

HSP70 在放线菌素 D 所致肺腺癌 细胞增殖抑制和凋亡中的作用*

刘先领^{1)**} 刘伏友²⁾ 李桂源³⁾ 胡春宏¹⁾ 马芳¹⁾

(¹⁾中南大学湘雅二医院肿瘤科, 长沙 410011; ²⁾中南大学肾脏病研究所, 长沙 410011; ³⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410011)

摘要 为探讨热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)在肺腺癌中的表达及其作用, 首先采用免疫印迹检测经临床支气管镜确诊并行手术切除的肺腺癌组织标本中 HSP70 的表达, 结果显示在癌旁正常组织中 HSP70 的表达量显著低于其在癌组织中的表达量。其次, 采用 HSP70 反义寡核苷酸阻断 A549 细胞中 HSP70 表达后, 经 MTT 和 Hoechst33258 检测发现, HSP70 下调能显著促进放线菌素 D(actinomycin D, Act D)所致的 A549 细胞增殖抑制及凋亡, 反义寡核苷酸处理组与正义或随机寡核苷酸处理组比较 *P* 值均小于 0.05。进一步构建 HSP70 真核重组质粒并瞬时转染 A549 细胞后, 能显著增加 A549 细胞中 HSP70 表达, 同时采用 MTT 和流式细胞术及基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测发现, HSP70 过表达能显著抵消 Act D 所致细胞增殖抑制及凋亡, 转染 HSP70 重组质粒组与转染空载体组相比 *P* 值小于 0.05。上述结果提示, HSP70 在肺腺癌组织中高表达, 高表达的 HSP70 在降低肺腺癌细胞对 Act D 的敏感性及促进癌细胞增殖与抑制凋亡等方面发挥了重要作用。

关键词 热休克蛋白 70, 肺腺癌, 增殖, 凋亡, A549 细胞, 放线菌素 D

学科分类号 R734

原发性支气管肺癌(简称肺癌)是常见的恶性肿瘤, 是威胁人类健康的重要疾病。肺腺癌是肺癌中的一种重要类型。尽管针对原发性支气管肺癌的手术、放疗、化疗、生物治疗等治疗手段已取得了长足发展, 但肺癌的预后仍然十分恶劣, 总的 5 年生存率仍仅为 15%左右^[1,2], 这就要求肿瘤学家们努力去探索肺癌治疗的新途径、新方法。

热休克蛋白 (HSPs) 是细胞在生理状态下必需而在应激状态时表达增多的一类保护性蛋白质, 这类蛋白质具有高度保守性, 其生物学功能十分广泛, 主要是以“分子伴侣”的身份参与维持细胞蛋白质空间构象, 蛋白质新生多肽链的正确折叠, 多蛋白复合物的组装、跨膜运输、转运, 蛋白质降解等^[3,4]。大量研究表明, 在肺癌细胞中, 各种热休克蛋白均表达增多, 并在肺癌的发生发展、耐药、预后等方面发挥着重要作用^[5~7]。Ray 等^[8]发现, P210^{BCR-ABL} 融合蛋白的形成可诱导慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)对化疗药物产生耐受性, 这种耐受性的产生与转录因子 GATA-1 高表达后结合至 HSP70 启动子区-82~-58 碱基处的 GATA 反应元件进而促进 HSP70 的高表达有关。基于 HSP70 在 CML 对化疗药物产生耐受

性中的重要作用以及 HSP70 在肺癌中的高表达特性, 能否将 HSP70 视为一种有效治疗肺癌的生物靶标, 目前尚缺乏全面系统的研究。本研究拟通过确认 HSP70 在肺腺癌中的表达, 采用反义寡核苷酸技术和转基因技术, 来探讨 HSP70 与肺癌的关系及 HSP70 对放线菌素 D 所致 A549 细胞凋亡的影响, 以阐明 HSP70 在基因治疗肺腺癌中的潜在意义, 以期肺癌基因治疗新策略、新靶点的探索提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

A549 细胞株购自上海生命科学院细胞中心。DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 无支原体小牛血清购自杭州四季青生物工程公司; AMV 逆转录酶, M15 感受态细菌, *Bam*H I 和 *Eco*R I 核酸内切酶购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 氨苄青霉素, 卡那霉素均购自 Invitrogen 公司。

*湖南省科技厅计划资助项目(05FJ3062)。

** 通讯联系人。

Tel: 13973189688, E-mail: liuxianling3180@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-06-06, 接受日期: 2006-08-29

HSP70全长 cDNA 质粒和 pcDNA3.1-His 质粒由本校病理生理学教研室王慷慨副教授惠赠. Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 小量质粒 DNA 抽提试剂盒购自 Takara 公司. 放线菌素 D(ActD), MTT, 蛋白酶 K, 基因组 DNA 抽提试剂盒购自北京鼎国生物技术公司; 鼠抗 HSP70 单克隆抗体购自美国 Stressgen 公司; 兔抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 SantaCruz 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠, 羊抗兔 IgG 购自博士德公司.

