

# PJ34 对 A549/DDP 细胞耐药相关基因表达的影响

韩柯 郝吉庆

**摘要** 目的 探讨 PJ34 对肺腺癌顺铂耐药(A549/DDP)细胞多药耐药相关基因的影响。方法 将 A549/DDP 细胞分为对照组、顺铂单药组、PJ34 单药组、PJ34 联合顺铂组,RT-PCR 法检测细胞内肺耐药蛋白(LRP)、多药耐药蛋白(MRP)、P-糖蛋白(P-gp)、谷胱甘肽-S-转移酶- $\pi$ (GST- $\pi$ )、拓扑异构酶 II  $\alpha$ (TOPO-II  $\alpha$ ) mRNA 转录水平。结果 除了 TOPO-II  $\alpha$  外,其余四种耐药相关基因 mRNA 在 A549/DDP 细胞内的转录水平明显高于 A549 细胞( $P < 0.05$ )。经 PJ34 处理后的 A549/DDP 细胞内 MRP、P-gp mRNA 转录水平下降( $P < 0.05$ ),且呈浓度及时间依赖性。结论 LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$  可能参与了 A549/DDP 细胞对顺铂的继发耐药,PJ34 可能通过下调 MRP、P-gp mRNA 转录水平而间接增加顺铂对 DNA 的损伤。

**关键词** 肺腺癌; PARP-1 抑制剂; 顺铂; 耐药性; 多药耐药基因

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1128-05

中晚期肺癌患者无法行根治性切除术,以铂类为主的联合化疗成为主要治疗手段,仅有 25% 患者生存达到 5 年<sup>[1]</sup>,多药耐药的产生是治疗失败的主要原因。聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶-1 [Poly(ADP-ribose) merase-1, PARP-1] 是存在于多数真核细胞内的蛋白核酶,其维持基因组稳定,调节基因转录<sup>[2]</sup>。课题组前期研究<sup>[3]</sup>表明,PARP-1 在肺腺癌顺铂耐药细胞株中表达明显上调,第三代 PARP-1 抑制剂 PJ34 可诱导细胞凋亡、抑制 DNA 损伤修复、增强肺腺癌顺铂耐药细胞对顺铂的敏感性。研究<sup>[4-5]</sup>显示肺耐药蛋白(LRP)、多药耐药相关蛋白(MRP)、P-糖蛋白(P-gp)、谷胱甘肽-S-转移酶- $\pi$ (GST- $\pi$ )和拓扑异构酶 II (TOPO II) 在肿瘤的耐药中发挥重要作用。该研究探讨耐药相关基因在肺腺癌顺铂耐药株与野生株间的表达差异及 PJ34 对其表达的影响。

2016-04-19 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085MH142);安徽省对外科技合作计划项目(编号:1503062023)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:韩柯,男,硕士研究生;

郝吉庆,女,博士,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ayfy\_hjq@163.com111

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 肺腺癌顺铂耐药细胞(A549/DDP)株购自南京凯基生物科技发展有限公司; A549 细胞株由安徽医科大学基础医学院惠赠,均培养于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中,隔天换液,细胞长至 80% ~ 90% 传代。A549/DDP 细胞初始加入含 500 ng/ml DDP 的药物培养液,两代后加入终浓度为 2 000 ng/ml 的顺铂维持其耐药表型。

**1.2 试剂及器材** RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司; PJ34 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 顺铂注射液购自山东齐鲁制药有限公司; RNA 提取 TRIzol、cDNA 逆转录试剂盒、SYBR Select Maser Mix 均购自美国 Thermo 公司; PCR 基因扩增仪 MJ Research PTC-100 购自美国 BIO-RAD 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 StepOne Plus 购自美国 Applied Biosystem 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 实验分组及处理** A549/DDP 细胞分为对照组、PJ34 单药组、PJ34 联合顺铂组, PJ34 组分为 0、3、6、12、24 mg/L 5 个浓度梯度,分别处理 24 h,另取浓度为 3 mg/L 的 PJ34 分别处理 24、48、72 h; PJ34 联合顺铂组给予 3 mg/L PJ34 + 11 mg/L 顺铂处理 24 h, A549 细胞作为对照组。每个处理组实验重复 3 次。

