

热休克蛋白 70 在人食管癌 EC9706 细胞凋亡过程中的表达与定位变化

刘凡¹ 陈兰英² 黄建³ 刘用金¹ 石松林^{1*}

(1. 厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361005; 2. 河南城建学院生物医学教研室, 河南 平顶山 467036; 3. 桂林医学院生物技术学院, 桂林 541004)

[摘要] 目的 探讨姜黄素对人食管癌 EC9706 细胞凋亡的诱导作用, 热休克蛋白 70(HSP70) 在肿瘤细胞凋亡过程中在核基质上的变化及其与凋亡调控相关蛋白的关系。方法 用细胞计数和流式细胞仪检测姜黄素对人食管癌 EC9706 细胞的增殖抑制作用, 以光学显微镜和透射电镜观察姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡前后的细胞结构变化, 琼脂糖凝胶电泳观察人食管癌 EC9706 细胞凋亡前后的 DNA 结构变化。双向凝胶电泳和质谱鉴定分析 HSP70 在核基质中的存在与变化; 并以 Western blotting 进行确证; 激光扫描共焦显微镜观察 HSP70 在 EC9706 细胞凋亡过程中的定位及其与 Bax、Bcl-2 等基因产物的共定位关系。结果 姜黄素能显著抑制人食管癌 EC9706 细胞增殖并诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡, 双向凝胶电泳、质谱鉴定和结果发现并证实, HSP70 在姜黄素处理前后的 EC9706 细胞核基质蛋白中的存在及其表达下调变化。激光扫描共焦显微镜观察结果显示, HSP70 在 EC9706 细胞凋亡过程中与 Bax、Bcl-2 等基因产物具有共定位关系, 且其共定位区域发生了变化。结论 姜黄素对人食管癌 EC9706 细胞具有显著的凋亡诱导作用; HSP70 作为一种新发现的核基质蛋白, 在姜黄素诱导人食管癌 EC9706 凋亡过程中的表达与分布发生了显著变化。HSP70 与凋亡相关基因的关系对 EC9706 细胞凋亡具有重要影响。

[关键词] 姜黄素; 热休克蛋白 70; EC9706 细胞; 食管癌; 流式细胞术; 琼脂糖凝胶电泳; 人

[中图分类号] R735.1, Q291 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.0529-4356.2012.04.010

Changes in expression and localization of heat shock protein 70 during curcumin-induced apoptosis of human esophageal cancer cell line EC9706

LIU Fan¹, CHEN Lan-ying², HUANG Jian³, LIU Yong-jin¹, SHI Song-lin^{1*}

(1. Department of Basic Medical Sciences, Medical College of Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China;

2. Biomedical Department, He'nan University of Urban Construction, He'nan Pingdingshan, 467044, China;

3. College of Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of curcumin on human esophageal cancer EC9706 cells and explore the role of heat shock protein(HSP70) in cell apoptosis by examining changes in the nuclear matrix and its relationship with apoptosis-related proteins. **Methods** Cell counting and flow cytometry were performed to probe the inhibitory effect of curcumin on cellular proliferation. Transmission electron microscopy and optical microscopy were used to observe the structural changes in EC9706 cells before and after apoptosis. Agarose gel electrophoresis was conducted to investigate the DNA structure of EC9706 cells before and after apoptosis. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) and mass spectrometry (MS) analysis were performed to investigate the presence and changes of HSP70 in the nuclear matrix of EC9706 cells before and after curcumin treatment, which was further corroborated by Western blotting assay. Laser confocal scanning microscopy was used to observe the colocalization of HSP70 with Bax and Bcl-2 during apoptosis. **Results** The results indicated that curcumin could markedly inhibited EC9706 cell proliferation and finally induced apoptosis. Data from 2-D PAGE, MS, and Western blotting showed that HSP70 was involved in the nuclear matrix

[收稿日期] 2011-11-07 **[修回日期]** 2011-11-28

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(2011J01256); 中央高校基本科研业务费专项资金(2011121061)

[作者简介] 刘凡(1981—),男(汉族),福建省南平市人,博士。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: shisonglin@xmu.edu.cn Tel: (0592) 2185363

proteins and expression of HSP70 was downregulated after curcumin treatment. Laser confocal microscopy showed that HSP70 colocalized with Bax and Bcl-2, and the colocalized regions were altered by the curcumin treatment. **Conclusion** Our work proves that curcumin could definitely induce EC9706 cells into apoptosis. As a new found nuclear matrix protein, the expression and distribution of HSP70 are altered during the apoptosis of EC9706 cells. The colocalization of HSP70 with apoptosis-related genes evidently affects the apoptosis of EC9706 cells.

[Key words] Curcumin; Heat shock protein70; EC9706 cell; Esophageal cancer; Flow cytometry; Agarose gel electrophoresis; Human

热休克蛋白 70(heat shock protein, HSP70) 是热休克蛋白家族成员,参与蛋白质折叠、转运、细胞保护、抗原呈递及肿瘤免疫等许多重要细胞生命活动^[1]。HSP70 分布于细胞核、细胞质以及内质网和线粒体等细胞器中,并在细胞胁迫条件下集中于细胞核和核仁中^[2],但其定位和转运机制尚不清楚。研究发现,HSP70 不仅在恶性肿瘤细胞,如卵巢癌^[3]、乳腺癌^[4]、胃癌^[5]、肺癌^[6]、肝癌^[7]等常有高水平表达,显示其与肿瘤细胞增殖与癌变的重要关系,同时 HSP70 与细胞凋亡也有密切关系,可能通过基因调节以及免疫应答而发挥抗凋亡作用^[8-9]。但有研究报道,HSP70 可促进细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)介导肿瘤细胞凋亡,显示 HSP70 在调控细胞凋亡中具有双向性。因此,目前 HSP70 在肿瘤细胞凋亡过程中的定位、作用及其调控机制等尚不明确,有待进一步探索。

真核细胞核基质是细胞内染色质的支撑骨架,核基质蛋白及其结合蛋白与 DNA 复制、转录和 RNA 加工修饰等均具有重要关系,在细胞的不同生命活动过程中,核基质上均聚集了参与该生命活动调控的相关蛋白质。因此,对核基质蛋白的分析能够发现与细胞生理病理活动相关的功能调控蛋白。姜黄素(curcumin)是从姜科、天南星科等植物的根茎中提取的一种二酮类化合物,具有降血脂、抗肿瘤、抗炎、利胆、抗氧化等作用。姜黄素在科学研究中常被作为细胞的凋亡诱导剂使用。我们在分析姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡前后核基质蛋白组成变化时,发现 HSP 存在于细胞核基质组分中,并在姜黄素处理前后的细胞中出现表达下调的变化。为此,我们对 HSP 在 EC9706 细胞凋亡过程中的表达,及其与细胞凋亡相关蛋白的共定位及其变化进行报道,以期探索和阐明 HSP 在人食管癌等恶性肿瘤中对细胞凋亡的作用和调控机制,并提供相关实验数据和深入探索的新方向。

