

转录因子 Snail 促进结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的机制研究

钟文^{1a}, 叶磊^{1b}, 童磊², 王昊^{1c}

(1. 安徽省立医院 a. 病理科, b. B 超室, c. 检验科, 安徽 合肥 230001;

2. 淮南市凤台县第一人民医院普外科, 安徽 淮南 230032)

摘要:目的 研究转录因子 Snail 促进结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂产生耐药性的分子机制。**方法** 采用 MTT 法分别检测过表达 Snail 蛋白和空载质粒的 HCT116 细胞对奥沙利铂的敏感性差别,以及 RNA 敲除-糖蛋白(P-gp,编码基因 ABCB1)蛋白的 HCT116 细胞对奥沙利铂的敏感性的影响。实时定量 PCR 方法检测过表达 Snail 对耐药相关基因表达的影响。蛋白质免疫印迹技术 Western blot 检测过表达 Snail 对 P-gp 蛋白表达的影响。**结果** 过表达转录因子 Snail 可以明显促进结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂产生耐药性。实时定量 PCR 结果表明:过表达 Snail 明显提高了 P-gp 蛋白编码基因 ABCB1 的表达,而对其它耐药基因如 ABCG1、ERCC1 等没有明显影响。Western blot 结果显示过表达 Snail 可以促进 P-gp 蛋白的表达。敲除 P-gp 蛋白可以明显提高 HCT116 细胞对于奥沙利铂的敏感性。**结论** 过表达 Snail 可以明显促进结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂的耐药性,其机制与 Snail 促进耐药蛋白 P-gp 的表达有关。

关键词: 结直肠癌; Snail; 耐药; 奥沙利铂; P-gp

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.034

Molecular mechanism of transcription factor Snail mediated chemoresistance of colorectal cell HCT116 to Oxaliplatin

ZHONG Wen^{1a}, YE Lei^{1b}, TONG Lei², WANG Hao^{1c}

(a. Pathology Department, b. B-ultrasound Room, c. Clinical Laboratory Department, 1. Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230001, China; 2. Department of General Surgery, The First People's Hospital of Fengtai County, Huainan, Anhui 230032, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of transcription factor Snail mediated chemoresistance of colorectal cell HCT116 to Oxaliplatin. **Methods** The effect of overexpression Snail or knockdown P-gp on sensibility of HCT116 cells to Oxaliplatin was analyzed by MTT assay. Real time PCR was used to detect mRNA expressions of drug resistance genes influenced by overexpression Snail. Western blotting was used to detect the effect of Snail on P-gp expression. **Results** Compared to vector plasmid, overexpression Snail obviously enhanced the resistance of HCT116 cells to Oxaliplatin. The results of real time PCR demonstrated that overexpression Snail significantly enhanced ABCB1 mRNA expression, which encoded P-gp protein, but not the other drug resistance genes, such as ABCG1, ERCC1. Western blotting result show over overexpression Snail promote the expression of P-gp protein. Importantly, knockdown P-gp expression enhanced the sensibility of HCT116 cells to Oxaliplatin. **Conclusions** Overexpression Snail increased the chemoresistance of HCT116 cells to Oxaliplatin by up-regulated multidrug resistance protein P-gp expression.

Key words: Colorectal cancer; Snail; Drug resistance; Oxaliplatin; P-gp

多年来,结直肠癌是严重威胁世界人民身体健康的恶性肿瘤之一。目前,药物治疗是结直肠癌的主要治疗手段,然而,结直肠癌对化疗药物产生耐药性一直是困扰其治疗的难题。因此,更好的理解产生化疗耐药性的潜在机制对成功治疗肿瘤具有重大的临床意义。奥沙利铂是目前临床上结直肠

癌化疗的基础药物之一,奥沙利铂的作用机制是进入结直肠癌细胞后与 DNA 交叉联结,形成稳定的奥沙利铂-DNA 复合物,阻断 DNA 复制,引起结直肠癌细胞死亡。然而,在临床应用中,多数病人经初始化疗缓解后,结直肠癌细胞对奥沙利铂产生了耐药性,影响了结直肠癌治疗的效果。

