

蛋白酶体抑制剂 MG132 对卵巢癌紫杉醇耐药的逆转作用

The Reverse Effect of Proteasome inhibitor MG132 on Paclitaxel Resistance in Patients with Ovarian Cancer // YANG Ting, ZHU Ya-ping, WEI Ya-nan, et al.

杨 婷, 祝亚平, 魏桢楠, 冯怡雯, 祁 澜

(上海交通大学附属上海市第一人民医院, 上海 200080)

摘 要: [目的] 探讨蛋白酶体抑制剂 MG132 对卵巢癌紫杉醇耐药细胞株的作用及其逆转耐药的作用。[方法] 采用 MTT 法、TUNEL 法检测 MG132 及紫杉醇作用于卵巢癌细胞株 SKOV-3 及卵巢癌紫杉醇耐药细胞株 SKOV-3/TAX 后细胞存活及凋亡的情况, 并应用半定量 RT-PCR 方法检测凋亡相关基因 *p53*、*Bcl-2* 表达的变化。[结果] $2\mu\text{g/ml}$ 的紫杉醇作用于 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞 24h 后细胞的存活率分别为 41% 及 91%, 作用 48h 后两种细胞的存活率分别为 45% 及 85%; 而 $2\mu\text{g/ml}$ 的紫杉醇与 $10\mu\text{mol/L}$ 的 MG132 联合作用 24h 后两种细胞的存活率分别为 42% 及 48%, 48h 后分别为 44% 和 27%。TUNEL 法检测显示 MG132 及 MG132 与紫杉醇联合用药后 SKOV-3 及 SKOV-3 细胞均有明显的细胞凋亡产生。RT-PCR 显示, *p53* 在紫杉醇作用于 SKOV-3 细胞后表达上调, MG132 作用后则表达下调, 而在 SKOV-3/TAX 细胞中未见明显表达, *Bcl-2* 在 SKOV-3/TAX 中表达明显, 经 MG132 作用后表达明显下调, 而在对照组 SKOV-3 细胞中, 未见明显表达, 而加入紫杉醇及 MG132 后则表达明显上调。[结论] MG132 能够显著抑制 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞的增殖活性, 并且能够逆转卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药性。

主题词: MG132; 蛋白酶体抑制剂; 卵巢癌; 耐药

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)05-0353-04

肿瘤细胞灭活术联合铂类和紫杉醇化疗, 是目前卵巢癌患者的标准治疗方案, 但后续化疗产生的获得性耐药常常导致化疗失败。近年来研究发现, 凋亡通路受阻是多药耐药的重要机制之一, 而泛素—蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 作为细胞内特异性降解蛋白质的重要途径, 在真核细胞的转录、蛋白质降解与稳定、受体胞吞、细胞凋亡和应激反应等过程中均参与重要的调节作用^[1,2], 因而对凋亡通路具有重要的调节作用。多项研究显示蛋白酶体抑制剂可抑制多种肿瘤细胞包括卵巢癌细胞^[3]的生长并诱导其凋亡, 与化疗药联用可能有协同作用, 而其与铂类联用对卵巢癌细胞表现出的协同作用^[4], 提示其在卵巢癌化疗耐药中可能存在的潜在作用。

在众多复杂的信号通路中, 野生型 *p53* 基因被称为细胞生长的监视器, 能够诱导损伤的细胞进行修复, 而在细胞修复失败时及时诱导其凋亡, 在一些产生耐药的肿瘤细胞中, *p53* 基因往往会发生突变,

从而其对凋亡的控制作用也发生异常。而 *Bcl-2* 是一种重要的细胞凋亡抑制基因, 其过表达可以抑制化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用, 促进肿瘤细胞产生耐药。

本研究拟通过观察蛋白酶体抑制剂 MG132 对紫杉醇耐药的卵巢癌细胞生长和凋亡的影响, 同时研究 *p53* 及 *Bcl-2* 在紫杉醇及 MG132 作用后在细胞中表达的变化, 从而探讨 MG132 对紫杉醇耐药的卵巢癌细胞可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞株来源: SKOV-3 为上海市第一人民医院妇产科保存的卵巢癌细胞株; SKOV-3 的紫杉醇耐药细胞株 SKOV-3/TAX 为中国协和大学北京协和医院妇产科惠赠^[5]。

