

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.09.011
文章编号: 1005- 8982 (2017) 09- 0054- 05

E2F-1 与小细胞肺癌多药耐药及预后的相关性*

金沅武¹, 赵媛¹, 孟祥娇²

(1. 山东省淄博矿业集团有限责任公司中心医院 肿瘤血液科, 山东 淄博 255120;
2. 山东省医学科学院, 山东 济南 250062)

摘要:目的 探讨 E2F-1 在小细胞肺癌 (SCLC) 多药耐药中的作用及其与预后的关系。**方法** 检测 92 例 SCLC 患者肿瘤组织中 E2F-1 的表达, 分析 E2F-1 mRNA 表达对患者生存时间的影响, 培养人 SCLC 敏感细胞株 H69 和多药耐药细胞株 H69AR, 分为 E2F-1 过表达组、阴性对照组和空白对照组, 检测不同转染组细胞药物敏感性。**结果** SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量与癌旁组织比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低表达组患者中位生存时间与高表达组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); E2F-1 过表达组 H69 细胞对阿霉素、顺铂和依托泊苷的 IC_{50} 值与阴性对照组和空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 E2F-1 干扰组 H69AR 细胞对阿霉素、顺铂及依托泊苷的 IC_{50} 值与阴性对照组和空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** E2F-1 在 SCLC 组织中呈高表达, 下调 E2F-1 可增强多药耐药细胞株 H69AR 对化疗药物敏感性。

关键词: 小细胞肺癌; E2F-1; RNA 干扰; 多药耐药

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Correlation of E2F-1 with multidrug resistance and prognosis of small cell lung cancer*

Yuan-wu Jin¹, Yuan Zhao¹, Xiang-jiao Meng²

(1. Department of Cancer Hematology, Central Hospital of Shandong Zibo Mining Group Co. Ltd, Zibo, Shandong 255120, China; 2. Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of E2F-1 on multidrug resistance in small cell lung cancer (SCLC) and its relationship with the prognosis. **Methods** The expression of E2F-1 in the cancerous tissues of 92 patients with SCLC was detected. The effect of the expression of E2F1 mRNA on survival time was analyzed. The human SCLC sensitive cell line H69 and multidrug resistant cell line H69AR were cultured. The cells were divided into E2F-1 overexpression group, negative control group and blank control group, respectively. The drug sensitivity of the cells in different transfected groups were detected. **Results** The relative expression level of E2F1 mRNA in the SCLC tissues was higher than that in the adjacent tissues ($P < 0.05$). The median survival time in the low-expression group was longer than that in the high-expression group ($P < 0.05$). The IC_{50} values of Doxorubicin, Cisplatin and Etoposide for H69 cells in the E2F-1 overexpression group were higher than those in the negative control group and the blank control group ($P < 0.05$). The IC_{50} values of Doxorubicin, Cisplatin and Etoposide for H69AR cells in the E2F-1 interference group were lower than those in the negative control group and the blank control group ($P < 0.05$). **Conclusions** E2F-1 is highly expressed in SCLC tissues. Reduced expression of E2F-1 could enhance the sensitivity of multidrug resistant cell line H69AR to chemotherapy.

Keywords: small cell lung cancer; E2F-1; RNA interference; multidrug resistance

收稿日期: 2016-09-14

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81301868)

小细胞肺癌 small cell lung cancer, SCLC) 占原发性肺癌的 16%~25%^[1], 临床上以全身化疗作为 SCLC 治疗重点, 但易发生化疗耐药而影响患者预后^[2]。研究表明, 细胞增殖和凋亡失衡是导致肿瘤细胞发生多药耐药的重要原因^[3]。E2F-1 作为细胞周期相关转录因子 E2F 家族重要成员, 是调控细胞增殖和凋亡过程的关键性启动子^[4], 通过多种途径参与调控肿瘤细胞凋亡过程^[5]。本研究分析 SCLC 患者肿瘤组织中 E2F-1 的表达及其与预后的关系, 利用小分子 RNA 干扰抑制其表达, 观察对 SCLC 多药耐药的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2006 年 3 月 - 2011 年 3 月在山东省淄博矿业集团有限责任公司中心医院诊治的 SCLC 患者 92 例。其中, 男性 42 例, 女性 50 例, 平均年龄 53.8 ± 9.7 岁。所有患者经病理学检查确诊, 确诊前均未接受放化疗治疗。临床分期: 61 例为广泛期, 31 例为局限期。所有患者行依托泊苷联合顺铂化疗方案, 治疗 5~6 个周期后完全缓解或部分缓解 (化疗敏感) 30 例, 稳定或进展 (化疗耐药) 62 例。所有患者留取肿瘤组织及其癌旁组织保存于 -70°C 液氮中以备检, 本研究通过医院伦理委员会批准, 所有患者知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

