

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000267

沉默三联基序蛋白 25 基因对 A549/DDP 细胞株顺铂耐药性及凋亡的影响

栗林, 秦霞, 敬怀志, 屈灿, 邱峰
(重庆医科大学第一附属医院药学部, 重庆 400016)

【摘要】目的:三联基序蛋白 25(tripartite motif containing 25, TRIM25)为泛素化 E3 连接酶,通过抑制 TRIM25 表达,研究其对肺癌顺铂(cis-dichlorodiamine platinum, DDP)耐药细胞株 A549/DDP 耐药性及凋亡的影响。**方法:**针对 TRIM25 基因设计 4 条不同序列 shRNA,分别构建重组质粒载体 pt1、pt2、pt3、pt4。利用脂质体将质粒转染至 A549/DDP 细胞,采用 real-time PCR、Western blot 检测抑制效果,MTT 实验和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)实验分别检测在 DDP 作用下细胞耐药性改变和凋亡情况。**结果:**干扰质粒 pt1 在 mRNA 和蛋白质水平上均能特异性地抑制 TRIM25 的表达;MTT 法结果显示,抑制 TRIM25 表达后,干扰组 pt1 细胞 IC₅₀ 值低于 pNC 组($P=0.001$)及对照组($P=0.000$);FCM 结果显示,干扰组 pt1 的细胞凋亡率明显低于 pNC 组($P=0.005$)、对照组($P=0.004$)。**结论:**抑制 TRIM25 表达后,能有效地降低 A549/DDP 细胞株的 DDP 耐药性并促进其凋亡。

【关键词】siRNA; TRIM25; A549/DDP 细胞; 肿瘤耐药**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-01-01

Effects of tripartite motif containing 25 gene silencing on cisplatin resistance and apoptosis in A549/DDP cells

Su Lin, Qin Xia, Jing Huaizhi, Qu Can, Qiu Feng

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research the effects of silencing tripartite motif containing 25 (TRIM25) gene on cisplatin resistance and apoptosis in cisplatin resistant lung cancer cell lines A549/DDP.

作者介绍:栗林, Email: sulin2010cherry@126.com,

研究方向: 肺癌蛋白基础研究与临床。

通信作者:邱峰, Email: qiufeng.cn@gmail.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科重点资助项目(编号: 2011-1-036)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000267.html>

Methods: Four types of short hairpin RNA were designed and prepared. The recombinant plasmids (pt1, pt2, pt3, pt4) were constructed respectively, which were transfected into A549/DDP cells using lipofectamine. Real-time PCR and Western

[4] Yoles E, Schwartz M. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve[J]. Arch Ophthalmol, 1998, 116(7): 906-910.

[5] 傅轶, 刘苏, 王志刚, 等. 超声微泡造影剂介导脑源性神经营养因子联合转染视网膜和视皮质对视神经损伤后视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 中华眼底病杂志, 2011, 27(1): 65-69.

[6] 任蕾, 牛建军, 王一, 等. 利用荧光金逆行示踪技术评价视神经不完全损伤后视网膜神经节细胞的存活率[J]. 眼科新进展, 2005, 25(1): 21-23.

[7] Germain F, Calvo M, de la Villa P. Rabbit retinal ganglion cell survival after optic nerve section and its effect on the inner plexiform layer[J]. Exp Eye Res, 2004, 78(1): 95-102.

[8] Schnieder J, Gbureck U, Thull R, et al. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement[J]. Biomaterials, 2006, 27(23): 4239-4249.

[9] Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28(1): 5-24.

[10] Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, et al. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation[J]. Ultrasound Med Biol, 2006, 32(6): 915-924.

[11] Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, et al. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section[J]. J Neurosci, 1989, 9(4): 1263-1272.

[12] 陈慷, 郭希, 让鲍玉, 等. 大鼠眼玻璃体内注射神经生长因子的药代动力学研究[J]. 眼科研究, 2003, 21(3): 267-269.

[13] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78[J]. FEBS letters, 2002, 514(2-3): 122-128.

