DOI:10.16016/j.1000-5404.201510091

血小板衍生生长因子受体-β信号促进突变型 p53 介导 MDA-MB-231 细胞阿霉素耐药

谭 娟,王成龙,曹友德 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理学教研室)

[摘要] **目的** 探讨血小板衍生生长因子受体-β(platelet-derived growth factor receptor-beta,PDGFR-β)信号与三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞阿霉素耐药的关系及机制。**方法** 采用流式细胞术、MTS 法检测 PDGF-DD(PDGFR-β 特异性配体)对阿霉素所致的细胞 G_2期阻滞、细胞凋亡及死亡情况的影响;qPCR 和 Western blot 检测突变型 *p*53、*cdk*1、*PDGFR-β*、*p*21、*bax*、*hsp*90 及 *TopBP*1 表达水平,以研究 PDGF-DD、Wortmannin(PI3K 抑制剂)对突变型 *p*53 及其功能的影响;利用 siRNA 干扰技术、qPCR 探讨突变型 *p*53、PDGF-DD 和耐药相关基因表达的关系。**结果** PDGF-DD 明显提高阿霉素条件下细胞存活率、降低细胞凋亡率、一定程度改善细胞 G_2期阻滞,显著提高突变型 p53 蛋白水平并改变其下游基因 *cdk*1、*PDGFR-β*、*p*21、*bax* 表达,但突变型 *p*53 mRNA 变化差异不具统计学意义($P>0.05$)。PDGF-DD 显著上调 *hsp*90(突变型 p53 蛋白稳定因子)和 TopBP1(突变型 p53 功能促进蛋白)mRNA 和蛋白水平,Wortmannin 处理后表达明显下降。PDGF-DD 明显提高耐药相关基因 *FOXC*2、*twist*、*snail*、*nanog*、*oct*4 mRNA 水平,*p*53 siRNA 处理后 mRNA 表达显著下降。**结论** PDGF-DD/PDGFR-β 信号能诱导 MDA-MB-231 细胞发生阿霉素耐药,通过 PI3K 途径转录水平上调 *hsp*90 和 *TopBP*1 表达、稳定并促进突变型 p53 介导细胞耐药是其重要机制之一。

[关键词] 血小板衍生生长因子受体-β;耐药;突变型 p53;拓扑异构酶(DNA)Ⅱ结合蛋白 1;干性相关基因

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

PDGFR-β signals induce mutant p53-mediated doxorubicin resistance in MDA-MB-231 cells

Tan juan, Wang Chenglong, Cao Youde (Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-β) signals in doxorubicin (Dox) resistance of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, and explore its underlying mechanism. **Methods** The percentage of cells arrested at G_2 phase, cell apoptosis and viability were detected by flow cytometry and MTS assay in PDGF-DD (a PDGFR-β specific ligand) incubated cells. The expression levels of mutant *p*53 (*mtp*53), *cdk*1, *PDGFR-β*, *p*21, *bax*, *hsp*90 and *TopBP*1 were determined by qPCR and Western blotting for the effects of PDGF-DD and Wortmannin (a PI3K inhibitor) on the mtp53 expression and its functions. qPCR was used to measure the mRNA levels of resistant genes in cells treated with *p*53 siRNA or (and) PDGF-DD. **Results** PDGF-DD significantly enhanced the cell viability, reduced the apoptotic rates and relieved G_2/M cell cycle arrest in the MDA-MB-231 after Dox treatment. It greatly improved the protein level of mtp53 and seriously altered the expression levels of its downstream genes, *cdk*1, *PDGFR-β*, *p*21 and *Bax*, but showed negligible change of *mtp*53 mRNA ($P>0.05$). Meanwhile the elevated mRNA and protein levels of *hsp*90 (a mtp53 protein-stabilizing factor) and

[基金项目] 重庆市卫生局重点项目(2012-1-79)

[通信作者] 曹友德,电话:(023)68485789,E-mail:420306100@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151221.0807.014.html(2015-12-21)

topoisomerase (DNA) Ⅱ binding protein 1 (TopBP1, a mtp53 function-promoting protein) induced by PDGF-DD heavily decreased after Wortmannin treatment. Moreover, the improvement of the mRNA levels of resistant genes, *FOXC2*, *twist*, *snail*, *nanog* and *oct4*, induced by PDGF-DD were seriously limited *via* knocking down mutant p53. **Conclusion** PDGF-DD/PDGFR-β induces Dox resistance in MDA-MB-231 cells by stabilizing mtp53 protein and promoting mtp53-mediated resistance *via* up-regulating *hsp*90 and *TopBP*1 at transcriptional level through the PI3K signaling pathway.

