

APE1 基因沉默增强骨肉瘤 U2-OS 细胞硼替佐米治疗敏感性的实验研究

多 健^① 王国文^① 韩秀鑫^① 杨吉龙^① 孙建合^②

摘要 目的:探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(APE1)基因沉默对蛋白酶体抑制剂硼替佐米(bortezomib, PS-341) 抑制骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖作用的影响及其生物学机制。**方法:**将 APE1 特异性 shRNA 的重组质粒, 稳定转染入骨肉瘤 U2-OS 细胞, 采用聚合酶链反应和免疫印迹法检测转染前后 U2-OS 细胞中 APE1 的表达, 采用四甲基偶氮唑盐法观察 PS-341 和 APE1-siRNA 对骨肉瘤 U2-OS 细胞生长的抑制作用, 采用免疫印迹法检测 PS-341 和 APE1-siRNA 对 U2-OS 细胞中 APE1 和胞核 NF- κ B 的表达的影响。**结果:**细胞稳定转染 APE1-siRNA 重组质粒后, APE1 mRNA 和蛋白表达分别下降约 46.1% 和 62.6%, MTT 法检测 U2-OS 细胞增殖受到抑制。转染前后 U2-OS 细胞 PS-341 的 IC₅₀ 值分别为 371.54 nmol/L 与 109.64 nmol/L, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示 PS-341 和 APE1-siRNA 均抑制 U2-OS 细胞胞核中 NF- κ B 的表达, 两者联合应用抑制效果更明显。**结论:**APE1-shRNA 质粒转染骨肉瘤 U2-OS 细胞后, 肿瘤细胞的增殖率降低, 对 PS-341 抑制 U2-OS 细胞的增殖具有协同作用。推测其生物学机制可能与下调胞核 NF- κ B 蛋白表达有关。

关键词 骨肉瘤 蛋白酶体抑制剂 脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 1 NF- κ B 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.08.003

APE1 Gene Silencing Promotes the Sensitivity of Osteosarcoma U2-OS Cells to Bortezomib

Jian DUO¹, Guowen WANG¹, Xiuxin HAN¹, Jilong YANG¹, Jianhe SUN²

Correspondence to: Jian DUO; E-mail: duojian@live.cn

¹Department of Bone and Soft Tissue Tumors, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

²Department of Anesthesiology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

This work was supported by the Natural Science Foundation of Tianjin City (No. 08JCYBJC05500)

Abstract Objective: To investigate the effects of apurinic / apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) on the inhibitory action of bortezomib on human osteosarcoma U2-OS cells and the underlying biological mechanisms. **Methods:** An shRNA plasmid that targets APE1 was constructed and transfected into U2-OS cells. The mRNA and protein levels of APE1 were detected via reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot analysis. The inhibition of cell proliferation induced by PS-341 and APE1-siRNA was examined with an 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide assay. The change in nuclear NF- κ B and APE1 expression induced by PS-341 and APE1 in osteosarcoma U2-OS cells was examined using Western blot analysis. **Results:** The APE1-shRNA expression plasmid was successfully constructed and transfected into U2-OS cells. The expression inhibition rate was about 47.6 % at the mRNA level, and was about 62.6 % at the protein level. Osteosarcoma cell proliferation was inhibited, as indicated by the MTT analysis. The median inhibitory concentration of PS-341 was 371.54 nmol/L before APE1-shRNA transfection, which significantly decreased to 109.64 nmol/L after APE1-shRNA transfection ($P < 0.01$). The Western blot analysis indicated that both PS-341 and APE1-siRNA downregulated nuclear NF- κ B protein expression in the U2-OS cells. The effect was more significant than that of combination of the above two. **Conclusion:** After APE1-shRNA plasmid transfection into the osteosarcoma U2-OS cells, APE1 expression was inhibited at the protein and mRNA levels. The osteosarcoma cell proliferation rate was also decreased, and the PS-341 inhibitory effect on the osteosarcoma cells was promoted. The biological mechanisms may be related to the downregulation of nuclear NF- κ B expression.

