文章编号:1000-5404(2012)11-1083-04

论著

SSAT2 通过抑制 HIF-1α 表达增强肾癌 Caki-1 细胞化疗敏感性

曹 进[1],张献全[1],曾维威[1],宋梦龙[2],王关嵩[3] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肿瘤科[1];610072 成都,四川省人民医院急救中心[2];400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所[3])

[摘要] **目的** 探讨转染精脒/精胺 N1 乙酰基转移酶 2(spermidine/spermine N^1-acetyltransferase 2,SSAT2)在低氧条件下对肾癌 Caki-1 细胞增殖、凋亡和阿霉素敏感性的影响及机制。**方法** 经 X-treme GENE HP 介导将真核表达质粒 pcDNA3.1(D)/V5-His-SSAT2 转入肾癌 Caki-1 细胞,细胞在 1% 氧浓度下培养,Western blot 法检测 SSAT2 蛋白和低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1α)蛋白表达;流式细胞仪检测细胞的凋亡率、死亡率;MTT 法检测细胞的增殖,以及不同浓度阿霉素对细胞的抑制率。**结果** SSAT2 成功转入肾癌 Caki-1 细胞,与空白细胞组及空载体组比较,转染 SSAT2 组 HIF-1α 蛋白表达明显下调($P<0.01$),细胞增殖受到明显抑制($P<0.01$),细胞凋亡率和死亡率均增加($P<0.05$)。阿霉素浓度为 2 μg/ml 时,转染组细胞抑制率可达(67.5±3.7)%,对空白细胞和空载体细胞的抑制率为(54.7±8.4)%、(56.8±7.7)%,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 转染 SSAT2 可以通过下调 HIF-1α 蛋白表达,减少肾癌细胞的增殖,增加肾癌 Caki-1 细胞的凋亡率、坏死率和对阿霉素的敏感性,针对 SSAT2 的基因治疗可能成为逆转肾癌耐药的方法之一。

[关键词] 精脒/精胺 N1 乙酰基转移酶 2;缺氧诱导因子-1α;肾肿瘤;肿瘤细胞,培养的;阿霉素
[中图法分类号] R394-33;R73-361;R737.11 [文献标志码] A

Spermidine/spermine N^1-acetyltransferase 2 increases sensitivity of renal carcinoma Caki-1 cells to chemotherapy by inhibiting HIF-1α

Cao Jin[1], Zhang Xianquan[1], Zeng Weiwei[1], Song Menglong[2], Wang Guansong[3] ([1]Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Emergency Center, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan Province, 610072; [3]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of spermidine/spermine N^1-acetyltransferase 2 (SSAT2) on the proliferation and apoptosis in renal carcinoma Caki-1 cells and cell sensitivity to adriamycin under hypoxic condition. **Methods** Plasmid pcDNA3.1(D)/V5-His-SSAT2 was transfected into Caki-1cells with X-treme GENE HP. Caki-1 cells were cultured under hypoxia condition. Expression of SSAT2 and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1α) protein was detected by Western blotting. Apoptotic and necrotic rates of Caki-1 cells were assayed by flow cytometry. Proliferation of Caki-1 cells and inhibitory effect of adriamycin on proliferation of Caki-1 cells were detected by MTT assay. **Results** The SSAT2 was successfully transfected into Caki-1 cells. The expression level of HIF-1α and the proliferation level of Caki-1 cells were significantly lower while the apoptotic and necrotic rates of Caki-1 cells were significantly higher in SSAT2 transfection group than in blank cell group and empty vector group ($P<0.01$). The inhibitory rate of adriamycin on SSAT2 transfected Caki-1 cells could reach (67.5±3.7)%, while only (54.7±8.4)% and (56.8±7.7)% respectively in blank cell group and empty vector group when adriamycin was administrated at the concentration of 2 μg/ml ($P<0.01$). **Conclusion** SSAT2 inhibits the proliferation and improves the apoptotic and necrotic rates of Caki-1 cells, enhances the sensitivity of Caki-1 cells to adriamycin by down-regulating the expression of HIF-1α protein. SSAT2 targeting therapy may thus become one of the methods for reversing the drug-resistance of renal carcinoma.

