

## 死亡结构域相关蛋白对卵巢癌细胞周期及化疗影响的研究

伦巍巍, 王俊耐

(郑州大学第三附属医院妇产科 450015)

**[摘要]** **目的** 探索在卵巢癌细胞中下调死亡结构域相关蛋白(Daxx)后对其细胞周期及化疗耐药的影响。**方法** 转染卵巢癌细胞株 C13k 后分为阴性对照组(NC 组)和下调 Daxx 组(siDaxx 组)。设立多柔比星药物浓度梯度 0、0.15、0.30、0.60  $\mu\text{mol/L}$ , 流式细胞仪检测上述两组细胞周期变化。Western blot 从蛋白水平检测细胞周期及凋亡相关蛋白 cyclinB1、cleaved-parp 的表达变化。流式细胞仪检测上述两组细胞凋亡的变化。**结果** 在多柔比星 0.30  $\mu\text{mol/L}$  时, 下调 Daxx 蛋白使细胞发生明显的 G2/M 期阻滞, 与 NC 组比较, siDaxx 组 G2/M 期细胞百分比明显增高( $P < 0.05$ )。下调 Daxx 蛋白使细胞对多柔比星化疗耐药。**结论** Daxx 对卵巢癌化疗的影响可能与 Daxx 对细胞周期的调控作用有关。

**[关键词]** Fas 相关死亡结构域蛋白质; 卵巢肿瘤; 细胞周期; cyclinB1

**[中图分类号]** R711.75

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)01-0017-03

## Study on influence of Daxx on cell cycle and chemotherapy in human ovarian cancer cells

LUN Weiwei, WANG Junnai

(Department of Gynaecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450015, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the influence of down-regulating Daxx on cell cycle and chemotherapeutic drug resistance in human ovarian cancer cells. **Methods** SiRNA and NC negative control(NC) RNA of Daxx were constructed and divided into the NC group and silencing Daxx(siDaxx) group after transfecting to ovarian cancer cell line C13k. The doxorubicin concentration gradient of 0, 0.15, 0.30, 0.60  $\mu\text{mol/L}$  was set. The cellular cycle changes and apoptosis changes of these two groups were detected by using the flow cytometry. Western blot was used to detect the expression changes of apoptosis related protein cyclinB1 and cleaved-parp. **Results** 0.30  $\mu\text{mol/L}$  doxorubicin down-regulated Daxx to result in significant G2/M arrest( $P < 0.05$ ). Down-regulating Daxx resulted in doxorubicin resistance in C13k cells. **Conclusion** The effect of Daxx on ovarian cancer chemotherapy might be related to its regulation on cell cycle.

**[Key words]** Fas-associated death domain protein; ovarian neoplasms; cell cycle; cyclinB1

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 化疗耐药一直是卵巢癌治疗中的一大难题<sup>[1]</sup>, 研究其耐药机制是解决这一难题的关键。死亡结构域相关蛋白(death domain associate protein, Daxx)于 1997 年在 Cell 杂志上首次以 Fas 死亡相关蛋白发表<sup>[2]</sup>, 但其对细胞凋亡的影响一直备受争议<sup>[3-4]</sup>。有学者提出 Daxx 参与 Fas 凋亡通路的调控而发挥促细胞凋亡的作用; 而有大量研究证明, 在人的正常细胞或者结肠癌细胞中, Daxx 通过抑制凋亡基因的转录而最终发挥抗细胞凋亡的作用<sup>[5]</sup>。已有研究表明 Daxx 基因在卵巢癌中普遍高表达<sup>[6]</sup>。本实验目的在于明确 Daxx 对卵巢癌化疗的影响, 从而进一步明确其耐药机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 化疗药多柔比星购自美国 Sigma 公司(货号 CAS25316-40-9), 实验所用卵巢癌细胞株 C13k 购自 ATCC 细胞库。抗体 cyclinB1 及抗体 cleaved-parp 购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号分别为 55004-1-AP、13371-1-AP), 抗体 Daxx 及抗体 actin 购自博士德生物工程有限公司(货号分别为 PB0580、BM0005)。流式细胞仪购自美国 Thermo 公司(型号 ABI17500)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组** 卵巢癌耐药细胞 C13k 转染后分为阴性对照组(NC 组)和下调 Daxx 组(siDaxx 组)。

