文章编号:1000-5404(2012)01-0005-04

论著

沉默孕烷X受体增强结肠癌LS174T细胞对奥沙利铂敏感性的影响

江 恒[1,2],陈 健[2],陈克力[1],李建军[1],潘 凤[1],梁后杰[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科[1];610021 成都,解放军第452医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 观察沉默孕烷X受体(pregnane X receptor,PXR)表达对结肠癌细胞奥沙利铂化疗敏感性的影响,初步探讨其可能机制。**方法** 构建PXR基因的siRNA质粒表达载体,转染结肠癌LS17T细胞,并建立稳定表达细胞,用RT-PCR和Western blot方法检测特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)和多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associate protein 3, MRP3)表达,MTT方法检测奥沙利铂化疗敏感性。**结果** 成功建立PXR敲低细胞克隆PXRi 1#、PXRi 2#;在PXRi 1#和PXRi 2#细胞克隆中,MRP3 mRNA及蛋白表达明显下降,SP1表达也下降;与PXRi control相比,细胞克隆PXRi 1#、PXRi 2#奥沙利铂的IC_{50}值均显著降低[(4.83±0.22)、(4.75±0.19) *vs* (9.44±0.37),$P<0.05$]。**结论** PXR表达沉默可增强结肠癌LS174T细胞对奥沙利铂化疗敏感性,这可能与PXR沉默后,SP1、MRP3表达下调相关。

[关键词] 孕烷X受体;结肠肿瘤;多药耐药;奥沙利铂
[中图法分类号] R73-362;R735.35;R979.11 [文献标志码] A

Silencing pregnane X receptor improves chemosensitivity of colon cancer LS174T cells to oxaliplatin

Jiang Heng[1,2], Chen Jian[2], Chen Keli[1], Li Jianjun[1], Pan Feng[1], Liang Houjie[1] ([1] Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 400038, Chongqing; [2] Department of Oncology, No. 452 Hospital of PLA, Chengdu, Sichuan Province, 610021, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of silencing pregnane X receptor (PXR) expression by RNA interference on the chemosensitivity of LS174T cells to oxaliplatin. Methods The PXR RNAi expression plasmids were constructed, and then transfected LS174T cells to establish stable transfection cell clones. The expression of specificity protein (SP) 1 and multidrug resistance-associate protein 3 (MRP3) were detected by RT-PCR and Western blotting. The chemosensitivity of the transfected and nontransfected cells to oxaliplatin was evaluated by MTT assay. Results The cell clones PXRi 1# and PXRi 2# with stable PXR silence were constructed successfully. In cell clones PXRi 1# and PXRi 2#, the expression of MRP3 at mRNA and protein levels was decreased markedly, and that of SP1 also was decreased. Compared with control group, the IC_{50} of PXRi 1# and PXRi 2# cells to oxaliplatin was significantly decreased (4.83±0.22 and 4.75±0.19 *vs* 9.44±0.37, $P<0.05$). Conclusion Interference of PXR expression can elevate the chemosensitivity of LS174T cells to oxaliplatin, which might be through PXR knock-down downregulating SP1 and MRP3.

[**Key words**] pregnane X receptor; colon neoplasms; multidrug resistance; oxaliplatin

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172114) and the Project of Medical Research of Sichuang Health Department (100188). Corresponding author: Liang Houjie, Tel: 86-23-68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,以铂类方案为基础的化疗是结肠癌主要治疗手段之一。目前结肠癌化疗效果仍不理想,多药耐药形成是化疗失败的主要原因。孕烷X受体(pregnane X receptor,PXR)是核受体超家族成员之一,可调控众多药物代谢和转运靶基因表达。近来研究发现PXR可通过调节药物代谢和转运,参与肿瘤多药耐药[1]。本研究通过RNAi技术抑制人结肠癌LS174T细胞PXR表达,观察LS174T细胞对奥沙利铂的化疗敏感性变化,并初步探讨其可能

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172114);四川省卫生厅科研课题(100188)
[通信作者] 梁后杰,电话:(023)68754128,E-mail:lianghoujie@sina.com

作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Trizol试剂(Invitrogen, 美国),M-MLV酶(Promega,美国),2×*Taq* MasterMix(北京天根生化),Mem-PER真核膜蛋白提取试剂盒、NE-PER核蛋白抽提试剂盒和化学发光试剂盒(Pierce,美国),SDS-PAGE凝胶试剂盒(北京赛驰生物),特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)、多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associate protein 3, MRP3)、α-Tubulin等一抗和相应的IgG-HRP标记二抗购自Santa Cruz公司。

