

# MT1X siRNA 对肺癌 A549/DDP 细胞顺铂敏感性的影响

彭 波,董 琳,肖国华,张志伟,贺修胜

(南华大学医学院肿瘤研究所,湖南 衡阳 421001)

**摘 要:** **目的** 探讨金属硫蛋白 1X(MT1X)在肺癌耐药细胞株(A549/DDP)顺铂耐药中的作用。 **方法** 通过化学合成针对 MT1X 的 siRNA 段抑制其在 A549/DDP 中的表达,实时定量聚合酶链反应(PCR)及 WB 检测干扰效果,MTT 及平板克隆形成实验检测干扰前后细胞对顺铂的药物敏感性变化;流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况。 **结果** 针对 MT1X 的 siRNA 片段能在 RNA 及蛋白水平有效抑制其在 A549/DDP 中的表达;与对照组相比,MT1X 表达被抑制后,肿瘤细胞对顺铂的敏感性明显升高;增殖被抑制,平板克隆形成率明显降低( $P < 0.05$ ),细胞凋亡率显著增高( $P < 0.05$ )。 **结论** 针对 MT1X 的 siRNA 片段可部分逆转肺癌细胞(A549/DDP)对顺铂的耐受,为提高肺癌的化疗效率提供了一种新方法。

**关键词:** 多药耐药; 金属硫蛋白; 顺铂; siRNA

中图分类号:R734.2 文献标识码:A

## The Effect of MT1X siRNA on Cisplatin Sensitivity in Human Lung Cancer A549/DDP Cells

PENG Bo, DONG Lin, XIAO Guohua, et al

(Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of metallothionein 1X (MT1X) in cisplatin-resistant lung cancer cell lines (A549/DDP). **Methods** The specific MT1X small interfering RNA was synthesized in vitro and transfected into A549/DDP cells. Then, the expression of MT1X was detected by real-time PCR and Western blot, the cisplatin drug sensitivity and cell proliferation ability were investigated by MTT and colony formation assay and the cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** The results indicated that our MT1X-interfering RNA successfully diminished MT1X expression at both mRNA and protein level. Suppressing MT1X expression could significantly increase the sensitivity of tumor cells to cisplatin, decrease colony formation and increase the apoptosis of A549/DDP cells to cisplatin ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that MT1X siRNA can reverse the cisplatin resistance of human lung cancer cell line, and this finding may provide a new method to improve the efficiency of lung cancer chemotherapy.

**Key words:** MDR; metallothionein; cisplatin; siRNA

顺铂是目前化疗最常用的药物之一,其对肺癌、乳腺癌、头颈部癌、卵巢癌等多种肿瘤均有很好的疗效。遗憾的是临床应用中发现长时间使用顺铂会使患者对其产生抗性,从而导致肿瘤患者对化疗出现

耐受<sup>[1]</sup>。近年来,许多与耐药相关的基因先后被发现,包括人们所熟知的 MDR、BCRP 等经典的膜转运蛋白,也包括一些非膜蛋白如 P53、MT 等<sup>[2]</sup>。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类富含半胱氨酸并普遍存在的金属结合蛋白,其对维持一些体内必需金属的代谢平衡及抵抗有毒金属毒性、清除自由基等均具有重要的意义。人类 MT 基因包括 10 个功能性基因: MT1A、MT1B、MT1E、MT1F、MT1G、MT1H、MT1X、MT2A、MT3 和 MT4<sup>[3]</sup>。尽管近年来研究表明部分 MT 家族蛋白可参与肿瘤细胞

收稿日期:2013-03-29

基金项目:国家自然科学基金(81172575),湖南省科技厅基金(2012SK3157)和湖南省科技厅基金(2011SK3089)。

作者简介:彭波,博士,实验师,研究方向:肿瘤耐药机制, E-mail: pengbopb@aliyun.com. 通讯作者贺修胜,博士,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤, E-mail: hexiusheng@hotmail.com.

的增殖、分化、凋亡以及化疗耐药,影响治疗和预后,但是各个异构体的功能尚不明确。目前,对于 MT1X 的研究比较少,而其在肺癌耐药中的研究则未见报道。因此,本研究拟采用 RNA 干扰技术,通过抑制 A549/DDP 细胞中 MT1X 的表达,对其在肺癌细胞顺铂耐受中的作用及其机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

细胞培养用小牛血清、RPMI-1640 培养基及 RNA 抽提用 TRIzol 购自 GibcoBRL 公司;RevertAid 逆转录试剂盒购自 Promega 公司;Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;二甲基亚砷(DMSO)为 Amresco 公司产品,MTT 购自 Sigma 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂、ECL 发光试剂购自 Pierce 公司;羊抗人 MT1X 单克隆抗体(sc-12807),鼠抗人  $\beta$ -actin、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗均购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 细胞与细胞培养