实验试剂: MG132 购自德国 MERCK 公司; DMEM 高糖培养基及胎牛血清、三抗购自美国 GIBCO 公司; TUNEL 试剂盒购自罗氏公司; RT-PCR

通讯作者: 祁澜, 副主任医师, 博士; 上海市第一人民医院妇产科, 上海市海宁路 100 号 (200080); E-mail: qilan2005@163.com。
收稿日期: 2011-12-12; **修回日期:** 2012-01-29

引物 *p53*、*Bcl-2* 由美国 Invitrogen 公司合成; RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。其他 MTT、DMSO、triton 均为国产试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 均在含 10% 胎牛血清和 1% 三抗的 DMEM 高糖培养基中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中培养和传代。

1.2.2 实验分组

取对数期生长的细胞进行分组处理, 将 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞各分为 4 组, 共 8 组。前 4 组为 SKOV-3 细胞, 后 4 组为 SKOV-3/TAX 细胞, ①和⑤为对照组, ②和⑥为紫杉醇处理组, ③和⑦为 MG132 处理组, ④和⑧为紫杉醇及 MG132 联合用药组。紫杉醇实际用药浓度为 2 μg/ml; MG132 实际用药浓度为 10 μmol/L (均为分别作用于 SKOV-3 24h 后的 IC₅₀ 浓度)。

1.2.3 MTT 法检测用药后细胞增殖

将对数期生长的 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞用胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基配制成单细胞悬液, 以每孔 2 000 个的密度接种于 96 孔板中, 每孔体积 200 μl, 待细胞贴壁后吸净培养基, 予以每孔 200 μl 不含血清的 DMEM 高糖培养基静止 24h, 然后分别加入紫杉醇、MG132 及联合用药 (并设立只加培养基不加细胞的空白组和只加细胞不加药的对照组, 每组各 6 个副孔, 共 54 个孔), 分别于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中培养 24h 及 48h 后, 加入 20 μl 5mg/ml 的 MTT 溶液, 继续孵育 4h 后自孵箱中取出, 吸净培养基, 每孔加入 150 μl DMSO, 震荡 10min, 在酶联免疫检测仪上检测各孔 OD₄₉₀ 的值, 根据 OD₄₉₀ 计算各组细胞存活率 VR (vital rate) = (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) × 100%。

1.2.4 TUNEL 法检测用药后细胞凋亡

同样取对数期生长的 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞用胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基配成单细胞悬液, 接种于 12 孔板中, 每孔 1ml。每孔中加入一块载玻片, 待细胞在玻片上贴壁并生长密度至约 80% 时, 用不含血清的 DMEM 高糖培养基 1ml 予以静止 24h, 然后分别加入紫杉醇、MG132 及联合用药, 放入孵箱培养 24h 后, 吸净培

养基并用 PBS 冲洗 2 次, 用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定细胞 30min, 吸净固定液, 加入 0.1% triton 于冰上通透 2min, 然后每个玻片加入 50 μl TUNEL 反应液, 放置在暗盒内, 37℃ 的孵箱中反应 1h 后, 取出于荧光显微镜下观察。

1.2.5 半定量 RT-PCR 检测凋亡相关基因的表达

将药物作用的各组细胞经 PBS 洗涤后用 Trizol 消化提取, 然后用氯仿、异丙醇、75% 乙醇提取 RNA 并溶解于 DEPC 水中, 调整浓度后使用 TaKaRa 试剂盒将其逆转录为 cDNA (37℃ 15min, 85℃ 5s), 并用 PCR 扩增 (94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 45s, 35 个循环)。所用引物序列为: *p53*: 上游 5' - GCAGCTCAGCTACAGCACAGA-3'; 下游 5' - CAGCAGGTCGGAAGTGATTGG-3', 产物长度 439bp; *Bcl-2*: 上游 5' - TGCCATAACAAAGTAG-CACAG-3'; 下游 5' - TCCTAACCCCTCAGTTTCTCAC-3', 产物长度 314bp。基因扩增后进行琼脂糖电泳。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 各组间的差异采用单因素方差分析进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测紫杉醇及 MG132 对肿瘤细胞的抑制作用