1.2 方法

1.2.1 组织标本的获取及 HE 染色. 收集我院 2005 年 11 月份经术前支纤镜活检确诊为肺腺癌的患者术后新鲜组织标本 3 例, 置于液氮中保存备用. 并经我院病理科行常规 HE 染色进一步确诊.

1.2.2 细胞培养及处理. A549 细胞用含 10%小牛血清、100 mg/L 链霉素、100 U/ml 氨苄青霉素的 DMEM 培养基调整为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 后接种于细胞培养瓶, 24 h 后用于实验. 放线菌素 D 处理依据本研究前期工作之量效和时效分析, 采用终浓度为 10 mg/L 处理细胞 12 h.

1.2.3 总 RNA 提取及 RT-PCR 检测热休克蛋白 mRNA 的表达. 组织总 RNA 的抽提按《分子克隆》所载方法进行. RT-PCR 以 GAPDH 为内对照, 以正常肺组织和肺癌组织总 RNA 为模板, 采用 Takara 公司的 AMV 进行两步法 RT-PCR 扩增. 以 GAPDH 为内对照, 经 2.0%琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色后于紫外透射仪摄像. GAPDH 的上下游引物分别为, 5' AAGCCCATCACCA TCTTCCA 3'和 5'CCTGCTTCACCACCTT CTTG 3', 扩增片段长度为 580 bp. HSP70 引物采用“Primer3”引物设计软件进行设计, 并用“Blastn”进行比较确认没有

其他基因匹配. 其上下游引物序列为, 5' TGG AGT CCT ACG CCT TCA AC 3'和 5' AAT CCA CCT CCT CAA TGG TG 3', 扩增片段长度为 300 bp.

1.2.4 免疫印迹(Western blot)分析. 组织和细胞蛋白质的收集按照《分子克隆》所载方法进行. 收集的蛋白质采用 Bradford 法进行蛋白质定量, 制备好的蛋白质样品置 -80°C 冰箱保存备用. 每泳道以 30 μg 蛋白上样, 经 SDS-PAGE 后, 电转膜至硝酸纤维素膜. 封闭 3 h 后加入一抗, 室温孵育 1 h, 加入 HRP 标记的二抗孵育 30 min, DAB 显色, 拍摄照片, 记录实验结果. 同时检测 β -actin 作为内对照. 用 Bandleader 软件对免疫印迹条带进行灰度扫描, 按下述公式计算某蛋白质的相对含量: 蛋白质相对含量=(该蛋白质条带的灰度值-背景的灰度值)/(上样对照条带的灰度值-背景的灰度值).

1.2.5 脂质体介导的反义寡核苷酸转染. 依据 Macario 等^[9]报道的 HSP70 反义核酸序列, 并同时设计相应的正义和随机核酸序列(表 1), 所有核酸序列均由上海博雅生物技术有限公司加以合成. 所有碱基均进行硫代修饰, 并在反义核酸序列 5'端加上荧光标记物, 以便随时观察其导入细胞情况. 根据 Invitrogen 公司提供的转染操作说明书, 用 0.25 ml 不含血清及抗生素(下同)的 DMEM 培养基溶解 8 μg 合成的寡核苷酸, 并将其与 0.25 ml 含 15 μl 脂质体的无血清 DMEM 培养基充分混匀, 室温放置 20 min. 细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 遍后, 加入 1.5 ml 无血清 DMEM 培养基, 然后加入上述寡核苷酸与脂质体的混合物, 37°C , 5%的 CO_2 培养箱中培养, 6 h 后置于荧光显微镜下观察, 确认全细胞有荧光发出后拍照记录, 再加入 2 ml 含 20 %小牛血清的 DMEM 培养基, 于 24 h 后收集细胞, 进行后续实验.

Table 1 Sequence of HSP70 antisense and its sense and random oligonucleotides

Name	Sequence	Modification
Anti-sense (AS)	5' X-ctc cgc tgc tgc cgc aga cgc cat 3'	Phosphorothioate
Sense (S)	5' atg gcg tct gcg gca gca gcg gag 3'	Phosphorothioate
Random (R)	5' tgc ctg cca gca tgc cga ccg tcc 3'	Phosphorothioate

Sense oligonucleotides were designed according to the mRNA sequence (BC002453) of human HSP70 gene. Three probes were synthesized with phosphorothioate modification, and the antisense probes were added with green fluorescent group “X” in the 5' side.

1.2.6 细胞增殖能力 (MTT) 检测. 活细胞线粒体可还原 MTT 为紫色的甲胍结晶, 在一定范围内紫色的深浅与活细胞浓度呈线性关系, 通过测定甲胍

570 nm 波长处的光密度值可反映活细胞活力的变化. 取对数生长期细胞接种于 96 孔板 (1×10^4 / 孔), 在含 10%新生小牛血清的条件下培养 24 h, 分别

转染反义、正义及随机寡核苷酸 2 μg /孔, 于 24 h 及 48 h 向每孔中加入 MTT (5 g/L) 20 μl 继续培养 4 h, 结束时, 倾弃培养液上清, 加入二甲基亚砜 100 μl , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡至紫色的甲肼结晶完全溶解后, 将 96 孔板放入酶标仪, 测量 570 nm 处吸光值. 统计分析以正常对照组吸光度值为 1, 其余各组分别与之相比后再计算均数与标准差.