材料和方法

1. 材料

人食管癌 EC9706 细胞购自中国科学院细胞库,小鼠抗人 HSP70 抗体购自 NeoMarkers 公司,异

硫氨酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG、四甲基异硫氨酸罗丹明(TRITC)标记的山羊抗小鼠 IgG、兔抗人 Bax 抗体、兔抗人 Bcl-2 抗体购自 Santa Cruz 公司,RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品,新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品,姜黄素购自中国药品生物制品检定所。

2. 细胞培养和凋亡诱导处理

EC9706 细胞培养于 RPMI-1640 培养液中(内含 15% 热灭活小牛血清和 6mg/L 青霉素、100mg/L 链霉素及 50mg/L 卡那霉素,pH7.2),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,姜黄素用二甲基亚砜(DMSO)溶解,干液浓度为 10g/L,-20℃ 避光保存,取对数生长期的 EC9706 细胞进行消化传代,接种 24 h 更换含 30 μmol/L 姜黄素的培养液进行诱导处理,连续培养 72 h 后收集细胞备用。对照组细胞相应扩增,收集备用。

3. 细胞生长曲线

取对数生长期细胞,以 5 × 10⁷/L 细胞浓度接种于 25ml 培养瓶中,每组 12 瓶,共 24 瓶,接种 24 h 后,对照组细胞换上新鲜培养液,处理组换上含 30 μmol/L 姜黄素的作用液,从中各取 3 瓶细胞,锥虫蓝拒染法隔日(1~7d)进行活细胞计数,取其均值,绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次,结果基本一致,以其中 1 次为准。

4. 细胞周期的测定

取对数生长期的对照组和处理组细胞,收集细胞,并用 PBS 洗涤 3 次,细胞沉淀重悬于 70% 乙醇(预冷)中固定,-20℃ 过夜。离心除去乙醇,PBS 洗涤 3 次,加入不含 DNase 的 100mg/L RNaseA 37℃ 温育 30 min 以消化 RNA,加入 50mg/L 碘化丙啶(PI)4℃ 染色 30 min,200 目滤网过滤。用流式细胞仪(Bacton-Dickson 公司)进行细胞周期时相检测与分析。实验重复 3 次。

5. 光镜与电镜观察样品制备

取对数生长期细胞接种于盖玻片条上,接种 24 h 后更换新鲜培养液,处理组换上含 30 μmol/L 姜黄素的培养液继续培养处理 48h。

5.1 HE 染色:长有细胞的玻片条用预温至 37℃ 的 PBS 洗涤 3 次,Bouin-Hollande 液固定过夜,70%

乙醇洗涤,常规苏木素-伊红(HE)染色,Olympus BH-2型光学显微镜下观察并摄片。

5.2 Hoechst染色:长有细胞的盖玻片条,温PBS液漂洗3次,4%多聚甲醛(pH 7.2)4℃固定10min,PBS漂洗3次,滴加5g/L的Hoechst35258荧光染料,37℃避光孵育10min,PBS漂洗3次,90%甘油(10% PBS)封片。荧光显微镜(Olympus BH-2)下观察并摄片。

5.3 扫描电镜观察:取分别长有对照组和经8mg/L姜黄素处理的细胞盖玻片条,温PBS漂洗3次,每次2~3min,2%戊二醛于4℃固定1h,PBS漂洗3次,每次5min,用1%四氧化锇于4℃固定5min,并经乙醇系列脱水,丙酮浸泡,乙酸异戊脂置换,CO₂临界点干燥后,于XL30扫描电子显微镜下观察。

5.4 透射电镜样品制备与观察:取对数生长期细胞,接种于一批50ml培养瓶中,接种24h后,对照组细胞换上新鲜培养液,处理组换上含8mg/L姜黄素的作用液,温PBS液漂洗,用橡皮刮刀推下细胞移入离心管中,1500r/min离心10min,弃上清液。细胞沉淀用2.5%戊二醛4℃预固定2h,PBS漂洗3次,1%四氧化锇4℃固定2h,乙醇系列脱水,环氧树脂823包埋,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色后,于JEM100-CX II型透射电镜下观察并摄片。

6. 琼脂糖凝胶电泳

取姜黄素处理不同时间的EC9706细胞和对照组细胞,常规方法提取DNA,以1%琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭(EB)染色后摄片记录实验结果。

7. 核基质蛋白的提取

收集对照组与处理组细胞,分别加入细胞骨架(cytoskeleton,CSK)提取液CSK100[10mmol/L哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES),300mmol/L蔗糖,100mmol/L NaCl,3mmol/L MgCl₂,1.2mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF),0.5% TritonX-100]0℃放置10min,1500r/min离心5min,去除上清液。加入细胞骨架提取液CSK50(10mmol/L PIPES,300mmol/L蔗糖,50mmol/L NaCl,3mmol/L MgCl₂,1.2mmol/L PMSF),0.5% Triton X-100)洗涤2次,离心,去除上清液。加入 3×10^5 IU/L DNase I (CSK50配制)消化30min,加入1mol/L硫酸铵至终浓度0.25mol/L,室温孵育15min,1500r/min离心5min,不溶性沉淀物的成分即为核基质蛋白,CSK50漂洗1次,于-80℃储存备用。

8. 双向凝胶电泳与图像分析

常规方法进行双向电泳,以质谱兼容的硝酸银染色法染色,对3个重复实验组凝胶图像蛋白点的检测、定量分析、差异比较及统计学分析均通过凝胶

图像分析软件PD Quest 8.0(Bio-Rad公司)进行。各蛋白点的吸光度(absorbance,A)值相对总蛋白密度进行了标准量化,相对密度变化超过2倍的点定义为差异表达的蛋白点。

9. 核基质蛋白的质谱鉴定

提取差异表达的蛋白质点,经漂洗,脱色,DTT还原,碘乙酰胺烷基化,干燥,胶内酶解,肽段抽提与浓缩等步骤后,通过ReFlexTM III型MALDI-TOF质谱仪(Bruke公司)获取酶解蛋白的肽指纹(PMF)数据。数据经分析软件Flex Analysis 2.0进行处理,消除误差与污染峰。最后在MASCOT(www.matrixscience.com)蛋白质组数据库中进行查询鉴定。

10. Western blotting 检测

收集对照组和处理组细胞,提取核基质蛋白。蛋白样品以15% SDS-PAGE分离后通过半干转印法转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,4℃,3%牛血清清蛋白(BSA)封闭过夜;然后加入按1:2000稀释的与鉴定蛋白相应的一抗作用液(2% BSA配制)室温条件下震荡孵育1.5h,TBST洗膜3次,每次10min;加入按1:4000稀释的HRP标记的相应二抗工作液(2% BSA配制),室温条件下震荡孵育1.5h,TBST洗膜3次,每次10min;增强型化学发光试剂(ECL)显色观察。以 β -actin做内参。

