

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.14.002

干扰 LRP16 基因表达对人卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 细胞耐药性的影响及机制研究 *

于 丹¹ 伍志强² 梅 倩² 韩为东² 丁佳佳¹ 孟元光^{1Δ}

(1 解放军总医院妇产科 北京 100853; 2 解放军总医院分子生物学实验室 北京 100853)

摘要 目的:探究干扰人白血病相关蛋白 16(LRP16)基因表达对人卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 细胞耐药性的影响及其相关机制。**方法:**采用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹(WB)检测 LRP16 在敏感组(SKOV3 细胞)、耐药组(SKOV3/DDP 细胞)、LRP16 干扰组(SKOV3/DDP 细胞 - 稳定转染 LRP16 shRNA 质粒)和 NC 组(即阴性对照组, SKOV3/DDP 细胞 - 稳定转染阴性对照质粒)细胞中的表达情况; MTT 试验检测 LRP16 对 SKOV3/DDP 细胞耐药性的影响; 彗星试验检测 LRP16 对顺铂(DDP)诱导 DNA 损伤的影响; 流式细胞术(FCM)试验检测细胞凋亡变化; WB 试验检测 PTEN、p-Akt 和 NF-κB 蛋白表达水平。**结果:**LRP16 干扰组细胞的耐药指数(RI)值(3.19 ± 0.21)显著低于耐药组细胞(6.84 ± 0.37) ($P < 0.05$)。DDP($25 \mu\text{mol/L}$)处理 24 h 后, LRP16 干扰组 DNA 损伤的细胞百分比、细胞凋亡百分比均显著低于耐药组和 NC 组(P 均 < 0.05), 而耐药组和 NC 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); LRP16 干扰组细胞 PTEN 蛋白相对表达量高于耐药组和 NC 组(P 均 < 0.05), 而 p-Akt 和 NF-κB 相对表达量低于耐药组和 NC 组(P 均 < 0.05)。**结论:**干扰 LRP16 基因表达可逆转卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 细胞的耐药性, PTEN/Akt/NF-κB 可能是其中的关键信号通路。

关键词:LRP16; 卵巢癌; 耐药; SKOV3/DDP

中图分类号:R-33; R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)14-2606-05

Effects of Downregulation of LRP16 Gene Expression on the Drug Resistance of Ovarian Cancer SKOV3/DDP Cells and Its Possible Mechanisms*

YU Dan¹, WU Zhi-qiang², MEI Qian², HAN Wei-dong², DING Jia-jia¹, MENG Yuan-guang^{1Δ}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, PLA General Hospital, Beijing, 100853, China;

2 Molecular biology laboratory, PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of downregulation of LRP16 gene expression on the drug resistance of ovarian cancer SKOV3/DD cells, and explore the possible mechanisms. **Methods:** The expressions of LRP16 in the sensitive group (SKOV3), resistant group (SKOV3/DDP), LRP16 interference group (SKOV3/DDP-stably transfected with the LRP16 shRNA plasmid) and NC group (SKOV3/DDP-stably transfected with the negative-control plasmid) were detected by the real-time PCR and Western blotting (WB) assay. The influence of LRP16 expression on the drug-resistance of SKOV3/DDP was analyzed by the MTT assay. Moreover, Cisplatin (DDP)-induced DNA damage was determined by the Comet tail assay, flow cytometry (FCM) was applied to detect the cell apoptosis, and the protein levels of PTEN, p-Akt and NF-κB were detected by the WB assay. **Results:** The resistance index (RI) value of LRP16 interference group was (3.19 ± 0.21), which was much lower than (6.84 ± 0.37) of the resistant group ($P < 0.05$). At 24h post treatment of DDP ($25 \mu\text{mol/L}$), the percentage of DNA-damage cells and apoptotic rate of LRP16 interference group were significantly lower than those in the resistant group and the NC group ($P < 0.05$), but there was no differences between the resistant group and the NC group ($P > 0.05$). Meanwhile, the protein expression of PTEN in the LRP16 interference group was significantly lower than that in the resistant group and the NC group ($P < 0.05$), and the protein expressions of p-Akt and NF-κB in the LRP16 interference group were significantly higher than those in the resistant group and the NC group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Downregulation of LRP16 gene expression was able to reverse the drug-resistance of SKOV3/DDP, and the PTEN/Akt/NF-κB may be the key pathway involved.

