文章编号:1000-5404(2006)21-2177-03

论著

SAPK/JNK信号通路在鼻咽癌放疗群集耐受中的作用研究

栾 巍,黄海辉,梁后杰 (第三军医大学西南医院肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 用CNE-2Z多细胞球(multicellular spheroids,MCSs)模拟实体瘤,探讨SAPK/JNK信号通路在鼻咽癌放疗群集耐受中的作用。**方法** 采用liquid overlay技术进行MCSs培养,Western blot法检测X射线照射后信号通路活性变化,SAPK/JNK信号通路特异阻断剂sp-600125作用前后Caspase-3蛋白表达变化;TUNEL法检测sp-600125作用前后、X射线照射后MCSs凋亡率变化。**结果** X射线照射后MCSs中SAPK/JNK信号通路表现动态磷酸化过程,其中2h磷酸化水平最高;预先阻断信号通路X射线照射后,细胞凋亡率上调($P<0.05$),caspase-3蛋白表达增高($P<0.05$)。**结论** SAPK/JNK信号通路短暂激活可能传递生存信号而在鼻咽癌放疗群集耐受中发挥作用,特异性阻断其信号传递上调MCSs凋亡率,这可能与促进caspase-3蛋白表达有关。

关键词:人鼻咽癌细胞系CNE-2Z;细胞凋亡;SAPK/JNK信号通道;sp-600125
中图法分类号:R329.2;R730.55;R739.63 **文献标识码**:A

Role of SAPK/JNK signaling pathway in multicellular resistance to radiotherapy for human nasopharyngeal carcinoma

LUAN Wei, HUANG Hai-hui, LIANG Hou-jie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective Taking CNE-2Z multicellular spheroids (MCSs) as the simulation of solid tumors, to investigate the role of SAPK/JNK signaling pathway in multicellular resistance to radiotherapy for human nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** Human NPC cell line CNE-2Z were cultured into multicellular spheroids by using liquid overlay technique, then divided into control MCSs, irradiated MCSs (average dose in one minute: 2 Gy), sp-600125(a specific inhibitor for SAPK/JNK signaling pathway) + irradiated MCSs, sp-600125 + MCSs. Western blotting was employed to analyze the activity of SAPK/JNK signaling pathway in MCSs, and the expression of Caspase-3 protein before and after sp-600125 treatment; X-ray induced cell apoptotisis in MCSs before and after sp-600125 treatment was detected by TUNEL. **Results** The level of SAPK/JNK phosphorylation in MCSs was a dynamic course after radiation, and the phosphorylation peaked at 2 h after irradiation; The apoptotic rate of MCSs ($P<0.05$) and the expression of Caspase-3 protein ($P<0.05$) were significantly increased after sp-600125 treatment. **Conclusion** The transient activation of SAPK/JNK plays an important role in multicellular resistance to radiotherapy for human NPC *via* mediating survival signals, block this pathway so as to accelerate cell apoptosis. The increased apoptosis of MCSs by blocking SAPK/JNK signaling pathway may be related to the increased expression of Caspase-3.

Key words: human NPC cell line CNE-2Z; apoptosis; SAPK/JNK signaling pathway; sp-600125; multicellular resistance

实体瘤对放射治疗的抵抗是影响放疗疗效的重要原因之一。研究表明,实体瘤的放疗敏感性与单层培养的肿瘤细胞显著不同;在三维培养时,肿瘤细胞对细胞毒药物和放射线等治疗的耐受性比单层细胞明显增强,而与在体肿瘤相近,即群集耐受性(multicellular resistance)[1]。JNK(c-Jun N-terminal protein kinase)信号转导途径是MAPK信号转导途径的亚族之一,由于JNK信号传递途径在细胞应激反应中起重要作用,可被细胞外应激信号激活,故被称为应激活化的蛋白激酶(stress activated protein kinase,SAPK)。许多在细胞外触发凋亡的刺激因子都能活化SAPK/JNK信号通路,表明该通路在环境应激诱导的凋亡过程中可能发挥着重要的作用。抑制细胞凋亡是肿瘤对治疗耐受的

