

文章编号:1000-5404(2013)12-1197-03

论著

人小细胞肺癌细胞 H446 Snail 基因表达及其在顺铂耐药中的作用

况里杉,周向东 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] 目的 观察锌指转录因子 snail 在耐顺铂(cisplatin, CDDP)的人小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC) H446/CDDP 细胞中的表达情况,探讨 snail 表达在人 SCLC 顺铂耐药中的作用。方法 培养 H446 细胞系和 H446/CDDP 细胞系,采用 MTT 法检测 H446/CDDP 的耐药指数;分别提取人 SCLC 顺铂耐药细胞 H446/CDDP 及其亲代细胞 H446 的 mRNA 及总蛋白,应用 sybgreen 实时荧光 RT-PCR、Western blot 方法检测 snail mRNA 及蛋白表达水平。结果 H446/CDDP 细胞 snail 蛋白及 mRNA 表达水平较 H446 细胞显著性升高($P < 0.05$)。结论 SCLC 的顺铂耐药性可能与 snail 表达水平增高有关。

[关键词] 人小细胞肺癌;顺铂耐药;snail;real time RT-PCR;Western blot

[中图分类号] R394.2;R734.2;R979.11

[文献标志码] A

Expression of snail in human small-cell lung cancer cell line H446 and its role in cisplatin resistance

Kuang Lishan, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of zinc finger transcription factor snail in human cisplatin (CDDP)-resistant small-cell lung cancer (SCLC) cell line H446/CDDP, and to study the role of snail in cisplatin resistance of human SCLC. **Methods** H446 and H446/CDDP cell lines were cultured, and cisplatin resistance index was measured by MTT assay. The mRNA and protein expression levels of snail in the H446 and H446/CDDP cells were detected by real-time RT-PCR and Western blotting. **Results** The mRNA and protein expression levels of snail in the H446/CDDP cells were significantly higher than those in the H446 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The CDDP resistance of human SCLC may be related to the high expression level of snail.

[Key words] human small cell lung cancer; cisplatin resistance; snail; real-time RT-PCR; Western blotting

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2010CB529402). Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: xiangdongzhou@126.com

人小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)易发生顺铂耐药,其机制目前尚不完全清楚,可能与凋亡、DNA 修复异常、细胞内药物异常积累等多种因素相关^[1]。锌指转录因子(Snail)是一种抑制型转录因子,通过直接抑制钙黏蛋白 E(E-cadherin) 的表达触发上皮-间充质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的发生,进而赋予上皮源性肿瘤细胞运动和侵袭能力^[2-3]。在肺腺癌细胞系 A549 的研究中发现沉默

Snail 的表达能够恢复细胞对顺铂的敏感性^[4-5],而在 SCLC 尚缺乏相关方面的研究。因此,本研究拟从 EMT 的关键因子 snail 入手,研究人 SCLC 顺铂耐药性的获得与 snail 表达水平之间的关系,为逆转其耐药寻求新的途径。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人 SCLC 细胞系 H446(简称 H446)及人耐 CDDP 的 SCLC 细胞系 H446/CDDP(简称 H446/CDDP)由第三军医大学西南医院呼吸内科保存,培养基 RPMI 1640 购于美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)购于浙江四季青公司;Trizol 试剂购于天

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2010CB529402)

[通信作者] 周向东, E-mail: xiangdongzhou@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1553.017.html> (2013-03-05)

根生化;Real time RT-PCR 试剂盒购于康为试剂;引物由上海生工公司合成。

1.2 细胞培养

H446 及 H446/CDDP 细胞常规接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 5% CO₂ 的培养箱在 37 °C、饱和湿度条件下培养。实验中所用细胞均选用处于对数生长期的 3 ~ 10 代内细胞;为了保持耐药细胞的耐药性,H446/CDDP 细胞培养基中同时加入终浓度为 0.5 μg/mL 的顺铂维持培养。

1.3 MTT 比色法测定 H446 和 H446/CDDP 的细胞增殖曲线,计算 H446/CDDP 的顺铂耐药指数

取处于对数生长期的 H446 和 H446/CDDP 细胞按 5 000/孔接种于 96 孔培养板上,置 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h,待细胞贴壁后去掉培养基,加入含有不同浓度顺铂的 RPMI 1640 培养液,每孔总体积为 200 μL,每种浓度设 3 个复孔;梯度浓度的顺铂作用 48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL,继续无菌培养 4 h;将每孔中的培养液小心吸去后加入 200 μL DMSO,振荡 10 min,待沉淀完全溶解后用酶标仪测定波长 490 nm 下各孔的光密度值 [D(490)];绘制细胞增殖曲线,并计算半数抑制浓度 (50% growth-inhibition, IC₅₀)。耐药指数 (resistance index, RI) = 耐药细胞 IC₅₀/亲本细胞 IC₅₀。细胞增殖率 = [D(490)_{实验组} - D(490)_{对照组}] / [D(490)_{对照组} - D(190)_{空白组}] × 100%。此实验在相同条件下重复 3 次。

