

上调 Sp1 表达对小细胞肺癌耐药细胞的化疗增敏作用

王彦玲 马卫东 蒋常文 赵俊霞 周娜静 郑力芬 赵娟 闫蕴力*

(河北医科大学基础医学研究所细胞生物学教研室, 石家庄 050017)

摘要 探讨转录因子 Sp1 对人小细胞肺癌足叶乙甙耐药细胞 H446/VP 的化疗增敏作用。采用脂质体转染 Sp1 质粒进入细胞, MTT 法检测细胞对足叶乙甙作用的半数抑制浓度(IC₅₀); AO/EB 双荧光染色观察细胞死亡率; RT-PCR 和 Western 印迹检测 Sp1、拓扑异构酶 II α (Topo II α)和拓扑异构酶 II β (Topo II β) mRNA 和蛋白质表达。结果: 细胞转染 Sp1 质粒后 IC₅₀ 明显降低, 细胞死亡率明显增加。RT-PCR 和 Western 印迹检测可见, H446/VP-Sp1 细胞中 Sp1、Topo II α 的 mRNA 和蛋白质表达量均较转染前明显增加, 而 Topo II β 表达无显著性差别。研究表明, 上调 Sp1 表达可提高人小细胞肺癌耐药细胞中 Topo II α 的表达, 为 Topo II 抑制剂类药物提供了更多的作用靶点, 使细胞对 Topo II 抑制剂类药物的敏感度提高。

关键词 转录因子 Sp1; 多药耐药; 小细胞肺癌; 拓扑异构酶 II; 足叶乙甙

小细胞肺癌为临床常见的恶性肿瘤, 治疗过程中易发生多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象, 导致化疗的失败^[1]。拓扑异构酶抑制剂是临床化疗中常用的抗癌药物, 由其导致的耐药现象是化疗失败的常见原因。研究表明, 耐药细胞中拓扑异构酶 II α (topoisomerase II, Topo II α)表达下调, 拓扑异构酶抑制剂缺乏作用靶点是导致耐药发生的重要机制。Sp1 作为 Topo II α 启动子的主要激活剂能够促进 Topo II α 表达。为了解 Sp1 对肿瘤耐药细胞的化疗增敏作用, 本研究将 Sp1 表达型质粒转染进入人小细胞肺癌耐药(对足叶乙甙耐药 H446/VP)细胞株^[2], 通过提高 Topo II 的表达水平, 增加相关药物的作用靶点, 探讨肿瘤细胞的耐药逆转机制, 为提高肿瘤治疗效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 含有 Sp1 基因 Sp1/pN3 质粒及 pN3 空载质粒由德国 Suske 教授惠赠。

1.1.2 细胞株 人小细胞肺癌对足叶乙甙耐药 H446/VP 细胞株由本室建立保存。

1.1.3 药物 足叶乙甙(etoposide, VP-16)为山东齐鲁药业有限公司产品。

1.1.4 试剂及仪器 鼠抗人 Topo II α 、Topo II β 及 Sp1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, β 肌动蛋白抗体购自北京中山试剂公司。Trizol、Taq 酶、dNTP、细胞核蛋白提取试剂盒、RNA 酶抑制剂(RNase)、

随机引物、M-MLV 逆转录酶均购自 Promega 公司。脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitron 公司。PCR 引物由北京赛百胜公司合成。荧光倒置显微镜为 Olympus 公司产品, 低温高速离心机、分光光度计、PCR 仪为 Eppendorf 公司产品, 酶标仪为 Bio-Tek 公司产品, 凝胶成像系统为 UVP 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒转染 碱裂法小量抽提 Sp1 质粒, 应用脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染 Sp1 质粒进入 H446/VP 细胞, 将转染 Sp1 细胞命名为 H446/VP-Sp1 细胞。同时将 pN3 空载质粒转入 H446/VP 细胞, 并命名为 H446/VP-pN3 细胞。

