

靶向干扰Chk1增强阿霉素抗人乳腺癌MCF-7/adr细胞的作用机制研究

权蓉* 陈晓品 冉之蓉 何芳 杨彪 赵银晶 杨小琼

(重庆市重钢总医院肿瘤科, 重庆 400081)

摘要 Chk1的高表达可能是肿瘤对化疗药物的敏感性降低的重要因素之一, 本研究的目的是观察siRNA干扰Chk1对人乳腺癌耐药细胞株MCF-7/adr(耐阿霉素)生长及细胞周期的影响, 探讨Chk1在乳腺癌细胞耐药中的作用机制。采用RNAi技术抑制MCF-7/adr细胞中Chk1的表达。Western blot检测转染前后细胞内Chk1蛋白表达情况, 经阿霉素作用后, 流式细胞术(FCM)检测其细胞周期分布及细胞凋亡率, MTT法检测细胞增殖。Western blot结果显示, Chk1 siRNA转染24 h后, MCF-7/adr细胞中Chk1蛋白表达下降了67%, 明显低于对照组和空载体转染组($P < 0.05$)。FCM法检测结果显示, 同时, 抑制Chk1的表达可解除阿霉素引起的G₂/M期阻滞; 使阿霉素诱导的细胞凋亡率由转染前的(5.54 ± 0.15)%上升到(22.24 ± 0.13)% ($P < 0.05$); 在阿霉素浓度为0.4 mg/L、4 mg/L时, 细胞的增殖活性分别下降13%、34%。提示siRNA干扰Chk1能够通过调控MCF-7/adr细胞周期及增殖从而增强乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性, 为临床上克服乳腺癌化疗耐药提供了新的作用靶点。

关键词 乳腺癌; 耐药; RNA干扰; 细胞周期; 细胞周期检测点激酶1

目前, 抗肿瘤化疗药物主要是通过不同机制引起直接或间接肿瘤细胞DNA损伤的药物。尽管DNA损伤剂在肿瘤治疗中应用广泛, 但是这些药物往往具有对正常细胞非特异杀伤及容易诱导耐药等缺点^[1]。细胞周期检验点又称为细胞周期关卡, 与DNA损伤剂的这些副作用密切相关。细胞周期检验点是控制细胞增殖周期的限速位点, 其主要作用是在DNA复制和有丝分裂前确定DNA完整性, 精确调节细胞周期的进行, 防止增殖周期中的错误。当细胞DNA发生损伤时, 细胞周期检验点及时启动周期延迟或阻滞, 根据损伤程度, 进一步激活DNA修复过程或引起细胞衰老、凋亡等, 从而及时修复损伤的DNA或清除有害的异常细胞。对于正常细胞来说, 细胞周期检验点固然是防止因基因组不稳定而造成细胞癌变的关键因素。然而, 肿瘤细胞中的细胞周期检验点因促进DNA损伤修复而降低化疗药物对细胞的杀伤作用, 与肿瘤耐药密切相关^[2,3]。因此, 靶向抑制细胞周期检验点中关键因子, 可克服细胞周期检验点对化疗药物作用的影响, 从而增加肿瘤对DNA损伤剂的敏感性。此外, 肿瘤细胞中固有的周期检验点缺陷有利于提高DNA损伤剂对肿瘤细胞的选择性杀伤作用^[4]。

检验点激酶1 (checkpoint kinase 1, Chk1), 一种丝氨酸/苏氨酸激酶。作为细胞周期检验点的重要的信号传导分子, Chk1主要功能是将DNA损伤或周期阻滞信号从上游分子ATM(ataxia telangiectasia mutated)/ATR(ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related)通过磷酸化形式传递给众多底物, 发挥相应的生物学效应, 引起周期阻滞和DNA修复。已有的研究显示Chk1的高表达可能是肿瘤对化疗药物的敏感性降低的重要因素之一^[5]。

本研究通过靶向干扰人乳腺癌耐药细胞株MCF-7/adr(耐阿霉素)中的周期检验点激酶Chk1, 观察阿霉素的增敏作用, 探讨靶向干扰Chk1对阿霉素诱导的周期阻滞及细胞凋亡的影响及其分子机制, 为以细胞周期检验点为靶点的肿瘤治疗方案提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