11. 激光扫描共焦显微镜样品的制备与观察

取长有对照组和处理组细胞的玻片,PBS漂洗3次,每次5min;Karnovsky溶液中固定20min,PBS漂洗3次,每次5min;用0.5% Triton X-100的透化试剂(PBS配制)室温透膜20min,PBS漂洗3次,每次5min,5% BSA室温封闭1h,以3% BSA配制一抗作用液(HSP70稀释100倍,Bax、Bcl-2、Fas和p53各稀释200倍),设置抗体组合:鼠抗人HSP70/兔抗人Bax、鼠抗人HSP70/兔抗人Bcl-2。各加40 μ l相应一抗稀释液至玻片上,室温孵育30min,4℃孵育过夜,PBS漂洗3次,每次5min。配制相应组合的荧光素标记二抗作用液(羊抗鼠与羊抗兔二抗),各取30 μ l二抗作用液加到玻片上,室温避光孵育30min,4℃孵育3h,漂洗。抗荧光淬灭剂封片。TCS-SP2 MP型激光扫描共焦显微镜观察结果。以3% BSA代替HSP70抗体进行免疫荧光染色,作为阴性对照。

结 果

1. 生长曲线

细胞生长曲线(图1A)测定结果显示,EC9706细胞的增殖速度明显比处理组细胞快,当接种细胞浓度为 5×10^7 /L时,连续计数至第7天,细胞数为

$9.03 \times 10^8 / L$, 是原来的 18.06 倍, 其倍增时间为 40.23h。但经不同浓度的姜黄素处理后, EC9706 细胞生长状态分别受到不同程度的抑制, 其中 $10 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 7d 后, 细胞计数结果为 $4.20 \times 10^8 / L$, 是原来的 8.40 倍, 倍增时间延长为 54.74h, 生长抑制率为 53.48%。 $20 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素

处理 7d 后, 细胞计数结果为 $2.07 \times 10^8 / L$, 是原来的 4.14 倍, 倍增时间延长为 81.95 h, 抑制率为 77.11%。 $30 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 7d 后, 细胞计数结果为 $1.46 \times 10^8 / L$, 为原来的 2.91 倍, 倍增时间延长为 108.94h, 抑制率高达 83.88%。

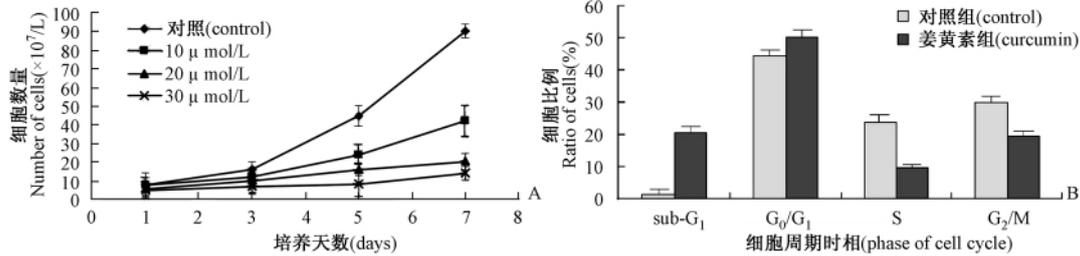


图1 姜黄素对 EC9706 细胞增殖的影响

A. 不同浓度的姜黄素对 EC9706 细胞增殖的影响。随着姜黄素浓度的增高, 对细胞生长的抑制作用越来越显著;

B. $30 \mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素对 EC9706 细胞周期的影响。

Fig.1 The effect of curcumin on the cellular proliferation of EC9706 cells

A, The effects of curcumin at different concentrations on the proliferation of EC9706 cells. The inhibition rates kept rising along with increasing curcumin concentration; B, The effects of $30 \mu\text{mol/L}$ curcumin on the cell cycle of EC9706 cells

2. 细胞周期

流式细胞仪检测结果显示, 经 $30 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素诱导处理后, 人食管癌 EC9706 细胞的细胞周期分布出现明显的变化。测定结果显示, 对照组 EC9706 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例为 44.57%, S 期细胞占 23.85%, G₂/M 期细胞占 30.06%; 经 $30 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素诱导处理之后, 细胞周期出现明显的凋亡峰, 亚 G₀/G₁ 期细胞比例高达 20.64%, G₀/G₁ 期细胞比例上升为 50.08%, 而 S 期、G₂/M 期细胞分别下降为 9.62%, 19.66% (表 1; 图 1B)。

表 1 姜黄素对 EC9706 细胞周期的影响 (%)

Table 1 The effect of $30 \mu\text{mol/L}$ curcumin on the cell cycle of EC9706 cells (%)

组别/周期 group/phase	Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照(control)	1.52	44.57	23.85	30.06
处理组(treatment)	20.64	50.08	9.62	19.66

3. 姜黄素处理前后光镜与电镜观察结果

3.1 HE 染色: 结果显示, 对照组人食管癌 EC9706 细胞群体排列不规则, 汇合处呈上皮样排列。个体细胞形状不规则, 呈圆形、梭形、多边形等不规则形态。细胞体积较小, 细胞核大, 核内常见多个核仁, 多达 3~5 个, 大且深染。细胞质铺展, HE 染色不均匀, 着色深浅不一。较常见癌巨细胞、多核细胞以及多极分裂象细胞 (图 2A)。经 $30 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理之后, 细胞群体较为规则, 个体细胞形状较规则, 多为圆形。细胞形态较一致, 核仁数目减少, 核固缩、核凝聚现象增多, 核质比例较小, 着色深浅较

均一。同时癌巨细胞、多核细胞及多极分裂象细胞减少 (图 2B)。

3.2 Hoechst 染色结果: Hoechst 染色结果显示, 对照组 EC9706 细胞核结构完整, 荧光呈弥散状, 着色较均匀 (图 2C)。经 $30 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, 细胞核碎裂, 染色质凝聚, 出现浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光, 荧光发光强度不均匀 (图 2D)。

3.3 扫描电镜观察: 全细胞扫描电镜结果显示, 对照组 EC9706 细胞较铺展, 贴壁性强, 核质比大, 细胞表面微绒毛多, 遍布整个细胞外周, 胞质外并有许多长纤维丝与邻近细胞接触 (图 3A); 姜黄素处理组细胞大部分成固缩状态, 细胞凝成球形, 只有少量胞质与玻片接触, 细胞表面有不规则球状突起, 表面微绒毛逐渐退化直至消失, 至凋亡后期, 可见凋亡小体从细胞表面分离, 细胞逐渐裂解 (图 3B, 3C)。

3.4 透射电镜观察: 超薄切片经透射电子显微镜观察显示, EC9706 细胞核质比较大, 细胞核大且形状不规则, 细胞核内多见异染色质, 呈团块状散在分布于核内以及核膜部位; 细胞质内, 细胞器较少, 线粒体数量少, 线粒体体积小, 形状不规则, 常可见呈深色负染, 细胞表面有微绒毛突起 (图 3D)。经姜黄素处理后的 EC9706 细胞的超微结构产生了明显的变化。细胞核质比减小, 细胞核固缩, 染色质边聚, 核内出现了透明区域; 细胞质空泡化明显; 细胞膜皱缩但完整, 细胞器数目减少, 线粒体增多, 肿胀; 内质网网腔扩大; 可见体积小、数目多的凋亡小体 (图 3E, 3F)。高倍透射电镜观察选择性抽提后的细胞核基质-核纤层-中间纤维系统 (NM-L-IF), 显示对照

