

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00142

JNK 通路及 HSP70 在热化疗抑制人小细胞肺癌细胞生长中的作用

王琳¹, 高珊¹, 张瑞芳², 吴卫东^{1,3}, 吴逸明^{1*}

1. 郑州大学公共卫生学院职业卫生与职业病学教研室, 郑州 450052

2. 新乡医学院公共卫生学系, 新乡 453003

3. The Center for Environmental Medicine and Lung Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA

[摘要] **目的:**研究热化疗对小细胞肺癌生长的影响及其可能的机制。**方法:**参考临床常用剂量,采用 43℃ 加热联合 120 μg/L 紫杉醇(热化联合组)、43℃ 加热联合 120 μg/L 紫杉醇及 20 μmol/L JNK 特异抑制剂 SP600125(热化联合+SP600125 组)、单纯 43℃ 加热(单纯热疗组)、单纯使用 120 μg/L 紫杉醇(单纯化疗组)处理 H446 细胞,以未处理的 H446 细胞作对照。应用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT 法)检测各处理方式下细胞增殖率的变化,通过 Western 印迹法检测 JNK、磷酸化 JNK(p-JNK)和 HSP70 的表达并对数据进行统计学分析。**结果:**热化联合组细胞增殖率低于对照组、单纯化疗、单纯热疗及热化联合+SP600125 组($P<0.05$);p-JNK 表达水平在热化联合组中表达明显增高($P<0.05$),但 SP600125 可抑制其表达,使热化联合+SP600125 组细胞的增殖率相应增高($P<0.05$);HSP70 在热化联合组的表达低于单纯热疗组($P<0.05$),细胞增殖率也发生了相应变化。**结论:**热疗可以明显增加紫杉醇对 H446 细胞生长的抑制作用,且这种作用可能是通过激活 JNK 信号转导通路或抑制 HSP70 的表达完成的。

[关键词] 肺肿瘤;H446 细胞;JNK 丝裂原活化蛋白激酶类;热休克蛋白质 70;温热疗法;药物疗法;细胞增殖

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0142-04

Role of JNK pathway and HSP70 in thermo-chemotherapy of lung cancer

WANG Lin¹, GAO Shan¹, ZHANG Rui-fang², WU Wei-dong^{1,3}, WU Yi-ming^{1*}

1. Department of Occupational Medicine, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Faculty of Public Health, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China

3. The Center for Environmental Medicine and Lung Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of thermo-chemotherapy on lung cancer and its possible mechanism. **Methods:** H446 cells were subjected to different thermo-chemotherapy strategies: 43℃ + Paclitaxel (120 μg/L, thermo-chemotherapy group), 43℃ + Paclitaxel (120 μg/L) + SP600125 (20 μmol/L, JNK inhibitor) (thermo-chemotherapy + SP600125 group), thermotherapy (43℃) group, and Paclitaxel (120 μg/L) group; untreated cells served as control. MTT assay was used to measure cell proliferation and Western blotting was used to examine the expression of JNK, p-JNK and HSP70 protein. **Results:** The proliferation rate of cells in the thermo-chemotherapy group was significantly lower than those in the other 3 groups (all $P<0.05$). The expression of p-JNK was significantly increased in the thermo-chemotherapy group ($P<0.05$); SP600125 inhibited the expression of p-JNK and the proliferation of cells in the thermo-chemotherapy+SP600125 group was elevated ($P<0.05$). The expression of HSP70 in the thermo-chemotherapy group was lower than that of the thermotherapy group ($P<0.05$). **Conclusion:** Thermotherapy can obviously promote the inhibitory effect of Paclitaxel chemotherapy against the growth of lung cancer cell line H446, probably through activating JNK pathway or inhibiting expression of HSP70 protein.

[KEY WORDS] lung neoplasms; H446 cells; JNK mitogen-activated protein kinases; heat-shock proteins 70; thermotherapy; drug therapy; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2):142-145]

[收稿日期] 2007-10-28 **[接受日期]** 2008-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30571552);郑州市 2006 年度科技发展计划(19-153). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571552) and Program of Science and Technology Development of Zhengzhou Municipal Government, 2006(19-153).

[作者简介] 王琳, 博士生.