[**Key words**] platelet-derived growth factor receptor-beta; drug resistance; mutant p53; topoisomerase (DNA) Ⅱ binding protein 1; stem-related genes

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-79). Corresponding author: Cao Youde, Tel: 86-23-68485789, E-mail: 420306100@qq.com

除减少药物摄取、增加药物外流、改变药物作用靶点、增强 DNA 损伤后修复和抑制凋亡等经典途径外,肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)和上皮间质化(epithelial mesenchymal transitions,EMT)介导肿瘤治疗抵抗[1-2]的观点逐渐兴起。但以上这些单细胞耐药模型并不能完全解释肿瘤获得性耐药机制。最新研究认为肿瘤微环境在耐药中发挥了重要作用。在放疗存活的肺癌细胞中血小板衍生生长因子受体-β(platelet-derived growth factor receptor-beta,PDGFR-β)和干性相关基因大幅度上调[3],但 PDGFR-β 信号与耐药的关系尚不明确。

几乎一半的人类肿瘤发生了 p53 突变。突变型 p53(mutant p53,mtp53)广泛参与多种化疗药物耐药与放疗抵抗,表达 mtp53 的肿瘤干细胞负责肿瘤耐药与复发[4]。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,TNBC,ER/PR/HER 阴性)占乳腺癌发病率 10% ~ 20%,高度低分化与异质性,因侵袭性强、转移率高等高恶性生物学行为与治疗反应差、病死率较高等不良预后成为近年来乳腺癌研究的热点。阿霉素(doxorubicin,Dox)为高效广谱抗癌药,广泛用于 TAC、AC-P、AC-T、FAC 等乳腺癌化疗方案。因此,本研究以三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(含纯合子 p53R280K)为实验对象,探讨 PDGFR-β 在阿霉素耐药中的作用及与突变型 p53 的关系,力求为优化乳腺癌化疗方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与材料

MDA-MB-231 细胞由重庆医科大学病理学教研室提供,DMEM 培养基、胎牛血清来自于 HyClone 公司。人源重组 PDGF-DD 粉末(GenScript)和阿霉素粉末(Solarbio)均用 ddH_2O 配置成溶液,Wortmannin(Selleck)用 DMSO 配置。Cell Titer(一步溶解试剂)来自 Promega 公司;流式检测试剂由重庆医科大学生命科学院检测中心提供。脂质体 2 000 来自 Invitrogen 公司,*p*53 siRNA 与 NC RNA 由上海吉玛公司设计合成,PCR 引物由上海生工合成,反转录试剂盒(含 gDNA Eraser)来自 TaKaRa 公司。WB 一抗:p53 鼠单抗(DO-1):sc-126(Santa Cruz),PDGFR-β 兔多抗(Immuno-Way),TopBP1 兔多抗(Bioworld),cdk1、p21、bax、hsp90AA1 等兔多抗来自上海生工公司。

1.2 细胞培养

MDA-MB-231 细胞用含有 10% 胎牛血清 + 1% 青霉素链霉素的 DMEM 培养液在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养箱中常规培养。

1.3 MTS 实验

以 4×10^3/孔将对数期细胞接种于 96 孔板中,加入 PDGF-DD(20 ng/mL)或相应体积 ddH_2O,培养 48 h 后再分别加入 Dox 0.01、0.1、1、10、50 μmol/L,同时设置空白组,每组设置 3 个复孔,继续培养 48 h 后按 20 μL/孔避光加入 MTS 溶液,继续孵育 2 h,酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定各孔光吸收值[*D*(490)]。计算各个给药组的细胞存活率。细胞存活率 = [实验组 *D*(490)值 - 空白组 *D*(490)值]/[对照组 *D*(490)值 - 空白组 *D*(490)值] × 100%。以 Dox 浓度对数值为横坐标,细胞存活率为纵坐标绘制曲线。