(责任编辑: 关蕴良)

blot were used to detect the inhibitory effects. The resistance of cisplatin to A549/DDP cells was detected by MTT assay. Cell apoptosis was tested by flow cytometry (FCM). **Results:** The recombinant plasmid pt1 can inhibit mRNA and protein expression of TRIM25 specifically. MTT data showed that the cisplatin IC₅₀ was decreased significantly in pt1 group than in pNC group ($P=0.000$) and control group ($P=0.000$) after the TRIM25 gene inhibition. According to the results of FCM, apoptotic cells was significantly decreased in pt1 group than in pNC group ($P=0.005$) and control group ($P=0.004$). **Conclusion:** TRIM25 gene silencing in A549/DDP cells can effectively reduce cisplatin resistance and promote cells apoptosis.

【Key words】siRNA; tripartite motif containing 25; A549/DDP cells; tumor resistance

顺铂 (cis-dichlorodiamine platinum, DDP) 是当前肺癌化疗中最常用的药物之一, 但肿瘤细胞对 DDP 耐药性的产生常使化疗难以奏效并最终导致治疗失败。因此, 探索 DDP 耐药的分子机制与耐药的治疗对策一直是肿瘤研究的重点。迄今为止, 体内外研究发现肿瘤耐药与靶基因突变、靶基因扩增、DNA 损伤修复能力差异、药物进入肿瘤细胞内浓度减少等许多因素有关, 这提示肿瘤耐药的分子机制非常复杂^[1-3]。秦霞等^[4]前期研究提示, 三联基序蛋白 25 (tripartite motif containing 25, TRIM25) 的表达可能与肺腺癌细胞的 DDP 敏感性有较密切关系。TRIM25 为 TRIM 家族蛋白成员^[5], 属于泛素-蛋白酶体途径和干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, ISG15) 途径中的 E3 连接酶, 其蛋白质表达于细胞质中; TRIM25 作用底物为 14-3-3 σ , 14-3-3 σ 与肿瘤耐药密切相关^[6-7]。

本研究采用 RNA 干扰技术抑制 A549/DDP 细胞中 TRIM25 蛋白表达, 并考察了 TRIM25 表达抑制后 A549/DDP 细胞对 DDP 的药物敏感性, 以明确 TRIM25 蛋白与细胞 DDP 耐药性的关系, 为后续逆转耐药的研究提供新的实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

人肺腺癌细胞 DDP 耐药株 A549/DDP 购自上海锐聪实验室。

1.2 主要试剂

RPMI1640 培养液及胎牛血清 (Gibco 公司), TRIM25 兔抗人-抗 (Sigma 公司), 质粒提取试剂盒 (Omega 公司), 脂质体 PolyJet™ (Signagen 公司), RNA 提取试剂盒及 PCR 试剂盒 (宝生物公司), 早期凋亡率试剂盒 (南京凯基公司), MTT (Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 TRIM25 基因 siRNA 的设计及质粒载体的构建 针对目的基因 TRIM25 (NM_005082), 采用在线设计软件 siDi-

rect version2.0 设计 4 条不同序列小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), siRNA 序列如表 1, 经 BLAST 软件分析, 与其他基因序列无明显同源性。shRNA 的 loop 结构选用 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号, 以 T6 结构为转录终止序列。将 shRNA 连接于 BamHI、PstI 酶切位点之间, 构建重组质粒载体 pGPU6/GFP/Neo-TRIM25, 分别命名为 pTRIM25-524, pTRIM25-1471, pTRIM25-1630, pTRIM25-1413, 依次简称为 pt1、pt2、pt3、pt4。选取一条与现有人类基因无同源性的 siRNA 序列 (正义链: 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3') 作为阴性质粒对照, 命名为 pNC。shRNA 的合成、质粒载体的构建及酶切测序鉴定均由上海吉玛公司完成。

表 2 TRIM25 和 β -actin 的引物序

Tab.2 Primer sequencing of TRIM25 & β -actin

扩增产物	上游引物	下游产物
TRIM25	5'-CGAGGTGGAAC- GAACCACAA-3'	5'-TTCAACAGGGCGTGTG- GATTT-3'
β -actin	5'-ACGAGACCACC- TTCAACTCCATC-3'	5'-TAGAAGCATTTCGC- GTGGACGA-3'

