

网络出版时间: 2018-6-8 10:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.001.html>

◇基础医学研究◇

乳源免疫调节肽通过泛素-蛋白酶体途径抑制 卵巢癌耐药性及其机制研究

阮昕¹, 汪慎姝¹, 徐怡¹, 席浩¹, 薛绍礼^{1,2}, 秦宜德¹

摘要 目的 研究乳源免疫调节肽(PGPIP)抑制卵巢癌耐药性及其机制。方法 MTT法检测PGPIP与抗癌药顺铂(DDP)联合用药抑制人卵巢癌敏感细胞株(SKOV₃)、耐药细胞株(SKOV₃-DDP)和原代卵巢癌细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)和细胞增殖抑制率,PCR法和Western blot法检测人卵巢癌细胞株和原代卵巢癌细胞用药情况下泛素-蛋白酶体途径相关基因的表达。结果 PGPIP和DDP联合用药细胞增殖抑制率显著高于单独DDP组或PGPIP组,差异有统计学意义($P < 0.05$),PCR和Western blot结果表明PGPIP通过调节泛素-蛋白酶体途径相关基因表达降低卵巢癌细胞的耐药性。PGPIP促进SIAH和PSMA1表达,降低 β -catenin基因的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),且有剂量依赖性。结论 PGPIP通过泛素-蛋白酶体途径降低卵巢癌细胞对DDP的耐药性。

关键词 卵巢癌;乳源免疫调节肽;顺铂;泛素-蛋白酶体途径中图分类号 R 737.31; R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-0989-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.001

卵巢癌是妇科三大常见的恶性肿瘤之一,化疗目前是一种重要的治疗手段,但化疗耐药严重影响了患者的治愈率,主要的化疗药物包括顺铂(cis-dichlorodiammine platinum, DDP)和紫杉醇,提高化疗敏感性,对卵巢癌的治疗有重要意义。乳源免疫调节肽(PGPIP)来源于牛乳 β -酪蛋白的63-68氨基酸残基上的六肽^[1],也是一种免疫调节肽。课题

组前期通过体内实验显示PGPIP具有刺激机体外周血细胞增殖、明显促进抗体生成、能显著促进腹腔巨噬细胞吞噬活性、刺激淋巴细胞转化等^[2-4],并且能够抑制卵巢癌细胞SKOV₃的侵袭和转移,促进细胞凋亡^[5-6]。虽然PGPIP无毒副作用和不良反应,但抗癌效果不及传统的化疗药物,基于前期研究^[7],因此采用PGPIP和DDP联合用药。泛素-蛋白酶体系统是一种破坏陈旧或损伤蛋白的重要机制,并调节多种细胞生物学过程,在调节细胞内各项信号通路中起着重要作用。该实验主要研究PGPIP是否通过泛素-蛋白酶体途径降低卵巢癌细胞对DDP的耐药性。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人卵巢癌SKOV₃、SKOV₃-DDP细胞株购自中国医学科学院北京肿瘤研究所。

1.2 人卵巢癌组织 人卵巢癌组织在获取知情同意后取自安徽医科大学妇产科手术室,符合伦理学要求。

1.3 主要材料 PGPIP纯度为99.288%(中国合肥国肽生物科技有限公司);DDP(江苏诺欣药业公司);McCoy's 5A Medium(美国Sigma公司);MTT、BCA蛋白测定试剂盒、Agarose(江苏碧云天生物技术有限公司);TRIzol(美国Gibco公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);胰酶(合肥Biosharp生物科技有限公司);DL1000 DNA Marker、Premix $\times$ Taq酶(日本TaKaRa公司);逆转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司);PVDF膜(美国Bio-Rad公司); β -actin(北京中杉金桥生物技术有限公司);SIAH兔抗(武汉爱博泰克生物技术有限公司);PSMA1兔抗(美国Abcam公司);PBS、 β -catenin兔抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 人卵巢癌细胞SKOV₃、SKOV₃-DDP用McCoy's 5A Medium培养基,加入含10%胎

2018-03-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472448);安徽省自然科学基金(编号:1508085MH196)

作者单位:¹ 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

² 安徽医科大学生命科学院生物工程教研室,合肥 230032

作者简介:阮昕,女,硕士研究生;

薛绍礼,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: xuesl@sina.com;

秦宜德,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: yideqin@ahmu.edu.cn

牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,SKOV₃-DDP 细胞给予一定浓度 DDP 持续刺激,保持其耐药性。