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0371-66913091, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

目前,肺癌的发生率和死亡率居于世界癌症之首,是一种治愈率极低的恶性肿瘤。热疗被认为是继手术、放疗、化疗、生物疗法之后的第5种治疗肿瘤的方法,基于细胞培养、动物模型、临床应用等的研究均证明热疗可与化疗产生协同作用,因此,热疗诱导肿瘤细胞凋亡和增加肿瘤细胞对化疗的敏感性的作用受到越来越多的重视。但有关热化疗的理论研究相对滞后,其分子生物学机制的探讨尚不深入。本研究将加热与临床常用的化疗药物紫杉醇(TAX)联合应用,研究其对H446细胞生长增殖以及JNK信号转导通路和热休克蛋白70(HSP70)表达的影响,进而阐明热疗作用的可能机制,为肿瘤热疗的临床实践提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 人小细胞肺癌细胞株NCI-H446细胞(H446细胞)为本教研室自备;紫杉醇注射液(Paclitaxel Injection,太极集团四川太极制药有限公司,批准文号:国药准字H19994040);四甲基偶氮唑盐(Sigma公司);鼠抗人HSP70单克隆抗体(美国Santa Cruz生物技术公司);兔抗人JNK抗体和磷酸化JNK(p-JNK)(Thr183/Tyr185)抗体(美国Cell Signaling公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);JNK特异抑制剂SP600125(美国Alexis公司);垂直电泳槽;电转仪;Sunrise酶标仪;恒温水浴箱。

1.2 实验分组 实验应用临床常用剂量处理细胞,分为单纯紫杉醇化疗组(37℃,120 μg/L紫杉醇)、单纯热疗组(43℃加热,0 μg/L紫杉醇)、热化联合组(43℃加热联合120 μg/L紫杉醇)、热化联合并加入JNK特异抑制剂SP600125组(43℃加热联合120 μg/L紫杉醇及20 μmol/L SP600125)及对照组(37℃,0 μg/L紫杉醇)。

1.3 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测H446细胞生长的变化 取对数生长期的细胞常规消化制成单细胞悬液,调整细胞密度为 2.5×10^4 /ml,接种于96孔板中,每孔0.2 ml,37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h待细胞贴壁,按实验设计给细胞处理(每组设6个复孔,独立重复3次),之后放回37℃、5%CO₂培养箱继续培养48 h;每孔加入5 mg/ml MTT液20 μl,继续孵育4 h,取出培养板,弃去MTT液,每孔加入150 μl DMSO,微量震荡器震荡10 min,使结晶物充分溶解,以DMSO调零,酶联免疫检测仪在492 nm波长下检测每孔的光密度值,按下列公式

计算细胞生长增殖率:细胞生长增殖率=(实验组平均光密度值/对照组平均光密度值)×100%。

1.4 Western印迹法检测JNK、p-JNK及HSP70的表达 各组细胞离心收集,将约 1×10^6 个细胞置于细胞裂解液(30 mmol/L NaHCO₃,0.1 mmol/L EDTA,0.1 mmol/L DTT,0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟,2 mg/L 抑肽酶)中,在冰水浴中反复吹打进行破碎,4℃、10 000 r/min($r=6$ cm)离心10 min,吸取上清液,即为细胞提取液。进行总蛋白定量,调整蛋白浓度一致后,进行SDS-PAGE电泳,然后转移至硝酸纤维素膜上,分别以小鼠抗人HSP70抗体、兔抗人JNK抗体和兔抗人p-JNK抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠或抗兔IgG为二抗,进行免疫印迹分析,ECL显色后,应用GeneTool图像分析软件进行定量分析。将JNK1和JNK2、p-JNK1和p-JNK2的数值分别合并,计算p-JNKs与JNKs的比值,代表p-JNK的表达;HSP70的表达以与β-actin的比值表示。

1.5 统计学处理 应用SPSS 13.0对数据进行分析,实验均重复3次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行统计学分析,LSD法进行多重比较,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 细胞形态学观察结果 倒置显微镜下观察细胞,未处理的H446细胞贴壁生长,呈长梭形或多角形,排列均匀,可见较多的分裂象细胞;紫杉醇作用后,细胞胞体变圆变小,折光性增强,分裂象的细胞数目减少,仅有少数贴壁细胞,可见一些细胞崩解死亡;43℃加热联合紫杉醇作用时,存活细胞数量更少。

2.2 各处理因素对细胞生长的影响 MTT法测单纯紫杉醇化疗组、热化联合组、热化联合并加入JNK特异抑制剂SP600125组及对照组细胞增殖率,结果见表1。其中单纯化疗组、单纯热疗组和热化联合组增殖率均低于对照组($P < 0.05$);热化联合后加入JNK抑制剂组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而热化联合组细胞增殖率低于单纯化疗组和单纯热疗组($P < 0.05$)。

