

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000032

三基序蛋白 25 过表达对肺癌细胞 H1299 顺铂敏感性的影响

屈 灿¹, 邱 峰¹, 陈世知², 粟 林¹, 敬怀志¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院药剂科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第二医院核医学科, 重庆 400010)

【摘要】目的:初步探讨三基序蛋白 25(tripartite motif containing 25, TRIM25)过表达对人肺癌细胞株 H1299 顺铂敏感性的影响及其分子作用机制。**方法:**应用基因克隆技术构建 TRIM25 高表达质粒载体, 瞬时转染人肺癌细胞株 H1299, 荧光显微镜下观察转染效率, Western blot 法检测 TRIM25 蛋白表达水平及其过表达时丙酮酸激酶 M2(pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2)蛋白水平的变化。用顺铂分别处理转染前后的 H1299 细胞 24 h, MTT 法检测细胞耐药性, Annexin V/PI 双染法流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡。**结果:**同 H1299 空白组和转染 pGCMV/neo 空载体组比较, pGCMV-trim25 转染组细胞中 TRIM25 蛋白的表达水平明显增加($P=0.003$, $P=0.005$); 且 TRIM25 过表达时, 细胞中 PKM2 蛋白的表达水平降低($P=0.001$, $P=0.003$)。用顺铂处理后, pGCMV-trim25 转染组细胞的药物敏感性显著下降($P<0.001$), 转染组细胞凋亡率亦明显降低($P<0.001$)。**结论:**TRIM25 在肺癌细胞 H1299 中高表达时, 可能通过下调 PKM2 而降低对顺铂的敏感性。

【关键词】高表达载体; 三基序蛋白 25; 丙酮酸激酶 M2; 肺癌细胞 H1299; 药物敏感性

【中图分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-21

Effects of TRIM25 overexpression on drug sensitivity of human lung cancer cells H1299 to cisplatin

Qu Can¹, Qiu Feng¹, Chen Shizhi², Su Lin¹, Jing Huaizhi¹

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Nuclear Medicine, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of tripartite motif containing 25 (TRIM25) overexpression on the chemotherapeutic drug sensitivity of human lung cancer cell line H1299 to cisplatin and the molecular mechanisms. **Methods:** TRIM25 overexpression plasmid vector was constructed by gene cloning techniques and was transfected into H1299 cells. Efficiency of transfection was observed under fluorescence microscope. Western blot was used to determine the TRIM25 protein expression level and the change of pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) protein level when TRIM25 was overexpressed. After treating untransfected and transfected H1299 cells with cisplatin for 24 h, drug resistance was detected by MTT assay and apoptosis was detected by Annexin V/PI. **Results:** Compared with those of H1299 blank group and pGCMV/neo empty carrier group, TRIM25 protein levels of pGCMV-trim25 transfection group were significantly increased ($P=0.003$, $P=0.005$ respectively). Moreover, when up-regulating the TRIM25, PKM2 expression was reduced ($P=0.001$, $P=0.003$ respectively). After cisplatin treatment, drug sensitivity as well as apoptosis rate of pGCMV-trim25 transfection group were significantly decreased ($P<0.001$, $P<0.001$). **Conclusions:** Overexpression of TRIM25 protein in lung cancer cells H1299 could decrease the drug sensitivity to cisplatin by down-regulating expressions of PKM2.

【Key words】 overexpression vector; tripartite motif containing 25; pyruvate kinase isozyme type M2; lung cancer H1299 cells; drug sensitivity

化疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一, 多数化疗药物通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡等机制发挥抗肿瘤作用。但目前针对肺癌患者的化疗其有效

率依然很低, 而肿瘤细胞产生耐药性即对药物敏感性降低是导致化疗抵抗和治疗失败的主要原因^[1]。三基序蛋白 25(tripartite motif containing 25, TRIM25) 是 TRIM 家族成员之一, 有显著的生物多效性^[2-3]。有研究指出 TRIM25 作为一种致癌基因可能促进乳腺癌的发生^[4]。TRIM25 同时也是 14-3-3 σ 蛋白类泛素化 ISG15 途径中的 E3 连接酶, 而 14-3-3 σ 与细胞凋亡、细胞分裂信号传导和肿瘤细胞耐药等密切相

作者介绍: 屈 灿, Email: qcvivi2012@163.com,

研究方向: 肿瘤细胞耐药。

通信作者: 邱 峰, Email: qiufeng.cn@gmail.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研重点资助项目(编号: 2011-1-036)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000032.html>