人肺腺癌细胞株(A549)及其耐顺铂细胞株(A549/DDP)购自中国典型培养物保藏中心,用含 10% 小牛血清(FCS)的 RPMI-1640 培养基培养,并于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中常规培养,取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3 MT1X-siRNA 靶序列及实时定量 PCR 引物设计

根据 GenBank 公布的 hMT1X mRNA (NM\_005952)全长序列,遵循 siRNA 的设计原则,利用 Thermo Scientific 提供的在线 RNA 干扰设计程序,设计 3 条针对 MT1X 基因的瞬时干扰片段,序列如下: MT1X ASO1# 5'-TGT GCC GGC TCC TGC AAA T-3', MT1X ASO2# 5'-TGC AAA GGG ACG TCA GAC A-3', MT1X ASO3# 5'-GCA AAG GGA CGT CAG ACA A-3'。阴性对照片段:Scrambled ASO 5'-TGC AGT TCC CGT AGC ATG C-3'。实时定量 PCR 引物为:上游引物 5'-AAC TCC TGC TTC TCC TTG CC-3',下游引物 5'-GCT CTA TTT ACA TCT GAG AGC ACA A-3'。

### 1.4 实时定量 PCR 检测 MT1X mRNA 表达

转染前 1 天取对数生长期细胞进行传代,待细胞融合达 80% 时参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书所述方法进行转染,siRNA 终浓度为 100 nmol/L。实验分为阴性对照组(Untreated)、阴

性 siRNA 对照组(Scrambled ASO)、MT1X ASO1# 组、MT1X ASO2# 组和 MT1X ASO3# 组,转染 8 h 后换成完全培养基。转染细胞培养 48 h 后,提取总 RNA,经 MMLV 逆转录酶合成 cDNA 后,以  $\beta$ -actin 为内参,实时定量 PCR 检测干扰效率。 $\beta$ -actin 和 MT1X 的循环条件:95 °C 5 min,95 °C 10 s,61 °C 15 s,85 °C 收集荧光 5 s,共 30 个循环。将样品 MT1X 基因值除以其  $\beta$ -actin 基因值计算表达量。

### 1.5 Western Blot 检测 MT1X 蛋白表达

细胞经不同处理后,PBS 洗 3 次,用细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L Tris-Cl (pH7.6),0.001 mol/L EDTA (pH8.0),1  $\mu$ g/mL Aprotinin,100  $\mu$ g/mL PMSF)进行裂解,4 °C,13 000  $\times$  g 离心 10 min,取上清用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。取提取的蛋白样品(25  $\mu$ g/泳道)加入适量上样缓冲液,100 °C 煮沸 5 min,12% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶的 TBST 室温下封闭 2 h,1:1 000 加入 MT1X 或  $\beta$ -actin 抗体于 37 °C 孵育 2 h 或 4 °C 过夜;TBST 洗涤 30 min,每 10 min 换液 1 次,加入相应的二抗室温孵育 1 h 后,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。加入发光试剂于暗室中进行压片、显影、定影。

### 1.6 MTT 检测 MT1X-siRNA 对细胞增殖影响

取 A549/DDP 细胞悬液,以  $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,待细胞贴壁后加入 20  $\mu$ L 不同浓度 DDP,使其终浓度分别为 30  $\mu$ mol/L,每组设 6 个复孔,分别处理 24 或 48 h。在培养结束前 4 h 每孔加入 5 g/L MTT 20  $\mu$ L,继续培养 4 h 后吸去培养基每孔加入 DMSO 100  $\mu$ L,震荡 10 min 使沉淀充分溶解后用酶标仪(EX-800 型)在 570 nm 波长测吸光值(A 值)。按公式  $IR(\%) = (1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ ,计算相对抑制率(IR),以上实验重复 3 次。

### 1.7 流式细胞仪分析

收集经不同处理的 A549/DDP 细胞,离心,冰冷 PBS 洗 2 遍,4 °C 的 70% 乙醇固定 24 h 后,经碘化丙啶(PI)染色,用流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡情况。

### 1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS 12.0 统计分析软件,以 One-way ANOVA 及 Student *t* test 方法进行检验,所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 MT1X 在 A549 和 A549/DDP 中的表达

与 A549 亲本细胞株相比,肺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 中 MT1X 蛋白的表达水平约提高 3.7 倍,提示 MT1X 可能在肺癌细胞耐顺铂中发挥了作用(图 1)。

