

Metadherin 参与酸性微环境诱导的鼻咽癌紫杉醇耐药

余长云¹, 刘勇², 秦兆冰¹, 曹华¹

(1. 郑州大学第一附属医院耳鼻喉医院, 河南 郑州 450052;

2. 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

摘要: [目的] 分析异黏蛋白(metadherin, MTDH)在酸性微环境诱导的鼻咽癌紫杉醇耐药中的作用并探讨其相关机制。[方法] 不同浓度紫杉醇作用于鼻咽癌细胞 CNE-2, 48h 后 CCK-8 法检测细胞生长抑制率, 确定紫杉醇对 CNE-2 细胞的 IC₃₀。分别用 pH 7.4、pH 6.8 的细胞培养基培养 CNE-2 细胞, CCK-8 法检测 IC₃₀ 浓度紫杉醇下 CNE-2 细胞生存率; 相差显微镜下观察细胞形态改变; RT-qPCR、Western blot 检测 MTDH 及上皮-间质转化(EMT)标志物表达情况; 酸性环境下用 siRNA 沉默 MTDH 表达后, 检测 CNE-2 细胞对紫杉醇敏感性及其 EMT 标志物表达变化。[结果] 紫杉醇对 CNE-2 细胞的 IC₃₀ 为 6.167 nmol/L。IC₃₀ 浓度下, pH 6.8 组细胞的生存率为 48.46%±4.39%, 明显高于 pH 7.4 组的 31.30%±5.21%(P=0.013)。酸性环境下沉默 MTDH 表达后, CNE-2 对紫杉醇的敏感性增强, IC₃₀ 浓度下对照组和沉默组的细胞生存率分别为 48.70%±2.35% 和 32.87%±2.97%(P=0.020)。沉默 MTDH 表达可逆转酸性引起的 E-cadherin 下降、Vimentin 表达增强。[结论] 沉默 MTDH 可逆转酸性微环境诱导的鼻咽癌 CNE-2 细胞紫杉醇耐药, 这一现象与 EMT 进程逆转密切相关。

关键词: 酸性微环境; 鼻咽肿瘤; 异黏蛋白; 上皮间质转化; 紫杉醇

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)06-0542-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.06.B003

Metadherin Involves in Acidic Extracellular pH-induced Paclitaxel Resistance in Nasopharyngeal Carcinoma

YU Chang-yun¹, LIU Yong², QIN Zhao-bing¹, et al.

(1. Otolaryngology Hospital, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: [Objective] To determine the role of metadherin(MTDH) in acidic extracellular pH(pHe)-induced paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma (NPC), and the related mechanism. [Methods] Nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells were stimulated with various concentrations of paclitaxel for 48 h, the proliferation inhibition rate was evaluated by the cell counting kit(CCK-8), and IC₃₀ value of paclitaxel was determined. Then, CNE-2 cells were incubated in normal(pH 7.4) or acidic (pH 6.8) medium, following IC₃₀ paclitaxel stimulation for 48 h, the cell survival rate was evaluated by CCK-8 assay. Cell morphology was observed under phase contrast microscope. The expression of MTDH and epithelial-mesenchymal transition(EMT) makers were detected by quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR) and Western blot. MTDH expression was blocked by small RNA(siRNA) silencing in NPC cells cultured at a pHe of 6.8. Then, the changes of cell sensitivity to paclitaxel and EMT makers were assessed. [Results] The IC₃₀ value of paclitaxel in CNE-2 cells was 6.167 nmol/L. The cell survival rate of CNE-2 cells cultured in acidic (pH 6.8) medium was significantly higher than that in normal(pH 7.4) medium(48.46%±4.39% vs 31.30%±5.21%, P=0.013). The sensitivity of CNE-2 to paclitaxel was enhanced after MTDH expression was silenced in acid environment, under the IC₃₀ concentration, the cell survival rate in the control group and the silencing group was 48.70%±2.35% and 32.87%±2.97%, respectively (P=0.02). Silencing of MTDH expression also sensitized acidic pHe-induced down-regulation of E-cadherin and up-regulation of Vimentin. [Conclusion] Down-regulation of MTDH expression can reverse the acidic pHe-induced paclitaxel resistance in NPC CNE-2 cells, which is closely correlated with MTDH-mediated EMT.

