

文章编号:1005-6947(2007)04-0346-04

· 基础研究 ·

# 抑制热休克蛋白 70 表达对 Eca-109 细胞生长的影响

王文祥<sup>1</sup>, 陈胜喜<sup>1</sup>, 王金胜<sup>2</sup>, 王宽松<sup>2</sup>, 肖高明<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅医院 胸外科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院 病理学系, 湖南 长沙 410078)

**摘要:**目的 观察热休克蛋白 70 (HSP 70) 反义寡核苷酸阻断食管癌 Eca-109 细胞的 HSP 70 表达及对细胞增殖和凋亡的影响。方法 应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western blot 技术检测 HSP 70 反义寡核苷酸 (10 μmol/L) 转染 Eca-109 细胞后, 其 HSP 70 基因 mRNA 和蛋白表达的变化。观察 HSP 70 反义寡核苷酸转染对肿瘤细胞的生长抑制效应及转染后细胞凋亡率和细胞周期分布的改变。结果 HSP 70 反义寡核苷酸可阻断 Eca-109 细胞 HSP 70 mRNA 和蛋白的表达; 转染后 48 h 和 72 h, 生长抑制率分别为 25.5% 和 35.4%; HSP 70 反义寡核苷酸组细胞凋亡率明显高于 HSP 70 正义寡核苷酸组和未转染组 ( $P < 0.05$ )。结论 HSP 70 反义寡核苷酸能抑制 Eca-109 细胞的生长并诱导其发生凋亡。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(4): 346-349]

**关键词:** 食管癌; 热休克蛋白 70; 反义寡核苷酸; 凋亡

**中图分类号:** R735.1

**文献标识码:** A

## Study on the effects of heat shock protein 70 antisense oligonucleotide on cell growth of Eca-109

WANG Wen-xiang<sup>1</sup>, CHEN Sheng-xi<sup>1</sup>, WANG Jin-sheng<sup>2</sup>, WANG Kuan-song<sup>2</sup>, XIAO Gao-ming<sup>2</sup>

(1. Department of Chest Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Pathology, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of HSP 70 in the proliferation and apoptosis of esophageal cancer cell line Eca-109 by inhibiting HSP 70 expression with HSP 70 antisense oligonucleotides.

**Methods** After Eca-109 cells were transfected with HSP 70 antisense oligonucleotides, analysis of HSP70 mRNA and protein expression by RT-PCR and western blotting were made respectively, the proliferation, induction of apoptosis and cell cycle were detected. **Results** After transfection with HSP 70 antisense oligonucleotides, the expression of HSP 70 was partially blocked, the proliferation of Eca-109 cells was apparently inhibited, and its inhibitory rate was increased to 25.5% at 48h and 35.4% at 72h respectively. Apoptosis rate induced by HSP 70 antisense oligonucleotides was obviously higher than that by HSP 70 sense oligonucleotides or untransfected group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** HSP 70 antisense oligonucleotides could not only inhibit the proliferation, but also induce the apoptosis of Eca-109 cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4): 346-349]

**Key words:** Esophageal Carcinoma; Heat Shock Protein 70; Antisense Oligonucleotides; Apoptosis

**CLC number:** R735.1

**Document code:** A

在 HSP 家族中, HSP 70 被认为是保护哺乳类动物细胞免受损害的最重要的应急蛋白, 它与肿

瘤的发生、发展和预后等密切相关。在消化道恶性肿瘤中 HSP 70 常常高表达<sup>[1-3]</sup>。为此, 笔者利用 HSP 70 反义寡核苷酸转染食管癌 Eca-109 细胞, 阻断 HSP 70 的表达, 以探讨 HSP 70 对食管癌细胞生长的影响, 以利于进一步探讨以 HSP 70 为靶治疗食管癌的可能性。