组 EC9706 细胞的核基质-核纤层-中间纤维系统的连接紧密,而经姜黄素处理后,EC9706 细胞的核基质-核纤层-中间纤维系统中纤维丝数量较少,更加杂乱无章,核基质、中间纤维与核纤层连接也较对照组稀疏,核基质纤维比对照组明显稀疏,且有断裂趋势(图 3G, 3H, 3I)。

4. DNA 的琼脂糖凝胶电泳实验结果

经琼脂糖电泳显示,随着姜黄素处理时间的延长,EC9706 细胞的 DNA 产生了 180 ~ 200bp 倍数级左右的小分子 DNA 梯度条带(图 4)。表明姜黄素处理的细胞的 DNA 分子以核小体片段长度为单位发生了断裂。这是细胞凋亡的典型特征之一。

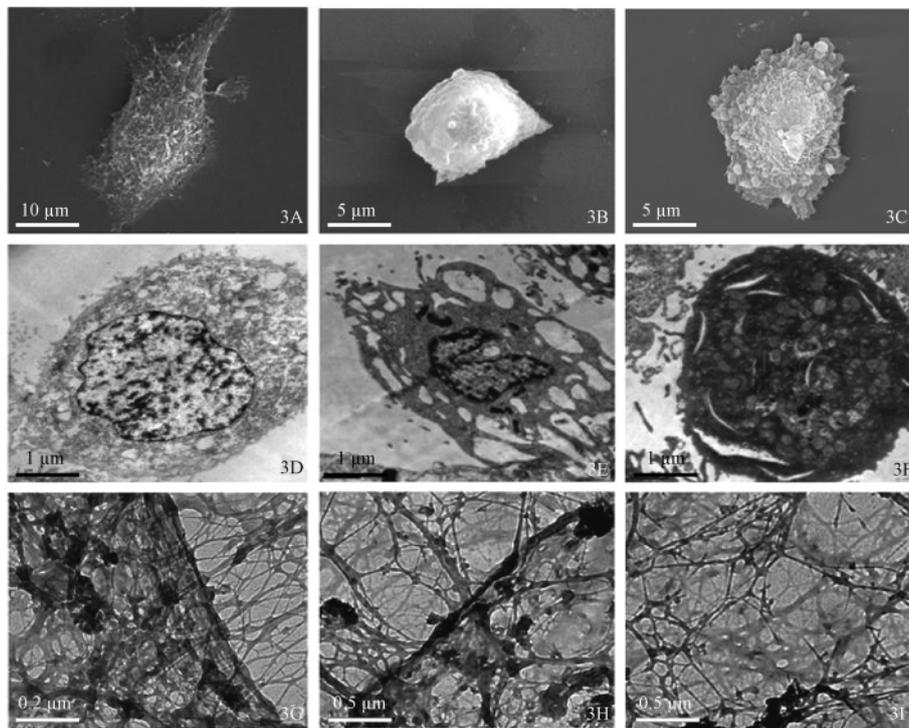


图 3 扫描电镜与透射电镜观察姜黄素处理诱导 EC9706 细胞凋亡前后细胞超微结构变化。

- A. 扫描电镜观察示对照组 EC9706 细胞形态。细胞形态铺展,细胞质、细胞核较明显,细胞贴壁性强,表面有许多微绒毛凸起。
- B. 扫描电镜观察示经 8 mg/L 姜黄素处理 EC9706 细胞。细胞凋亡开始不久,细胞收缩变圆成球状,贴壁面积减小,细胞核隆起,细胞质体积小,细胞表面微绒毛减少。
- C. 扫描电镜观察示经 8mg/L 姜黄素处理 EC9706 细胞。凋亡进入后期,有较多的凋亡小体凸起于细胞表面。
- D. 透射电镜观察示对照组 EC9706 细胞超微结构。
- E. 透射电镜观察示 8mg/L 姜黄素处理后的 EC9706 细胞超微结构,线粒体肿胀,染色质边聚化。标尺示 1 μ m。
- F. 透射电镜观察示 8mg/L 姜黄素处理后的 EC9706 细胞超微结构,出现致密核。标尺示 1 μ m。
- G. 对照组 EC9706 细胞核基质-核纤层-中间纤维系统透射电镜高倍观察结果,纤维丝致密、杂乱无章,核基质、中间纤维与核纤层连接比较紧密。标尺示 0.2 μ m。
- H. 姜黄素处理组 EC9706 细胞核基质-核纤层-中间纤维系统透射电镜高倍观察结果,纤维丝数量较少,更加杂乱无章,且有趋于断裂现象,核基质、中间纤维与核纤层连接也较对照组稀疏。标尺示 0.5 μ m。
- I. 姜黄素处理组 EC9706 细胞核基质透射电镜观察结果,核基质纤维比对照组明显稀疏,且有断裂趋势。标尺示 0.5 μ m。

Fig. 3 The ultrastructural changes in EC9706 cells before and after curcumin treatment, observed by using scanning and transmission electron microscopy (TEM).

A, Scanning electron micrograph showing the EC9706 cells in the control possessed strong adhesion through microvilli; B, Scanning electron micrograph showing that after treatment with 8mg/L curcumin, the EC9706 cells shrink with little microvilli; C, Scanning electron micrograph showing many apoptotic bodies after treatment with 8mg/L curcumin; D, Transmission electron micrograph showing the ultrastructure of EC9706 cells; E, Transmission electron micrograph showing the ultrastructure of EC9706 cells treated with 8mg/L curcumin. Chromatin accumulated along the inner side of nucleus, Bar = 1 μ m; F, Transmission electron micrograph showing the ultrastructure of EC9706 cells treated with 8mg/L curcumin, Bar = 1 μ m; G, The result of the nuclear matrix-lamina-intermediate filament of the control group EC9706 cells under high-power TEM. Dense and disordered fibers are observed. The nuclear matrix, the intermediate filament, and the lamina have tight conjunctions, Bar = 0.2 μ m; H, The result of the nuclear matrix-lamina-intermediate filament in the curcumin-treated EC9706 cells under high-power TEM. The fibers are fewer, more disordered, and are prone to breakage. The nuclear matrix, the intermediate filament, and the lamina conjunction are sparser than those in the control group, Bar = 0.5 μ m; I, The result of the nuclear matrix of the curcumin-treated EC9706 cells observed under high-power TEM. Compared with the control group, the nuclear matrix fibers are sparser and more prone to breakage, Bar = 0.5 μ m.