Subject words: acidic extracellular pH; nasopharyngeal carcinoma; metadherin; epithelial-mesenchymal transition; paclitaxel

鼻咽癌为我国及东南亚地区常见的恶性肿瘤之

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81402232)

通讯作者: 曹华, 主任, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 博士; 郑州大学第一附属医院耳鼻喉医院咽喉头颈科, 河南省郑州市建设东路1号(450052); E-mail: chcare@163.com

收稿日期: 2017-11-30; **修回日期:** 2018-03-04

一。化疗为鼻咽癌的重要治疗手段, 在中晚期患者、复发及转移患者的治疗中起着非常重要的作用。在鼻咽癌患者化疗中, 紫杉醇的临床效果得到一致认可。然而, 紫杉醇细胞耐药性的产生及大剂量紫杉醇

药物使用所致的药物毒性反应在一定程度上限制了其临床应用。酸性微环境为实体瘤的一个重要特征,在肿瘤发生发展中发挥重要作用,调控肿瘤侵袭转移及化疗耐药,然而其调控紫杉醇耐药的分子机制目前尚不清楚。现有研究证实,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)在多种肿瘤对化疗药物的敏感性中发挥了重要作用^[1]。我们前期研究发现,MTDH的表达与头颈部鳞状细胞癌(简称头颈鳞癌)患者的预后呈负相关,且可调控头颈鳞癌细胞发生EMT^[2]。因此,本研究在前期研究的基础上,探讨MTDH调控的EMT在酸性微环境诱导的紫杉醇耐药中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般材料

人鼻咽癌CNE-2细胞株由中南大学湘雅医院中心实验室提供。RPMI-1640培养基(Hyclone,美国),特级胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),0.25%胰蛋白酶消化液(含乙二胺四乙酸)、双抗(青霉素-链霉素)(Gibco,美国),细胞计数试剂盒(CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),TRIzol总RNA提取试剂(Thermo Fisher Scientific,美国),High Capacity RNA-to-cDNA kit逆转录试剂盒(Applied Biosystems,美国),iQ™STBR® Green Supermix(Bio-Rad,美国),MTDH小干扰RNA(SC-77797)和空白载体(SC-37007)(Santa Cruz,美国),小鼠抗人E-cadherin单克隆抗体、小鼠抗人Vimentin单克隆抗体(Santa Cruz,美国),兔抗人MTDH多克隆抗体(Proteintech Group,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 鼻咽癌CNE-2细胞培养和细胞培养基pH值的调节

CNE-2细胞在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下,用含有10%特级胎牛血清、100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的RPMI-1640培养基进行培养,常规0.25%胰蛋白酶消化传代。细胞培养基的pH值分别通过20mmol HEPES缓冲液和20mmol MES缓冲液调节,使得培养基pH值分别为7.4和6.8,模拟正常微环境和酸性微环境。每隔12h进行换液处理。所有实验均选用对数生长期细胞。

1.2.2 CCK-8法检测紫杉醇对CNE-2细胞的30%抑制浓度(IC₃₀)

常规培养细胞处于对数生长期时消化传代,细胞计数并调整细胞数为3×10³个/ml接种于96孔板,每孔100μl;过夜贴壁后向各孔中加入不同浓度紫杉醇100μl(使紫杉醇终浓度分别为0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50和25.00nmol/L,0nmol/L为对照组),同时设置只含10%胎牛血清的1640培养基的空白组,每组设3个复孔;培养48h后每孔加入10μl CCK-8测定液,2h后用酶标仪测定450nm波长吸光度值(A)。计算各浓度的抑制率,并算出IC₃₀浓度。