Key words: LRP16; Ovarian cancer; Drug resistance; SKOV3/DDP

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)14-2606-05

前言

卵巢癌的发病率高,位居妇科恶性肿瘤的第二位^[1]。近年

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071617;81001184)

作者简介:于丹(1988-),女,硕士,医师,研究方向:妇科肿瘤, E-mail: sdjs1205@163.com, 电话: 010-938343, 18501055094

Δ 通讯作者:孟元光(1965-),男,博士,主任医师,研究方向:妇科肿瘤, E-mail: meng6512@vip.sina.com

(收稿日期:2017-10-30 接受日期:2017-11-24)

来,卵巢癌在诊断、手术治疗以及放化疗等方面均取得了巨大进展,以手术切除为基础并辅以放化疗的综合治疗方案是卵巢癌患者的最主要治疗方法。铂类抗肿瘤药是卵巢癌化疗的一线用药,然而化疗耐药、复发等仍然是导致卵巢癌患者不良预后的重要原因^[2]。卵巢患者的5年总生存率低于25%,如III期和IV期患者的5年总生存率分别为28%和16%,而I期患者的5年总生存率为80%^[3]。因此,寻找能够逆转化疗耐药、增强卵巢癌细胞对铂类抗肿瘤药的敏感性的新方案是临床上亟需解决的问题。

人白血病相关蛋白16(LRP16)基因是由Yu和Han等在健康成年人外周血的淋巴细胞中发现的一种白血病相关基因^[4],定位于染色体11q12.1,是macro domain家族成员之一。macro domain家族蛋白在DNA损伤修复、染色体重塑中发挥多种不同的生物功能^[5]。LRP16蛋白是雌激素受体 α (ER α)的共激活因子,参与ER α 信号转导通路^[6]。有研究显示LRP16能够促进激素依赖性的卵巢癌的发生和恶性进展^[7]。目前,关于LRP16在卵巢癌化疗耐药中的研究甚少。本研究采用RNA干扰技术下调人卵巢癌耐药SKOV3/DDP细胞中LRP16基因的表达,探讨了其对SKOV3/DDP细胞耐药性的影响,并对其内在机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM培养液和胎牛血清(FBS)均购自美国Gibco公司,青霉素、链霉素、LRP16 shRNA质粒、阴性对照质粒、real-time PCR引物序列和Annexin V-FITC/PI双染试剂盒均购自上海生工生物工程股份有限公司,Lipofectamine 3000、Trizol试剂、RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒均购自美国Invitrogen公司,RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL发光液、MTT溶液(5 mg/mL)和二甲基亚砜(DMSO)均购自上海碧云天生物技术有限公司,LRP16、PTEN、p-Akt、Akt、NF- κ B和GAPDH抗体均购自美国Abcam公司,HRP标记二抗均购自上海恒远生物科技有限公司,正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖、溴乙锭。

二氧化碳培养箱(美国Thermo公司),超微量核酸蛋白测定仪(美国Thermo公司),定量PCR扩增仪(美国ABI公司),水平电泳仪(美国Bio-Rad公司),凝胶成像仪(上海天能科技有限公司),酶标仪(美国Bio-Tek仪器有限公司),流式细胞仪(美国BD公司),荧光显微镜(上海蔡康光学仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 卵巢癌细胞株SKOV3,卵巢癌耐药细胞株SKOV3/DDP为本实验室常规培养,保种,SKOV3/DDP耐药细胞的耐药指数(resistance index, RI)为(6.84 $\pm$ 0.37)。SKOV3及SKOV3/DDP细胞均生长于DMEM培养基(含10% FBS, 10 $\times$ 10⁴ U/L青霉素, 100 mg/L链霉素)中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下中培养, 3-4 d传代一次,传代比例为1:3;取复苏后第4代-10代的细胞进行相关试验。

1.2.2 脂质体转染及稳转细胞的筛选 取4 $\times$ 10⁵个处于对数生长期的耐药SKOV3/DDP细胞接种于3.5 cm培养皿中, 24 h后采用脂质体Lipofectamine 3000将LRP16 shRNA质粒及阴性对照质粒(阴性对照组,即NC组)转染至SKOV3/DDP细胞

中,操作步骤参照试剂说明书,转染48 h后,采用遗传霉素(G418)进行筛选,得到稳转单克隆,即LRP16基因沉默的耐药SKOV3/DDP细胞株。试验分组:耐药组、LRP16干扰组和NC组。

1.2.3 荧光实时定量PCR (real-time PCR) Trizol试剂抽提细胞总RNA,参照RNA提取试剂盒的说明书操作。超微量核酸蛋白测定仪检测总RNA浓度及纯度(OD_{260/280}值),逆转录试剂盒进行逆转录,合成cDNA。Real-time PCR引物序列如下,LRP16:正向引物5'-CCGCAGCGACATCACCAAGC-3',反向引物5'-TCCGGCACTCGTCGGTAAGC-3'; β -actin:正向引物5'-AAAGACCTGTACGCCAACAC-3',反向引物5'-GTCAT-ACTCCTGCTTGCTGAT-3'。定量PCR扩增仪检测LRP16 mRNA表达水平。Real-time PCR扩增体系为10 μ L,反应条件:50 $^{\circ}$ C预热2 min, 95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 95 $^{\circ}$ C变性15s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸55s,进行35个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法表示LRP16 mRNA相对表达量。取3个不同批次的细胞进行重复试验后,进行统计分析。