1.2 靶向PXR的shRNA质粒构建

参照冷泉港实验室(cold spring harbor laboratory)方法,选取2条已证实有效的PXR基因RNAi靶序列:1#,5′-CTTCTC-CCATTTCAAGAAT-3′;2#,5′-GCATCCATTTGAACACATT-3′。经Blast分析进一步确认其靶序列特异性。由上海吉凯基因化学技术有限公司根据靶序列信息构建PXR shRNA质粒及测序鉴定(图1)。PXR shRNA质粒相应地被命名为PXRi 1#和PXRi 2#。相应阴性对照干扰质粒由上海吉凯公司提供,其靶序列为:5′-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3′,质粒被命名为PXRi control。

1.3 细胞培养和稳定转染

人结肠癌LS174T细胞由本科室传代保存。我们以前的研究已建立及鉴定PXRi control、PXRi 1#和PXRi 2#稳定转染细胞克隆[2]。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

按Trizol试剂说明提取细胞总RNA,并逆转录合成cDNA。参照文献[3]的方法设置PCR反应体系及循环条件,引物序列:MRP3(157 bp)上游:5′-AAAAGCAGACGGCACGACA-3′,下游:5′-GCAGGCACTGATGAGGAAGC-3′;GAPDH(224 bp)上游:5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGTATTG-3′,下游:5′-CCTGGAA-GATGGTGATGGGATT-3′。GAPDH为内参照。

1.5 Western blot分析

参照相应试剂盒说明书,提取细胞膜蛋白和核蛋白。BCA法测定蛋白质浓度。Western blot分析SP1(106×10^3)和MRP3(169×10^3)蛋白表达,其变性,上样,电泳,转膜,加一抗、二抗,化学显色,成像等步骤参照我们以前的方法[2-3]。以α-Tubulin(55×10^3)和β-actin(42×10^3)分别作为核蛋白和膜蛋白内参照。

1.6 MTT法检测奥沙利铂敏感性

将细胞接种于96孔板,每孔约1×10^4个细胞,每组设定3个复孔。24 h后换液加200 μl含不同浓度(0.8~80.0 μg/ml)奥沙利铂的培养基,继续培养48 h,加MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,4 h后吸去培养液,加150 μl DMSO,在微孔板振荡器上振荡10 min。用Model 550型酶标仪在波长490 nm测光密度值[D(490)]。按下式计算细胞增殖抑制率:抑制率=[1-实验孔平均D(490)值/对照孔平均D(490)值]×100%。用IC_{50}计算软件计算IC_{50}值。实验重复3次,取均值。

1.7 统计学分析

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 重组质粒鉴定和转染

测序结果与所选靶序列完全相符(1#:5′-CTTCTC-CCATTTCAAGAATCGTCTTGAAATTCTTGAAATGGGAGAAG-3′;2#:5′-GCATCCATTTGAACACATTCGTCTTGAAAATGTGTTCAA-ATGGATGC-3′),表明重组质粒构建成功(图1、2)。质粒转染及G418筛选后4周,细胞克隆均带明亮的绿色荧光(图3)。

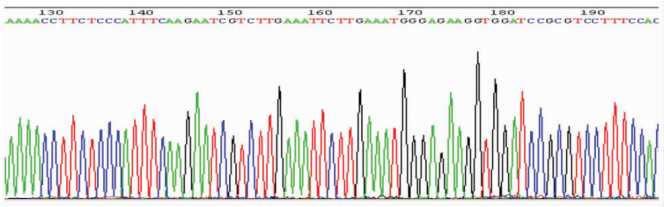


图1 PXRi 1# 质粒测序结果

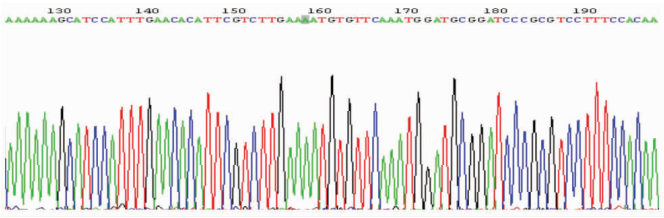


图2 PXRi 2# 质粒测序结果

2.2 PXR敲低对人结肠癌细胞奥沙利铂化疗敏感性的影响

各组细胞经奥沙利铂作用48 h,用MTT法检测细胞活力。与野生型LS174T细胞相比,PXRi control组细胞对奥沙利铂的IC_{50}值无明显变化($P>0.05$);与PXRi control组相比,PXRi 1#、PXRi 2#组细胞对奥沙利铂的IC_{50}值均明显下降($P<0.05$)。见表1。