1.4.2 原代培养 原代卵巢癌组织来自于安徽医科大学第一附属医院妇产科,为 28 例浆液性卵巢腺癌(Ⅲ、Ⅳ级)的患者,且这些患者在手术前未接受辅助治疗,如化疗或放疗前。患者在接受癌组织切除术后,尽快用预冷的 10% 血清 DMEM 培养基将组织块运送至细胞房,用预冷无菌 PBS 缓慢冲洗癌组织块上的血细胞。无菌操作下将组织块用无菌眼科剪剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右后转移至无菌试管中,加入癌组织 3 倍体积的 1.5% 的胰蛋白酶,消化 40 ~ 50 min 后 800 r/min 离心 5 min,弃上清液。将消化结束后的组织块用含 3 μg/ml 生长因子、0.1 ng/ml β-雌二醇和 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打混匀后接种于培养瓶中放于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。48 h 后将未贴壁的组织用 PBS 冲洗去除,贴壁的细胞继续培养至汇合率为 70% ~ 80%,传代后进行下一步实验。

1.4.3 MTT 检测 48 h 时 DDP 和联合用药对卵巢癌细胞增殖的影响 取对数生长的细胞配置成细胞悬液接种于 96 孔板中,培育过夜后,加入不同浓度的 DDP。48 h 后每孔加入 20 μl MTT,继续孵育 4 h 后,酶标仪上测定各孔 490 nm 波长的吸光度(optical density, OD)值,每组 5 个复孔,以空白对照组计算用药组的生长抑制率,增殖抑制率的计算公式为:增殖抑制率(%) = (1 - OD_{实验组}/OD_{空白对照组}) × 100%。MTT 实验法,检测 48 h 时,PGIPN 联合 DDP 对卵巢癌细胞增殖的抑制率。取对数生长的细胞配置成细胞悬液接种于 96 孔板中,培育过夜后,细胞株分为 6 组加药:空白对照、1.68 × 10⁻¹ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀)、DDP(IC₅₀) + 1.68 × 10⁻³ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀) + 1.68 × 10⁻¹ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀) + 16.8 μmol/L PGIPN。48 h 后每孔加入 20 μl MTT,继续孵育 4 h 后,酶标仪上测定各孔 490 nm 波长的吸光度值,每组复孔 5 个,以正常对照组计算用药组的生长抑制率,计算公式为:抑制率(%) = (1 - OD_{实验组}/OD_{空白对照组}) × 100%。

1.4.4 RT-PCR 检测 SIAH、PSMA1、β-catenin 的 mRNA 的表达情况

1.4.4.1 RNA 提取 培养卵巢癌细胞,分为 6 组加药:空白对照、1.68 × 10⁻¹ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀)、DDP(IC₅₀) + 1.68 × 10⁻³ μmol/L PGIPN、

DDP(IC₅₀) + 1.68 × 10⁻¹ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀) + 16.8 μmol/L PGIPN。培养 48 h 提取总 RNA,再用 DEPC 水溶解后放置于 -80 ℃ 保存。

1.4.4.2 引物设计 所有引物由上海生工生物技术有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列及长度

基因	引物(5'-3')	长度(bp)
PSMA1	F: GGTTCAGCCACAGTTGGTC	241
	R: TTAGAGATACAAGACGACACAGG	
SIAH	F: GCCACACACAGAAAAAGCAG	308
	R: TCAGCTGTACGATTGCGAAG	
β-catenin	F: GCCACTACCACAGCTCCTTC	392
	F: GCCACTACCACAGCTCCTTC	
β-actin	F: GCCACTACCACAGCTCCTTC	350
	F: GCCACTACCACAGCTCCTTC	

1.4.4.3 PCR 过程 使用 Thermo 试剂盒进行逆转录。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,并用凝胶成像系统分析,以目的条带的灰度与内参 β-actin 的灰度之比表示目的基因的表达水平。

1.4.5 Western blot 法检测 SIAH、PSMA1、β-catenin 蛋白的表达情况 培养卵巢癌细胞,分为 6 组加药:空白对照、1.68 × 10⁻¹ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀)、DDP(IC₅₀) + 1.68 × 10⁻³ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀) + 1.68 × 10⁻¹ μmol/L PGIPN、DDP(IC₅₀) + 16.8 μmol/L PGIPN。48 h 以后收集细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭,分别加入一抗 β-actin(1:10 000)、PSMA1(1:5 000)、SIAH(1:1 000)、β-catenin(1:200)过夜,TBST 洗 3 次,加入对应的二抗,孵育 2 h,洗膜,显影,并进行灰度值分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行分析,灰度值用 Image J 分析,所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGIPN 联合 DDP 对卵巢癌细胞增殖的影响