1.2.4 蛋白免疫印迹试验(Western blotting, WB) 收集各组约1 $\times$ 10⁷个细胞,RIPA蛋白裂解液抽提细胞全蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。8% SDS-PAGE胶电泳分离蛋白后,湿转法将蛋白转到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温震荡封闭1 h, TBS-T洗膜,分别加入LRP16、PTEN、p-Akt、Akt、NF- κ B和GAPDH抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBS-T洗涤后,分别加入HRP标记二抗,室温孵育1 h,加ECL发光液进行化学发光显影,凝胶成像仪观察蛋白条带,对试验结果进行灰度分析(Image Lab软件),计算目的蛋白与内参蛋白的灰度比值。取3个不同批次的细胞进行重复试验后,进行统计分析。

1.2.5 MTT 试验 以0.8 $\times$ 10⁴/孔的密度将细胞接种于96孔板,共设置7组,每组设置6个复孔。细胞贴壁后换成无血清DMEM培养液,撤血清24 h,使细胞周期同步化,分别以含不同浓度的DDP(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ mol/L)完全培养液培养处理敏感组、耐药组、LRP16干扰组和NC组细胞,48 h后检测细胞增殖情况。具体方法为:每孔加10 μ L的MTT溶液,孵育4 h,弃掉上清,每孔加150 μ L的DMSO,振荡、溶解,于酶标仪上测量490 nm波长吸光度值(A值)。取每组6个复孔的A值的均数,计算各浓度组细胞的生存率,即细胞生存率(%)=(加药组A值/未加药组A值) $\times$ 100%。取3个不同批次的细胞进行重复试验后,进行统计分析。

1.2.6 单细胞电泳试验(彗星试验) 将100 μ L 0.75%的PBS溶解的正常熔点琼脂糖滴在磨砂载玻片上,盖上盖玻片,避免气泡,4 $^{\circ}$ C静置10 min,凝固后,小心除去盖玻片(即下层胶);25 μ mol/L DDP分别处理敏感组、耐药组、LRP16干扰组和NC组细胞,24 h后,收集各组细胞,并用PBS溶液制成细胞悬液;取10 μ L细胞悬液与90 μ L 0.75%低熔点琼脂糖(PBS溶解)混匀,滴加在下层胶上,盖上盖玻片,4 $^{\circ}$ C静置30 min,固化,小心除去盖玻片(即上层胶);将玻片置于新鲜配制好的预冷的细胞裂解液中,避光,4 $^{\circ}$ C裂过夜;将玻片置于水平电泳槽中,在预冷的碱性电泳缓冲液中静置20 min,使液面高于凝胶约2 mm,电压25 V,电流300 mA,电泳30 min;电泳结束后,用中和液Tris-HCl(0.4M, pH7.5)浸泡玻片,2 μ g/mL溴乙锭染色,置于湿盒内;荧光显微镜下观察,每组观察200个细胞,计算发生

DNA 损伤的细胞百分比。取 3 个不同批次的细胞进行重复试验后, 进行统计分析。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 25 $\mu\text{mol/L}$ DDP 分别处理敏感组、耐药组、LRP16 干扰组和 NC 组细胞, 24 h 后, 采用流式细胞术(Flow Cytometry, FCM), Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞凋亡百分比, 具体操作如下: 收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞, 随后加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL PI, 混匀, 室温避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡百分比。取 3 个不同批次的细胞进行重复试验后, 进行统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 进行统计学分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示, 多组独立样本的比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同卵巢癌细胞中 LRP16 的表达

Real-time PCR 试验结果显示: 与敏感组细胞相比, 耐药组细胞中 LRP16 mRNA 相对表达量显著增加($P < 0.05$); LRP16 干扰组细胞中 LRP16 mRNA 相对表达量显著低于耐药组和 NC 组(P 均 < 0.05), 耐药组和 NC 组之间无差异($P > 0.05$), 见表 1。WB 试验结果显示: 耐药组细胞中 LRP16 蛋白相对表达量显著增加($P < 0.05$); LRP16 干扰组细胞中 LRP16 蛋白相对表达量显著低于耐药组和 NC 组(P 均 < 0.05), 耐药组和 NC 组之间无差异($P > 0.05$), 见表 1、图 1。

表 1 各组细胞中 LRP16 mRNA 和蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The relative mRNA and protein expressions of LRP16 in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	LRP16 mRNA	LRP16 protein
Sensitive group	1.06 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.06
Resistant group	3.02 $\pm$ 0.27*	1.82 $\pm$ 0.19*
LRP16 interference group	1.46 $\pm$ 0.12 [#]	0.73 $\pm$ 0.11 [#]
NC group	2.93 $\pm$ 0.31	1.91 $\pm$ 0.23
P	0.000	0.000

Note: Compared with the sensitive group, * $P < 0.05$; compared with the resistant group and the NC group, [#] $P < 0.05$.