用 MTT 法检测各组细胞用药后的情况发现, 2 μg/ml 的紫杉醇单独作用于 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞 24h 后两种细胞的存活率分别为 41% 和 91%, 作用 48h 后分别为 45% 和 85%; 10 μmol/L 的 MG132 作用于 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞 24h 后细胞存活率分别为 81% 和 55%, 作用 48h 后分别为 36% 和 47%; 而两药联合作用 24h 后存活率分别为 42% 和 48%, 48h 后分别为 44% 和 27% (图 1)。经统计分析发现, 相比于对照组 2 μg/ml 的紫杉醇对 SKOV-3 细胞具有明显的杀伤作用 ($P < 0.001$), 而对紫杉醇耐药的细胞株 SKOV-3/TAX 无明显杀伤作用; 10 μmol/L 的 MG132 对 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞均具有明显的杀伤作用 ($P < 0.001$)。对 SKOV-3 细胞而言, 同单用 MG132 组相比两种药物的联合作用在 24h 后杀伤作用更明显 ($P < 0.001$), 而 48h 后两组

无统计学差异($P=0.117$);相反,对于 SKOV-3/TAX 细胞而言,两种药物的联合作用在 24h 时与单用 MG132 组比较无统计学差异($P=0.143$),而作用 48h 后表现出比单用 MG132 更明显的杀伤作用 ($P<0.001$)。

2.2 TUNEL 法检测用药后细胞凋亡情况

各组细胞经紫杉醇和 MG132 处理 24h 后,在荧光显微镜下可见细胞核呈现致密的颗粒状绿色荧光,表明细胞核已固缩碎裂,即明显的细胞凋亡产生。图 2 为各组细胞用药后荧光显微镜下显示的凋亡小体,可见 MG132 单用及与紫杉醇联合用药对 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 细胞均有明显的促凋亡作用。图中紫杉醇和 MG132 联合用药的细胞组可见荧光小体的密度低于单独用药组,在自然光下亦可见联合用药组的细胞密度较低。

2.3 半定量 RT-PCR 检测凋亡相关基因的表达

实验显示, $p53$ 在 SKOV-3 细胞中有着稳定的表达,且在紫杉醇作用后表达上调,MG132 作用后则表达下调,而在 SKOV-3/TAX 细胞中则未见表达; $Bcl-2$ 在 SKOV-3/TAX 中表达明显,经 MG132 作用后表达明显下调,而在对照组 SKOV-3 细胞中,未见明显表达,而加入紫杉醇及 MG132 后则表达明显上调。见图 3。

3 讨 论

临床上,卵巢癌的治疗,通常是手术和化疗相结合的治疗方式。但是,患者对化疗药物不敏感或治疗后产生耐药,成为治疗失败的一个重要因素。因此,若能逆转肿瘤细胞对化疗药物的耐药性或增强其对化疗药物的敏感性,必将大大提高卵巢癌患者的生存率。

临床上治疗卵巢癌的化疗药物,除了铂类药物以外,常用的主要是紫杉醇。紫杉醇主要作用于细胞微管网,诱导和稳定微管蛋白聚合,抑制其解聚,从而将细胞周期阻滞于 G_2/M 期,导致有丝分裂异常或停止,诱导肿瘤细胞死亡^[6]。

而 MG132 是作为一种肽醛类蛋白酶体抑制剂,通过抑制某些重要蛋白质的降解,从而影响细胞基因转录,继而发挥诱发细胞应激,破坏细胞稳态以致引起细胞凋亡等相关作用。因此,在本研究中,我们

