

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.001

· 基础研究 ·

NDRG2 在热应激抗肝癌细胞侵袭中的作用和分子机制研究*

郭燕¹ 侯玉² 马骥¹ 王倩荣¹ 刘文超^{1△}

(1 第四军医大学西京医院肿瘤科 陕西 西安 710032; 2 济南军区第 150 中心医院口腔科 河南 洛阳 471031)

摘要 目的:探讨 NDRG2 在热疗诱导的热应激抗肝癌细胞侵袭中所发挥的作用和机制研究。**方法:**构建 NDRG2 过表达和干扰表达的 HepG-2 细胞稳转细胞株,通过 Transwell 和 Western-blot 方法检测了和细胞侵袭力和细胞内 NDRG2、MMP-2 和 MMP-9 的表达量变化;构建荷瘤鼠模型,通过 HE 染色及免疫组化方法检测并对比了热对肿瘤细胞向周围肌肉组织的侵袭抑制作用。**结果:**给予 NDRG2 过表达的 HepG-2 细胞 45 °C、30min 热处理后,细胞内 NDRG2 的表达明显增高,同时伴随细胞侵袭力、MMP-2 和 MMP-9 的表达明显降低(P<0.05)。与对照组相比,45 °C 的局部热作用能有效抑制肿瘤细胞对周围肌肉组织的侵袭,而干扰细胞内 NDRG2 的表达则降低了热对肿瘤细胞侵袭的抑制。对其机制的研究中发现,给予对照和 NDRG2 过表达的 HepG-2 细胞 45 °C, 30min 热刺激后,HSP70 在热后 6h 表达量开始升高,而在两个组之间没有显著差异;对照组的 HepG-2 细胞在给予热处理后 ERK1/2 的磷酸化水平降低;NDRG2 的过表达不仅降低了细胞中 ERK1/2 的本底水平,还降低了热作用早期对 ERK1/2 的诱导;进一步分别应用 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK 三个激酶的抑制剂作用于 NDRG2 被敲除的 HepG-2 细胞,经过热处理后 ERK1/2 抑制剂组可以明显抑制 HepG-2 细胞的侵袭。**结论:**热应激所诱导 NDRG2 的表达量与肝癌细胞的侵袭力呈现一种负相关性;在热应激抗肝癌细胞侵袭的作用中,是通过影响 NDRG2-ERK1/2 通路而实现的。

关键词:热应激;NDRG2;肝癌;侵袭;分子机制

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2801-07

Function and Mechanism of NDRG2 in Heat stress Retards Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells*

GUO Yan¹, HOU Yu², MA Ji¹, WANG Qian-rong¹, LIU Wen-chao^{1△}

(1 Department of Oncology, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Stomatology, 12th Military Hospital, Luoyang, Henan, 471031, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the function and mechanism of NDRG2 in hyperthermia (HT) induced heat stress retards invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** We established the stable cell lines with NDRG2 overexpression or NDRG2 knockdown. Matrigel invasion assay and Western-blot were performed to evaluate the effect of heat stress on invasion of cells. We further established mouse xenograft model. H&E and immunohistochemical staining examined the anti-invasion potential. **Results:** In NDRG2 over expressing cells, HT at 45 °C reduced the invasive potential significantly, compared with HepG-2 cells treated by HT alone. We next detected the expression of MMP-2 and MMP-9. Western-blot revealed that expression of MMP-2 and MMP-9 decreased in NDRG2 overexpressing HepG-2 cells and even lower after the cells were treated by HT. Malignant tumors slightly invaded into nearby tissues in HT treated mouse model. In contrast, suppression of NDRG2 facilitate invasion of tumor nodules and reversed anti-invasive effect of HT in HepG-2 cells with significant destruction of the muscle layer as well as alleviated the repression of MMP-2 and MMP-9 expression by HT. To elucidate the molecular mechanism of NDRG2 mediated the anti-invasion effect of HT. We examined the expression of HSPs and MAPKs in HepG2 cells of control and overexpression of NDRG2 at different time points after cells were subjected to HT at 45 °C for 30 min. HSP70 expression was induced at 6h and kept at high levels after HT. However, the expression pattern of HSP70 was the same between these two groups. The phosphorylation of ERK1/2 declined after heat treatment. Moreover, overexpression of NDRG2 abrogated the intrinsic and HT induced activation of ERK1/2 pathway. The ERK1/2 inhibitor (PD98059) treatment could significantly enhance the anti-invasive effect of HT. **Conclusions:** The expression of NDRG2 and cell invasion ability are negative correlation. In addition, NDRG2 mediates the anti-invasion effect of hyperthermia via inhibition of the ERK1/2 signaling pathway.

Key words: Hyperthermia; NDRG2; Hepatocellular carcinoma; Invasion; Mechanism

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)15-2801-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30973437)

作者简介:郭燕(1981-),女,博士,医师,主要研究方向:肿瘤的分子靶向治疗,电话 15829580661,E-mail:gyfmmu@163.com

△通讯作者:刘文超,E-mail Liuwc@yahoo.cn

(收稿日期:2013-12-08 接受日期:2013-12-30)

前言

原发性肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,肝癌的转移是导致肝癌病人死亡的重要因素。传统的手术治疗,放疗,化疗,生物治疗或这些疗法间的相互结合均对发生转移后的肿瘤治疗效果都不甚理想。热疗正逐渐成为恶性肿瘤综合治疗中的一种常规治疗手段。大量的临床、动物和基础实验证明,热疗可干涉肿瘤转移的多个环节抑制肿瘤转移。肿瘤的转移是个复杂的多环节、多步骤的连续过程。其中侵袭是贯穿肿瘤转移全过程的重要步骤。NDRG2 属于 NDRG 家族,许多研究表明它作为一种抑癌基因,参与肿瘤的发生、发展与转归;另外还参与到了多种应激反应中。

那么,NDRG2 是否在热应激抗肝癌细胞侵袭中发挥作用;我们能否从 NDRG2 入手去调控热疗抗肝癌细胞侵袭的信号通路。带着这样的疑问,我们分别在体内、外的试验中通过人为的去改变细胞内 NDRG2 的蛋白表达水平,证实了 NDRG2 在热应激抗肝癌细胞侵袭中所发挥的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株及动物