2.3 各组JNK及p-JNK蛋白的表达 单纯化疗、热化联合及热化联合后加入JNK抑制剂等因素处理细胞后,采用Western印迹检测JNK、p-JNK蛋白表达情况,结果如图1所示,各组JNK蛋白表达差异不明显;但加热后p-JNK的表达量比对照组和单纯化疗组明显增加,加入抑制剂后,p-JNK的表达量减少($P < 0.05$,表1)。

表 1 不同条件下 H446 细胞增殖率以及 p-JNK 和 HSP70 的表达

Tab 1 Proliferation rates of H446 cells and p-JNK and HSP70 expression under different conditions

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Cell proliferation(%)	p-JNK	HSP70
Control	100.00±0.00	0.43±0.01	3.58±1.23
Chemotherapy	69.16±2.95* Δ	0.47±0.03 Δ	1.07±0.74* Δ \blacktriangle
Thermotherapy	64.39±2.48* Δ		8.12±2.23* Δ
Thermo-chemotherapy	59.83±3.36*	0.66±0.14*	6.35±2.11*
Thermo-chemotherapy + SP600125	93.00±0.03 Δ	0.51±0.01 Δ	
F(LSD)	198.74	5.20	19.17
P(LSD)	<0.01	0.02	<0.01

* P<0.05 vs control; Δ P<0.05 vs thermo-chemotherapy group; \blacktriangle P<0.05 vs thermotherapy group

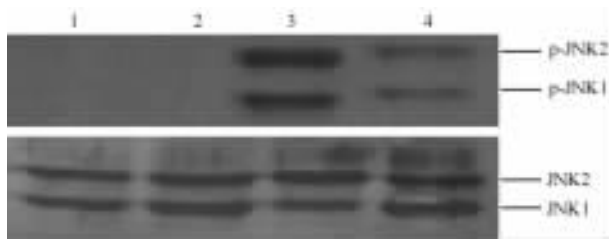


图 1 各组 JNK 和 p-JNK 蛋白 Western 印迹结果

Fig 1 Expression of JNK and p-JNK in each group(Western blotting)

1: Control; 2: Chemotherapy; 3: Thermo-chemotherapy; 4: Thermo-chemotherapy + SP600125

2.4 各组 HSP70 的表达 单纯化疗、单纯热疗及热化联合等因素处理细胞后,采用 Western 印迹法检测 HSP70 的表达情况。结果如图 2 所示,对照组、单纯热疗组以及热化联合组, HSP70 表达量(表 1)两两比较,差别均有统计学意义(P<0.05),且热化联合组 HSP70 表达低于单纯热疗组(P<0.05)。

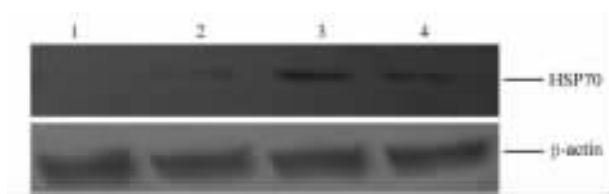


图 2 各组 HSP70 蛋白 Western 印迹结果

Fig 2 Expression of HSP70 protein in each group (Western blotting)

1: Control; 2: Chemotherapy; 3: Thermo-chemotherapy; 4: Thermo-chemotherapy + SP600125

3 讨论

紫杉醇是目前临床上常用的化疗药物,抗肿瘤效果显著^[1-2],但是,化疗药物往往会带来很大的不良反应,因此,寻找降低化疗药物用量并能提高疗效的综合治疗方法具有临床应用价值,热化联合就是

途径之一。热疗是一种新的肿瘤治疗方法,能够在有效的温度范围内提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,逆转肿瘤细胞的耐药^[3],诱导细胞凋亡^[4]。动物实验也证明了这一点,表明紫杉醇较为适合与加热联合应用于肿瘤的治疗,加热可以显著提高紫杉醇的肿瘤治疗效果^[5]。

本研究采用临床常用化疗药物紫杉醇与 43℃ 加热联合作用于 H446 细胞,观察到细胞的生长受到抑制,并且此种抑制作用要高于单纯使用紫杉醇,说明 43℃ 加热可增加细胞对化疗药物紫杉醇的敏感性。