收稿日期: 2007-01-25; 修订日期: 2007-03-27。

**作者简介:** 王文祥, 男, 湖南石门人, 中南大学湘雅医院博士研究生 (湖南省肿瘤医院副主任医师), 主要从事胸部肿瘤方面的研究。

**通讯作者:** 陈胜喜 E-mail: Daowangwenxiang@yahoo.com.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Eca-109细胞株购自中科院上海生物细胞研究所细胞库。HSP 70反义寡核苷酸和正义寡核苷酸参考文献<sup>[4]</sup>,反义寡核苷酸链5'-CGCGGCTTTG-GCCAT-3',正义寡核苷酸链5'-ATGGCCAAAGC-CGCG-3',行全程硫代磷酸化法修饰。HSP 70引物参考文献<sup>[5]</sup>自行设计,上游5'-TTTGACAACAG-GCTGCTGAACC-3',下游5'-GTGAAGATCTGC GTCT-GCTTGG-3',扩增片段为590bp。 $\beta$ -actin引物用Primer Premier5.0,上游5'-AGTTGCGTTACAC-CCTTCTTG-3',下游5'-TCACCTTCACCGTTC-CAGTTT-3',扩增片段为150bp,由上海生工生物公司合成。脂质体lipofectin2000、Trizol购自Invitrogen公司,RPMI 1640购自Gibco公司,超级新生牛血清为杭州四季青生物公司产品,噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司,RT-PCR试剂盒、Taq Plus DNA聚合酶均为Fermentas公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Eca-109细胞用含8%小牛血清的RPMI 1640培养基,37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养。实验用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 HSP 70 寡核苷酸的转染 转染前1d,接种Eca-109细胞至96孔板中( $5 \times 10^3$ 个/孔)或50mL培养瓶中( $5 \times 10^5$ 个/瓶)贴壁培养18h,无血清培养基洗涤细胞2次,转染按脂质体lipofectin2000说明书进行,寡核苷酸和lipofectin的终浓度分别为10 $\mu$ M和10 $\mu$ g/mL;实验共分3组,即HSP 70反义寡核苷酸组、正义寡核苷酸组和未转染组。转染6h后,弃转染液。无血清培养基洗涤细胞2次,各组细胞换用正常培养液继续培养24,48,72h。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 细胞于转染后,在换正常培养液继续培养至24h时,按Trizol说明书提取细胞总RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的提取质量,并测其浓度。取1 $\mu$ g总RNA按逆转录试剂盒说明书合成cDNA第一链。再取1 $\mu$ L cDNA进行PCR扩增,PCR反应条件:95℃预变性5min,94℃变性50s,58℃退火50s,72℃延伸50s,进行35个循环后再72℃延伸10min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外

分析仪上观察、照相,并采用凝胶图像处理软件ImageTool(IT)3.0测量灰度值,计算mRNA表达的相对值。计算方法为:mRNA表达的相对值=目的基因条带灰度值/ $\beta$ -actin基因条带灰度值。

1.2.4 Western blot 细胞于转染后,在换正常培养液继续培养至48h时,提取细胞总蛋白。BCA试剂盒(Pierce公司)测定其浓度,以80 $\mu$ g量上样于10%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,4h后转膜(电压15伏,45min),丽春红染色观察带型。蒸馏水洗,5%的脱脂奶粉室温封闭2h,HSP 70一抗(1:200)室温孵育2h,4℃过夜,Tris缓冲盐吐温溶液(TBST)洗,以辣根过氧化物酶标记的二抗1:2000室温孵育2h,TBST洗,DAB显色,灰度扫描。结果以 $\beta$ -actin杂交条带的灰度值作内对照进行校正,分别计算出各样本的蛋白质相对表达量。