人肝癌细胞系 HepG-2 和 Huh-7 均购自中科院上海细胞库。细胞以单层细胞贴壁的生长方式培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 恒温孵育箱,每 1-2 天换液一次。nu/nu 裸鼠,雄性,4-6 周龄,体重 15-20 g,由第四军医大学实验动物中心提供。所有动物实验均参照我国《实验动物管理条例》中有关动物福利的条规进行饲养。

1.2 主要试剂

Matrigel 胶为美国 B&D 公司产品,Transwell 8 μm 孔径侵袭小室为美国 Milipore 公司产品,NDRG2 鼠单抗为台湾 Abnova 公司产品,Tubulin、MMP-2、MMP-9 鼠单抗为武汉博士德生物公司产品,BCA 蛋白定量试剂盒为美国 Thermo Scientific 公司产品,NC 膜为美国 Milipore 公司产品,HRP 标记二抗为美国 Sigma-Aldrich 公司产品,SP-9000 免疫组化染色试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒为北京中杉公司产品。

1.3 方法

1.3.1 NDRG2 过表达与干涉表达的稳转细胞系建立 将细胞密度约 1×10^6 /mL 的 HepG-2 肝癌细胞种至 6 孔板中;24 h 后当种植的细胞密度融合至 70% 左右,向培养皿中加入包装好的 NDRG2 过表达、干涉表达及其相关对照的 Cherry 和 Scramble 慢病毒;在加入病毒的 48 h 后,再向各培养皿中分别加入相应浓度的 Puromycin 或 Blasticidin;镜下观察细胞的生长情况,每隔 3-4 天给细胞换一次含有 Puromycin 或 Blasticidin 的新培养液;筛选 4 周,那些未感染病毒的 HepG-2 细胞将被 Puromycin 或 Blasticidin 全部杀死,而存活的细胞将继续保持扩增,并将多余细胞冻存。

1.3.2 细胞侵袭实验 将对照组和各实验组经撤血清饥饿的细胞常规消化后,离心后收集细胞,PBS 漂洗后将细胞密度稀释到 1×10^5 /mL,这时使用不含 FBS 的培养基重悬细胞,取约 200 μL 的细胞悬液接种于包被了 Matrigel 胶的 Transwell 小室中;而在 24 孔板内即 Transwell 小室外加入约 500 μL 含 10%

FBS 的 DMEM 培养基;继续培养 24 h 后,吸出孔中的培养基,用干棉签拭去 Transwell 小室内层中的细胞,100%乙醇固定 20 min,结晶紫染色 20 min 后在倒置显微镜下拍照,计数侵袭的细胞数,每个样本随机抽 5 个视野,每组细胞设 3 个平行孔,计算平均数。

1.3.3 Western-blot 方法 将对照组和各实验组细胞收集到 EP 管内,加入 100-150 μL 的细胞裂解液,低温离心机离心 (12000 rpm,4℃),20 min 后提取蛋白上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度;将每个样品调整为相同浓度后,各取样 20 μL,12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h,再分别加入兔抗人的 Tubulin、NDRG2、MMP-2 和 MMP-9 单克隆抗体,4℃ 孵育过夜,荧光二抗孵育膜 1 h 后,使用 Odyssey 双色红外激光成像系统,扫描图像,分析结果。

1.3.4 裸鼠皮下移植瘤的建立 收集分别稳转了 Scramble 和 shNDRG2 慢病毒的处于对数生长期的 HepG-2 细胞,胰酶消化,重悬于 $1 \times$ PBS 中;将细胞浓度调整至 5×10^6 /mL,接种细胞至 5 周龄裸鼠的后肢皮下,0.2 mL/只。接种后 1 周左右,成瘤率达到 100%。观察肿瘤生长情况。

1.3.5 裸鼠皮下移植瘤的局部加热 肿瘤移植后 2 周,将热治疗组的裸鼠的瘤子局部给予 45℃、30 min 水浴加热;在水浴加热时,需用电子温度检测仪对移植瘤和裸鼠直肠内部温度进行检测。在肿瘤细胞皮下种植 4 周后,处死裸鼠,取出原发肿瘤并进行病理组织学检查。

1.3.6 免疫组织化学染色 石蜡切片常规脱蜡至水,采用枸橼酸缓冲液(0.01 mol/L,pH 6.0)高压锅抗原热修复,加 3% H₂O₂ 室温避光孵育 30 min,PBS 缓冲液洗 5 min \times 3 次。检测采用 SP 法。用 10% 正常非免疫羊血清 37℃ 孵育 30 min,滴加一抗(NDRG2,1:400;MMP-2 和 MMP-9,1:200)4℃ 冰箱中过夜,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。滴加二抗工作液,37℃ 孵育 60 min,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃ 孵育 60 min,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。DAB 显色、镜下控制反应时间;苏木素复染,75%-100% 梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每只小鼠取 1 张切片观察。

1.3.7 统计学分析 以上结果使用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$)进行分析,组间两两比较使用 t 检验,与对照组相比,P<0.05 表示差异显著,P<0.01 表示差异非常显著。

2 结果

2.1 构建 NDRG2 过表达和干涉表达的 HepG-2 细胞稳转细胞系

我们构建了 NDRG2 过表达和干涉表达的慢病毒载体,包装慢病毒,进行病毒滴度测定,感染肝癌 HepG-2 细胞后,利用载体携带的筛选标记进行稳定细胞株的筛选,最后经 Western-blot 方法鉴定了稳转后 NDRG2 蛋白在细胞中的表达,如图 1 所示。通过人为的方式去改变了 HepG-2 细胞内 NDRG2 蛋白的表达水平。