生长抑制率=(对照组平均A值-实验组平均A值)/(对照组平均A值-空白组平均A值)×100%

1.2.3 CCK-8法检测细胞生存率

将CNE-2细胞3×10³个/ml接种于96孔板,每孔100μl,分pH 7.4组和pH 6.8组;过夜贴壁后向各孔中加入含IC₃₀浓度紫杉醇的细胞培养基100μl,48h后CCK-8法检测细胞生存率。

1.2.4 逆转录实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

采用TRIzol提RNA法提取细胞中的RNA,紫外分光光度仪测定RNA纯度,并测定其浓度,按照High Capacity RNA-to-cDNA kit逆转录试剂盒的说明合成逆转录cDNA。利用iQ™STBR® Green Supermix在Bio-Rad IQ5™ Multicolor Real-Time PCR检测仪进行实时荧光定量PCR。PCR条件为:95℃ 3 min 变性,95℃ 15s,60℃ 30s,共40个循环。引物序列分别为:E-cadherin forward:5'-GCTGGACCG A-GAGAGTTTCC-3',Reverse:5'-CAAAATCCAAGCC-CGTGGTG-3';Vimentin forward,5'-TGTCCAAATC-GATGTGGATGTTTC-3',Reverse:5'-TTGTACCATTC-TTCTGCCTCCTG-3';MTDH forward:5'-GATGATGA-ATGGTCTGGGTAAA-3',Reverse:5'-GACCTTTTG-ATCATC AGGAATTG-3';GAPDH forward:5'-GAG-TCAACGGATTTGGTCGT-3',Reverse:5'-TTGATTT-TGGAGGGATCTC G-3'。用^{2-ΔΔCt}法计算相对表达量。实验均重复3次。

1.2.5 Western blot检测

提取细胞总蛋白,二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid,BCA)测定细胞总蛋白浓度。50μg总蛋白变性处理后,进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。蛋白电泳分离后转膜至PVDF

膜, 5%脱脂牛奶室温下封闭 2h。小鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体(1:400), 小鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(1:200), 兔抗人 MTDH 多克隆抗体(1:800)于 4℃下孵育过夜。洗膜后, 分别于辣根过氧化物酶标记的抗小鼠二抗(1:1000)或抗兔二抗(1:3000)室温下孵育 1 h。洗膜后, 经化学发光剂显影曝光摄片。以小鼠抗人 β -actin 抗体(1:1000)检测 β -actin 含量作为内参照。实验均重复 3 次。

1.2.6 细胞转染

将状态良好的 CNE-2 细胞按 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 用无抗生素细胞培养基培养 24h。转染按照 Santa Cruz 公司 siRNA 转染说明书进行: 80pmol MTDH siRNA 或 Control siRNA 加入 100 μ l siRNA 转染培养基中混匀作为 A 液; 将 6 μ l Santa Cruz 转染试剂加入 100 μ l siRNA 转染培养基中混匀作为 B 液; 将 A 液加入 B 液混匀, 室温静置 30min。去除 6 孔板中原有细胞培养基, 用 2ml Santa Cruz 转染培养基洗细胞, 并迅速将 A、B 混合液加入 0.8ml Santa Cruz 转染培养基中形成 1ml 转染体系, 混匀, 加入 6 孔板中。细胞置 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 7h 后换正常培养基培养, 待后续实验。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用两样本均数的 *t* 检验进行比较。所有检验均为双侧检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

