

光神霉素A抑制人肺腺癌A549/DDP 细胞MRP1基因表达

李怀永 邵淑丽* 张伟伟 杨希婷 刘 锐 陈 闯 车家祥 徐君懿
(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 该研究旨在探讨Sp1抑制剂光神霉素A(Mithramycin A)对人肺腺癌A549/DDP细胞MRP1表达的影响。不同浓度光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h后, 采用MTT法检测细胞存活率, Real time RT-PCR检测Sp1和MRP1基因表达水平, Western blot检测Sp1和MRP1蛋白表达水平。结果显示, 300 nmol/L光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h后Sp1和MRP1 mRNA表达水平分别降低31.22%和85.44%, Sp1和MRP1蛋白表达水平分别降低53.27%和40.42%。提示光神霉素A能够通过抑制Sp1表达, 从而抑制MRP1表达。

关键词 肺癌; MRP1; Sp1; 光神霉素A

Mithramycin A Inhibited Expression of *MRP1* Gene of Human Lung Adenocarcinoma Cell A549/DDP

Li Huaiyong, Shao Shuli*, Zhang Weiwei, Yang Xiting, Liu Rui, Chen Chuang, Che Jiaxiang, Xu Junyi
(College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract The study investigated the effects of Mithramycin A on the expression of *MRP1* gene of human lung adenocarcinoma cell A549/DDP. The inhibitory effect of Mithramycin A on the growth of A549/DDP cells was tested by MTT method *in vitro*. The levels of Sp1/MRP1 were measured by Real time RT-PCR and Western blot. The results showed that Mithramycin A inhibited the growth of A549/DDP cells in a dose-dependent manner. After exposure to 300 nmol/L Mithramycin A for 48 h, the expressions of mRNA and protein of Sp1 and MRP1 were reduced. The results suggested that Mithramycin A depressed the expression of *MRP1* gene of human lung adenocarcinoma cell A549/DDP through down-regulation of *Sp1* gene.

Key words lung cancer; MRP1; Sp1; Mithramycin A

肺癌是常见癌症之一, 严重威胁人类的健康。化学治疗是癌症治疗的重要手段, 具有手术和放射治疗不可替代的作用。然而肺癌细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR)是导致化疗失败的主要

原因。多药耐药是指肿瘤细胞对多种结构不同、靶位点不同、作用方式不同的抗肿瘤药物具有抵抗性。多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, *MRP1*)基因过表达是肺癌细胞产生多药耐

收稿日期: 2013-09-26 接受日期: 2013-12-24

黑龙江省自然科学基金(批准号: C200624、C201241)、黑龙江省教育厅科学技术项目(批准号: 11511447、12511611)和齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(批准号: YJSCX2013-ZD14)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

Received: September 26, 2013 Accepted: December 24, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (Grant No.C200624, C201241), the Project of Science and Technology of Heilongjiang Provincial Educational Department (Grant No.11511447,12511611) and Graduate Innovation Foundation of The Qiqihar University (Grant No.YJSCX2013-ZD14)

*Corresponding author: Tel: +86-452-2738219, E-mail: shshl32@163.com

网络出版时间: 2014-02-21 14:53

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0312.html>

药的主要机制之一^[1-2]。对MRP1基因5'-末端区分析表明, 在启动子近侧区的正负调控结构域中, 包含转录因子Sp1结合序列^[3]。因此, 本研究通过观察光神霉素A(Mithramycin A)作用人肺腺癌A549/DDP细胞对Sp1和MRP1表达的影响, 探讨Sp1对MRP1表达的影响, 为逆转肿瘤细胞多药耐药提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌A549细胞和A549/DDP细胞购自中国科学院上海细胞库。DMSO购自Sigma公司。RPMI-1640培养基购自HyClone公司。光神霉素A、胎牛血清、胰蛋白酶、Hepes、TEMED、UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒和总蛋白提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人肺腺癌A549和A549/DDP细胞用含10%胎牛血清、 1×10^5 U/L青霉素及100 mg/L链霉素的RPMI-1640培养液置于含5% CO₂、饱和湿度、37 °C培养箱中培养。