**1.3.2 RNA 提取和定量测定** 步骤包括: ① 取处理完毕后各组细胞,吸出培养液,6 孔板每孔内加入 1 ml TRIzol 消化,然后移入无 RNA 酶的 EP 管中,室温孵育 5 min; ② 1 ml TRIzol 中加入 0.2 ml 氯仿,剧烈晃动 15 s,室温孵育 2 ~ 3 min; ③ 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,溶液分为无色上清水相、中间层(膜状蛋白)、下层红色苯酚氯仿层; ④ 吸取上层无色水相至另一无 RNA 酶的 EP 管中,加入 500  $\mu\text{l}$  异丙醇,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min(RNA 附着于管底); ⑤ 移除上清液,加入 1 ml 75% 乙醇溶液,简单振荡,4  $^{\circ}\text{C}$ 、7 500 r/min 离心 5 min,弃上清液; ⑥ 空气干燥 5 ~ 10 min,加入 20 ~ 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O 重悬 RNA; ⑦ 55 ~ 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 ~ 15 min; ⑧ 测 RNA 浓

度及纯度;⑨ 直接进行逆转录或储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

**1.3.3 逆转录合成 cDNA** 依据试剂盒说明书进行操作,总 RNA 量为  $1.5\ \mu\text{g}$ ,总反应体积  $20\ \mu\text{l}$ ,反应条件: $25^{\circ}\text{C}$ 、 $10\ \text{min}$   $37^{\circ}\text{C}$ 、 $120\ \text{min}$   $85^{\circ}\text{C}$ 、 $5\ \text{min}$ ,逆转录产物直接进行 PCR 扩增或储存于  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱内备用。

**1.3.4 PCR 扩增** GAPDH、LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$ 、TOPO-II  $\alpha$  引物由上海生工生物公司合成,GAPDH 作为内参,其基因序列见表 1。QRT-PCR 反应体系  $20\ \mu\text{l}$ ,包括 SYBR Select Master Mix  $10\ \mu\text{l}$ ,上下游引物各  $1\ \mu\text{l}$ ,cDNA 模板  $1\ \mu\text{l}$ , $\text{ddH}_2\text{O}$   $7\ \mu\text{l}$ 。反应

参数设置: $50^{\circ}\text{C}$  保温  $2\ \text{min}$ , $95^{\circ}\text{C}$  预热  $2\ \text{min}$ , $95^{\circ}\text{C}$  变性  $15\ \text{s}$ , $60^{\circ}\text{C}$  退火延伸  $1\ \text{min}$ , $40$  个循环。通过  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析基因的相对表达量。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,上述数据均重复 3 次,试验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。计量资料组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。图表在 GraphPad Prism 5.0 中生成。

## 2 结果

**2.1 A549/DDP 细胞耐药相关基因 PCR 反应** PCR 反应扩增曲线见图 1。

**2.2 A549 与 A549/DDP 细胞间耐药相关基因表达** A549/DDP 及 A549 细胞内 LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$ 、TOPO-II  $\alpha$  均有表达,但 LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$  在 A549/DDP 细胞内的表达水平明显高于 A549 细胞,差异有统计学意义( $t = 69.282, P < 0.01$ ;  $t = 110.177, P < 0.01$ ;  $t = 323.916, P < 0.01$ ;  $t = 258.287, P < 0.01$ ),TOPO-II  $\alpha$  在两种细胞内的表达差异无统计学意义( $F = 4.117, P > 0.05$ ),见图 2。

**2.3 PJ34 对 A549/DDP 细胞内耐药相关基因表达的影响**

**2.3.1 PJ34 对 A549/DDP 细胞内耐药相关基因表达的量效关系** 取对数生长期的 A549/DDP 细胞,

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: GCTGTGAAGACCCAGGAGAG R: AAGCACCAGGAAACCACTTG
LRP	F: AAGAGCAGCGAGGAGTGAAG R: GCGTGGTGAAGAGGTAGAG
MRP	F: GCTGTGAAGACCCAGGAGAG R: AAGCACCAGGAAACCACTTG
GST- $\pi$	F: CACTCAAAGCCTCCTGCCTA R: TGCTGGTCCCTCCATAGAG
P-gp	F: GTTGACAGCATAGCCGACCT R: CCACTTAGCCGAGCAGATG
TOPO-II $\alpha$	F: GATGCTAATGATGCTGGTGCT R: TCCGTATCTGTCTCGTCAA

