论著

文章编号:1000-5404(2013)07-0618-04

CA916798基因通过PI3K/AKT通路参与肺癌顺铂耐药

祝冰晶,王宇亮,罗 虎,周向东 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 在前期体外研究的基础上,建立裸鼠移植瘤模型,观察阻断PI3K/AKT通路对肺腺癌细胞A549及多药耐药肺腺癌细胞A549/CDDP内CA916798基因mRNA表达的影响。**方法** 建立A549、A549/CDDP裸鼠移植瘤模型,以LY294002作用A549组和A549/CDDP组后,比较各组移植瘤生长情况,HE染色观察组织结构变化,实时荧光定量PCR检测肿瘤细胞中CA916798基因mRNA的表达水平。**结果** 成功建立裸鼠移植瘤模型,以LY294002分别阻断A549、A549/CDDP组裸鼠移植瘤细胞的PI3K/AKT通路后,移植瘤体积明显缩小,CA916798基因的表达明显下调($P<0.05$)。**结论** 抑制PI3K/AKT通路能够明显抑制肺腺癌细胞A549及A549/CDDP的恶性增殖。

[关键词] CA916798;耐药;顺铂;PI3K/AKT
[中图法分类号] R73-361; R734.2; R979.11 [文献标志码] A

CA916798 gene is involved in cisplatin resistance in human lung cancer through PI3K/AKT pathway

Zhu Bingjing, Wang Yuliang, Luo Hu, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of blocking the PI3K/AKT pathway on the expression of CA916798 gene in nude mouse transplanted tumor of human lung adenocarcinoma cell line A549 and the multidrug-resistant cell line A549/CDDP. **Methods** A total of 20 nude mice were randomly and equally divided into 4 groups, that is, A549, A549/CDDP, A549 + LY294002, and A549/CDDP + LY294002 groups. The animal model with A549 cells and A549/CDDP cells transplanted tumor was established in these corresponding nude mice. LY294002 of 25 mg/kg was treated in the mice of the 2 later groups. The size of tumor was measured, and morphology of the mass was observed after HE staining. Real-time fluorescent quantitative PCR was performed to detect CA916798 mRNA expression in the tumor. **Results** The model of transplanted tumor was established in nude mice successfully. Blocking PI3K/AKT pathway with LY294002 resulted in significantly decreased expression of CA916798 at mRNA level ($P<0.05$), and reduced tumor volume. **Conclusion** Inhibition of PI3K/AKT pathway significantly inhibits the malignant proliferation in lung adenocarcinoma cell A549 and multidrug-resistant cell line A549/CDDP.

[**Key words**] CA916798; drug resistance; cisplatin; PI3K/AKT

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971308). Corresponding author: Zhou Xiangdong, Tel: 86-23-68754621, E-mail: xiangdongzhou@126.com

肺癌是对人类健康危害最大的常见肿瘤,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)在肺癌中约占80%[1],大部分肺癌患者在确诊时已属于晚期,且手术治疗后复发及转移发生率也很高,因此,晚期NSCLC的首选治疗仍为化疗[1]。以铂类为基础的联合化疗方案是目前晚期NSCLC的标准一线化疗方案[2],顺铂耐药是肺癌化疗失败的主要原因之一。肺癌耐药是一个多基因参与的复杂过程,到目前为止机制尚未完全清楚,对耐药相关基因的深入研究有助于阐明肺癌耐药的机制。CA916798基因是我们前期研究发现的与肺癌顺铂耐药相关的新基因,并证实抑制该基因可逆转肺癌对顺铂耐药[3]。上调CA916798基因的表达可促进肺癌对顺铂耐药性的产生,抑制该基因可逆转肺癌对顺铂耐药[4],但其机制尚不清楚。

[基金项目] 国家自然科学基金(30971308)
[通信作者] 周向东,电话:(023)68754621,E-mail: xiangdongzhou@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130108.1049.007.html(2013-01-08)