1.2.2 细胞生长曲线测定 将A549/DDP细胞以 1×10^5 /mL的浓度接种于细胞培养瓶中, 采用台盼蓝拒染法对细胞进行计数, 每天各测3瓶, 分7 d, 取平均值。7 d计数完成后, 用Origin7.5作图, 确定对数生长期。

1.2.3 光神霉素A对细胞生长的抑制作用 A549/DDP细胞中分别加入终浓度为0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 nmol/L的光神霉素A, 分别孵育24, 48, 72 h。常规MTT法检测不同浓度下细胞的存活率, 570 nm下测吸光度(*D*), 计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率=(实验组平均*D*值-空白组平均*D*值)/(对照组平均*D*值-空白组平均*D*值)×100%。采用直线回归方法计算药物的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测Sp1和MRP1 mRNA 采用UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒提取细胞总RNA。*Sp1*正义链: 5'-ctg tga atg ctg ctc aac tct c-3', 反义链: 5'-gtt ttc tcc ttc ctc tcc acc t-3', 扩增产物为212 bp。*MRP1*正义链: 5'-ggg gtc ctc att atc ttc tgg-3', 反义链: 5'-tgg tct cag ggt agg ggt tag-3', 扩增产物为209 bp。以 β -actin为内参照, β -actin正义链: 5'-agg gag cat ccc cca aag tt-3', 反义链: 5'-ggg cac gaa ggc tca

tca tt-3', 扩增产物为205 bp。实时荧光定量PCR扩增条件: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环35次; 72 °C检测信号, 循环结束后进行熔解曲线检测。实验重复3次, 数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.2.5 Western blot检测Sp1和MRP1蛋白的表达 收集经0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 nmol/L光神霉素A作用48 h的A549/DDP细胞和未经处理的A549细胞, 利用在生工生物工程(上海)有限公司购买的总蛋白抽提试剂盒说明书中的方法提取总蛋白, 样品进行SDS-PAGE凝胶电泳, 用Bio-Rad电转仪将蛋白转移到PVDF膜上, 转膜条件为150 V恒压3 h, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 加Sp1/MRP1一抗(1:100), 内参照GAPDH一抗4 °C孵育过夜, PBS洗膜, 加二抗IgG(1:10 000), 室温孵育2 h, Odyssey红外荧光扫描成像系统中进行扫描检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据处理, 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间比较用LSD法检测其差异性, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养

人肺腺癌耐顺铂A549/DDP细胞生长状态如图1所示, 呈上皮样贴壁生长, 细胞壁光滑, 折光性好, 细胞生长状态良好。

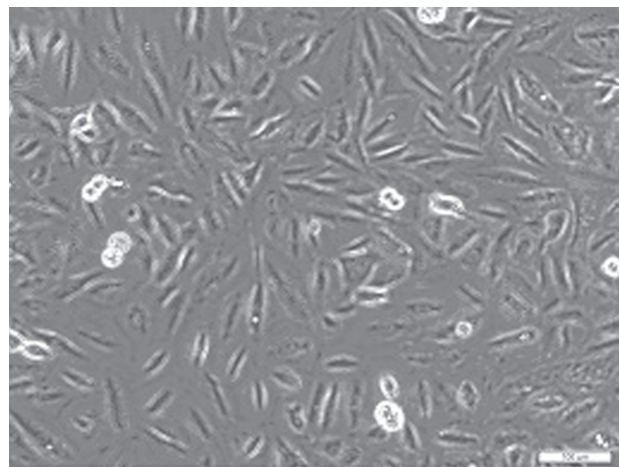


图1 光学显微镜下A549/DDP细胞的细胞形态(200×)
Fig.1 The cell morphology of A549/DDP cells under light microscope (200×)