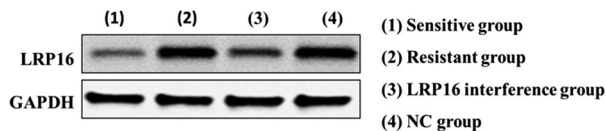


图 1 WB 试验检测各组细胞中 LRP16 的蛋白表达

Fig.1 The relative protein expression of LRP16 in each group was determined by the Western blotting assay

2.2 LRP16 表达下调对 SKOV3/DDP 细胞耐药性的影响

采用不同浓度 DDP(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理敏感组、耐药组、LRP16 干扰组和 NC 组细胞 48 h, 通过 MTT 试验检测各组细胞的生存率, 结果显示: 与敏感组细胞相比, 耐药组细胞的 RI 值为(6.84 $\pm$ 0.37), LRP16 干扰组细胞的

RI 值为(3.19 $\pm$ 0.21), 且 LRP16 干扰组细胞的 RI 值显著低于耐药组, 差异有统计学意义($P = 0.000$), 见表 2、图 2。

表 2 DDP 对各组细胞的 IC₅₀ 值($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The IC₅₀ values of DDP in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	IC ₅₀ value
Sensitive group	6.43 $\pm$ 1.25
Resistant group	46.21 $\pm$ 5.32*
LRP16 interference group	21.32 $\pm$ 3.26 [#]
NC group	45.82 $\pm$ 5.82
P	0.000

Note: Compared with the sensitive group, * $P < 0.05$; compared with the resistant group and the NC group, [#] $P < 0.05$.

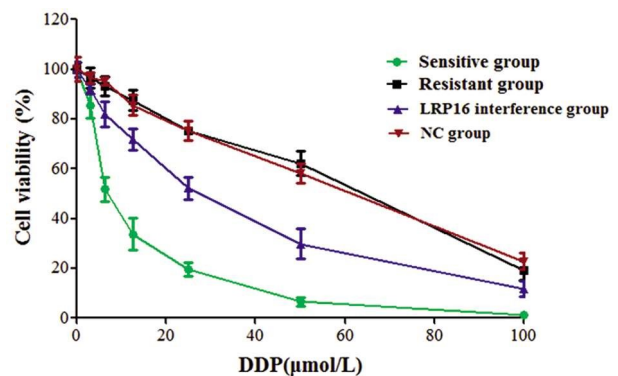


图 2 不同浓度 DDP 处理细胞 48 h 对各组细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of DDP on the cell viability of different groups at 48 h after the treatment

2.3 LRP16 表达下调对 DDP 诱导的各组细胞 DNA 损伤的影响

采用 25 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理敏感组、耐药组、LRP16 干扰组和 NC 组细胞 24 h, 通过彗星试验检测各组细胞的 DNA 损伤情况, 结果显示: 与敏感组相比, 耐药组中发生 DNA 损伤的细胞百分比显著下降($P < 0.05$); LRP16 干扰组中发生 DNA 损伤的细胞比例显著高于耐药组和 NC 组 (P 均 < 0.05), 而耐药组和 NC 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 3、图 3。

表 3 LRP16 表达下调对 DDP 诱导的各组细胞 DNA 损伤的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of downregulation of LRP16 gene expression on the percentage of DNA-damage cells treated by DDP between different groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	The rates of DNA-damage cells
Sensitive group	96.23 $\pm$ 4.25
Resistant group	16.21 $\pm$ 2.32*
LRP16 interference group	71.32 $\pm$ 3.61 [#]
NC group	17.21 $\pm$ 2.57
P	0.000

Note: Compared with the sensitive group, * $P < 0.05$; compared with the resistant group and the NC group, [#] $P < 0.05$.