作者简介:栾 巍(1977-),男,山东省淄博市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤耐药方面的研究。电话:13996431804,E-mail:luan1977@126.com
通讯作者:梁后杰,电话:(023)68754128
收稿日期:2006-08-13;修回日期:2006-09-27

重要原因，因此推测 SAPK/JNK 信号通路可能与群集耐受相互联系。采用 MCSs 模拟实体瘤，探讨其在群集耐受中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司；磷酸化 SAPK/JNK 多克隆抗体，Cell Signaling Technology 公司；sp-600125、Western blot 反应体系、上海康成生物科技公司；Caspase-3 单克隆抗体，北京中杉金桥生物技术有限公司；TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒，南京凯基生物科技发展有限公司；瓦里安 2300C/D 直线加速器，美国 Varian 公司。

1.2 细胞培养和照射条件

MCSs 培养采用 liquid overlay 技术[2]，主要步骤如下：①以灭菌后的 2% 琼脂糖平铺于六孔板底部使之形成凝胶层，②消化对数生长期的培养细胞，制成单细胞悬液，③取单细胞悬液分别加入已用琼脂糖铺底的六孔板中，置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养，④每天更换半量培养液。培养 5 d 左右，细胞球直径 100 μm 左右，实验采用培养 5 d 的细胞球。照射条件：室温下，Varian2300C/D 直线加速器 6 mV 的 X 射线照射，加 3 cm 标准等效填充物，平均剂量率 2 Gy/min。

1.3 Western blot 法检测 SAPK/JNK 信号通道活性和 caspase-3 蛋白表达

2 Gy X 射线照射 MCSs 后 SAPK/JNK 信号通道活性检测：分别设对照和 0.5、2、5 h 等 3 个时间点提取总蛋白检测。caspase-3 蛋白表达检测：分别设 MCSs 对照组、MCSs 2 Gy 照射组、sp-600125 + MCSs 2 Gy 照射组（sp-600125 加入培养基中 0.5 h后照射，终浓度 20 μmol/L），射线处理 24 h 后提取总蛋白检测。用 Gel-Pro Analyzer4.5 软件分析结果，蛋白的灰度值除以内参 GAPDH 的灰度值以校正误差，所得结果代表样品的蛋白相对含量。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

分别设 MCSs 对照组、MCSs 2 Gy 照射组、sp-600125 + MCSs 2 Gy 照射组、sp-600125 + MCSs 组（终浓度 20 μmol/L）。射线处理 24 h 后参照原位细胞凋亡试剂盒说明书进行操作（在分组前进行细胞计数，以保证每组细胞数基本一致）。凋亡率 =（凋亡细胞数/同视野细胞总数）×100%。

1.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验及单因素方差分析。

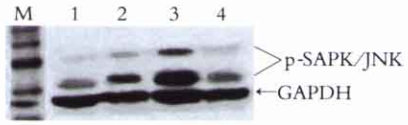
2 结果

2.1 细胞培养

MCSs 倒置显微镜观察：经过 5 d 培养，形成直径 100 μm 左右的 MCSs，细胞间的黏附广泛而且紧密。可以用于下面的实验。

2.2 SAPK/JNK 信号通道活性的检测

2.0 Gy X 射线照射 MCSs 后 30 min，SAPK/JNK 磷酸化蛋白表达明显增强（由 0.172 6 ± 0.019 9 上升至 0.484 6 ± 0.024 1），2 h 表达最强（0.690 6 ± 0.023 6），5 h 基本恢复原水平（0.198 2 ± 0.017 5）（图 1）。

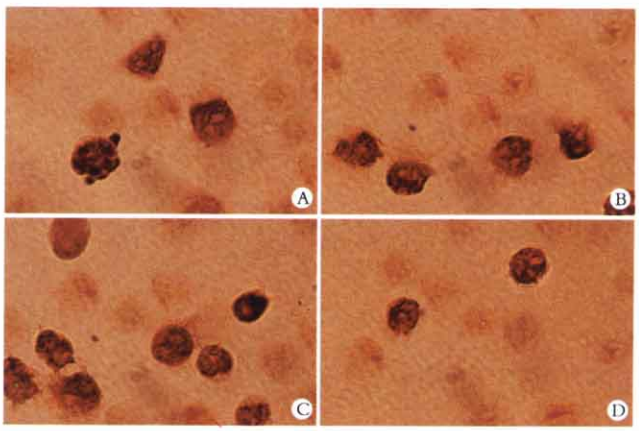


M：标准；1：MCSs 对照组；2：MCSs 2 Gy X 射线照射组，0.5 h；3：MCSs 2 Gy X 射线照射组，2 h；4：MCSs 2 Gy X 射线照射组，6 h