PI3K/AKT 通路已被证实参与多种肿瘤的发生、发展，在促进肿瘤对化疗和放疗的抵抗、抑制细胞凋亡方面具有重要的作用[5]。我们前期研究证实，抑制 PI3K/AKT 通路或 CA916798 基因均可逆转肺癌对顺铂的耐药性，而激活 PI3K/AKT 通路或增加 CA916798 基因的表达可增强肺癌细胞对顺铂的耐药[6-8]。由此推测，CA916798 基因通过 PI3K/AKT 通路参与肺癌顺铂耐药。前期研究发现，CA916798 基因位于 PI3K/AKT 通路的下游[9]。本研究拟在前期工作基础上，以肺腺癌亲代细胞系 A549 及其耐顺铂肺腺癌细胞系 A549/CDDP 为对象，建立裸鼠移植瘤模型，用 LY294002 抑制 PI3K/AKT 通路，观察裸鼠移植瘤体积的变化，并对肿瘤组织标本切片做 HE 染色观察其组织结构变化，检测 CA916798 基因 mRNA 的表达，从体内证实 CA916798 基因与 PI3K/AKT 通路的关系，进一步阐明该基因参与肺癌顺铂耐药的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞及多药耐药人肺腺癌 A549/CDDP 细胞在前期工作中诱导，保存于第三军医大学西南医院中心实验室。

1.1.2 动物 实验裸鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清(FBS)、RPMI1640 购自美国 Gibco，胰蛋白酶购自美国 Hyclone，青链霉素(双抗)购自华北制药股份有限公司，PBS 购自康为世纪生物科技有限公司，顺铂注射液(2 mL:10 mg)购自云南生物谷灯盏花药业有限公司，DMSO、LY294002 购自 Sigma，Trizol 购自 Invitrogen，实时荧光定量 PCR 试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。

1.1.4 引物设计与合成 CA916798 引物：c19orf48 NM_199250.1 上下游引物：5′-GCTTCCTCCTCAACCTCGTCCT-3′ 和 5′-GTAGCCCACTTATCCACCTTCTCC-3′。GAPDH 上下游引物：5′-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3′ 和 5′-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3′。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 药物配置 顺铂注射液用生理盐水稀释配成 0.2 mg/mL 的溶液。LY294002 用 DMSO 溶解，用生理盐水稀释，使 LY294002 终浓度为 2.25 mg/mL。

1.2.2 细胞培养 肺腺癌 A549 细胞、肺腺癌多药耐药 A549/CDDP 细胞用加入青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 μg/mL 的含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养，置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中。根据情况每 1 ~ 2 天换液，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，每 2 ~ 3 天按 1:2 比例传代 1 次。

1.2.3 裸鼠分组及处理 将裸鼠随机分为 4 组，每组 5 只：A549 组、A549/CDDP 组、A549 + LY294002 组、A549/CDDP + LY294002 组，每只裸鼠皮下注射 6×10^5 个细胞，观察肿瘤生长情况。当裸鼠肿瘤长至直径为 5 mm 大小时，4 组均给予 4 mg/kg 顺铂腹腔内注射，1 次/周，连续 3 周；A549 + LY294002 组和 A549/CDDP + LY294002 组给予 25 mg/kg LY294002，2 次/周，连续 3 周。给药后观察裸鼠的一般情况和肿瘤生长情况，给药 21 d 后处死 4 组裸鼠。对肿瘤组织进行大体观察和病理切片 HE 染色观察。实时荧光定量 PCR 方法检测各组 CA916798 基因 RNA 的表达：①取各组肿瘤组织用 Trizol 作用后按 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA，并用分光光度计测量吸光度 $D(260)$ 值，计算总 RNA 的浓度；②将提取的各组 RNA 用前述引物反转录成 cDNA，作为模板 PCR 扩增目的基因 CA916798 及内参 β-actin。PCR 扩增条件为 95 ℃ 1 min 15 s(95 ℃ 15 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s)39 个循环。应用 Bio-Rad CFX Manager 软件对 PCR 产物进行定量分析。