1.2.2 细胞培养 将 H446/VP 细胞、H446/VP-pN3 细胞以及 H446/VP-Sp1 细胞以 RPMI 1640 培养基培养, 内含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素, 置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂, 饱和湿度环境下培养, 3 天传代 1 次。

1.2.3 MTT 法检测药物对细胞的杀伤作用 (1) 药物浓度选择、实验分组 每种细胞的 VP-16 药物浓度分别设为 5、10、25、50、100、250、500、1 000 μ g/ml, 同时设空白对照组。(2) MTT 检测抑制率将以上细胞分别以 1×10^5 个/ml 细胞浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 180 μ l。24 h 后按照实验分组分别加入经无血清 RPMI 1640 稀释的药物 20 μ l, 每组均做 8 复孔。药物与细胞共同培养至 24 h, 每

收稿日期: 2006-12-28 接受日期: 2007-03-26

* 通讯作者。Tel: 0311-86265558, E-mail: yanyl@hebm.edu.cn

孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT。继续温育 4 h 后, 1 000 r/min 离心 10 min, 吸去上清液, 加入 150 μl /孔 DMSO 终止反应, 振荡仪振荡 10 min。用 ELX800 型酶标仪在 490 nm 波长下测吸光值(A 值)。根据 A 值计算细胞抑制率(inhibition rate, IR), 计算公式为: 细胞抑制率(%)=[(对照组 A 值 - 用药组 A 值)/ 对照组 A 值] \times 100%。根据各药物 IR, 计算三种细胞的药物半数抑制浓度(IC₅₀)。本实验重复 3 次。

1.2.4 双荧光染色观察细胞的死亡率 分别取对数生长期 H446/VP、H446/VP-pN3、H446/VP-Sp1 细胞, 培养 24 h 后分别加入 124.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VP-16 作用细胞各 24 h。收集细胞, 1 \times PBS 洗 1 次, 重悬细胞, 加入 0.05 mg/ml 吖啶橙(AO)和 0.05 mg/ml 溴乙啶(EB)混合染液 2 μl , 吹打混匀, 滴至载玻片上, 高倍镜下计数 400 个细胞, 计算死亡率。本实验重复 3 次。

1.2.5 RT-PCR 检测 (1)RNA 的提取及 cDNA 合成 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 采用随机引物法合成 cDNA。(2) PCR 扩增 从 NCBI- 核苷酸数据库中查找目的基因原始 cDNA 序列, 采用 primer 5.0 软件设计扩增引物, 由北京赛百盛公司合成。各目的基因引物序列、片段长度见表 1。扩增条件为均先采用 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, Sp1: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环。Topo II α : 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s, 40 个循环。Topo II β : 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s, 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。扩增完毕后取 25 μl 扩增产物, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳(120 V, 40 min), 0.05 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 核酸染料(GoldView)染色, 读胶仪读取扩增条带的光密度值并进行分析、照相。采用目的基因 / 内参的比值表示目的基因 mRNA 表达水平。

1.2.6 Western 印迹分析 用 Perice 核蛋白提取试剂盒按照说明提取细胞核蛋白和胞浆蛋白, 测定蛋白质浓度。配制 10% 分离胶和 5% 积层胶, 加入 150 μg

蛋白质样品开始电泳, 指示剂至分离胶底部, 电泳完毕, 80 V 水浴转膜。5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 加入 1 : 80 稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBS 漂洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, TBS 漂洗膜, 化学发光, 采用 UVP lab work 4.60 软件测定条带光密度值, 并分析结果。数据处理运用 SAS 6.12 统计学软件, 方法采用 *t* 检验、单因素方差分析。

2 结果

2.1 MTT 检测结果

应用 VP-16 作用后, H446/VP、H446/VP-pN3、H446/VP-Sp1 细胞 IC₅₀ 值分别为: (332.92 \pm 31.58) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(328.83 \pm 24.69) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(124.86 \pm 22.38) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。H446/VP-Sp1 细胞的 IC₅₀ 与 H446/VP-pN3 和 H446/VP 细胞比较有显著性差异($P < 0.05$), H446/VP-pN3 和 H446/VP 细胞比较无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 双荧光染色结果