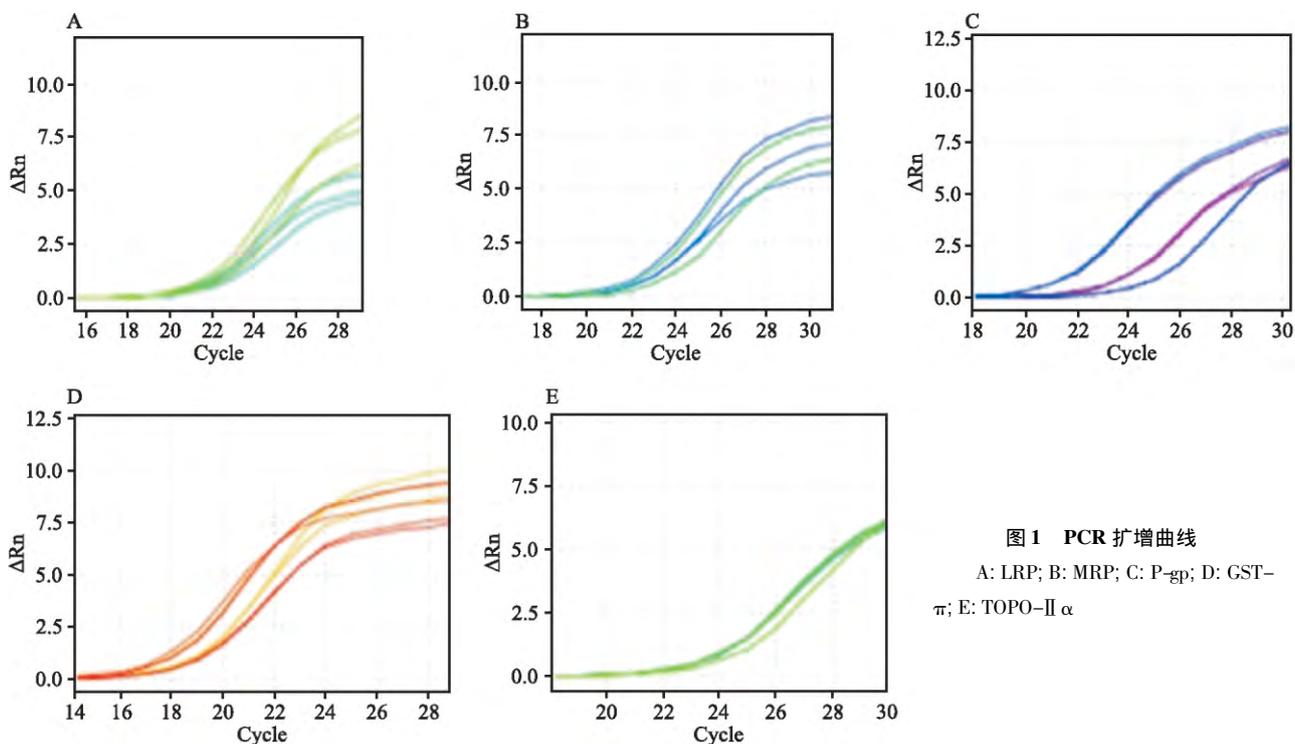


图 1 PCR 扩增曲线

A: LRP; B: MRP; C: P-gp; D: GST- $\pi$ ; E: TOPO-II  $\alpha$

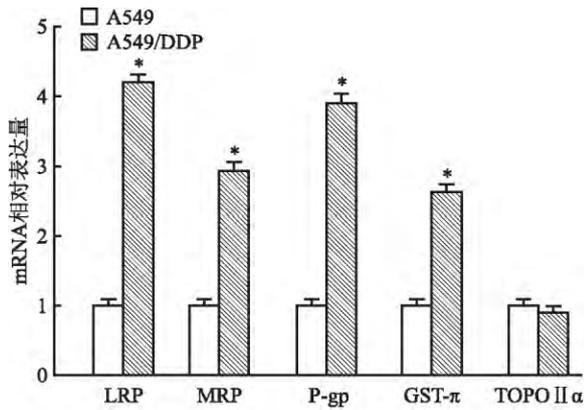


图2 A549细胞与A549/DDP细胞耐药相关基因表达的差异与A549细胞比较: \* P < 0.05

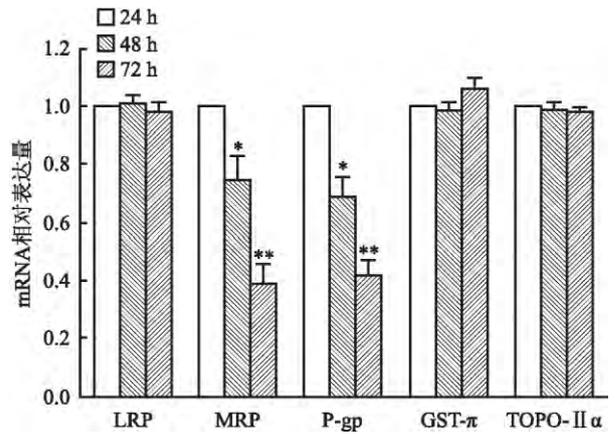


图4 PJ34对A549/DDP细胞内耐药相关基因表达的时效关系与24 h比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

加入不同浓度(0、3、6、12、24 mg/L) PJ34 处理 24 h 后 ,A549/DDP 细胞内 MRP 表达水平下降 ,差异有统计学意义 ( $F = 1\ 756.279, P < 0.05$ ) ,P-gp 表达水平下降 ,差异有统计学意义 ( $F = 1\ 