**1.2.2 流式仪对细胞周期的检测** C13k 细胞用胰酶消化后

接种于 12 孔板, 接种第 2 天加化疗药多柔比星处理细胞。上述两组细胞药物浓度梯度均为 0、0.15、0.30、0.60  $\mu\text{mol/L}$ 。培养基均为 1.5 mL。药物作用 24 h 后, 胰酶消化细胞, 1 200 r/min 离心 5 min, 细胞用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 1 遍, 用 70% 冰乙醇固定细胞, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  过夜。第 2 天从 -20  $^{\circ}\text{C}$  取出细胞, 1 200 r/min 离心 5 min, 再用预冷的 PBS 洗 1 遍, 用 10 倍浓度的碘化丙啶(PI)及 100 倍浓度的 RNA 酶(RNAase)各 300  $\mu\text{L}$  避光染色细胞 30 min, 转流式管上机分析细胞周期变化。

**1.2.3 流式仪对细胞凋亡的检测** 0、0.30  $\mu\text{mol/L}$  的多柔比星处理上述两组细胞 24 h 后, 胰酶消化两组细胞, 800 r/min 离心 5 min, PBS 轻柔漂洗 1 次, 800 r/min 离心 5 min 收集细胞; 向收集管中加入 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液(Binding Buffer), 轻轻摇晃, 使细胞悬浮; 向每个收集管中加入 5  $\mu\text{L}$  的异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V(Annexin V-FITC), 轻轻混匀, 然后再加入 5  $\mu\text{L}$  PI, 摇晃, 使其充分混匀; 于室温下避光放置, 使细胞和上述试剂充分反应 5~15 min; 避光, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 于 1 h 内进行流式细胞仪检测。

**1.2.4 Western blot** C13k 细胞接种于 12 孔板, 第 2 天用 0.30  $\mu\text{mol/L}$  药物梯度处理细胞 48 h 后。胰酶消化细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 再用 PBS 洗涤细胞 1 次。用 RIPA 裂解细胞提取蛋白, 30  $\mu\text{g}$  上样量行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳。牛奶封闭 1 h, 封一抗 cyclinB1、cleaved-parp 及

内参蛋白 GAPDH, 4 °C 过夜; 第 2 天封抗兔及抗鼠二抗, TBST 洗涤 2 h 后, 曝光仪曝光。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用方差分析及 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 检测 siRNA 的干扰效应** 向 C13k 细胞中转入 siRNA 后, 在未经化疗药处理和经化疗药处理后的 Daxx 表达水平均明显降低, 见图 1。

**2.2 流式细胞仪检测两组细胞周期的变化** 两组细胞的周期对比, 在多柔比星 0.30  $\mu\text{mol/L}$  时, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), NC 组和 siDaxx 组在不加药时, 均阻滞于 G1 期; 加多