图 1 Western blot 检测 X 射线照射 MCSs SAPK/JNK 信号通道活性

2.3 细胞凋亡检测

MCSs 中存在一定的自发凋亡现象，凋亡率（10.08 ± 1.45）%；2.0 Gy X 射线照射后，MCSs 凋亡率（17.94 ± 1.98）%，照射前后凋亡率变化不显著（$P > 0.05$）；同时，单独阻断 SAPK/JNK 信号通道凋亡率（11.24 ± 1.89）%，加入 sp-600125 前后凋亡率变化不显著（$P > 0.05$）；MCSs + sp-600125 照射组凋亡率（33.37 ± 2.11）%，较之单纯照射组凋亡率显著上调（$P < 0.05$）（图 2）。

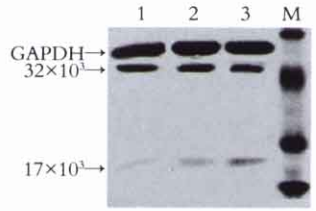


A：MCSs 对照组；B：MCSs 2 Gy X 射线照射组；C：MCSs + sp-600125 2 Gy X 射线照射组；D：MCSs + sp-600125 组

图 2 MCSs 细胞凋亡情况 （TUNEL ×200）

2.4 Caspase-3 蛋白表达检测

MCSs 对照组 caspase-3 蛋白表达相对含量 0.074 5 ± 0.003 2，MCSs 照射组 0.158 7 ± 0.013 2；MCSs + sp-600125 照射组 0.315 4 ± 0.027 8。MCSs + sp-600125 照射组 caspase-3 蛋白表达明显高于单纯照射组（$P < 0.05$）（图 3）。



M：标准；1：MCSs 对照组；2：MCSs 2 Gy X 射线照射组；3：MCSs + sp-600125 2 Gy X 射线照射组

图 3 Western blot 检测 caspase-3 蛋白表达

3　讨论

鼻咽癌是我国常见的恶性肿瘤之一，放射治疗是其主要的治疗手段，而电离辐射作用于细胞引起各种损伤导致细胞死亡的主要机制是诱导细胞发生凋亡[3]。降低鼻咽癌的放疗群集耐受性、上调肿瘤细胞凋亡率是提高放疗疗效的关键环节。本实验显示，2 Gy的 X 射线照射后 MCSs 凋亡率变化不显著（$P > 0.05$），亦体现了其群集耐受性。有研究认为，肿瘤的群集耐受现象不是获得性的，而是肿瘤的内在属性[4]。结构和功能是相互联系、不可分割的整体。本实验采用的 MCSs 从结构和某些特性上较好地模拟了实体瘤的情况，为研究肿瘤群集耐受现象提供了自然模型。如：MCSs 由呈向心性分布的细胞群组成，最里面是死亡细胞构成的中心，表面则是由生长分裂增殖旺盛的细胞组成，二者之间是相对静止的细胞；细胞间黏附广泛而紧密，偶可见镶嵌连接，线粒体、内质网等细胞器丰富；MCSs 中心缺氧，糖、ATP 含量下降，乳酸等代谢产物堆积，G_1 期细胞增多[5]。

SAPK/JNK 信号通路参与包括细胞生长、分化、转换、凋亡等过程，直接活化转录因子 c-Jun、ATF2（activating transcription factor 2）、Elk、p53、c-Myc。MKK4/7 协同磷酸化 SAPK/JNK 的丝苏氨酸残基，使其完全活化。关于 SAPK/JNK 信号通路在细胞凋亡（或生存）的中扮演的角色，目前还存在许多的争论。在正常细胞中，SAPK/JNK 信号通路的激活做为前凋亡事件导致 Bcl-2 家族的激活，接着诱导细胞色素 c 从线粒体释放；在紫外线诱导小鼠成纤维细胞凋亡的实验中，JNK 缺失导致线粒体死亡途径功能障碍，细胞色素 c 不能释放[6]。然而在肿瘤细胞中 SAPK/JNK 信号通路的角色一直没有得到完全的认同。在一些细胞类型中，JNK 下游底物 c-Jun 过表达对抗细胞毒药物的作用，采用反义 RNA 技术逆转了 c-Jun 的抵抗作用[7]；但是在另外一些细胞系中，c-Jun 缺失使得细胞对顺铂的治疗愈加耐受。