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡. 本实验由北京鼎国生物技术公司协助完成. 参考该公司流式细胞检测说明收集细胞. 简言之, 在转染反义核酸 24 h 后, 刮下细胞并收集于 10 ml 离心管中, 1 000 r/min 常温下离心 8 min, 弃上清, 用冷的 PBS 液重悬细胞, 同上离心后弃上清. 用 80%乙醇重悬并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 18 h 调整细胞浓度为 10 6 /ml, 取 1 ml 细胞悬液, 用 PBS 洗 3 次, 细胞重悬于 1 ml PI (50 mg/L) 染液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 即可进行流式分析.

1.2.8 Hoechst 33258 染色及荧光显微镜下观察细胞凋亡. 常规细胞涂片, 4%多聚甲醛固定, Hoechst 33258 染色后封片. 荧光显微镜下, 见正常细胞核呈弥散均匀荧光, 凋亡细胞则表现为浓染致密的颗粒块状荧光. 观察后照相并计数 500 个细胞核, 计算凋亡核百分率. 凋亡核百分率 = 凋亡细胞核 / 500 $\times$ 100%.

1.2.9 pcDNA3.1-HSP70 重组质粒的构建. 以 *EcoR* I、*Bam*H I 消化 HSP70 质粒, 获得大小为 2.5 kb 的含 HSP70 基因的片段. 以相同限制性内切酶酶切消化 pcDNA3.1 质粒, 然后两者在 T4 连接酶的作用下, 于 14 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 将连接产物 10 μl 加入预冷的 1.5 ml 的 EP 管中, 再加入 200 μl 感受态细菌, 混匀后置冰上 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 冰上 2 min, 加入 400 μl 不含氨苄青霉素的

LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 振摇 90 min. 取 100 μl 菌液涂抹含氨苄青霉素的琼脂平皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜. 次日挑选单个克隆, 置于 10 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中进行扩增培养, 采用小量质粒 DNA 抽提试剂盒抽提质粒, 以 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切该质粒进行鉴定. 确认无误后, 仍采用小量质粒 DNA 抽提试剂盒抽提质粒 DNA, 用相应内切酶酶切消化再次鉴定后, 分光光度计测定 DNA 浓度, 用于细胞转染. 转染方法同前, 细胞转染 36 h 后用于实验.

1.2.10 细胞 DNA 抽提及琼脂糖凝胶电泳. 按细胞 DNA 提取试剂盒说明书进行. 在质粒转染 36 h 后, 刮下细胞, 收集于 10 ml 离心管中, 1 000 r/min 常温下离心 8 min, 弃上清, 用冷的 PBS 液重悬细胞, 同上离心后弃上清. 依据试剂盒抽提 DNA 后, 用 50 μl TE 溶解, 取 3 μl 与 1 μl 点样缓冲液混合, 上样于 1.5%的琼脂糖凝胶, 80 V 电泳 1 h, 紫外灯下拍照记录结果.

1.2.11 统计学处理. 采用“简明医学统计学处理系统 1.0”软件进行统计学分析. 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用 *t* 检验分析, 多组间比较用单因素方差分析. 以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义.

2 结 果

2.1 HSP70 在肺腺癌组织中的表达

本研究选取经纤支镜活检确诊为肺腺癌病人的术后癌组织标本, 以距肿块 2~3 cm 的癌旁组织为对照, 采用免疫印迹技术检测组织中 HSP70 蛋白的表达, 结果显示, 正常肺组织中几乎没有 HSP70 表达, 癌组织中 HSP70 表达较正常肺组织明显增多. 灰度分析显示癌组织中 HSP70 表达量约为正常肺组织的 4~5 倍 ($P < 0.01$) (图 1).

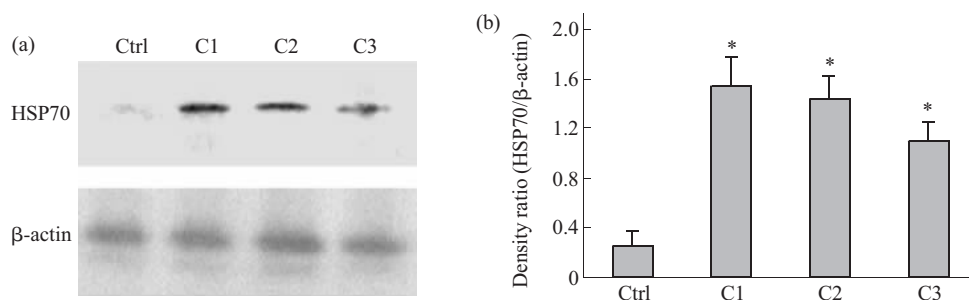


Fig. 1 Western blotting showed the expression of Hsp70 protein in tissue from lung cancer

Ctrl: Normal lung tissue; C1, C2, C3: Lung cancer tissue from three patients. (a) Immunoblotting; (b) Density ratio of HSP70 band to β -actin band, compared with ctrl, * $P < 0.05$.