柔比星化疗药后, 相比与 NC 组, siDaxx 组的 G2/M 期细胞百分比明显增高, 见表 1。

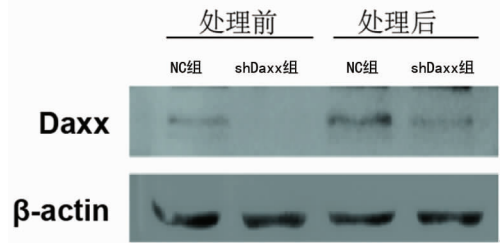


图 1 未加及加后, siRNA 的干扰效应

表 1 不同浓度的多柔比星作用下 NC 组及 siDaxx 组各细胞周期所占比例分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 ( $\mu\text{mol/L}$ )	G1 期		<i>P</i>	S 期		<i>P</i>	G2/M 期		<i>P</i>
	NC 组	siDaxx 组		NC 组	siDaxx 组		NC 组	siDaxx 组	
0	76.51 $\pm$ 8.18	78.33 $\pm$ 7.13	>0.05	18.23 $\pm$ 2.54	19.51 $\pm$ 3.10	>0.05	8.22 $\pm$ 1.13	9.01 $\pm$ 0.97	>0.05
0.15	64.32 $\pm$ 6.65	68.34 $\pm$ 9.43	>0.05	21.23 $\pm$ 3.12	23.43 $\pm$ 4.13	>0.05	17.54 $\pm$ 4.71	15.44 $\pm$ 5.13	>0.05
0.30	40.64 $\pm$ 7.32	33.87 $\pm$ 8.75	>0.05	35.51 $\pm$ 6.43	28.33 $\pm$ 5.18	>0.05	23.35 $\pm$ 6.88	43.10 $\pm$ 8.22	<0.05
0.60	29.54 $\pm$ 4.23	31.22 $\pm$ 5.74	>0.05	32.55 $\pm$ 6.77	37.49 $\pm$ 7.83	>0.05	36.98 $\pm$ 8.32	33.91 $\pm$ 5.62	>0.05

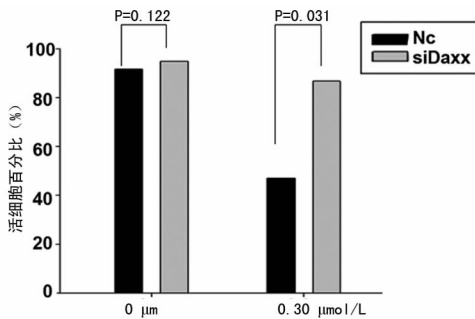


图 2 未加与加 0.30  $\mu\text{mol/L}$  化疗药处理后两组的细胞死亡率比较

**2.3 流式细胞仪检测两组细胞的凋亡比较** 不加药时两组凋亡率差异无统计学意义 ( $P = 0.122$ ), 多柔比星 (0.3  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用时 NC 组的凋亡率高于 siDaxx 组 ( $P = 0.031$ ), 见图 2。

**2.4 Western blot 检测 cyclinB1、cleaved-parp 的表达** siDaxx 组细胞在化疗药多柔比星作用后, cyclinB1 表达水平降低, 细胞阻滞于 G2/M 期, 受损的细胞 DAN 发生损伤修复, 细胞凋亡率降低; NC 组受损伤的 DNA 跳过 G2/M 期检测位点, 损伤没有得到修复, 细胞凋亡率高, 见图 3。

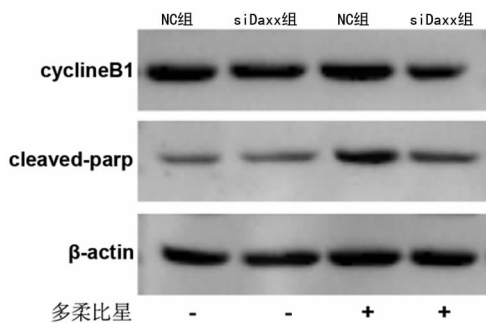


图 3 化疗药处理后 cyclinB1 及 cleaved-parp 在两组的表达

## 3 讨论

很多化疗药发生耐药是由于肿瘤细胞 DNA 受损后, 通过某些机制使细胞周期停滞, 使受损的细胞 DNA 在停滞期得到有效的损伤修复<sup>[7]</sup>, 从而使癌细胞逃过化疗致 DNA 损伤的杀伤作用。

