肺组织的细胞形态变化 取 2 组用药治疗后小鼠肿瘤、肝和肺组织, 按“2.3.2”项方法制成石蜡切片。然后行常规脱蜡水化, 苏木精染色 5 min, 0.5~1% 盐酸 (70% 乙醇配制) 分化 30 s, 酸化伊红对比染色细胞核 1 min。最后常规脱水、透明和中性树胶封固, 置于光学显微镜下观察细胞形态的变化。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计学软件对实验结果进行统计学分析。以上实验均独立重复 3 次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组间比较采用两独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用

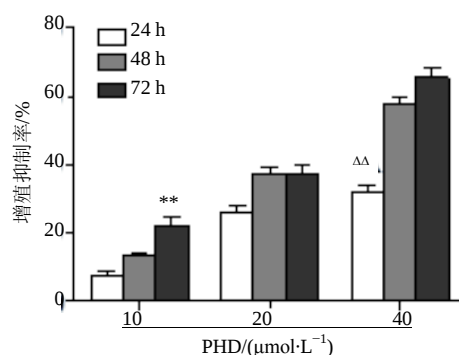
SNK- q 检验。

3 结果

3.1 PHD 对 B16 细胞增殖和形态的影响

10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 24、48 和 72 h 后, 对 B16 细胞增殖具有明显的抑制作用。其中 10 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 72 h 的抑制率显著高于 24 h 和 48 h 的抑制率 ($P < 0.01$), 而 40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 24 h 的抑制率显著高于 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.05$ 、0.01), 结果见图 1。以上结果表明, PHD 在体外可抑制小鼠黑素瘤 B16 细胞的增殖, 且具有时间和浓度依赖性。

与 0.01% DMSO 处理组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 48 h 后细胞数量 [$(1.30 \pm 0.22) \times 10^5$], 显著低于对照组 [$(4.50 \pm 0.36) \times 10^5$] ($P < 0.01$); 且细胞体积增大为梭形, 排列有序, 成纤维状生长, 多数细胞出现树突状结构, 为典型的细胞分化形态 (图 2), 证明 PHD 可能诱导黑素瘤 B16 细胞的分化, 与前期研究结果一致^[8]。



与 10 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用 24 h 和 48 h 比较: ** $P < 0.01$; 与 10、20 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用 24 h 比较: ΔΔ $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ PHD treated for 24 h and 48 h; ΔΔ $P < 0.01$ vs 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ PHD treated for 24 h

图 1 PHD 对黑素瘤 B16 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig.1 Inhibition of PHD on proliferation of melanoma B16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

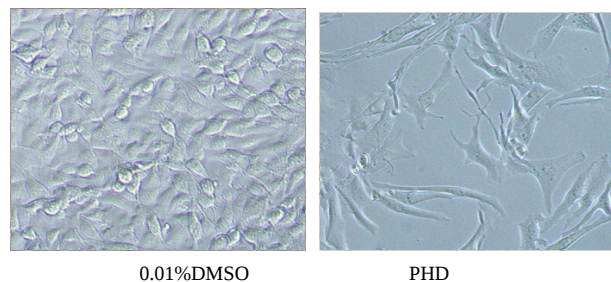


图 2 PHD 对小鼠黑素瘤 B16 细胞形态的影响

Fig. 2 Effects of PHD on morphologic change of melanoma B16 cells

3.2 PHD 对小鼠体内移植瘤形成的抑制作用

与模型组比较, PHD 能够明显抑制肿瘤细胞在小鼠体内的生长。模型组小鼠的肿瘤体积增长速度较快, 而 2 mg/kg PHD 治疗组小鼠肿瘤体积增长缓慢, 在治疗后第 11 天后增长速度开始慢于模型组。治疗结束后, PHD 治疗组小鼠的肿瘤体积和质量均明显低于模型组 ($P < 0.001$), 见图 3。以上结果表明, PHD 能够明显抑制 B16 细胞在小鼠体内的生长。

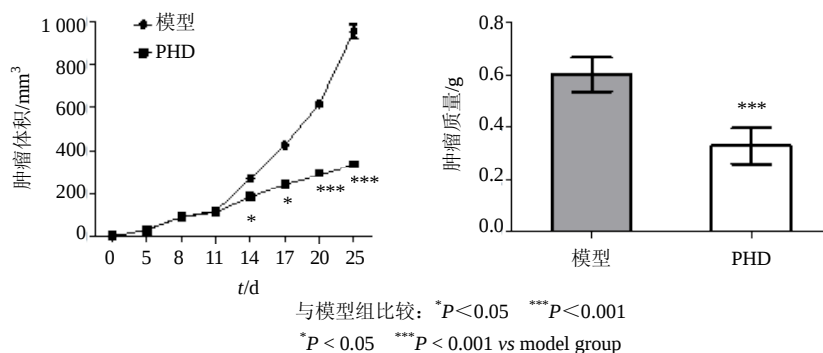


图 3 PHD 对小鼠体内黑素移植瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of PHD on growth of xenograft tumors in mouse implanted with melanoma B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

