

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.23.006

文章编号: 1005-8982(2016)23-0027-05

论著

CTR1 和 ATP7B 在人肺腺癌细胞 A549 的表达及其与顺铂耐药的关系

罗霞¹, 陈明伟²

(1.新疆医科大学第一附属医院 呼吸与危重症医学科,新疆 乌鲁木齐 830000;

2.西安交通大学第一附属医院 呼吸内科,陕西 西安 710061)

摘要:目的 探讨人肺腺癌细胞株 A549 和肺腺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP 对顺铂的耐药机制。**方法** 利用噻唑蓝法检测顺铂对 A549/DDP 及其亲代细胞株的细胞毒作用和生长曲线的影响,探讨 A549/DDP 细胞株凋亡敏感性的变化规律。采用 Western blot 检测该细胞株铜离子转运蛋白 1(CTR1)、铜离子转运磷酸化 ATP 酶(ATP7B)及聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)剪切蛋白表达,分析 A549 细胞对顺铂耐药与 CTR1、ATP7B 及 PARP 剪切蛋白表达量的相关性。**结果** A549/DDP 较其亲代细胞株对顺铂引起的细胞毒性和凋亡敏感性下降;较其亲代细胞株 A549/DDP 中 ATP7B 表达增加,CTR1 表达降低。**结论** 人肺腺癌细胞株 A549 对顺铂耐药的产生与细胞凋亡敏感性降低有关,且细胞内 ATP7B 表达增加,CTR1 表达降低,或可作为细胞对顺铂的增敏靶点。

关键词: 顺铂耐药;肺癌 A549 细胞株;铜转运蛋白;铜离子转运磷酸化 ATP 酶;铜离子转运蛋白 1

中图分类号: R91

文献标识码: A

Resistance to cisplatin is mediated by synergistic action of CTR1 and ATP7B in A549 cell line *in vitro*

Xia Luo¹, Ming-wei Chen²

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Respiriology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an, Shannxi 710061, China)

Abstract: Objective To study the mechanisms of cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cell lines A549 and A549/DDP. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 cells and a cisplatin-resistant derivative A549/DDP were treated with varying concentrations of cisplatin. The changes in cell growth, cytotoxicity and apoptosis were explored. Western blot was used to determine the expression of copper transporter 1 (CTR1), copper transporting phosphorylated ATPase (ATP7B) and poly-ADP-ribose polymerase (PARP). The correlations of cisplatin resistance with CTR1, ATP7B and PARP were analyzed. **Results** Compared to the A549 cells, the A549/DDP cells were less sensitive to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis. ATP7B expression increased but CTR1 expression decreased in the A549/DDP cells compared to the A 549 cells. **Conclusions** Our results demonstrate that reduced expression of the copper influx transporter CTR1 and overexpression of the copper efflux transporter ATP7B are responsible for the resistance of A549/DDP cells to cisplatin. These results indicate well that the expression of ATP7B and CTR1 may provide markers for chemoresistance and chemosensitivity, respectively, to cisplatin-based chemotherapy.

Keywords: cisplatin-resistance; lung adenocarcinoma cell line; copper transporters 1; copper transporting phosphorylated ATPase

收稿日期:2016-07-06

肺癌是最常见的一种恶性肿瘤,每年新发肺及支气管癌达 109.52 万,而死亡人数达 95.10 万,位居各种癌症第 1 位。接近 70%肺癌患者在确诊时已经是晚期或全身转移。顺铂已被广泛用于治疗各种恶性肿瘤化疗 20 多年。因其耐药的发生,导致肺癌中仅 < 20% 的患者对化疗有效。有关顺铂耐药的机制,在前期研究中证实可能与铂类药物的转运、解毒、DNA 损伤,以及凋亡蛋白的发现等有关^[1-2],但具体机制尚不清楚。本研究选用人肺腺癌细胞株 A549 及其顺铂耐药细胞株,观察顺铂处理后,耐药细胞和亲代细胞对顺铂的细胞毒性、凋亡敏感性,以及铜离子转运磷酸化 ATP 酶(copper transporting phosphorylated ATPase, ATP7B)、铜离子转运蛋白 1(copper transporters 1, CTR1)表达是否存在差异,进一步探讨细胞耐药机制,为临床解决化疗耐药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞株

无血清细胞冻存培养基(roswell park memorial institute-1640, RPMI 1640)、胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,兔抗人多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抗体、兔抗人 ATP7B、CTR1 抗体、鼠抗兔免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)二抗均购自美国 CST 公司,人 A549 肺癌细胞株、A549/顺铂耐药细胞株[cis-Dichlorodiamineplatinum(II), DDP]均购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 细胞培养及噻唑蓝检测细胞增殖活力