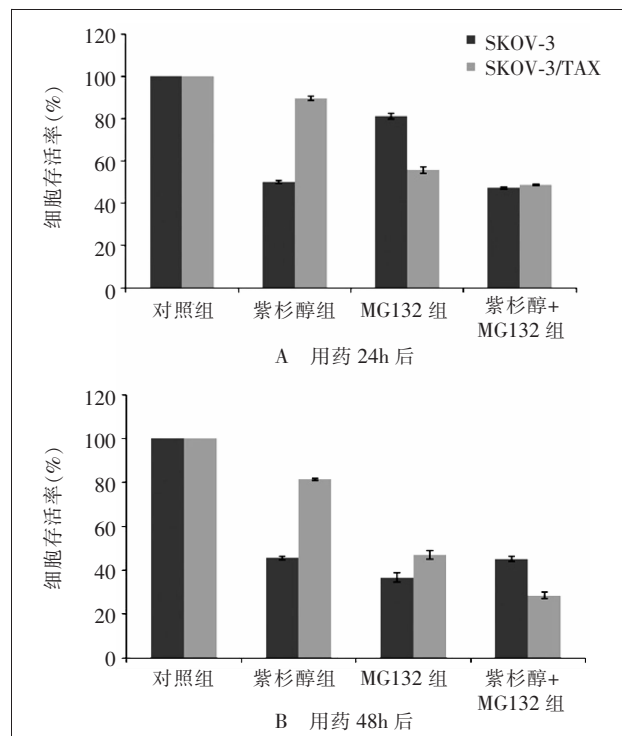


图 1 MTT 法检测紫杉醇及 MG132 对卵巢癌细胞增殖活性的影响

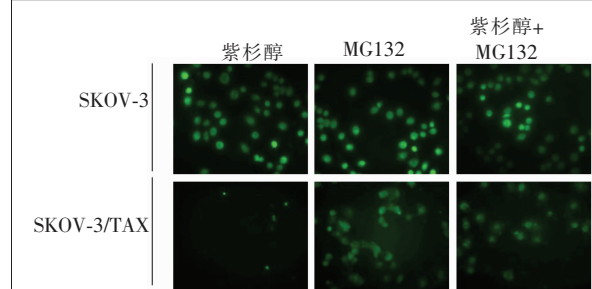


图 2 TUNEL 法检测细胞凋亡情况

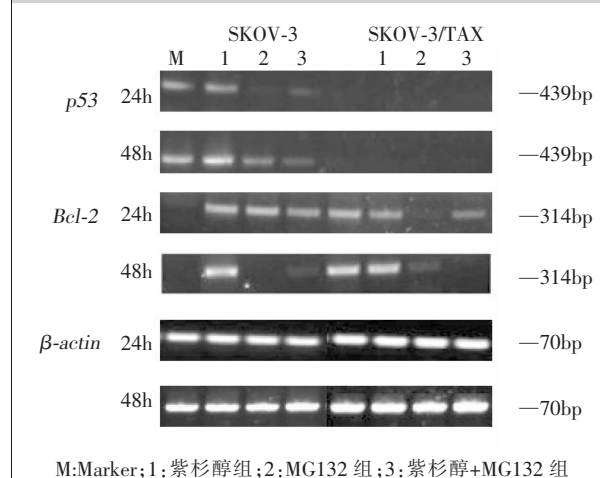


图 3 RT-PCR 检测紫杉醇及 MG132 作用后 $p53$ 及 $Bcl-2$ 的表达

尝试研究 MG132 是否能逆转紫杉醇对化疗药物的耐药性并增强其对化疗药物的敏感性。如图 1 和图 2 所示, MG132 无论是对 SKOV-3 还是 SKOV-3/TAX 都有明显的杀伤作用, 且将 MG132 和紫杉醇联合作用后对两种细胞亦有明显的杀伤作用, 但具体作用机制目前并不明确。Bazzaro 等^[3]研究发现, MG132 诱发细胞周期阻滞, 且其作用导致 *p21* 和 *p27* 的上调, 可通过 caspase-3 的作用诱导细胞凋亡。同时, 我们检测了细胞内 *p53* 的表达情况, *p53* 作为一种与肿瘤发生关系极其密切的基因, 在应激、DNA 损伤等情况下通常会表达上调, 从而诱导细胞凋亡^[7], 而紫杉醇作用后 SKOV-3 细胞内 *p53* 表达明显上调也正说明了这一点, 然后使用 MG132 后, *p53* 表达不仅没有增加, 反而呈现出一定程度的下降, 说明 MG132 诱导细胞凋亡为 *p53* 非依赖性的。此前的研究中, 孙国敬等^[8]通过对 MG132 作用于白血病细胞 HL-60 后细胞周期及相关蛋白的表达的检测后发现, *p21* 蛋白呈现明显上调, 而 HL-60 是 *p53* 缺失的, 同样验证了 MG132 引起的细胞凋亡并非通过 *p53* 实现。但是关于为何 MG132 作用后 *p53* 表达下降目前则尚未明确原因。