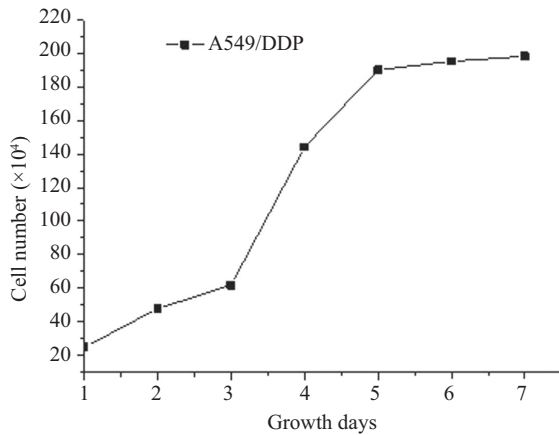


图2 A549/DDP细胞生长曲线
Fig.2 The growth curve of A549/DDP cells

2.2 细胞生长曲线

台盼蓝拒染法对A549/DDP细胞连续计数7 d, 作细胞生长曲线(图2)。由图2可知, A549/DDP细胞的对数生长期为第3~5 d, 所以选择在第3.5 d加光神霉素A。

2.3 光神霉素A对A549/DDP细胞生长抑制作用

光神霉素A在50~300 nmol/L之间对A549/DDP细胞作用24, 48, 72 h后的生长抑制作用呈剂量依赖性(图3), 光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h的 IC_{50} 为 663.156 ± 0.481 nmol/L($R^2=0.953$)(表1)。所以在本实验中, 50, 100, 150, 200, 250, 300 nmol/L光神霉素

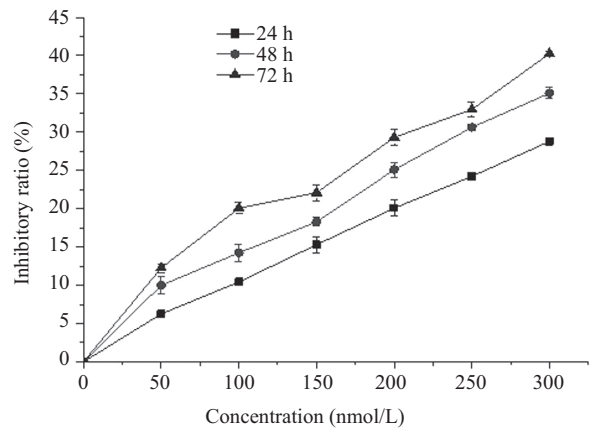


图3 光神霉素A对A549/DDP细胞的生长抑制曲线
Fig.3 The growth inhibition curve of mithramycin A of A549/DDP cells

A对A549/DDP细胞的生长影响较小。

2.4 光神霉素A对A549/DDP细胞*Sp1* mRNA和*MRP1* mRNA表达水平的影响

应用定量PCR仪自带的数据分析软件可以获得对应的 C_t 值, 并采用 $power(2^{-\Delta\Delta C_t})$ 法计算出各组细胞*Sp1* mRNA和*MRP1* mRNA表达量(表2)。结果表明, 不同浓度光神霉素A处理A549/DDP细胞可使*Sp1*和*MRP1*基因表达浓度依赖性降低, 差异显著($P<0.05$)。300 nmol/L光神霉素A作用48 h后, A549/DDP细胞*Sp1* mRNA和*MRP1* mRNA表达量分别降低31.22%和85.44%。阴性对照A549细胞中*Sp1*和

表1 A549/DDP细胞曲线拟合结果

Table 1 The results of curve fitting on A549/DDP cells

	回归方程 Regression equation	半数抑制率(nmol/L) IC_{50} (nmol/L)	相关性系数 R^2	回归方程显著性 F	差异显著性 P
24 h	$Y = -44.609 + 12.402 \log X$	778.592	0.936	58.579	<0.01
48 h	$Y = -48.913 + 14.570 \log X$	663.156	0.953	81.667	<0.01
72 h	$Y = -46.592 + 14.526 \log X$	563.884	0.923	48.226	<0.01

