MiR-122 上调野生 p53 蛋白增强 BEL-7402/5-FU 细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性

殷 杰,杨晓燕,虞 佳,向 琼,朱炳阳,雷小勇
(南华大学 药物药理研究所,湖南 衡阳 412001)

摘 要: **目的** 探讨 MiRNA-122 对肝癌耐药细胞株 BEL-7402/5-FU 的 5-氟尿嘧啶敏感性的影响以及作用机制。 **方法** 构建 miR-122 及其阴性对照空载体稳定转染至 BEL-7402/5-FU 细胞中,Western blot 检测未转染组,阴性载体转染组和 miR-122 转染组中与耐药相关的 p53 蛋白表达水平。用 MTT 法和流式细胞术检测三组细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性。 **结果** MiR-122 转染组与未转染组,阴性载体转染组比较,野生型 p53 蛋白表达水平升高。流式细胞术检测,miR-122 转染组的细胞凋亡率较未转染组和阴性载体转染组高。 **结论** miR-122 能上调野生型 p53 蛋白表达,增加 BEL-7402/5-FU 细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性,从而成为治疗肝癌耐药治疗的一个方法。

关键词: 微小 RNA; 野生型 p53; BEL-7402/5-FU 细胞; 凋亡; 5-氟尿嘧啶
中图分类号: R979.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-1116(2011)06-0640-03

MiR-122 Increases Sensitivity of BEL-7402/5-FU Cells to 5-fluorouracil via Up-regulation of Wild-type p53 Protein

YIN Jie, YANG Xiao-yan, YU Jia, et al
(*Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: **Objective** To investigate the influence and mechanism of miR-122 confer 5-FU sensitivity in BEL-7402/5-FU cells. **Methods** MiR-122 and negative miRNA expression vectors were constructed and stably transfected into BEL-7402/5-FU cells. Western Blotting was used to detect Wild-type p53 (wt-p53) protein expression. Drug sensitivity of the cells to 5-fluorouracil (5-FU) were analyzed with MTT and flow cytometry. **Results** Compared with negative miRNA transfectants or untreated cells, protein expression level of wt-p53 in stable miR-122 transfectants were decreased. Flow cytometry results demonstrated that apoptosis rate increased in miR-122 transfected cells, compared with negative miRNA or untreated cells. **Conclution** MiR-122 can specifically up-regulate the expression of wt-p53 in BEL-7402/5-FU cells, which increased cells spontaneous apoptosis and sensitize cells to 5-FU. Therefore, miR-122 may be used as a potential therapy agent against human hepatoblastoma.

Key words: miRNA; wt-p53; BEL-7402/5-FU cells; apoptosis; 5-FU

原发性肝癌肝癌(HCC)是全世界发病率较高的肿瘤之一[1]。早期患者治疗以手术切除和肝脏移植辅以化学治疗为主,手术后复发也是肝癌治疗中普遍存在的问题[2],化学治疗已成为治疗肝癌病人的一种主要手段。目前临床上治疗原发性肝癌的药物有 5-氟尿嘧啶(5-FU)等药物。5-FU 为嘧啶类的氟化物,属于抗代谢肿瘤药,它通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,抑制 DNA 的生物合成而杀死肿瘤细胞[3]。随着对肿瘤治疗研究的不断深入,人们逐渐认识到,抗凋亡作用是肿瘤细胞对化疗药物耐药的重要原因之一。氟尿嘧啶类抗癌药耐药性问题是肝癌化疗中的关键障碍,其耐药机制包括增加了胸腺

收稿日期: 2011-06-08
通讯作者: 雷小勇,电话:0734-8282753,E-mail:lei_xiaoyong@yahoo.com.cn.

嘧啶核苷酸合成酶和多药耐药相关蛋白的表达等[4],因此基因治疗与化学药物相结合将为原发性肝癌的治疗开辟新的前景。近些年来,人们发现抑癌因子 p53 与肝癌耐药机制有密切的关联。p53 基因是与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,也是化疗敏感性最高的基因之一。MiRNA 是一类长为 20 ~ 25nt 左右的小分子非编码 RNA (ncRNA)。MicroRNA122(miR-122)是肝脏特异高表达的微小 RNA,是一个调节肝脏发育的"肝特异性微小 RNA"。有研究表明,miR-122 表达下调是在肝癌发生过程中伴随发生的事件,它也可能是肝癌的一个潜在的生物标志[5]。但是,miR-122 是在肝癌发生过程中具有直接的作用还是只是在肝癌中受到了异常的调节,还有待深入的研究。本研究利用 miR-122 质粒表达载体转染至肝癌耐药细胞株 BEL-7402/5-FU 细胞中,研究其对耐药细胞株药物敏感性的影响,为逆转肝癌耐药提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌耐药细胞株 BEL-7402/5-FU 细胞购自南京麦莎细胞中心,小牛血清为杭州四季青生物公司,质粒提取试剂盒为日本 TAKARA 公司产品,RNA 提取试剂盒为美国 GIBCO 公司,RT-PCR 试剂盒为 Promega 公司产品,PCR 扩增体系购于上海生物工程公司。鼠抗人 p53 一抗、鼠抗人 β-actin 一抗、二抗均购于 Santa Cruz 公司,脂质体 Lipofectamin 2000 为美国 Invitrogen 公司产品,G418 为 Invitrogen 公司产品,5-氟尿嘧啶为天津金耀氨基酸有限公司,显影发光剂为 Santa Cruz 公司,其他试剂为进口分装及国产分析纯。