各细胞株置于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中,在 37℃ 二氧化碳 CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。细胞密度调整为 1×10^4 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板,100 μ l/孔。细胞株给予不同浓度的顺铂处理(终浓度依次为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 和 32.00 μ g/ml),分别培养 24 和 48 h 后,加入试剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)150 μ l,震荡 10 min,使噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]还原产物完全溶解。酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处检测光密度(optical density, OD)值,OD 值代表活细胞数量。按以下公式计算细胞活力:细胞生存率(%)=(D 实验组 - D 空白对照)/(D 对照组 - D 空白对照) \times 100%。半数抑制浓度 IC₅₀ 通过 SPSS 16.0

统计软件计算,耐药指数(resistance index, RI)= 耐药细胞株 IC₅₀/ 亲代细胞株 IC₅₀。

1.3 Western blot 检测

收集对数生长期的各细胞株,分别用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液裂解,提取蛋白并定量。聚氰基丙烯酸正丁酯法测定蛋白浓度后,以 30 μ g 总蛋白量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,用湿法转膜至硝酸纤维素(nitrocellulose filter membrane, NC)膜上,转膜后以 5% ~ 10% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,在 1 : 1 000 浓度的 PARP 抗体,兔抗人 ATP7B、CTR1 抗体中温育 16 h,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20, TBST)洗涤 6 次,1 : 3 000 浓度的鼠抗兔 IgG 二抗温育 1 h,洗膜,增强化学发光,显影。以目的条带与内参条带灰度值的比值计算目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两种细胞生长曲线差异用配对样本 *t* 检验,两组细胞不同药物浓度对生存率变化趋势分析采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对耐药细胞 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 的细胞毒性作用

A549/DDP 及其亲代细胞 A549 在分别在 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 和 32.00 μ g/ml 浓度顺铂作用 48 h 后,利用 MTT 法检测 A549/DDP 与亲代细胞 A549 的 OD 值,采用重复测量数据方差分析,结果:①不同浓度顺铂作用下,两组细胞生存率有差别($F=24.829, P=0.000$),②不同浓度对不同细胞的生存率影响有差异($F=24.829, P=0.000$)。见附表。

利用 MTT 法检测顺铂耐药细胞株 A549/DDP 与亲代细胞 A549 在顺铂处理 48 h 后细胞生存曲线,计算 A549 细胞株的 IC₅₀ 为(1.35 \pm 1.97), A549/DDP 细胞株的 IC₅₀ 为(13.77 \pm 3.54), RI 为 10.2。见图 1。

2.2 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 的生长曲线

为观察诱导细胞耐药后,是否影响细胞的增殖速度,绘制耐药细胞 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 的生长曲线。为比较两组细胞增殖速度是否相同,以细胞密度为 1×10^4 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板(共 5 个),100 μ l/孔,每天取 1 块细胞培养板用

附表 A549/DDP 与亲代细胞 A549 在不同浓度顺铂作用下 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

细胞类型	32.00 μ g/ml	16.00 μ g/ml	8.00 μ g/ml	4.00 μ g/ml	2.00 μ g/ml	1.00 μ g/ml	0.50 μ g/ml	0.25 μ g/ml
A549	0.029 \pm 0.262	0.055 \pm 0.286	0.089 \pm 0.273	0.188 \pm 0.35	0.459 \pm 0.252	0.546 \pm 0.236	0.683 \pm 0.163	0.763 \pm 0.107
A549/DDP	0.413 \pm 0.273	0.473 \pm 0.293	0.971 \pm 0.262	0.620 \pm 0.303	0.813 \pm 0.240	0.894 \pm 0.247	0.899 \pm 0.153	0.929 \pm 0.117

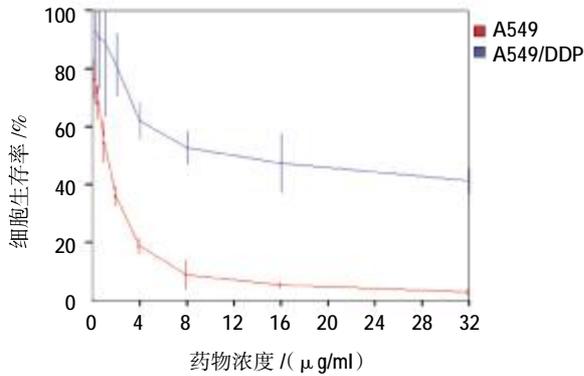


图 1 顺铂耐药细胞 A549/DDP 与亲代细胞 A549 经顺铂处理 48 h 后细胞生存曲线

MTT 法测得 OD 值,5 d 后,使用 SPSS 统计软件对每天测得 OD 值采用配对样本 *t* 检验,两组细胞 OD 值比较,差异无统计学意义($t=0.968$,自由度=4,双侧检验 $P=0.339$),说明顺铂诱导耐药后,细胞增殖未受影响,因此该细胞株适合用于顺铂耐药性研究。见图 2。

