

热化联合对肺癌患者 A549 细胞生长、c-Jun N-末端激酶磷酸化及热休克蛋白 70 表达的影响

吴海乔, 田 甜, 胡君程, 林 蓁

(中国人民解放军第 174 医院病理科, 福建 厦门 361000)

【摘要】 目的 观察热化联合对肺癌患者 A549 细胞生长的影响及机制探讨。方法 对 A549 细胞分别进行单独热疗、单独化疗, 热化联合干预及热化联合并 SP600125 干预, 同时选取未做任何处理的 A549 细胞作为对照组。观察各组细胞增殖率、细胞侵袭力的变化。同时采用蛋白免疫印记法(Western Bolt)检测 JNK 磷酸化以及热休克蛋白 70 (HSP70) 的表达。结果 热化联合组的 A549 细胞增殖率明显低于单独热疗、单独化疗和热化联合并 SP600125 组($P<0.05$)。热化联合组 JNK 磷酸化表达明显高于对照组及单独化疗组($P<0.05$), 热化联合组 HSP70 表达明显低于单独热疗组($P<0.05$)。热化联合干预下, p-JNK 表达水平出现上升, 与对照组、单独热疗组和单独化疗组相比, 差异均具有统计学意义($P<0.05$); 热化联合并 SP600125 组的 p-JNK 的表达水平较热化联合组显著下降($P<0.05$)。结论 热化联合抑制 A549 细胞增殖的效果优于单独热疗或单独化疗, 作用机制可能与激活 JNK 信号通路或抑制 HSP70 表达有关。

【关键词】 热化; A549 细胞; c-Jun N-末端激酶磷酸化; 热休克蛋白 70

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)03-0326-03

Influence of thermalization on A549 cells growth, c-Jun N-terminal kinase phosphorylation and expression of heat shock protein 70 in patients with lung cancer. WU Hai-qiao, TIAN Tian, HU Jun-cheng, LIN Zhen. Department of Pathology, the 174th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Xiamen 361000, Fujian, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effect of thermalization on A549 cells growth in patients with lung cancer and its mechanism. **Methods** A549 cells were given thermotherapy alone (group A), chemotherapy alone (group B), and thermotherapy combined with chemotherapy (group C), thermotherapy combined with chemotherapy and SP600125 intervention (group D). Untreated A549 cells were selected as the control group. The changes of cell invasion, proliferation rate of the cells in each group were observed. Phosphorylated JNK and expression of heat shock protein 70 (HSP70) were detected by Western blot. **Results** A549 cell proliferation rate of group C was significantly lower than that of group A, group B and group D ($P<0.05$). The expression of group C was significantly higher than that of control group and group B ($P<0.05$), and the expression of HSP70 in group C was significantly lower than that in group A ($P<0.05$). In group C, the expression level of p-JNK increased, compared with the control group, group A and group B, with statistically significant difference ($P<0.05$). In group D, the expression level of p-JNK decreased significantly compared with group C ($P<0.05$). **Conclusion** Thermotherapy combined with chemotherapy had better effects in inhibiting proliferation of A549 cells than thermotherapy or chemotherapy alone. The mechanism may be related to the activation of JNK signal pathway or inhibiting expression of HSP70.

【Key words】 Thermotherapy; A549 cell; c-Jun N-terminal kinase phosphorylation; Heat shock protein 70

通讯作者: 吴海乔. E-mail: 1589725541@qq.com

[8] Amar AP, Zlokovic BV, Apuzzo ML. Endovascular restorative neurosurgery: a novel concept for molecular and cellular therapy of the nervous system [J]. Neurosurgery, 2003, 52(2): 402-412.

[9] Chen J, Venkat P, Zacharek A, et al. Neurorestorative therapy for stroke [J]. Front Hum Neurosci, 2014, 8: 382.

[10] Liu X, Ye R, Yan T, et al. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside [J]. Prog Neurobiol, 2014, 115: 92-115.

[11] Liu Y, Zhou Y, Zhang C, et al. Optimal time for subarachnoid transplantation of neural progenitor cells in the treatment of contusive spinal cord injury [J]. Neural Regen Res, 2013, 8(5): 389-396.

