

· 论 著 ·

shRNA 沉默 TPX2 基因对肺腺癌细胞 A549 紫杉醇敏感性的影响

刘 莹,张 徽[△],唐 熹

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心/病理学教研室,重庆 400016)

摘要:目的 观察靶向 Xklp2 靶蛋白(TPX2)-短发夹状 RNA(shRNA)对肺腺癌 A549 细胞 TPX2 基因以及紫杉醇敏感性的影响。**方法** 将靶向 TPX2 基因的片段插入载体后构建重组质粒,经 Lipofectamine 2000 将其导入 A549 细胞,并进行筛选及克隆化培养。细胞分 3 组培养:(1)转染组;(2)阴性对照组;(3)空白对照组。反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白印迹法(Western Blot)分析转染前后 TPX2 基因的表达情况。MTT 法检测转染干扰载体后 A549 细胞对紫杉醇化疗的敏感性变化。RT-PCR 检测肺耐药蛋白(LRP)及多药耐药相关蛋白(MRP)mRNA 表达水平的变化。**结果** 与对照组相比,转染重组质粒后,TPX2 基因的表达明显降低,MTT 法显示转染 TPX2-shRNA 载体质粒的 A549 细胞对紫杉醇的敏感性明显增加;RT-PCR 检测相关基因显示,LRP、MRP mRNA 表达水平与空白对照组相比无明显改变($P>0.05$)。**结论** TPX2-shRNA 干扰载体能有效抑制肺腺癌细胞系 A549 中 TPX2 基因的表达,并增强其对化疗药物的敏感性。

关键词:TPX2 基因;短发夹 RNA;肺肿瘤;腺癌;药物敏感性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.05.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)05-0487-03

Effects of shRNA mediated down-regulation of TPX2 on sensitivity of A549 cells to paclitaxel

Liu Ying, Zhang Hui[△], Tang Xi

(Research Center of Molecular Medicine and Cancer/Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of short hairpin RNA (shRNA) targeted TPX2 on TPX2 gene expression and sensitivity of A549 cells to paclitaxel. **Methods** The DNA fragment targeting human TPX2 gene was inserted into the plasmid, and the recombinant plasmid was constructed. The recombinant plasmids were transfected into A549 cells by lipofectamine 2000 and G418 was selected and cloned. There were three groups; shRNA-TPX2 group, negative control group and blank control group. The levels of TPX2 were detected with RT-PCR and Western blot before and after transfection, respectively. The sensitivity of A549 cells to paclitaxel was detected by MTT after transfection. The levels of LRP and MRP mRNA were detected by RT-PCR. **Results** After TPX2-shRNA expression vector transfection, RT-PCR and Western-blot assays showed that there was a significant decrease in TPX2 mRNA and protein levels. TPX2-shRNA enhanced the sensitivity of A549 cells to paclitaxel. But there was no effect on the levels of LRP and MRP mRNA. **Conclusion** TPX2-shRNA expression vector can significantly suppress TPX2 expression and enhances the sensitivity of A549 cells to chemotherapeutics.

Key words: targeting protein for Xklp2; short hairpin RNA; lung neoplasms; adenocarcinoma; drug sensitivity

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,由于缺乏有效的早期诊断手段使其发病率和死亡率一直呈明显上升趋势,严重威胁人的健康和生命。近年来有丝分裂相关基因表达的异常与肿瘤发生发展的关系成为研究的热点,Xklp2 靶蛋白(TPX2)基因在许多恶性肿瘤中都存在过表达状态,包括乳腺癌、唾液腺癌、肺鳞状细胞癌等^[1-3],成为受到广泛关注的候选癌基因。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和试剂 稳定表达 TPX2-短发夹状 RNA(shRNA)的人肺腺癌 A549 细胞,及未经处理的 A549 细胞为本实验室保存;RPMI 1640 培养液(美国 Hyclone 公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);MTT(美国 Sigma 公司);紫杉醇(上海生工有限公司);逆转录试剂盒与 DNA-Marker(日本 Takara 公司);PCR 引物由上海赛百盛生物技术责任有限公司合成。

1.2 细胞培养 细胞分 3 组培养:(1)稳定表达 TPX2 干扰载体的 A549 细胞,即转染组;(2)稳定表达空白质粒的 A549 细

胞,即阴性对照组;(3)未经任何处理的 A549 细胞,即空白对照组。RPMI 1640 培养基中含 10%新生牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,pH 调至 7.4,置于 37℃,5%CO₂,饱和湿度孵箱内培养,根据细胞生长状况,每 2 天换液 1 次,每 4 天传代。