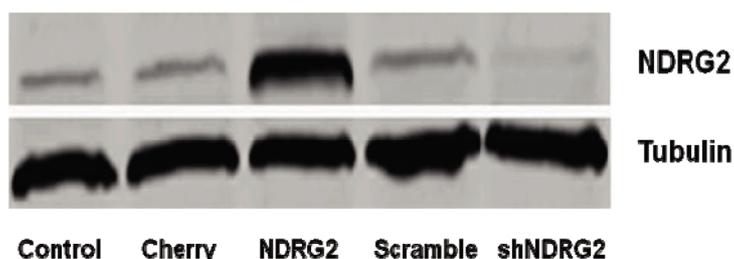


图 1 Western-blot 对稳转细胞内 NDRG2 蛋白表达的鉴定

Fig.1 Expression level of NDRG2 was determined by Western-blot in the stable cell lines

2.2 热对 NDRG2 过表达的 HepG-2 细胞侵袭力的影响

接下来我们应用 Transwell 方法和 Western-blot 方法检测了对照组 (Cherry-37 °C)、单热处理组 (Cherry-45 °C)、NDRG2 过表达组 (NDRG2-37 °C) 和 NDRG2 过表达联合热处理组 (NDRG2-45 °C) 之间细胞侵袭力、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达情况。如图 2-1 和图 2-2 研究结果发现:单热处理组和 NDRG2

过表达组较对照组 (Cherry-37 °C) 的肝癌细胞侵袭能力和 MMP-2/MMP-9 表达水平均发生显著性降低 (P<0.05); 然而 NDRG2-45 °C 组的肝癌细胞侵袭力、MMP-2 和 MMP-9 的表达不仅相比对照组显著降低 (P<0.01), 而且相比单热处理组、NDRG2 过表达组也表现出明显的降低趋势 (P<0.05)。

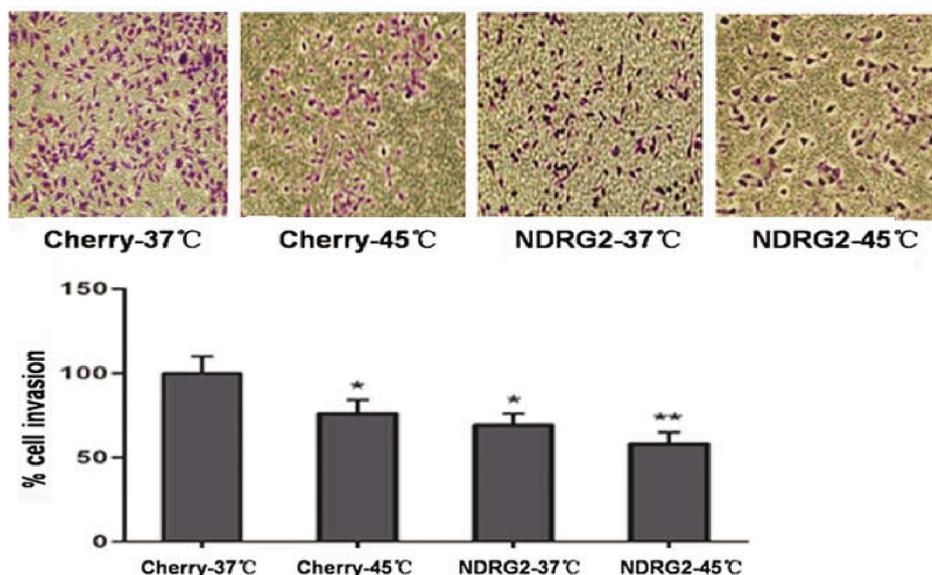


图 2-1 Transwell 实验检测不同处理组间体外细胞侵袭力改变 (*P<0.05 vs Cherry-37 °C, **P<0.01 vs Cherry-37 °C)

Fig.2-1 Invasive effect was determined by Transwell assay in different groups (*P<0.05 vs Cherry-37 °C, **P<0.01 vs Cherry-37 °C)

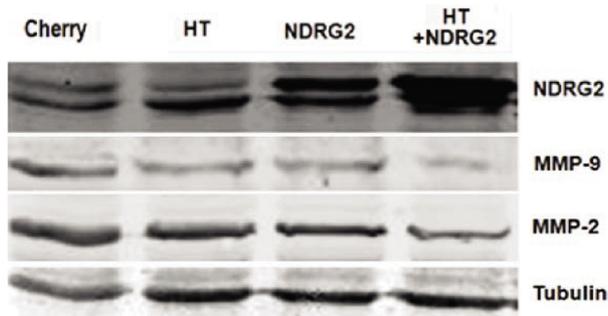


图 2-2 Western-blot 实验检测不同处理组细胞内 NDRG2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达变化

Fig.2-2 Expression levels of NDRG2, MMP-2 and MMP-9 were determined by Western-blot in different groups

2.3 裸鼠体内研究热对 NDRG2 干扰表达的 HepG-2 细胞侵袭能力的影响

通过动物在体实验,进一步验证了 NDRG2 在热应激抗肝

癌细胞侵袭的作用。如图 3-1 和图 3-2 结果显示,HE 染色发现,45 °C 热作用可以抑制恶性肿瘤对临近肌肉组织的入侵;当干涉了肝癌细胞中 NDRG2 的表达时,这不仅加速了肿瘤结节的入侵,而且还逆转了热作用的抗肿瘤侵袭过程。免疫组化结果发现,NDRG2 干扰组的 MMP-2 和 MMP-9 表达较强;而 NDRG2 干扰联合热处理组的细胞相比单纯 NDRG2 干扰组细胞中的 MMP-2 和 MMP-9 表达明显减弱。以上结果表明,NDRG2 通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达参与了热应激抗肝癌细胞侵袭的作用。

2.4 NDRG2 对 HSPs 的影响在热应激抗肝癌细胞侵袭的作用中

通过 Western-blot 检测了 45 °C, 30 min 热作用后的 12 h 内,在空载体对照和 NDRG2 过表达的 HepG-2 细胞间 HSP27, HSP70 和 HSP90 蛋白的表达变化情况。如图 4 结果显示,热处理后的 12 h 内 HSP27 和 HSP90 在两组之间没有显著变化,而 HSP70 蛋白的表达在热处理后 6 h 开始升高,但在两组之间没有显著差异。