2.4 LRP16 表达下调对 DDP 诱导各组细胞凋亡的影响

25 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理敏感组、耐药组、LRP16 干扰组和 NC 组细胞 24 h 后, 通过 FCM 试验检测各组细胞的凋亡情况, 结果显示: 与敏感组相比, 耐药组的细胞凋亡百分比显著降低

($P < 0.05$); LRP16 干扰组的细胞凋亡百分比显著高于耐药组和 NC 组 (P 均 < 0.05), 耐药组和 NC 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4、图 4。

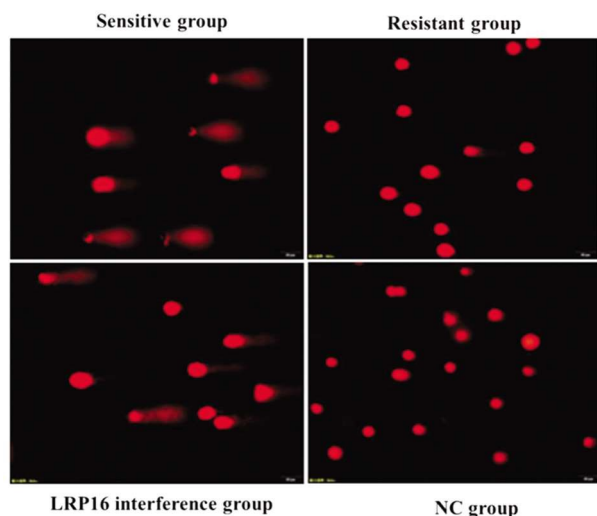


图 3 彗星试验检测各组细胞的 DNA 损伤情况

Fig.3 The DNA damage was detected by the Comet assay

表 4 LRP16 表达下调对 DDP 诱导各组细胞凋亡百分比的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of downregulation of LRP16 gene expression on the apoptotic rates of cells treated by DDP between different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	The rates of apoptotic cells
Sensitive group	64.21 $\pm$ 5.87
Resistant group	12.47 $\pm$ 3.28*
LRP16 interference group	40.32 $\pm$ 4.79 [#]
NC group	14.89 $\pm$ 4.72
P	0.000

Note: Compared with the sensitive group, * $P < 0.05$; compared with the resistant group and the NC group, [#] $P < 0.05$.

表 5 各组细胞中 PTEN、p-Akt 和 NF- κ B 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the protein expressions of PTEN, p-Akt and NF- κ B between different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	PTEN	p-Akt	NF- κ B
Sensitive group	0.61 $\pm$ 0.11	0.11 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.05
Resistant group	0.18 $\pm$ 0.04*	0.68 $\pm$ 0.09*	0.48 $\pm$ 0.09*
LRP16 interference group	0.43 $\pm$ 0.06 [#]	0.21 $\pm$ 0.07 [#]	0.14 $\pm$ 0.11 [#]
NC group	0.19 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.11	0.52 $\pm$ 0.12
P	0.000	0.000	0.001

Note: Compared with the sensitive group, * $P < 0.05$; compared with the resistant group and the NC group, [#] $P < 0.05$.

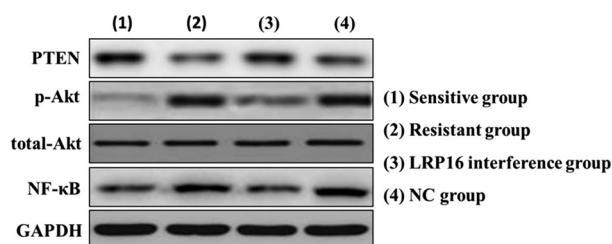


图 5 免疫印迹检测各组细胞中 PTEN、p-Akt 和 NF- κ B 蛋白表达

Fig.5 The protein expression of PTEN, p-Akt and NF- κ B were detected by western blotting

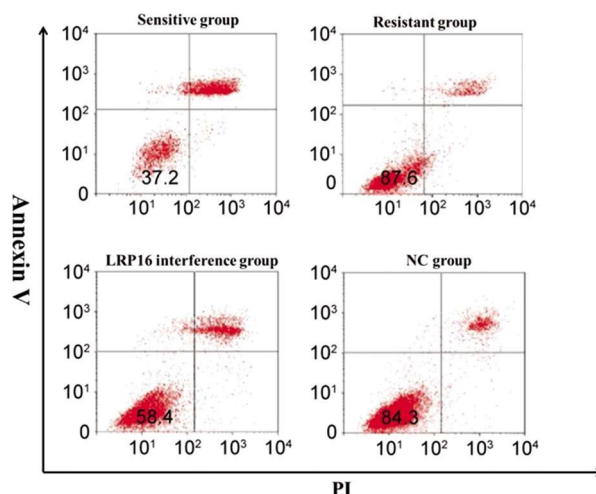


图 4 FCM 试验检测各组细胞凋亡百分比

Fig.4 The percentage of apoptotic cells was detected by FCM assay

2.5 LRP16 表达下调对各组细胞耐药相关信号通路的影响

25 μ mol/L DDP 处理敏感组、耐药组、LRP16 干扰组和 NC 组细胞 24 h 后,与敏感组相比,耐药组细胞中 PTEN 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$); LRP16 干扰组细胞中 PTEN 蛋白相对表达量显著高于耐药组和 NC 组 (P 均 < 0.05), 耐药组和 NC 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5, 图 5。与敏感组相比,耐药组细胞中 p-Akt、NF- κ B 蛋白相对表达量显著增加 ($P < 0.05$); LRP16 干扰组细胞中 p-Akt、NF- κ B 蛋白相对表达量显著低于耐药组和 NC 组 (P 均 < 0.05), 耐药组和 NC 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5、图 5。