1.3 MTT 法测定紫杉醇对 A549 细胞的细胞毒性作用 取对数生长期未经处理 A549 细胞,制备 1×10⁴ 个/毫升的单细胞悬液,200 毫升/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 贴壁细胞融合度达到 70%左右后加入不同浓度的紫杉醇(2×10⁻⁶、3×10⁻⁶、4×10⁻⁶、5×10⁻⁶、6×10⁻⁶、7×10⁻⁶ mol/L),继续作用 24 h 后去除原培养液,每孔加入新鲜配制的 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,37℃条件下作用 4 h,弃上清液,加入 150 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO),振荡处理 10 min 使结晶充分溶解,置于酶标仪波长 490 nm 处读取吸光度(A)值。每组设 5 个复孔,并设不加药组为对照组,实验重复 3 次,取平均值。细胞抑制率(%)=(1-A_{紫杉醇组}/A_{空白组})×100%。并计算

IC₅₀ 值进行后续实验。

1.4 MTT 法测定 TPX2-shRNA 对 A549 细胞紫杉醇敏感性的影响 取对数生长期细胞,制备 1×10⁴ 个/毫升的单细胞悬液,200 毫升/孔接种于 96 孔板中,分为以下组别。I:空白对照组;II:转染组;III:紫杉醇组;IV:转染+紫杉醇组,接种 24 h 后 IV 组在换液时加入浓度为 IC₅₀ 的紫杉醇,余步骤同 1.3。

1.5 RT-PCR 检测相关基因 LRP 和 MRP mRNA 表达水平 Trizol 法提取各组总 RNA,逆转录为 cDNA 后进行 RT-PCR。LRP 引物序列:上游:5'-CCC CCA TAC CAC TAT ATC CAT GTG-3';下游:5'-TCG AAA AGC CAC TGA TCT CCT G-3';MRP 引物序列:上游:5'-CCC CAG AGC TGG CAT ATC T-3';下游:5'-CTC TCC TGG GTC TTC ACA GC-3'。LRP 反应条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,61 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 循环 30 次,72 ℃ 10 min 4 ℃ 保存,产物大小为 405 bp。MRP 反应条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,61 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 循环 30 次,72 ℃ 10 min 4 ℃ 保存,产物大小为 200 bp。扩增后用 20 g/L 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳(100 V, 25 min)。

1.6 统计学处理 本实验采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(*F* 检验),组间两两比较采用 SNK-*q* 方法。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 紫杉醇对 A549 细胞生长的抑制作用 不同浓度的紫杉醇作用 A549 细胞 24 h 后,经 MTT 法检测分析,细胞生长抑制率分别为(13.70±1.56)%、(20.58±4.25)%、(39.45±2.20)%、(54.94±2.35)%、(79.63±5.00)%、(83.20±4.01)%。见图 1。在此范围内,紫杉醇的浓度与 A549 细胞生长抑制率随药物浓度的增加而增大,呈正相关,经相关系数显著性检验,差异有统计学意义(*P* = 0.000, *F* = 222.54),其 IC₅₀ 值为(4.98±0.10)×10⁻⁶ mol/L。

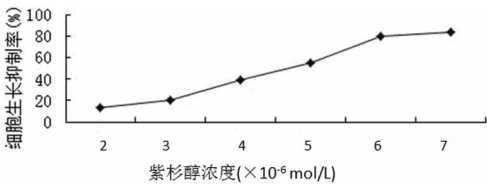


图 1 不同浓度的紫杉醇对 A549 细胞生长的抑制作用

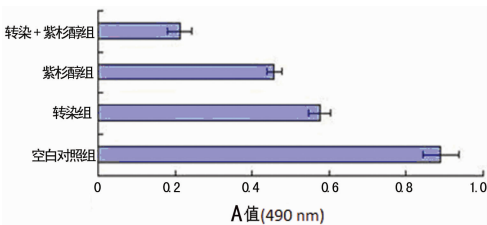
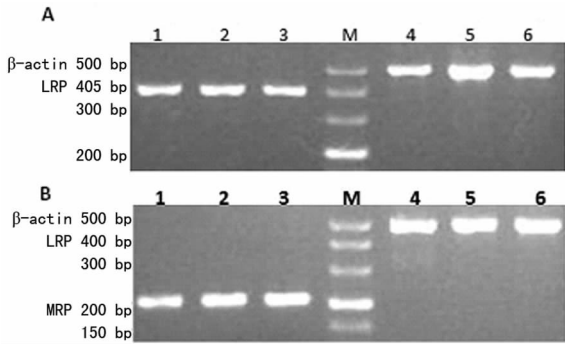