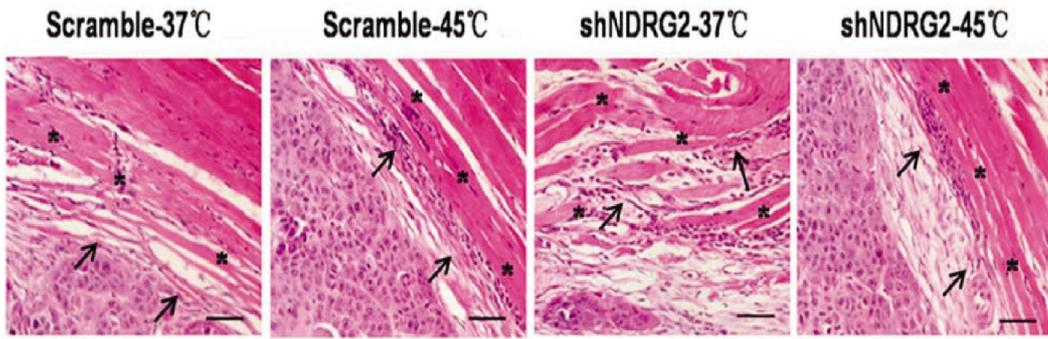


图 3-1 HE 染色对各处理组间肿瘤对临近肌肉组织侵袭程度的观察 (“*”定位肌肉层, “ ”指向肿瘤侵袭区域,放大倍数 400×)

Fig.3-1 H&E staining of histological sections revealed histological destruction in each group. (“*” mark the locations of muscle. “ ”point to invasion areas. magnification 400×)

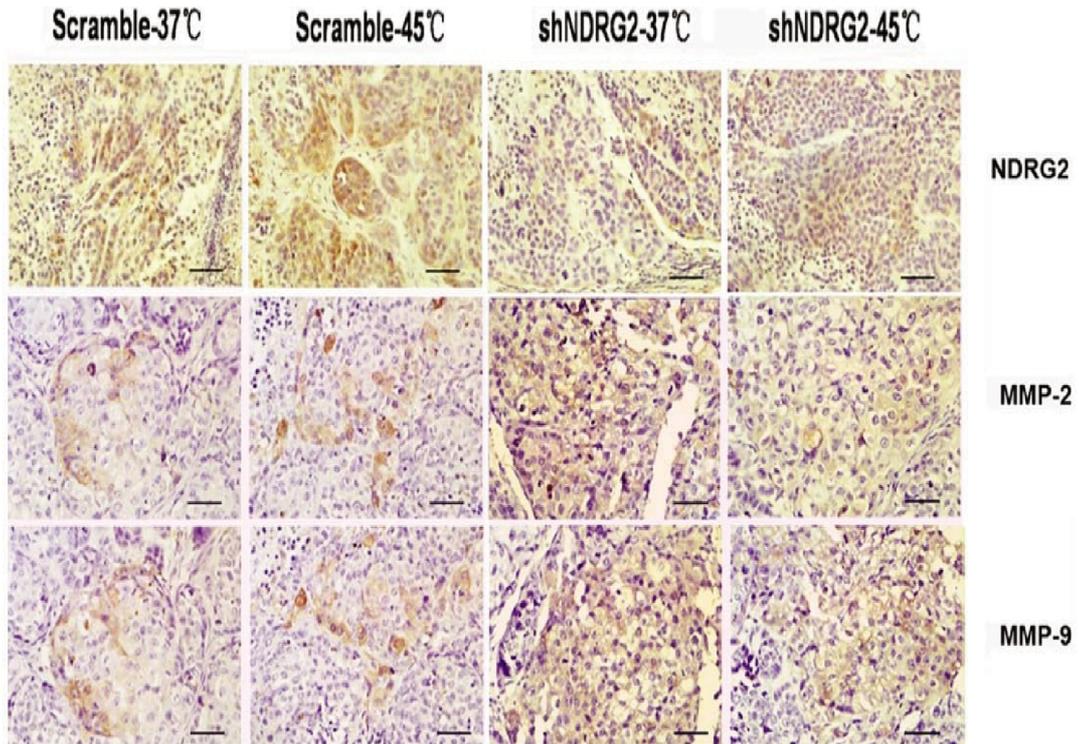


图 3-2 免疫组化对各处理组间肿瘤组织内 NDRG2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的检测 (放大倍数 400×)

Fig.3-2 Expression levels of NDRG2, MMP-2 and MMP-9 were determined by immunohistochemical staining in different groups (magnification 400×)

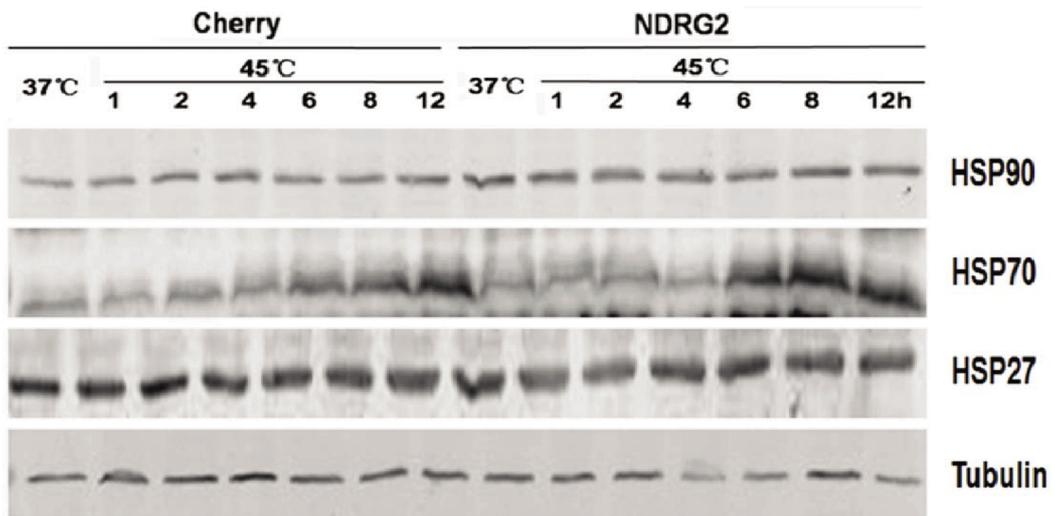


图 4 Western-blot 实验检测各处理组间细胞内 HSP27、HSP70 和 HSP90 蛋白表达改变

Fig.4 Expression levels of HSP27, HSP70 and HSP90 were determined by Western-blot in different groups