2.2 反义寡核苷酸对肺腺癌细胞中 HSP70 蛋白表达的影响

将 HSP70 反义寡核苷酸用脂质体包裹, 导入 A549 细胞 6 h 后, 采用荧光显微镜观察寡核苷酸 (带有荧光标记物) 转入细胞的情况. 结果显示, 在同一激发光下, 仅用脂质体转染组细胞没有任何荧光, 而导入脂质体包裹的反义寡核苷酸组细胞可见

明显的绿色荧光, 弥散分布于细胞浆和细胞核 (资料未展示). 随后, 在转染 24 h 后收集细胞总蛋白. 采用免疫印迹检测 HSP70 蛋白的表达. 结果显示, 反义寡核苷酸显著抑制了 HSP70 的表达, 可使其表达水平下调约 75%, 而正义与随机寡核苷酸则对 HSP70 的表达无明显影响, 该两组条带灰度值与正常对照比, $P > 0.05$, 无统计学意义 (图 2).

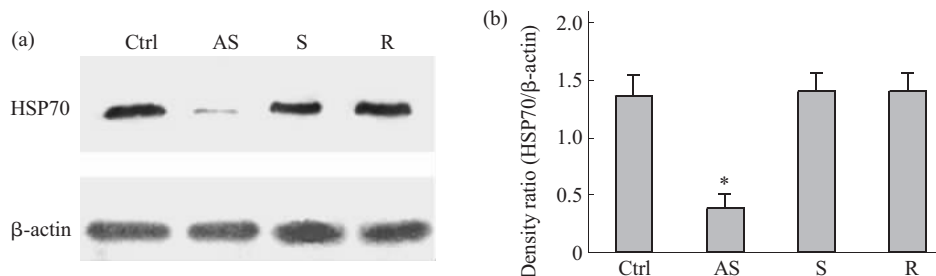


Fig. 2 Immunoblotting showing the effects of antisense oligonucleotides on the expression of HSP70 protein in A549 cells (one of three experiments)

Ctrl: A549 cells under normal condition; S, AS, R: A549 cells transfected with sense, antisense and random oligonucleotides of HSP70. (a) Immunoblotting; (b) Density ratio of HSP70 band to β-actin band, compared with Ctrl, S and R, * $P < 0.01$.

2.3 HSP70 表达下调对放线菌素 D 所致 A549 细胞增殖抑制及凋亡的影响

采用 MTT 法检测 A549 肺腺癌细胞增殖能力的大小. 以未经任何处理的 A549 肺腺癌细胞的增殖活力为 100%, 结果显示, Act D 处理 12 h 后, A549 细胞的增殖能力下降了 18%, 为 $(82.3 \pm 5.57)\%$ ($P < 0.05$), 在 HSP70 反义寡核苷酸处理 24 h 后, 再加入 Act D 处理 12 h, 此时 A549 细胞增殖能力在单纯 Act D 处理的基础上又下降了约 20%, 为 $(62.8 \pm 3.21)\%$, 仅相当于正常生长 A549 细胞增殖能力的 60%, 与 Act D 处理组和正常对照 (Ctrl) 组比, P 值均小于 0.01, 具有统计学意义 (图 3). 而采用 HSP70 正义寡核苷酸和随机寡核苷酸处理 24 h 后, 再加入 Act D 处理 12 h, 此时 A549 细胞增殖能力与单纯 Act D 处理组基本相当, 彼此并无统计学意义, $P > 0.05$. Hoechst33258 染色结果显示, 正常生长 A549 细胞胞核呈均匀弥散荧光, Act D 处理 12 h 后, A549 细胞出现明显的凋亡核形态学改变, 表现为体积缩小, 核碎裂, 核固缩, 呈致密浓染的颗粒状荧光. 转染 HSP70 反义寡核苷酸的 A549 细胞凋亡核形态学改变更加明显, 数目明显增多, 转染 HSP70 正义寡核苷酸的 A549 细胞凋亡核形态学改变与单纯 Act D 处理相当. 统

计分析显示, 正常 A549 细胞凋亡核百分率分别为 3.6%, 单纯 Act D 处理细胞凋亡核百分率为 16.8%, 两者相比 $P < 0.05$, 具有统计学意义. 转染 HSP70 反义寡核苷酸的 A549 细胞凋亡核百分率为 25.9%, 转染 HSP70 正义寡核苷酸的 A549 细胞凋亡核百分率为 15.6%, 两者相比 $P < 0.05$, 具有统

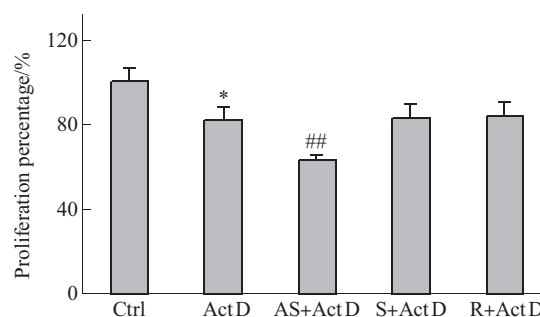


Fig. 3 Role of antisense oligonucleotides of HSP70 in proliferation inhibition-mediated by Act D in A549 cells

Ctrl: Cells under normal condition; Act D: Cells treated with Act D for 12 h; AS+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with antisense oligonucleotides of HSP70 for 24 h; S+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with sense oligonucleotides of HSP70 for 24 h; R+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with random oligonucleotides for 24 h, compared with Ctrl and Act D, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, $n = 8$.