[12] Pandamooz S, Najji M, Alinezhad F, et al. The influence of cerebrospinal fluid on epidermal neural crest stem cells may pave the path for cell-based therapy [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(4): 84.

[13] 陈 鹏, 张 波, 张连阳. 间充质干细胞迁移的研究进展[J/D]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(4): 977-979.

[14] Dailey T, Metcalf C, Mosley YI, et al. An Update on Translating Stem Cell Therapy for Stroke from Bench to Bedside [J]. J Clin Med, 2013, 2(4): 220-241.

[15] Rakic P. Neurobiology discriminating migrations [J]. Nature, 1999, 400(6742): 315-316.

[16] Arbab AS. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma [J]. Histol Histopathol, 2012, 27(5): 549-557.

[17] Machein MR, Renninger S, de Lima-Hahn E, et al. Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas [J]. Brain Pathol, 2003, 13(4): 582-597.

(收稿日期: 2014-07-14)

目前,肺癌在全世界的发病率均呈现逐年上升的趋势^[1]。在我国,肺癌已经成为危及群众健康与生命的最大杀手。以往对于肺癌患者的治疗多以化疗为主^[2]。热疗是近年来兴起的一种新型治疗方式,在一些肿瘤患者的临床应用中,已取得了一定的成绩^[3-4]。特别是热疗联合化疗往往起到意想不到的疗效。但目前关于热化联合治疗肿瘤的机制尚不清楚,因此,本研究就 A549 细胞的增殖以及 C-Jun N-末端激酶信号通路、热休克蛋白 70 (HSP70) 的表达水平等情况进行实验观察,试图阐述肿瘤热化疗的临床作用机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料 本实验所用的人肺癌 A549 细胞购于上海细胞生物研究所,化疗药物为紫杉醇(四川太极制药有限公司; H19994040)。噻唑蓝(Sigma 公司),小鼠抗人 HSP70 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 生物技术公司),兔抗人 JNK 抗体和 p-JNK (Thr183PTyr185)抗体(美国 SantaCruz 生物技术公司)。

1.2 研究分组 本研究设立单独热疗组、单独化疗组、热化疗联合组、热化联并 SP600125 组以及对照组。药物使用及剂量如下:①单独热疗组(43℃, 0 μg/L 紫杉醇);②单独化疗组(37℃, 50 μg/L 紫杉醇);③热疗联合组(43℃, 50 μg/L 紫杉醇);④热化联并 SP600125 组(43℃, 50 μg/L 紫杉醇, 50 μmol/L SP600125);⑤对照组(37℃, 0 μg/L 紫杉醇)。

1.3 A549 细胞生长检测 采用噻唑蓝比色法(MTT)进行检测。首先,将指数生长期的 A549 细胞配置成 2.5×10^7 个 PL 细胞悬液,然后将悬液注入 96 孔的培养板中,每个孔中加入 200 LIP,每个组均设立 6 个复孔。24 h 后,将培养板内的悬液倒掉,然后注入不同浓度的紫杉醇培养液,每个孔内 200 μl。注入完毕后,采用水浴法将培养板加热,温度设定为 43℃,时间设置为 40 min,同时设立 37℃ 水浴作为对照组。水浴时间到后,将培养板放置于 5%CO₂ 的培养箱内,温度设定为 37℃。培养 24 h 后,取出培养板,在每个孔中加入 MTT 20 μl,浓度为 5 g/L。常温条件下进行培养 4 h,时间到后,倒掉培养液,在每个孔中加入 150 μl DMSO,同时使用振荡器进行震荡处理,时间为 10 min。利用酶标仪检测细胞生长增殖率。

1.4 蛋白免疫印记法(Western Bolt)检测 收集细胞提取液,分别于电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育后进行蛋白检测。