2.5 NDRG2 对 MAPKs 在热应激抗肝癌细胞侵袭的作用中的影响

通过 Western-blot 方法检测了 ERK1/2、p38MAPK、JNK 总蛋白和磷酸化的表达量去进一步研究 NDRG2 在热疗抗肝癌细胞侵袭中的具体机制。实验结果如图 5-1 显示, JNK 表现出很高的内在基础激活量, 无论是给予 45 °C 热处理 30 min, 还是在 NDRG2 过度表达的细胞也都不能进一步增强 JNK 的活化; 在对照的 HepG-2 细胞给予热处理 2 h 之内, ERK1/2 的磷酸化

增加, 然后在热处理后的 4 h 又迅速的下降到基础水平, 甚至到后面的时间变得更低。然而, 在 NDRG2 过表达组 ERK1/2 的磷酸化水平相比对照组减低, 并且随着时间的变化这种降低的趋势越明显; 45 °C, 30 min 的热作用激活了对照组 HepG-2 细胞内 p38MAPK 的表达, 并且呈现一种时间依赖性, 而 NDRG2 的高表达却对热应激引起的 p38MAPK 激活不起任何作用。以上研究结果提示, NDRG2 不仅降低了 HepG-2 细胞中 ERK1/2 本底的表达, 还降低了早期热应激对 ERK1/2 的诱导。

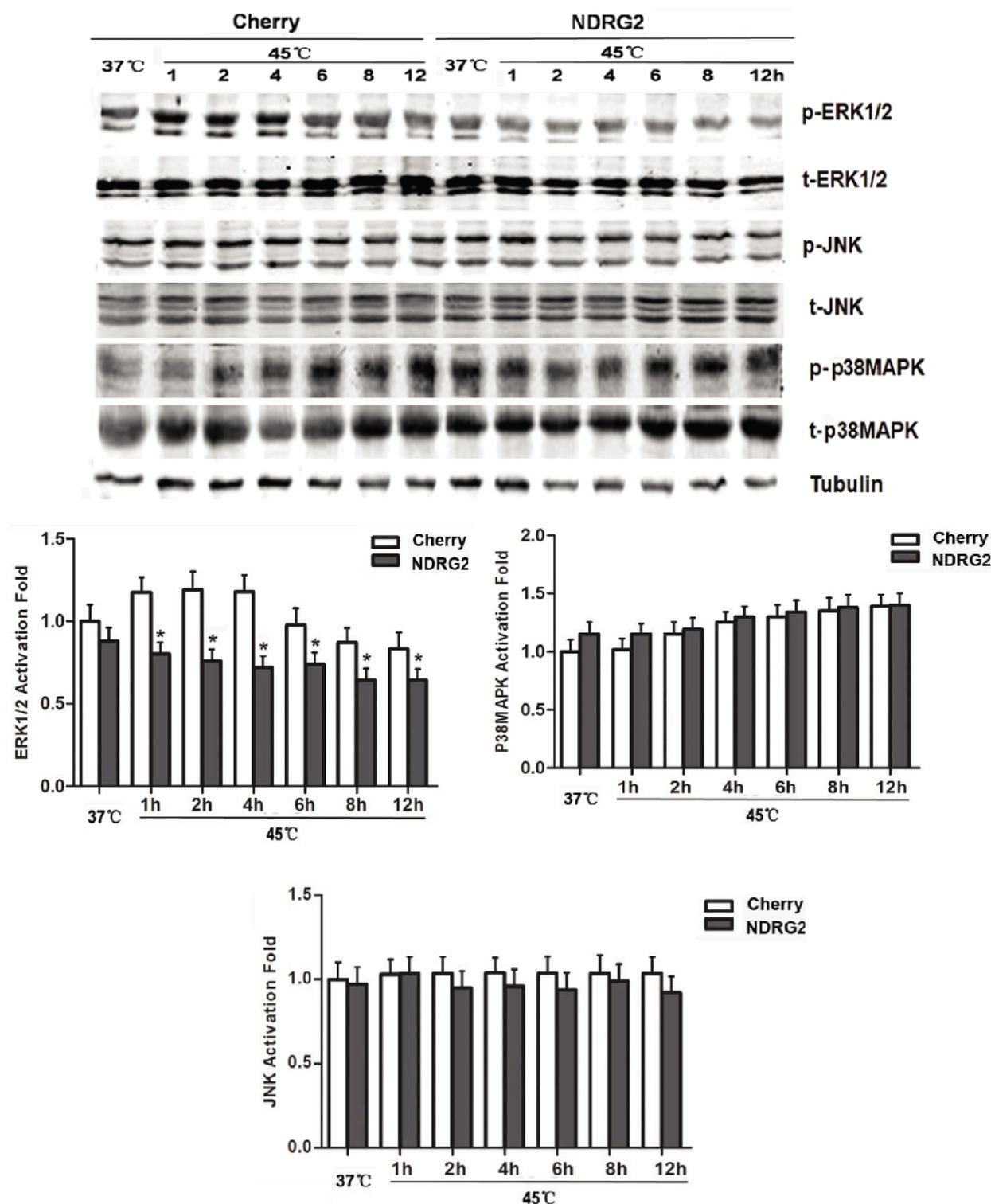


图 5-1 Western-blot 实验对各处理组间细胞内 ERK1/2、P38MAPK 和 JNK 蛋白活性表达改变的检测 (*P<0.05 vs Cherry)

Fig.5-1 Expression levels of ERK1/2, P38MAPK and JNK were determined by Western-blot in different groups (*P<0.05 vs Cherry)