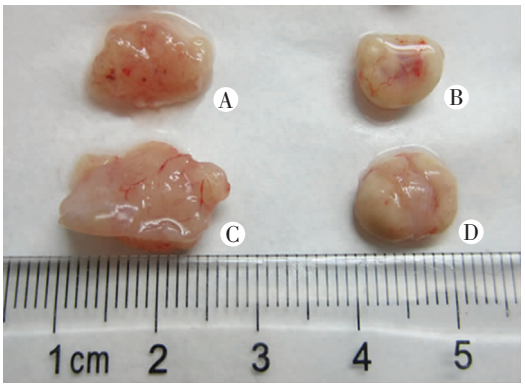
1.3 统计学处理

计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 20.0 统计软件，两组数据间比较采用 t 检验，多组数据比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肿瘤组织形态学观察

A549/CDDP 组肿瘤组织的体积均大于 A549 组，且用 LY294002 处理后，A549 组及 A549/CDDP 组的肿瘤组织体积均有明显缩小(图 1)。



A：A549/CDDP + LY294002 组；B：A549 + LY294002 组；C：A549/CDDP 组；D：A549 组

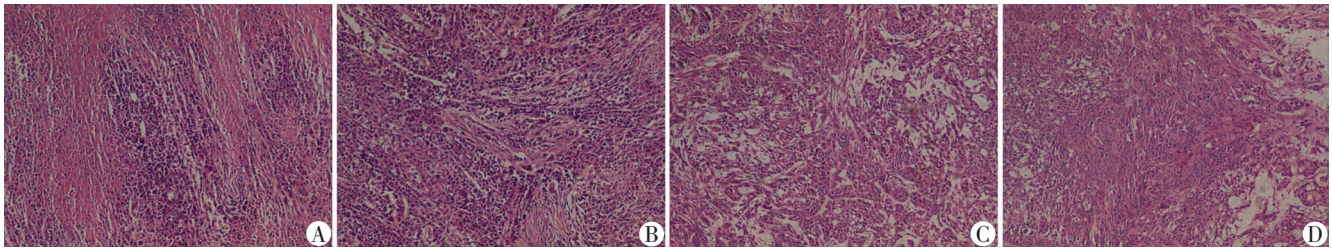
图 1 各组肿瘤组织大体观察

2.2 肿瘤组织病理切片 HE 染色

A549 组肿瘤细胞成条索状、腺管状分布，之间可见大片坏死，可见病理性核分裂相。A549 + LY294002 组未见明显腺管样结构，其间可见纤维组织增生。A549/CDDP 组可见细胞排列紊乱，主要成腺泡样分布，间质血管丰富，可见大量病理性核分裂相，细胞核深染。A549/CDDP + LY294002 组可见细胞与周围组织边界不清，细胞质丰富，细胞呈腺泡样、囊性分布，大量病理性核分裂相可见，间质纤维组织增生，细胞巢间可见黏液分泌形成黏液湖，见图 2。

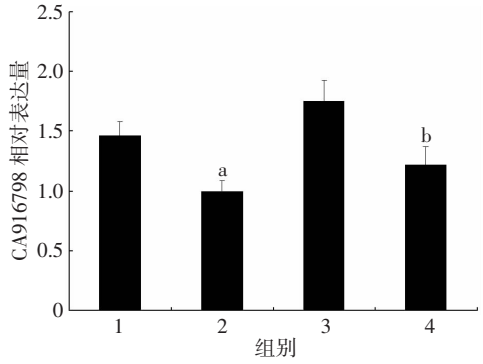
2.3 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平

A549/CDDP 组肿瘤细胞内 CA916798 基因的 mRNA 表达量明显高于 A549 组细胞，用 LY294002 处理后，A549 组和 A549/CDDP 组肿瘤细胞内 CA916798 基因的 mRNA 表达量均较前明显下降。各组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)，见图 3。