865.031, P < 0.05$ ) ,且二者呈明显的浓度依赖性 ,而 LRP、GST-π、TOPO-II 表达量随 PJ34 浓度的增加未见明显变化 ,见图 3。

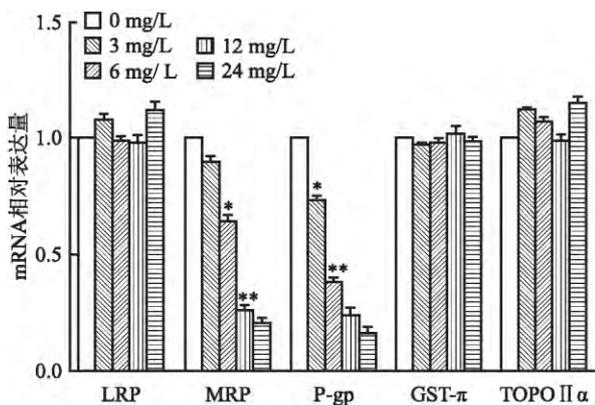


图3 PJ34对A549/DDP细胞内耐药相关基因表达的量效关系与0 mg/L比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

**2.3.2 PJ34对A549/DDP细胞内耐药相关基因表达的时效关系** 取对数生长期的A549/DDP细胞,加入3 mg/L的PJ34分别处理24、48、72 h后,A549/DDP细胞内MRP表达量随给药时间的延长逐渐下降,差异有统计学意义( $F = 2\ 119.237, P < 0.05$ ) ,P-gp表达量随给药时间的延长逐渐下降,差异有统计学意义( $F = 2\ 639.624, P < 0.05$ ) ,呈明显的时间依赖性,而LRP、GST-π、TOPO-II α表达量随时间延长未见明显变化,见图4。