使用 0 ~ 100 μmol/L DDP 作用于人卵巢癌细胞 SKOV₃、SKOV₃-DDP 以及原代卵巢癌细胞 48 h,随着 DDP 浓度增加,对细胞的抑制作用也增加,测出 SKOV₃、SKOV₃-DDP 以及原代卵巢癌细胞的平均 IC₅₀ 值为 (10.022 ± 2.574)、(20.967 ± 3.600)、(23.743 ± 14.043) μmol/L。使用 IC₅₀ 浓度 DDP,联合低、中、高浓度 PGIPN 作用于卵巢癌细胞 48 h,

计算细胞增殖抑制率 结果显示 ,与 DDP 组相比 ,联合用药组的细胞抑制率高于单独 DDP 组 ,且肽浓度越高 ,抑制率越明显 ,单独 PGIPN 组效果不明显 ,PGIPN 能降低卵巢癌细胞耐药性 ,差异有统计学意义($F_{SKOV_3} = 28.419$, $F_{SKOV_3-DDP} = 29.336$, $F_{\text{原代细胞}} = 16.274$, $P < 0.05$)。见图 1。

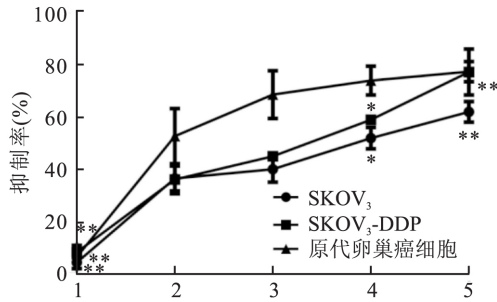


图1 PGIPN联合DDP对SKOV₃、SKOV₃-DDP和原代细胞增殖的影响

1: $1.68 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 2: DDP(IC_{50}); 3: DDP(IC_{50}) + $1.68 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 4: DDP(IC_{50}) + $1.68 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 5: DDP(IC_{50}) + $16.8 \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 与 DDP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 RT-PCR 检测泛素 - 蛋白酶体途径基因表达

RT-PCR 检测 PGIPN 联合 DDP 作用于卵巢癌细胞时 , β -catenin、SIAH、PSMA1 的 mRNA 表达情况 , 结果显示 ,与对照组相比 ,用药组的 SIAH、PSMA1 基因表达量增加($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,随着 PGIPN 浓度增加而增加 , β -catenin 基因的表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,随着 PGIPN 浓度增加而降低。见图 2。

2.3 Western blot 法检测泛素 - 蛋白酶体途径蛋白表达

Western blot 法检测 PGIPN 联合 DDP 作用于卵巢癌细胞时 , SIAH、PSMA1、 β -catenin 蛋白表达情况 , 结果显示 ,与对照组相比 ,用药组的 SIAH、PSMA1 蛋白表达量增加($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,随着 PGIPN 浓度增加而增加 , β -catenin 蛋白的表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,随着 PGIPN 浓度增加而降低。见图 3。