2.3 顺铂对耐药细胞 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 凋亡敏感性的影响

将两组细胞分别用不同浓度顺铂处理 24 h 后,提取蛋白,利用 Western blot 检测 PARP 的剪切情况。人肺腺癌亲代细胞株 A549 在 2 μ g/ml 顺铂浓度开始出现 PARP 剪切,而其顺铂耐药细胞株 A549/DDP 需要增加顺铂干预浓度,在 16 μ g/ml 时开始出现 PARP 剪切,且剪切片段的表达逐渐增强。根据 A549/DDP 发生 PARP 剪切浓度上升(阳性结果即可

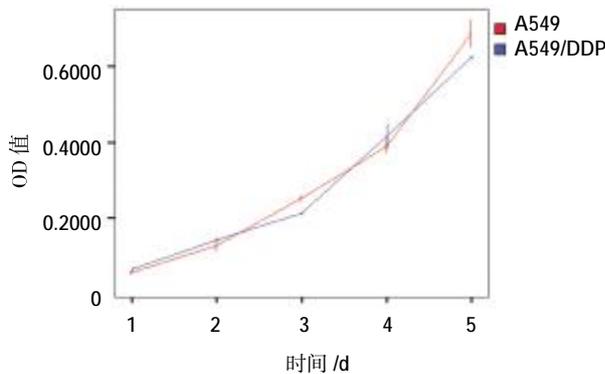


图 2 顺铂耐药细胞 A549/DDP 与亲代细胞 A549 5 d 内的生长曲线

说明),说明人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 较其亲代细胞株的凋亡敏感性下降。见图 3。

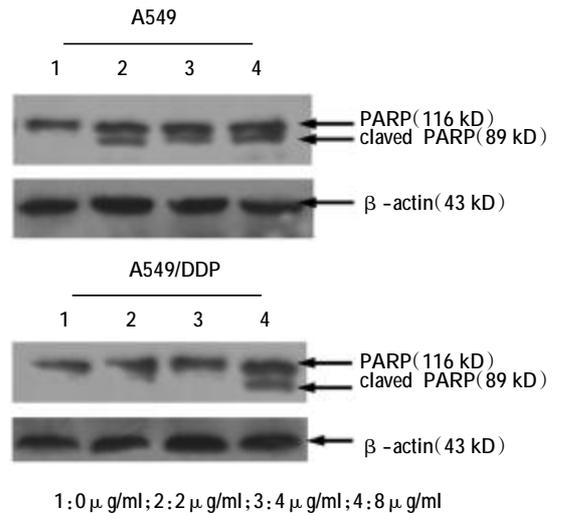


图 3 顺铂处理耐药细胞株 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 24 h 后引起的 PARP 剪切

2.4 顺铂对耐药细胞 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 细胞膜上 ATP7B 表达的影响

利用 Western blot 检测顺铂处理耐药细胞株 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 经 5 μ g/ml 顺铂处理 48h 后 ATP7B 蛋白的表达水平。可见,经药物处理后,人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的 ATP7B 表达量较其亲代细胞株明显增加。见图 4。

2.5 顺铂对耐药细胞 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 细胞膜上 CTR1 表达的影响

利用 Western blot 检测 A549/DDP 细胞株及其亲代细胞 A549 经 15 μ g/ml 顺铂处理 5min 后细胞

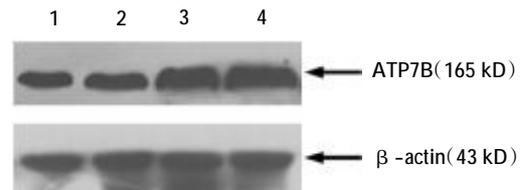
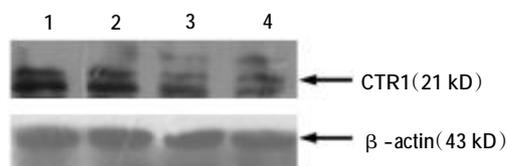


图 4 顺铂处理耐药细胞株 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 经 5 μ g/ml 顺铂处理 48 h 后 ATP7B 蛋白的表达水平