**2.3.3 PJ34联合顺铂后A549/DDP细胞内MRP、P-gp mRNA水平的变化** 取对数生长期的A549/

DDP细胞,分为对照组、顺铂(11 mg/L)单药组、PJ34(3 mg/L)单药组及PJ34(3 mg/L)联合顺铂(11 mg/L)组,结果显示: PJ34单药组较对照组MRP mRNA水平降低,差异有统计学意义( $t = 83.563, P < 0.05$ ) ,P-gp mRNA水平降低,差异有统计学意义( $t = 79.315, P < 0.05$ ) ; PJ34联合顺铂组较顺铂单药组MRP mRNA水平降低,差异有统计学意义( $t = 74.253, P < 0.05$ ) ,P-gp mRNA水平降低,差异有统计学意义( $t = 69.969, P < 0.05$ ) ,PJ34单药组较PJ34联合顺铂组MRP、P-gp mRNA水平未见明显变化。见图5。

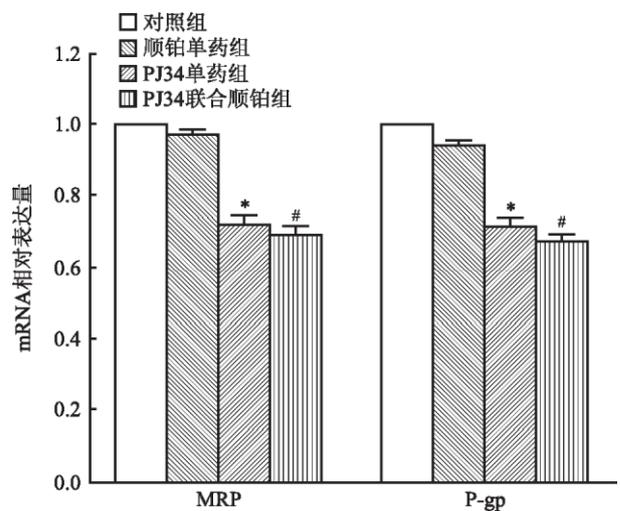


图5 PJ34联合顺铂对A549/DDP细胞MRP、P-gp mRNA的影响与对照组比较: \* P < 0.05; 与顺铂单药组比较: # P < 0.05

### 3 讨论

LRP是人类穹窿体的重要组成部分,其参与阿

霉素、长春新碱、顺铂等多种药物的耐药。研究<sup>[6]</sup>显示 LRP 高表达的非小细胞肺癌患者较低表达患者对顺铂的敏感性降低。MRP 是一种 ATP 依赖性膜转运蛋白,其在肺癌的继发耐药中起重要作用,参与非小细胞肺癌对顺铂的继发耐药<sup>[7]</sup>。P-gp 是 ATP 结合转运蛋白家族的主要成员之一,其可作为肺腺癌对顺铂产生耐药性的一个预测因子<sup>[8]</sup>。GST- $\pi$  属于 II 相代谢酶,与多种肿瘤的化疗耐药密切相关。非小细胞肺癌细胞株 GST- $\pi$  mRNA 水平高于小细胞肺癌细胞株,导致小细胞肺癌比非小细胞肺癌细胞株对顺铂更敏感,对顺铂耐药的肺腺癌患者中 GST- $\pi$  的表达明显增高<sup>[9]</sup>。TOPO-II 是催化 DNA 结果的基本核酶,细胞内 TOPO-II mRNA 水平及活性与以其为靶点的相关药物的耐药密切相关,TOPO-II 的表达增加可增加肺癌细胞对表柔比星的敏感性,TOPO-II 表达下降,肺癌细胞对 VP-16 的敏感降低。本实验研究显示 LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$  mRNA 在 A549/DDP 细胞内的水平明显高于 A549 细胞,提示 LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$  在肺腺癌对顺铂的继发耐药中发挥重要作用,这与上述研究结果一致,而 TOPO-II  $\alpha$ mRNA 在两种细胞内未见明显差异,与肺腺癌对顺铂的继发耐药无关,这可能因为顺铂为非 TOPO-II 靶点药物。