1.2.5 MTT法检测细胞的增殖速度 细胞于转染后,在换正常培养液继续培养至24,48h及72h时,每孔滴加MTT溶液(5mg/mL)20 $\mu$ L,继续孵育4h后,吸弃每孔内的培养上清液。每孔滴加DMSO 150 $\mu$ L,轻轻振荡10min,使结晶充分溶解。用酶标仪(490nm波长),测定各孔的吸光度值(A值)。以时间为横轴,A值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.6 流式细胞术分析细胞周期和凋亡百分率 细胞经转染后,在换正常培养液继续培养至72h时,以0.25%胰酶对单层细胞进行消化并收集细胞,PBS洗涤细胞2次,70%的乙醇4℃固定。行流式细胞术分析细胞群体的周期分布和凋亡百分率。

### 1.3 统计学分析

应用SPSS 11.0统计软件进行统计分析。多组间均数比较,采用单向方差分析(One-way ANOVA);各实验组与对照组的比较采用最小显著差值法(LSD),以 $P < 0.05$ 确定差异具有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 HSP 70反义寡核苷酸转染抑制HSP 70 mRNA的表达

RT-PCR分析发现HSP 70反义寡核苷酸转染Eca-109细胞24h后,HSP 70 mRNA表达明显降低( $P < 0.05$ )(图1),表明HSP 70反义寡核苷酸转染能显著抑制HSP 70 mRNA的表达。

## 2.2 HSP 70 反义寡核苷酸转染抑制 HSP 70 蛋白的表达

Western blot 分析发现 HSP 70 反义寡核苷酸转

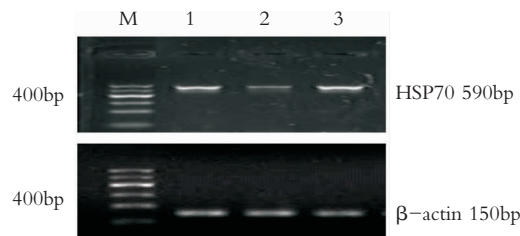


图1 HSP 70 反义寡核苷酸转染 Eca-109 细胞 24h 后 RT-PCR 分析 HSP 70 mRNA 的表达 M:marker; 1: HSP 70 正义寡核苷酸组; 2: 反义寡核苷酸组; 3: 未转染组

## 2.3 HSP 70 反义寡核苷酸转染对 Eca-109 细胞生长的影响

在 HSP 70 反义寡核苷酸 ( $10\mu\text{mol/L}$ ) 处理 Eca-109 细胞 24h 后,细胞生长即表现出一定程度的抑制,在处理 48h 和 72h 时,生长抑制率分别为 25.5% 和 35.4%,与未转染组和正义寡核苷酸组之间存在明显差异 ( $P < 0.05$ ),而正义组与未转染组之间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

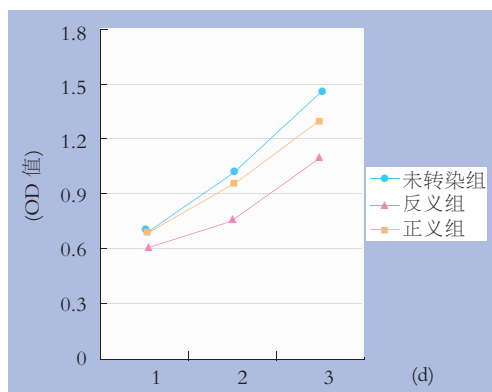


图3 HSP 70 反义寡核苷酸转染对 Eca-109 细胞生长的影响

## 2.4 HSP 70 反义寡核苷酸转染对 Eca-109 细胞凋亡的影响

HSP 70 反义寡核苷酸转染细胞 72h 后,流式细胞术分析结果显示,反义组与未转染组和正义组相比,细胞的凋亡率增加,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表1 HSP 70 反义寡核苷酸转染 72h 后对 Eca-109 细胞凋亡的影响

	HSP 70 反义组	HSP 70 正义组	未转染组
凋亡率 (%)	$1.66 \pm 0.07$	$0.76 \pm 0.11^\dagger$	$0.88 \pm 0.061^\dagger$

注:† 与反义组相比,  $P < 0.05$

染 Eca-109 细胞 48h 后, HSP 70 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ) (图 2), 表明 HSP 70 反义寡核苷酸转染能显著抑制 HSP 70 蛋白的表达。