双荧光染色可见, 活细胞被 AO 染成绿色, 死细胞被 EB 染成橘红色或红色。H446/VP 细胞、H446/VP-pN3 细胞、H446/VP-Sp1 细胞的死亡率分别为 (20.16 \pm 3.78)%、(21.63 \pm 4.85)%、(42.67 \pm 6.29)%。H446/VP-Sp1 细胞死亡率与 H446/VP 和 H446/VP-pN3 细胞比较有显著性差异($P < 0.05$), H446/VP-pN3 和 H446/VP 细胞比较无显著性差异($P > 0.05$)(表 2)。

2.3 RT-PCR 检测结果

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在各泳道的 135 bp 处观察到 β 肌动蛋白的电泳条带, 在 821 bp、349 bp、452 bp 处分别观察到 Sp1、Topo II α 、Topo II β 的电泳条带。H446/VP-Sp1 细胞 Sp1、Topo II α mRNA 表达增高($P < 0.05$), Topo II β 表达无显著性差异($P > 0.05$)。H446/VP-pN3 和 H446/VP 细胞比较无显著性差异($P > 0.05$)(图 1、表 3)。

2.5 Western 印迹检测结果

与 H446/VP 及 H446/VP-pN3 细胞比较, H446/VP-Sp1 细胞的 Sp1、Topo II α 表达增高($P < 0.05$), Topo II β 表达无显著性差异($P > 0.05$)。H446/VP-pN3 和 H446/VP 细胞比较无显著性差异($P > 0.05$)(图 2, 表 4)。

表 1 各目的基因引物序列、片段长度

基因	引物	长度 (bp)
β 肌动蛋白	有义: 5'- CCA ACT GGG ACG ACA T -3' 反义: 5'- TCT GGG TCA TCT TCT CG -3'	135
Sp1	有义: 5'-CTA CCC CTA CCT CAA AGG-3' 反义: 5'- CTC TCC TTC TTT TTG CTG G -3'	821
Topo II α	有义: 5'-TGC CTG TTT AGT CGC TTT C-3' 反义: 5'-TGA GGT GGT CTT AAG AAT-3'	349
Topo II β	有义: 5'- GTC AGA AAC TGC CAA CAA A -3' 反义: 5'- CAT AAC CAT TAC GAC CAC C -3'	452

表 2 双荧光染色细胞的死亡率($\bar{x} \pm s, n=10$)

细胞系	死亡率 (%)
H446/VP	20.16 \pm 3.78
H446/VP-pN3	21.63 \pm 4.85*
H446/VP-Sp1	42.67 \pm 6.29*

与 H446/VP 细胞、H446/VP-pN3 细胞相比, * $P < 0.05$; 与 H446/VP 细胞相比, * $P > 0.05$ 。

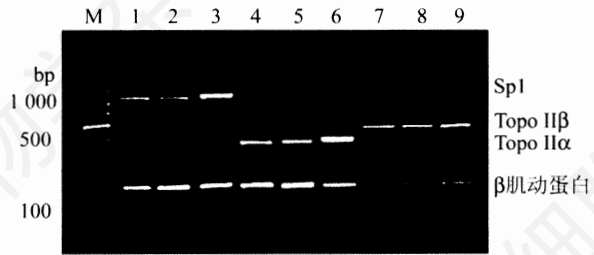


图1 半定量 RT-PCR 测定 Sp1、Topo II α 、Topo II β mRNA 表达

M: marker; 1、4、7: H446/VP 细胞; 2、5、8: H446/VP-pN3 细胞; 3、6、9: H446/VP-Sp1 细胞。

表3 半定量 RT-PCR 测定 Sp1、Topo II α 、Topo II β mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

mRNA 表达	H446/VP	H446/VP-pN3	H446/VP-Sp1
Sp1	0.68 \pm 0.16	0.72 \pm 0.23 [#]	1.07 \pm 0.21*
Topo II α	0.91 \pm 0.34	0.93 \pm 0.26 [#]	1.38 \pm 0.43*
Topo II β	1.07 \pm 0.37	1.06 \pm 0.31 [#]	1.04 \pm 0.23 [#]