膜 CTR1 蛋白的表达水平。可见, 无顺铂干预时 (0 $\mu\text{g/ml}$), 人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 中 CTR1 的表达量明显少于其亲代细胞株。而利用 15 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂干预细胞 5 min 后, 两细胞细胞株的 CTR1 表达量较未行顺铂干预时并无明显变化。见图 5。



1:0 $\mu\text{g/ml}$ A549 ; 2:15 $\mu\text{g/ml}$ A549 ; 3:0 $\mu\text{g/ml}$ A549/DDP; 4:15 $\mu\text{g/ml}$ A549/DDP

图 5 顺铂处理耐药细胞株 A549/DDP 及其亲代细胞 A549 经 15 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂处理 5 min 后 CTR1 蛋白的表达水平

3 讨论

全身化疗是目前大多数非小细胞肺癌患者的主要治疗手段, 而主要的铂类方案有效率只有 30% ~ 47%。肿瘤细胞对抗癌药物耐药是临床化疗失败的主要原因。克服肿瘤细胞耐药性, 提高抗癌药物疗效, 是目前临床上亟需解决的问题。然而肿瘤耐药产生是一个多途径、多环节、多重机制的过程, 需深入研究以阐明其机制。

文献中报道, 人肺腺癌顺铂耐药细胞株对顺铂的抗性是亲代细胞的 7.88 倍^[9], 在不含药物的培养基中稳定培养几个月耐药性仍然不变化。本研究结果表明, 人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 较其亲代细胞株耐药指数为 10.2, 本实验中 A549/DDP 耐药指数稍高于文献报道数值, 主要考虑与细胞实验前用低浓度顺铂 (2 $\mu\text{g/ml}$) 稳定培养 2 个月左右, 增加了细胞的耐药性。通过绘制 A549、A549/DDP 生长曲线, 发现两细胞株经过顺铂药物诱导后, 增殖速度未受到影响, 因此认为该细胞株适合用于顺铂耐药性研究。

PARP 是一种重要的 DNA 修复基因, 在细胞凋亡的研究中, 可作为凋亡的标志。目前, 对于 PARP 的单核苷酸多态性与肿瘤的易感性研究, 主要集中在生殖系肿瘤、肺癌、乳腺癌等方面。其是碱基切除修复系统通路的核心成员之一, 在维持基因组稳定性及调节转录方面发挥重要作用。研究表明, PARP 的高度保守的接触反应区存在的两个多态性位点与吸烟的交叉作用可明显增加肺癌的易感性^[4]。PARP 基因多态性与非小细胞肺癌铂类化疗敏感性相关尚无定论^[9]。本实验中 A549 细胞株在顺铂浓度

2 $\mu\text{g/ml}$ 是即出现 PARP 剪切, 而在 A549/DDP 细胞株中, 顺铂浓度达 16 $\mu\text{g/ml}$ 后出现 PARP 剪切, 说明人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 对顺铂引起的凋亡敏感性减低。

顺铂的分子极性高, 不易通过扩散方式穿过细胞膜, 进入细胞。铜离子转运蛋白家族包括铜离子转运蛋白家族包括铜离子转运蛋白和铜离子转运磷酸化 ATP 酶。ATP7A 和 ATP7B 是主要的铜离子泵出蛋白, 两者也参与转运铂类药物出胞^[6]。KOMATSU 等^[7]在调节铂类药物对细胞耐药性研究中首次提出, ATP7B 过度表达表现出对高浓度顺铂药物的耐受性。鼠在体实验发现, ATP7B 降调节使肿瘤细胞生长减少 40%, 且会增加顺铂的化疗效果^[8]。非小细胞肺癌细胞异位种植试验证实, ATP7B 表达与顺铂耐药有关, 对顺铂耐药细胞中 ATP7A、ATP7B 基因表达水平高于敏感细胞, 可以作为非小细胞癌耐药标记物^[9]。YIN 等^[10]发现, 在体外检测 21 例确诊肺癌的标本对铂类药的敏感性, 采用逆转录聚合酶链反应监测 ATP7B 基因的表达, 结果发现, 铂类耐药的肺癌比铂类敏感的肺癌 ATP7B 的表达要高。以上结果表明, ATP7B 可能参与铂类抗肿瘤药物的泵出。本实验中, 人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的 ATP7B 表达量较其亲代细胞株增加, 且随着干预药物浓度增高呈逐渐上升趋势。