计学意义, 转染 HSP70 反义寡核苷酸组与单纯 Act D 处理组相比 $P < 0.05$, 具有统计学意义, 与正常对照组比 $P < 0.01$, 具有统计学意义. 转染

HSP70 正义寡核苷酸与单纯 Act D 处理组相比 $P > 0.05$, 无统计学意义 (图 4).

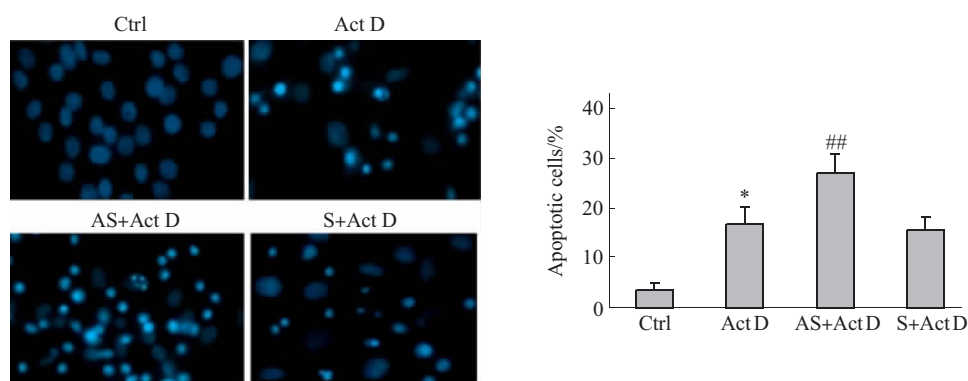


Fig. 4 Hoechst33258 staining showing the role of antisense oligonucleotides of HSP70 in proliferation inhibition-mediated by Act D in A549 cells

Ctrl: Cells under normal conditions; Act D: Cells treated with Act D for 12 h; S+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with sense oligonucleotides for 24 h; AS+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with sense oligonucleotides for 24 h; compared with Ctrl, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with Act D, ## $P < 0.05$, $n=5$ (200 $\times$).

2.4 HSP70 重组质粒转染升高 A549 细胞中 HSP70 蛋白的表达水平

将 HSP70 基因 2.5 kb 的全长 cDNA 片段插入真核表达载体 pcDNA3.1 中, 获得多个阳性克隆. 将其中的一个阳性克隆经 *EcoR* I / *Bam* H I 进行双酶切鉴定, 可见 2.5 kb 的插入片段. 进一步对这一克隆进行测序及 Blast 比对, 证明 pcDNA3.1-

HSP70 重组质粒构建成功(资料未展示). 将重组质粒 pcDNA3.1-HSP70 及对照质粒 pcDNA3.1 分别转染 A549 细胞 36 h, 收集细胞作免疫印迹分析 (图 5). 结果显示, 转对照质粒的 A549 细胞 HSP70 的表达量, 明显低于转 HSP70 基因 36 h 后细胞内 HSP70 蛋白的表达量.

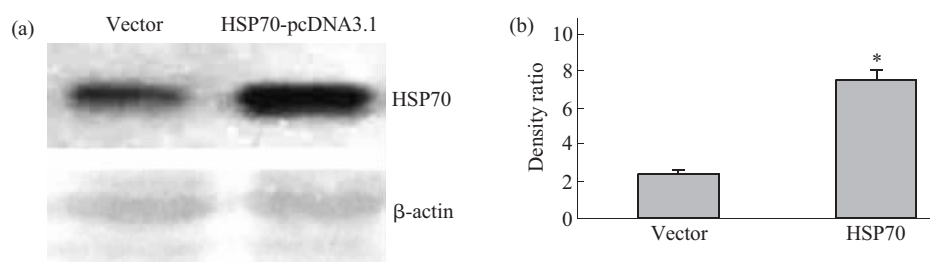


Fig. 5 Expression of HSP70 in A549 cells after transfection with pcDNA3.1-HSP70 recombinant plasmid

(a) Representative of 3 separated Western-blot experiments. (b) Ratio of density of HSP70 bands to their β -actin bands and statistic analysis (* $P < 0.05$, vs vector group, $n=3$).