最近一些研究发现,肿瘤化疗耐药性的产生与上皮-间质转化(EMT)之间存在表型和分子方面的密切相关^[1-3]。Snail 蛋白作为 EMT 重要的转录因子,已经成为肿瘤发生发展研究的热点之一^[4]。越

基金项目:国家自然科学基金(81502599);安徽省自然科学基金(1608085QH217);中国博士后基金(2016M592040)

通信作者:王昊,男,博士,硕士生导师,研究方向:肿瘤转移与化疗耐药, E-mail: wanghao986118@163.com

来越多的研究发现,Snail 不仅是 EMT 转化过程的重要调控者,而且在肿瘤进程中发挥着 EMT 以外的生物学功能^[5]。Snail 与肿瘤耐药之间存在密切关系,但潜在的分子机制并不清楚。肿瘤耐药性的产生机制非常复杂,涉及到多种原因,主要与细胞膜水平上药物摄取减少和外排增多、DNA 修复系统功能增强、细胞解毒系统、药物亚细胞分布的改变以及药物靶点(主要指拓扑异构酶Ⅱ)在质和量上的改变等因素有关。本研究检测了过表达 Snail 对结直肠癌细胞 HCT116 耐药性的影响,并通过检测相关耐药基因的变化,对其中潜在的分子机制进行了探讨,以期为深入理解肿瘤耐药机制提供一些有益的实验依据和线索。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 结直肠癌细胞株 HCT116 由本实验室保存。培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,置 37℃,5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 d 用 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2 主要试剂 噻唑兰(MTT)、奥沙利铂购自 Sigma-Aldrich 公司;单克隆抗体 Snail、P-gp、ABCG2 购自 Cell Signaling Technology 公司;单克隆抗体 α -tubulin 抗体购自 Santa Cruz 公司;HRP 标记的羊抗兔和羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司;反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;PCR 引物由上海生工公司合成;其余试剂均为国产分析纯以上。

1.3 MTT 实验 取对数生长期的 HCT116 细胞,经胰酶消化后以每毫升 5×10^4 密度接种于 96 孔培养板,加药组加不同浓度药物,对照组加等体积的 0.9% 生理盐水,每组设 6 个复孔,无细胞孔为背景。置 37℃,5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 48 h 后加 MTT 每孔 20 μ L,继续培养 4 h,加二甲基亚砜(DMSO)每孔 20 μ L,充分振荡直至沉淀完全溶解,用酶标仪检测 OD₄₉₂,实验重复 3 次,细胞存活率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值。

1.4 蛋白提取和蛋白质印迹检测 细胞用预冷 PBS 洗涤后用蛋白裂解液[50 mmol·L⁻¹ Tris-Cl (pH 8.0),100 mmol·L⁻¹ 氯化钠,0.2 g·L⁻¹ 叠氮钠,100 mg·L⁻¹ 抑肽酶,100 mg·L⁻¹ PMSF,1 g·L⁻¹ 十二烷基硫酸钠,10 g·L⁻¹ NP-40,5 g·L⁻¹ 去氧胆酸钠]裂解,离心后收集上清,用 Bradford 法测定蛋白浓度;等量蛋白样品经 10% SDS-PAGE 电泳分离后,转印至 PVDF 膜上,50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉室温孵育 2 h,Snail、P-gp 和 α -tubulin 均以 1:1 000 孵育过夜,经含有吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗

涤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的特异性的羊抗兔或羊抗鼠的二抗以 1:5 000 室温孵育 1.5 h,PBST 洗涤 3 次,最后用 ECL 化学发光试剂对 X 光片显影。

1.5 荧光定量 PCR 实验 按照 TRIzol 说明书方法提取细胞 RNA,按反转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 α -tubulin 作为内参。引物序列如表 1 所示。PCR 反应条件:94℃预变性 30 s,94℃5 s,60℃30 s,72℃30 s 共 40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 c-met mRNA 的相对表达量,每个实验组重复 3 次。