与 H446/VP 细胞、H446/VP-pN3 细胞相比, * P <0.05, [#] P >0.05; 与 H446/VP 细胞相比, [#] P >0.05。

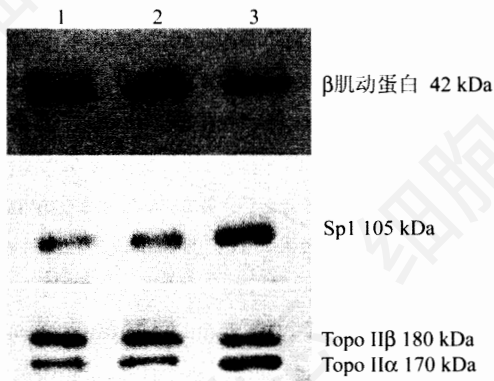


图2 Western 印迹测定蛋白质表达

1: H446/VP 细胞; 2: H446/VP-pN3 细胞; 3: H446/VP-Sp1 细胞。

表4 Western 印迹测定 Sp1、Topo II α 、Topo II β 表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

蛋白质表达	H446/VP	H446/VP-pN3	H446/VP-Sp1
Sp1	0.22 \pm 0.08	0.25 \pm 0.11 [#]	1.17 \pm 0.37*
Topo II α	0.12 \pm 0.05	0.11 \pm 0.04 [#]	0.42 \pm 0.13*
Topo II β	0.27 \pm 0.06	0.26 \pm 0.08 [#]	0.25 \pm 0.06 [#]

与 H446/VP 细胞、H446/VP-pN3 细胞相比, * P <0.05, [#] P >0.05; 与 H446/VP 细胞相比, [#] P >0.05。

3 讨论

Topo II 是某些肿瘤化疗药物的作用靶点, 它的表达水平改变与肿瘤细胞的 MDR 的发生、发展密切相关^[3]。Topo II 有两种同工酶 Topo II α 和 Topo

II β , 在恶性肿瘤的发生、发展以及耐药的过程中有着重要的意义。作为多种药物的作用靶酶, 其含量与细胞对药物的敏感性关系密切^[4,5]。研究表明, Topo II α 表达水平下降, 肿瘤细胞对化疗药物的敏感性下降, 耐药性增高^[6]。有资料表明, 药物作用后引起的 Topo II 含量或活性降低、基因变异以及在细胞内分布的改变, 均是对 Topo II 抑制剂产生耐药的原因^[7,8]。通过 Topo II α 基因转染提高 Topo II α 水平, 可使肿瘤细胞对 Vp-16 敏感性增加^[9]。

研究表明, Sp1 是一个普遍存在于哺乳动物细胞中的转录因子, 在保证持家基因、组织特异性表达基因和病毒基因正确表达过程中起重要作用。Sp1 特异性地结合启动子区的 GC/GT 盒, 激活包括 Topo II 基因在内的有关基因转录^[10-12]。对于含有多个 Sp 结合位点的启动子而言, Sp1 通过直接的蛋白质-蛋白质相互作用发挥协同转录功能^[13]。

已有研究证实, 在 Topo II α 的启动子区包含了 2 个 GC 盒(GC1 和 GC2), Sp1 通过其 3 个锌指结构与 Topo II α 启动子区的 GC/GT 盒结合, 上调 Topo II 的表达^[14-16]。但关于上调肿瘤细胞内 Sp1 表达是否可克服相关细胞耐药, 增强肿瘤耐药细胞对化疗药物的敏感性, 至今仍缺乏研究。