人 SCLC 敏感细胞株 H69 和多药耐药细胞株 H69AR 均购自美国 ATCC 公司, 无血清细胞冻存培养基 (roswell park memorial institute 1640, RPMI 1640) 和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, Trizol 总 RNA 提取试剂盒和 Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒和聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司, E2F-1、E2F-1 干扰系列及模拟序列、阴性对照序列及内参引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, 活细胞计数法试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海翊圣生物科技有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞培养及转染 将人 SCLC 敏感细胞株 H69 和多药耐药细胞株 H69AR 分别用含 15% 胎牛

血清和 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 5% 二氧化碳 CO_2 、 37°C 恒温培养箱中培养。待细胞融合度达 60%~70% 时, 将细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度 5×10^5 个/ml, 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行转染, 根据转染物不同, 将人 SCLC 敏感细胞株 H69 细胞分为 3 组: ① E2F-1 过表达组。通过质粒重组、病毒包装构建 E2F-1 启动子溶瘤病毒 Ad-E2F-1, 正向引物: 5'-GTTTCATCCGGACAAAGCC-3', 反向引物: 5'-CTCGAGGATATCATCGAG-3'; ② 阴性对照组。以 CMV 启动子调控下的复制缺陷性腺病毒 Ad-EGFP 作为对照, 正向引物: 5'-AGCTGGACGGCGACGTAAC-3', 反向引物: 5'-CACGAACTCCAGCAGGACATG-3'; ③ 空白对照组。不做任何处理。将多药耐药细胞株 H69AR 细胞分为 3 组: ① E2F-1 干扰组, 转染 E2F-1-siRNA 正向引物: 5'-TTTGCTCTTAAGGGAGATCTGAA-3', 反向引物: 5'-ACUAUGGU GGCAGAGUCAGdTdT-3'; ② 阴性对照组, 转染阴性对照组正向引物: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反向引物: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; ③ 空白对照组, 不做任何处理。转染后培养于 5% CO_2 、 37°C 恒温培养箱中。

1.3.2 qRT-PCR 检测肿瘤及其癌旁组织和不同转染组细胞中 E2F-1 基因表达 取肿瘤及其癌旁组织, 研磨后加入细胞裂解液进行裂解, 取转染后培养 48 h 细胞, 加入细胞裂解液进行裂解, 用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒对总 RNA 进行提取, 利用分光光度计对总 RNA 纯度进行检测, 取 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 作为合格样品。用逆转录试剂盒逆转录获得模板单链 cDNA, 以 cDNA 为模板用 PCR 试剂盒进行 PCR。E2F-1 正向引物: 5'-CCCAACTCCCTCTACCOCT-3', 反向引物: 5'-CTCCCATCTCATATCCATCCTG-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 正向引物: GGGAGCCAAAGGGTCAT-3', 反向引物: 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3'。PCR 反应条件: 94°C 预变性 60 s, 92°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 74°C 延伸 30 s, 共 36 次循环。每个样品均设置 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法获得肿瘤及其癌旁组织和不同转染组细胞中 E2F-1 基因相对表达量。

1.3.3 CCK-8 法检测不同转染组细胞的药物敏感性 取各组转染后培养 24 h 细胞, 接种于 96 孔板中, 分别将化疗药物阿霉素、顺铂及依托泊苷加入到培养基中, 进行稀释, 使阿霉素浓度分别为 12.5、25.0、

75.0 和 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 顺铂分别为 50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g/ml}$, 依托泊苷分别为 100、200、400、600 和 800 $\mu\text{g/ml}$, 分别加入到不同孔中, 并设置对照孔, 每个样品均设置 5 个反应复孔。将 CCK-8 加入各孔, 于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 4 h, 利用酶标检测仪对各孔 450 nm 处吸光度 (A 值) 进行检测, 计算各组细胞存活率 = (不同药物浓度 A 值均值 - 空白孔 A 值均值) / 不含药物阳性对照组 A 值均值, 根据不同药物浓度下的细胞存活率, 绘制对数曲线, 获得细胞生存率为 50% 时的药物浓度 half maximal inhibitory concentration, IC_{50} 。