表1 PXR敲低后人结肠癌细胞对奥沙利铂IC_{50}值变化

(μg/ml, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IC_{50}
野生型LS174T组	9.12±0.31
PXRi control组	9.44±0.37
PXRi 1#组	4.83±0.22[a]
PXRi 2#组	4.75±0.19[a]

a:$P<0.05$,与PXRi control组比较

2.3 敲低PXR表达对结肠癌细胞耐药基因MRP3表达的影响

RT-PCR检测结果显示:在PXRi 1#和PXRi 2#细胞克隆中,MRP3 mRNA表达明显下降(图4),Western blot分析进一步证实:沉默PXR表达后,MRP3膜蛋白表达明显下降;而PXRi control组与野生型LS174T组MRP3膜蛋白表达无明显变化,见图5。结果提示特异性沉默PXR基因表达可降低LS174T细胞耐药基因MRP3表达。

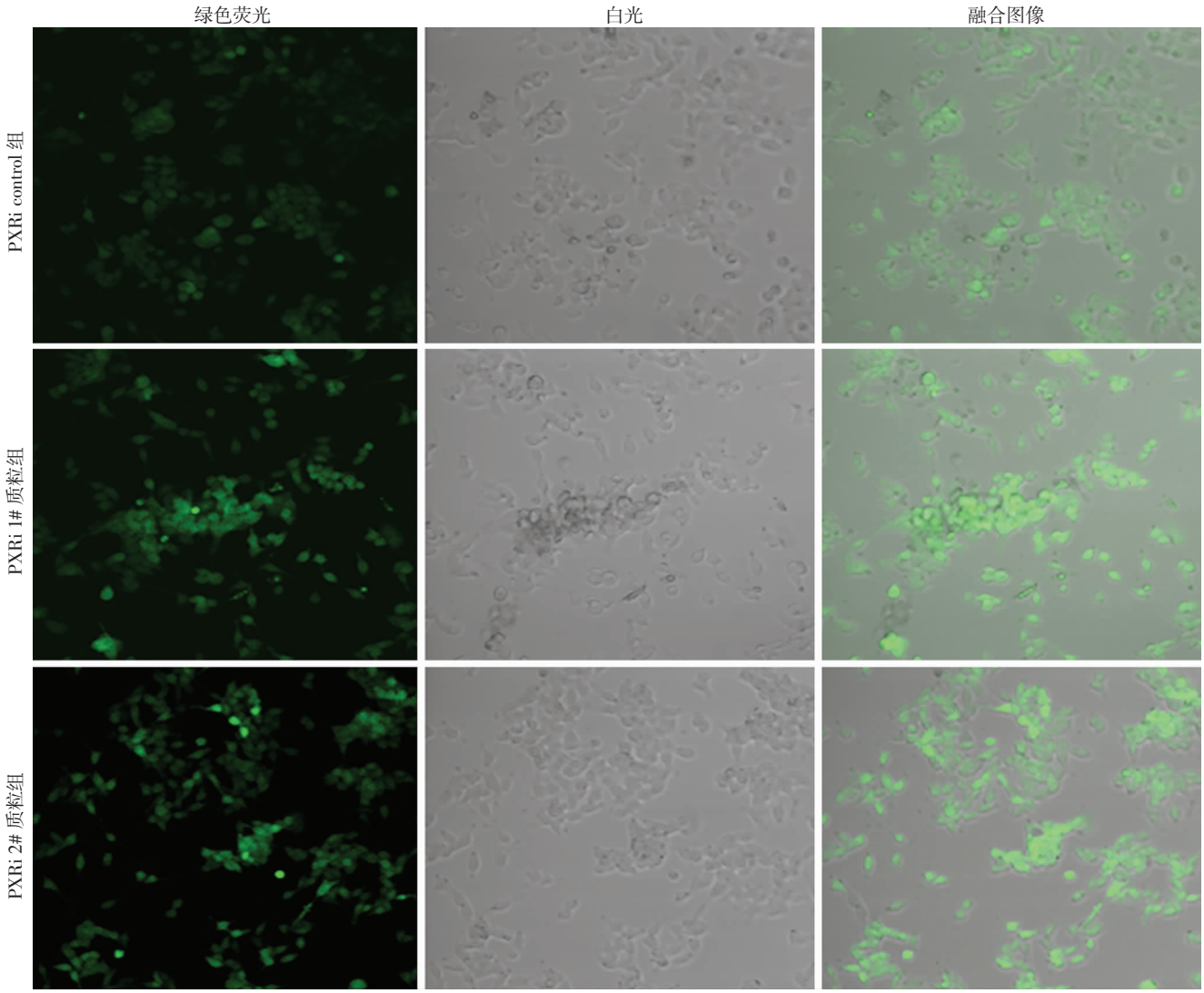
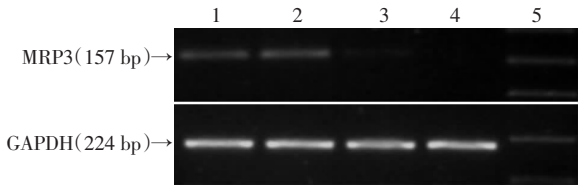
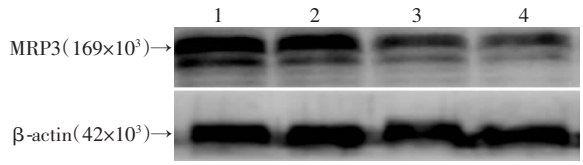