PARP-1 是 PARP 家族中含量最多、功能最重要的亚型。目前,国内外将 PARP-1 作为疾病治疗的新靶点,已研制出多种 PARP-1 抑制剂,并显示出良好的治疗效果。PARP-1 抑制剂增强 ERCC1 低表达的非小细胞肺癌对顺铂的敏感性,在顺铂耐药的睾丸生殖细胞肿瘤中也显示出来良好的治疗效果<sup>[10-11]</sup>。PJ34 是新一代选择性 PARP-1 抑制剂,较传统 PARP 抑制剂,无论口服还是注射都显示出较高的生物利用度。研究<sup>[12]</sup>显示在急性创伤性脑损伤, PJ34 维持血脑屏障的完整性,减轻脑组织水肿及炎症反应。PJ34 还可通过降低 FANCD2、BRCA2 和 RAD51 蛋白和 mRNA 表达水平,下调 FA/BRCA 通路活性增加对骨髓瘤细胞的杀伤作用,部分逆转对美法兰的耐药<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, PJ34 可降低多药耐药相关基因 MRP、P-gp 的表达水平,并且具有浓度及时间依赖性。PJ34 联合顺铂组与单药顺铂组比较表现出协同降低 MRP、P-gp 的表达水平,差异有显著性,而与单药 PJ34 比较未见明显差异,推测其可能原因为顺铂作为细胞周期非依赖性化疗药物其主要作用机制为直接诱导细胞 DNA 的损伤,对细胞内 MRP、P-gp 的表达无影响。

综上所述,本研究提示 A549 细胞顺铂继发耐药与 LRP、MRP、P-gp、GST- $\pi$  过表达相关, PJ34 可通过下调 MRP、P-gp mRNA 的水平,部分逆转 A549/DDP 对顺铂的耐药。这为 PJ34 在铂类耐药非小细胞肺癌患者的应用提供一定的理论基础。

### 参考文献

- [1] Torre L A , Bray F , Siegel R L , et al. Global cancer statistics , 2012 [J]. *CA Cancer J Clin* , 2015 , 65(2) : 87 - 108.
- [2] Rajesh M , Mukhopadhyay P , Godlewski G , et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2006 , 350(4) : 1056 - 62.
- [3] 姚圆圆 郝吉庆. PJ34 对肺腺癌顺铂耐药细胞增殖及耐药性的影响 [J]. *中国药理学通报* 2015 31(6) : 865 - 70.
- [4] Wang J , Zhang J , Zhang L , et al. Expression of P-gp , MRP , LRP , GST- $\pi$  and TopoII $\alpha$  and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines [J]. *Oncol Rep* , 2011 , 26(5) : 1081 - 9.
- [5] 喻龙姍 张开光. 胃癌多药耐药机制的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(4) : 449 - 52.
- [6] Zurita A J , Diestra J E , Condom E , et al. Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours [J]. *Br J Cancer* , 2003 , 88(6) : 879 - 86.
- [7] Ikuta K , Takemura K , Sasaki K , et al. Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Biol Pharm Bull* , 2005 , 28(4) : 707 - 12.
- [8] Inoue Y , Gika M , Abiko T , et al. Bcl-2 overexpression enhances *in vitro* sensitivity against docetaxel in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep* , 2005 , 13(2) : 259 - 64.
- [9] Hirano T , Kato H , Maeda M , et al. Identification of postoperative adjuvant chemotherapy responders in non-small cell lung cancer by novel biomarker [J]. *Int J Cancer* , 2005 , 117(3) : 460 - 8.
- [10] Cheng H , Zhang Z , Boreczuk A , et al. PARP inhibition selectively increase sensitivity to cisplatin in ERCC1-low non-small cell lung cancer [J]. *Carcinogenesis* 2013 34(4) : 739 - 49.
- [11] Cavallo F , Graziani G , Antinozzi C , et al. Reduced proficiency in homologous recombination underlies the high sensitivity of embryonal carcinoma testicular germ cell tumors to Cisplatin and poly (adp-ribose) polymerase inhibition [J]. *PLoS One* , 2012 , 7(12) : e51563.
- [12] Tao X , Chen X , Hao S , et al. Protective actions of PJ34 , a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor , on the blood - brain barrier after traumatic brain injury in mice [J]. *Neuroscience* , 2015 , 291 : 26 - 36.
- [13] Xiong T , Wei H , Chen X , et al. PJ34 , a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor , reverses melphalan-resistance and inhibits repair of DNA double-strand breaks by targeting the FA/BRCA pathway in multidrug resistant multiple myeloma cell line RPMI8226/R [J]. *Int J Oncol* , 2015 , 46(1) : 223 - 32.