1.3.4 随访方法 所有 SCLC 患者进行随访, 方式包括电话及门诊复查; 内容包括一般检查、临床症状及影像学检查。随访截止日期 2016 年 3 月 31 日, 随访时间 5~120 个月, 其中, 66 例患者死亡, 26 例患者生存, 未出现失访病例。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD- t 检验, 利用 Kaplan-Meier 法对 SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量对患者生存时间的影响进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E2F-1 基因在 SCLC 组织及其癌旁组织中的表达

SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量为 (0.95 \pm 0.10), 高于癌旁组织中的 (0.53 \pm 0.08), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 40.829$, $P = 0.000$)。

2.2 SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 与临床病理特征的关系

SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量与年龄和性别比较, 经 t 检验, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而与临床分期和化疗敏感性比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见附表。

2.3 SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 对患者预后的影响

以 SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量的 P_{25} 值为界值, 将患者分为低表达组 (23 例) 和高表达 (69 例), Kaplan-Meier 生存分析显示, 低表达组患者中位生存时间 53.0 个月, 高表达组患者中位生存时间 22.0 个月; Log-Rank 检验显示, 两组患者生

存时间比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.517$, $P = 0.001$)。见图 1。

附表 临床病理特征与 SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 的关系

指标	例数	E2F-1 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
年龄				
≥ 50 岁	45	0.51 \pm 0.07	1.074	0.143
< 50 岁	47	0.54 \pm 0.09		
性别				
男性	42	0.52 \pm 0.06	0.918	0.180
女性	50	0.55 \pm 0.09		
临床分期				
广泛期	61	0.62 \pm 0.07	17.546	0.000
局限期	31	0.36 \pm 0.08		
化疗敏感性				
敏感	30	0.33 \pm 0.08	16.930	0.000
耐药	62	0.64 \pm 0.10		

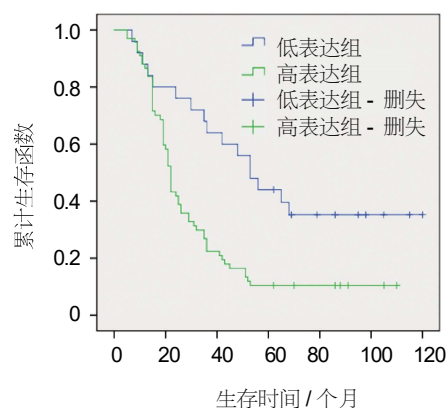


图 1 SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 对患者生存时间的影响

2.4 E2F-1 基因在不同转染组 H69 和 H69AR 细胞中的表达

转染培养 48 h 后, H69 细胞中, E2F-1 mRNA 相对表达量在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 49.824$, $P = 0.000$), E2F-1 过表达组高于阴性对照组和空白对照组; H69AR 细胞中, E2F-1 mRNA 相对表达量在 E2F-1 干扰组、阴性对照组及空白对照组间比较, 差异有统计学意义 ($F = 38.672$, $P = 0.000$), E2F-1 干扰组低于阴性对照组和空白对照组。见图 2、3。

2.5 上调 H69 细胞中 E2F-1 基因表达对化疗药物敏感性的影响

H69 细胞对阿霉素 IC_{50} 值在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较, 经单因素方差分

析,差异有统计学意义 ($F=21.964, P=0.000$), E2F-1 过表达组高于阴性对照组和空白对照组; H69 细胞对顺铂的 IC_{50} 值在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较,差异有统计学意义 ($F=72.752, P=0.000$), E2F-1 过表达组高于阴性对照组和空白对照组; H69 细胞对依托泊苷的 IC_{50} 值在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较,差异有统计学意义 ($F=35.281, P=0.000$), E2F-1 过表达组高于阴性对照组和空白对照组。见图 4。