RPMI 1640培养基购自Gibco公司, 胎牛血清购自Hyclone公司。siRNA转染试剂、siRNA转染培

收稿日期: 2010-12-03 接受日期: 2011-01-11

*通讯作者。Tel: 023-68840712, E-mail: qr690318@sina.com

养液及Chk1 siRNA(基因序列为: 5'-AAG TTC AAC TTG CTG TGA ATA-3')及Lipofectamine™ 2000为Invitrogen公司产品。Bradford试剂购于上海生工生物工程有限公司。Chk1(兔抗人多克隆抗体)及相应二抗均为Abcam公司产品。 β -actin(兔抗人多克隆抗体)购自武汉博士德公司。MTT及碘化丙啶(PI)购自Sigma公司。

1.2 人乳腺癌MCF-7/adr细胞的培养

人乳腺癌MCF-7/adr细胞株由重庆医科大学病理生理学教研室提供。常规培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养液中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 恒湿、恒温条件下培养。

1.3 RNA干扰实验

siRNA的配制及脂质体复合体合成: 5 nmol的Chk1 siRNA用无核酸酶水稀释, 终浓度为20 μ mol/L。将干扰用的适量siRNA稀释于siRNA转染培养液中, 轻轻混匀。适量的Lipofectamine™ 2000与稀释的siRNAs混合, 轻轻混匀, 并于室温下温育20 min左右, 即可获得siRNA-Lipofectamine™ 2000复合体。

siRNA转染细胞: 转染前1 d将对数生长期的细胞以 3×10^5 个/孔接种于6孔板中, 细胞接种在2 ml含血清、不含抗生素的正常培养基中, 于24 h内当细胞贴壁达40%~60%时进行转染, 在加入复合物前换用1 ml无血清、无抗生素的培养液后将脂质体复合体加到培养板中, 按转染试剂说明书分别予50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L的Chk1 siRNA进行转染。置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养6 h, 弃掉培养液, 加入新鲜的含血清、不含抗生素的正常培养液2.5 ml, 实验分为未转染组、脂质体组、阴性siRNA对照组和Chk1 siRNA转染组4组, 其中未转染组、脂质体组及阴性siRNA对照组作为对照。

1.4 MTT实验

分别收集MCF-7/adr未转染组、脂质体组、阴性siRNA对照组及Chk1 siRNA转染组细胞, 各组细胞以 5×10^4 /ml浓度接种至96孔板上, 每孔100 μ l, 阿霉素浓度按其血浆高峰浓度(0.4 mg/ml)的0倍、0.01倍、0.1倍、1倍、10倍、100倍加入每孔中, 每个浓度设3个复孔, 同时设只加培养液、不加细胞的空白对照孔调零, 分别于药物作用24 h后, 每孔加入20 μ l MTT, 37 $^{\circ}$ C孵育4 h, 离心去上清, 加入DMSO 200 μ l充分溶解MTT, 在分光光度计上于490 nm处测各组的吸光度(D)值, 按照公式: 细胞存活率=试验

组D值/对照组D值 $\times 100$, 计算细胞的增殖活性。

1.5 Western blot检测

阿霉素(0.4 mg/ml)作用24 h后, 细胞裂解, 收集蛋白质, Bradford法测定含量。蛋白变性后每孔上样30 μ l, 经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转移至PVDF膜上, 用含5%牛血清白蛋白的TBST(Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 137 mmol/L和0.1% Tween-20)室温封闭1 h, 用Chk1(1: 500)、 β -actin(1:1 000)4 $^{\circ}$ C过夜, TBST洗3次, 每次5 min, 加入相应的二抗(1:1 000)后室温孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次5 min, 化学发光剂检测, 并压片曝光。

1.6 细胞周期分析

收集阿霉素(0.4 mg/ml)作用24 h后上述各组细胞 1×10^6 个和未经药物处理的空白对照组, 以冰冻的PBS洗2次, 70%乙醇4 $^{\circ}$ C固定过夜, 离心去上清, PBS洗2次后, 加入0.3 ml 20 μ g/ml的PI(含0.2 mg/ml RNA酶)染色, 室温避光30 min, 用流式细胞仪FCM检测。Cell Quest分析软件进行细胞周期DNA含量分析, 确定细胞周期分布。