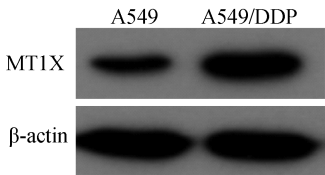


图 1 Western blot 检测 MT1X 在 A549 和 A549/DDP 中的表达

### 2.2 siRNA 干扰对 MT1X 表达的影响

实时定量 PCR 结果显示,3 种 MT1X 的 siRNA 片段均能导致 A549/DDP 细胞中 MT1X mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。其中 MT1X ASO3#的干扰效果最强,与阴性对照比较抑制率达到 80% 左右(图 2A),对蛋白表达水平检测也得到类似结果(图 2B),这表明以上 siRNA 能从转录和表达水平抑制 MT1X 的表达。

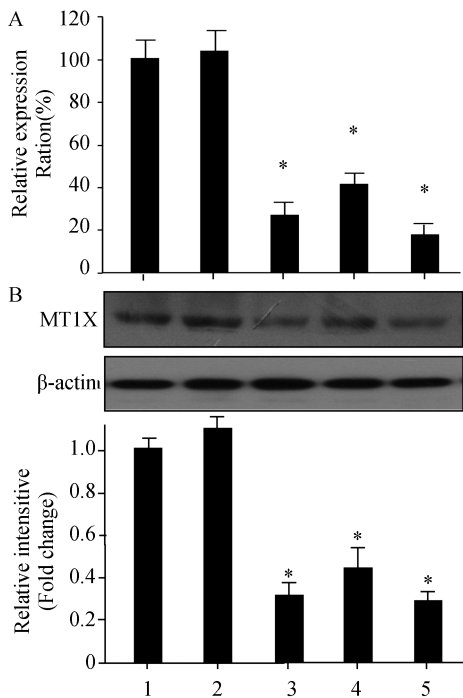


图 2 siRNA 干扰对 A549/DDP 细胞中 MT1X 表达水平的影响 A:实时定量 PCR 检测 MT1X 基因表达水平;B:Western blot 检测 MT1X 蛋白的表达情况。 1:阴性对照组;2:阴性 siRNA 对照组;3:MT1XASO1#组;4:MT1XASO1#组;5:MT1XASO3#组。 与对照组比较, \* : $P < 0.05$

### 2.3 siRNA 增加 A549/DDP 肺癌细胞对顺铂的敏感性

如图 3A 所示,与对照组比较,ASO3 #抑制 MT1X 基因表达后 A549/DDP 细胞的存活率明显降低。同时,MT1X-ASO3#干扰组其所形成的克隆数明显少于 2 个对照组细胞(图 3B)。30  $\mu\text{mol/L}$ 顺铂克隆形成率分别为 73.6% 和 18.5%。上述研究结果表明,MT1X 能够介导肺癌细胞对顺铂的耐药,抑制 MT1X 的表达可部分逆转肺癌细胞对顺铂的耐药。

### 2.4 MT1X-siRNA 对 A549/DDP 肺癌细胞凋亡的影响

如表 1 示,与空白对照组相比较,伴随着 MT1X 被抑制后肿瘤细胞凋亡率显著升高,30  $\mu\text{mol/L}$  顺铂处理后由空白对照组的 12.4% 上升到 37.2% ( $P < 0.05$ ),而对对照 ASO 片段处理组的凋亡则无明显影响。这些结果提示 MT1X 具有抑制顺铂诱导细胞凋亡的作用。

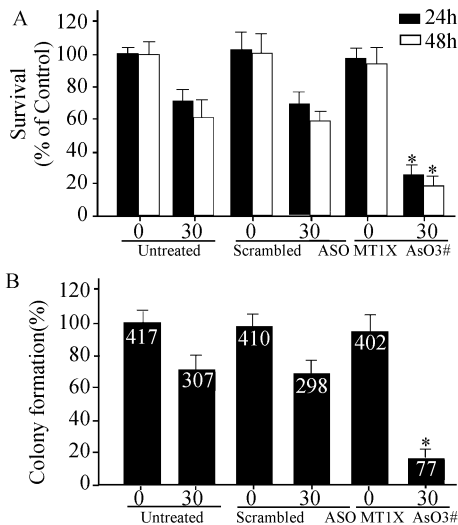


图 3 siRNA 干扰 MT1X 表达对 A549/DDP 细胞增殖的影响 A:MTT 法检测顺铂处理 24 或 48 h 后细胞增殖;B:平板克隆实验检测顺铂处理后细胞克隆形成,黑色条柱上的数值为形成的克隆个数。 \* :与对照组比较, $P < 0.05$

表 1 MT1X siRNA 干扰片段对 A549/DDP 细胞凋亡的影响

| 分组            | 顺铂( $\mu\text{mol/L}$ ) | 凋亡率( % )                    |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|
| Untreated     | 0                       | 4.1 $\pm$ 0.2               |
|               | 30                      | 12.4 $\pm$ 1.3              |
| Scrambled ASO | 0                       | 5.3 $\pm$ 0.6               |
|               | 30                      | 14.2 $\pm$ 1.1              |
| MT1X ASO3#    | 0                       | 5.6 $\pm$ 0.7               |
|               | 30                      | 37.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup> |