3 讨论

乳源生物活性肽是乳蛋白经消化酶的作用后释放的一种肽 ,机体可以直接吸收 ,在免疫、代谢等诸多方面对生物体有调节作用^[8-9]。

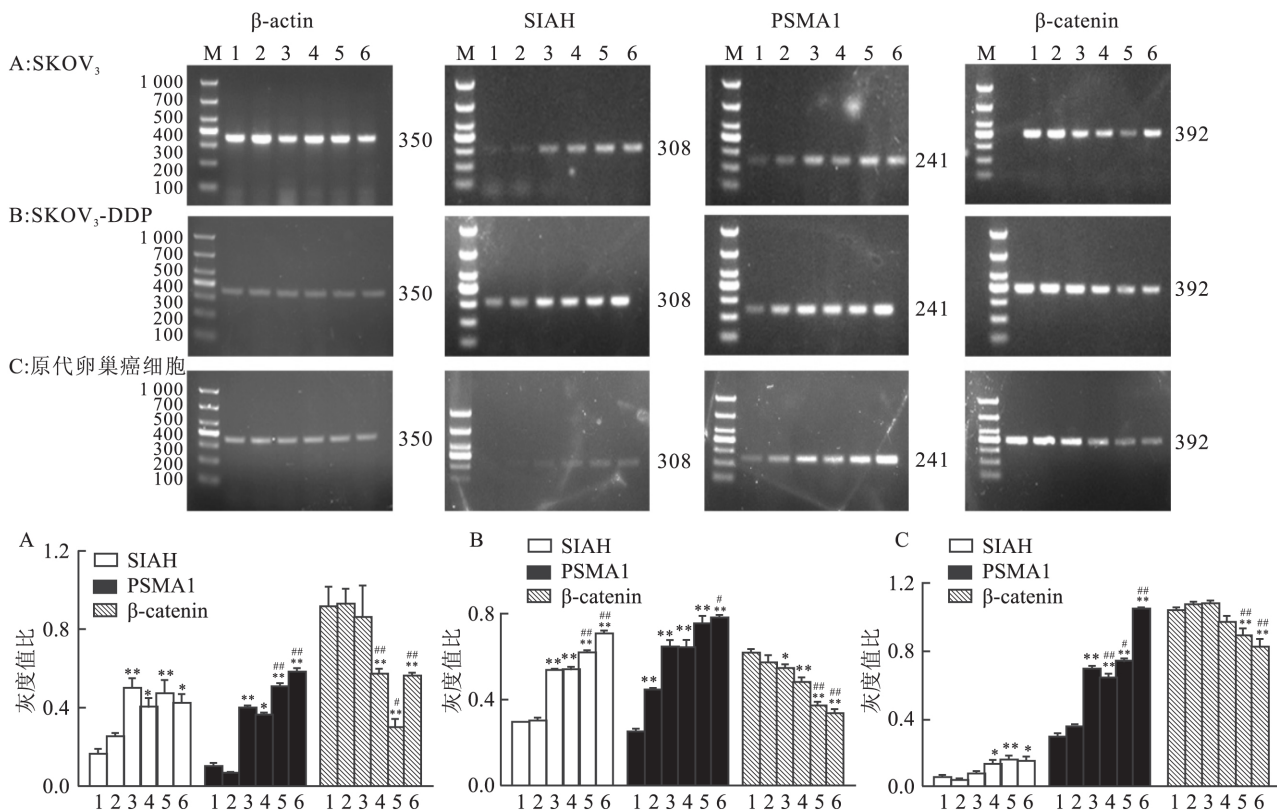


图2 PGIPN联合DDP作用于卵巢癌细胞的SIAH、PSMA1和β-catenin的RT-PCR结果

A: SKOV₃; B: SKOV₃-DDP; C: 原代卵巢癌细胞; M: Marker; 1: 空白对照; 2: $1.68 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 3: DDP(IC_{50}); 4: DDP(IC_{50}) + $1.68 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 5: DDP(IC_{50}) + $1.68 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 6: DDP(IC_{50}) + $16.8 \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DDP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