[**Key words**] spermidine/spermine n1-acetyltransferase 2; hypoxia-inducible factor-1 alpha; kidney neoplasm; tumor cell, cultured; adriamycin

Corresponding author: Zhang Xianquan, E-mail: xqzhng@hotmail.com

[通信作者] 张献全,E-mail:xqzhng@hotmail.com

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是肿瘤细胞为适应缺氧微环境而表达的一种核转录因子,与多种肿瘤生物学行为密切相关。研究显示HIF-1在多种肿瘤中高表达,促进肿瘤细胞的生长并且影响肿瘤细胞对放化疗的耐受性[1]。HIF-1α是HIF-1的功能亚基,处于表达与降解的动态平衡。低氧情况下,HIF-1α不被降解,在胞浆内积聚并进入胞核与HIF-1β结合从而调控下游基因的转录及表达。精脒/精胺N1乙酰基转移酶2(spermidine/spermine N^1-acetyltransferase 2,SSAT2)在HIF-1α氧依赖降解途径中起着重要作用。常氧情况下,HIF-1α被脯氨酸羟化酶所羟化,希佩尔-林道病肿瘤抑制蛋白(von Hippel-Lindua tumor suppressor protein,VHL)与HIF-1α结合,两者再结合Elongin C,从而引起HIF-1α的泛素化降解。其中SSAT2是稳定VHL和Elongin C关键因素,可调控HIF-1α的泛素化过程从而使HIF-1α迅速降解而失去调控靶基因的活性[2]。为探明SSAT2是否可通过抑制HIF-1α表达而参与肾癌的分子生物学行为,本研究将SSAT2基因转染肾癌细胞,观测SSAT2对HIF-1α蛋白的影响,并研究SSAT2对HIF-1α的调控在肾癌生长和耐药中的作用,从而为深入研究肾癌的分子靶向治疗提供新的思路和实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肾癌Caki-1细胞株购于中科院上海生命科学研究院,McCoy's 5A培养基、胎牛血清及0.25%胰蛋白酶均为HyClone公司产品,去内毒素质粒中提试剂盒购自天根公司,转染试剂X-tremeGENE HP购自美国Roche公司,鼠抗人HIF-1α单克隆抗体购于英国Novus biological公司,鼠抗人V5抗体购于美国Invitrogen公司、二抗兔抗鼠IgG购自北京中杉金桥公司,凋亡试剂盒购于碧云天公司,MTT购于美国Amersco公司。阿霉素购于辉瑞公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的扩增与鉴定 pcDNA3.1(D)/V5-His-SSAT2质粒由美国约翰霍普斯金大学Dr. Semenza惠赠。质粒转化DH5α感受态进行扩增,去内毒素质粒中提试剂盒提取质粒,酶切及测序鉴定。

1.2.2 细胞培养、转染和分组 人肾癌Caki-1细胞株在含10%胎牛血清的McCoy's 5A培养液中培养,定期换液,传代。细胞于转染前换液铺板,按X-tremeGENE HP的说明书进行转染,转染后放入37 ℃、1% O_2、94% N_2、5% CO_2低氧条件下培养48 h。实验分组:空白细胞组、空载体组、V5-SSAT2组。

1.2.3 Western blot检测SSAT2和HIF-1α蛋白表达 RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白,12 000 r/min离心8 min后,转移上清至新离心管中,BCA法测定蛋白浓度后并调节蛋白浓度一致,按比例加入上样缓冲液后沸煮5 min。在电泳缓冲液中进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白质转移至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,加入1∶5 000的V5一抗或1∶500的HIF-1α一抗,4 ℃过夜,TBST洗3次,加相应二抗孵育1 h,TBST洗膜4次后显色发光。

1.2.4 MTT检测细胞增殖活性 取对数生长期的各组细胞,消化后计数,以每孔3 000个细胞接种于96孔板中,各组细胞均设5个复孔。细胞转染后放入1%氧浓度中分别培养24、48、72 h,每孔细胞加入MTT 10 μl,放入孵箱继续培养4 h,小心吸取上清,加入DMSO 150 μl,振荡10 min,以充分溶解甲臜颗粒,酶标仪检测波长490 nm处的光密度值[D(490)],计算机处理分析,实验重复3次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞死亡率和凋亡率 收集低氧培养48 h各组细胞,PBS洗3次,胰酶消化细胞,1 000×g离心5 min,弃上清,分别加入195 μl Annexin V-FITC结合液制成细胞悬液,然后再加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl PI,室温下避光10 min,流式细胞仪检测分析,实验重复3次。

1.2.6 MTT检测加入阿霉素后各组细胞活力,计算抑制率 胰酶消化各组细胞,每孔3 000个细胞接种于96孔板中,转染6 h后各组细胞加入阿霉素并放入低氧条件下培养。以阿霉素血浆峰浓度为中心,设置药物浓度为0.125、0.25、0.5、1、2 μg/ml,每个浓度设5个复孔,并留置5个未加药孔作为对照组,5个无细胞空白组作为空白对照组。加药后48 h测定D(490)值,计算各组抑制率。抑制率=1-(给药组-空白对照组)/(对照组-空白对照组)×100%。实验重复3次。