A:A549 组;B:A549 + LY294002 组;C:A549/CDDP 组;D:A549/CDDP + LY294002 组

图 2 显微镜观察 LY294002 处理后的各组肿瘤组织病理变化 (HE ×100)



1:A549 组;2:A549 + LY294002 组;3:A549/CDDP 组;4:A549/CDDP + LY294002 组

a:$P<0.05$,与 A549 组比较;b:$P<0.05$,与 A549/CDDP 组比较

图 3 实时荧光定量 PCR 检测 LY294002 处理后各组 CA916798 mRNA 表达

3 讨论

近年来在肺癌的治疗方面虽然取得了一定进展,但5年生存率仍未见明显提高[10],化疗是肺癌的主要治疗手段,顺铂是肺癌化疗中有效并广泛使用的一线药物,肺癌细胞对顺铂的耐受是肺癌患者低生存率的主要原因之一,但机制尚未完全阐明,目前认为由于损伤修复过程中 DNA 剪切物的增加、抗凋亡、与调控信号通路相关的调节蛋白表达的改变等均可能与对顺铂的耐药有关[11-12]。

PI3K/AKT 通路被认为是癌细胞存活的首要通路,该通路的异常可引起细胞异常增殖导致肿瘤的发生。研究表明,PI3K/AKT 通路与肿瘤细胞的抗凋亡、侵袭和耐药密切相关[13]。前期研究已证实,抑制 AKT 的过表达可以逆转肺腺癌多药耐药细胞 A549/CDDP 对顺铂的耐药,采用 PI3K 的抑制剂可显著抑制 AKT 的表达并增强 A549/CDDP 对顺铂的敏感性。进一步研究发现,AKT 通过 mTOR-P70S6K1 信号途径诱导肺癌细胞对顺铂耐药[6]。此外,PI3K/AKT 通路还参与调控 EGFR、survivin[14]、CSE[15] 等多种肺癌顺铂耐药相关基因。

LY294002 是一种能够完全特异性抑制 PI3K 活性的蛋白酶抑制剂,与 PI3K 竞争性的结合 ATP 位点,从而抑制 AKT 的激活。体外实验发现 LY294002 对肺癌细胞、卵巢癌细胞和食管癌细胞均有抑制生长、促进凋亡的作用。前期研究发现 A549/CDDP 细胞系的 CA916798 mRNA 表达量较 A549 细胞系明显上调($P<0.05$),阻断 PI3K 或 mTOR 的作用后,细胞对顺铂的耐药性均有明显下调($P<0.05$),阻断 PI3K/AKT 通路后,CA916798 基因的 mRNA 表达也明显下调,首次证实了 CA916798 基因位于 PI3K/AKT 通路的下游。本实验是以 LY294002 作用裸鼠移植瘤 A549 组及 A549/CDDP 组,检测对肿瘤细胞内 CA916798 基因 mRNA 表达量的影响。结果显示:①LY294002 可抑制裸鼠移植瘤 A549 组和 A549/CDDP 组肿瘤的生长,提示 LY294002 可通过抑制 PI3K 的活性,从而抑制 AKT 的表达与活化,进一步抑制肺癌细胞的生长;②A549/CDDP 组肿瘤细胞 CA916798 基因的 mRNA 表达量明显高于 A549 组($P<0.05$),且用 LY294002 阻断 PI3K/AKT 通路后,A549 组和 A549/CDDP 组肺癌细胞 CA916798 基因的 mRNA 表达量均明显下降,与我们前期体外研究结果一致,进一步证实 CA916798 基因位于 PI3K/AKT 通路的下游,CA916798 基因可能通过 PI3K/AKT 通路参与肺癌顺铂耐药。

综上,本研究从体内进一步验证 CA916798 基因是 PI3K/AKT 通路作用的靶点,揭示了 CA916798 基因通过 PI3K/AKT 通路参与肺癌顺铂耐药,有助于深入研究 CA916798 基因的功能和进一步阐明肺癌顺铂耐药的机制,为肺癌靶向治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Pirker R, Minar W. Chemotherapy of advanced non-small cell lung cancer[J]. Front Radiat Ther Oncol, 2012, 42: 157-163.