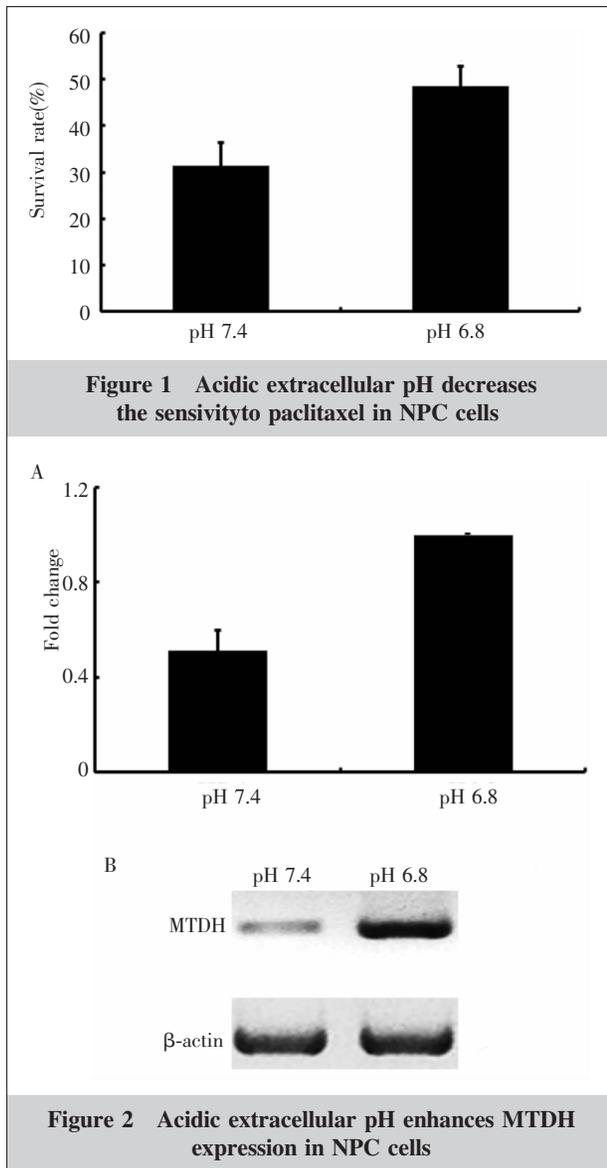
2.1 酸性微环境对鼻咽癌细胞对紫杉醇敏感性的影响

采用不同浓度紫杉醇(0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50 和 25.00nmol/L)作用于鼻咽癌细胞 CNE-2, 48h 后收集细胞, CCK-8 法检测不同浓度紫杉醇对 CNE-2 细胞的生长抑制率, 并确定紫杉醇对 CNE-2 的 IC₃₀ 浓度为 6.167nmol/L。在此基础上, 进一步分别用 pH 7.4 和 pH 6.8 的细胞培养基培养 CNE-2 细胞, 用 IC₃₀ 浓度紫杉醇作用于 CNE-2 细胞, 48 h 后 CCK-8 法检测细胞生存率。结果显示, pH 7.4 组的细胞生存率为 31.30% \pm 5.21%, 低于 pH 6.8 组 48.46% \pm 4.39% (*t* = -4.362, *P* = 0.013) (Figure 1), 酸性环境下鼻

咽癌细胞对紫杉醇的敏感性降低。

2.2 酸性微环境下鼻咽癌细胞 MTDH 的表达

qRT-PCR 结果显示: MTDH 的 mRNA 表达倍数在 pH 6.8 组细胞中(1.00 \pm 0.00)明显高于 pH 7.4 组细胞(0.51 \pm 0.09) (*t* = 9.549, *P* = 0.001) (Figure 2A)。Western blot 结果显示: pH 6.8 组细胞中 MTDH 的表达在蛋白水平较 pH 7.4 组细胞中的表达亦明显增强(Figure 2B)。