1.3.2 细胞转染 取对数生长期细胞接种于 24 孔板, 1.0×10^5 个/孔, 融合度为 90%~95% 时按脂质体 PolyJet™ 说明书进行转染。脂质体: 质粒 = 1.5 μ l: 0.6 μ g (2.5:1) 为最适比例。转染 48 h 后检测 TRIM25 mRNA 的表达量, 转染 72 h 后检测 TRIM25 蛋白的表达量。

1.3.3 Real-time PCR Trizol 法提取各组细胞总 RNA 后进行荧光定量 PCR。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s。TRIM25 和内参 β -actin 所用引物由上海 Invitrogen 公司合成, 序列如表 2。实验分组为: ①pt1 组; ②pt2 组; ③pt3 组; ④pt4 组; ⑤pNC 组; ⑥对照组, 实验独立地重复 3 次。

表 1 TRIM25 基因 siRNA 序列

Tab.1 siRNA sequencing of TRIM25

siRNA 序列	正义链 (5' -3')
pt1	5' -GCAATGTTCCAGCACAATC-3'
pt2	5' -GCTCTGTCTAGAGTCTATACA-3'
pt3	5' -GCATCTGCTACGGAAGCATGA-3'
pt4	5' -GCTCCTGGAGTATTACATTAA-3'

1.3.4 Western blot 提取各组细胞总蛋白质,将含 50 μg 蛋白质样品液与上样缓冲液混合,煮沸 5 min 后,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(110 V,90 min),半干转法将蛋白质转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)(恒流 $I=0.1\text{ A}$,17 min),室温下 5%脱脂奶粉封闭 1.5 h,加入封闭液稀释的 TRIM25 一抗(1:200 稀释),以 β -actin 为对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000),室温静置孵育 1 h,ECL 显影,并用 Quantity One 4.5 tool 进行光密度分析。实验分组为:①pt1 组;②pt2 组;③pt3 组;④pt4 组;⑤pNC 组;⑥对照组,实验独立地重复 3 次。

1.3.5 细胞 DDP 耐药性检测 在 4 组质粒中,选取抑制效果最佳的干扰质粒进行 MTT 实验。将转染 36 h 后的细胞接种于 96 孔培养板(5×10^3 细胞/孔),培养 12 h 后,按照梯度稀释方法将顺铂加入培养基。DDP 终浓度为 1000、100、10、1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 72 h,加入 5 mg/ml MTT(20 μl /孔),培养 4 h,加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)(150 μl /孔),室温振荡 10 min,于 570 nm 测各孔吸光度(absorbance,A)值。细胞生长抑制率(%)=(1-干扰组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。采用 GraphPad5.0 软件的线性回归法计算 IC_{50} 。实验分组:①pt1 组;②pNC 组;③对照组,实验独立重复 3 次,每组 5 个复孔。

1.3.6 细胞早期凋亡率检测 使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,以 V-FITC/PI 双染法流式细胞仪检测细胞凋亡情况。各组细胞经 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 作用 48 h 后,用预冷 PBS 清洗并收集细胞,混悬于 500 μl 结合缓冲液,加入 5 μl 异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate,FITC)和 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide,PI),室温暗处孵 15 min 后进行流式细胞仪分析。实验分组:①pt1 组;②pNC 组;③对照组,实验独立重复 3 次。

1.4 统计学分析

所有实验数据的统计分析采用 SPSS 19.0 软件处理,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学方法采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 和 Games-Howell 比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 转染后 TRIM25 mRNA 水平变化

Real-time PCR 结果显示(表 3、图 1),组间比较差异具有统计学意义($F=42.778$, $P=0.000$)。与对照组比较,干扰组 pt1、pt3 的 mRNA 表达量明显降低,其差异具有统计学意义($P=0.000$)。而干扰组 pt2、pt4、阴性质粒对照组 pNC 却无统计学差异。其中干扰组 pt1 细胞 mRNA 表达水平为(0.110 ± 0.013),明显低于 pt3 组(0.432 ± 0.013),差异具有统计学意义($P=0.013$)。