## TSC1 在肝纤维化中的表达及基因甲基化

陈晨<sup>1,2</sup>, 黄成<sup>1,2</sup>, 孟晓明<sup>1,2</sup>, 李俊<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 通过检测在大鼠肝纤维化模型及转化生长因子-β1 (TGF-β1) 刺激的大鼠肝星形细胞 (HSC) T6 中结节性硬化症 (TSC) 相关蛋白错构素 (hamartin) 的表达, 并检测 HSC T6 细胞 TSC1 基因启动子甲基化状态, 探讨肝纤维化疾病治疗的新靶点。方法 构建大鼠肝纤维化模型, 培养 HSC T6 细胞。利用 Western blot 法检测 hamartin 蛋白表达, 利用焦磷酸测序检测 TSC1 启动子甲基化。结果 与正常对照组比较, 肝纤维化模型组 TSC1 蛋白表达量较小 ( $P < 0.01$ ), 且 TSC1 基因启动子甲基化程度较高。结论 TSC1 可能与肝纤维化形成有一定关联。

**关键词** TSC1; 肝纤维化; 甲基化

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1132-04

肝纤维化是许多慢性肝病发展到肝硬化的中间

过渡阶段, 其中有 25% ~ 40% 最终发展成为肝硬化, 更严重的发展为肝癌。肝脏的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成和降解不平衡, 而导致纤维结缔组织的过度沉积, 是肝纤维化的主要病理表现<sup>[1]</sup>。HSCs 的激活与增殖是肝纤维化发生发展其中的中心环节<sup>[2]</sup>。肝纤维化的形成是受各类因素网路调控的, 目前的研究<sup>[1]</sup>表明其涉及多种相关细胞因子以及诸多信号转导通路。结节硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC) 是一种罕见的常染色体显性遗传病, 其发病机制是由于 TSC1 和 TSC2 基因中任何一个发生变异。TSC1 基因定位 9q34, TSC2 基因定位于 16p13.3, TSC1 和 TSC2 编码的基因产物分别为错构素 (hamartin) 和结节素 (tuberin), 蛋白分子量大小为 130 ku 与 200 ku<sup>[3-4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>显示 TSC1 在肾纤维化模型中低表达, 并且敲除 TSC1 基因的转基因小鼠可以显示出肾间质纤维细胞的激活以及肾纤维化。该研究旨在探讨 TSC1 是否在肝纤维化中有表达变化。

### 1 材料与方法

1.1 实验材料 HSC T6 细胞株来自安徽医科大学

2016-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81273526, 81473268); 安徽省科技攻关项目 (编号: 1301042212)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学药学院, <sup>2</sup> 安徽医科大学肝病研究所, 合肥 230032

作者简介: 陈晨, 女, 硕士研究生;

李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

## Effect of PJ34 on the expression of multidrug resistance related gene in A549/DDP cells

Han Ke, Hao Jiqing

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the impact of PJ34 on human pulmonary carcinoma cell line A549/DDP-related multiple drug resistance genes. **Methods** A549/DDP cells were divided into 3 groups: negative control, DDP-treated group, PJ34-treated group, PJ34 and DDP-treated group. The mRNA transcription levels of LRP, MRP, P-gp, GST-π, TOPO-II α were quantified in each group by RT-PCR. **Results** The mRNA transcription levels of LRP, MRP, P-gp, GST-π in A549/DDP cells were significantly higher than those in the A549 cells ( $P < 0.05$ ). The mRNA transcription levels of MRP, P-gp in A549/DDP cells dramatically decreased in a time and dose-dependent manner after PJ34 treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** LRP, MRP, P-gp, GST-π are probably involved in secondary drug resistance of DDP in A549/DDP cells. PJ34 sensitizes DNA to DDP damage by indirectly downregulating mRNA levels of MRP and P-gp.

**Key words** pulmonary adenocarcinoma; PARP-1 inhibitors; cisplatin; tolerance; multidrug resistance gene