2.3 siRNA 沉默 CNE-2 细胞中 MTDH 的表达

为阐明 MTDH 在肿瘤酸性微环境诱导的紫杉醇耐药中的作用, 采用 siRNA 沉默鼻咽癌细胞 CNE-2 中 MTDH 的表达。转染 48h 后提取细胞 RNA 和蛋白, 分别在 mRNA 和蛋白水平检测转染效率。

qRT-PCR 结果显示: 转染 siRNA 后 MTDH 的表达量明显降低, 沉默组 mRNA 表达量为对照组的 0.19 ± 0.05 倍 ($t=27.989, P<0.001$) (Figure 3A)。Western blot 结果显示: 转染 siRNA 后 MTDH 的蛋白表达量亦明显降低 (Figure 3B)。

2.4 沉默 MTDH 表达对肿瘤酸性微环境诱导的紫杉醇耐药的影响

CCK-8 结果显示, 酸性环境下沉默 MTDH 表达后, CNE-2 细胞对紫杉醇的敏感性增强, IC_{50} 浓度紫杉醇作用 48h 后, 对照组和沉默组的细胞生存率分别为 $48.70\% \pm 2.35\%$ 、 $32.87\% \pm 2.97\%$ ($t=7.243, P=0.020$) (Figure 4)。

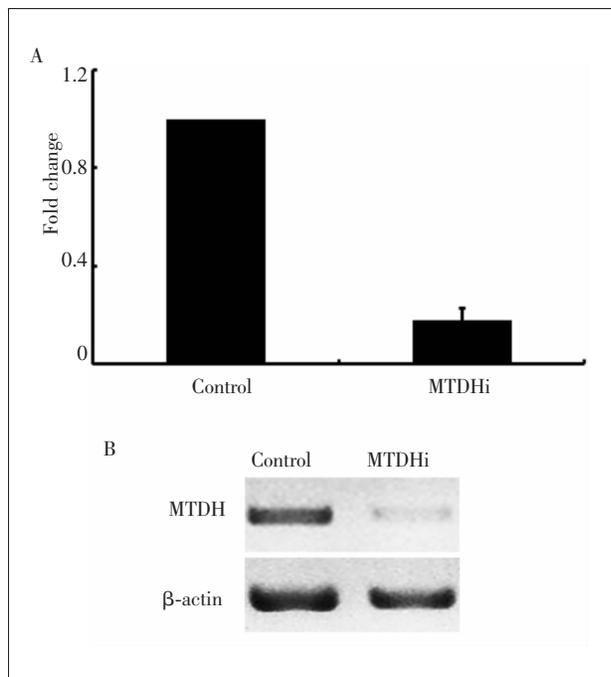


Figure 3 The expression of MTDH downregulated by siRNA

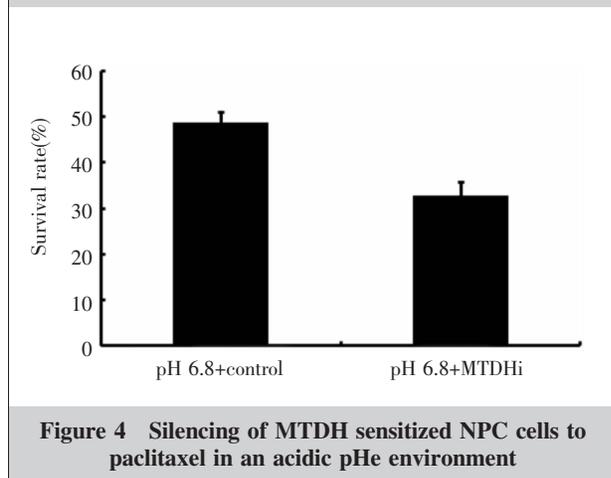


Figure 4 Silencing of MTDH sensitized NPC cells to paclitaxel in an acidic pH environment