VP-16 是半合成的鬼臼毒素衍生物, 属于 Topo II 毒性抑制剂, 主要通过稳定 Topo II-DNA 断裂复合物, 抑制 DNA 的再连接, 造成 DNA 断裂损伤^[17]。VP-16 是 SCLC 化疗的常用药物^[18], MDR 现象是其化疗失败的重要因素之一。我们在以前的研究中利用 VP-16 诱导小细胞肺癌 H446 细胞产生耐药, 建立了 H446/VP 细胞系^[2], 并观察到其 Topo II 表达降低是产生耐药的主要原因。

本研究中我们将 Sp1 质粒转染进入 H446/VP 细胞, 并观察到随着 Sp1 表达水平上调, H446/VP 细胞 Topo II α 的表达上升, 此举可为 VP-16 提供了更多的作用靶点, 使耐药细胞对 VP-16 的敏感性提高, 增强了肿瘤耐药细胞对化疗药物的敏感性。

本研究结果为进一步寻找克服肿瘤耐药相关因素, 提高肿瘤临床治疗效果具有参考意义。

参考文献(References)

- [1] Ikubo S *et al. Anticancer Res*, 1999, **19**: 3985
- [2] 张会军等. *肿瘤*, 2004, **19**: 230
- [3] Withoff S *et al. Anticancer Res*, 1996, **16**: 1867
- [4] Koshiyama M *et al. Anticancer Res*, 2001, **21**: 905
- [5] Sabourin M *et al. Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 1947
- [6] 冯建航等. *肿瘤防治杂志*, 2001, **8**: 675

- [7] Godard T *et al. Mutat Res*, 2002, **520**: 47
[8] Miao ZH *et al. Cancer Res*, 2003, **63**: 4527
[9] Zhou Z *et al. Br J Cancer*, 2001, **85**: 747
[10] French SW *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 948
[11] Dong XP *et al. J Gen Virol*, 1999, **80**: 2097
[12] Bouwman P *et al. Mol Cell Endocrinol*, 2002, **195**: 27
[13] Su W *et al. Genes Dev*, 1991, **5**: 820
[14] 马卫东等。癌症, 2005, **24**: 958
[15] Saxena D *et al. Gene*, 2004, **342**: 145
[16] Magan N *et al. Biochem J*, 2003, **374**: 723
[17] Beck WT *et al. Biochem Soc Trans*, 2001, **29**: 702
[18] Matsumoto Y *et al. Jpn J Cancer Res*, 2001, **92**: 778

The Role of Enhanced Chemotherapy Sensitivity on Drug Resistance of the Small Cell Lung Cancer Cells by Up-regulated Sp1

Yan-Ling Wang, Wei-Dong Ma, Chang-Wen Jiang, Jun-Xia Zhao, Na-Jing Zhou,
Li-Fen Zheng, Juan Zhao, Yun-Li Yan*

(Cell Biology Division, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract In order to find the chemotherapy sensitivity of how transcription factor Sp1 influence the etoposide (VP-16) resistance of small cell lung cancer cells, we transfected the expression type human Sp1 plasmid to H446/VP cells to enhance the expression of Sp1. Transfected Sp1 plasmid to VP-16 resistance small cell lung cancer cell, H446/VP mediated by liposome. The microculture tetrazolium (MTT) assay was used to measure the half inhibiting concentration (IC_{50}); AO/EB double fluorescent staining was applied to measure the death rate; RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of Sp1, topoisomerase II (Topo II α , Topo II β). It was found that the IC_{50} of H446/VP-Sp1 cell was obviously lower than H446/VP cell; The death rate of H446/VP-Sp1 cell increased significantly by comparing with H446/VP cell. It was showed that in both of the level of mRNA and protein, the expression of Sp1, Topo II α was increased in H446/VP-Sp1 cell, while the Topo II β expression had no obvious change. It was showed that the up-expression of Sp1 can enhance the expression of Topo II α in the drug resistance of small cell lung cancer cells. It offered more targets and increased sensitivity for topoisomerase inhibitor.

Key words transcription factor Sp1; multidrug resistance; small cell lung cancer; topoisomerase II; etoposide

Received: December 28, 2006

Accepted: March 26, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265558, E-mail: yanyl@hebmh.edu.cn