2.5 HSP70 过表达对放线菌素 D 所致 A549 细胞增殖抑制及凋亡的影响

采用 MTT 检测 A549 细胞增殖活力, 以未作任何处理的 A549 细胞的增殖活力为 100%, 结果显示, Act D 处理 12 h 后, A549 细胞的增殖能力

下降了 18%, 为 $(82.3 \pm 5.57) \%$ ($P < 0.05$), 在转染空载 36 h 后, 再加入 Act D 处理 12 h, 此时 A549 细胞增殖能力与单纯 Act D 处理组基本相当, 彼此无统计学意义, $P > 0.05$. 在转染 HSP70 重组质粒 36 h 后, 再加入 Act D 处理 12 h, 此时 A549

细胞增殖能力为 $(97.83 \pm 3.43)\%$, 与转空载体组比 $P < 0.05$, 具有统计学意义(图 6).

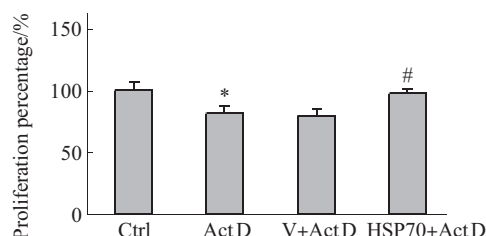


Fig. 6 Role of overexpression of HSP70 in proliferation inhibition-mediated by Act D in A549 cells

Ctrl: Cells under normal condition; Act D: Cells treated with Act D for 12 h; V+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with pcDNA3.1 plasmid for 36 h; HSP70+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with HSP70-pcDNA3.1 plasmid for 36 h, compared with Ctrl, * $P < 0.05$, compared with Act D group and V+Act D group, # $P < 0.05$, $n=8$.

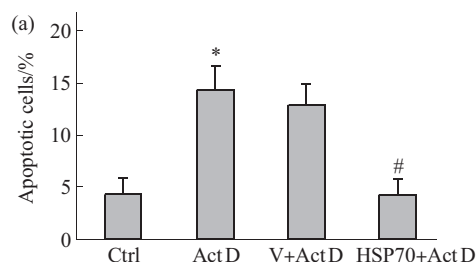
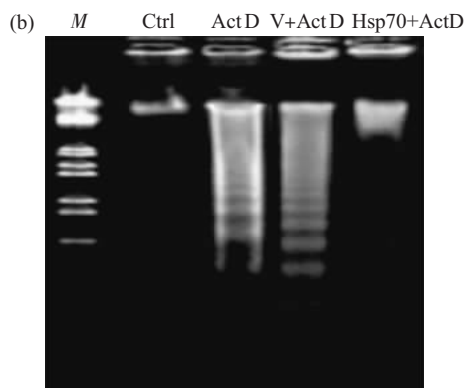


Fig. 7 Role of over-expression of HSP70 in apoptosis-mediated by Act D in A549 cells

(a) Analysis of the results from FCM, (b) Agarose gel electrophoresis detecting the DNA laddering in gDNA. M: 1 kb DNA molecular mass marker; Ctrl: Cells under normal condition; Act D: Cells treated with Act D for 12 h; V+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with pcDNA3.1 plasmid for 36 h; HSP70+Act D: Cells treated with Act D for 12 h after transfected with HSP70-pcDNA3.1 plasmid for 36 h, compared with Ctrl, * $P < 0.05$, Compared with Act D group and V+Act D group, # $P < 0.05$, $n = 4$ for figure (a) and $n = 3$ for figure (b).

经流式细胞术检测发现, 正常 A549 细胞凋亡核百分率为 4.31%, 单纯 Act D 处理细胞凋亡核百分率为 14.37%, 两者相比 $P < 0.05$, 具有统计学意义. 转染空载体 36 h 后, 再用 Act D 处理 12 h, 细胞凋亡核百分率为 12.89%, 转染 HSP70 重组质粒 36 h 后, 再用 Act D 处理 12 h, 细胞凋亡核百分率为 4.24%, 两者相比 $P < 0.05$, 具有统计学意义, 后者与正常对照组比 $P > 0.05$, 无统计学意义(图 7a). 为充分确认 HSP70 在 Act D 诱导的 A549 细胞凋亡中的作用, 本研究进一步抽提 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳观察 DNA “梯状”条带(DNA 片段化), 结果显示, 正常细胞, 转染 HSP70 重组质粒组未见明显的 DNA “梯状”条带, 而转染空载体组及单纯用 Act D 处理的细胞出现了明显的片段化 DNA (图 7b). 说明 HSP70 过表达能抑制或逆转 Act D 所致 A549 细胞凋亡.