1.4 流式检测细胞周期和凋亡

按照 5×10^5/孔接种 6 孔板,加入 PDGF-DD(20 ng/mL),培养 24 h 后加入 Dox(0.2 μmol/L),并设立溶剂对照组,孵育 24 h 后胰酶消化,充分吹散后 1 000 × *g* 离心 5 min,PBS 洗涤 2 次,弃上清,一边振荡一边加入 1 mL 于 -20 ℃ 预冷的 75% 乙醇,4 ℃ 固定 24 h,PBS 再次洗涤 2 次后离去上清,加入碘化吡啶(PI)和 RNaseA 至终浓度 50 μg/mL,37 ℃ 避光 30 min 后用流式细胞仪测定细胞周期。在加入 Dox(0.2 μmol/L)48 h 后胰酶消化、轻微吹打、低速离心收集细胞,PBS 洗涤 3 次后离去上清,依照 Annexin-V-FITC 试剂盒说明书用流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

1.5 RNA 干扰

MDA-MB-231 细胞以 40% 比例接种 6 孔板,贴壁后,将阴性对照 RNA(NC)和 *p*53 siRNA 按照脂质体 2 000 说明书进行转染,4 h 后换液,继续培养 48 h,提取总蛋白或总 RNA 进行 Western blot 或 qRT-PCR 检测 p53 表达水平。

表 1 3 条 p53 siRNA 和阴性对照 RNA 序列

RNA 名称	RNA 序列
*p*53 siRNA 1	正义链:5′-CUACUUCCUGAAAACAACG-3′
	反义链:5′-CGUUGUUUUCAGGAAGUAG-3′
*p*53 siRNA 2	正义链:5′-UGGUUCACUGAAGACCCAG-3′
	反义链:5′-CUGGGUCUUCAGUGAACCA-3′
*p*53 siRNA 3	正义链:5′-CUACUUCCUGAAAACAACG-3′
	反义链:5′-GUAGAUUACCACUGCAGUC-3′
阴性对照 RNA	正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3′
	反义链:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3′

1.6 RNA 提取和荧光 qPCR

终止培养后,PBS 洗涤细胞 3 次弃上清,采用 TRIzol(Invitrogen)法提取细胞总 RNA,去 DNA 后反转录为 cDNA。荧光 qPCR 检测各指标 mRNA 表达水平;qPCR 实验均采用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪(USA)进行信号采集,数据以 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算对 mRNA 相对表达量。

表 2 待测基因引物序列及扩增片段长度

引物名称	引物序列	扩增长度
*p*53	上游:5′-GGCGCACAGAGGAAGAGAAT-3′	156 bp
	下游:5′-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3′	
*p*21	上游:5′-TTAGCAGCGGAACAAGGAGT-3′	116 bp
	下游:5′-CGTTAGTGCCAGGAAAGACA-3′	
*cdk*1	上游:5′-TAGCGCGGATCTACCATACC-3′	128 bp
	下游:5′-CATGGCTACCACTTGACCTG-3′	
PDGFR-β	上游:5′-TGGCCCTCAAAGGCGAGC-3′	142 bp
	下游:5′-GAACCCGAGCAGGTCAGAAC-3′	
*TOPBP*1	上游:5′-TCGTACTCTTTCAGATGTCAGCA-3′	180 bp
	下游:5′-CCGCAAAGATATATCCGACAACC-3′	
bax	上游:5′-CCGATTCATCTACCCTGCTG-3′	111 bp
	下游:5′-TGAGCAATTCCAGAGGCAGT-3′	
*hsp*90	上游:5′-GCCCAGAGTGCTGAATACCC-3′	100 bp
	下游:5′-TAACAGGTGCCCTGCTTCTC-3′	
snail	上游:5′-TTTACCTTCCAGCAGCCCTA-3′	108 bp
	下游:5′-GACAGAGTCCCAGATGAGCA-3′	
*FOXC*2	上游:5′-AGTTCATCATGGACCGCTTC-3′	231 bp
	下游:5′-TCTCCTTGGACACGTCCTTC-3′	
twist	上游:5′-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3′	159 bp
	下游:5′-CCAGCTTGAGGGTCTGAATC-3′	
*oct*4	上游:5′-CCCCTGGTGCCGTGAA-3′	97 bp
	下游:5′-GCAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG-3′	
nanog	上游:5′-ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC-3′	76 bp
	下游:5′-TTTTTGCGACACTCTTCTCTGC-3′	
β-actin	上游:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′	285 bp
	下游:5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′	