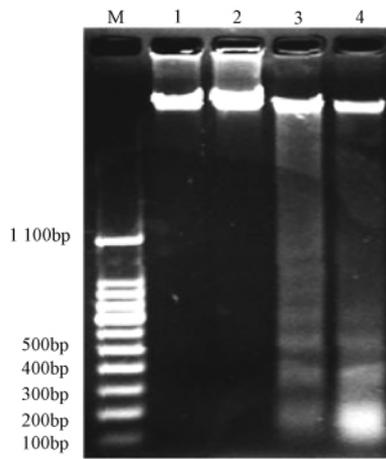


图 4 EC9706 细胞 DNA 的琼脂糖电泳
泳道 M. DNA 分子量标准; 泳道 1. 对照组 EC9706 细胞电泳图;
泳道 2. 姜黄素处理 24h DNA 电泳图; 泳道 3. 姜黄素处理 48h
DNA 电泳图; 泳道 4. 姜黄素处理 72h DNA 电泳图
Fig. 4 DNA agarose electrophoresis of EC9706 cells
M , DNA marker; Lane 1 , Control group; Lane 2 , Group treated with
curcumin for 24hours; Lane 3 , Group treated with curcumin for 48
hours; Lane 4 , Group treated with curcumin for 72 hours

5. 双向电泳与凝胶图像分析结果

对照组 EC9706 细胞与姜黄素处理组细胞提取

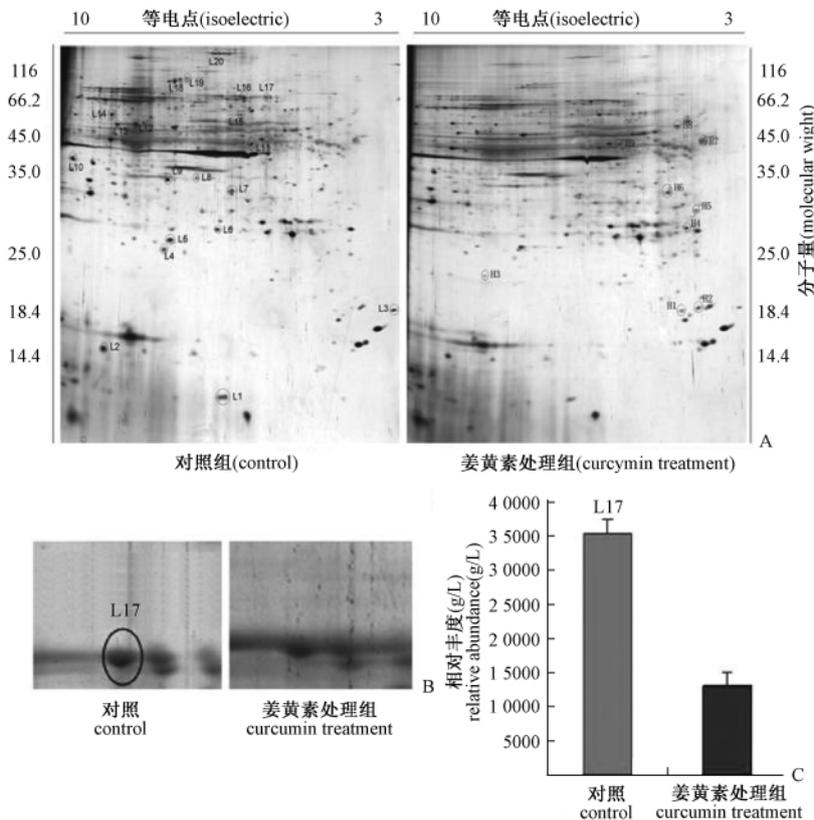


图 5 EC9706 细胞核基质蛋白的双向凝胶电泳(银染)
A. 姜黄素处理前后的 EC9706 细胞核基质蛋白的双向凝胶电泳图; B. 鉴定为 HSP70 的蛋白点放大图; C. HSP70 的相对表达水平变化。

Fig. 5 2-D PAGE gels of nuclear matrix proteins from EC9706 cells (silver staining)

A , 2-D PAGE gels of nuclear matrix proteins from EC9706 cells before and after curcumin treatment; B , Enlarged maps of changed expression of HSP70 from EC9706 cells; C , Relative expression level of HSP70 in clear matrix

的核基质蛋白双向电泳均重复 3 次以上 ,采用 Bio-Rad 公司的凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 对采集到的双向电泳图像进行定量分析。图 5A 中的 L17 是鉴定为 HSP70 的蛋白质点;图 5B 为 HSP70 的蛋白质点局部放大图像;图 5C 显示了 HSP70 的蛋白质点在处理前后细胞核基质上的表达量差异。

6. MALDI-TOF 质谱分析、数据库检索及 Western blotting 验证

差异表达的蛋白质点经 MALDI-TOF 质谱的肽指纹数据分析与数据库检索 ,鉴定差异表达的蛋白质点 L17 为 HSP70 蛋白 ,其分子量及等电点理论值与双向电泳实验观察结果基本相符(表 2)。

经 SDS-PAGE 电泳分离与半干式转膜方式将蛋白转移到 PVDF 膜上进行 Western blotting 分析。阴性对照组以不含一抗的孵育液代替一抗进行孵育 ,应用 ECL 进行蛋白检测。阴性对照未见蛋白条带;各标本与相应抗体反应后 ,也仅在与待测蛋白分子量附近有反应条带 ,显示抗体特异性好。HSP70 的分子量约为 70kD ,Western blotting 结果显示 ,对照组中 HSP70 蛋白的表达水平较姜黄素处理组高 ,在核基质蛋白样品中对照组的表达水平高于姜黄素

表 2 蛋白质鉴定结果(MASCOT 数据库)

Table 2 Proteins identified by using MASCOT database (www. matrixscience. com)

蛋白点编号 spot No.	蛋白质名称 protein name	检索号 accession No.	分子量 Mol. mass calc(D)	等电点 pI (calc)	得分 score	匹配肽段数 matching peptides
L17	HSP70	gi14529894	70760	5. 76	58	7

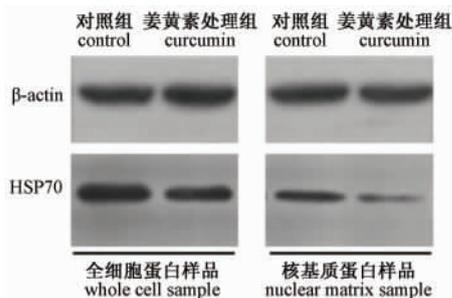


图 6 Western blotting 实验显示 ,全细胞和核基质蛋白组中 HSP70 在姜黄素处理前后变化

Fig. 6 The results of Western blotting showing the expression of HSP70 in the whole cell lysates and nuclear matrix lysates from EC9706 cells

处理组(图 6)。

7. HSP70 与凋亡相关基因表达产物在人食管癌 EC9706 细胞内的共定位关系

用鼠抗人 HSP70 抗体分别和兔抗人 Bcl-2、Bax 等特异性抗体配对组合 ,对 EC9706 细胞进行双重免疫荧光染色 ,羊抗鼠二抗以红色荧光染料 CY3 标记 ,羊抗兔二抗抗体以绿色荧光染料 FITC 标记 ,激光扫描共焦显微镜观察 HSP70 及相应基因产物的定位关系及其变化 ,两者共定位部位叠加后为黄色或橙黄色(图 7)。