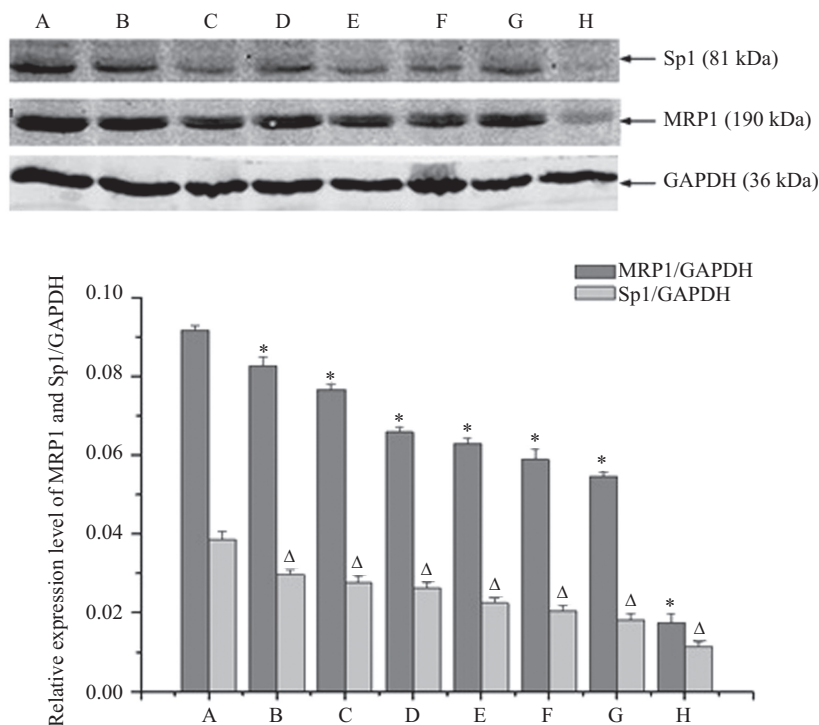
表2 A549/DDP细胞和A549细胞内*Sp1* mRNA和*MRP1* mRNA表达情况

Table 2 The *Sp1* mRNA and *MRP1* mRNA expression levels of the A549/DDP cells and A549 cells

组别 Group	循环域值(<i>Sp1</i>) C_t (<i>Sp1</i>)	循环域值(<i>MRP1</i>) C_t (<i>MRP1</i>)	循环域值(β -actin) C_t (β -actin)	相对表达量(<i>Sp1</i>) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (<i>Sp1</i>)	相对表达量(<i>MRP1</i>) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (<i>MRP1</i>)
1	15.00±0.08	17.59±0.67	9.94±0.29	100%	100%
2	14.91±0.44	17.63±0.03	9.74±0.03	(92.66±0.06)%*	(84.67±0.17)%*
3	19.82±0.09	22.71±0.59	14.51±0.35	(84.09±0.14)%*	(68.30±0.20)%*
4	16.80±0.76	20.40±0.05	11.44±0.22	(81.23±0.27)%*	(40.33±0.13)%*
5	16.01±0.24	19.66±0.06	10.51±0.12	(73.71±0.12)%*	(35.36±0.21)%*
6	18.34±0.40	22.66±0.15	12.81±0.16	(72.20±0.18)%*	(21.61±0.11)%*
7	19.13±0.65	23.96±0.36	13.53±0.10	(68.78±0.25)%*	(14.56±0.14)%*
8	19.40±1.03	23.01±0.77	11.13±0.20	(10.81±0.45)%*	(5.33±0.89)%*

1: 对照(0 nmol/L光神霉素A); 2: 50 nmol/L光神霉素A; 3: 100 nmol/L光神霉素A; 4: 150 nmol/L光神霉素A; 5: 200 nmol/L光神霉素A; 6: 250 nmol/L光神霉素A; 7: 300 nmol/L光神霉素A; 8: A549细胞。* $P<0.05$, 与对照组比较。

1: CK (0 nmol/L Mithramycin A); 2: 50 nmol/L Mithramycin A; 3: 100 nmol/L Mithramycin A; 4: 150 nmol/L Mithramycin A; 5: 200 nmol/L Mithramycin A; 6: 250 nmol/L Mithramycin A; 7: 300 nmol/L Mithramycin A; 8: A549 cell. * $P<0.05$ vs control group.