[2] Rollins K D, Lindley C. Pemetrexed: a multitargeted antifolate[J]. Clin Ther, 2005, 27(9): 1343-1382.

[3] 周向东, 刘凌志, 钱桂生, 等. 一条新的人肺腺癌耐药相关基因全长 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. 癌症, 2002, 21(4): 341-345.

[4] Wang H J, Yang H P, Zhou X D, *et al*. CA916798 regulates multi-drug resistance of lung cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(12): 3403-3408.

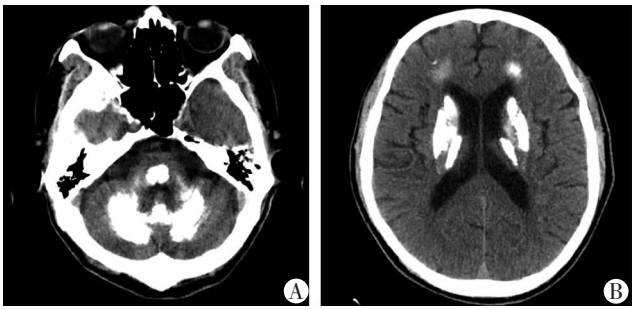
[5] Tammasi S, Pinto R, Pilato B, *et al*. Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma[J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(32): 3279-3287.

[6] Liu L Z, Zhou X D, Qian G, *et al*. AKT1 amplification regulates cis-

platin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway[J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6325 - 6332.
[7] 王海晶, 杨和平, 周向东. MDR 相关新基因 CA916798 真核表达载体的构建及其对 H446 细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(24): 2315 - 2318.
[8] 王海晶, 杨和平, 周向东. RNA 干扰 CA916798 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 23 - 26.
[9] 亓占中, 王宇亮, 周向东. CA916798 基因通过 PI3K/AKT/mTOR 通路参与顺铂耐药的机制分析[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(9): 1290 - 1293.
[10] Siegel R, Ward E, Brawley O, *et al*. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212 - 236.
[11] Ohmichi M, Hayakawa J, Tasaka K, *et al*. Mechanisms of platinum drug resistance[J]. Trends Pharmacol Sci, 2005, 26(3): 113 - 116.
[12] Wangpaichitr M, Wu C, You M, *et al*. Inhibition of mTOR restores cisplatin sensitivity through down-regulation of growth and anti-apoptotic proteins[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 591(1/3): 124 - 127.
[13] Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(1): 34 - 44.
[14] Kanwar J R, Kamalapuram S K, Kanwar R K. Survivin signaling in clinical oncology: a multifaceted dragon[J]. Med Res Rev, 2012, [Epub ahead of print].
[15] Yin P, Zhao C, Li Z, *et al*. Sp1 is involved in regulation of cystathionine γ-lyase gene expression and biological function by PI3K/Akt pathway in human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Cell Signal, 2012, 24(6): 1229 - 1240.

(**收稿**:2012-11-06;**修回**:2013-01-01)
(编辑 邓强庭)

(上接 617 页)



A:钙化累及小脑齿状核、脑干;B:基底节、皮质对称性高密度钙化灶

图 2 本家系中 Fahr 病患者先证者Ⅱ4 头颅 CT 表现

先证者胞弟Ⅱ5:男性,48 岁,4 年来反复发作剧烈头痛、视物旋转在外院治疗,考虑"脑血管病",给予改善微循环治疗,可自行缓解。头颅 CT 提示基底节区、小脑齿状核、大脑脚、杏仁体、脑干等多部位发现高密度钙化灶。查体及精神检查均未见异常。通过家系调查,Ⅰ2 因心血管疾病去世多年;Ⅱ1 及Ⅱ2 失访,Ⅰ1(89 岁)、Ⅲ2(28 岁)、Ⅲ3(25 岁)、Ⅲ4(23 岁)、Ⅳ1(4 岁)均无神经精神相关症状,头颅 CT 均显示正常。