表 3 RT-PCR 检测 TRIM25 在各组中 mRNA 的表达

Tab.3 Expression of mRNA of TRIM25 detected by RT-PCR

实验分组	均数 $\pm$ 标准差	与对照组比较	与 pNC 比较	与 pt3 比较
		P 值	P 值	P 值
pt1	0.110 ± 0.013^{abc}	0.000	0.000	0.013
pt2	0.785 ± 0.038^a	0.064	0.149	—
pt3	0.432 ± 0.013^{ab}	0.000	0.000	—
pt4	0.838 ± 0.078	0.189	0.393	—
pNC	0.994 ± 0.165	0.994	—	—
对照组	1.035 ± 0.138	—	—	—

注:a,与对照组比较, $P < 0.05$;b,与 pNC 比较, $P < 0.05$;c,与 pt3 比较, $P < 0.05$

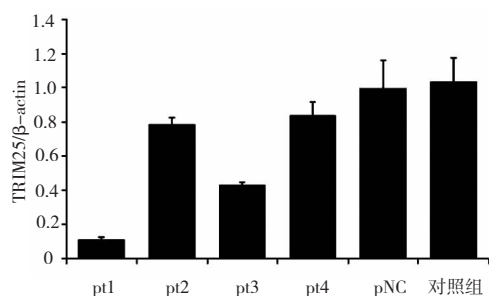


图 1 RT-PCR 检测 TRIM25 在各组中 mRNA 的表达

Fig.1 Expression of mRNA of TRIM25 detected by RT-PCR

2.2 转染后 TRIM25 蛋白水平变化

Western blot 结果显示(表 4、图 2),组间比较差异具有统计学意义($F=49.375$, $P=0.000$)。与对照组比较,干扰组的 TRIM25 蛋白表达量明显降低,其差异具有统计学意义,而 pNC 却无统计学差异。与 pNC 组比较,pt1、pt2、pt3 的差异也具有统计学意义,而 pt4 无统计学差异。综合 real-time PCR 与 Western blot 结果可以发现干扰组 pt1 的抑制效果最好,因此,选取质粒 pt1 进行下一步实验。

表 4 Western blot 检测 TRIM25 蛋白表达

Tab.4 Expression of TRIM25 protein detected by Western blot

实验分组	均数 $\pm$ 标准差	与对照组比较	与 pNC 比较
		P 值	P 值
pt1	0.305 ± 0.012^{ab}	0.002	0.001
pt2	0.349 ± 0.024^{ab}	0.048	0.042
pt3	0.335 ± 0.023^{ab}	0.034	0.027
pt4	0.408 ± 0.004^a	0.005	0.053
pNC	0.447 ± 0.010	0.931	—
对照组	0.453 ± 0.006	—	—

注:a,与对照组比较, $P < 0.05$;b,与 pNC 比较, $P < 0.05$

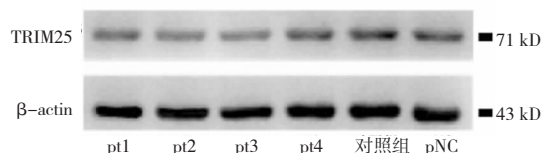


图 2 Western blot 检测 TRIM25 蛋白的表达

Fig.2 Expression of TRIM25 protein detected by Western blot

2.3 细胞 DDP 敏感性变化

MTT 法检测结果显示如表 5, 3 者组间比较差异具有统计学意义 ($F=32.600, P=0.000$)。对 A549/DDP 细胞进行 RNA 干扰后, pt1 组细胞 DDP 的 IC_{50} 值下降为 $(16.352 \pm 3.160) \mu\text{g/ml}$, 低于 pNC 组 $(30.150 \pm 3.552) \mu\text{g/ml}$ ($P=0.001$) 及对照组 (30.696 ± 2.794) ($P=0.000$), 说明针对 TRIM25 基因进行的 RNA 干扰可促使肺癌细胞 A549/DDP 顺铂耐药性发生逆转。

表 5 A549/DDP 细胞耐药性变化
Tab.5 Changes in the drug resistance of A549/DDP

实验分组	均数 $\pm$ 标准差 ($\mu\text{g/ml}$)	与对照组比较	与 pNC 比较
		P 值	P 值
pt1	$16.352 \pm 3.160^{\text{ab}}$	0.000	0.001
pNC	30.150 ± 3.552	0.961	—
对照组	30.696 ± 2.794	—	—