为了进一步证实上一个实验结果,我们分别采用 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的 PD98059 (ERK1/2 抑制剂), 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的 SB203580 (p38MAPK 抑制剂) 和 50 $\mu\text{mol/mL}$ 的 SP600125 (JNK 抑制剂) 处理 NDRG2 沉默表达的 HepG-2 细胞各 30 min, 然后再给予 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min。如图 5-2 和图 5-3 实验结果显示, 沉默的 NDRG2 表达显著降低了热应激的抗侵袭

作用;同时,经 PD98059 处理后的 NDRG2 干扰表达细胞可以明显通过降低 MMP-2/MMP-9 的表达来提高热应激的抗侵袭作用; 但经 SB203580 和 SP600125 处理后的细胞却没有发生显著的变化。因此,我们的研究结果提示,NDRG2 介导的热应激抗侵袭作用是通过抑制 ERK1 /2 信号通路实现的。

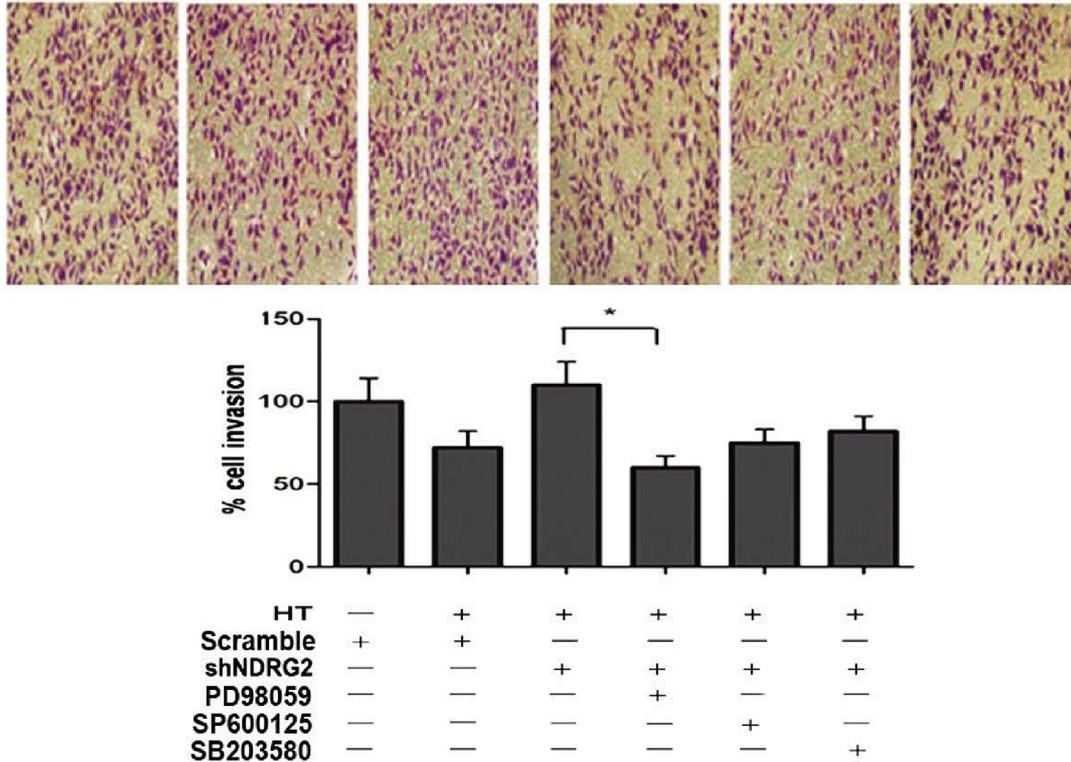


图 5-2 Transwell 实验检测不同处理组间体外细胞侵袭力改变 (*P<0.05 vs HT+shNDRG2)

Fig.5-2 Invasive effect was determined by Transwell assay in different groups (*P<0.05 vs HT+shNDRG2)

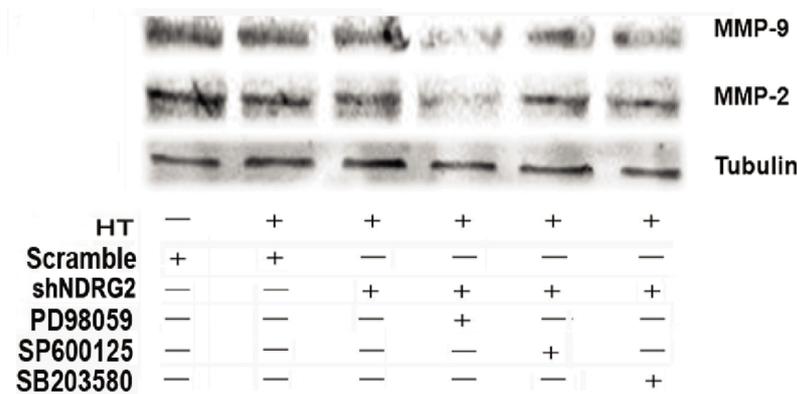


图 5-3 Western-blot 实验对各处理组间细胞内 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达改变的检测

Fig.5-3 Expression levels of MMP-2 and MMP-9 were determined by Western-blot in different groups

3 讨论

热疗是一种微创的癌症治疗手段在临床上已被广泛应用。热对肿瘤的疗效并非单纯物理因素可以解释,除了不同组织、细胞对热有不同敏感性之外,热作用还可能通过改变信号转导途径和相关蛋白发挥作用。我们在实验研究中拟通过构建 NDRG2 过表达和干扰表达的稳转细胞系来观察肝癌细胞侵袭能力的改变,去进一步明确 NDRG2 在热应激抗肝癌细胞侵袭

中的作用。当前,将目的基因导入靶细胞的方法主要包括病毒载体介导的转染和真核表达质粒的转染方法。其中真核表达质粒的转染对于有丝分裂比较活跃的细胞效果较好,但随着时间的延长,表达的目的基因常常会发生丢失。现病毒载体主要采用的有四种类型:单纯疱疹病毒、慢病毒、腺病毒及腺相关病毒等载体^[1]。其中慢病毒(Lentivirus)载体即以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础改造而来的。慢病毒对分裂细胞和非分裂细胞均