关^[5-6]。本研究通过构建 pGCMV-trim25 高表达质粒载体,转染人肺癌细胞 H1299,以顺铂作为凋亡诱导因素,初步探讨 TRIM25 对肺癌细胞药物敏感性的影响及其分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肺癌细胞株 H1299 购于中国科学院典型培养物保藏中心。胎牛血清和 RIMI1640 为 Gibco 公司产品;鼠抗人 TRIM25 多克隆一抗和兔抗人丙酮酸激酶 M2(pyruvate kinase isozyme type M2,PKM2)单克隆一抗为 Santa Cruze 公司产品;山羊抗兔,山羊抗鼠二抗为北京中杉金桥技术有限公司产品;质粒提取试剂盒、RNA 提取试剂盒和 RT-PCR 试剂盒为宝生物公司;脂质体 PolyJet™(SL100688)购于 SignaGen 公司;顺铂购于山东齐鲁制药公司;ECL 显影发光剂为 Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299 细胞使用 RPMI1640 培养基(含 10% FBS,青霉素 200 IU/ml,链霉素 200 IU/ml)于 37℃、5%CO₂ 孵育箱中培养。0.25%胰酶+0.02%乙二胺四乙酸二钠消化,2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 TRIM25 重组质粒载体的构建 根据 TRIM25 mRNA 的 CDS 编码区的全序列(GenBank 编号:NM_005082.4),利用 Primer 5.0 软件设计引物(由上海吉玛公司合成)。引物上游:5'-GATAACTCGAGGCCACCATGGCAGAGCTGTGCCCCCT-GGCCGAGGAGCTGT-3',下游:5'-GTATCGAATTCGACTT-GGGGGAGCAGATGGAGAGT-3'。取对数生长期的 H1299 细胞提取总 RNA,以此总 RNA 为模版,逆转录合成 cDNA。再以此 cDNA 模版用 PCR 技术进行扩增,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,切下 TRIM25 目的条带处的凝胶用试剂盒回收纯化。用 *Xho*I, *Eco*R II 双酶切 PCR 目的片段和质粒载体 pGCMV/EGFP/Neo, T4 DNA 连接酶连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,用 LB 琼脂平板(含卡那霉素 50 μ g/ml)筛选阳性单克隆菌落,接种到 LB 培养基(含卡那霉素 50 μ g/ml)中大量扩增,收集菌液少量抽提质粒 DNA。行限制性酶切鉴定及 DNA 测序鉴定(上海吉玛公司),测序正确的菌株提取质粒 DNA,-20℃冻存备用。

1.2.3 细胞转染及分组 取对数生长期的细胞消化、细胞计数,调整细胞浓度为每孔 5.0×10^5 个接种到 6 孔板中,待细胞生长至 80%~90%融合度时进行转染。转染前 30 min 各孔更换 1.5 ml 的新鲜全培养基。对于每孔细胞,分别用 50 μ l 无血清高糖 DMEM 培养基稀释 2 μ g 质粒 DNA 和 6 μ l PolyJet™ 转染试剂,混匀后室温孵育 5 min。再将两者混匀后室温孵育 15 min,每孔加入 100 μ l 上述形成的质粒复合物,摇匀,继续培养 6~8 h 后更换新鲜全培养基,24 h 后即可在荧光显微镜下观察。实验分组:①H1299 空白组;②转染 pGCMV/neo 空载体组;③ pGCMV-trim25 转染组。

1.2.4 Western blot 检测 TRIM25 蛋白表达水平 收集各组

细胞,用预冷的 PBS 洗 1、2 次,加入 RIPA 裂解液和 PMSF 按 100:1 配好的裂解缓冲液,冰上裂解后离心收集蛋白上清液,按 BCA 法说明书测定蛋白浓度。与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,煮沸 5 min,于 -80℃ 保存备用。按蛋白浓度加样,进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,半干转法将蛋白质转至 PVDF 膜上。室温下用 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 3~6 h,分别加入封闭液稀释的鼠抗人 TRIM25 多克隆一抗(1:500)和 β -actin 单抗(1:1 000),4℃ 孵育过夜。洗膜后加山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000),室温孵育 2 h,洗膜后 ECL 显影,Quantity One 软件进行吸光度(absorbance, A)分析。以 β -actin 为内参照,实验重复 3 次。