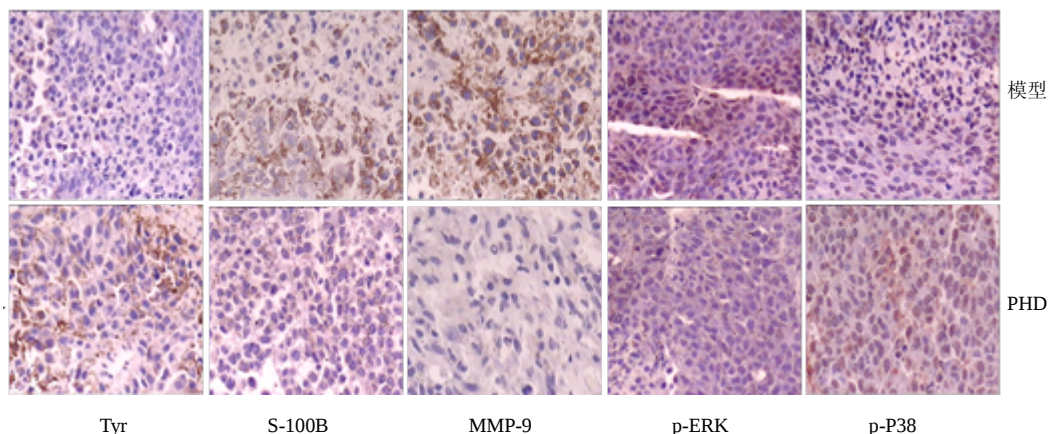


图 4 免疫组织化学法检测 PHD 治疗后小鼠体内移植瘤细胞相关蛋白的表达

Fig. 4 Expression of protein in xenograft tumors treated with PHD detected by immunohistochemistry

3.4 PHD 对移植瘤小鼠肝和肺组织形态的影响

HE 染色结果 (图 5) 显示, PHD 治疗组小鼠肝组织内可见肝细胞大小均一, 排列紧密整齐, 无明显的极性变化; 模型组肺组织中有明显的肿瘤结节, 而 PHD 治疗组小鼠的肝和肺中均未见明显的组织病理学变化, 表明 PHD 可能对小鼠没有潜在的肝毒性, 并可抑制黑色素瘤向肺组织的转移。

4 讨论

近年来, 天然药物抗肿瘤新药开发的品种迅速增多, 发挥的治疗作用也涉及到各个方面。本课题

3.3 PHD 对小鼠体内 Tyr、MMP-9、S-100B、p-P38 和 p-ERK 蛋白表达的影响

免疫组织化学染色法检测结果 (图 4) 显示, Tyr 和 p-P38 蛋白在 PHD 治疗组中阳性表达率分别为 100% (6/6) 和 83% (5/6), 均明显高于模型组的 17% (1/6) ($P < 0.05$), MMP-9、S-100B 和 p-ERK 蛋白在 PHD 治疗组中阳性表达率均为 17% (1/6), 明显低于模型组的 100% (6/6)、100% (6/6) 和 83% (5/6) ($P < 0.05$)。

组前期研究结果^[9-10]显示, 木鳖子 PHD 能够显著抑制 B16 细胞的生长并能够诱导其分化。在前期研究基础上, 本研究探索了 PHD 对小鼠体内黑色素瘤细胞移植瘤的抑制作用和初步机制。

本研究结果表明, PHD 可明显抑制黑色素瘤 B16 细胞的体外增殖, 并且治疗组 B16 细胞出现典型的细胞分化状态, 与以往研究结果相符。黑色素的量增加是黑色素瘤细胞功能分化的标志之一^[11], 而在黑色素细胞中, Tyr 控制黑色素的合成, 是黑色素合成通路中的关键酶。S-100B 蛋白是评价黑色素瘤预后