图 3　稳定筛选后激光共聚焦显微镜观察各组细胞 GFP 的表达　（×200）



1：野生型 LS174T 组；2：PXRi control 组；3：PXRi 1#组；4：PXRi 2#组；5：标准

图 4　RT-PCR 检测 PXR 敲低后 MRP3 mRNA 表达

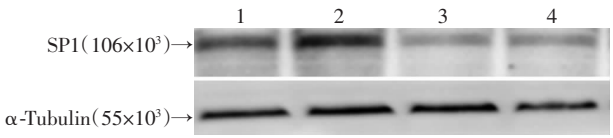


1：野生型 LS174T 组；2：PXRi control 组；3：PXRi 1#组；4：PXRi 2#组

图 5　Western blot 检测 PXR 敲低后 MRP3 蛋白表达

2.4　敲低 PXR 表达对结肠癌细胞核转录因子 SP1 表达的影响

Western blot 检测结果显示：在 PXRi 1# 和 PXRi 2# 细胞克隆中，SP1 蛋白表达明显下降；而 PXRi control 组与野生型 LS174T 组 SP1 表达无明显变化，图 6 所示。结果提示沉默 PXR 表达后，在细胞核蛋白中，核转录因子 SP1 表达也相应下降。



1：野生型 LS174T 组；2：PXRi control 组；3：PXRi 1#组；4：PXRi 2#组

图 6　Western blot 检测 PXR 敲低后 SP1 蛋白表达

3　讨论

肿瘤细胞对化疗药物的耐药是一个多基因、多因素和多步骤的复杂过程。孕烷 X 受体（PXR）是一种配体活化的核转录因子，它调控的靶基因涉及众多药物代谢酶及药物转运体，包括：①药物Ⅰ相代谢酶细胞色素氧化酶，如 CYP3A4、CYP2C9（代谢约 16% 临床处方药）、CYP2C19 和 CYP2B6 等，其中 CYP3A4 是表达

最广泛的细胞色素氧化酶,几乎代谢50%以上的处方药,包括部分抗癌药物;②药物Ⅱ相代谢还原酶,如UDP-葡萄糖苷酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferases,UGTs)和谷光苷肽S转移酶(Glutathione S-transferases,GSTs)等;③药物Ⅲ相转运体,如MDR1、MRP2、MRP3和乳腺癌耐药相关蛋白(breast cancer resistance protein,BCRP)等[1]。这些靶基因都参与肿瘤多药耐药形成。PXR可能通过对其靶基因调控,介导药物之间相互作用及个体对药物的反应差异,改变肿瘤细胞内药物代谢和转运,从而影响肿瘤患者化疗敏感性。PXR涉及MDR机制众多位点,这可能更符合体内多药耐药形成本质。近来研究发现PXR与肿瘤耐药相关。Mensah-Osman等[4]发现PXR蛋白表达水平与骨肉瘤细胞对足叶乙甙的耐药直接相关。Chen等[5]发现在前列腺癌细胞PC3中,PXR配体SR12813预处理后,可提高细胞对紫杉醇和长春新碱的耐受性,而下调PXR表达可增强细胞对化疗药物的敏感性。Gupta等[6]也发现利福平活化PXR后,可促进卵巢癌细胞增殖和提高其对化疗药物的耐受性。Raynal等[7]发现PXR表达提高SN-38葡萄苷酸化降低结肠癌细胞对伊立替康的敏感性。与他们的结果相似,本研究也证实,用RNAi技术特异性抑制结肠癌LS174T细胞PXR表达后,细胞对奥沙利铂的化疗敏感性增强。