1.4 Real-time RT-PCR 检测 H446 和 H446/CDDP 细胞中 Snail 的表达

Trizol 法提取细胞总 RNA,依据公布的人 snail 基因 (NM_005985.3),Primer Premier 5.0 软件设计扩增引物,引物由上海生工公司合成,Snail 引物:上游 5'-CTTCCAGCAGCCCTACGAC-3',下游 5'-CGGTGGGGTTGAGGATCT-3';GAPDH 引物:上游:5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3',下游:5'-GGGTCATTGATGGCAACAATA-3';反转录反应条件与体系:dNTP Mix (2.5 mmol/L)4 μL,Primer Mix 2 μL,RNA Template 1 μg,5 × RT Buffer 4 μL,DTT(0.1 mol/L)2 μL,HiFi-MMLV (200 U/μL) 1 μL,RNase-Free Water 加至 20 μL,涡旋震荡混匀,短暂离心,使管壁上的溶液收集到管底。42 °C 孵育 30 ~ 50 min,70 °C 孵育 15 min。反应结束后,短暂离心,置于冰上冷却。

PCR 扩增反应条件与体系 (sybgreen 法): 50 μL 反应体系,2 × UltraSYBR Mixture 25 μL,上游引物 (10 μmol/L) 1 μL,下游引物 (10 μmol/L) 1 μL,cDNA 2 μL,RNase-Free Water 加至 50 μL。反应条件:95 °C 10 min,(95 °C 15 s,60 °C 1 min)40 个循环;融解曲线分析:95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,60 °C 15 s。

1.5 Western blot 检测

常规培养至细胞密度为 80% ~ 90%,加 RIPA 裂解液提取蛋白后用 BCA 法定量,取 20 μg 蛋白上样,一抗兔抗人 snail 抗体 (1:1 000) 4 °C 过夜,二抗羊抗兔 (1:5 000) 抗体室温 2 h,后用 ECL 法成像,Bio-Rad 成像仪摄片。IPP5.0 软件测量光密度。

1.6 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行独立样本 *t* 检验。

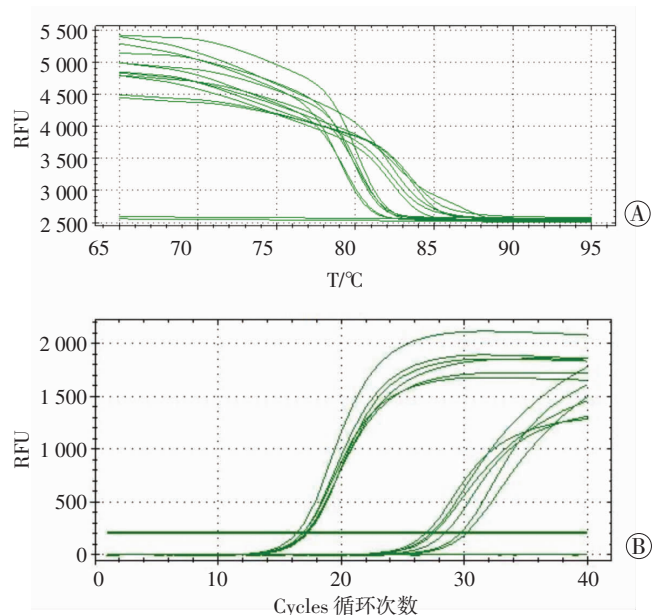
2 结果

2.1 H446/CDDP 细胞株的耐药性鉴定

H446/CDDP 及 H446 细胞的 IC₅₀ 分别为 2.35、0.21 μg/mL;则 H446/CDDP 细胞的顺铂耐药指数为 11.19,可用于后续实验。

2.2 Real-time RT-PCR 检测结果

采用 Real-time RT-PCR (图 1) 技术检测 H446 细胞及 H446/CDDP 细胞中 snail mRNA 表达,可见 H446/CDDP 细胞 snail mRNA 的表达显著高于 H446 细胞组 (*P* < 0.05)。