1.5 统计学方法 应用 SPSS14.0 软件,计量资

料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 A549 细胞增殖率比较 研究发现,单独热疗组、单独化疗组以及热化疗联合组细胞增殖率均明显低于对照组($\chi^2_{\text{单独热疗}} = 6.684, \chi^2_{\text{单独化疗}} = 4.530, \chi^2_{\text{热化疗联合}} = 9.238, P < 0.05$)。热化联合并加入 SP600125 组细胞增殖率与对照组比较,差异无明显的统计学意义($\chi^2_{\text{联合+SP600125}} = 2.741, P > 0.05$)。热化疗联合组细胞增殖率明显低于单独热疗组以及单独化疗组($\chi^2_{\text{单独热疗}} = 3.474, \chi^2_{\text{单独化疗}} = 3.276, P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组 A549 细胞增殖率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	重复次数	增殖率(%)
对照组	6	3	56.46±8.56
单独热疗组	6	3	27.92±6.01 ^a
单独化疗组	6	3	31.59±10.37 ^a
热化疗联合组	6	3	14.90±6.94 ^{abc}
热化联合并加入 SP600125 组	6	3	45.34±5.05

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与单独热疗组比较,^b $P < 0.05$;与单独化疗组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.2 各组 HSP70 表达水平比较 实验检测显示,单独热疗组以及热化联合组 HSP70 表达明显高于对照组($P < 0.05$),热化联合组 HSP70 表达明显低于单独热疗组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组 HSP70 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	HSP70 水平
对照组	3	3.66±1.46
单独热疗组	3	8.84±2.37 ^a
单独化疗组	3	1.29±0.82
热化联合组	3	6.53±2.42 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与单独热疗组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组 JNK 磷酸化水平比较 实验检测提示,除对照组外,其他各组 JNK 水平表达之间的差异均无统计学意义($P > 0.05$);而在热化联合干预下,p-JNK 表达水平出现上升,与对照组、单独热疗组和单独化疗组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);热化联合并 SP600125 组的 p-JNK 的表达水平较热化联合组显著下降($P < 0.05$)。

表 3 各组 JNK 磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	JNK 磷酸化水平
对照组	3	80.25±5.42 ^b
单独热疗组	3	91.89±2.31 ^{ab}
单独化疗组	3	92.21±1.55 ^{ab}
热化联合组	3	118.99±2.47 ^{ab}
热化联合并 SP600125 组	3	90.12±2.25 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与热化联合组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前,临床上用于治疗肿瘤的方式方法众多,比较常见的有手术、药物化疗、放射疗法以及生物疗法等^[5-6]。随着医疗技术的发展,热疗已广泛应用于临床各类肿瘤的治疗当中,取得了较好的临床疗效,并认为是属于上述4种疗法之后的第5种肿瘤治疗方法^[7]。本研究通过肺癌A549细胞,观察了热疗联合对细胞的增殖率抑制的影响。结果发现,热疗联合干预A549细胞,能够明显治愈肿瘤细胞的生长。而且细胞增殖的抑制率明显高于单独化疗组。该结果表明,43℃条件下,化疗药物紫杉醇的敏感性会增强。此前,有研究表明^[8],紫杉醇在43℃缓解下可以诱导肿瘤细胞中ROS水平的上升,加快肿瘤细胞的凋亡,从而达到临床治疗肿瘤的作用。还有一些研究表明^[9-11],临床上对于一些肿瘤的治疗,可以适当进行微波加热,可以起到增强化疗药物敏感性的效果。

JNK属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中重要的组成成员,其构成中的Thr183以及Tyr185两个位点在正常情况下处于休眠状态,当出现细胞应激反应,Thr183以及Tyr185可以形成p-Thr183、p-Tyr185。目前的研究认为,p-JNK可以明显抑制细胞的生长以及增殖,同时促进细胞发生凋亡^[12-13]。本研究显示,JNK信号通路在加热后能够被激活。研究结果显示,热化联合干预A549细胞后,虽然总JNK未见明显的表达,但其p-JNK蛋白出现了现在的上升,而且上升程度显著高于单独热疗以及单独化疗组。此外,研究结果显示,热化疗加入SP600125后,A549细胞的增殖率明显高于对照组,提示SP600125能够较大程度上对JNK抑制A549细胞生长的发生起到作用,提示热疗联合对A549细胞的生长抑制作用可能是通过JNK信号通路而产生的。