与对照组比较,a: $P < 0.05$

### 3 讨 论

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是肿瘤细胞免受化疗药物攻击的重要的防御机制,也是导致化疗失败的主要原因之一。多药耐药的逆转一直是临床研究中非常关注的内容,其中基因治疗是近年来出现的一种逆转多药耐药的新方法,其主要策略为使用 siRNA 干扰技术抑制肿瘤细胞中耐药基因的表达。与传统技术相比,RNAi 技术具有以下几个方面的优势:(1)与反义寡核苷酸相比 RNAi 具有高效性和特异性;(2) siRNA 介导的基因沉默更有效,更长久;(3)在转录后水平发挥阻断作用;(4)一点注入的 siRNA 干扰片段可作用于全身等<sup>[4-5]</sup>。

本研究通过采用 RNA 干扰片段沉默肺癌细胞中的 MT1X 基因的表达,发现干扰 MT1X 基因表达后 DDP 对 A549/DDP 细胞增殖抑制作用增强;干扰 MT1X 基因表达还能有效的减少 A549/DDP 平板克隆形成率;沉默 MT1X 的表达后 Tca/PYM 细胞的凋亡率显著提高。以上结果表明,MT1X 可能是抗凋亡基因,应用 RNA 干扰片段特异性抑制 MT1X 表达能成功逆转肺癌耐药细胞株(A549/DDP)对顺铂的耐药。

大量研究表明诱导细胞凋亡是顺铂发挥肿瘤杀伤作用的重要机制之一,其诱导肿瘤细胞发生凋亡依赖于细胞内完整且正常的凋亡途径,如果肿瘤细胞的凋亡途径出现缺陷或抗凋亡机制增强,则可表现为对药物的耐药性<sup>[6]</sup>。近年来,人们发现 MT 的表达与肿瘤细胞对化疗药物的耐受也具有密切的关系,如有研究表明金属硫蛋白具有对细胞凋亡的保护作用,癌巢中 MT 的高表达常意味着细胞具有较高的细胞增殖率和更低的细胞凋亡率<sup>[7]</sup>。Dutsch-Wicherek 等<sup>[8]</sup>发现 MT 能调控细胞内锌离子的水平,细胞内保持适当  $Zn^{2+}$  水平对于维持具有活化 caspase-3 活性相关的 DNA 片段具有重要的意义。另有研究也表明 MT1H 蛋白能促进细胞对顺铂耐药,作用机制与抑制细胞凋亡有关。在之前对舌癌耐药研究中也发现,干扰舌癌耐药细胞株(Tca/PYM)中 MT1X 表达后,细胞对顺铂的敏感性明显增强,但对平阳霉素的敏感性无明显改变<sup>[8]</sup>。结合本实验的研究结果推测,MT1X 在细胞内的高表达并

非细胞特异性,而是与顺铂耐药具有很强的特异相关性,即高表达 MT1X 的细胞可能具有很强的抗凋亡特性,从而诱导细胞出现顺铂耐药。

当然,尽管本实验结果为以后的肺癌多药耐药逆转提供了新的靶标,但由于本实验中所采用的研究是基于体外实验得出的结论,因此,在以后的工作中需要使用动物舌癌移植瘤模型对本研究在体内的效果进行评价,将有助于确定靶向沉默 MT1X 是否具有潜在临床应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance [J]. *Oncogene*, 2011, 31: 1869-1883.
- [2] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2011, 1807(6): 735-745.
- [3] Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions [J]. *Journal Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005, 19: 13-17.
- [4] Nakamura K, Lila ASA, Matsunaga M, et al. A double-modulation strategy in cancer treatment with a chemotherapeutic agent and siRNA [J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(11): 2040-2047.
- [5] 唐敏,熊晶.慢病毒载体对 HIF-2 $\alpha$  基因沉默效率的研究[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(3): 240-244.
- [6] Florea AM, Büsselfberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects [J]. *Cancers*, 2011, 3(1): 1351-1371.
- [7] Mao J, Yu H, Wang C, et al. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12): 2568-2577.
- [8] Dutsch-Wicherek M, Lazar A, Tomaszewska R, et al. Analysis of metallothionein and vimentin immunoreactivity in pharyngeal squamous cell carcinoma and its microenvironment [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 352(2): 341-349.
- [9] Peng B, Gu Y, Xiong Y, et al. Microarray-Assisted Pathway Analysis Identifies MT1X & NF $\kappa$ B as Mediators of TCRP1-Associated Resistance to Cisplatin in Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e51413.

(此文编辑:朱雯霞)