刺激有质的不同（激活不同的信号通路），有量的差异（以不同的强度和不同的持续时间来激活通路），信号传导途径能对它们产生不同的应答。就某条通路而言，高强度或长时间的刺激所产生的应答与低强度短时间的刺激所产生的应答是不一样的。Perona 等[8]指出，JNK 路径激活在细胞凋亡或生存中所扮演的角色，可能与 JNK 路径激活的持续时间相关。信号通道持续的激活过程可能促进细胞凋亡，而短暂的激活过程可能对于应激反应中细胞生存应答是重要的。本实验显示 MCSs 中 SAPK/JNK 信号通路被 X 射线激活，而且呈现短暂的动态磷酸化的过程，照射后 2 h 磷酸化蛋白表达水平最高，5 h 基本恢复原水平。这种短暂的激活过程可能参与了“生存信号”的传递，从而保护细胞避免进入凋亡程序，对抗 X 射线致凋亡作用。

细胞凋亡涉及一系列半胱氨酸蛋白酶 caspase 级联反应，在多种细胞和各种刺激因素的作用下，caspase-3 被认为是凋亡的关键执行者。caspase-3 处于该级联反应的下游，其通过与细胞内相应底物作用导致蛋白质降解、细胞质膜破坏、DNA 裂解而使细胞凋亡。本实验显示，阻断 SAPK/JNK 信号通路的信号传递过程，再用 2 Gy 的 X 射线照射后 MCSs 凋亡率明显上调，caspase-3 蛋白表达明显增加。

X 射线照射后触发了肿瘤细胞内一系列信号转导通路[9]，不仅涉及凋亡信号的激活和传递，而且涉及生存信号的激活和传递，肿瘤细胞的最终命运决定于双方力量的此消彼涨。我们要做的就是设法使平衡的天平倒向凋亡一边。具体涉及到本实验相关的细胞类型、培养方式、凋亡诱导方式、强度等众多实验因素，SAPK/JNK 信号通路短暂激活可能参与了生存信号的传递，特异性地阻断该信号传递过程，导致 MCSs 凋亡率上调；这种作用依赖于上调 Caspase-3 蛋白的表达。

参考文献：

[1] 梁后杰，黄海辉. 细胞黏附介导的肿瘤多细胞耐药[J]. 中华医学杂志，2004，84(24)：2142－2143.

[2] WALKER J，MARTIN C，CALLAGHAN R. Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy[J]. Eur J Cancer，2004，40 (4)：594－605.

[3] SHINOMIYA N. New concepts in radiation-induced apoptosis：‘premitotic apoptosis’ and ‘postmitotic apoptosis’[J]. J Cell Mol Med，2001，5(3)：240－253.

[4] FRANKEL A，MAN S，ELLIOTT P，*et al*. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341[J]. Clin Cancer Res，2000，6 (9)：3719－3728.

[5] HARRISON L B，CHADHA M，HILL R J，*et al*. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes[J]. Oncologist，2002，7(6)：492－508.

[6] TOURNIER C，HESS P，YANG D D，*et al*. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway[J]. Science，2000，288(5467)：870－874.

[7] HAYAKAWA J，OHMICHI M，KURACHI H，*et al*. Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade，differentially activated by cisplatin，sensitizes human ovarian cancer cell line[J]. J Biol Chem，1999，274(44)：31648－31654.

[8] PERONA R，SANCHEZ-PEREZ I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance[J]. Br J Cancer，2004，90(3)：573－577.

[9] DENT P，YACOUB A，FISHER P B，*et al*. MAPK pathways in radiation responses[J]. Oncogene，2003，22(37)：5885－5896.

（编辑　张大春）