1.7 蛋白质印迹法(Western blot)

将细胞接种于培养皿中,给药或转染 48 h 后终止培养,PBS 洗涤 3 次,弃上清,加入适量裂解液(RIPA∶PMSF = 100∶1),冰上摇 30 min,刮匙快速刮取细胞裂解液,将其转入 EP 管中,4 ℃ 12 000 × *g* 离心 20 min,取上清冰上备用;利用 BCA 试剂盒(碧云天)测定总蛋白浓度;向蛋白样品中加入 5 × 蛋白上样缓冲液置沸水中变性 5 ~ 10 min;根据待测蛋白相对分子质量配置相应浓度 SDS-PAGE 胶,电泳分离蛋白,湿转法转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶或 5% 牛血清蛋白封闭 2 ~ 3 h,孵一抗 p53 鼠单抗(1∶500 稀释),cdk1、PDGFR-β、p21、bax、hsp90 和 TopBP1 等兔多抗(1∶700 稀释),β-actin 鼠单抗(1∶1 000 稀释),4 ℃ 摇床过夜;1 × TBST 洗膜 10 min × 3 次,加入二抗(山羊抗兔和抗鼠抗体均按1∶1 000 稀释)室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜 10 min × 3 次,用 ECL™ 化学发光法系统采集图像,Image J 软件测量条带灰度值。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 20.0 进行统计分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,双侧检验。

2 结果

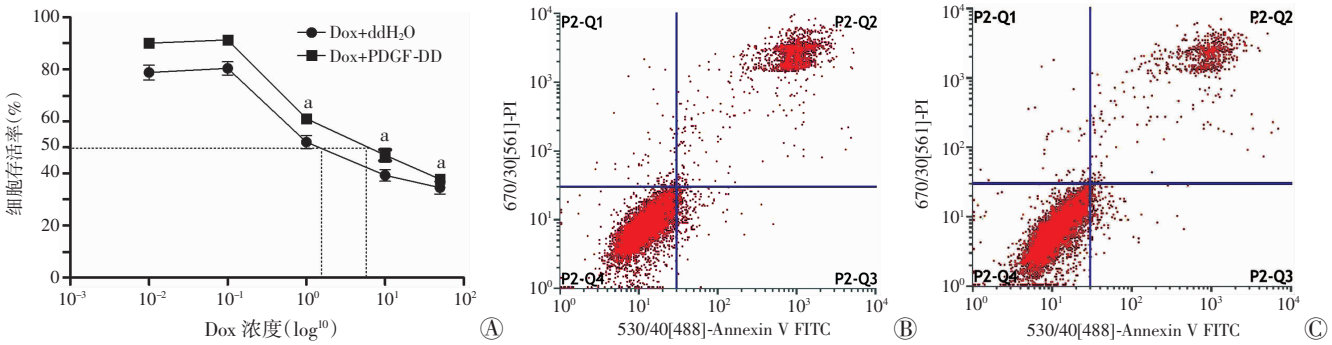
2.1 PDGF-DD/PDGFR-β 诱导 MDA-MB-231 细胞发生阿霉素耐药

PDGF-DD(PDGFR-β 特异性配体)20 ng/mL 或相应体积 ddH_2O 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后加入不同浓度阿霉素(Dox)继续作用 48 h,MTS 结果显示,Dox + PDGF-DD 组与 Dox + ddH_2O 组相比细胞存活率均显著升高($P < 0.05$,图 1A);Dox(0.2 μmol/L)、PDGF-DD(20 ng/mL)处理后,细胞 G_2 期比例分别为:对照组(8.96 ± 1.80)%、Dox + ddH_2O 组(47.99 ± 0.08)%、Dox + PDGF-DD 组(43.04 ± 0.09)%,Dox + PDGF-DD 组与 Dox + ddH_2O 组相比 G_2 期比例下降差异具有统计学意义($P < 0.01$);Dox(0.2 μmol/L)处理 48 h 后,Dox + PDGF-DD 组凋亡比例(10.44 ± 0.49)%与 Dox + ddH_2O(17.02 ± 0.86)% 相比差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 1B、C)。表明 PDGF-DD/PDGFR-β 能明显降低 MDA-MB-231 细胞对 Dox 的敏感性、介导耐药发生。