A: 对照(0 nmol/L光神霉素A); B: 50 nmol/L光神霉素A; C: 100 nmol/L光神霉素A; D: 150 nmol/L光神霉素A; E: 200 nmol/L光神霉素A; F: 250 nmol/L光神霉素A; G: 300 nmol/L光神霉素A; H: A549细胞。* $P < 0.05$, $^{\Delta}P < 0.05$, 与对照组比较。

A: CK (0 nmol/L Mithramycin A); B: 50 nmol/L Mithramycin A; C: 100 nmol/L Mithramycin A; D: 150 nmol/L Mithramycin A; E: 200 nmol/L Mithramycin A; F: 250 nmol/L Mithramycin A; G: 300 nmol/L Mithramycin A; H: A549 cell. * $P < 0.05$, $^{\Delta}P < 0.05$ vs control group.

图4 光神霉素A作用A549/DDP细胞MRP1、Sp1和GAPDH蛋白Western blot结果

Fig.4 The Western blot results of MRP1, Sp1 and GAPDH of A549/DDP by Mithramycin A

MRP1 mRNA的表达均为最低($P < 0.05$)。

2.5 光神霉素A对A549细胞和A549/DDP细胞Sp1和MRP1蛋白表达水平的影响

Western blot检测光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h后, Sp1和MRP1蛋白的表达水平见图4, 随着光神霉素A浓度的升高, Sp1和MRP1蛋白表达水平逐渐降低, 差异显著($P < 0.05$)。300 nmol/L光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h后, Sp1和MRP1蛋白表达水平分别降低53.27%和40.42%。阴性对照A549细胞中Sp1和MRP1蛋白的表达均为最低($P < 0.05$)。

3 讨论

MRP1是MRP蛋白家族9个成员(MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5、MRP6、MRP7、MRP8、MRP9)之一, 属于ABC(ATP binding cassette, ABC)超家族膜转运蛋白, 其表观分子量为180~190 kDa, 运用ATP结合/水解产生的能量, 行使转运功能^[2,4]。主要分布于细胞膜和内膜系统, 能将细胞内药物排出细胞外, 降低细胞内药物浓度, 使胞内的药物浓度低于杀死细胞的临界值, 并使胞内药物重新分布, 呈现

MDR表型^[5]。本研究采用的人肺腺癌A549/DDP细胞属于人肺腺癌耐顺铂细胞株, MRP1基因过表达是肺癌细胞产生多药耐药的主要机制之一, 如何调控肺癌细胞MRP1基因表达, 克服肺癌细胞的多药耐药, 是提高肿瘤化疗效果的关键。MRP1表达调控非常复杂, 涉及多种调控机制^[6-7]。

Sp1是Sp/KLF蛋白家族的成员之一, 是20世纪80年代第一个被发现的转录因子。Sp1在多种细胞、组织中广泛表达, 参与了几乎所有的细胞生命过程, 如细胞生长、分化、凋亡、血管再生、免疫反应等。转录因子Sp1是一种序列特异性的DNA结合蛋白, 在其C端有3个串联的Cys2His2型锌指结构域, 能特异性地结合到一些富含GC盒和GT盒的启动子上, 从而参与多种基因的转录调控^[8]。

对MRP1基因5'-末端区分析表明, 在启动子近侧区的正负调控结构域中, 包含转录因子Sp1结合序列^[3], 光神霉素A通过与GC富含序列结合, 从而与Sp1蛋白竞争性结合Sp1顺势作用元件, 抑制Sp1蛋白对基因转录的调控作用^[9], 并且抑制Sp1表达可通过上调某些抑癌基因, 起到促凋亡作用^[10]。研究表