Bcl-2 作为一种重要的抗凋亡基因, 其活性受到 NF- κ B 的调控。包括 *Bcl-2* 在内的 *Bcl* 家族在泛素—蛋白酶体途径中具有重要的作用^[9]。静息状态下, NF- κ B 的活性被其抑制因子 I- κ B 所抑制, 在急性炎症反应、细胞损伤等应激情况下, 释放的细胞因子诱导 I- κ B 磷酸化并启动 I- κ B 共价结合泛素, 从而成为 26S 蛋白酶体的底物, 导致 I- κ B 降解, NF- κ B 被激活, 并迁移到细胞核, 结合于各种相应的基因启动位点, 从而启动基因转录, 参与细胞凋亡、周期调节等多种重要的调控作用。MG132 作用于肿瘤细胞后, 可能通过抑制 I- κ B 的降解, 从而抑制 NF- κ B 的激活, 使 *Bcl-2* 的表达明显下降, 从而增加肿瘤细胞的凋亡。除此以外, Lin 等^[10]研究发现, NF- κ B 的激活能够促进卵巢癌细胞对铂类药物的耐药, 而 MG132 的使用正是能够通过抑制 NF- κ B 的激活从而达到逆转耐药的作用。

蛋白酶体抑制剂 MG132 除了以上通过对细胞周期的调节作用以及抑制 NF- κ B 的活性从而达到促进细胞凋亡、逆转耐药的作用以外, 还有多种促凋亡的方式, 比如 Ernestina 等人研究发现在卵巢癌细

胞中, 蛋白酶体抑制剂 MG132 能够增加肿瘤坏死因子相关的凋亡配体 TRAIL 对促凋亡药物的敏感性, 从而促进 TRAIL 对 A2780 及 A2780/DDP 耐药的卵巢癌细胞的杀伤作用, 而 Baritaki 等^[11]人研究发现, 对前列腺癌细胞使用蛋白酶体抑制剂后, 可以通过抑制 NF- κ B 降低 Snail 的表达, 从而抑制肿瘤细胞的转移, 这也提示我们除了直接的肿瘤抑制作用以外, 蛋白酶体抑制剂也存在潜在的抗肿瘤转移的作用。

综上所述, 10 μ mol/L 的 MG132 对 SKOV-3 及 SKOV-3/TAX 均有明显抑制作用, 使用 MG132 和紫杉醇联合用药对 SKOV-3/TAX 细胞具有明显的抑制作用, 而该肿瘤杀伤作用是非 *p53* 依赖性的, 且 MG132 可能通过抑制细胞周期, 同时抑制 NF- κ B 的活性从而抑制 *Bcl-2* 等相关抗凋亡基因的表达, 从而与紫杉醇产生协同作用, 达到逆转 SKOV-3/TAX 紫杉醇耐药的作用。

参考文献:

- [1] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1-3):55-72.
- [2] Daniela H, Ivan D. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy[J]. *Nature*, 2009, 458(26):438-444.
- [3] Bazzaro M, Lee MK, Zoso A, et al. Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (7): 3754-3763.
- [4] Aghajanian C, Dizon DS, Sabbatini P, et al. Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (25): 5943-5949.
- [5] 闫雪冬, 张明伟, 潘凌亚, 等. 不同方式诱导卵巢癌紫杉醇耐药细胞系的比较 [J]. *基础医学与临床*, 2006, 26 (3):284-289.
- [6] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol [J]. *Nature*, 1979, 277(5698): 665-667.
- [7] Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1):44-55.
- [8] 孙国敬, 钱俊杰, 孟祥兵, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导 HL-60 细胞凋亡前 G2/M 期阻滞及机制 [J]. *癌症*, 2004, 23 (10):1144-1148.
- [9] Zhou W, Hu J, Tang H, et al. Small interfering RNA targeting mcl-1 enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis in various solid malignant tumors[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11:485-493.
- [10] Lin ZP, Boller YC, Amer SM, et al. Prevention of brefeldin A-induced resistance to teniposide by the proteasome inhibitor MG-132: involvement of NF-Kappa B activation in drug resistance[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(14):3059-3065.
- [11] Baritaki S, Chapman A, Yeung K, et al. Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by the novel proteasome inhibitor, NPI-0052: pivotal roles of Snail repression and RKIP induction [J]. *Oncogene*, 2009, 28(40):3573-3585.