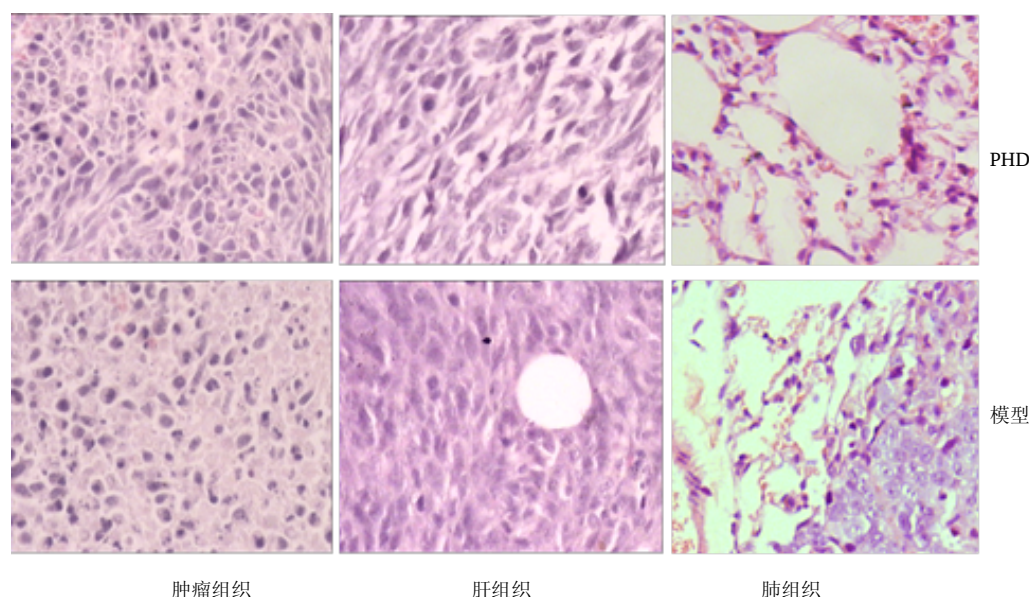


图 5 HE 染色法检测 PHD 治疗后小鼠体内肝、肺组织形态学变化

Fig. 5 Morphological changes of liver and lung tissues in xenograft tumors treated with PHD detected by HE staining

的一种生物标记物^[12-13]，本研究结果发现，PHD 在体内可降低黑色素瘤组织中 S-100B 和 MMP9 蛋白的表达水平，升高 Tyr 蛋白的表达水平，进一步证实 PHD 不但能够诱导黑色素瘤细胞向正常黑色素细胞方向分化，而且能够明显降低已经分化细胞的恶性程度，从而发挥体内的抗肿瘤作用。

MAPKs 为丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶的一个家族，调节细胞的凋亡、增殖及分化等，在黑色素细胞生物活性中具有重要作用^[14-15]。MAPKs 超家族中 3 个特征性亚家族为 Erks、JNK 和 P38 MAPKs。有研究发现^[16]，P38-MAPKs 通路活化与黑色素合成增加有关，P38-MAPKs 的级联反应参与了 B16 的黑色素合成。本研究结果表明，PHD 能够降低体内黑色素瘤组织中 p-ERK 蛋白的表达水平，升高 p-P38 蛋白的表达水平，说明 PHD 可能通过增强 P38 通路活性，降低 ERK 通路活性而激活黑色素合成相关基因，促进小鼠黑色素瘤 B16 细胞的分化。本研究结果还显示，与模型组相比，PHD 治疗组小鼠的肝和肺组织均未发现明显的病理学改变，证明 PHD 有望成为一种较安全的抗癌药物。

综上所述，PHD 在体内能够抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖和分化，其机制可能与 MAPK 通路相关，为 PHD 应用于黑色素瘤治疗提供了理论基础。关于 PHD 诱导 B16 细胞分化的深入作用机制，尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Prignano F, Coronello M, Pimpinelli N, et al. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 186(2): 183-192.
- [2] Balch C M, Gershenwald J E, Soon S J, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(36): 6199-6206.
- [3] 田红, 肖桂芝, 田苗, 等. 黑色素瘤治疗药物的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(7): 890-896.
- [4] 王英凯, 张明磊, 张立波. 人参三醇组皂甙诱导分化人肝癌细胞的研究 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2003, 19(4): 242-243.
- [5] 景永奎, 韩锐. 大豆甾元(S86019)与乳香有效成分 Bc-4 或阿糖胞苷对 HL-60 细胞分化的联合诱导 [J]. *药学报*, 1993, 28(1): 11-16.
- [6] Wang N, Wang L W, Gou B D, et al. Realgar-induced differentiation is associated with MAPK pathways in HL-60 cells [J]. *Cell Biol Int* 2008, 32(12): 1497-1505.
- [7] 赵连梅, 韩丽娜, 商晓辉, 等. 木鳖子醇提取物对黑色素瘤 B16 细胞增殖的抑制作用及其可能机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 13-18.
- [8] 赵连梅, 韩丽娜, 耿艺曼, 等. 木鳖子醇提取物诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞分化的作用机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4): 381-386.
- [9] 耿艺曼, 赵连梅, 朱秀丽, 等. 木鳖子对羟基桂皮醛对黑色素瘤 B16 细胞分化的影响及其机制 [J]. *中草药*,

- 2013, 44(14): 1951-1956.
- [10] 赵连梅, 耿艺曼, 孙士萍, 等. 木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞的分化及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(3): 282-287.
- [11] Zhao L M, Han L N, Ren F Z, *et al.* An ester extract of *Cochinchina momordica* seeds induces differentiation of melanoma B16F1 cells via MAPKs signaling [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3795-3802.
- [12] Jiang Z, Xu J, Long M, *et al.* 2,3,5,4'- tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation [J]. *Life Sci*, 2009, 85(9/10): 345-350.
- [13] Wevers K P, Kruijff S, Speijers M J, *et al.* S-100B: a stronger prognostic biomarker than LDH in stage IIIB-C melanoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(8): 2772-2779.
- [14] Kruijff S, Hoekstra H J. The current status of S-100B as a biomarker in melanoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2012, 38(4): 281-285.
- [15] Selimovic D, Hassan M, Haikel Y, *et al.* Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2 [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(2): 311-322.
- [16] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(22): 3525-3544.