1.7 统计学分析

以上实验均重复3次, 应用SPSS12.0软件包分析实验数据, 所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各均值间的显著性检验采用F检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Chk1 siRNA对MCF-7/adr细胞Chk1蛋白表达的影响

Western blot分析(图1)各组细胞Chk1的蛋白表达显示。通过凝胶图像分析仪(Bio-Rad)扫描Chk1与 β -actin条带后, Quantity One软件分析未转染组、脂质体组、阴性siRNA对照组及siRNA转染组的灰度比值分别为 0.342 ± 0.11 , 0.598 ± 0.12 , 0.494 ± 0.13 , 0.199 ± 0.12 。可见Chk1在MCF-7/adr细胞内高表达, 转染siRNA后, Chk1蛋白表达水平下降了67%, 与未转染组、脂质体组及阴性siRNA对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 Chk1 siRNA对MCF-7/adr细胞增殖的影响

收集经阿霉素处理24 h后的各组细胞, 用MTT法检测细胞的增殖, 在阿霉素为血浆高峰浓度的0.01倍、0.1倍、100倍时, siRNA转染组细胞的增殖活性与空载体转染组相比无明显差异; 而在浓度为1倍、10倍时, siRNA转染组MCF-7/adr细胞的

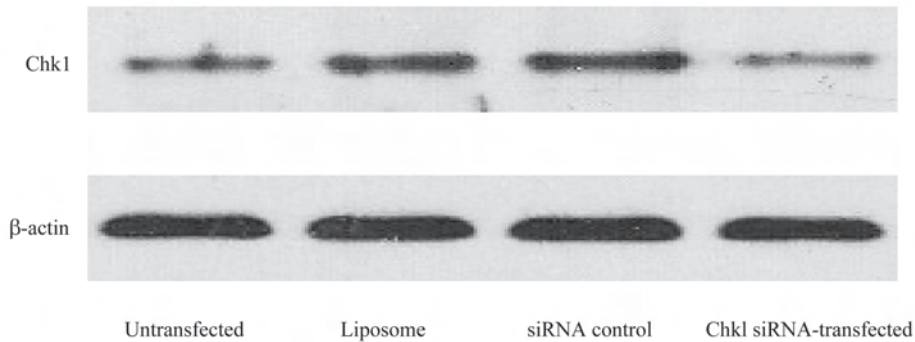


图1 不同处理组MCF-7/adr细胞Chk1蛋白表达的变化

Fig.1 Expression of Chk1 of MCF-7/adr cells in different groups

增殖活性分别由 (87.31 ± 1.43) 下降到 (76.55 ± 2.14) 、 (66.52 ± 2.01) 下降到 (43.64 ± 1.44) ($P < 0.05$)。提示在一定的药物浓度范围内, G_2/M 期阻滞的解除有利于增强化疗药物的细胞毒性作用。

2.3 Chk1 siRNA对MCF-7/adr细胞周期的分布及凋亡率的影响

如表1所示, 阿霉素作用24 h后, 转染siRNA的MCF-7/adr细胞 G_2/M 期的百分率为 $(15.61 \pm 0.14)\%$ 。而

siRNA阴性对照组、未转染组和脂质体组分别为 $(51.40 \pm 0.67)\%$ 、 $(53.95 \pm 1.03)\%$ 、 $(48.21 \pm 0.32)\%$, 可见siRNA转染组显著低于其它几组($P < 0.05$), 提示抑制Chk1的表达后, 其 G_2/M 期的阻滞现象减弱。且Chk1 siRNA转染组的凋亡率明显升高 $(22.24 \pm 0.13)\%$ 与siRNA阴性对照组 $(6.04 \pm 0.11)\%$ 、未转染组 $(5.54 \pm 0.15)\%$ 及脂质体组 $(8.81 \pm 0.11)\%$ 相比, 差异有显著性($P < 0.05$)。