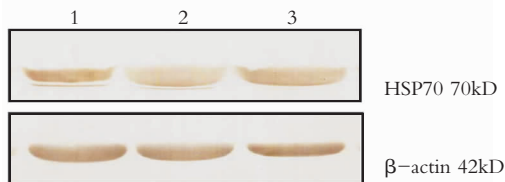


图2 HSP 70 反义寡核苷酸转染 Eca-109 细胞 48h 后 Western blot 分析 HSP 70 蛋白的表达 1: HSP 70 正义寡核苷酸组; 2: 反义寡核苷酸组; 3: 未转染组

## 2.5 HSP 70 反义寡核苷酸转染对 Eca-109 细胞生长周期的影响

HSP 70 反义寡核苷酸转染细胞 72h 后,流式细胞术分析发现,与 HSP 70 正义寡核苷酸组及未转染组相比, HSP 70 反义寡核苷酸组  $G_0/G_1$  期细胞百分比增加, S 期细胞百分比减少, 而  $G_2/M$  细胞百分比无明显改变。显示 HSP 70 反义寡核苷酸转染可以将食管癌细胞 Eca-109 阻滞于  $G_0/G_1$ 。以增殖指数 (Proliferation Index, PI) 表示细胞的增殖活性, 计算公式为:  $PI(\%) = (S + G_2M) / (G_0/G_1 + S + G_2M) \times 100\%$ 。反义组食管癌细胞的增殖指数小于其它 2 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表2 HSP 70 反义寡核苷酸转染 72h 后对 Eca-109 细胞周期的影响

	HSP 70 反义寡核苷酸组	HSP 70 正义寡核苷酸组	未转染组
$G_0/G_1(\%)$	$49.8 \pm 0.82$	$44.4 \pm 0.71^\dagger$	$42.3 \pm 0.64^\dagger$
S (%)	$29.2 \pm 0.42$	$36.9 \pm 0.44^\dagger$	$36.2 \pm 0.98^\dagger$
$G_2/M(\%)$	$21.0 \pm 0.79$	$18.7 \pm 0.65$	$21.4 \pm 1.10$
PI (%)	$50.2 \pm 0.88$	$55.6 \pm 0.85^\dagger$	$57.7 \pm 0.64^\dagger$

注:† 与反义组相比,  $P < 0.05$

## 3 讨论

肿瘤的发生是一个多因素、多步骤的过程,最突出的表现是肿瘤细胞具有无限增殖的能力,肿瘤细胞的不断增殖需要大量的热休克蛋白 (HSP) 作为“分子伴侣”来调节和稳定这一异常增殖过程。在 HSP 家族中, HSP 70 被认为是保护哺乳类动物细胞免受损害的最重要的应急蛋白,许多恶性肿瘤中 HSP 70 常常高表达,并且在体内许多不利于肿瘤生长的环境中,具有保护肿瘤

细胞的作用,严重影响抗肿瘤治疗的效果<sup>[1-3]</sup>。

本研究通过把 HSP 70 反义寡核苷酸导入人食管癌 Eca-109 细胞,经 RT-PCR 及 WesternBlot 证实,HSP 70 反义寡核苷酸在 mRNA 和蛋白水平均可显著抑制 HSP 70 基因的表达。另外,转染 HSP 70 反义寡核苷酸的 Eca-109 细胞比正义组和未转染组的细胞生长受到明显抑制。细胞周期分析发现,HSP 70 反义寡核苷酸组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞含量较 HSP 70 正义组和未转染组增加,增殖指数 (PI)降低,提示细胞出现了 G<sub>1</sub> 期阻滞,出现该现象的原因可能是由于 HSP 70 的表达与细胞增殖过程中进入 S 期有关,HSP 70 反义寡核苷酸通过下调 HSP 70 的表达,使细胞不能进入 S 期,造成 G<sub>1</sub> 期阻滞。从而抑制了肿瘤细胞的增殖。本研究还发现阻断 HSP 70 的表达后,Eca-109 细胞的凋亡率增加。可能与 HSP 70 反义寡核苷酸对 Eca-109 的生长抑制效应主要是由于其抑制 HSP 70 的表达,而 HSP 70 表达水平的降低导致细胞发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞和凋亡增加有关。同样,在其它肿瘤的研究中也证实 HSP 70 反义寡核苷酸对肿瘤细胞具有生长抑制效应<sup>[6-10]</sup>。