2.2 PDGFR-β 信号稳定并促进突变型 p53(mtp53)功能

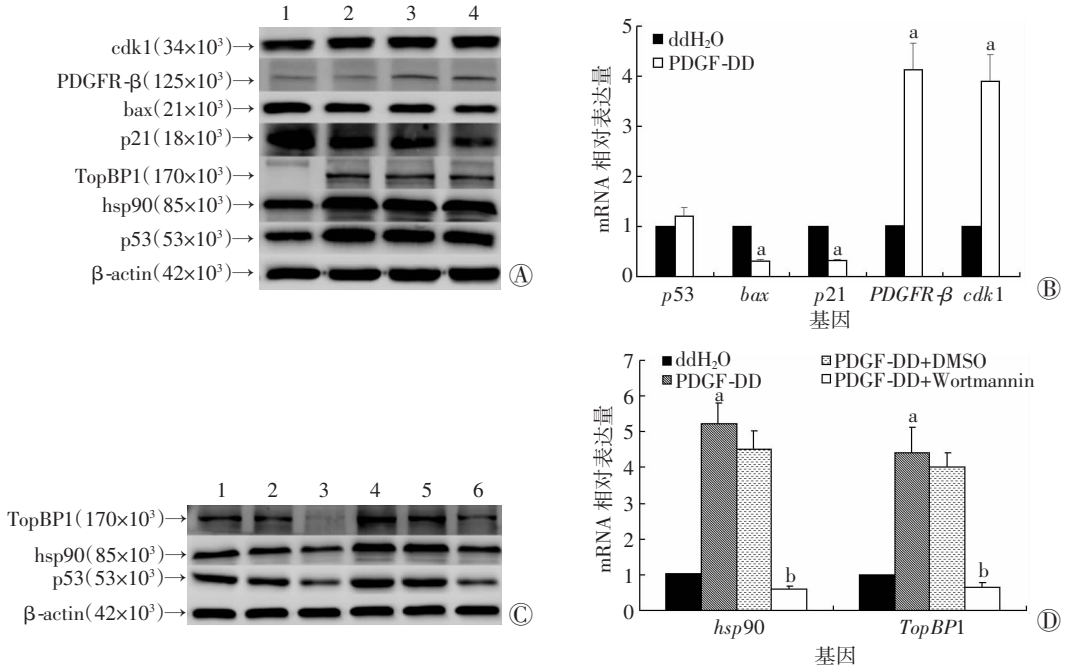
PDGF-DD 处理 MDA-MB-231 细胞后行 Western blot 和 qPCR 检测(图 2A、B),结果显示,PDGF-DD 组

与对照组相比 NF-Y 靶基因 *PDGFR-β*、*cdk*1 mRNA 和蛋白水平显著上升,p63/p73 靶基因 *p*21、*bax* 表达明显下降($P<0.05$)。表明 PDGF-DD/PDGFR-β 可明显促进 mtp53 的致癌作用,形成 PDGFR-β-mtp53-PDGFR-β 正反馈环路;PDGF-DD 处理后 mtp53 蛋白水平显著升高($P<0.05$,图 2A),而其 mRNA 变化差异无统计学意义($P>0.05$,图 2B),提示 PDGF-DD 可能从转录后水平促进 mtp53 功能。有报道热休克蛋白 90(hsp90)能减少突变型 p53 蛋白降解[5]。拓扑异构酶(DNA)Ⅱ结合蛋白 1(TopBP1)可促进突变型 p53 功能[6]。本实验数据显示,PDGF-DD 能显著上调二者的蛋白水平和 mRNA 水平($P<0.05$,图 2A ~ D)。予 DMSO 溶解的 Wortmannin(PI3K 抑制剂)2 μmol/L 处理后,PDGF-DD + Wortmannin 组与其对照组(PDGF-DD + DMSO 组)相比 *hsp*90 和 *TopBP*1 mRNA 和蛋白水平都出现明显降低($P<0.05$,图 2C、D)。表明 PDGFR-β 活化后通过 PI3K 信号转录水平上调 *hsp*90 和 *TopBP*1 表达可能是其促进突变型 p53 功能的机制之一。