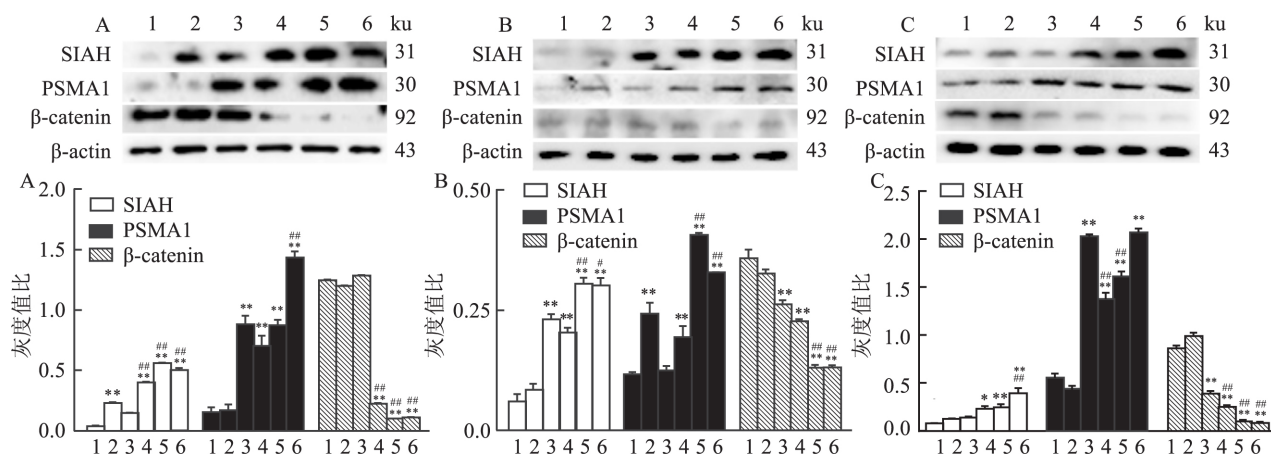


图3 Western blot 检测 PGIPN 联合 DDP 作用于卵巢癌细胞的 SIAH、PSMA1 和 β -catenin 的表达

A: SKOV₃; B: SKOV₃-DDP; C: 原代卵巢癌细胞; 1: 空白对照; 2: $1.68 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 3: DDP (IC_{50}); 4: DDP (IC_{50}) + $1.68 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 5: DDP (IC_{50}) + $1.68 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 6: DDP (IC_{50}) + $16.8 \mu\text{mol/L}$ PGIPN; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DDP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

本实验室研究的 PGIPN 富含脯氨酸能抵抗胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用,同时由于含有脂肪侧链的氨基酸残基,则在一定程度上能抵抗微生物的作用。在前期研究^[7]中发现 PGIPN 可以提高卵巢癌细胞对 DDP 的敏感性,其主要的机制主要是阻断肿瘤细胞的一些信号传导途径诱导其凋亡,抑制由顺铂等引起的卵巢癌细胞抗凋亡蛋白过表达,诱导肿瘤细胞凋亡。实验结果显示,不同浓度 PGIPN 联合相同浓度 DDP 作用与卵巢癌细胞,单独 PGIPN 组效果不明显,联合用药组的细胞抑制率高于单独 DDP 组,说明 PGIPN 能提高 DDP 对卵巢癌细胞的作用,增强卵巢癌细胞对顺铂的敏感性。

前期研究^[10]显示,PGIPN 的靶点是 EEF1D (eukaryotic translation elongation factor 1 delta),是真核生物翻译延伸因子 eEF1B 复合物的一个亚基,eEF1B 复合物是 eEF1A 的转换因子(exchange factor, GEF),可激活 eEF1A 上的核苷转换,从而完成 eEF1A 的活力循环,EEF1D 在病毒感染、细胞周期、肿瘤发生中都发挥了作用。有研究^[11]显示,EEF1D 能抑制 SIAH 的 E3 泛素连接酶活性。SIAH 蛋白是 E3 连接酶,可识别并结合底物蛋白使其由 26S 蛋白酶体途径降解,Siah 家族含有两个明确的结构域:N 端的 RING 指结构域和 C 端底物结合结构域,RING 指结构域为 E3 泛素连接酶活性所需,能够结合泛素结合酶 E2,将泛素链连接到底物蛋白上,使底物蛋白通过蛋白酶体途径降解。

蛋白酶体是催化泛素与蛋白底物耦联体降解的关键酶,包括 20S 蛋白酶体和 26S 蛋白酶体,其中

20S 上的 C2 亚基(PSMA1)为 α 环中最大的亚基,结构保守,可使 20S 蛋白酶体活性明显增强,蛋白降解加速。SIAH 是 p53 依赖性的细胞生长抑制基因,SIAH 的底物蛋白种类很多,在多种组织、多种信号通路、多种生命活动周期中发挥着重要作用,通过降解某些原癌基因及抗凋亡因子达到抑制肿瘤的作用,经泛素-蛋白酶体系统可降解多种蛋白,包括 β -catenin。

β -catenin 是一种多功能胞质蛋白,在各类卵巢癌中均有表达,是癌细胞早起增殖的重要分子,在正常成熟细胞中主要与 E 钙调蛋白分子形成 β -catenin/E-钙调蛋白复合体,均匀地分布在细胞膜上,调节细胞间的黏附,只有很少量的游离 β -catenin 存在于细胞内。 β -catenin 不仅是介导细胞之间黏附的重要蛋白,介导胞间黏附,促进肿瘤浸润和转移,也是 wnt 信号传导途径的重要组成部分。 β -catenin 是 SIAH 的底物蛋白之一,SIAH 可与 SCF(Skp-Cullin-F box)组成泛素连接酶复合体,Skp 蛋白是此复合物的中心成员,可以同时结合 Cullin 家族蛋白 Cull 及 F-box 蛋白,SIAH 不能结合此复合物,但是可以结合 SIP(Siah-interacting protein)蛋白,SIP 能结合 Skp1,从而将 SIAH 带到此复合物上,介导 β -catenin 的降解^[12]。PCR 和 Western blot 结果显示,与单独 DDP 组相比,联合用药组随着 PGIPN 浓度增加,SIAH 和蛋白酶体表达量有不同程度的增加,而 β -catenin 的表达量降低,说明 SIAH-蛋白酶体- β -catenin 的信号通路可能参与了 PGIPN 对卵巢癌细胞的作用过程,PGIPN 作用于 EEF1D,从而解除了