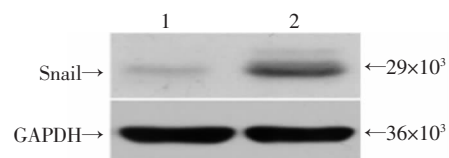


A:融解曲线图;B:扩增曲线图

图1 H446 和 H446 /CDDP 细胞基因组 snail mRNA 结果

2.3 Western blot 检测结果

H446 细胞及 H446/CDDP 细胞中 snail 蛋白的表达水平检测 (图 2),可见 H446/CDDP 细胞 snail 蛋白的表达水平显著高于 H446 细胞组 (*P* < 0.05)。



1: H446; 2: H446/CDDP

图2 H446 和 H446 /CDDP 细胞基因组 snail Western blot 检测结果

3 讨论

肺癌细胞化疗耐药性的机制十分复杂,近年来,EMT在肿瘤化疗耐药中的作用逐渐为研究者所重视。在多种肿瘤细胞中的研究显示:EMT与肿瘤多药耐药有密切的联系。耐奥沙利铂的结肠癌细胞显示出许多EMT特征,包括迁移和浸润能力的增加以及向梭状细胞形态转化、细胞极性丧失、伪足形成等。在多药耐药的卵巢癌细胞系中能够观察到Snail、slug的表达上调^[6]。多药耐药的胰腺癌细胞株中ZEB1表达增加、E-cadherin表达减少,抑制ZEB1表达则上调细胞对药物敏感性^[7]。这些研究均提示:EMT是促进肿瘤耐药的因素之一。

Snail是EMT中的主要调节蛋白,是含有锌指结构的DNA结合蛋白。Snail能够通过转录调节抑制E-cadherin基因的表达,引起上皮细胞向间质细胞表型的转变,导致EMT^[8]。在EMT与耐药关系的研究中发现:敲除snai则能促使A2780卵巢癌耐顺铂细胞株恢复对顺铂的敏感性^[9]。乳腺癌细胞中上调Snail的表达促使细胞对顺铂耐药^[10]。提示Snail与耐药密切相关。Zhuo等^[5]研究发现:敲除Snail能够通过促进juk/线粒体凋亡途径促使肺腺癌A549细胞对顺铂敏感性增强,提示Snail及EMT诱导耐药的机制可能与凋亡途径相关。

SCLC发生于肺支气管上皮,是一种具有未分化和神经内分泌分化的高度恶性肿瘤。除易发生骨、脑、淋巴结、肝等远处转移外,极易发生多药耐药,这使SCLC成为预后最差的肺癌类型。有研究显示:ZEB1在SCLC骨转移中具有重要的作用^[11],小鼠移植瘤中的SCLC具有明显间质化的特征^[12],提示SCLC具备EMT的特性,而目前在SCLC中尚缺乏针对EMT与耐药相关性的研究。

我们的研究通过Real-time RT-PCR和Western blot技术检测H446和H446/CDDP细胞系中Snail mRNA及蛋白表达水平,比较两株细胞系中Snail表达的不同。结果显示:H446/CDDP中Snail的表达较H446显著性升高,这与之前其他肿瘤细胞系研究结果相似,说明SCLC对CDDP的耐药性可能与细胞高表达Snail有关。并且,Snail作为EMT中的主要调节蛋白,其在H446/CDDP中表达增高也进一步提示SCLC

中EMT可能与肿瘤耐药的发生密切相关,可能是化疗耐药的促进因子。深入研究人SCLC中Snail基因表达与顺铂耐药的关系,将为SCLC的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Brown R, Glasspool R. Epigenetic modulation of resistance to chemotherapy? [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(9): 1429-1430.
- [2] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology [J]. *Pathology*, 2007, 39(3): 305-318.
- [3] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression; an alliance against the epithelial phenotype? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(6): 415-428.
- [4] Xiao D, He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2010, 2(3): 154-159.
- [5] Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway [J]. *Lung Cancer*, 2008, 62(1): 8-14.
- [6] Kurrey N K, Jalgaonkar S P, Joglekar A V, et al. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2059-2068.
- [7] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier K F, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5820-5828.
- [8] Becker K F, Rosivatz E, Blechschmidt K, et al. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1/3): 204-212.
- [9] Haslehurst A M, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 91.
- [10] Li W, Liu C, Tang Y, et al. Overexpression of Snail accelerates adriamycin induction of multidrug resistance in breast cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(10): 2575-2580.
- [11] Liu Y, Zhang N, Wang Y, et al. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes invasion and bone metastasis of small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8): 1420-1428.
- [12] Calbo J, van-Montfort E, Proost N, et al. A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(2): 244-256.

(收稿:2012-11-08;修回:2013-01-25)

(编辑 邓强庭)