2.6 抑制 H69AR 细胞中 E2F-1 基因表达对化疗药物敏感性的影响

H69AR 细胞对阿霉素 IC_{50} 值在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F=42.753, P=0.000$), E2F-1 过表达组低于阴性对照组和空白对照组; H69AR 细胞对顺铂 IC_{50} 值在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较,差异有统计学意义 ($F=80.681, P=$

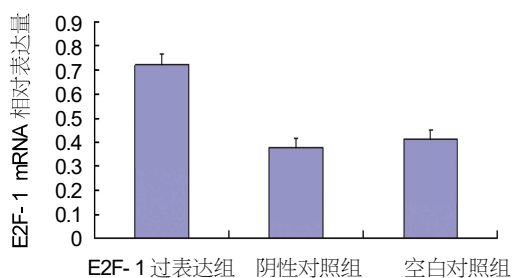


图 2 E2F-1 基因在不同转染组 H69 细胞中的表达

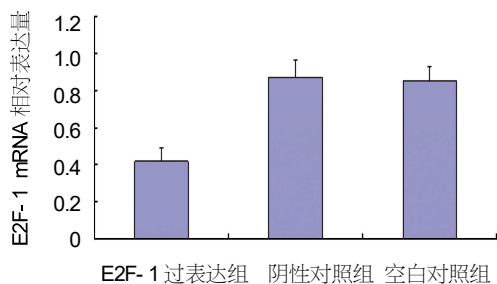


图 3 E2F-1 基因在不同转染组 H69AR 细胞中的表达

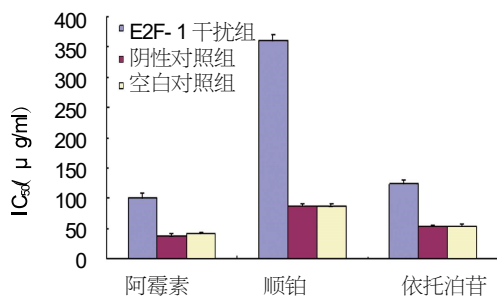


图 4 上调 H69 细胞中 E2F-1 基因表达对化疗药物敏感性的影响

0.000), E2F-1 过表达组低于阴性对照组和空白对照组; H69AR 细胞对依托泊苷 IC_{50} 值在 E2F-1 过表达组、阴性对照组及空白对照组间比较,差异有统计学意义 ($F=64.375, P=0.000$), E2F-1 过表达组低于阴性对照组和空白对照组。见图 5。

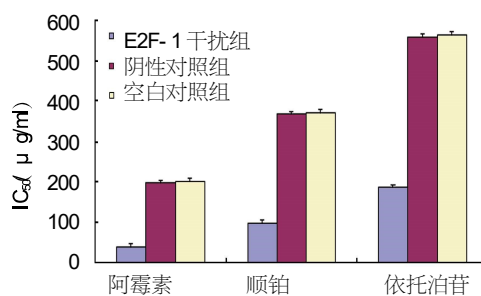


图 5 抑制 H69AR 细胞中 E2F-1 基因表达对化疗药物敏感性的影响

3 讨论

SCLC 作为常见的肺部恶性肿瘤类型,对化疗敏感,初治缓解率较高,但极易出现多药耐药而影响治疗效果^[6],目前,发生化疗耐药的具体机制尚不清楚,积极寻找导致化疗耐药的特异性分子指标,已成为临床研究重点。有研究指出,恶性肿瘤发生多药耐药与细胞周期调控紊乱有关^[7]。E2F-1 作为重要的转录调控因子,在调控细胞周期及细胞增殖中发挥关键性作用^[8],其异常高表达与食管癌^[9]、子宫内膜癌^[10]、膀胱癌等^[11]多种恶性肿瘤发生、进展及转移过程有关,且影响患者预后。本研究显示,SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量高于癌旁组织,说明 E2F-1 高表达可能参与 SCLC 发生过程。与临床病理特征指标相关性分析显示,SCLC 组织中 E2F-1 mRNA 相对表达量与临床分期和化疗敏感性比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$),在局限期、化疗敏感的患者组织中呈低表达,提示 E2F-1 可能参与 SCLC 病程进展及化疗耐药过程。所有患者接受相同的化疗治疗方案,Kaplan-Meier 生存分析显示,低表达组患者中位生存时间 53.0 个月,高于高表达组患者,说明 E2F-1 高表达可影响患者预后,提示 E2F-1 可能通过参与 SCLC 患者多药耐药而影响患者预后。