1.2.5 肺癌细胞中 TRIM25 高表达时 PKM2 的表达情况 提取各组细胞蛋白,同上述 Western blot 法检测。兔抗人 PKM2 单克隆一抗按 1:500 稀释,以 β -actin 为内参照。用 Quantity One 软件进行吸光度分析,实验重复 3 次。

1.2.6 细胞耐药性检测 将对数生长期的各组细胞按 200 μ l/孔(5×10^3 个细胞)接种于 96 孔培养板内,每组 3 个复孔,培养 12 h 后更换 180 μ l 培养基,并加入浓度依次为 1 000、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 μ g/ μ l 的顺铂各 20 μ l,设置不加药的空白对照孔。于 CO₂ 培养箱中培养 48 h,各孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h,弃尽孔内培养液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),设置只加 DMSO 的调零孔,室温避光振荡 10 min,酶标仪测定各孔 492 nm 的 A 值。计算细胞抑制率=[1-(加药组平均 A 值-调零孔 A 值)/(空白组平均 A 值-调零孔 A 值)] $\times$ 100%。根据药物浓度及细胞生长抑制率应用加权线性回归法求出半数抑制率 IC₅₀。抗药指数(resistance index, RI)=IC₅₀(转染 pGCMV/neo 空载体组或 pGCMV-trim25 转染组)/IC₅₀(H1299 空白组)。实验分组:①H1299 空白组;②转染 pGCMV/neo 空载体组;③pGCMV-trim25 转染组,实验重复 3 次。

1.2.7 细胞凋亡检测 各组细胞用顺铂处理 24 h 后,先收集上清液,再将贴壁细胞用胰酶消化,轻轻吹匀成单细胞悬液,与相同来源的上清液混合后离心。PBS 清洗 2 次,每 1×10^5 ~ 5×10^5 个细胞用 500 μ l 缓冲液重悬,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ l 碘化丙锭溶液混匀,室温暗处孵育 15 min 后上流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测。细胞分组同上,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据的录入和统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以百分率表示。均数间的比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 荧光显微镜下观察转染效率

转染 pGCMV-trim25 重组载体 48 h 后,在光学显微镜下观察肺癌细胞 H1299 生长旺盛,形态规则,以椭圆形、多边形

居多,与未转染前 H1299 细胞无明显差异。荧光显微镜下观察到绿色荧光,转染效率在 60%以上(图 1)。

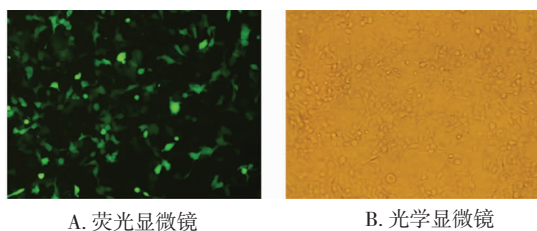


图 1 转染 48 h 后细胞生长状态和转染效率 (200×)
Fig.1 Growth state and transfection efficiency at 48 h after the transfection (200×)

2.2 Western blot 法检测转染后 TRIM25 的蛋白表达水平

如图 2 结果所示,H1299 空白组、转染 pGCMV/neo 空载体组和 pGCMV-trim25 转染组蛋白条带经灰度值分析,细胞内 TRIM25/ β -actin 的比值分别是 (0.399 ± 0.126) 、 (0.369 ± 0.037) 和 (0.688 ± 0.061) ,3 组之间差异具有统计学意义 ($F=13.928, P=0.006$);其中两两比较结果显示,pGCMV-trim25 转染组细胞中 TRIM25 的表达明显高于转染 pGCMV/neo 空载体组与 H1299 空白组(分别为 $P=0.003, P=0.005$),而转染 pGCMV/neo 空载体组与 H1299 空白组相比较差异无统计学意义($P=0.585$)(图 2)。

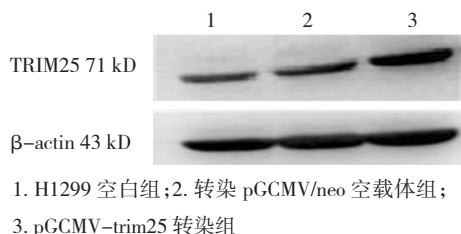


图 2 Western blot 法检测各组细胞 TRIM25 蛋白表达
Fig.2 Detection of TRIM25 protein level in each group by Western blot