3 讨 论

HSPs 是一类结构上高度保守, 功能非常广泛的蛋白质. 在哺乳类细胞中主要含有 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、HSP27 以及 α B-晶状体蛋白等^[3,4]. HSPs 在细胞中主要发挥分子伴侣(molecular chaperone)功能, 即帮助新合成的蛋白质正确折叠、解聚、转运, 结合受损的蛋白质或多肽, 帮助它们修复或通过泛素/蛋白酶体使其降解^[9]. 正因为这一系列生物学功能, HSPs 在抗损伤,

稳定甚至促进细胞增殖方面发挥重要作用, 因此, 众多学者认为热休克蛋白的过度表达是肿瘤细胞异常生长的原因之一. 大量研究表明, 各种热休克蛋白在多种恶性肿瘤细胞和组织中均存在有过度表达, 这些恶性肿瘤包括肝癌、乳腺癌、喉癌、胃肠道癌, 前列腺癌等多种恶性肿瘤^[10]. HSP70 作为诱导表达最多的一种热休克蛋白, 其在肿瘤生长中具有重要的生物学功能. Volm 等^[7]研究 HSP70 的表达与肺癌高危因素吸烟的关系, 发现吸烟与 HSP70 表达有相关性, 且与每日吸烟的数量有关, 这些研

究均提示, HSP70 在肺癌的发生发展、耐药、预后等方面发挥着重要作用^[11,12]. 本研究在组织水平, 从 mRNA (资料未显示) 和蛋白质两个层面均证实 HSP70 的表达显著高于正常组织. 基于这一结果, 我们认为, HSP70 作为最重要的热休克蛋白成员, 在肺腺癌组织中的高水平表达可能与肺腺癌细胞的生长有密切关系. 因此在肺腺癌的防治过程中, 利用 HSP70 高表达的特性, 通过干预 HSP70 基因和蛋白质水平的表达, 可能不失为一种值得探索的新途径和新靶点.

因此, 本研究进一步采用反义寡核苷酸技术下调 HSP70 的表达. 本研究中所选用的 HSP70 反义寡核苷酸序列已被多人验证有效. 反义寡核苷酸经脂质体转染后, 入细胞核和胞浆^[3], 与 HSP70 mRNA 或其前体特异结合, 阻断其翻译而抑制 HSP70 的表达. 在确认 HSP70 反义寡核苷酸之有效性后, 本研究首先采用 MTT 检测了 A549 细胞的增殖能力. 结果显示, HSP70 反义寡核苷酸能明显促进 Act D 诱导的 A549 细胞增殖抑制作用, 而 HSP70 正义及随机寡核苷酸则没有影响. 细胞增殖能力下降, 细胞是否发生了凋亡呢? 为了证实这一问题, 本研究进一步采用 Hoechst33258 荧光染料染色及流式细胞术(结果未显示)检测了 A549 细胞凋亡情况. 结果显示, HSP70 反义寡核苷酸能明显加重 Act D 诱导的 A549 细胞凋亡的发生, 细胞凋亡核百分率显著高于单纯 Act D 处理组, 而 HSP70 正义及随机寡核苷酸则同样对 Act D 诱导的 A549 肺腺癌细胞凋亡没有任何影响.

基于 HSP70 为一种重要的分子伴侣蛋白, 具有显著的抗细胞损伤作用, 也正因为如此, 所以我们假设高表达 HSP70 的肺腺癌细胞和组织得以生长, 进展迅速. 本研究拟进一步在细胞水平证实过表达 HSP70 的抗细胞损伤作用, 以验证上述假说, 从而肯定在肺腺癌化疗中 HSP70 发挥的重要作用.

本研究首先采用基因工程技术构建了 HSP70 的重组表达质粒, 并分别采用双核酸内切酶酶切以及基因测序的方法对构建的重组质粒进行鉴定, 结果表明重组质粒构建成功. 随后采用脂质体介导的基因转染技术将该质粒导入 A549 细胞, 并用免疫印迹法进行鉴定, 结果表明, 转 HSP70 重组质粒的 A549 细胞中 HSP70 的表达量显著高于转空载体的 A549 细胞, 说明本研究所依赖的转基因细胞模型构建成功. 在转基因细胞模型构建成功后, 利用这一平台, 本研究分别采用 MTT 法和凋亡分析技

术检测了 HSP70 过表达对 Act D 所诱导的 A549 细胞增殖抑制和细胞凋亡的影响. 结果表明, HSP70 过表达能明显抑制 Act D 诱导的 A549 细胞增殖抑制作用, 而转空载体则没有影响. 同时本研究进一步采用流式细胞术及 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测了 A549 细胞凋亡情况. 结果显示, HSP70 过表达能明显抑制 Act D 诱导的 A549 细胞凋亡的发生, 细胞凋亡核百分率显著低于单纯 Act D 处理组, 而转空载体则对 Act D 诱导的 A549 细胞凋亡没有任何影响. 琼脂糖凝胶电泳结果显示, HSP70 过表达能明显抑制 Act D 诱导的 A549 细胞凋亡 DNA “梯状”条带的形成, 而转空载体则没有影响.

上述研究表明, HSP70 过表达显著抑制了化疗药物 Act D 的抗肿瘤细胞生长作用, 而 HSP70 表达下调则可协同和促进 Act D 的抗肿瘤细胞生长作用. 因此我们认为, HSP70 在肺腺癌细胞和组织的生长、增殖的生物学功能中发挥了重要作用. 人为采用分子生物学或遗传工程技术下调或消除 HSP70 的表达, 再结合常规的手术、放疗、化疗等手段, 对于控制肺腺癌的复发、转移及提高患者 5 年生存率、提高患者的生存质量具有重要意义, 可能为今后治疗的发展方向.