A:MDA-MB-231 细胞存活率定量分析　a:$P<0.05$,与 Dox + ddH_2O 组比较;B、C:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Dox + ddH_2O 组,C:Dox + PDGF-DD 组

图 1　PDGF-DD 对 MDA-MB-231 细胞阿霉素(Dox)耐药的影响



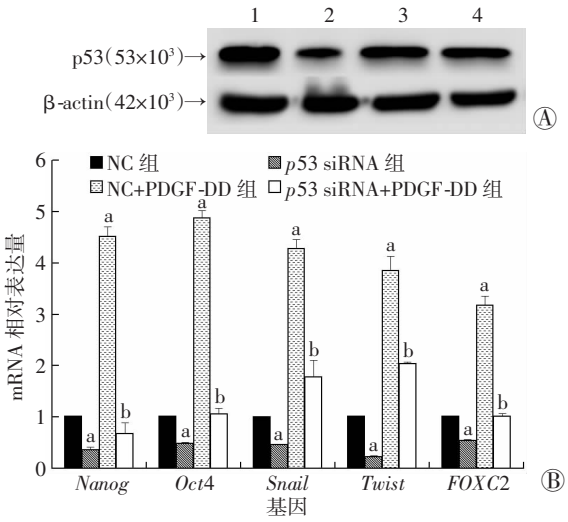
A:Western blot 检测蛋白水平　1:对照组;2 ~ 4:分别为 PDGF-DD 10、20、50 ng/mL 组;B:qPCR 检测 mRNA 相对表达量　a:$P<0.05$,与 ddH_2O 组比较;C:Western blot 检测 TopBP1、hsp90 表达　1:对照组;2:DMSO 组;3:Wortmannin 组;4:PDGF-DD 组;5:PDGF-DD + DMSO 组;6:PDGF-DD + Wortmannin 组;D:qPCR 检测 *TopBP*1、*hsp*90 mRNA 相对表达量　a:$P<0.05$,与 ddH_2O 组比较,b:$P<0.05$,与 PDGF-DD + DMSO 组比较

图 2　PDGFR-β 信号对突变型 p53(mtp53)功能的影响

2.3　PDGFR-β 信号通过突变型 p53(mtp53)促进 EMT 和干性相关基因表达

为验证突变型 p53、PDGF-DD 与耐药相关基因(如 EMT 相关基因、干性相关基因)的关系,我们设计并合成了 3 条 *p53* siRNA,用脂质体 2 000 转染后行 Western blot 检测,结果显示:siRNA1 干扰效率最佳,其蛋白干扰率为 60% 左右(图 3A),mRNA 干扰率为(77.67 ± 15.37)%。

NC + PDGF-DD 组相对于 NC 组 EMT 相关基因(*FOXC2*、*twist*、*snail*)、干性相关基因(*nanog*、*oct4*)mRNA 水平明显升高($P<0.05$,图 3B),*p53* siRNA 组相对于 NC 组、*p53* siRNA + PDGF-DD 组相对于 NC + PDGF-DD 组各基因 mRNA 水平显著下降($P<0.05$,图 3B)。表明 PDGFR-β 信号主要通过突变型 p53 转录水平上调 EMT 和干性相关基因表达。



A:Western blot 筛选 *p53* siRNA　1:阴性对照 RNA;2:*p53* siRNA1;3:*p53* siRNA2;4:*p53* siRNA3;B:qPCR 检测耐药相关基因 mRNA 水平　a:$P<0.05$,与 NC 组比较,b:$P<0.05$,与 NC + PDGF-DD 组比较