CTR1 是主要的铜离子摄入蛋白, 研究证实其参与铂类抗肿瘤药物的摄入。LEE 等^[11]采用 RT-PCR 检测 40 例卵巢癌患者中 CTR1 和 CTR2 的表达水平, 研究表明, CTR1 的高表达是对铂类药高敏感和高生存率预后的预测因子之一, 而 CTR2 的高表达与 CTR1 的低表达的卵巢癌患者对铂类药愈耐药和生存期愈短。CHEN 等^[12]采用免疫组织化学法研究发现, 54 例初次接受铂类化疗的 III 期非小细胞肺癌患者中, CTR1 高表达的化疗反应效果越好, PFS 及 OS 越好, 结果表明, CTR1 不仅是一种独立的铂类化疗的预测因子, 也是一种很好的预后因子。XU 等^[13-14]对 282 例经过 ≥ 2 周期以顺铂为基础化疗的非小细胞肺癌患者通过单核苷酸多态性研究发现, CTR1 基因多态性 rs7851395 和 rs12686377 与非小细胞肺癌对顺铂耐药相关, GT 单体型的患者对顺铂耐药性增加, 而 AG 单体型患者生存期较长, 同时发现非小细胞患者 rs10981694 为 C 等位基因时, 对顺铂的敏感性和耳毒性均增加。文献报道, 哺乳动物 CTR1 在细

胞内铂类药物积聚研究发现,CTR1 促进药物的入胞作用发挥于药物吸收早期;CTR1 缺失会减少早期顺铂的入胞,其药物暴露的前 5 min 吸收减少 81%^[5]。本实验中,不同浓度顺铂诱导下人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的 CTR1 的表达量较其亲代细胞株减少。但是 15 μ g/ml 顺铂干预细胞 5 min 后,两细胞细胞株的 CTR1 表达量并无明显变化。

总之,人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 细胞中 ATP7B 表达较其亲代细胞增加,而 CTR1 表达较亲代细胞降低,从而使细胞内顺铂蓄积减少,可以推断肺癌细胞对顺铂的耐药与细胞内 ATP7B 表达增加,CTR1 表达降低相关,同时顺铂进出细胞可能对铜离子转运通道存在一定的依赖性。铜离子转运蛋白 ATP7B、CTR1 与肺腺癌细胞对顺铂耐药存在明显相关性,人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的凋亡敏感性下降,该研究对临床克服肿瘤细胞对顺铂耐药有重要意义。

参 考 文 献:

- [1] LI R, LIU G Z, LUO S Y, et al. Cyclin I promotes cisplatin resistance via Cdk5 activation in cervical cancer [J]. *European Review for Medical Pharmacological Sciences*, 2015, 19(23): 4533-4541.
- [2] XI Z, GUO W, TIAN C, et al. Copper binding modulates the platination of human copper chaperone Atox1 by antitumor transplatinum complexes[J]. *Metallomics*, 2014, 6(3): 491-497.
- [3] SONG L, LI Y, LI W, et al. miR - 495 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to platinum by modulation of copper-transporting p-type adenosine triphosphatase a (ATP7A)[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2014, 115(7): 1234-1242.
- [4] LI Z, GUAN W, LI M X, et al. Genetic polymorphism of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population[J]. *Archives of Medical Research*, 2011, 42(3): 226-234.
- [5] LI D R, YANG Y Q, LING T, et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Tumor*, 2011, 31(4): 348-353.
- [6] MIGOCCA M. Copper-transporting ATPases: the evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems[J]. *International Union of Biochemistry Molecular Biology Life*, 2015, 67(10): 737-745.
- [7] KOMATSU M, SUMIZAWA T, MUTOH M, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(5):1312-1316.
- [8] KATAGIRI H, NAKAYAMA K, RAHMAN M T, et al. Is ATP7B a predictive marker in patients with ovarian carcinoma treated with platinum-taxane combination chemotherapy [J]. *International Journal of Gynecological Cancer Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 2013, 23(1): 60-64.
- [9] LI Z H, QIU M Z, ZENG Z L, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7A) is associated with platinum-resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10(1): 1409.
- [10] YIN T, ZHANG J, YAN S, et al. FATS expression is associated with cisplatin sensitivity in non small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3): 416-422.
- [11] LEE Y Y, CHOI C H, DO I G, et al. Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(2): 361-365.
- [12] CHEN H H, YAN J J, CHEN C, et al. Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy[J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(2): 228-234.
- [13] XU X, DUAN L, ZHOU B, et al. Genetic polymorphism of copper transporter protein 1 is related to platinum resistance in Chinese non-small cell lung carcinoma patients [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(9): 786-792.
- [14] XU X, REN H, ZHOU B, et al. Prediction of copper transport protein 1 (CTR1) genotype on severe cisplatin induced toxicity in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(2): 438-442.
- [15] LARSON C A, BLAIR B G, SAFAEI R, et al. The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(2): 324-330.

(童颖丹 编辑)