1.2 细胞培养

BEL-7402/5-FU 细胞培养于 10% 新生牛血清的 RPMI1640 溶液中,置于 37℃,5 % 二氧化碳培养箱,在培养液中加入 20 μg/mL 5-FU 维持耐药性培养。细胞经传代和收集,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 质粒提取与细胞转染

构建 miR-122 质粒表达载体和阴性对照表达载体,载体上含氨苄青霉素耐药基因。质粒提取试剂盒提取质粒,-20℃保存备用。细胞转染按脂质体 2000 说明书进行,取对数生长期细胞接种于 24 孔板,每孔 1.0×10^5 个细胞,细胞生长至占培养孔 90% ~95%时进行转染。每孔取质粒 0.8 μg,转染 48 h 后,按 1∶24 比例稀释细胞传代培养,加 G418 (800 μg/mL)筛选阳性克隆,筛选期间每 2 ~3 天更换一次培养基,15 天后加 G418(400 μg/mL)维持阳性克隆,收集细胞分析。

1.4 流式细胞术

以上各组细胞分别用 5-FU(IC_{50})20 μg/mL 处理 24 h,将各组所有细胞收集于 1.5 mL 离心管中,PBS 缓冲液洗涤细胞,加 70% 乙醇 1 mL 在 4℃固定过夜。离心去上层液,PBS 缓冲液洗一遍,加 200 μL RNA 酶消化细胞,37℃孵育 30 min。加 PI 800 μL印迹细胞,室温孵育 30 min,流式细胞仪检测。

1.5 Western-Blot 检测细胞蛋白的水平

细胞裂解提取总蛋白,紫外风光光度计法进行蛋白定量,50 μg 蛋白进行 10 % SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至 PVDF 膜 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,1 % 脱脂牛奶稀释孵育一抗 4℃过夜(1∶500),稀释孵育二抗 37℃1h(1∶1 000),暗室显影。

1.6 统计学处理

使用 SPSS11.0 软件。所有实验数据均用均数 ±标准差表示,单因素方差分析,并经 LSD 检验,$P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 miR-122 联合 5-FU 促进细胞凋亡

分别用不加药和 IC_{50}(21.5 μmol/mL)5-FU 处理未转染组、阴性转染组和 miR-122 转染组细胞 24 h,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果显示:未加药处理组中 miR-122 转染组与未转染组和阴性转染组比较,细胞凋亡率增加:5.6% ±0.35%、1.0% ±0.52%、2.2% ±0.48%;用 IC_{50}(21.5 μmol/mL) 5-FU 处理后 miR-122 转染组与未转染组和阴性转染组比较,细胞凋亡率明显增加:25% ±1.22%、7.6% ±0.86%、9.2% ±0.78%(图 1)。并且其差异性比不加药组更加显著,说明 miR-122 能够联合 5-FU 促进肝癌 BEL-7402/5-FU 细胞凋亡。

2.2 miR-122 对 BEL-7402/5-FU 细胞 wt-p53 的影响

Western Blot 检测与耐药相关 wt-p53 表达情况,结果显示 miR-122 转染组与未转染组和阴性转染组比较,wt-p53 表达升高(图 2)。说明 miR-122 通过上调 wt-p53 表达,增加 BEL-7402/5-FU 细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性,促进 BEL-7402/5-FU 细胞凋亡。