2 讨论

Fahr 病最先由 Bamberger 提及,其后 Fahr 做了进一步的描述,随着 CT 扫描的普及,近年文献报道显著增多。本病确诊需行脑组织活检,临床上多根据 Moskowitz 提出的诊断标准[2],即:①双侧基底节对称性钙化;②血清钙、磷在正常范围;③排除假性、假假性甲状旁腺功能减退症及感染、中毒等;④肾小管对甲状旁腺素反应功能正常;⑤可有或无阳性家族史。

我国第 1 个 Fahr 病家系由王国相于 1991 年率先描述,多倾向本病发生与遗传有关。Geschwind 等[3]将致病基因定位在 14 号染色体长臂的 D14S1014、D14S75、D14S306。而我国研究者通过多个家系研究定位在 8 号染色体上的 SLC20A2 基因,该基因与 3 型钠依赖性磷酸盐转运体 2 编码有关,突变后磷酸盐转运活性显著减弱[4]。其他染色体亦有报道存在变异,表明本病的遗传异质性。在本例家系中,Ⅰ2 不明原因去世多年,第Ⅲ代随访人员均不满 30 岁,而 Fahr 病多在 30 岁以后才开始出现钙盐沉积,20 年后出现临床症状,因此尚不能确定具体的遗传方式。除遗传因素外,血管功能改变、代谢异常、炎症改变及免疫因素等均可能参与了该病的发生。组织学上病灶处除有大量钙盐外,在小静脉周围亦有黏多糖及铝、砷、钴等微量元素沉积[5],病变部位神经元发生变性,胶质纤维环绕增生。在 MRI-T_2 加权像上呈高信号,提示这是一个慢性代谢性或炎性过程,在这个过程中血管壁的异常导致血浆成分的漏出、中性粒细胞渗出,从而引发了钙化及其他矿物质的沉积。临床症状可见于大约 2/3 的 Fahr 病患者,因累及部位不同而表现形式各异,大致包括神经、精神、认知三方面异常,常见神经症状有帕金森病、舞蹈病、共济失调、吞咽困难、言语障碍等;精神分裂症、心境障碍或情感失调则是常见精神异常;部分患者伴有记忆及或认知功能减退[6]。对于家族中多人出现神经精神异常尤其头颅 CT 有钙化表现者应高度警惕本病。本家系中患者以神经症状为主,Ⅱ4 除了有较典型的锥体外系征、小脑性共济失调外,还出现了脑干损害所特有的损害,如中脑萎缩损伤所出现的双侧眼球垂直运动障碍,延髓脑神经核团损伤出现的自主神经功能障碍及深浅感觉障碍,在之前病例报告中比较罕见,考虑为相应解剖部位钙盐沉重所致。

Fahr 病目前尚无根治方法,以对症治疗为主,随着该病确诊率的明显提高,进一步探讨将具有非常深远的意义。

参考文献:

[1] Benke T, Karner E, Seppi K, *et al*. Subacute dementia and imaging correlates in a case of Fahr's disease[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004, 75(8): 1163 - 1165.
[2] Moskowitz M A, Winickoff R N, Heinz E R. Familial calcification of the basal ganglions: a metabolic and genetic study[J]. N Engl J Med, 1971, 285(2): 72 - 77.
[3] Geschwind D H, Loginov M, Stern J M. Identification of a locus on chromosome 14q for idiopathic basal ganglia calcification (Fahr Disease)[J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(3): 764 - 772.
[4] Wang C, Li Y, Shi L, *et al*. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis[J]. Nat Genet, 2012, 44(3): 254 - 256.
[5] Manyam B V. What is and what is not 'Fahr's disease'[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2005, 11(2): 73 - 80.
[6] 谭泽兵, 杨建洪, 刘金贵, 等. 特发性基底节钙化[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5(16): 4799 - 4801.

(**收稿**:2012-12-21;**修回**:2013-01-19)
(编辑 王小寒)