为进一步探讨 E2F-1 对 SCLC 多药耐药的影响,本研究分别上调人 SCLC 敏感细胞株 H69 细胞中 E2F-1 表达,以及抑制多药耐药细胞株 H69AR 细胞中 E2F-1 表达,结果显示,E2F-1 过表达组 H69 细胞对阿霉素、顺铂及依托泊苷的 IC_{50} 值均高于阴性

对照组和空白对照组,说明上调 H69 细胞中 E2F-1 表达,可抑制 H69 细胞对化疗药物的敏感性,而 E2F-1 干扰组 H69AR 细胞对阿霉素、顺铂及依托泊苷的 IC₅₀ 值均低于阴性对照组和空白对照组,说明下调 H69AR 细胞中 E2F-1 表达,可增强 H69AR 细胞对化疗药物的敏感性,提示 E2F-1 与 SCLC 化疗多药耐药发生密切相关。有研究通过沉默人胃癌耐药裸鼠皮下瘤中 E2F-1 基因发现,E2F-1 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路而降低肿瘤细胞耐药性,加速细胞凋亡^[4]。亦有研究指出,抑制 E2F-1 可抑制耐吉西他滨人胰腺癌细胞中核糖核苷酸还原酶 M2 的表达而增强胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性^[5]。至于 E2F-1 调控 SCLC 多药耐药的具体机制,尚待进一步研究明确。

综上所述,E2F-1 在 SCLC 组织中呈高表达,与患者对化疗敏感性及预后有关,下调 E2F-1 可增强多药耐药细胞株 H69AR 对化疗药物的敏感性。

参 考 文 献:

- [1] KANG H K, UM S W, JEONG B H, et al. The utility of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in patients with small-cell lung cancer[J]. Intern Med, 2016, 55(9): 1061-1066.
- [2] TARTARONE A, LEROSE R, AIETA M. Somatostatin analog therapy in small cell lung cancer[J]. Semin Nucl Med, 2016, 46(3): 239-242.
- [3] YU C J, OU J H, WANG M L, et al. Elevated survivin mediated multidrug resistance and reduced apoptosis in breast cancer stem cells[J]. J BUON, 2015, 20(5): 1287-1294.
- [4] WU Q, LI G, XU F. Resected gastric cancer with D2 dissection: advances in adjuvant chemoradiotherapy and radiotherapy techniques[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2015, 15(6): 703-713.
- [5] LIN Z, REN N, JIANG Y, et al. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer augments gemcitabine-induced apoptosis in human colon cancer cells[J]. Clin Lab, 2015, 61(10): 1435-1444.
- [6] KOINIS F, KOTSAKIS A, GEORGIOULIAS V. Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years[J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(1): 39-50.
- [7] TSOURIS V, JOO M K, KIM S H, et al. Nano carriers that enable co-delivery of chemotherapy and RNAi agents for treatment of drug-resistant cancers[J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(5): 1037-1050.
- [8] WEI W Y, YAN L H, WANG X T, et al. E2F-1 overexpression inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth in vivo[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(2): 491-501.
- [9] 申潞艳, 陈克能. E2F-1 及其相关分子在食管癌中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(8): 1845-1846.
- [10] 杜豆, 彭军, 李智信. Ki-67, E2F-1 在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. 医学伦理与实践, 2014, 27(11): 1507-1508.
- [11] 武倩, 邱敏, 司马学琴, 等. siRNA 沉默 E2F1 对膀胱癌 T24 恶性生物学行为的影响[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2014, 28(1): 1-3.
- [12] 孔凡彪, 王晓通, 谢玉波, 等. 慢病毒 RNA 干扰 E2F-1 对人胃癌裸鼠皮下瘤耐药性的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(9): 655-659.
- [13] DAYLAMI R, MUILENBURG D J, VIRUDACHALAM S, et al. Pegylated arginine deiminase synergistically increases the cytotoxicity of gemcitabine in human pancreatic cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33(11): 102-109.

(童颖丹 编辑)