图 2 紫杉醇与 TPX2-shRNA 联合应用对 A549 细胞生长的作用

2.2 TPX2-shRNA 对 A549 细胞紫杉醇敏感性的影响 MTT 法分析显示 TPX2-shRNA 转染和紫杉醇联合应用,细胞生长抑制率为(76.31±3.20)%,优于两者单用时的抑制率(35.27±3.51)%及(48.44±4.88)%,与空白对照组、紫杉醇组和转染组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05, *F* = 259.945)。

见图 2。说明 TPX2-shRNA 能加强紫杉醇对体外培养的肺腺癌细胞 A549 的增殖抑制作用,TPX2 基因被抑制可以增强 A549 对化疗药物的敏感性。



A:LRP mRNA 表达水平;B:MRP mRNA 表达水平;1:空白对照组;2:转染组;3:阴性对照组;4~6:β-actin;M:DL 500 DNA 标记。

图 3 shRNA-TPX2 对 A549 细胞中 LRP 及 MRP mRNA 表达的影响

2.3 shRNA-TPX2 对相关基因 LRP 和 MRP mRNA 表达水平的影响 结果显示,转染组 LRP 和 MRP mRNA 表达水平较空白对照组和阴性对照组差异无统计学意义(*P* > 0.05)。抑制 TPX2 基因表达后并不会对肺腺癌相关耐药基因产生影响。见图 3、表 1。

表 1 不同组 A549 细胞中 LRP 和 MRP mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$, %)

组别	<i>n</i>	LRP	MRP
空白对照组	3	0.65±0.08	0.60±0.07
转染组	3	0.66±0.05	0.78±0.10
阳性对照组	3	0.64±0.06	0.75±0.12

3 讨 论

真核细胞的生长受到细胞周期的严格调控,细胞有丝分裂的错误,不但将会影响细胞的增殖,分化的正确进行,甚至会导致肿瘤的发生。近年来国内外研究证实,一些与细胞有丝分裂纺锤体形成和细胞周期检查点调节有关的基因表达和功能出现异常,会导致中心体扩增,染色体异常分离和非整倍体产生,导致基因组不稳定从而导致细胞恶性转化^[4]。

有丝分裂过程中,纺锤体的组装和染色体的分离都要依赖许多微管动力蛋白的作用,小的三磷酸苷 Ran(RanGTP)在纺锤体装配的过程中起到了关键作用,TPX2 是 Ran 最具有特征性的靶蛋白,其在细胞有丝分裂过程中的作用得到了越来越多的关注^[5-6]。TPX2 是一种核增殖相关蛋白,相对分子质量 100×10³,位于人类染色体 20q11.2,在有丝分裂纺锤体形成中发挥核心作用,其表达受细胞周期的严格调控^[7]。

TPX2 的异常表达可能抑制正常核分裂的完成及干扰 TPX2 激活的生理途径,可能在癌变和恶性肿瘤进展中发挥作用。此外在有丝分裂期,TPX2 与其下游基因相互作用,包括丝氨酸/苏氨酸激酶 Aurora-A,导致后者定位于有丝分裂纺锤体的微管,从而促进微管装配, Aurora-A/TPX2 相互关系的破坏将导致纺锤体组装错误,染色体异常而导致肿瘤的发生^[8]。

化疗是包括肺癌在内的多种恶性肿瘤综合治疗的重要组

成部分,然而化疗药物的毒副作用和肺癌细胞对抗癌药物产生多药耐药性(MDR)是肺癌尤其是非小细胞肺癌化疗失败的主要原因,因此逆转肿瘤细胞的多药耐药性成为迫切需要解决的问题。LRP 及 MRP 基因是近年来发现的肿瘤耐药相关基因,在非小细胞肺癌中有较高的表达率,被认为与肺癌的多药耐药密切相关。

在胰腺癌细胞中,Steven 等^[9]研究发现,利用小分子干扰 RNA(Small interfering RNA, siRNA)技术沉默 TPX2 表达,可以增强胰腺癌细胞对紫杉醇的敏感性。Hata 等^[10]研究表明, RNAi 沉默 Aurora-A 的表达能明显抑制体内外胰腺癌细胞的生长,增强对紫杉烷类化疗药物的敏感性。孟睿等^[11]在肺癌细胞的研究中亦有相似结论。并分析认为,耐药性的产生是由于 Aurora-A 基因的过表达导致纺锤体活性被削弱,细胞 G₂/M 检查点的功能被破坏有关,抑制 Aurora-A 的表达可以恢复纺锤体的活性和 G₂/M 检查点的功能从而逆转耐药性。本实验结果亦表明,抑制 TPX2 表达可以增强肺腺癌 A549 细胞对紫杉醇的敏感性,但是,细胞并未如上述文献报道阻滞在 G₂/M 期,两种与肺腺癌密切相关的耐药基因 LRP、MRP 的表达水平亦未发生变化,考虑抑制 TPX2 表达后还可能通过其他机制增强其耐药性。