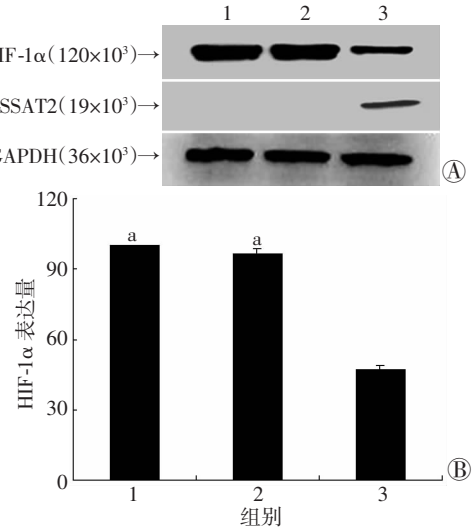
1.3 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件,组间比较行t检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 SSAT2载体在肾癌细胞中的表达及对HIF-1α蛋白的影响

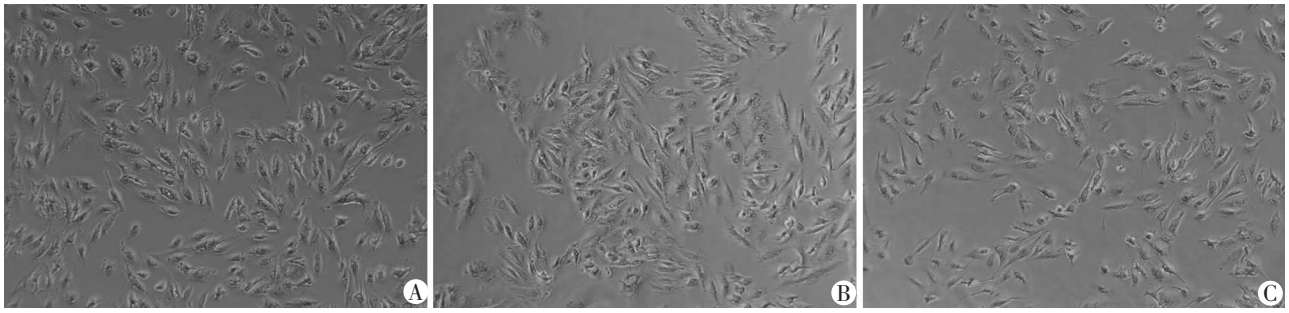
提取培养48 h的各组细胞总蛋白,Western blot检测带有V5标签SSAT2蛋白的表达。结果显示SSAT2成功转入Caki-1细胞,而空白细胞组和空载体组无外源的SSAT2表达。细胞转染并低氧培养48 h后,V5-SSAT2组HIF-1α蛋白明显下降,与空白细胞组和空载体组比较有统计学意义($P<0.01$)。见图1。



1:空白细胞组;2:空载体组;3:V5-SSAT2组

A: Western blot结果;B:半定量分析结果 a: $P<0.01$,与V5-SSAT2组比较

图1 Western blot检测各组细胞SSAT2和HIF-1α蛋白的表达



A:空白细胞组;B:空载体组;C: V5-SSAT2 组

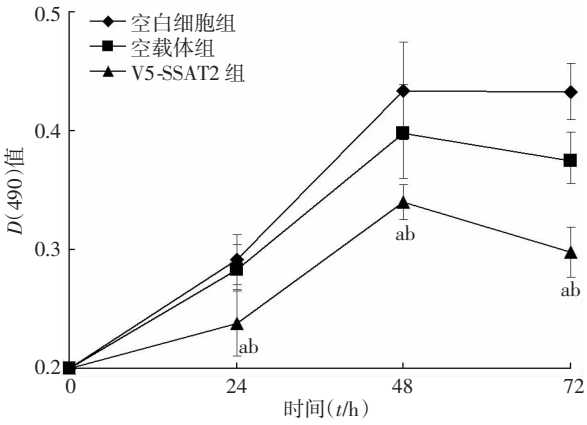
图2 倒置相差显微镜观察低氧条件下转染 SSAT2 细胞形态的变化(×100)

2.2 低氧条件下转染 SSAT2 细胞形态的变化

倒置相差显微镜观察各组细胞低氧培养48 h时形态,结果显示,空白细胞组及空载体组细胞密集,且细胞成梭形,体积较大,细胞间呈融合状态,而 V5-SSAT2 组细胞数量较少,细胞间连接减少,皱缩细胞数量增多。见图2。