图 3　突变型 p53 在 PDGF-DD 上调耐药相关基因中的作用

3　讨论

PDGFR-β 为酪氨酸酶受体,广泛调控细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭与转移、血管生成等过程,在正常人乳腺组织几乎不能检测,但在乳腺癌细胞和基质细胞中常过度表达,与原发性乳腺癌侵袭性表型及显著缩短的无复发生存率相关[7],可以被 PDGF-BB 或-DD 特异性激活(-DD 与-BB 相比作用尚不明确),与 PDGFR-α 功能不尽相同。有报道称,非特异性酪氨酸酶抑制剂伊马替尼控制 PDGFR-β 而不是 PDGFR-α 病例进展失败[8],结合 PDGFR-β 在放疗存活的肺癌细胞中上调[3],因此有必要深入探索其在耐药中的作用与机制。

阿霉素通过直接嵌入 DNA 碱基之间引发拓扑异构酶Ⅱ介导 DNA 三级结构破坏、诱导细胞继发性凋亡来发挥其抗癌作用。本实验 MTS 结果表明:PDGFR-β 活化后能明显提高 MDA-MB-231 在阿霉素条件下细胞存活率及阿霉素 IC_{50} 值,诱导耐药发生。细胞周期与凋亡检测结果证实 PDGF-DD 显著降低阿霉素所致的细胞凋亡,一定程度改善细胞 G_2/M 阻滞。qPCR 数据显示 PDGF-DD 显著提高耐药相关基因如干性相关基因、EMT 相关基因、ABC 转运体家族成员表达。由此可以看出,PDGFR-β 介导耐药的机制涉及增强 DNA 损伤后修复、增强药物外流、抑制凋亡、上调耐药相关基因表达等多个方面。

相对于野生型 p53,超过 70% 的 p53 突变体属于错义突变,大多发在 p53 DNA 结合区内,破坏其特异性 DNA 结合活性。突变体 p53 获得新功能后促进癌细胞增殖、转移、基因组不稳定性和放化疗耐药。以下是 p53 突变体获能的几种潜在机制:①与 NF-Y 转录因子相互结合、上调许多细胞周期相关基因如 *cyclin A*、*cyclin B*、*cdk1C*、*cdc25C*;②与 p63/p73 形成复合物并阻断其 DNA 结合活性,下调许多凋亡基因如 *p21*、*bax*。无论哪种机制其关键是 p53 突变体在细胞中高度累积,但 p53 突变体并不能独自保持自身稳定[9],需要在恶性转化过程中获得一些其他改变的积累才能拥有长半衰期。

PDGFR-β 也是 NF-Y 靶基因之一[10]。本实验 qPCR 和 WB 数据表明 PDGF-DD 能显著调节 p53 突变体下游基因 *cdk1*、*PDGFR-β*、*p21*、*bax* 表达,明显提高 p53 突变体蛋白水平,但其 mRNA 变化差异无统计学意义,提示 PDGFR-β 信号可能是通过转录后调节方式来促进 p53 突变体的功能。hsp90 能失活 MDM_2 和 CHIP 的 E_3 泛素酶活性从而稳定 p53 突变体[5]。TopBP1 作为一个支架蛋白分布于细胞核参与 DNA 损伤反应和 DNA 复制起始的功能为大家所熟悉,但其异位到细胞质、在肿瘤组织中高表达并与高肿瘤分级、短预后相关[11]的机制却知之较少。有报道 TopBP1 能够与 p53 热点突变体结合并促进其对 NF-Y 和 p63/p73 靶基因的调控[6]。本实验中 PDGF-DD 显著上调 *hsp90* 和 *TopBP1* mRNA 和蛋白水平,PI3K/Akt 抑制剂处理后表达明显下降,表明通过 PI3K 信号途径上调 *hsp90* 和 *TopBP1* 表达是 PDGFR-β 信号促进 p53 突变体致癌的机制之一。Akt 失活糖原合成酶激酶 3-β(GSK3-β)、激活热休克转录因子 1(HSF1)可能是 PI3K 信号上调 hsp90 表达的机制之一[12],而 PI3K 调节 TopBP1 的详细机制有待进一步探索。