EEF1D 对 SIAH 的 E3 泛素连接酶活性的抑制, 蛋白酶体活动增强, 加剧 β -catenin 的降解, 从而逆转卵巢癌细胞耐药性, 增加对顺铂的敏感性, 但具体相关机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Fiat A M, Migliore-Samouri D, Jollès P, et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities [J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76(1): 301–10.
- [2] 周艳, 秦宜德, 董华胜, 等. B-CM-7 对 MCF-7、SKOV₃ 和 SK-N-SH 肿瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2008, 43(1): 5–9.
- [3] 顾芳, 秦宜德, 董华胜, 等. 乳源免疫调节肽对小鼠抗氧化和抗疲劳作用研究 [J]. *营养学报*, 2006, 28(4): 326–8.
- [4] 李素萍, 秦宜德, 董琼珠, 等. 饲喂乳源免疫调节肽对大鼠生长和免疫的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2005, 40(6): 499–501.
- [5] 魏彩, 秦宜德, 郑欣, 等. 乳源免疫调节肽体外抑制人卵巢癌细胞侵袭和转移 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(1): 42–8.
- [6] 郑欣, 何晓光, 张文晓, 等. 免疫调节肽对卵巢癌 SKOV₃ 细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 758–62.
- [7] 周娟, 刘琛, 顾芳, 赵梦静, 等. 乳源免疫调节肽提高 DDP 对卵巢癌细胞的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(10): 1440–44.
- [8] Toerres-Llanez, Mde J, Vallejo-Cordoba B, González-Córdova A F. Bioactive peptides derived from milk proteins [J]. *Arch Latinoam Nutr*, 2005, 55(2): 111–7.
- [9] Baldi A, Ioannis P, Chiara P, et al. Biological effects of milk proteins and their peptide with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem [J]. *J Dairy Res*, 2005, 72: 66–72.
- [10] 李小勤, 筛选和鉴定抗卵巢癌活性六肽的靶点蛋白 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- [11] Wu H, Shi Y, Lin Y, et al. Eukaryotic translation elongation factor 1 delta inhibits the ubiquitin ligase activity of SIAH-1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1–2): 209–15.
- [12] Matsuzawa S, Li C, Ni C Z, et al. Structural analysis of Siah1 and its interactions with Siah-interacting protein (SIP) [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 1837–40.

Immunomodulating peptide inhibits the drug resistance of ovarian cancer cell through the ubiquitin-proteasome pathway

Ruan Xin, Wang Shenyi, Xu Qia, et al

(*Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To study the inhibitory effect of immunomodulating peptide (PGIPN) on the drug resistance and its mechanism in ovarian cancer. **Methods** The IC₅₀ and cell proliferation inhibition rates were detected in human ovarian cancer cell lines (both sensitive cell line, SKOV₃, and drug-resistant cell line, SKOV₃-DDP) and primary ovarian cancer cell through the combination of the PGIPN and cisplatin (DDP) by MTT method. The PCR and Western blot were used to detect the expressions of genes related to the ubiquitin-proteasome pathway in human ovarian cancer cell lines and primary ovarian cancer cells. **Results** The experimental results showed that the proliferation inhibition rate in combined drug group was higher than that in the groups treated only with DDP and PGIPN and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The results of PCR and Western blot indicated that PGIPN lessened the resistance of ovarian cancer cells to DDP by regulating the expressions of genes related to the ubiquitin-proteasome pathway in human ovarian cancer cell lines and primary ovarian cancer cells. PG-IPN promoted the expression of SIAH and PSMA1 genes and reduced the expression of β -catenin gene ($P < 0.05$, $P < 0.01$) with a dose-dependent manner. **Conclusion** PGIPN reduces the resistance of ovarian cancer cells to DDP through the ubiquitin proteasome pathway.

Key words ovarian cancer; immunomodulating peptide; cisplatin; the ubiquitin-proteasome pathway