表 1 引物序列

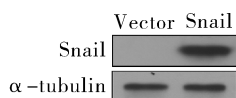
基因名称	引物序列
ABCB1	F:5'-TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG-3' R:5'-AATTACAGCAAGCCTGGAACC-3'
ABCC1	F:5'-GCCAAGAAGGAGGAGACC-3' R:5'-AGGAAGATGCTGAGGAAGC-3'
ABCC4	F:5'-GGTTCCTTGGGAATCATTT-3' R:5'-AATCCTGTGTGCATCAAACAG-3'
ABCC5	F:5'-ACCCGTTGTTGCCATCTTAG-3' R:5'-GCTTTGACCCAGGCATACAT-3'
ABCC6	F:5'-GTGGTGTGTTGCTGTCCACAC-3' R:5'-ACGACACCAGGTCAACTTC-3'
PARP1	F:5'-AAGAAATGCAGCGAGAGCAT-3' R:5'-CCAGTGTGGGACTTTTCCAT-3'
BRCA1	F:5'-GCCAGAAAACACCACATCAC-3' R:5'-CAGTGTCCGTTACACACAAA-3'
ERCC1	F:5'-CTCAAGGAGCTGGCTAAGATGT-3' R:5'-CATAGGCCCTGTAGGCTCTCCAG-3'
XRCC1	F:5'-CATCGTGCCTAAGGAGTGGGTG-3' R:5'-AGTGGGCTTGTTTGTGCTGG-3'
MSH2	F:5'-GCTTCTCTGGCAATCTCTCTC-3' R:5'-TACCCAACCTCAACCTGTCTCT-3'
TUBB3	F:5'-TCAGCAAGTGCGGTGAGGACTAT-3' R:5'-CGGAAGCAGATGCTCGTAGAGCG-3'
POLH	F:5'-CGTGGGAGCAGTGATTGTGGAGGA-3' R:5'-GGTTTGGCGGTTGGGCTTGTTTAG-3'
GST π	F:5'-ACCTCCGCTGCAAATACATC-3' R:5'-CTCAAAAGGCTTCAGTTGCC-3'
γ GT1	F:5'-GCCTGGATTCTCCCAGAGAT-3' R:5'-GGAGAGCACCTCTTCTCAG-3'
Gapdh	F:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' R:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

1.6 统计学方法 观测资料主要是计量数据,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 统计学软件处理。组间比较采用双侧 *t* 检验或单因素方差分析,以 *P* < 0.05

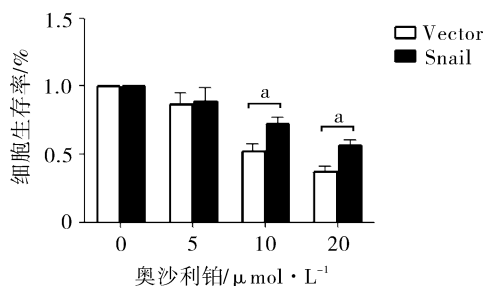
为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 Snail 增强结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂的耐药性 利用 MTT 实验比较过表达 Snail 蛋白和空载质粒的 HCT116 细胞对奥沙利铂的敏感性,结果显示,过表达 Snail 质粒后 Snail 蛋白表达明显升高(图 1A),并且在奥沙利铂作用 24 h 后,过表达 Snail 蛋白的 HCT116 细胞的生存率明显高于过表达空载质粒的 HCT116 细胞,两者之间相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1B)。研究表明,过表达 Snail 增强结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂具有耐药性。



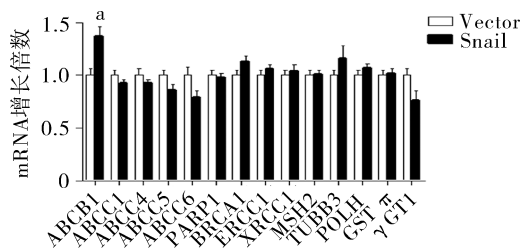
A. Western blot 检测 Snail 蛋白表达情况



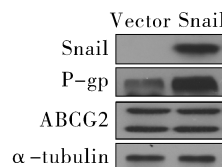
B. MTT 实验检测过表达 Snail 和空载质粒 Vector 对奥沙利铂的敏感性($^a P < 0.05$)