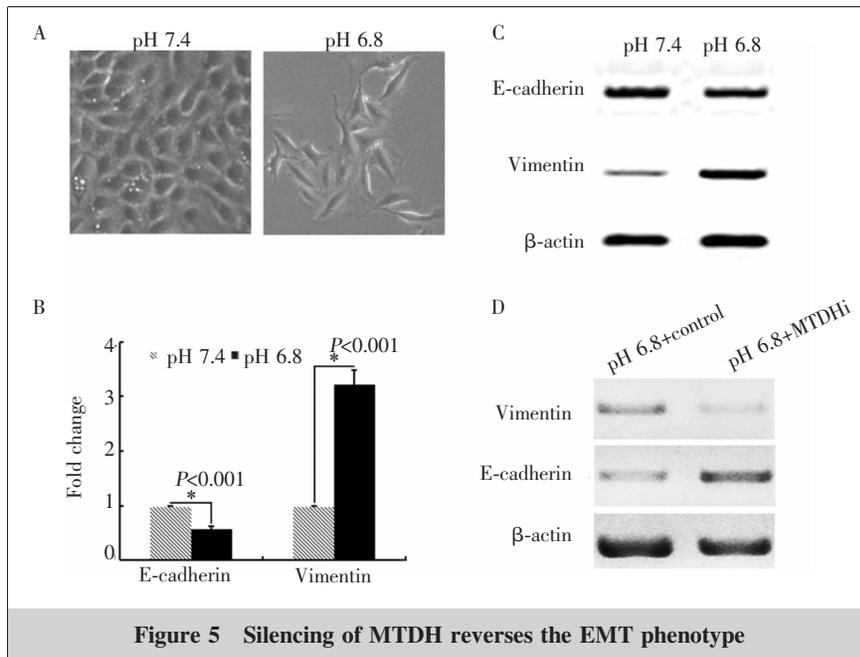
2.5 沉默 MTDH 逆转肿瘤酸性微环境诱发的鼻咽癌细胞 EMT 进程

相差显微镜下, pH 6.8 组细胞与 pH 7.4 组细胞相比, 细胞间连接相对松散, 细胞形态呈成纤维细胞样改变, 有伪足形成 (Figure 5A)。qRT-PCR 结果显示: 上皮细胞标志物钙黏蛋白 (E-cadherin) 的 mRNA 水平在 pH 6.8 组细胞中明显低于 pH 7.4 组细胞, 为 pH 7.4 组细胞的 0.57 ± 0.06 倍 ($t=13.200, P<0.001$) (Figure 5B); 间质细胞标志物波形蛋白 (Vimentin) 的 mRNA 水平在 pH 6.8 组细胞中明显高于 pH 7.4 组细胞, 为 pH 7.4 组细胞的 3.23 ± 0.26 倍 ($t=14.830, P<0.001$) (Figure 5B)。Western blot 结果显示: pH 6.8 组细胞中 E-cadherin 的表达在蛋白水平较 pH 7.4 组细胞中的表达明显降低; pH 6.8 组细胞中 Vimentin 的蛋白表达水平较 pH 7.4 组细胞增强 (Figure 5C)。然而酸性环境下沉默 MTDH 表达后, E-cadherin 表达增强, 而 Vimentin 表达下调 (Figure 5D)。

3 讨论

细胞外酸性微环境作为肿瘤的重要特征之一, 在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用, 与肿瘤化疗耐药关系密切^[3]。目前, 酸性微环境在鼻咽癌化疗耐药中的作用尚不十分明确。本研究表明, 细胞外酸性微环境能显著降低鼻咽癌细胞对紫杉醇的敏感性, 这与其他学者在小鼠 EMT6 细胞和膀胱癌 MGH-U1 细胞中的研究一致^[4]。目前, 关于肿瘤酸性微环境调控化疗耐药的机制主要集中在“离子俘获”效应, 即药物分子被细胞外酸性环境质子化后不易透过细胞膜脂质层进入细胞内, 从而造成化疗耐药^[3]。然而, 对于紫杉醇等不易电离的化疗药物, “离子俘获”效应并不能成为其主要耐药机制。因此, 尚需从新的角度进一步探讨肿瘤酸性微环境调控肿瘤化疗耐药的机制。