明, Sp1特异性阻断剂光神霉素A能明显抑制结直肠癌细胞中*NGX6*基因的表达^[11], 抑制非小细胞肺癌细胞中*VEGF*基因的表达^[12]。Jia等^[13]研究表明, 光神霉素A作用胰腺肿瘤细胞后明显抑制Sp1及受其调控的下游基因, 本研究表明, 300 nmol/L光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h后, *Sp1* mRNA和*MRP1* mRNA表达量分别降低31.22%和85.44%, 但是仍然高于A549细胞中*Sp1* mRNA和*MRP1* mRNA的表达水平。Sachrajda等^[14]研究表明, 250 nmol/L光神霉素A作用黑色素瘤细胞, 对*MRP1* mRNA表达的抑制率可达90%, 与本实验结果一致。同时, 本研究结果表明, 300 nmol/L光神霉素A作用A549/DDP细胞48 h后, Sp1和MRP1蛋白表达量分别降低53.27%和40.42%, 但是仍然高于A549细胞中Sp1和MRP1蛋白表达水平。因此, 光神霉素A对人肺腺癌A549/DDP细胞中*MRP1*基因表达具有明显的抑制作用, 这些实验结果将为阐明Sp1对*MRP1*基因表达的调控机制奠定基础, 但其具体的机理及在临床上对肺癌细胞的治疗作用尚有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258(5088): 1650-4.
- 2 Yin J, Zhang J. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: From discovery to clinical application. *J Cent South Univ (Med Sci)* 2011; 36(10): 927-38.
- 3 Rosenberg MF, Oleschuk CJ, Wu P, Mao Q, Deeley RG, Cole SP, *et al.* Structure of a human multidrug transporter in an inward-facing conformation. *J Struct Biol* 2010; 170(3): 540-7.
- 4 Shao SL, Zhang WW, Li XY, Zhang ZZ, Yun DZ, Fu B, *et al.* Reversal of MDR1 gene-dependent multidrug resistance in HL60/HT9 cells using short hairpin RNA expression vectors. *Cancer Biother Radiopharm* 2010; 25(2): 171-7.
- 5 Cho S, Lu M, He X, Ee PL, Bhat U, Schneider E, *et al.* Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20778-83.
- 6 Ronaldson PT, Ashraf T, Bendayan R. Regulation of multidrug resistance protein 1 by tumor necrosis factor alpha in cultured glial cells: Involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 2010; 77(4): 644-59.
- 7 Yu B, Datta PK, Bagchi S. Stability of the Sp3-DNA complex is promotor specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(18): 5368-76.
- 8 Zhu Q, Center MS. Evidence that SP1 modulates transcriptional activity of the multidrug resistance-associated protein gene. *DNA Cell Biol* 1996; 15(2): 105-11.
- 9 Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, *et al.* Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 2004; 15(11): 4841-53.
- 10 冯 洁, 汤正好, 余永胜. 转录因子Sp1在肝细胞癌中的表达. *临床肝胆病杂志*(Feng Jie, Tang Zhenghao, Yu Yongshen. Expression of transcription factor Sp1 in hepatocellular carcinoma. *J Clin Hepatol*) 2013; 1(29): 65-7.
- 11 刘敏姬, 王晓艳, 沈守荣, 李 楠, 张德才, 彭 娅, 等. 抑癌基因*NGX6*启动子的克隆与功能鉴定. *生物化学与生物物理进展*(Liu Minji, Wang Xiaoyan, Shen Sshourong, Li Nan, Zhang Decai, Peng Ya, *et al.* Cloning and identification of promoter of suppressed-tumor gene *NGX6*. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2010; 37(10): 1082-9.
- 12 Deacon K, Onion D, Kumari R, Watson SA, Knox AJ. Elevated SP-1 transcription factor expression and activity drives basal and hypoxia induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 2012; 287(47): 39967-81.
- 13 Jia Z, Zhang J, Wei D, Wang L, Yuan P, Le X, *et al.* Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res* 2007; 67(10): 4878-85.
- 14 Sachrajda I, Ratajewski M. Mithramycin A suppresses expression of the human melanoma-associated gene ABCB8. *Mol Genet Genomics* 2011; 285(1): 57-65.