2.3 转染 SSAT2 对肾癌 Caki-1 细胞增殖影响

MTT 法检测在低氧条件 SSAT2 对 Caki-1 细胞增殖水平的影响。细胞培养24 h 即可观察到 V5-SSAT2 组细胞较空白细胞组及空载体组细胞活力降低,培养 72 h 时差异显著($P<0.01$)。MTT 检测结果显示,转染 SSAT2 肾癌细胞增殖变缓,SSAT2 对 Caki-1 细胞的增殖有抑制作用。见图3。



a: $P<0.01$,与空白细胞组比较; b: $P<0.01$,与空载体组比较

图3 MTT 检测 SSAT2 转染对肾癌细胞增殖的影响

2.4 转染 SSAT2 对肾癌 Caki-1 凋亡率的影响

各组细胞低氧下培养48 h,以 Annexin V-FITC 和 PI 双标记进行流式检测。结果显示,与空白细胞组及空载体组细胞相比,转染 SSAT2 后肾癌细胞的死亡率和凋亡率均增加($P<0.05$),而死亡率增加更为显著。见表1。

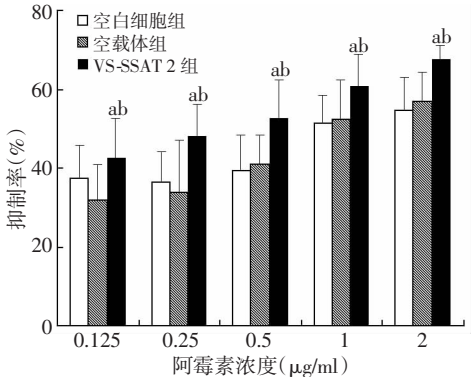
表1 各组细胞凋亡率和死亡率的比较[$n=3$, $(\bar{x}\pm s)\%$]

组别	死亡率	凋亡率
空白细胞组	2.27±0.46	4.97±1.61
空载体组	6.60±0.53	5.72±1.57
V5-SSAT2 组	18.30±1.23[ab]	7.39±2.71[ab]

a: $P<0.05$,与空白细胞组比较;b: $P<0.05$,与空载体组比较

2.5 转染 SSAT2 对阿霉素化疗敏感性的影响

各组细胞加入不同浓度阿霉素后低氧培养48 h,检测各组细胞 $D(490)$值。结果表明,各浓度阿霉素对 V5-SSAT2 组细胞的抑制率大于空载体组和空白细胞组($P<0.01$)。说明转染 SSAT2 可增加肾癌 Caki-1 细胞在低氧条件下对阿霉素的化疗敏感性,降低肾癌对阿霉素的耐药。见图4。



a: $P<0.01$,与空白细胞组比较; b: $P<0.01$,与空载体组比较

图4 不同浓度阿霉素作用下3组细胞生长抑制率的比较

3 讨论

在肾癌发展和转移过程中,由于肿瘤大小与血管形成不成比例,肿瘤内部存在严重的缺氧状况。肿瘤的生长、增殖的形成过程,也就是肿瘤细胞对缺氧的适应过程,生成异常紊乱的肿瘤血管体系和改变能量供给方式是肿瘤组织适应缺氧的最主要适应手段。近年有研究表明 HIF-1α 在肾癌中异常表达,无论是在原发病灶还是转移灶,HIF-1α 的水平明显高于正常组织[3],并与肾癌的发生、发展及耐药密切相关[4],抑制 HIF-1α 能够降低肾癌肿瘤的生长,侵袭及转移[5]。在肾癌细胞中 HIF-1α 的表达可以直接作为凋亡的标志物,HIF-1α 可以通过抑制细胞的生长,阻滞细胞周期,最终诱导细胞对化疗药物的耐受[6]。同时研究表明 HIF-1α 可以调控多药耐药(multi-drug resistance, MDR)相关基因从而影响肿瘤的化疗敏感性[7]。目前临床上已应用针对 HIF-1α 靶基因的治疗药物,发现抑制其表达后可以不同程度的逆转 MDR,从而抑制肿瘤耐药。

SSAT是多胺分解的重要酶,多胺参与多种生理和病理过程,与细胞周期,细胞的增殖和分化以及凋亡有着密切关系。SSAT1和SSAT2是SSAT家族的主要成员,SSAT1是多胺分解途径中的第一个限速酶,它在保持细胞内多胺稳态中发挥重要作用,可以防止多胺过度累积造成细胞毒性。SSAT1在多种肿瘤细胞内高表达,可通过多胺代谢途径,促使多胺池耗竭,最终诱导细胞死亡[8],并且能够降低乳腺癌、卵巢癌等对化疗药物的耐药[9-10]。SSAT2与SSAT1是同源物,有46%结构一致,64%结构相似,都与HIF-1α相互作用,都能促使HIF-1α的蛋白泛素化降解[2,11],但是SSAT2对肿瘤的生长和耐药的影响尚鲜见报道。