7.1 HSP70 与抑凋亡基因 bcl-2 表达产物在 EC9706 细胞内的共定位关系: 免疫荧光双标记观察结果显示 ,在人食管癌 EC9706 细胞中 ,代表 Bcl-2 的绿色荧光在整个细胞中都有分布 ,细胞质中靠近核膜区域荧光较强; 代表 HSP70 的红色荧光在整个细胞区域内均有分布 ,其中细胞核中的荧光相对较强 ,分布较均匀 ,细胞质中的荧光相对较弱; 叠加荧光显示 ,两种颜色的荧光在核质区域中有共定位关系 ,但共定位荧光不显著。

经姜黄素处理后 ,细胞中绿色荧光与红色荧光主要都分布于细胞核区域内 ,核区域内荧光较强 ,部分细胞核区域内可见团块状的荧光; 叠加的黄色荧光显示 ,两种蛋白的共定位关系在核质中有所增强(图 7)。

7.2 HSP70 与促凋亡基因 bax 表达产物在 EC9706 细胞内的共定位关系: 免疫荧光双标记观察结果显示 ,人食管癌 EC9706 细胞中 ,代表 Bax 的绿色荧光分布较均匀 ,在整个细胞区域内均有分布; 代表 HSP70 红色荧光在整个细胞区域内均有分布 ,核质

中的红色荧光较强 ,主要呈散点状分布 ,核周的荧光较密集 ,部分靠近核周区域的荧光呈团块状 ,细胞质区域内的荧光较为弥散 ,靠近核周处相对较强; 叠加荧光显示 ,两者在核质及细胞质区域中具有分布广泛的共定位关系 ,核周及核质区域的共定位荧光较强。

经姜黄素处理后 ,绿色荧光分布集中于细胞核及核周; 红色荧光主要分布与细胞核。叠加荧光显示两者的共定位区域主要位于核周及细胞质区域内 ,提示诱导处理后两者在细胞内的共定位区域有向核质转移的趋势(图 7)。

讨 论

1. 姜黄素对 EC9706 细胞有显著的凋亡诱导作用

细胞凋亡具有的特征性改变 ,是鉴定细胞凋亡的重要指标。本研究表明 ,姜黄素诱导处理 7d 后 ,EC9706 细胞增殖受到明显抑制 ,细胞生长抑制率达 83. 88% ,细胞周期出现明显的凋亡峰 ,亚 G₀/G₁ 期细胞比例高达 20. 64%。光镜与电镜观察结果显示 ,经姜黄素诱导处理后的 EC9706 细胞出现了细胞体积缩小、核质比例减小、细胞核固缩、核内染色质凝聚、线粒体肿胀、内质网网腔扩大、形成凋亡小体及细胞骨架系统趋于断裂解体等显著的细胞凋亡特征。琼脂糖凝胶电泳显示 EC9706 细胞出现凋亡典型的 DNA 梯状条带。Hoechst 核染色显示细胞核内出现浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光。

这些观察结果与公认的细胞凋亡的变化相同 ,也与我们实验室应用姜黄素诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞^[10,11] 凋亡的变化特征相一致 ,从而证实了姜黄素对人食管癌 EC9706 细胞的凋亡具有显著诱导作用。

2. HSP70 在核基质中的存在及其在 EC9706 细胞凋亡过程中的表达变化

研究表明 ,HSP70 不仅在多种恶性肿瘤细胞^[5-7] 中有高水平表达 ,并通过基因调节以及免疫应答而发挥抗凋亡作用^[8,9]。也有研究表明 ,HSP70 在调控肿瘤细胞凋亡时具有双向性 ,HSP70 在某些条件下还具有促肿瘤细胞凋亡的作用。Dressel 等^[12] 报道 ,用鼠 HSP70 基因转染人类黑色素瘤细胞后 HSP70 过表达 ,促进了 CTL 介导的肿瘤细胞凋亡。因此 ,HSP70 对于肿瘤细胞的作用十分复杂 ,有促进肿瘤细胞凋亡作用 ,也有抑制凋亡作用。