图 1 Snail 促进 HCT116 细胞对奥沙利铂耐药性

2.2 过表达 Snail 促进多药耐药蛋白 P-gp 的表达 为了进一步分析 Snail 促进 HCT116 细胞对奥沙利铂耐药性的分子机制,我们检测了过表达 Snail 蛋白对肿瘤耐药相关基因表达的影响情况。实时定量 PCR 结果显示(图 2A):过表达 Snail 可以促进 ABCB1 基因的高表达,而对其他耐药基因没有明显的影响。进一步地,我们检测了过表达 Snail 对 ABCB1 编码蛋白 P-gp 的影响,P-gp 蛋白介导了多种肿瘤细胞对化疗药物的耐受性,被称为多药耐药蛋白,Western blot 结果显示(图 2B)。过表达 Snail 可以明显促进 P-gp 的表达,而对 ABCG2 蛋白没有明显影响,这些结果提示 P-gp 可能在 Snail 介导的结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂耐药性的过程中发挥了重要作用。



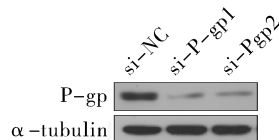
A. 实时定量 PCR 检测过表达 Snail 对耐药相关基因表达的影响($^a P < 0.05$)



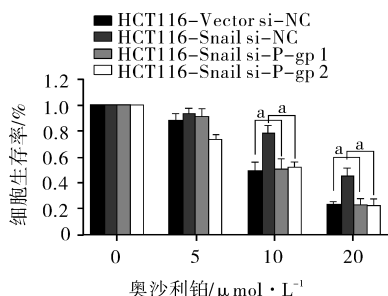
B. Western blot 检测过表达 Snail 对 P-gp 蛋白表达的影响

图 2 过表达 Snail 促进多药耐药蛋白 P-gp 的表达

2.3 P-gp 在 Snail 促进结直肠癌细胞耐药性过程中的作用 为了验证 P-gp 在 Snail 促进直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂耐药性过程中的作用,我们使用了 2 个针对 P-gp 的小分子干扰 RNA 转染到 HCT116 细胞中,并检测干扰后 P-gp 蛋白的表达情况,发现与同体积的对照组相比,2 个小分子干扰 RNA 都可以明显抑制 P-gp 蛋白的表达(图 3A)。我们进一步进行了 MTT 实验,预先使用小分子干扰 RNA 抑制 HCT116 细胞中 P-gp 的表达,再对细胞进行 Snail 蛋白的过表达,同时设立对照组,用 MTT 试剂处理细胞 24 h,结果显示:与同体积的对照组 RNA 相比,小分子干扰 P-gp 表达的 RNA 可以明显抑制 Snail 蛋白介导的耐药性,提高 HCT116 细胞对奥沙利铂的敏感性(图 3B)。这些结果表明:P-gp 蛋白在 AKT 信号通路在 Snail 促进直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂耐药性过程中发挥了至关重要的调控作用。



A. Western blot 检测小分子干扰 RNA 对 P-gp 蛋白表达的影响



B. MTT 检测干扰 P-gp 表达对 Snail 过表达促进细胞对奥沙利铂耐药性的影响($^a P < 0.05$)

图 3 干扰 P-gp 表达对 HCT116 细胞耐药性的影响

3 讨论

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,目前化疗是最有效的治疗方法,奥沙利铂是临床上结直肠癌化疗的一线药物,然而由于肿瘤细胞耐药性的产生常常限制了疗效进一步提高,并最终使治疗失败。因此,更好的理解产生化疗耐药性的潜在分子机制对成功治疗结直肠癌来说具有重大的临床意义。最近一些研究发现,EMT 与肿瘤化疗耐药性的产生之间存在表型和分子方面的密切相关。如在胰腺癌细胞中,EMT 转录因子 ZEB1 的表达与胰腺癌细胞对化疗试剂吉西他滨、5-氟尿嘧啶和顺铂的耐药性成正相关,敲除 ZEB1 表达可以显著增强胰腺癌细胞对这三种药物的敏感性^[2]。EMT 转录因子 Slug 通过对抗抑癌基因 p53 介导的细胞凋亡而导致卵巢癌细胞产生放疗和化疗耐药性^[6]。类似的,本研究中发现对结直肠癌细胞 HCT116 进行 Snail 蛋白的过表达,引起了细胞对奥沙利铂的耐药性。