3 讨论

LRP16 蛋白广泛存在于人体各组织器官中,在睾丸、卵巢、结肠粘膜组织中具有较高表达水平,在前列腺、小肠、胸腺组织中也表达,而在外周血白细胞中表达水平较低^[8]。LRP16 基因

启动子是典型的 II 型 RNA 聚合酶启动子,其启动子区含有多個甾体激素受体的结合位点,可能参与甾体激素介导的生理病理过程^[9]。如在乳腺癌组织中,LRP16 表达与患者肿瘤临床分期、组织学等级、肿瘤大小以及淋巴转移相关,具有作为乳腺癌诊断、治疗和预后判断靶分子的潜能^[10],且在乳腺癌细胞中,LRP16 能够促进细胞增殖、侵袭和迁移^[7],通过调节 cyclin E 和 cyclin D1 基因表达,参与细胞周期调控过程^[6]。而在卵巢癌 SKOV3 细胞中,雌激素受体 α (ER α)结合至 LRP16 基因启动区,促进 LRP16 基因转录翻译^[11]。LRP16 在其他肿瘤组织中也

存在异常表达。如在结肠癌组织中,LRP16 呈高表达状态,且其高表达与患者肿瘤分化程度、肿瘤大小、浸润深度以及远处转移相关^[12];LRP16 在神经内分泌肺癌中表达增加,且与患者临床分期和生存时间密切相关,LRP16 可以作为其预后预测的靶分子^[13]。以上研究结果均证实 LRP16 具有促癌基因的功能,促进恶性肿瘤的发生和进展,而关于 LRP16 在肿瘤化疗耐药中的作用,相关研究甚少。

本研究结果显示与对 DDP 化疗敏感的卵巢癌 SKOV3 细胞相比,LRP16 在对 DDP 耐药的 SKOV3/DDP 细胞中的表达水平显著升高,提示 LRP16 可能参与并促进了卵巢癌 SKOV3 细胞对 DDP 耐药性的产生。因此,本研究进一步探讨了 LRP16 在卵巢癌 SKOV3 细胞化疗耐药中的作用及其内在机制。采用 RNA 干扰、G418 筛选技术,以卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 细胞为本底细胞,成功构建稳定转染 LRP16 shRNA 质粒的细胞系(即 LRP16 干扰组),结果显示与耐药组细胞相比,LRP16 干扰组细胞中 LRP16 mRNA 和蛋白表达均被显著抑制,LRP16 干扰组细胞可用于后续试验研究。MTT 试验检测 LRP16 表达对 SKOV3/DDP 细胞耐药性的影响,结果显示,LRP16 干扰组细胞的 RI 值明显低于耐药组,提示干扰 LRP16 基因表达能够降低 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。铂类抗肿瘤药能与 DNA 结合,引起交叉联结,破坏 DNA 结构和功能,导致细胞凋亡,可采用彗星试验检测细胞 DNA 损伤情况^[14]。本研究中的彗星试验和 FCM 试验结果显示干扰 LRP16 基因表达后,SKOV3/DDP 细胞对 DDP 诱导的 DNA 损伤和细胞凋亡的敏感性显著增强。以上试验结果均证实干扰 LRP16 基因表达能够逆转 SKOV3/DDP 细胞的耐药性。

LRP16 是多种核受体的必要辅助因子^[5],有研究表明 LRP16 是 NF- κ B 转录因子的辅助激活因子,LRP16 能够与 NF- κ B 转录复合物相互作用,导致 NF- κ B 被激活而发挥功能。LRP16 高表达是导致 NF- κ B 在肿瘤中异常活化的原因之一^[16]。DNA 损伤应答机制复杂,主要包括 DNA 损伤修复和细胞凋亡两方面,NF- κ B 和 Akt 信号通路激活能够促进 DNA 损伤修复,对细胞存活发挥决定性的作用^[17]。有研究结果表明 LRP16 通过 DNA 损伤特异性的传感器 Ku70/Ku80,激活 NF- κ B 信号通路^[18]。在胰岛素瘤细胞 MIN6 中,增加 LRP16 表达后 ERK1/2 和 Akt 信号通路被激活,从而使 MIN6 细胞对脂肪酸介导的细胞凋亡产生耐受性^[19],而在 MIN6 细胞中降低 LRP16 表达后,细胞增殖被抑制,细胞凋亡增加,且细胞中 Akt 磷酸化水平降低^[20]。在脂肪 3T3-L1 细胞中,外源性增加 LRP16 表达后,细胞中的 PI3K/Akt 信号通路被激活,Akt 磷酸化水平增加^[21]。