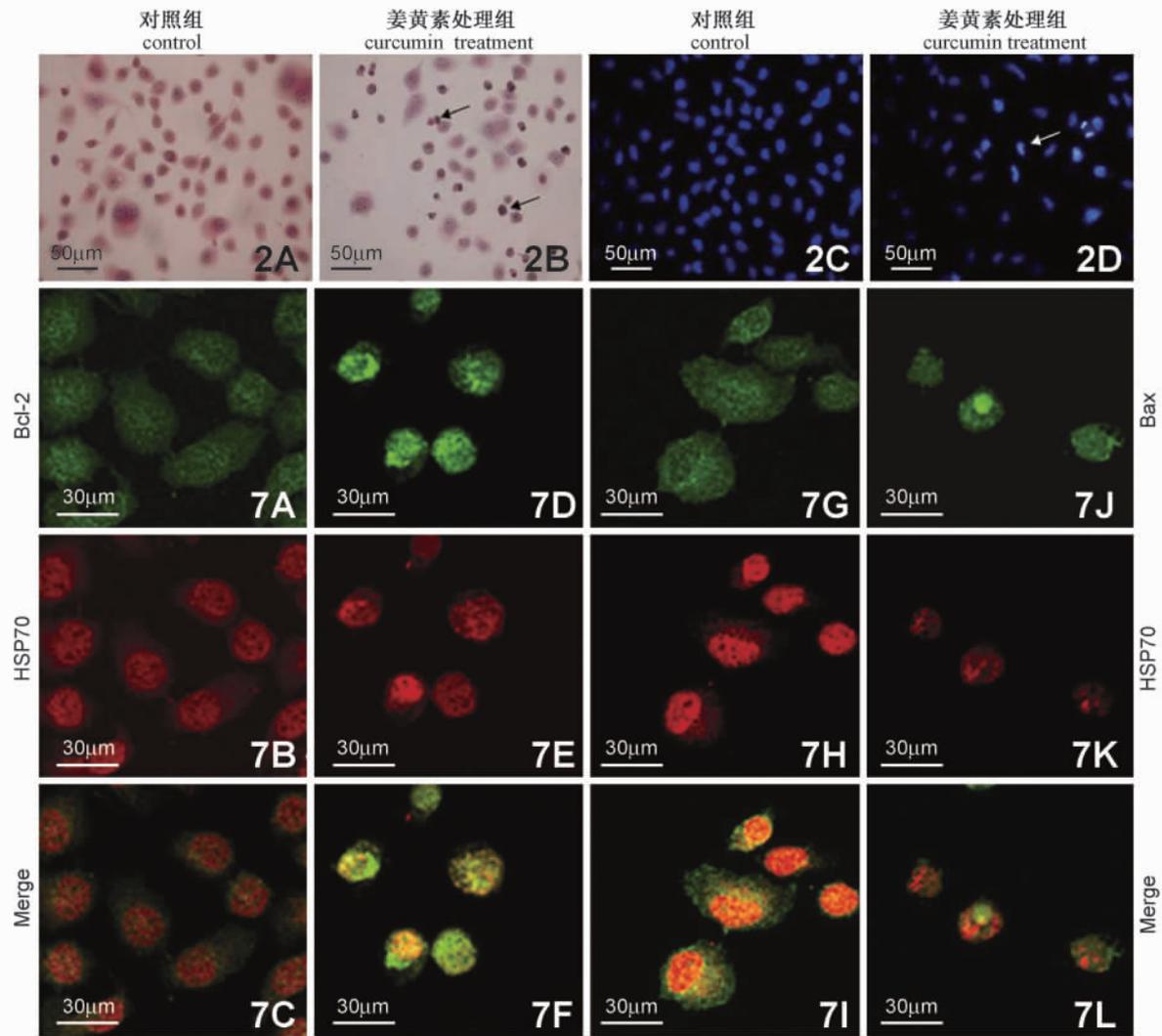


图 2 光镜观察姜黄素处理前后 EC9706 细胞形态变化 标尺示 50 μ m

A. HE 染色显示 EC9706 细胞群体排列不规则,细胞呈多种不规则形态,核质比例大; B. 经姜黄素处理后的 EC9706 细胞形状变圆,体积变小,核质比减小,核固缩、核凝聚现象增多,细胞核碎裂并出现浓染致密的固缩形态或颗粒等典型的凋亡特征; C. Hoechst 染色显示 EC9706 细胞在荧光显微镜下细胞核完整,着色均匀,荧光成弥散状,比较黯淡; D. 经姜黄素处理后,细胞核发生明显的变化,出现月牙状,发生裂解,染色质凝聚,并聚集到核内膜附近,着色不均匀,荧光比较明亮。

图 7 免疫荧光标记-激光扫描共聚焦显微镜观察显示,HSP70 与 Bcl-2 及 Bax 在 EC9706 细胞中的共定位关系 标尺示 30 μ m

A、B、C. 分别显示 Bcl-2 和 HSP70 在细胞中的定位荧光及荧光叠加情况,共定位荧光较弱; D、E、F. 分别显示姜黄素处理后 Bcl-2 和 HSP70 在细胞内分布情况与共定位关系,两者在核内具有较强的共定位荧光。G、H、I. 分别显示 Bax 和 HSP70 在 EC9706 细胞中的定位荧光及荧光叠加情况,共定位荧光较强,分布于细胞核与胞质; J、K、L. 分别显示姜黄素处理后 Bax 和 HSP70 在 EC9706 细胞中的定位及共定位荧光,共定位荧光减弱并分布于核内

Fig. 2 Morphological changes of the EC9706 cells before and after the curcumin treatment under the optical microscope Bar = 50 μ m

A, EC9706 cells in a variety of irregular shape with irregular cell groups and a large proportion of nucleus and cytoplasm, shown on haematoxylin- and eosin-stained sections; B, After the treatment of curcumin, cell shrinkage, nuclear fragmentation, chromatin condensation, chromosomal DNA fragmentation and other typical characteristic of cell apoptosis; C, EC9706 cells display the integrity nucleus, even coloring, diffuse fluorescence and compared dim under the fluorescence microscopy, shown on Hoechst dyeing; D, After the treatment of curcumin, the nucleus becomes crescent shape and fragmentation; the chromatin condenses and gathers near to the inner nuclear membrane with uneven coloration but with a bright fluorescence.

Fig. 7 Immunofluorescence-laser confocal microscopy revealed the co-localization of HSP70 with Bcl-2 and Bax in EC9706 cells Bar = 30 μ m

A, B, C, The fluorescence of the co-localization of Bcl-2 with HSP70 is weak; D, E, F, The intracellular distribution and co-localization of Bcl-2 with HSP70 after curcumin treatment. A strong co-localization is apparent in the nucleus; G, H, I, The co-localization of Bax with HSP70 is strong in both the cytoplasm and the nucleus; J, K, L, The co-localization of Bax with HSP70 decreases and only distributes in the nucleus after the treatment of curcumin.

本实验双向凝胶电泳分析、质谱鉴定及 Western blotting 实验结果均显示, HSP70 存在于人食管癌 EC9706 细胞核基质组分中, 并在姜黄素诱导处理后细胞核基质中表达下调。有关 HSP70 在肿瘤细胞凋亡中核基质上的变化目前未见报道。我们推测, 这可能与 HSP70 的抗凋亡功能有关, 在细胞过度增殖的时候, HSP70 维持细胞的生存。而经姜黄素处理后 HSP70 的表达下调, HSP70 对 EC9706 细胞的保护作用消失, 更易发生凋亡。HSP70 是决定肿瘤细胞命运的关键因素之一, 深入研究 HSP70 在细胞癌变和肿瘤细胞凋亡过程中的作用将为肿瘤的治疗带来新的希望。

HSP70 广泛分布于细胞核、细胞质和一些细胞器中, 参与细胞生命活动的重要过程^[13, 14], 并在细胞胁迫条件下集中于细胞核内^[2]。我们用电镜观察发现, EC9706 细胞的核基质-中间纤维(NM-IF)系统在凋亡前后发生了显著的形态改变, 出现了趋于断裂解体的凋亡特征。双向电泳和质谱结果显示, HSP70 是核基质蛋白, 在 EC9706 细胞凋亡后表达下调。Western blotting 实验证实了这一结果。HSP70 蛋白在核基质组分中的存在及其在肿瘤细胞凋亡中表达下调的变化, 尚未见报道。核基质是细胞核内 DNA 复制、转录和 RNA 合成、加工修饰的重要场所, 聚集着众多参与调控生命活动的重要功能蛋白。HSP70 在 EC9706 细胞核基质中的存在及其表达变化, 提示其在肿瘤细胞增殖与凋亡过程中起着重要作用。前人认为, HSP70 蛋白作为分子伴侣在肿瘤细胞中的高表达增强了肿瘤细胞的抗凋亡能力, 使细胞的生长抑制效应和死亡减弱^[15]。因此, 姜黄素处理后 EC9706 细胞核基质组分中 HSP70 蛋白表达下调变化, 可能是启动 EC9706 细胞凋亡的一个重要步骤。

3. HSP70 与凋亡相关基因产物的共定位关系及其在 EC9706 细胞凋亡过程中的变化

HSP70 以其特殊的分子伴侣作用, 与多种蛋白质形成复合体, 参与有关蛋白质的折叠、组装、细胞内运输及降解等过程, 以调节靶蛋白的活性和功能^[16]。HSP70 是肿瘤细胞生存所必需的, 表达 HSP70 有助于细胞的生存和增殖^[15]。大量研究认为, HSP70 是抗凋亡蛋白。但也有研究表明, HSP 在有些情况下具有促进细胞凋亡的作用^[17], 因此, HSP70 蛋白对细胞凋亡的调控作用具有双向性, 其调控细胞凋亡的机制尚有待阐明。