具有感染能力,其中包括一些分化终末期的细胞。作为外源基因载体,其具有感染率高、可稳定整合表达、宿主范围广泛、对宿主毒性小、不易诱发宿主免疫反应等优点,因此已被广泛地用于体外细胞的转染、基因治疗和转基因动物制备等方面的研究^[1]。RNA 干扰(RNAi)是一个十分有用的工具对于分析基因功能,并且它也被逐渐发展成为治疗肿瘤的一种方法和手段。最直接的 RNAi 方法是将 siRNA 核苷酸序列通过 Lipofectamine 2000 转染到细胞内,siRNA 能有效、快速的与细胞内相应 mRNA 结合,从而达到抑制基因表达的作用,但是这种抑制作用是瞬时的^[2]。目前慢病毒载体也被广泛地应用于 RNAi 的研究中。被感染慢病毒后的细胞利用慢病毒载体可表达 siRNA,它不仅可以达到与体外合成 siRNA 一样的基因表达抑制效果,在构建好的稳转细胞系中,长期发挥阻断靶基因表达的作用;它还能对多种细胞进行转染^[4,5]。考虑到慢病毒载体的安全性以及各种优点,我们认它是建立稳转细胞系的最理想载体。我们成功的构建了 NDRG2 过表达和干涉表达的稳转细胞株,这为下一步的机制性研究奠定了基础。通过对体内、外研究结果分析,我们证实 NDRG2 参与了热应激的抗肝癌细胞侵袭作用,并且热应激诱发的 NDRG2 表达水平的变化与肝癌的侵袭力呈现一种负相关性。

所有的生物细胞当遇到高温、理化刺激、生物应激等刺激时都可以产生一系列蛋白质,被称为热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)。这些蛋白质能够在生理状态下参与蛋白的折叠、修复、构象以及跨膜转运。在应激状态下 HSP 呈高水平表达,通过启动细胞凋亡避免细胞非正常死亡,提高细胞稳定性,起到应激保护的作用^[6]。目前研究较多的是 HSP70,研究发现肿瘤细胞内的 HSP70 可以与多种原癌基因相互作用,参与肿瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的调控。其中,在肿瘤细胞的凋亡方面, HSP70 具有双向的调节作用,在不同的实验条件下,可表现出完全不同的作用。实验研究表明, HSP70 可以作为“分子伴侣”参与 Bcl-2 家族癌基因的抗细胞凋亡调控^[7];另一方面, HSP70 也可以增强野生型 p53 基因的促凋亡作用^[8]。本实验通过 Western blot 研究结果发现,在给予 45 °C, 30 min 的热刺激后的 12 h 内,空载体对照和 NDRG2 过表达的 HepG-2 细胞间 HSP90 和 HSP27 蛋白的表达之间没有显著变化,而 HSP70 在热后 6 h 开始升高,但在两组之间没有显著差异。类似结果在人类结肠癌 HCT116 细胞中也被观察到, Deng 等^[9]发现 HSP27 和 HSP90 的表达并不受热作用(45 °C, 20 min)的影响,而 HSP70 可随着加热温度表达升高。Okayama 等^[10]的研究发现,在热作用下肿瘤细胞的转移潜能可受到 HSP70 蛋白表达的影响。这已经被证实,在肿瘤细胞中 HSPs 表达都呈现异常增高的现象,当癌细胞再次受到不同的死亡刺激后,如氧化应激、辐射、细胞毒性药物和热刺激后, HSPs 表达会变得更。另外, HSPs 在肝癌细胞中也呈现高表达状态,并且 HSPs 表达水平与组织学分级和肝癌患者的生存期之间具有相关性。因此,我们有理由推测 45 °C 的热作用不会进一步刺激已经在肝癌细胞中处于高表达的 HSP27 和 HSP90。最后,我们得出结论 NDRG2 并没有激活 HSPs 参与到热应激对抗肝癌细胞侵袭的过程中。

MAPKs 是存在于细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。目前发现, MAPK 信号通路存在于大多数细胞内,它是真核

生物信号传递网络中的重要途径之一,其可将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并引起细胞生物学反应,在基因表达调控中发挥关键作用。在哺乳类细胞目前已发现存在着下述三条并行的 MAPKs 信号通路:p38MAPK、JNK 以及 ERK1/2 信号通路。大量研究发现, MAPK 家族的 JNK 及 p38MAPK 主要参与氧化应激、炎症与细胞凋亡等的调控,而 ERK1/2 信号通路主要参与细胞增殖、分化的调控。许多生长因子和原癌基因通过它转导信号来促进生长和分化^[11]。近年来,大量研究发现 MAPK 家族成员的高表达可影响多种恶性肿瘤的侵袭、转移,通过对 MAPKs 信号通路的激活可增强 MMPs、VEGF 等分子的表达继而影响肿瘤的侵袭、转移^[12-15]。先前的研究已经报道, MAPK 家族在细胞应激过程中发挥重要的生物学功能。那么热应激条件下,在肝癌 HepG-2 细胞系中 NDRG2 对 MAPKs 各蛋白的表达产生了怎么样的影响呢?我们的结果显示, 45 °C 热应激并没有激活 JNK 的表达,这样的类似结果在 MDA-MB-231 细胞中也被观察到^[16]。同时,我们观察到不仅热疗抑制了 ERK1/2 和 p38MAPK 的活化, NDRG2 的过表达也同样抑制了 ERK1/2 信号通路的激活。在此之前的研究报道中,我们发现 NDRG2 可激活 p38MAPK 磷酸化在 HepG-2 细胞中^[17],而在本研究中 NDRG2 却并没有激活 p38MAPK。我们推测, p38MAPK 的磷酸化已被热疗引发的热应激激活到了较高的水平,而 NDRG2 的高表达已对它不能起到任何作用。为了进一步验证这个发现,我们分别应用 ERK1/2, p38MAPK 和 JNK 三个激酶的抑制剂作用于 NDRG2 被敲除的 HepG-2 细胞,经过 45 °C, 30 min 热作用后,我们发现沉默的 NDRG2 表达显著降低了热应激的抗侵袭作用;同时,经 PD98059(ERK1/2 的抑制剂)处理后的 NDRG2 干涉表达细胞可以明显通过降低 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达来提高热应激的抗侵袭作用;但经 p38MAPK 和 JNK 抑制剂处理后的细胞却没有能够显著的抑制肿瘤细胞的侵袭和 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达。