MRP3是PXR调控的靶基因之一,它在肿瘤耐药中的作用已被证实[8]。在肿瘤细胞中MRP3与铂类药物耐药相关[9]。Campa等[10]的研究提示MRP3与结肠癌化疗的遗传药理学有潜在的关联。这些研究提示MRP3可能与结肠癌铂类药物耐药密切相关。本研究也发现MRP3表达下降后,结肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性也明显增强。

有研究发现MRP3启动子区-211 bp多态性影响其表达调控,此区域含多个SP1结合位点(即GC盒)[11]。SP1可结合于人和大鼠MRP3/Mrp3启动子上游的相应结合位点,上调MRP3/Mrp3的表达[12]。Chen等[13]发现RXRα/RARα可通过减少SP1与MRP3启动子上游的GC结合,从而抑制MRP3的转录。本研究发现PXR沉默后,核蛋白中SP1表达及细胞膜蛋白MRP3表达相应下降,这提示PXR沉默后,可能影响SP1与启动子相应位点结合,从而下调MRP3表达。

PXR靶基因涉及众多耐药相关基因,RNAi特异性抑制PXR表达后,可能会相应地改变其耐药靶基因表达,从而影响结肠癌细胞对化疗药物的敏感性。本研究观察到特异性沉默PXR基因表达可相应降低LS174T细胞MRP3表达,这可能是影响奥沙利铂化疗敏感性的重要因素之一,其他耐药相关基因如MDR1、CYP3A4等也可能涉及其中。综上所述,RNAi特异性敲低PXR表达,可能通过SP1抑制耐药基因MRP3的表达,从而增强结肠癌LS174T细胞对奥沙利铂的化疗敏感性。

参考文献:

[1] Chen T. Overcoming drug resistance by regulating nuclear receptors [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(13): 1257-1264.

[2] 江恒, 陈文生, 陈克力, 等. 核受体PXR对人结肠癌细胞增殖和化疗敏感性的影响[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(11): 2012-2015.

[3] 江恒, 陈克力, 何建明, 等. 核受体PXR与耐药相关基因在结肠癌中的表达及意义[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(2): 144-147.

[4] Mensah-Osman E J, Thomas D G, Tabb M M, *et al*. Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines[J]. Cancer, 2007, 109(5): 957-965.

[5] Chen Y, Tang Y, Wang M T, *et al*. Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10361-10367.

[6] Gupta D, Venkatesh M, Wang H, *et al*. Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(17): 5332-5340.

[7] Raynal C, Pascussi J M, Leguelinel G, *et al*. Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 46.

[8] Lagas J S, Fan L, Wagenaar E, *et al*. P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1): 130-140.

[9] Risch A, Dally H, Müller P, *et al*. MRP3-polymorphisms influence the response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients[J]. Proc Am Assoc Cancer Res, 2005, 46: 1452.

[10] Campa D, Vodicka P, Pardini B, *et al*. Could polymorphisms in ATP-binding cassette C3/multidrug resistance associated protein 3 (ABCC3/MRP3) modify colorectal cancer risk? [J]. Eur J Cancer, 2008, 44(6): 854-857.

[11] Gradhand U, Tegude H, Burk O, *et al*. Functional analysis of the polymorphism -211C>T in the regulatory region of the human ABCC3 gene[J]. Life Sci, 2007, 80(16): 1490-1494.

[12] Tzeng S J, Chang W C, Huang J D. Transcriptional regulation of the rat Mrp3 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members and CCAAT/enhancer binding proteins[J]. J Biomed Sci, 2005, 12(5): 741-761.

[13] Chen W, Cai S Y, Xu S, *et al*. Nuclear receptors RXRalpha: RARalpha are repressors for human MRP3 expression[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(5): G1221-G1227.

(**收稿**:2011-08-31;**修回**:2011-10-10)

(编辑 汪勤俭)