本研究中,与敏感组细胞相比,耐药组细胞中 NF- κ B 和 p-Akt 蛋白相对表达量均显著增加,而 LRP16 干扰组细胞中的 NF- κ B 和 p-Akt 蛋白相对表达量均显著低于耐药组,以上结果表明,在 SKOV3/DDP 耐药细胞中,NF- κ B 和 Akt 信号通路活性增强,而干扰 LRP16 基因表达后,NF- κ B 和 Akt 信号通路活性被抑制,提示干扰 LRP16 基因表达,逆转 SKOV3/DDP 细胞耐药性,可能是通过抑制 NF- κ B 和 Akt 信号通路活性实现的。有研究显示抑制 PI3K/Akt 信号通路能够增强 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的敏感性^[22]。PTEN 能够抑制 Akt 磷酸化,阻断 Akt 信号通路活性,本研究结果显示 LRP16 干扰组细胞中的 PTEN 蛋

白相对表达量均显著高于耐药组,提示参与逆转耐药的 Akt 相关信号通路是 PTEN-PI3K/Akt 信号通路,而 Vichalkovski A 等研究结果表明 DNA 损伤导致 Akt 激活,不依赖于 PTEN-PI3K/Akt 信号通路,而是依赖于 Akt/PKB 信号通路^[23]。本研究将在后续研究中对 Akt/PKB 信号通路进行论证验证。

综上所述,本研究结果表明 LRP16 高表达促进了卵巢癌 SKOV3 细胞对 DDP 耐药性的产生,且干扰 LRP16 基因表达能够逆转 SKOV3/DDP 细胞的耐药性,PTEN/Akt/NF- κ B 可能是其中的关键信号通路。

参考文献(References)

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [2] Au KK, Josahkian JA, Francis JA, et al. Current state of biomarkers in ovarian cancer prognosis[J]. Future Oncol, 2015, 11(23): 3187-3195
- [3] Zhou J, Shan G, Chen Y. The effect of lymphadenectomy on survival and recurrence in patients with ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(8): 718-726
- [4] Han WD, Yu L, Lou FD, et al. The Application of RACE Technique to Clone the Full-Length cDNA of A Novel Leukemia Associated Gene LRP16[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2001, 9(1): 18-21
- [5] Posavec M, Timinszky G, Buschbeck M. Macro domains as metabolite sensors on chromatin[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(9): 1509-1524
- [6] Han WD, Mu YM, Lu XC, et al. Up-regulation of LRP16 mRNA by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor alpha (ERalpha), but not ERbeta, and promotion of human breast cancer MCF-7 cell proliferation: a preliminary report[J]. Endocr Relat Cancer, 2003, 10(2): 217-224
- [7] Han WD, Zhao YL, Meng YG, et al. Estrogenically regulated LRP16 interacts with estrogen receptor alpha and enhances the receptor's transcriptional activity[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(3): 741-753
- [8] 韩为东,于力,韩小平.LRP16 基因的 SAGE 谱及其在正常血细胞、白血病细胞中的表达状况 [J]. 军医进修学院学报, 2002, (03): 161-163
Han Wei-dong, Yu Li, Han Xia-ping, et al. SAGE pattern of LRP16 gene and its expression in normal blood and leukemic cells [J]. Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School, 2002, 23 (3): 161-163
- [9] Yang B, Lu XC, Chi XH, et al. LRP16 gene function based on bioinformatic analysis[J]. Ai Zheng, 2009, 28(12): 1283-1290
- [10] Yao DJ, Qiao S, Zhang Y, et al. Correlation between expression of LRP16, Ki67 and EGFR and breast cancer clinical pathologic factors and prognosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21 (3 Suppl): 47-51
- [11] Tian L, Wu Z, Zhao Y, et al. Differential induction of LRP16 by liganded and unliganded estrogen receptor alpha in SKOV3 ovarian carcinoma cells[J]. J Endocrinol, 2009, 202(1): 167-177
- [12] Xi HQ, Zhao P, Han WD. Clinicopathological significance and prognostic value of LRP16 expression in colorectal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(13): 1644-1648
- [13] Shao Y, Li X, Lu Y, et al. Aberrant LRP16 protein expression in primary neuroendocrine lung tumors [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (6): 6560-6565