综上所述, NDRG2 参与了热应激抗肝癌细胞的侵袭作用过程,热应激所诱导 NDRG2 的表达量与肝癌细胞的侵袭力呈现一种负相关性;在热应激抗肝癌细胞侵袭的作用中,是通过影响 NDRG2-ERK1/2 信号通路而实现的。

参考文献(References)

- [1] 毛颖佳, 郑源强, 石艳春. 慢病毒载体及其应用的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(2): 196-200
Mao Ying-jia, Zheng Yuan-qiang, Shi Yan-chun. Progress in study on lentiviral vectors and their application[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2009, 22(2): 196-200
- [2] 罗望, 张泓, 许森, 等. 慢病毒-基因转移的潜在新载体 [J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(6): 366-371
Luo Wang, Zhang Hong, Xu Miao, et al. Lentiviral-potential new gene transfer vectors [J]. JiangSu Pharmaceutcal and Clinical Research, 2006, 14(6): 366-371
- [3] Elbasher S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836): 494-498
- [4] Bos T J, De Bruyne E, Heirman C, et al. In search of the most suitable lentiviral shRNA system[J]. Curr Gene Ther, 2009, 9(3): 192-211

- left ventricular systolic dysfunction[J]. International Journal of Cardiology, 2010, 142(1): 97-100
- [10] Liu Xiao-fang, Liu Zhen-bing. Effect of prognosis in patients with chronic congestive heart failure factors and intervention[J]. Journal of cardiovascular and pulmonary diseases, 2006, L4(2): 166-168
- [11] Jurkowitz C, Abramson J, McClellan wM. Anemia and cardiovascular and kidney disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012, 15(2): 117-122
- [12] Hillege HI, Nitsch D, Pfeffer MA, et al. Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure[J]. Circulation, 2012, 113(5): 677-678
- [13] Pedersen C T, Metra M, Charlesworth A, et al. Effects of metoprolol and carvedilol on pre-existing and new onset diabetes in patients with chronic heart failure: data from the Carvedilol Or Metoprolol European Trial(COMET)[J]. Heart, 2012, 93(8): 968-973
- [14] Huang Shi-yu, Peng Jun-zhu, Luo Yun-hai, et al. Analysis of spironolactone, effect of carvedilol in treatment of chronic heart failure[J]. Journal of XiangNan University (Medicine Edition), 2010, 10(1): 5-6
- [15] Liang Wei-ji, Xian Hong-guang, Chen Lei. Effects of spironolactone on chronic heart failure patients neurohumoral and left ventricular function[J]. Journal of Chinese physician, 2011, 18(9): 167-168
- [16] Lu Yi-huo. Clinical observation on the therapeutic effect of spironolactone in the treatment of heart failure in patients with hypertension [J]. Chinese community physician (medical), 2010, 17(4): 84-85
- [17] Zhou Fei-xia, Xue Ying, Zhang Lei, et al. Perindopril combined with spironolactone in the treatment of elderly patients with chronic congestive heart failure curative effect observation of[J]. Sichuan medicine, 2010, 14(4): 201-202
- [18] Cai Chunmei, Wen Ye snow, Guo Chunhua, et al. The reason of poor medication compliance of patients with senile diabetic[J]. Contemporary nurse (Academic Edition), 2011, 11(1): 109-110
- [19] Tan Qiu-zhen. Elderly diabetic patients with poor compliance reasons and Countermeasures[J]. Foreign medical, 2012, 31(4): 43-44
- [20] Zhou Hong-ling. Hospital health education on the compliance of patients with diabetes magazine[J]. Chronic diseases, 2010, 12(3): 213-214

(上接第 2807 页)

- [5] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553
- [6] Didelot C, Schmitt E, Brunet M, et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death [J]. Handb Exp Pharmacol, 2006 (172): 171-198
- [7] Dremina E S, Sharov V S, Schoneich C. Heat-shock proteins attenuate SERCA inactivation by the anti-apoptotic protein Bcl-2: possible implications for the ER Ca²⁺-mediated apoptosis[J]. Biochem J, 2012, 444(1): 127-139
- [8] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin S A, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 839-843
- [9] Deng H, Ravikumar T S, Yang W L. Bone morphogenetic protein-4 inhibits heat-induced apoptosis by modulating MAPK pathways in human colon cancer HCT116 cells [J]. Cancer Lett, 2007, 256(2): 207-217
- [10] Okayama T, Kokura S, Ishikawa T, et al. Antitumor effect of pretreatment for colon cancer cells with hyperthermia plus geranylgeranylacetone in experimental metastasis models and a subcutaneous tumor model of colon cancer in mice[J]. Int J Hyperthermia, 2009, 25(2): 141-149
- [11] Cuevas B D, Abell A N, Johnson G L. Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration [J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3159-3171
- [12] Airolidi M, Gabriele P, Brossa P C, et al. Serum thyroid hormone changes in head and neck cancer patients treated with microwave hyperthermia on lymph node metastasis [J]. Cancer, 1990, 65(4): 901-907
- [13] Langlois B, Perrot G, Schneider C, et al. LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11584
- [14] Kumar B, Koul S, Petersen J, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity [J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 832-841
- [15] Inamoto T, Azuma H, Sakamoto T, et al. Invasive ability of human renal cell carcinoma cell line Caki-2 is accelerated by gamma-aminobutyric acid, via sustained activation of ERK1/2 inducible matrix metalloproteinases[J]. Cancer Invest, 2007, 25(7): 574-583
- [16] Moon E J, Sonveaux P, Porporato P E, et al. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(47): 20477-20482
- [17] Liu X, Niu T, Liu X, et al. Microarray profiling of HepG2 cells ectopically expressing NDRG2[J]. Gene, 2012, 503(1): 48-55