表1 各组MCF-7/adr细胞在阿霉素(0.4 mg/ml)作用24 h后细胞周期分布($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Cell cycle distributions of MCF-7/adr cells at 24 h after being treated with adriamycin ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	G_0/G_1 期(%)	S期(%)	G_2/M 期(%)	Sub-G峰(%)
Groups	Phase G_0/G_1 (%)	Phase S(%)	Phase G_2/M (%)	Sub-G(%)
Negative control	10.97 ± 0.11	37.63 ± 0.23	51.40 ± 0.67	$6.04 \pm 0.11^*$
Untransfected	10.65 ± 0.12	35.40 ± 0.33	53.95 ± 1.03	$5.54 \pm 0.15^*$
Liposome-transfected	10.61 ± 0.11	41.10 ± 0.15	48.21 ± 0.32	$8.81 \pm 0.11^*$
Chk1 siRNA-transfected	31.19 ± 1.12	53.20 ± 1.43	15.61 ± 0.14	22.24 ± 0.13

*与Chk1 siRNA转染组比较, $P < 0.05$ 。

*Compared with Chk1 siRNA-transfected group, $P < 0.05$.

3 讨论

目前, 化疗仍然是治疗乳腺癌的重要手段, 尽管化疗方案的改进及新药的使用, 临床化疗效果越来越好, 但仍有部分患者在化疗前后对某些药物产生耐药性, 从而影响化疗效果。目前临床上常用抗肿瘤药物是DNA损伤剂, 如阿霉素等。它们所致的DNA损伤将激活周期检验点相关信号网络, 引起周期阻滞, 严重的损伤最终通过诱导凋亡等方式导致细胞死亡。然而, 如果DNA损伤不足以杀死细胞的话, 周期检验点则会诱导DNA损伤修复通路来对损伤进行修复, 从而影响DNA损伤药物的细胞毒性^[6,7]。随着对细胞周期检验点和DNA修复机制研究的深入,

以其关键蛋白为靶点的肿瘤治疗策略也越来越体现出其优势。

Chk1是一种进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶。当DNA复制受阻或损伤后, Chk1通过其上游的激酶分子(ATM、ATR)而被激活, 活化的Chk1通过磷酸化CDC25C(cell division cycle control1)而阻止CDC25C对Cdc2的去磷酸化作用, 从而抑制Cdc2-CyclinB的活性, 使细胞阻滞在 G_2/M 期, 供受损的DNA修复^[8]。Ganzinelli等^[9]发现用小干扰RNA靶向沉默Chk1后, 能够显著增强5-氟尿嘧啶对人结肠癌细胞HCT-116的抗肿瘤活性。同时, 将Chk1沉默的HCT-116细胞克隆在裸鼠种植成瘤后发现, 该移

植瘤对5-氟尿嘧啶的敏感性显著增加, 提示Chk1蛋白是一个增强化疗药物敏感性的有效的分子靶点。Xiao等^[10]也证实, 在外界损伤因素的作用下, 肿瘤细胞充分利用G₂/M期检测点的活化, 使G₂/M期的阻滞延长, 修复受损的DNA而获得耐药性, 而抑制Chk1的表达有可能成为逆转肿瘤细胞耐药的一个重要的治疗手段。

我们研究证实, MCF-7/adr细胞高表达Chk1, 与阿霉素共孵育24 h后观察到细胞出现明显的G₂/M期阻滞。而后我们应用RNA干扰技术观察了Chk1-siRNA转染对MCF-7/adr细胞Chk1表达的影响。通过Western blot检测, 我们发现将*Chk1*基因沉默后, 细胞中Chk1蛋白水平下降明显, 表明靶向Chk1 siRNA产生了序列特异性效果。在确保*Chk1*基因被有效沉默后, 本研究采取MTT法评价了*Chk1* siRNA干扰前后MCF-7/adr细胞增殖活性的变化。结果显示, 相比未转染组和脂质体转染组*Chk1* siRNA组细胞增殖活性明显下降, 生长受到抑制。这些发现提示一定水平的Chk1蛋白的表达是肿瘤细胞进行增殖活动所必需的。本研究还发现, *Chk1* siRNA对细胞周期产生了显著影响, 使阿霉素引起的G₂/M期阻滞被抑制, S期细胞增加; 此外, 抑制*Chk1*的表达导致损伤的DNA无法修复, 使MCF-7/adr细胞凋亡率明显增加, 增殖活性下降。由此可见, 活化的Chk1通过延迟细胞进入有丝分裂期而提高了耐药细胞株的增殖活性, 解除G₂/M期阻滞更有利于增强DNA损伤剂对耐药细胞的杀伤活性。