HSP70蛋白家族属于HSPs中最为保守以及最为主要的一类蛋白^[14],目前的实验研究表明^[15],HSP70拥有分子伴侣样的作用。实验研究证明,HSP70可以通过抑制多种凋亡通路来起到抑制细胞凋亡的效果。因此,HSP70对于细胞的生长以及增殖起到显著的保护作用。本研究显示,HSP70在单独热疗组的表达要明显高于热化联合组,这提示热化联合干预后的协同效果对抗了HSP70对肿瘤细胞的保护作用,比单独热疗更能抑制肿瘤细胞的生长。但是,本研究进行的实验尚处于初步,还不能说明此种协同作用是通过哪种途径来发挥作用,这还有待于进一步研究的深入来揭示。

综上所述,热化联合抑制A549细胞增殖的效果

优于单独热疗或单独化疗,作用机制可能与激活JNK信号通路或抑制HSP70表达有关。

参考文献

- [1] 万琴. 培美曲塞二钠治疗非小细胞肺癌的研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(12): 1231-1233.
- [2] Saccomandi P, Schena E, Caponero MA, et al. Theoretical analysis and experimental evaluation of laser-Induced interstitial thermotherapy in ex vivo porcine pancreas [J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2012, 59(10): 2958-2964.
- [3] 刘新奎, 王琳, 张明智, 等. 热化疗对Raji细胞生长、JNK通路及热休克蛋白70表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(3): 372-375.
- [4] Galldiks N, von Tempelhoff W, Kahraman D, et al. C-Methionine positron emission tomographic imaging of biologic activity of a recurrent glioblastoma treated with stereotaxy-guided laser-Induced interstitial thermotherapy [J]. Molecular Imaging, 2012, 11(4): 265-271.
- [5] 王琳, 刘新奎, 吴拥军, 等. 活性氧在热化疗抑制人肺肿瘤细胞生长中的作用[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(24): 4473-4475.
- [6] Cattini S, Rovati L. A novel method for noninvasive monitoring of ocular fundus status during transpupillary thermotherapy treatment [J]. IEEE Sensors Journal, 2012, 12(3): 617-626.
- [7] 毕德利, 王亚旭, 舒宁波, 等. BMP-2联合温热化疗对SW480中GDF15和TFF3表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(9): 775-778.
- [8] Shuhendler AJ, Staruch R, Oakden W, et al. Thermally-triggered 'off-on-off' response of gadolinium-hydrogel-lipid hybrid nanoparticles defines a customizable temperature window for non-invasive magnetic resonance imaging thermometry [J]. Journal of Controlled Release, 2012, 157(3): 478-484.
- [9] 祝鑫海, 王永清, 姜志明, 等. β -榄香烯联合热化疗对肺腺癌患者A549细胞系中蛋白表达的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2011, 30(11): 962-964.
- [10] 王梅. 热疗联合TP方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床分析[J]. 海南医学, 2010, 21(19): 35-37.
- [11] Huang SC, Chang YY, Chao YJ, et al. Dual-row needle arrays under an electromagnetic thermotherapy system for bloodless liver resection surgery [J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2012, 59(3): 824-831.
- [12] 王琳, 吴拥军, 刘新奎, 等. 热化疗联合作用抑制人小细胞肺癌细胞增殖的机制[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(1): 1-4.
- [13] 王琳, 徐春燕, 刘新奎, 等. 热化疗对H446细胞增殖的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(3): 375-378.
- [14] Hong C, Kang J, Kim H, et al. Photothermal Properties of inorganic nanomaterials as therapeutic agents for cancer thermotherapy [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2012, 12(5): 4352-4355.
- [15] 孙胜杰, 吴志勇, 焦顺昌, 等. 热疗增强长春瑞滨对人肺癌PLA-801D细胞株毒性的实验研究[J]. 中国药物应用与监测, 2012, 9(2): 87-91.

(收稿日期:2014-06-10)