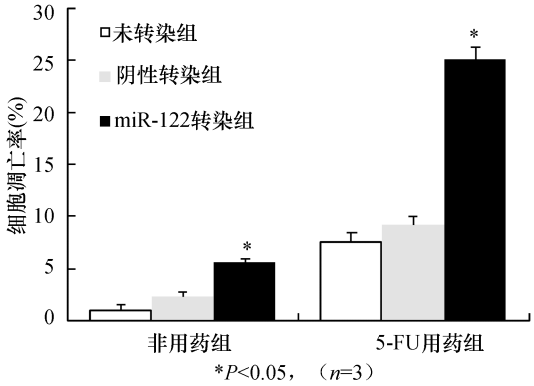

图 1　miR-122 联合 5-FU 对 BEL-7402/5-FU 细胞凋亡的影响

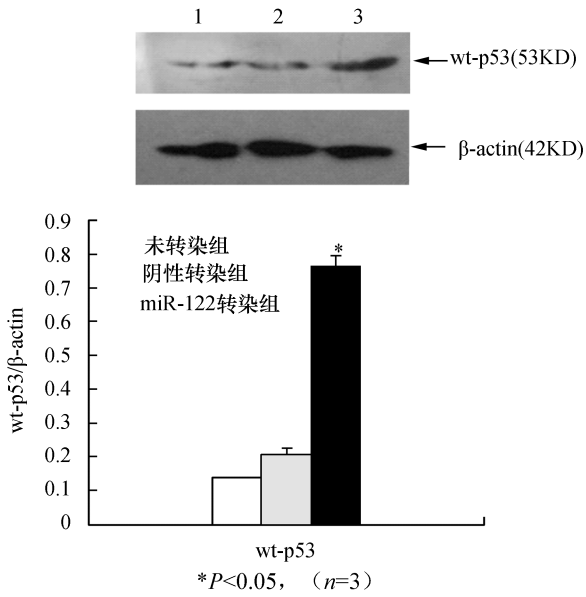

图 2　Western Blot 检测 miR-122 对 BEL-7402/5-FU 细胞 wt-p53 表达的影响

1:未转染组;2:阴性转染组;3:miR-122 转染组

3　讨　　论

p53 基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最为密切的基因,它在调节基因的转录、诱导细胞凋亡、控制 DNA 的复制以及维持基因组的稳定性等方面具有关键性的作用。近年研究显示 p53 基因的改变可能参加肿瘤耐药性的形成[6]。

野生型 p53 基因,又称基因卫士,是调节正常细胞周期循环所必不可少的重要调控因子,可分别与 DNA、RNA 聚合酶结合,作为核转录因子调节基因的表达,可抑制 DNA 的合成,参与 DNA 的修复,诱导细胞周期生长停止于 G1 期,在 DNA 损伤后诱导 Fas 介导的细胞程序性死亡,维持细胞的正常生长,抑制恶性繁殖。化疗药物治疗肿瘤的机理之一就是通过 p53 依赖途径而诱导细胞凋亡实现的。若 p53 基因失活或缺失,则其诱导的凋亡途径不能进行,化疗药物依赖 p53 诱导的细胞凋亡也不能进行,肿瘤细胞则会对化疗药物不再敏感[7]。

5-氟尿嘧啶(5-FU)是肝癌及其他肿瘤化疗中使用最为广泛的药物,然而,由于肿瘤细胞原发或继发的耐药性,化疗的效果差强人意。其耐药性涉及细胞的多种生化改变,包括 Bcl-2 和 Bcl-XL 表达升高、药物的蓄积降低、谷光甘肽(GSH)或与其代谢有关酶活性增高、细胞内金属硫蛋白水平升高以及 DNA 修复能力增强等。

本文以 BEL-7402/5-FU 为研究对象,Western-blot 结果显示,BEL-7402/5-FU 细胞中 wt-p53 基因表达较 BEL-7402 细胞明显降低,说明 wt-p53 基因与肝癌多药耐药密切相关,作为转录因子,p53 的表达下降,影响了一些促凋亡因子的转录活化、与线粒体的相互作用以及间接激活胱门蛋白酶的作用下降[8]。

本文构建的 miR-122 真核表达载体,在蛋白水平明显降低了靶向目的基因表达,而不影响内参基因表达,且阴性对照表达载体对基因表达无影响,说明这一载体作用明显且具有特异性。这一载体为本文研究小组成功构建,结果表明经转染后均能增加化疗药物的敏感性。本文作者推测 miR-122 通过上调 wt-p53 蛋白表达诱导 BEL-7402/5-FU 凋亡增加其对 5-FU 敏感性。这一研究为 wt-p53 基因作为靶基因的 RNAi 提供了实验依据,可望有效逆转肝癌癌化疗耐药,为肝癌的基因沉默治疗提供了新的思路;本研究将 miR-122 真核表达载体用于肝癌耐药细胞株 BEL-7402/5-FU,发现其对 5-氟尿嘧啶敏感性增加,但还需验证其对其它多种化疗药敏感性的影响,而且需要进行进一步体内荷瘤实验,为 miR-NA 用于临床打下实验基础。

参考文献:

[1]　Levin B, Amos C. Therapy of unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 1995, 332: 1294-1296.

[2]　Lou WY. Primary liver tumors[J]. Semin Surg Oncol, 2000, 19: 135-144.

[3]　Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M, et al. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(1): 140-151.

[4]　Jin J, Huan M, Liu GT. Studies on the resistance mechanism of a 5-fluorouracil resistant human hepatocellular carcinoma cell line Bel/5-FU[M]. The Chinese Young

（下转第 658 页）

(上接第 642 页)

Pharmacologists Symposium,2002. 83-84.

[5] Kutay H,Bai S,Datta J,et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas[J]. J Cell Biochem,2006,99(3):671-678.

[6] Chang WT,Kang JJ,Lee KY,et al. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis[J]. J Bio Chem,2001,276(3):2221-2227.

[7] I Sturm,AG Bosanquet,S Hermann,et al. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occur as a consequence of prior DNA - damaging chemotherapy [J]. Cell Death and Differentiation,2003,10:477-484.

[8] 李玉秀,林志彬,谭焕然. 人肝癌 Bel7402/52FU 耐药株多药耐药与凋亡关系的研究[J]. 中国药理学通报,2003,19(5):512-517.

(此文编辑　蒋湘莲)