Keywords Osteosarcoma; Proteasome inhibitor; Apurinic / Apyrimidinic Endonuclease 1; NF- κ B protein

骨肉瘤是青少年中常见的一种恶性肿瘤, 恶性程度高, 尽管近年来临床治疗取得了较大进展, 但死亡率和致残率仍很高, 寻找新的治疗靶点显得尤为

重要。蛋白酶体抑制剂 PS-341 作为第二类靶向治疗药物, 也是目前唯一进入临床应用的蛋白酶体抑制剂, 主要用于多发性骨髓瘤治疗, 取得了满意的疗效^[1]。

作者单位: ①天津医科大学附属肿瘤医院骨和软组织肿瘤科, 天津市肿瘤防治重点实验室 (天津市 300060); ②麻醉科

*本文课题受天津市自然科学基金(编号:08JCYBJC05500)资助

通信作者: 多健 duojian@live.cn

APE1基因是DNA损伤修复的关键基因,在多种肿瘤中呈高表达,并与预后相关。众多研究提示APE1基因可能是肿瘤治疗的新靶点。本实验通过转染构建APE1-shRNA质粒稳定表达的骨肉瘤细胞系U2-OS,研究新药PS-341对骨肉瘤的细胞毒作用,为骨肉瘤新的治疗方向提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及培养条件

人骨肉瘤细胞系U2-OS从中国医学科学院上海细胞库引进,含10%胎牛血清和100 U/mL青霉素和链霉素的DMEM高糖培养基中、37℃、5% CO₂培养箱内培养。3~5天传代一次。

1.2 主要试剂

pGenesil-1.1绿色荧光蛋白质粒购自于武汉市晶赛生物工程技术有限公司。脂质体Lipofectamine™2000为Invitrogen公司产品。蛋白酶体抑制剂PS-341为Millennium Pharmaceuticals公司产品。鼠抗人APE1单克隆抗体购自美国Novus Biological公司。鼠抗人单克隆NF-κB p65抗体、鼠抗人单克隆β-actin抗体为Santa Cruz产品。四甲基偶氮唑盐(MTT)及G418为Sigma公司产品。DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基和胎牛血清购自于Gibco公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒为Thermo公司产品。T4 DNA连接酶、Eco31 I酶、Sac I酶为TAKARA公司产品。细胞核蛋白抽提试剂盒及二抗辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG抗体购自天津灏洋生物科技公司。

1.3 方法

1.3.1 骨肉瘤U2-OS细胞的稳定转染 APE1特异性shRNA重组质粒的构建与鉴定参考文献[2]设计的APE1-siRNA cDNA序列,以Eco31 I酶酶切线性化,pGenesil-1.1质粒表达载体构建APE1-siRNA表达载体pSilenceAPE1,用质粒纯化试剂盒提取质粒,用Sac I酶进行酶切鉴定,并进一步测序鉴定,阳性重组质粒命名为APE1-shRNA,阴性对照重组质粒命名为Control-shRNA。APE1-shRNA转染前24 h将对数生长期的U2-OS细胞接种于24孔板,待细胞生长到80%融合时进行转染,分为三组:空白对照组:未转染任何质粒;阴性对照组:转染Control-shRNA质粒;实验组:转染APE1-shRNA质粒。每组设三个复孔。按照转染试剂Lipofectamine™2000说明书进行转染,空白对照组则加入等体积的无血清DMEM培养液。转染12 h后,即于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达,并更换完全培养基;待培养72 h后更换含G418(500 μg/mL)筛选培养基培养;每3~5 d换液一次。经G418(500 μg/mL)筛选培养基培养3周后,得到稳定细胞克隆,并挑至培养

瓶中继续用含G418(300 μg/mL)培养基培养。

1.3.2 RT-PCR实验 各组细胞培养后收集,用Trizol提取细胞中总RNA,将2 g总RNA逆转录成cDNA,采用PCR仪扩增。APE1引物序列上游:5'-CTGCCTG-GACTCTCT CATCAA-3',下游:5'-AGGTCTCCACA-CAGCACAAGG-3',产物302 bp。β-actin引物序列上游:5'-GCA CCCAGCACAATGAAGATC-3',下游引物为:5'-CTA GAAGCATTTCGGTGGAC-3',产物169 bp。PCR反应条件:94℃ 5 min;35个循环的94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s;72℃ 8 min。