Daxx 作为一种保守的多功能蛋白, 通过蛋白与蛋白的相互作用或者转录调控下游基因的表达, 与肿瘤细胞凋亡关系密切<sup>[8-9]</sup>。有研究发现 Daxx 与 p53 结合后通过抑制 p53 对下游基因的转录调控作用, 使周期相关蛋白 (如 p21、CDKs 等) 表达下调, 受损的 DAN 不能修复而使细胞发生凋亡<sup>[10]</sup>; 在人结肠癌细胞、肝癌细胞中, Daxx 通过转录调控有丝分裂检测位点的表达, 参与癌细胞凋亡<sup>[11]</sup>; 在卵巢癌中, 过表达 Daxx 能够促进卵巢癌的进展, 使癌细胞发生化疗耐药, 这一机制可能与 Daxx 转录调控相关周期蛋白表达, 使细胞周期停滞、损伤的 DNA 得以修复, 从而使癌细胞逃过化疗的杀伤产生耐药有关<sup>[12]</sup>。本实验中, 在卵巢癌耐药细胞株 C13k 中, 利用 siRNA 降低 Daxx 蛋白的表达后, 能使 C13k 细胞对多柔比星发生化疗耐药。进一步对这一现象的机制进行探讨, 笔者发现在 0.30  $\mu\text{mol/L}$  的多柔比星作用时, siDaxx 组细胞中 G2/M 期调控蛋白 cyclinB1 表达水平下降, 使 C13k 细胞在 G2/M 期发生周期阻滞, 化疗药作用下损伤的 DNA 在这一时期得到有效的损伤修复, DNA 损伤标志性蛋白 cleaved-parp 表达水平下降, 从而对多柔比星的耐药性增加, 而这一现象与之前的研究<sup>[12]</sup> 相反。在本实验中, 增加多柔比星的药物浓度至 0.60  $\mu\text{mol/L}$  时, siDaxx 组的 G2/M 期的阻滞作用消失, G1 期细胞增加, 细胞周期有继续进展的趋势。

Daxx 作为一种多功能蛋白参与转录调控及 Fas 信号通路促进细胞凋亡, 并作为细胞核蛋白参与染色体的稳定作用等<sup>[13-15]</sup>。本实验中在卵巢癌耐药细胞系 C13k 细胞中下调 Daxx 表达后, 细胞对多柔比星的耐药性增加。寻找使 Daxx 表达上调的方式, 可能使耐药细胞株 C13k 对多柔比星化疗增敏, 这为卵巢癌化疗耐药的机制研究及临床治疗提供了一个新

的靶点。

## 参考文献

- [1] 李霞. miRNA 在卵巢癌化疗耐药中的作用[J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(12): 842-844, 847.
- [2] 吕磊, 刘志强, 李丽, 等. 卵巢癌耐药细胞株的比较蛋白质组分析[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(4): 635-637.
- [3] TANG J, PANG Q M, YANG X. Daxx is reciprocally regulated by Mdm2 and Hausp[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(3): 542-545.
- [4] RUSSETSKAYA N V, LUKYANOVA N Y, CHEKHUN V F. chekhun, molecular profile and cell cycle in mcf-7 and mcf-7/dox cells exposed to conventional and liposomal forms of doxorubicin[J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(3): 140-143.
- [5] CORPET A, OLBRICH T, GWERDER M, et al. Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(2): 249-267.
- [6] WAN Y P, WU Y M, ZHU C M, et al. Transcriptional repression of hDaxx enhanced by adenovirus 12 E1B 55kDa oncoprotein interacting with hDaxx [J]. *Chin Med J*, 2004, 117(5): 753-757.
- [7] LI Q, ZHAO L Y, ZHENG Z, et al. Inhibition of p53 by adenovirus type 12 E1B-55K deregulates cell cycle control and sensitizes tumor cells to genotoxic agents[J]. *J Virol*, 2011, 85(16): 7976-7988.
- [8] CHAUHAN S C, VANNATTA K, EBELING M C, et al. Expression and functions of transmembrane mucin

MUC13 in ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 765-774.