本研究成功将SSAT2基因转入肾癌Caki-1细胞并且在1%氧浓度下培养,进行细胞增殖实验,结果显示与空白细胞组和空载体组细胞相比,转染SSAT2后低氧24、48、72 h各时间点细胞活力减低,增殖减慢。同样,流式细胞检测表明,转染SSAT2可以增加肾癌凋亡率和死亡率,提示在低氧条件下转染SSAT2可以抑制肾癌细胞的增殖,促进细胞死亡。

本实验以阿霉素作为实验用药,并以阿霉素血药峰浓度设置实验浓度进行细胞耐药实验,因为阿霉素对于肾癌治疗几乎是无效的,大部分肾癌患者对阿霉素都有耐药现象,并且阿霉素与HIF-1α介导的多药耐药相关[12]。结果表明,较空白细胞组和空载体组细胞,转染SSAT2后肾癌细胞对各浓度阿霉素抑制率显著提高,阿霉素浓度为2 μg/ml时,转染组细胞抑制率可达67.5%,提示转染SSAT2能够在低氧条件下增加肾癌细胞对不同浓度阿霉素的化疗敏感性,降低肾癌对阿霉素的耐药。

同时,本研究证明在低氧条件下肾癌Caki-1细胞转染外源性SSAT2后HIF-1α蛋白明显下调,与参考文献[2]的研究一致,SSAT2过表达可以促进HIF-1α蛋白降解,并且Coleman等[13]的研究证明SSAT2虽然与SSAT1结构相似,同属于SSAT家族,但是并不参与多胺代谢。以上结果提示,转染SSAT2可能通过HIF-1α途径调控肾癌的增殖,凋亡及耐药的病理生理过程,设计针对SSAT2的基因治疗可能会逆转肿瘤的耐药性,并成为治疗肾癌的新靶点。但是SSAT2增加肾癌对阿霉素化疗敏感性是否由于SSAT2通过HIF-1直接抑制细胞增殖,还是由于SSAT2调控HIF-1下游耐药基因表达尚不可知,以及SSAT2与其他信号交联作用尚不清楚,还有待进一步研究,进而为SSAT2基因合理有效的应用于临床肾癌治疗提供更为科学的研究。

参考文献:

[1] Semenza G L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics[J]. Oncogene, 2010, 29(5): 625-634.

[2] Baek J H, Liu Y V, McDonald K R, *et al*. Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1alpha[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23572-23580.

[3] Schultz L, Chaux A, Albadine R, *et al*. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(10): 1549-1556.

[4] Rini B I, Atkins M B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(10): 992-1000.

[5] Xu K, Ding Q, Fang Z, *et al*. Silencing of HIF-1alpha suppresses tumorigenicity of renal cell carcinoma through induction of apoptosis[J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(3): 212-222.

[6] Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways[J]. Drug Rrsist Updat, 2011, 14(3): 192-201.

[7] Comerford K M, Wallace T J, Karhausen J, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene[J]. Cancer Res, 2002, 62(12): 3387-3394.

[8] Pegg A E. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(6): E995-E1010.

[9] Pledgie-Tracy A, Billam M, Hacker A, *et al*. The role of the polyamine catabolic enzymes SSAT and SMO in the synergistic effects of standard chemotherapeutic agents with a polyamine analogue in human breast cancer cell lines[J]. Caner Chemother Pharmacol, 2010, 65(6): 1067-1081.

[10] Marverti G, Ligabue A, Guerrieri D, *et al*. Spermidine/spermine N^1-acetyltranferase modulation by novel folate cycle inhibitors in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines[J]. Gynecol Oncol, 2010, 117(2): 202-210.

[11] Baek J H, Liu Y V, McDonald K R, *et al*. Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha[J]. J Bio Chem, 2007, 282(46): 33358-33366.

[12] Chen L, Feng P, Li S, *et al*. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide[J]. Neurochem Res, 2009, 34(5): 984-990.

[13] Coleman C S, Stanley B A, Jones A D, *et al*. Spermidine/spermine-N^1-acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and is not involved in polyamine metabolism[J]. Biochem J, 2004, 384(Pt 1): 139-148.

(**收稿**:2012-01-12;**修回**:2012-03-05)

(编辑 汪勤俭)