研究表明,肿瘤耐药与多种机制有关,肿瘤细胞抗凋亡机制增强是肿瘤耐药的重要机制之一。在恶性肿瘤中,凋亡抑制基因的过度表达不但导致凋亡抑制,并和化疗耐药密切相关。Bcl-2 是经典的凋亡抑制基因,具有多种生物学功能,不但可以抑制细胞凋亡,同时还是一个独立的耐药基因,在恶性肿瘤中高表达导致化疗敏感性降低^[12-13]。Bcl-2 蛋白使肿瘤细胞对多种化疗药物产生耐药,如氟尿嘧啶、环磷酰胺、紫杉醇等。抗肿瘤药物通过激活内源性机制诱发凋亡而达到杀伤肿瘤细胞的目的,而 Bcl-2 的过表达可以干扰此过程,使肿瘤细胞凋亡受阻,细胞过多堆积而导致耐药的产生^[14]。许多研究均证实,Bcl-2 与恶性肿瘤的耐药性密切相关,下调 Bcl-2 基因的表达不但促进肿瘤细胞凋亡,并可以增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性,从而提高肿瘤治疗效果。在本实验前期研究中已经证实,抑制 TPX2 表达可以导致 Bcl-2 的表达降低,考虑这可能是导致细胞对化疗药物敏感性增强的原因之一^[15]。

近年来包括 TPX2 在内的一些与细胞有丝分裂纺锤体形成,细胞周期检查点调节有关的基因成为研究热点,与肿瘤细胞多种生物学功能密切相关,且对化疗药物紫杉醇有显著增敏作用,可使其在不增加剂量和毒副作用的情况下增加疗效有望成为新的诊断和治疗靶点,有待进一步多方面进行研究。

参考文献:

[1] Lin DM, Ma Y, Xiao T, et al. TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2006, 35(9): 540-544.
[2] Shigeishi H, Ohta K, Hiraoka M, et al. Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas[J]. Oncol Rep, 2009,

21(2): 341-344.

[3] 张惠球,沈浩贤,刘奕生. TPX2 蛋白在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 中国医药指南, 2010, 8(11): 27-28.
[4] Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death[J]. Cancer Cell, 2005, 8(1): 7-12.
[5] Wittmann T, Wilm M, Karsenti E, et al. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization[J]. J Cell Biol, 2000, 149(7): 1405-1418.
[6] Di Fiore B, Ciciarello M, Lavia P. Mitotic functions of the Ran GTPase network; the importance of being in the right place at the right time[J]. Cell Cycle, 2004, 3(3): 305-313.
[7] Kufer TA, Sillje HH, Korner R, et al. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle[J]. J Cell Biol, 2002, 158(4): 617-623.
[8] Bibby RA, Tang C, Faisal A, et al. A cancer-associated aurora a mutant is mislocalized and misregulated due to loss of interaction with TPX2[J]. J Biol Chem, 2009, 284(48): 33177-33184.
[9] Steven L, Warner BJ, Stephens, SN, et al. Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(230): 6519-6528.
[10] Hata T, Furukawa T, Sunamura M, et al. RNA interference targeting aurora kinase a suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(7): 2899-2905.
[11] 孟睿,伍钢,张涛,等. Aurora A 反义寡核苷酸联合紫杉醇对体外肺癌细胞的作用及其机制[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(12): 896-900.
[12] Armstrong RC, Aja T, Xiang J, et al. Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors[J]. Biol Chem, 1996, 271(28): 16850-16855.
[13] Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. IUBMB Life, 2008, 60(6): 390-397.
[14] 张慧,王英红,潘晓琳,等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)联合低剂量顺铂诱导多药耐药人卵巢癌细胞凋亡的实验研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2005, 23(5): 545-550.
[15] 刘莹,张徽,唐熹. 短发夹 RNA 靶向沉默 TPX2 基因促进人肺腺癌 A549 细胞凋亡及其相关机制[J]. 肿瘤, 2011, 31(12): 1055-1060.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-10-31)