本实验激光扫描共焦显微镜观察结果显示, HSP70 与 Bcl-2 在细胞核有较弱的共定位荧光, 姜黄素诱导处理后共定位荧光增强, HSP70 与 Bcl-2 的共定位提示它们之间可能存在的相互作用关系。

Bcl-2 蛋白是目前研究的比较深入、广泛的凋亡调控蛋白, 能阻止细胞凋亡。目前尚无 HSP70 与 Bcl-2 相互作用的报道, 因此, 对 HSP70 和 Bcl-2 的可能相互作用进行深入研究, 对于揭示肿瘤细胞凋亡诱导的分子机制具有重要的意义。

本实验激光扫描共焦观察结果显示, 在对照组细胞中, HSP70 和 Bax 在细胞核及细胞质中有共定位现象, 经姜黄素处理后, 细胞质中的共定位荧光减弱, 共定位荧光主要集中在细胞核中并减弱。提示它们之间的相互作用发生了变化。HSP70 和 Bax 在细胞内存在相互作用, 可以引起 Bax 蛋白构象发生变化, 通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)介导的 Bcl-2 家族蛋白的磷酸化来阻止细胞凋亡。Stankiewicz 等^[18]研究表明, HSP70 阻断热诱导凋亡主要是通过抑制 Bax 的活性。在 HSP70 高表达的细胞中, Bax 活化之后的所有事件全部被抑制, 从而阻止了细胞凋亡的发生。因此, HSP70 这种抗细胞凋亡的功能可以通过调节 Bax 的活性来实现。综合前人研究的一些成果, 我们推测姜黄素诱导 EC9706 细胞改变了 HSP70 与 Bax 之间的相互作用, 从而诱导了凋亡。HSP70 与 Bax 之间相互作用与变化的深入研究, 对于阐明肿瘤细胞凋亡诱导机制具有重要的科学意义。

综上所述, HSP70 的细胞定位、表达水平及其与凋亡相关蛋白的共定位区域在人食管癌 EC9706 细胞凋亡过程中均发生了明显的变化, 说明 HSP70 可能作为姜黄素作用的靶向性蛋白, 并通过与细胞凋亡相关蛋白的协同作用, 共同调控细胞的凋亡。进一步研究 HSP70 在核基质上的功能及其与凋亡相关基因表达产物的相互作用机制, 对于揭示细胞凋亡的调控机制具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Nishikawa M, Otsuki T, Ota A, et al. Induction of tumor-specific immune response by gene transfer of Hsp70-cell-penetrating peptide fusion protein to tumors in mice [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 421-428.
- [2] Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, et al. Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14(4): 391-406.
- [3] Zhao X, Wei YQ. Increase in thermosensitivity of cervical cancer and ovarian cancer cells by HSP70 antisense oligodeoxynucleotides [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2000, 22(2): 99-101. (in Chinese)
赵霞, 魏于全. HSP70 反义寡脱氧核苷酸增强宫颈癌和卵巢癌细胞的热敏感性[J]. *中华肿瘤杂志*, 2000, 22(2): 99-101.
- [4] Chen Y, Zhao M, Wang S, et al. A novel role for DYX1C1, a chaperone protein for both Hsp70 and Hsp90, in breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(9): 1265-1276.

- [5]Maehara Y ,Oki E ,Abe T , et al. Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer[J]. *Oncology* ,2000 ,58(2) : 144-151.
- [6]Lu QF ,Bai M ,Zhang HJ , et al. Co-detection of P21 ,P53 and HSP70 and their possible role in diagnosis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-related lung cancer[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases* ,2003 ,21(5) : 359-361. (in Chinese)
卢桥发 ,白明 ,张焕景 等. P21、P53 蛋白及热应激蛋白 70 水平检测对多环芳烃相关肺癌的诊断价值[J]. *中华劳动卫生职业病杂志* ,2003 ,21(5) : 359-361.
- [7]Li H ,Sui C ,Kong F , et al. Expression of HSP70 and JNK-related proteins in human liver cancer: Potential effects on clinical outcome [J]. *Dig Liver Dis* ,2007 ,39(7) : 663-670.
- [8]Kumar S ,Deepak P , Acharya A. Hsp70 induces Th1 polarization through tumor-associated macrophages in a T-cell lymphoma [J]. *Neoplasma* ,2007 ,54(2) : 113-122.
- [9]Tanimura S ,Hirano AI ,Hashizume J , et al. Anticancer drugs up-regulate HspBP1 and thereby antagonize the prosurvival function of Hsp70 in tumor cells[J]. *J Biol Chem* ,2007 ,282(49) : 35430-35439.
- [10]Zhao ZL ,Li QF ,Zheng YB , et al. The aberrant expressions of nuclear matrix proteins during the apoptosis of human osteosarcoma cells[J]. *Anat Rec (Hoboken)* ,2010 ,293(5) : 813-820.
- [11]Li QF ,Zheng YB ,Yang HB , et al. Changes of nuclear matrix proteins during apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells induced by curcumin[J]. *Journal of Molecular Cell Biology* ,2008 ,41(6) : 473-481. (in Chinese)
李祺福 ,郑燕彬 ,杨海波 ,等. 姜黄素诱导人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡过程中核基质蛋白表达的变化[J]. *分子细胞生物学报* ,2008 ,41(6) : 473-481.
- [12]Dressel R ,Elsner L ,Quentin T , et al. Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to CTL [J]. *J Immunol* ,2000 ,164(5) : 2362-2371.
- [13]Noonan EJ ,Place RF ,Giardina C , et al. Hsp70B' regulation and function[J]. *Cell Stress Chaperones* ,2007 ,12(4) : 393-402.
- [14]Anwar A ,Siegel D ,Kepa JK , et al. Interaction of the molecular chaperone Hsp70 with human NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 [J]. *J Biol Chem* ,2002 ,277(16) : 14060-14067.
- [15]Nylandsted J ,Brand K ,Jäättelä M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells [J]. *Ann N Y Acad Sci* ,2000 ,926: 122-125.
- [16]Bukau B ,Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines [J]. *Cell* ,1998 ,92(3) : 351-366.
- [17]Dressel R ,Elsner L ,Quentin T , et al. Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to CTL [J]. *J Immunol* ,2000 ,164(5) : 2362-2371.
- [18]Stankiewicz AR ,Lachapelle G ,Foo CP , et al. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation [J]. *J Biol Chem* ,2005 ,280(46) : 38729-38739.

(编辑 安晓意)

授权声明和维权律师函

《解剖学报》已经与北京万方数据股份有限公司签署了数字版权独家合作协议,《解剖学报》自 2012 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日将数字版权独家授予北京万方数据股份有限公司。北京万方数据股份有限公司在此期间拥有《解剖学报》的数字版复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权及有关收益权。其他任何机构和个人使用上述期或文献数据 均为非法。《解剖学报》已授权北京万方数据股份有限公司以其名义进行维权。

特此声明!

《解剖学报》编辑部