1.3.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)实验 各组细胞消化后,制成浓度为2×10⁵个/mL细胞悬液接种于96孔板,每孔200 μL,每组设6个复孔,同时设立不加细胞的试剂组。待细胞贴壁后加入不同浓度蛋白酶体抑制剂PS-341处理,浓度分别为25、50、100、200、400、800 nmol/L,于48 h后加入MTT(5 mg/mL)20 μL,继续培养4 h,离心弃去培养液,每孔加入DMSO 100 μL,用酶标仪在波长570 nm下检测OD值。计算细胞存活率=试验组OD值/对照组OD值×100%。并绘制细胞生长曲线。

1.3.4 蛋白印迹分析(Western-blot)实验 取各组对数生长期细胞,加药组(PS-341组和PS-341+APE1-shRNA组)加入IC50浓度的PS-341处理细胞,加药后48 h收集细胞。各组细胞收集后,用RIPA裂解液于冰上裂解,4℃ 13 000 r/min离心,取上清液即为总蛋白,按照细胞核蛋白抽提试剂盒说明书提取核蛋白,BCA法测定蛋白浓度。每组样本各取蛋白50 μg,用8%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离蛋白,半干转法将蛋白转到PDVF膜上。经5%脱脂奶封闭1 h后,加一抗4℃孵育过夜(一抗稀释浓度根据说明书要求)。二抗为采用HRP标记的羊抗鼠IgG(1:3 000),用化学发光法显色。凝胶图像分析系统检测蛋白质印记条带灰度。采用Kodak 1D软件分析APE1和NF-κB蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

实验数据以均数±标准差表示,采用SPSS 16.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

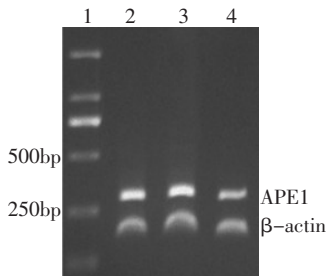
2.1 APE1基因沉默骨肉瘤细胞系的构建

RT-PCR实验结果APE1-shRNA稳定转染骨肉瘤U2-OS细胞后,在mRNA水平检测APE1表达,结果发现实验组较空白对照组APE1表达明显下调(46.1±4.18)% (图1)。Western blot实验结果证实APE1-shRNA组APE1蛋白表达水平较空白对照组下调了(62.6±2.74)%,说明我们设计的APE1-shRNA通过稳定转染能够有效抑制骨肉瘤U2-OS细胞

APE1mRNA的表达。

2.2 PS-341与APE1基因沉默对骨肉瘤U2-OS细胞系增殖的影响

为观察APE1基因沉默后蛋白酶体抑制剂PS-341对人骨肉瘤U2-OS细胞系生长抑制的影响,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)实验,用25、50、100、200、400、800 nmol/L不同浓度的PS-341分别作用于实验组和阴性对照组U2-OS细胞,观察48 h的细胞生长状况,通过MTT细胞生存率曲线分析和计算IC₅₀值,比较两组U2-OS细胞的生长情况。结果表明蛋白酶体抑制剂PS-341对对照组U2-OS细胞的生长有着抑制作用,且这种抑制作用随着PS-341剂量增加而逐渐增强,不同浓度PS-341作用下U2-OS细胞的生存率分别为(95.52±1.21)%、(84.53±2.80)%、(78.41±4.47)%、(74.25±3.98)%、(54.05±3.69)%和(43.23±4.53)%。实验组与对照组相比,不同浓度PS-341对骨肉瘤APE1-shRNA U2-OS细胞系的抑制作用明显增强($P<0.05$),生存率分别为(79.38±4.36)%、(62.52±3.01)%、(54.95±3.87)%、(31.73±2.66)%、(24.67±2.72)%和(17.36±2.35)% (图2)。实验组和阴性对照组IC₅₀值分别为(109.64±17.86)nmol/L与(371.54±26.32)nmol/L,两者比较有明显统计学差异($P<0.01$)。提示APE1基因沉默可以提高PS-341对骨肉瘤U2-OS细胞系的生长抑制作用。



1: DNA marker (DL2000); 2: Control-shRNA组; 3: 空白对照组; 4: APE1-shRNA组

图1 APE1-shRNA在mRNA水平对APE1表达的抑制作用

Figure 1 The mRNA level suppression of APE1 induced by APE1-shRNA

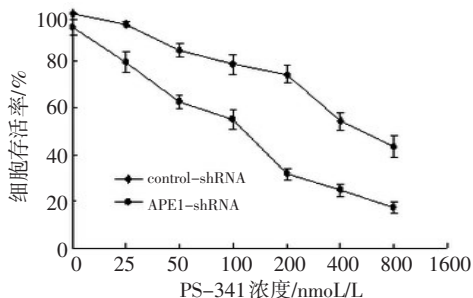
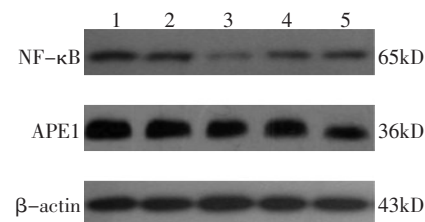