低紧密连接蛋白乳腺肿瘤占 TNBC 25% ~39%,与高表达的 EMT 相关基因密切相关[13]。EMT 相关基因如 *FOXC*2 能诱导干性相关基因上调、增加干细胞数目[13]。本实验运用 siRNA 技术证明 p53 突变在 PDGF-DD 上调 EMT 和干性相关基因表达中发挥了重要作用。文献[14-16]证明 EMT 相关基因 *FOXC*2、*snail*、*twist* 受转录因子 NF-κB 调控。p53 突变能增强 NF-κB 活化强度及持续时间[17]。在肿瘤组织中 p53 突变体表达水平与 NF-κB 活性正相关[18]。因此我们推测 NF-κB 可能是 p53 突变体上调 EMT 及干性相关基因表达的方式之一。

综上所述,PDGF-DD/PDGFR-β 能诱导 MDA-MB-231 细胞发生阿霉素耐药,通过 PI3K 途径转录水平上调 *hsp*90 和 *TopBP*1 表达、稳定并促进 p53 突变体介导细胞耐药是其重要机制之一。因此,PDGFR-β 有可能成为耐阿霉素三阴性乳腺癌的治疗靶点之一,尤其是含 p53 突变的肿瘤。本研究为优化乳腺癌化疗方案提供了一定的实验依据。

参考文献:

[1] Ablett M P, Singh J K, Clarke R B. Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic? [J]. Eur J Cancer, 2012, 48(14): 2104-2116. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.03.019

[2] Shintani Y, Okimura A, Sato K, *et al*. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer[J]. Ann Thorac Surg, 2011, 92(5): 1794-1804. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2011.07.032

[3] Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, *et al*. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 94. DOI: 10.1186/1476-4598-12-94

[4] Shetzer Y, Solomon H, Koifman G, *et al*. The paradigm of mutant p53-expressing cancer stem cells and drug resistance [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(6): 1196-1208. DOI: 10.1093/carcin/bgu073

[5] Li D, Marchenko N D, Schulz R, *et al*. Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(5): 577-588. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0534

[6] Liu K, Ling S, Lin W C. TopBP1 mediates mutant p53 gain of function through NF-Y and p63/p73 [J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(22): 4464-4481. DOI: 10.1128/MCB.05574-11

[7] Coltrera M D, Wang J, Porter P L, *et al*. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma[J]. Cancer Res, 1995, 55(12): 2703-2708.

[8] Watanabe K, Otsu S, Morinaga R, *et al*. CD34-negative solitary fibrous tumour resistant to imatinib[J]. BMJ Case Rep, 2013, 2013. DOI: 10.1136/bcr-2013-200126

[9] Lang G A, Iwakuma T, Suh Y A, *et al*. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome[J]. Cell, 2004, 119(6): 861-872.

[10] Weissmueller S, Manchado E, Saborowski M, *et al*. Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor β signaling[J]. Cell, 2014, 157(2): 382-394. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.066

[11] Liu K, Bellam N, Lin H Y, *et al*. Regulation of p53 by TopBP1: a potential mechanism for p53 inactivation in cancer[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(10): 2673-2693. DOI: 10.1128/MCB.01140-08

[12] Takahashi R U, Takeshita F, Honma K, *et al*. Ribophorin Ⅱ regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3β[J]. Sci Rep, 2013, 3: 2474. DOI: 10.1038/srep02474

[13] Hollier B G, Tinnirello A A, Werden S J, *et al*. FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(6): 1981-1992. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2962

[14] Yu Y H, Chen H A, Chen P S, *et al*. MiR-520h-mediated FOXC2 regulation is critical for inhibition of lung cancer progression by resveratrol[J]. Oncogene, 2013, 32(4): 431-443. DOI: 10.1038/onc.2012.74

[15] Cichon M A, Radisky D C. ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF-kB-dependent activation of Snail[J]. Oncotarget, 2014, 5(9): 2827-2838.

[16] Tsubaki M, Komai M, Fujimoto S, *et al*. Activation of NF-κB by the RANKL/RANK system up-regulates snail and twist expressions and induces epithelial-to-mesenchymal transition in mammary tumor cell lines[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32: 62. DOI: 10.1186/1756-9966-32-62

[17] Schneider G, Henrich A, Greiner G, *et al*. Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53 [J]. Oncogene, 2010, 29(19): 2795-2806. DOI: 10.1038/onc.2010.46

[18] Weisz L, Damalas A, Liontos M, *et al*. Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2396-2401.

(**收稿**:2015-10-19;**修回**:2015-11-23)

(编辑 汪勤俭)