2.3 Western blot 法检测 TRIM25 高表达时 PKM2 蛋白的表达情况

如图 3 结果所示,H1299 空白组、转染 pGCMV/neo 空载体组和 pGCMV-trim25 转染组蛋白条带经灰度值分析,细胞内 PKM2/ β -actin 的比值分别是 (0.683 ± 0.073) 、 (0.764 ± 0.061) 和 (0.456 ± 0.036) ,3 组之间差异具有统计学意义 ($F=21.717, P=0.002$);其中两两比较结果显示,pGCMV-trim25

转染组细胞中 PKM2 的表达较转染 pGCMV/neo 空载体组及 H1299 空白组明显减少(分别为 $P=0.001, P=0.003$),而转染 pGCMV/neo 空载体组与 H1299 空白组相比较差异无统计学意义($P=0.075$)(图 3)。

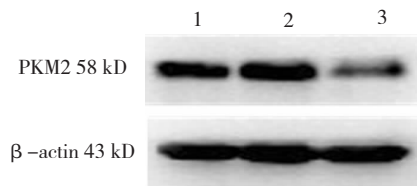


图 3 Western blot 法检测各组细胞 PKM2 蛋白表达
Fig.3 Detection of PKM2 protein level in each group by Western blot

2.4 MTT 法检测细胞耐药性

经 MTT 法检测,H1299 空白组、转染 pGCMV/neo 空载体组和 pGCMV-trim25 转染组细胞对顺铂的 IC_{50} 分别是 $(3.689 \pm 0.384) \mu\text{g/ml}$ 、 $(4.007 \pm 0.592) \mu\text{g/ml}$ 、 $(32.828 \pm 0.621) \mu\text{g/ml}$,3 组之间差异具有统计学意义 ($F=3387.18, P=0.000$);pGCMV-trim25 转染组对顺铂的 IC_{50} 是 H1299 空白组的 8.9 倍,pGCMV-trim25 转染组对顺铂的耐药性明显增加($P=0.000$),见表 1。

表 1 转染前后 H1299 细胞的耐药性

Tab.1 Drug resistance of H1299 cells before and after the transfection

分组	IC_{50}	RI
H1299 空白组	3.689 ± 0.384	1.000
转染 pGCMV/neo 空载体组	4.007 ± 0.592^b	1.086
pGCMV-trim25 转染组	32.828 ± 0.621^a	8.899

注:a,与 H1299 空白组比较, $P=0.000$;b,与 H1299 空白组比较, $P=0.464$

2.5 FCM 检测细胞凋亡

加入顺铂处理 24 h 后,用 Annexin V/PI 双染法 FCM 检测各组的凋亡率(图 4)。pGCMV-trim25 转染组的细胞凋亡率明显低于其它 2 组,差异具有统计学意义($P=0.000$),转染 pGCMV/neo 空载体组及 H1299 空白组之间无明显差异($P=0.961$),见表 2。

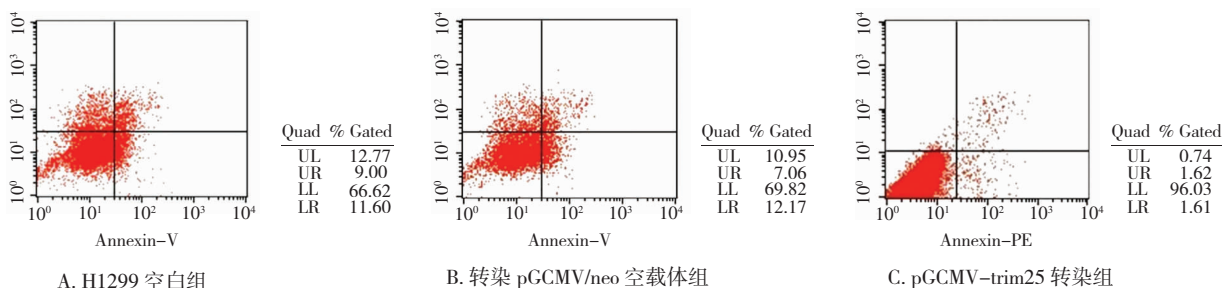


图 4 顺铂处理后检测凋亡率
Fig.4 Detection of apoptosis rate after being treated with cisplatin

表 2 转染前后 H1299 细胞的凋亡率
Tab.2 Apoptosis rates of H1299 cells before and after
the transfection

分组	凋亡率 (%)	F 值	P 值
H1299 空白组	0.166 ± 0.011		
转染 pGCMV/neo 空载体组	0.167 ± 0.008 ^b	359.08	0.000
pGCMV-trim25 转染组	0.016 6 ± 0.003 ^a		