参 考 文 献

- 1 陆舜. 非小细胞肺癌综合治疗新进展. 中国肺癌杂志, 2005, 8 (1): 74~76.
Lu S. Chin J Lung Cancer, 2005, 8 (1): 74~76
- 2 Liberman M, Liberman D, Sampalis J S, *et al.* Delays to surgery in non-small-cell lung cancer. Can J Surg, 2006, 49 (1): 31~36
- 3 Benjamin I J, McMillan D R. Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circ Res, 1998, 83: 117~132
- 4 Xiao X Z, Benjamin I J. Stress-response proteins in cardiovascular disease. Am J Hum Genet, 1999, 64: 685~690
- 5 Macario A J. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. Int J Clin Lab Res, 1995, 25 (2): 59~70
- 6 战润庆, 董 驹, 张树波, 等. 肺腺癌 GLC-82 细胞 HSP70 表达与放化疗的敏感性. 中国肿瘤, 2005, 14 (2): 126~129
Zhan R Q, Dong J, Zhang S B, *et al.* Bull of Chinese Cancer, 2005, 14 (2): 126~129
- 7 Volm M, Mattern J, Stammers G. Up-regulation of heat shock protein 70 in adenocarcinomas of the lung in smokers. Anticancer Res, 1995, 15 (6B): 2607~2609
- 8 Ray S, Lu Y, Kaufmann S H, *et al.* Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. J Biol Chem, 2004, 279(34): 35604~35615

- 9 Kregel K C. Molecular biology of thermoregulation invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physio*, 2002, **192**: 2177~2186
- 10 Jolly C, Morimoto R I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Res Inst*, 2000, **92**: 1564~1572
- 11 Maulik G, Kijima T. Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2002, **8**: 620~627
- 12 Chang Y S, Lee L C, Sun F C. Involvement of calcium in the differential induction of heat shock protein 70 by heat shock protein 90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, in human non-small cell lung cancer H460 cells. *J Cell Biochem*, 2006, **97** (1): 156~165

Roles of HSP 70 in Actinomycin D-Induced Inhibition of Proliferation and Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cell*

LIU Xian-Ling^{1)**}, LIU Fu-You²⁾, LI Gui-Yuan³⁾, HU Chun-Hong¹⁾, MA Fang¹⁾

¹⁾Department of Oncology of The 2nd Xiangya Hospital, Changsha 410011, China;

²⁾Institute of Nephrology, Changsha 410011, China; ³⁾Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract It had been proved by many evidences that several heat shock proteins (HSPs) expression is up-regulated in tissue-derived primary lung cancer, and HSPs may play important roles in development, in resistant to drugs and in prognosis of lung cancer. However, there have not still systemic research on which HSPs, especially HSP70 can be or not thought as a new biological target in the therapy to lung cancer. In order to address the expression and roles of heat shock protein 70 (HSP70) in lung adenocarcinoma, immunoblotting was performed to detect the expression of HSP70 in tissue specimens from lung adenocarcinoma which were diagnosed unambiguously by branch fibromicroscopy and were excised. It showed that in the normal lung tissues, the expression of HSP70 was less than that in cancer tissues. After down-regulation of HSP70 protein by HSP70 anti-sense oligonucleotides in A549 cell line, MTT assay showed that the proliferation of A549 cells was inhibited remarkably after the treatment with HSP70 antisense oligonucleotides and Act D. There had significant differential in HSP70 antisense treatment group followed by Act D treatment and Act D treatment group. Results of Hoechst33258 staining revealed that HSP70 antisense oligonucleotides could promote Act D-mediated apoptosis in A549 cells with a higher percentage of apoptotic cells ($26.91 \pm 3.73\%$) than that of Act D-treated group ($16.83 \pm 3.41\%$) ($P < 0.01$). Furthermore, the expression of HSP70 protein was increased remarkably by transfection with a full length HSP70 recombinant plasmid into A549 cells. MTT assay revealed that HSP70 over-expression could block significantly the inhibition of proliferation induced by Act D, there had statistic significance between HSP70 over-expression group and only Act D-treated group ($P < 0.01$). Furthermore, over-expression of HSP70 could significantly inhibit Act D-mediated apoptosis in A549 cells with a lower percentage of apoptotic cells ($4.25 \pm 1.48\%$) in HSP70 transfection group, ($12.89 \pm 2.03\%$) in vector transfection group and ($14.37 \pm 2.56\%$) in Act D treatment group and disappearance of DNA laddering. These results suggests that increased levels of HSP70 in lung adenocarcinoma tissues decrease the sensitivity of lung adenocarcinoma to Act D, promote proliferation and suppress apoptosis of lung adenocarcinoma cells.

Key words heat shock protein 70 (HSP70), lung adenocarcinoma, proliferation, apoptosis, actinomycin D (Act D), A549 cell line

*This work was supported by a grant from The Office of Hunan Science and Technology (05FJ3062).

**Corresponding author . Tel: 86-013973189688, E-mail: liuxianling3180@yahoo.com.cn

Received: June 6, 2006 Accepted: August 29, 2006