MTDH 是新近发现的癌基因, 在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用, 与肿瘤侵袭转移、化疗耐药关系密切^[5]。我们前期研究发现, MTDH 在头颈鳞癌中高表达, 且可通过 EMT 调控头颈鳞癌细胞侵袭转移^[2]。然而, MTDH 在鼻咽癌化疗耐药中的作用目前尚少见报道。本研究发现, 体外酸性环境下鼻咽癌细胞 MTDH 表达增强。采用小 RNA 干扰技术沉默



MTDH 表达,结果发现 MTDH 表达抑制后,细胞外酸性环境诱导的紫杉醇耐药得到逆转。进一步机制研究发现,MTDH 可逆转酸性诱导的 EMT 进程。

EMT 是具有极性的上皮细胞向具有活动能力的间质细胞转化的过程,是一类基本形态和基因表型变化,在胚胎发育、伤口愈合、肿瘤进展等病理生理过程中发挥重要作用^[1]。大量研究证实,EMT 与卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌等多种肿瘤细胞化疗耐药关系密切^[6-8]。在一项体外研究中,通过持续的、递增浓度的顺铂刺激而获得鼻咽癌耐药细胞株;进一步研究发现,这些耐药细胞株具有 EMT 特征^[9]。另有学者通过体内、体外研究证实,紫杉醇耐药的鼻咽癌细胞株亦获得 EMT 表型,且 EMT 是鼻咽癌细胞化疗耐药的重要机制^[10]。

综上所述,本研究表明,酸性微环境可诱导鼻咽癌细胞发生紫杉醇耐药;沉默 MTDH 表达可逆转酸性微环境诱导的紫杉醇耐药;这一现象的出现与 EMT 进程逆转密切相关。该研究结果丰富了细胞外酸性微环境调控肿瘤化疗耐药的分子机制,并为今后利用 MTDH 作为鼻咽癌治疗的分子靶点提供了新的实验数据和理论依据。然而,本研究只是在细胞水平上证实了 MTDH 在酸性微环境诱发紫杉醇耐药中的作用,仍需通过大量动物模拟实验来进一步证实。

参考文献:

- [1] Roche J. The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer[J]. *Cancers(Basel)*,2018,10(2):E52.
- [2] Yu C, Liu Y, Tan H, et al. Metadherin regulates metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck via AKT signalling pathway-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Lett*,2014,343 (2): 258-267.
- [3] Taylor S,Spugnini EP,Assaraf YG, et al. Microenvironment acidity as a major determinant of tumor chemoresistance;Proton pump inhibitors (PPIs) as a novel therapeutic approach[J]. *Drug Resist Updat*,2015,23:69-78.
- [4] Vukovic V,Tannock IF. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel,mitoxantrone and topotecan[J]. *Br J Cancer*,1997,75(8):1167-1172.
- [5] Emdad L, Das SK, Hu B, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC: a promiscuous protein partner critical in cancer, obesity, and CNS diseases[J]. *Adv Cancer Res*,2016,131:97-132.
- [6] Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, et al. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*,2010,10(3):268-278.
- [7] Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer [J]. *Nature*,2015,527(7579):525-530.
- [8] Bao Y, Lu Y, Wang X, et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A2 (eIF5A2) regulates chemoresistance in colorectal cancer through epithelial mesenchymal transition[J]. *Cancer Cell Int*,2015,15:109.
- [9] Zhang P, Liu H, Xia F, et al. Epithelial-mesenchymal transition is necessary for acquired resistance to cisplatin and increases the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*,2014,33(1):151-159.
- [10] Zhou Z, Zhang L, Xie B, et al. FOXC2 promotes chemoresistance in nasopharyngeal carcinomas via induction of epithelial mesenchymal transition[J]. *Cancer Lett*,2015,363(2):137-145.