- [9] 胡坤. 死亡结构域相关蛋白的研究进展[J]. 徐州医学院学报, 2015, 35(5): 343-346.
- [10] GOSTISSA M L, MORELLI M, MANTOVANI F, et al. The Transcriptional Repressor hDaxx Potentiates p53-dependent Apoptosis[J]. *JBC*, 2004, 279(46): 48013-48023.
- [11] GIOVINAZZI S L, Morozov V M, SUMMERS M K, et al. USP7 and Daxx regulate mitosis progression and taxane sensitivity by affecting stability of Aurora-A kinase [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(5): 721-731.
- [12] PAN W W, ZHOU J J, LIU X M, et al. Death domain-associated protein DAXX promotes ovarian cancer development and chemoresistance [J]. *J Bio Chem*, 2013, 288(19): 13620-13630.
- [13] YANG X, KHOSRAVI FAR R, CHANG H Y, et al. Daxx, a novel Fas binding protein that activates JNK and apoptosis[J]. *Cell*, 1998, 89(7): 1067-1076.
- [14] ALI A Y, ABEDINI M R, TSANG B K. The oncogenic phosphatase PPM1D confers cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells by attenuating checkpoint kinase 1 and p53 activation[J]. *Oncogene*, 2012, 31(17): 2175-2186.
- [15] MARINONI I, KURRER A S, VASSELLA E, et al. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(2): 453.

(收稿日期: 2017-06-28 修回日期: 2017-09-06)

(上接第 16 页)

- et al. Discovery and Longitudinal Evaluation of Candidate Protein Biomarkers for Disease Recurrence in Prostate Cancer[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(7): 2769-2783.
- [2] OH J J, PARK S, LEE S E, et al. Genome-wide detection of allelic genetic variation to predict advanced-stage prostate cancer after radical prostatectomy using an exome SNP chip [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(8): 1493-1501.
- [3] MERTENS K, SLAETS D, LAMBERT B, et al. PET with <sup>18</sup>F-labelled choline-based tracers for tumour imaging: a review of the literature[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37(11): 2188-2193.
- [4] KITAJIMA K, MURPHY R C, NATHAN M A, et al. Update on positron emission tomography for imaging of prostate cancer[J]. *Int J Urol*, 2014, 21(1): 12-23.
- [5] PONDE D E, DENCE C S, OYAMA N, et al. <sup>18</sup>F-fluoroacetate: a potential acetate analog for prostate tumor imaging--in vivo evaluation of <sup>18</sup>F-fluoroacetate versus <sup>11</sup>C-acetate[J]. *J Nucl Med*, 2007, 48(3): 420-428.
- [6] PILLARSETTY N, PUNZALAN B, LARSON S M. 2-<sup>18</sup>F-Fluoropropionic acid as a PET imaging agent for prostate cancer[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(10): 1709-1714.
- [7] CHANDLER R J, ASWANI V, TSAI M S, et al. Propionyl-CoA and adenosylcobalamin metabolism in *Caenorhabditis elegans*: evidence for a role of methylmalonyl-CoA

epimerase in intermediary metabolism [J]. *Mol Genet Metab*, 2006, 89(1): 64-73.

- [8] MANSOUR M, SCHWARTZ D, JUDD R, et al. Thiazolidinediones/PPAR $\gamma$  agonists and fatty acid synthase inhibitors as an experimental combination therapy for prostate cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(2): 537-546.
- [9] CURRIE E, SCHULZE A, ZECHNER R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(2): 153-161.
- [10] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. *Nature*, 2013, 504(7480): 446-450.
- [11] 党永红, 蔡炯, 李欣, 等. <sup>18</sup>F-FPA 在荷乳腺癌小鼠模型中的显像性能和体内分布[J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(3): 320-324.
- [12] 党永红, 蔡炯, 李欣, 等. Lewis 肺癌小鼠 2-<sup>18</sup>F-氟丙酸 microPET 显像[J]. 中华核医学与分子影像学杂志, 2016, 36(2): 180-183.
- [13] SCHNADING I D, BEER T M. Optimal timing of chemotherapy in androgen independent prostate cancer[J]. *Urol Oncol*, 2009, 27(1): 97-100.

(收稿日期: 2017-07-04 修回日期: 2017-09-10)