Traditional Chinese Medicine, 2014

- [21] Koh K K, Han S H, Oh P C, et al. Combination therapy for treatment or prevention of atherosclerosis: focus on the lipid-RAAS interaction [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 209(2): 307
- [22] 车海蓝. 葡萄籽提取物原花青素对动脉粥样硬化大鼠 ABCA1、TNF- α 、MCP-1 表达的影响[D]. 新乡医学院, 2014
- Che Hai-lan. Effect of Grape Seed Extract Proanthocyanidins on the expression of ABCA1, TNF- α and MCP-1 in atherosclerotic rats[D]. Xinxiang Medical University, 2014
- [23] Lee J, Lee S, Zhang H, et al. Interaction of IL-6 and TNF- α contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts[J]. *Plos One*, 2017, 12(11): e0187189
- [24] 李辉, 张迪, 赵红霞, 等. 血清 IGF-1、TNF- α 与糖尿病患者动脉粥样硬化的相关性研究[J]. 辽宁医学院学报, 2017, 38(2): 22-24
- Li Hui, Zhang Di, Zhao Hong-xia, et al. Study on the correlation between serum IGF-1, TNF- α and atherosclerosis in diabetic patients[J]. *Journal of Liaoning Medical University*, 2017, 38(2): 22-24
- [25] Koulmanda M, Bhasin M, Awdeh Z, et al. The Role of TNF- α in Mice with Type 1- and 2- Diabetes[J]. *Plos One*, 2012, 7(5): e33254
- [26] 林杨. MCP-1 与 2 型糖尿病大血管病变关系的临床研究[D]. 安徽医科大学, 2008
- Lin Yang. The clinical study of the relationship between MCP-1 and type 2 diabetic macroangiopathy [D]. Medical University Of Anhui, 2008
- [27] Wu S Q, Otero M, Unger F M, et al. Anti-inflammatory activity of an ethanolic *Caesalpinia sappan* extract in human chondrocytes and macrophages[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138(2): 364
- [28] Uddin G M, Kim C Y, Chung D, et al. One-step isolation of sappanol and brazillin from *Caesalpinia sappan* and their effects on oxidative stress-induced retinal death[J]. *BMB Rep*, 2015, 48(5): 289-294
- [29] 张红, 章卓, 黄小波, 等. 苏木水煎液对糖尿病肾病大鼠血糖、肾功能和肾脏病理影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1255-1256
- Zhang Hong, Zhang Zhuo, Huang Xiao-bo, et al. Effect of *Caesalpinia Sappan* decoction on blood sugar, renal function and kidney pathology of diabetic nephropathy rats[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2011, 22(5): 1255-1256
- [30] 李红微. 苏木防治早期糖尿病肾病的实验研究[D]. 哈尔滨医科大学, 2010
- Li Hong-wei. Experimental study on the prevention and treatment of early diabetic nephropathy by *Caesalpinia Sappan* [D]. Harbin Medical Sciences University, 2010
- [31] 刘婷, 佟晓哲. 巴西苏木素调控自噬对高糖诱导血管内皮细胞损伤的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(4): 343-346
- Liu Ting, Tong Xiao-zhe. Effects of Brazilian hematoxylin regulated autophagy on vascular endothelial cell injury induced by high glucose [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2017, 25(4): 343-346

(上接第 2610 页)

- [14] He H, Huang H, Yu T. Detection of DNA damage in sonochemotherapy against cisplatin-resistant human ovarian cancer cells using the modified comet assay[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(10): 897-902
- [15] Yang J, Zhao YL, Wu ZQ, et al. The single-macro domain protein LRP16 is an essential cofactor of androgen receptor [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2009, 16(1): 139-153
- [16] Wu Z, Li Y, Li X, et al. LRP16 integrates into NF- κ B transcriptional complex and is required for its functional activation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18157
- [17] Ochodnicka-Mackovicova K, Bahjat M, Bloedjes TA, et al. NF- κ B and AKT signaling prevent DNA damage in transformed pre-B cells by suppressing RAG1/2 expression and activity [J]. *Blood*, 2015, 126(11): 1324-1335
- [18] Wu Z, Wang C, Bai M, et al. An LRP16-containing preassembly complex contributes to NF- κ B activation induced by DNA double-strand breaks[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(6): 3167-3179
- [19] Li XJ, Guo QH, Wang X, et al. LRP16 gene protects mouse insulinoma MIN6 cells against fatty acid-induced apoptosis through Akt/Fox-O1 signaling[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(10): 1695-1702
- [20] Li X, Xue B, Wang X, et al. Reduced expression of the LRP16 gene in mouse insulinoma (MIN6) cells exerts multiple effects on insulin content, proliferation and apoptosis [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2012, 32(2): 190-198
- [21] Zang L, Xue B, Lu Z, et al. Identification of LRP16 as a negative regulator of insulin action and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Horm Metab Res*, 2013, 45(5): 349-358
- [22] Cai Y, Tan X, Liu J, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway enhances the sensitivity of the SKOV3/DDP ovarian cancer cell line to cisplatin in vitro [J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(5): 564-572
- [23] Vichalkovski A, Gresko E, Hess D, et al. PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage[J]. *Oncogene*, 2010, 29(24): 3554-3565