综上所述, 高表达*Chk1*可能是乳腺癌细胞阿霉素耐药的重要机制之一。靶向干扰*Chk1*可以降低耐阿霉素的人乳腺癌MCF-7/adr细胞的增殖活性, 解

除G₂/M期阻滞, 从而提高细胞对阿霉素的敏感性。Chk1在乳腺癌耐药中的作用将为化疗耐药乳腺癌病人的治疗提供一个新思路。

参考文献(References)

- 1 Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3): 188-200.
- 2 Kastan MB, Bartek J. Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432(7015): 316-23.
- 3 Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408(6811): 433-9.
- 4 Ashwell S, Zabludoff S. DNA damage detection and repair pathways-recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(13): 4032-7.
- 5 Janetka JW, Ashwell S. Checkpoint kinase inhibitors: A review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 2009; 19(2): 165-97.
- 6 Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Zhang H. Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: Implications for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(8): 1935-43.
- 7 ZhouBB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: Chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(3): 216-25.
- 8 Falck J, Mailand N, Svljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radio resistant DNA synthesis. *Nature* 2001; 410(6830): 842-7.
- 9 Ganzinelli M, Carrassa L, Crippa F, Tavecchio M, Brogini M, Damia G. Checkpoint kinase1 down-regulation by an inducible small interfering RNA expression system sensitized *in vivo* tumors to treatment with 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2008; 14(16): 5131-41.
- 10 Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H. A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 down-regulation. *Oncogene* 2005; 24: 1403-11.

Molecular Mechanisms of Adriamycin Hypersensitivity in Human Breast Carcinoma MCF-7/adr Cells by Targeting Silence of *Chkl*

Rong Quan*, Xiao-Pin Chen, Zhi-Rong Ran, Fang He, Biao Yang, Yin-Jing Zhao, Xiao-Qiong Yang

(Department of Tumor, General Hospital of Chongqing Steel and Iron Corporation, Chongqing 400081, China)

Abstract Our aim is to investigate effects on proliferation and cell cycle of human breast carcinoma MCF-7/adr cells resistant to adriamycin and explore the mechanisms of adriamycin hypersensitivity by targeting silence of *Chkl*. The siRNA targeting at *Chkl* gene was transfected into MCF-7/adr cells. The protein expression of Chkl was detected by Western blot. The MCF-7/adr cells were divided into three groups: untransfection, lipofectamine and *Chkl* siRNA-transfected group. After being treated with adriamycin, cell proliferation and cell cycle were determined by MTT assay and flow cytometry. The Chkl expression at protein levels in *Chkl* siRNA-transfected group was reduced by about 67% compared with untransfection, lipofectamine group ($P<0.05$). Inhibition of the Chkl expression in *Chkl* siRNA-transfected group significantly abrogated G₂/M arrest induced by adriamycin, and the proportion of the cells in G₂/M phase was lower than that in other two groups and increased cell apoptotic rates from (5.54±0.15)% to (22.24±0.13)% ($P<0.05$). After being Treated with 0.4 mg/L or 4 mg/L of adriamycin, cells-transfected proliferation rate was decreased by 13% or 34% respectively. siRNA targeting at *Chkl* gene can effectively inhibit the Chkl expression in MCF-7/adr cells, which enhanced the drug sensitivity of MCF-7/adr cells to adriamycin through blocking the signal transduction pathways of cell cycle checkpoint. So *Chkl* gene silence may provide a new target and an effective way against drug resistance of breast cells.

Key words breast carcinoma; drug-resistant; RNA interference; cell cycle; cell cycle checkpoint kinase 1

Received: December 3, 2010 Accepted: January 11, 2011

*Corresponding author. Tel: 86-23-68840712, E-mail: qr690318@sina.com