肿瘤细胞获得耐药性的机制非常复杂,涉及到多种原因,主要与细胞膜水平上药物摄取减少和外排增多、DNA 修复系统功能增强、细胞解毒系统、药物亚细胞分布的改变以及药物靶点在质和量上的改变等因素有关。研究报道 Snail 可以通过直接结合 DNA 修复蛋白核苷酸切除修复交叉互补基因 (ERCC1) 的启动子而促进其表达,从而导致头颈部癌对顺铂耐药^[7]。然而在我们的研究中过表达 Snail 并没有上调 HCT116 细胞中 ERCC1 的表达,而且对其他与耐药相关的 DNA 修复蛋白如 XRCC1、BRCA1 等的表达也没有影响,说明在结直肠癌中,Snail 可能通过其他机制导致耐药发生。Saxena 等^[8]发现了 EMT 转录因子可以通过上调 ABC 转运蛋白家族成员的表达而导致多药耐药的产生,并发现 Twist 可以直接调控 ABCC4 和 ABCC5 的启动子。因此,我们也检测了过表达 Snail 对 ABC 转运蛋白表达的影响,结果发现过表达 Snail 上调了 ABCB1 的 mRNA 表达,而对其他家族成员 ABCC1、ABCC4、ABCC5、ABCC6 和 ABCG2 的表达没有明显影响,进一步我们发现过表达 Snail 上调了 ABCB1 编码蛋白的表达水平。我们同时检查了过表达 Snail 对其他耐药相关基因如 TUBB3、GST π 和 γ GT1 等表达的影响,结果发现没有明显变化。P-gp 也被称为 MDR1,它在一些肿瘤中的表达通常处于一种较低的状态,但随着肿瘤化疗的不断进

行,P-gp 的表达开始逐渐增多,增加化疗药物的外排,使肿瘤细胞获得多药耐药特性,从而导致肿瘤化疗的失败^[9-11]。我们进一步发现,干扰 P-gp 表达可以抑制 Snail 引起的 HCT116 细胞对奥沙利铂的耐药性,表明 P-gp 蛋白在 Snail 介导的结直肠癌耐药性过程发挥一定作用。

总之,我们发现了过表达 EMT 转录因子 Snail 可以促进结直肠癌细胞 HCT116 对奥沙利铂的耐药性,并对其机制进行了探讨,发现 P-gp 蛋白在其中发挥了重要作用,Snail 通过上调 P-gp 蛋白促进药物外排导致了耐药性的产生,这可能为结直肠癌的临床化学治疗提供可行的作用靶点和潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] ARUMUGAM T, RAMACHANDRAN V, FOURNIER KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5820-5828.
- [2] SINGH A, SETTLEMAN J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-4751.
- [3] 卢列盛. 肿瘤多药耐药和侵袭转移关系的研究[J]. 国际肿瘤学杂志, 2006, 33(9): 665-667.
- [4] NIETO MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(3): 155-166.
- [5] WU Y, ZHOU BP. Snail: More than EMT[J]. Cell Adh Migr, 2010, 4(2): 199-203.
- [6] KURREY NK, JALGAONKAR SP, JOGLEKAR AV, 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] HSU DS, LAN HY, HUANG CH, et al. Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(18): 4561-4571.
- [8] SAXENA M, STEPHENS MA, PATHAK H, et al. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters[J]. Cell Death and Disease, 2011, 2(7): e179.
- [9] HIGGINS CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters[J]. Nature, 2007, 446(7137): 749-757.
- [10] 刘彭坤. PARP-1、P-gp 和 LRP 在肺腺癌中的表达和相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- [11] 李秋萍, 盖亚男. 五味子乙素对 MDR1 介导的人骨肉瘤细胞 U-2 OS/ADR 所致多药耐药性的逆转研究[J]. 安徽医药, 2014, 18(9): 1642-1645.

(收稿日期: 2016-07-02, 修回日期: 2016-09-22)