图2 MTT检测PS-341联合APE1-shRNA对骨肉瘤U2-OS细胞生长增殖的影响

Figure 2 Effects of PS-341 alone and PS-341 combined with APE1-shRNA on the proliferation of osteosarcoma U2-OS cells detected by MTT assay

2.3 胞核NF-κB的蛋白表达

通过Western blot实验检测加药组、APE1-shRNA组、Control-shRNA组和空白对照组中胞核NF-κB蛋白表达情况,见图3。结果显示PS-341组、APE1-shRNA组与空白对照组比较均下调了骨肉瘤U2-OS细胞胞核NF-κB蛋白表达水平,分别下调了(31.3±2.3)%和(19.5±3.4)%,两者联合应用后这种作用得到增强,与空白对照组比较下调了(75.2±2.6)%。



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: IC₅₀浓度PS-341+APE1-shRNA组; 4: IC₅₀浓度PS-341组; 5: APE1-shRNA组

图3 Western blot检测骨肉瘤U2-OS细胞APE1和NF-κB蛋白表达情况
Figure 3 APE1 and NF-κB expression in osteosarcoma U2-OS cells as determined through Western blot analysis

3 讨论

蛋白酶体是存在于细胞内的一种多单位组成的蛋白酶复合体,通过泛素-蛋白酶体途径(UPP)系统蛋白酶体精确、有选择性的降解细胞内目的靶蛋白,进而参与调节细胞周期进程、基因转录、抗原呈递、细胞分化与凋亡及信号转导等各种细胞病理生理过程。因此,抑制蛋白酶体功能可导致调控细胞周期转录凋亡的调节蛋白出现进行性积蓄,进而引起细胞周期变化和细胞凋亡^[3]。

PS-341是目前唯一临床批准使用的蛋白酶体抑制剂,抑制核转录因子NF-κB活性是PS-341诱导肿瘤细胞凋亡的关键靶点。PS-341通过与蛋白酶体的20S亚单位β环的苏氨酸位点结合,有效地抑制26S蛋白酶体的蛋白水解功能,进而阻断IκB的降解而抑制核因子NF-κB的激活。是NF-κB作为一种重要的抗凋亡因子,其活性的抑制不仅可以引起肿瘤细胞的凋亡,而且可以抑制癌细胞的侵袭、转移和血管生成^[4]。Hideshima等^[5]发现PS-341可以诱导人多发性骨髓瘤细胞凋亡。Chauhan等^[6]发现PS-341通过泛素-蛋白酶体途径抑制骨髓瘤细胞增殖的原因主要与下调NF-κB蛋白活性有关。Shapovalov等^[7]通过体内和体外实验研究发现PS-341可以抑制骨肉瘤细胞生长。本研究用不同浓度的PS-341作用人骨肉瘤U2-OS细胞后,MTT检测提示PS-341可以抑制U2-OS细胞生长,并呈剂量依赖性。Western blot实验结果提示PS-341通过下调胞核NF-κB蛋白表达抑制骨肉瘤U2-OS细胞增殖。