注: a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与 pNC 比较, $P < 0.05$

2.4 细胞早期凋亡率变化

FCM 结果显示如图 3, 3 者组间比较差异具有统计学意义 ($F=35.796, P=0.000$)。pt1 组、pNC 组和 A549/DDP 组的细胞凋亡率分别为 $(11.327 \pm 1.387)\%$ 、 $(3.427 \pm 1.220)\%$ 、 $(3.647 \pm 1.300)\%$, 其中 pNC 组与对照组的差异无统计学意义 ($P=0.975$), pt1 组的细胞凋亡率明显低于 pNC 组 ($P=0.005$)、对照组 ($P=0.004$), 其差异均具有统计学意义。

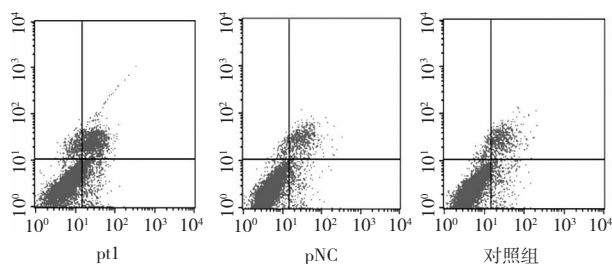


图 3 FCM AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡

Fig.3 Cell apoptosis detected by FCM AnnexinV/PI double staining

3 讨论

肺癌是一种常见的恶性肿瘤, 其发病率和病死率非常高。化疗是治疗肺癌的主要手段, 但耐药性的产生常使化疗失败。

TRIM25 作为泛素-蛋白酶体途径和 ISG15 途径中的一个 E3 连接酶^[8], 在抗病毒免疫反应和免疫相关信号通路中发挥重要作用^[9-10]; 但最近研究显示^[4], 采用蛋白酶体抑制剂 MG132 抑制泛素化-蛋白酶体途径, 可下调 TRIM25 蛋白表达水平, 并增强 A549/DDP 细胞株对 DDP 的敏感性, 提示 TRIM25 蛋白的表达可能与肺癌细胞的 DDP 敏感性有较密切关系。

本研究采用 RNA 干扰技术, 构建、筛选了特异性针对目的基因 TRIM25 (NM_005082) 的 siRNA 载体, 并成功导入人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP; 结果显示, 其能有效抑制 TRIM25 mRNA 及其蛋白的表达, 在成功转染后 TRIM25 蛋白的表达量明显减少。被抑制 TRIM25 表达的 A549/DDP 细胞株对顺铂的敏感性显著增加, 表现为 IC_{50} 值显著减小, 约降至 A549/DDP 细胞株的一半, 而细胞凋亡率增加至 A549/DDP 细胞株的约 3 倍, 出现显著的对顺铂耐药逆转。由此表明, TRIM25 与耐 DDP 肿瘤细胞的耐药特性有着直接且重要的作用, 这一研究结果为逆转肿瘤细胞株的耐药特性提供了新的实验依据, 也为将来肿瘤的治疗提供新的可能途径。

参 考 文 献

- [1] Miguel A, Fuertes, Carlos Alonso, et al. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action; enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance[J]. Chemical Reviews, 2003, 103(3): 645-662.
- [2] Glasspool RM, Teodoridis JM, Brown R. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance[J]. Br J Cancer, 2006, 94(8): 1087-1092.
- [3] Telesco SE, Shih AJ, Jia F, et al. A multiscale modeling approach to investigate molecular mechanisms of pseudokinase activation and drug resistance in the HER3/ErbB3 receptor tyrosine kinase signaling network[J]. Mol Biosyst, 2011, 7(6): 2066-2080.
- [4] 秦霞, 邱宗荫, 邱峰, 等. 人肺腺癌耐药细胞株 A549/CDDP 中相关泛素化蛋白质研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 866-869.
- [5] Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(1): 17-22.
- [6] Liu Y, Liu H, Han B, et al. Identification of 14-3-3 σ as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3248-3255.
- [7] Li Z, Dong Z, Myer D, et al. Role of 14-3-3 σ in poor prognosis and in radiation and drug resistance of human pancreatic cancers[J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 598-605.
- [8] Zou WG, 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.
- [9] Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, et al. Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(43): 16743-16748.
- [10] McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, et al. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(1): 46-56.

(责任编辑: 唐宗顺)