加热可以诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)瞬时性增高,经 JNK 途径介导细胞阻滞于 G₂/M 期^[6],并可通过 Caspase 依赖途径诱导细胞凋亡。本研究中,热化联合作用 H446 细胞后,被激活的 JNK (p-JNK) 增加,加入 JNK 特异性抑制剂 SP600125 后,p-JNK 蛋白表达则明显减少,说明热化联合作用可激活 JNK 信号转导通路。结合 MTT 的实验结果,加入 JNK 特异抑制剂 SP600125 后, H446 细胞的生长增殖高于未加抑制剂的处理组,说明热化联合对 H446 细胞的生长抑制作用可能是通过 JNK 信号转导通路而发生的。

加热可以诱导热休克蛋白 HSPs 表达增加, HSPs 的表达将导致细胞热耐受能力的提高, HSPs 抑制剂 KNK437 抑制 HSP27 和 HSP72 的表达,可以降低肿瘤细胞的热耐受性^[7]。HSP70 家族是 HSPs 中最保守和最主要的一类,在大多数生物中含量最多,在细胞应激后生成最为显著,具有分子伴侣功能,能与一些癌基因、抑癌基因产物相互作用,参与肿瘤细胞凋亡、细胞分化等^[8]。多项研究表明, HSP70 是通过抑制几种凋亡通路,如 JNK 信号转导通路、线粒体通路等而抑制细胞的凋亡^[9]。本研究发现, HSP70 在单纯热疗组的表达要高于热化联合组,同时单纯热疗组细胞增殖率高于热化联合组,

说明热化联合的协同作用可能对抗了HSP70对肿瘤细胞的保护作用,比单纯加热更好地抑制了肿瘤细胞的生长。

综上所述,本研究发现热化疗联合应用可以明显增加其对H446细胞生长的抑制作用,且这种抑制作用可能是通过激活JNK信号转导通路或抑制HSP70的表达完成的。但热疗影响肿瘤细胞生长可能的机制还需进一步阐明,HSP与JNK及凋亡的关系仍需研究;同时,它们在肿瘤治疗中的作用,还需进一步探讨。

(**志谢** 本实验在河南省分子医学重点实验室和郑州大学公共卫生学院预防医学实验中心完成,特致谢忱!)

[参考文献]

- [1] Huang G S, Lopez-Barcons L, Freeze B S, Smith A B 3rd, Goldberg G L, Horwitz S B, et al. Potentiation of taxol efficacy and by discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice [J]. *Clin Tumor Res*, 2006, 12: 298-304.
- [2] Rexer F H. International study on testicular tumor: EORTC 30983; randomized phase II/III study of Taxol-BEP versus BEP in patients with Intermediate Prognosis Germ Cell Tumor [J]. *Urologie A*, 2005, 44: 1064-1065.
- [3] 王琳,杨继要,吴逸明.热化疗对肺部肿瘤细胞生长影响的研究[J]. *环境与职业医学*, 2007, 24: 201-203.
- [4] Wang J H, Yao M Z, Zhang Z L, Zhang Y H, Wang Y G, Liu X Y. HSF1 blockade-induced tumor thermotolerance abolishment is mediated by JNK-dependent Caspase-3 activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321: 736-745.
- [5] Michalakis J, Georgatos S D, Romanos J, Koutala H, Georgoulas V, Tsiftsis D, et al. Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells [J]. *Tumor Chemother Pharmacol*, 2005, 56: 615-622.
- [6] Cho S D, Li G, Hu H, Jiang C, Kang K S, Lee Y S, et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G₂/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2005, 52: 213-224.
- [7] 石永进,虞积仁,岑溪南,朱强,任汉云.热疗促进HSP70表达对免疫效应细胞杀伤肿瘤的影响[J]. *北京大学学报:医学版*, 2005, 37: 175-178.
- [8] Lachapelle G, Radicioni S M, Stankiewicz A R, Mosser D D. Acute acidification or amiloride treatment suppresses the ability of Hsp70 to inhibit heat-induced apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12: 1479-1488.
- [9] Stankiewicz A R, Lachapelle G, Foo C P, Radicioni S M, Mosser D D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 38729-38739.

[本文编辑] 孙岩

• 书 讯 •

《高级医院管理学》(第2版)已出版

本书由张鹭鹭、李静主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0703-2,16开,定价49.00元。

本书按照内部管理和外部管理的系统构架,在《高级医院管理学》第1版内容的基础上,注重医院管理领域基本理论和最新研究成果,着重介绍了目前医院管理学的政策与环境改革热点问题以及前沿理论研究成果,是传统医院管理学理论及知识体系在新形势下的深入与拓展。本书是社会医学与卫生事业管理专业研究生、卫勤领导干部任职培训专业教材,也可作为医院管理人员继续教育以及医学院校师生与临床医务人员的研修参考用书。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>