APE1与肿瘤关系十分密切,在很多肿瘤组织中呈高表达,其升高常提示预后不佳。我们先前研究发现骨肉瘤患者中APE1高表达者对临床化疗不敏感且预后不佳^[8]。进而很多研究发现APE1表达增高与肿瘤对放疗和各种细胞毒性药物抵抗有关,降低APE1水平可能会提高肿瘤治疗的敏感性,从而提高治愈率,达到控制肿瘤进展和改善患者预后的目的。Wang等^[9]使用腺病毒载体抑制APE1表达后发现肺癌细胞对顺铂的药物敏感性增高。此外还发现敲除APE1基因以后骨肉瘤细胞对⁶⁰Co射线以及MMS等DNA损伤剂敏感性显著增加^[10]。本研究通过构建APE1-shRNA质粒稳定转染骨肉瘤U2-OS细胞,无论在RNA水平还是蛋白水平均检测到APE1基因沉默。此外,通过Western blot实验发现PS-341+APE1-shRNA组较空白对照组APE1表达降低降低(12.7±2.1)%,但较APE1-shRNA组增高(49.9±4.8)%,原因可能是骨肉瘤细胞通过高表达APE1产生对PS-341的抗性,这与Wang等^[9]实验研究相一致,他们发现随着顺铂加药浓度的增大,肺癌细胞表达APE1的水平提高,提示肿瘤中APE1表达增高与化疗药物抵抗有关。但是在PS-341组中未发现较空白对照组APE1表达的明显变化,可能是由于骨肉瘤U2-OS细胞本身高表达APE1,PS-341作用后难以产生明显差异所致。此外,实验组PS-341的IC50值较对照组降低2.39倍,说明APE1基因沉默可以提高骨肉瘤细胞对PS-341药物的敏感性。

此外,众多研究证实APE1在真核生物的基因转录中发挥转录调控作用,是多个转录因子的共同激活剂,包括AP-1、NF-κB、HIF-1α、Egr-1和P53等,通过介导这些转录因子参与细胞生存,增殖和抗凋亡路径的信号调控^[11]。Guan等^[12]研究发现APE1通过依赖和非依赖NF-κB介导的机制来修复TNF-α或低氧导致的细胞损害,抵抗细胞凋亡。APE1缺失可降低NF-κB的活性从而增加内皮细胞对凋亡的易感性。本研究Western blot结果发现APE1-shRNA组较对照组细胞核NF-κB表达水平降低,与PS-341联合后进一步下调细胞核NF-κB表达水平,提示APE1基因沉默通过下调核转录因子NF-κB胞核内表达提高PS-341对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用,提高其治疗敏感性。

本研究通过稳定转染APE1-shRNA质粒成功构建了APE1基因沉默的骨肉瘤细胞系模型,在此基础上联合抗癌新药PS-341进行了骨肉瘤细胞系的体外研究,发现APE1基因沉默可以提高PS-341对骨肉瘤细胞的治疗敏感性,为骨肉瘤靶向治疗提供了新的治疗方向。

参考文献

- 1 Montagut C, Rovira A, Albanell J. The proteasome: a novel target for anticancer therapy[J]. *Clin Transl Oncol*, 2006, 8(5): 313-317.
- 2 王 忱, 多 健, 史玉荣, 等. APE1shRNA重组质粒的构建及对人乳腺癌细胞生长的影响[J]. *实用肿瘤杂志*, 2010, 25(5): 523-527.
- 3 Andrew F, Cun-Yu W. Proteasome Inhibitor Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(7): 745-748.
- 4 Yang M, Huang J, Pan HZ, et al. Triptolide overcomes dexamethasone resistance and enhanced PS-341-induced apoptosis via PI3k/Akt/NF-κB pathways in human multiple myeloma cells[J]. *International journal of molecular medicine*, 2008, 22(4): 489-496.
- 5 Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor-κB activation in multiple myeloma cells [J]. *Blood*, 2009, 114(5): 1046-1052.
- 6 Chauhan D, Hideshima T, Mitsiades C. Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(4): 686-692.
- 7 Shapovalov Y, Benavidez D, Zuch D, et al. Proteasome inhibition with bortezomib suppresses growth and induces apoptosis in osteosarcoma[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(1): 67-76.
- 8 Yang JL, Yang D, Cogdell D, et al. APEX1 Gene Amplification and Its Protein Overexpression in Osteosarcoma: Correlation with Recurrence, Metastasis, and Survival[J]. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2010, 9(2): 161-169.
- 9 Wang D, Xiang DB, Yang XQ, et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells[J]. *Lung Cancer*, 2009, 66(3): 298-304.
- 10 Wang D, Luo M, Kelley MR. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(6): 679-683.
- 11 Flaherty DM, Monick MM, Huuninghake GW, et al. AP Endonucleases and the Many Functions of Ref-1[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(6): 664-667.
- 12 Guan Z, Basi D, Li Q, et al. Loss of redox factor 1 decreases NF-κB activity and increases susceptibility of endothelial cells to apoptosis. *Arterioscler*[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1): 96-101.

(2012-02-22收稿)

(2012-03-29修回)

(本文编辑:郑莉)