目前,关于 HSP 参与抗凋亡的机制尚未完全阐明,可能通过以下几方面的作用而实现<sup>[11-15]</sup>:

(1) HSP 70 可以修复线粒体内变性蛋白、防止其被降解,还可直接抑制自杀激活因子,如细胞色素 c 的释放;(2) HSP 70 能抑制应激激活蛋白激酶或 c-JunN-ter-minal 激酶 (SAPK-JNKs) 的上游、下游激活途径,从而抑制凋亡发生;(3) HSP 70 可与凋亡蛋白水解酶激活因子 -1 (Apaf-1) 单体的 caspase 结合域 (CARD) 结合,防止 Apaf-1 寡聚体形成以及随后的 caspase-9 前体的募集和活化;(4) HSP 70 能抑制野生型 P53 等凋亡激活基因表达,并防止其介导的 Bax 基因转录激活而明显减少 Bax 表达上调;(5) HSP 70 表达可抑制细胞内氧自由基生成,增加还原型谷胱甘肽含量,可能与抗凋亡作用有关。

总之,HSP 70 作为“分子伴侣”在食管癌细胞的增生、存活和凋亡过程中起重要作用。HSP 70 反义寡核苷酸通过诱导肿瘤细胞发生细胞周期阻滞和凋亡而抑制了食管癌细胞 Eca-109 的生长。因此,HSP 70 反义寡核苷酸可能为食管癌的治疗提供新的途径。

#### 参考文献:

- [1] Nakajima M, Kuwano H, Miyazaki T, *et al.* Significant correlation between expression of heat shock proteins 27, 70 and lymphocyte infiltration in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2002, 178(1): 99 - 106.
- [2] 裴海平,朱红,曾亮,等. 应用二维电泳和质谱技术筛选大肠癌与正常肠组织的差异表达蛋白[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(10): 748 - 752.
- [3] Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Dadaris PS, *et al.* Heat shock protein 70 and HLA-DR molecular tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 1995, 38(11): 739 - 742.
- [4] Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp 70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp 70 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(19): 6455 - 6459.
- [5] Targosz A, Pierzchalski P, Krawiec A, *et al.* Helicobacter pylori inhibits expression of heat shock protein 70 (HSP 70) in human epithelial cell line. Importance of Cag A protein [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57(2): 265 - 278.
- [6] Kaur J, Kaur J, Ralhan R. Induction of apoptosis by abrogation of HSP 70 expression in human oral cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2000, 85: 1 - 5.
- [7] Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 1996, 223(1): 163 - 170.
- [8] Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, *et al.* Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1995, 40(2): 73 - 78.
- [9] Liou SN, Ding XZ, Kiang JG, *et al.* Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells [J]. *J Immunol*, 1997, 158(12): 5668 - 5675.
- [10] Zhao ZG, Shen WL. Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901 [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(1): 73 - 78.
- [11] Tournier C, Hess P, Yang DD, *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c mediated death pathway [J]. *Science*, 2000, 288(5467): 870 - 874.
- [12] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, *et al.* Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp 70 [J]. *Nature Cell Biol*, 2000(2): 476 - 483.
- [13] Gordon SA, Hoffman RA, Simmons, *et al.* Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis [J]. *Arch Surg*, 1997, 132(12): 1277 - 1282.
- [14] Wong HR, M annix RJ, Rusnak JM, *et al.* The heat shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 15(6): 745 - 751.
- [15] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1309 - 1312.