注:a,与 H1299 空白组比较, $P < 0.001$;b,与 H1299 空白组比较, $P = 0.961$

3 讨 论

泛素化修饰是细胞内蛋白质经泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP)进行选择降解的关键信号,参与细胞凋亡等生命过程,研究发现 UPP 途径在化疗抵抗中发挥着重要作用^[7]。TRIM25 是 UPP 途径的泛素化 E3 连接酶,Urano 等^[4]报道 14-3-3 σ 受 TRIM25 调节进行蛋白质水解会促进乳腺癌的发生。PKM2 可能经由泛素化或者类泛素修饰调节,Spoden 等^[8]发现 PKM2 可受 PIAS3 (SUMO-E3 连接酶)介导发生类泛素化修饰。在前期研究中,从 A549 耐顺铂细胞株泛素化结合的蛋白中鉴定出了 TRIM25、PKM2 等^[9],这提示两者可能参与肿瘤细胞的耐药。

本研究成功构建了 pGCMV-trim25 过表达质粒载体,并采用脂质体介导的方法转染人肺癌细胞 H1299,用 Western blot 法检测结果显示所构建的质粒可使 TRIM25 蛋白在 H1299 细胞中高表达。应用顺铂作为凋亡刺激因子,观察导入外源 TRIM25 基因对肺癌细胞化疗敏感性的影响。MTT 法检查发现:与 H1299 空白组和转染 pGCMV/neo 空载体组相比,pGCMV-trim25 转染组细胞的生长抑制率明显降低,转染后细胞对同样浓度顺铂的敏感性降低,RI 为 8.889。Annexin V 对磷脂蛋白有高亲和性,可以结合早期凋亡暴露在外的磷脂酰丝氨酸,本研究采用 Annexin V/PI 测定细胞的凋亡率。FCM 检测结果显示 H1299 细胞转染 pGCMV-trim25 后凋亡率明显下降,进一步表明 TRIM25 高表达时抑制了顺铂诱导的细胞凋亡,从而使肿瘤细胞的药物敏感性降低。同时,该研究在 TRIM25 过表达的细胞中检测到 PKM2 的蛋白水平下调。已证实,抑制野生株细胞中 PKM2 的表达,将降低肿瘤细胞对化疗药物的

敏感性^[10],这与本实验的结论一致。因此,TRIM25 可能是通过下调 PKM2 的表达从而降低其对顺铂的敏感性。

综上所述,TRIM25 可影响肺癌细胞对化疗药物的敏感性,这为肿瘤细胞的耐药机制提供了新的研究切入点。为进一步阐明其作用机制,尚需在动物实验和肿瘤标本中验证,并通过实验进一步探讨 TRIM25 与 PKM2 的相互作用,以明确 PKM2 是否为 TRIM25 泛素化或类泛素化修饰调节的底物。

参 考 文 献

- [1] Berger W, Setinek U, Hollaus P, et al. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(6): 355-363.
- [2] Gack MU, Albrecht RA, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I[J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(5): 439-449.
- [3] Nakayama H, Sano T, Motegi A, et al. Increasing 14-3-3 sigma expression with declining estrogen receptor α and estrogen-responsive finger protein expression defines malignant progression of endometrial carcinoma[J]. Pathol Int, 2005, 55(11): 707-715.
- [4] Urano T, Saito T, Tsukui T, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for Proteolysis and promotes breast tumour growth[J]. Nature, 2002, 417(6891): 871-875.
- [5] Zou W, Zhang DE. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase[J]. J Biol Chem, 2006, 281(7): 3989-3994.
- [6] Porter GW, Khuri FR, Fu H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(3): 193-202.
- [7] Smith L, Lind MJ, Drew PJ, et al. The putative roles of the ubiquitin/Proteasome pathway in resistance to anticancer therapy[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(16): 2330-2338.
- [8] Spoden GA, Morandell D, Ehehalt D, et al. The SUMO-E3 Ligase PIAS3 Targets Pyruvate Kinase M2[J]. J Cellular Biochem, 2009, 107(2): 293-302.
- [9] 秦霞, 邱宗荫, 邱峰, 等. 人肺癌耐药细胞株 A549/CDDP 中相关泛素化蛋白的研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 886-889.
- [10] Martinez-Balibrea E, Plasencia C, Ginés A, et al. A proteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to oxaliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(4): 771-778.

(责任编辑:唐秋姗)