doi:10.11659/jjssx.09E017007

·基础研究·

Klotho 通过抑制自噬逆转乳腺癌紫杉醇耐药的作用机制研究

龙方懿[1],贾 萍[1],王华飞[1],卿 轶[1],熊婷婷[1],何梦婕[1],孙 瑾[1],陈 芳[1],孙倩茹[1],王 婷[2] (1.四川省妇幼保健院药学部,成都医学院附属妇女儿童医院药学部,四川 成都 610041;2.四川省肿瘤医院临床药学管理部,四川 成都 610041)

[摘 要] **目的** 探讨 Klotho 逆转乳腺癌紫杉醇耐药的分子机制。**方法** Western blot 法检测乳腺癌细胞 MCF-7 与紫杉醇耐药的乳腺癌细胞 MCF-7/PTX 中 Klotho 的表达情况,MTT 法检测 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇耐药的影响;Western blot 法考查 Klotho 与自噬抑制剂 3-methyladenine(3-MA)对 MCF-7/PTX 细胞 Beclin1 蛋白表达的影响,并利用 MTT 法检测 Klotho 与 3-MA 对该细胞紫杉醇耐药的影响。**结果** MCF-7/PTX 细胞中 Klotho 的表达较 MCF-7 细胞低,Klotho 可增强 MCF-7/PTX 细胞对紫杉醇的敏感性;MCF-7/PTX 细胞中 Beclin1 表达较 MCF-7 细胞高,而 Klotho 与 3-MA 均可降低该细胞中 Beclin1 的表达,且 Klotho 对该细胞紫杉醇耐药的逆转作用与 3-MA 相仿。**结论** 乳腺癌细胞的紫杉醇耐药与 Klotho 表达有关,Klotho 可通过抑制自噬进而逆转乳腺癌紫杉醇耐药。

[关键词] Klotho;自噬;乳腺癌;紫杉醇;耐药

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-09-13

Study on mechanism of Klotho reversing resistance of breast cancer to paclitaxel by inhibiting autophagy

LONG Fang-yi[1],JIA Ping[1],WANG Hua-fei[1],QING Yi[1],XIONG Ting-ting[1],HE Meng-jie[1],SUN Jin[1],CHEN Fang[1],SUN Qian-ru[1],WANG Ting[2] (1. Department of Pharmacy,Sichuan Provincial Hospital for Women and Children,Women and Children's Hospital of Chengdu Medical College,Chengdu Sichuan 610041,China;2. Department of Pharmacy,Sichuan Cancer Hospital,Chengdu Sichuan 610041,China)

Absract: Objective To investigate the mechanism of klotho reversing the resistance of breast cancer to paclitaxel in MCF-7/PTX cells. **Methods** The Klotho expression in MCF-7 and MCF-7/PTX cells was detected by Western blot. The effects of Klotho on paclitaxel resistance in MCF-7/PTX cells was measured by MTT assay. The effects of Klotho and 3-methyladenine (3-MA) on proliferation and expression of Beclin1 in MCF-7/PTX cells were detected by MTT and Western blot assay,respectively. **Results** The expression of Klotho in MCF-7/PTX cells was decreased compared with MCF-7 cells. Klotho could sensitize MCF-7/PTX cells to paclitaxel. The expression of Beclin1 in MCF-7/PTX cells was higher than that in MCF-7 cells. Klotho and 3-MA could decrease the expression of Beclin1 in MCF-7/PTX cells,and the effects of Klotho on paclitaxel resistance in MCF-7/PTX cells was similar to that of 3-MA. **Conclusion** Paclitaxel resistance in breast cancer cells is related to expression of the Klotho which can reverse the resistance of breast cancer to paclitaxel by inhibiting autophagy.

Keywords: klotho;autophagy;breast cancer;paclitaxel;drug resistance

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升。研究发现,超过 70% 的乳腺癌患者需要接受化疗以达到降低复发风险和缩小病灶等目的[1-3]。紫杉醇是目前乳腺癌治疗的一线化疗药物,但高发的耐药性严重制约了其临床应用[4]。因此,阐明乳腺癌紫杉醇耐药的分子机制,对于逆转乳腺癌化疗耐药、控制病灶转移以及改善患者的生存质量具有重要的意义。

Klotho 是 1997 年 Kuro-o 等[5]发现的新基因。近期研究发现,Klotho可通过PI3K/Akt途径逆转肺癌顺铂耐药[6];此外,顺铂耐药的肺癌细胞中检测到了 Klotho 表达降低,并伴随着自噬活性的增强,而 Klotho 表达上调可降低自噬活性进而逆转肺癌细胞顺铂耐药性[7]。这些研究表明,Klotho 可能在肿瘤耐药发生中发挥着重要作用,目前,有关 Klotho 与肿瘤耐药的报道甚少,且未见 Klotho 在乳腺癌耐药中的研究。本研究拟通过比较正常 MCF-7 细胞与紫杉醇耐药 MCF-7 细胞(MCF-7/PTX)中 Klotho 的表达情况,利用 MTT 检测 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞增殖的影响,阐明其对乳腺癌紫杉醇耐药的影响;同时利用 Western blot 与 MTT 探究 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞 Beclin1 的表达及细胞增殖的影响,并采用自噬抑制剂 3-methyladenine(3-MA)进行对照试验,初步探讨 Klotho 逆转乳腺癌紫杉醇耐药的分子机制。

[基金项目] 四川省科技厅面上项目(2017JY0303);四川省卫生计生委普及应用项目(17PJ562)

[通信作者] 贾 萍,E-mail:jp178@tom.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人乳腺癌细胞系 MCF-7 与紫杉醇耐药株 MCF-7/PTX(武汉普诺赛生命科技有限公司),RPMI 1640 培养液、胎牛血清、青链霉素与胰酶(美国 Gibco 公司),DMSO、MTT、紫杉醇与 3-Methyladenine(美国 Sigma 公司),Klotho 过表达质粒 pCMV6-Klotho(美国 Origene 公司),lipofectamine 3000(美国 Invitrogen 公司),Klotho、Beclin1 与 β-actin 一抗(美国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记二抗与 ECL 显影液(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 与 MCF-7/PTX 细胞培养于含 10%(v/v)灭活胎牛血清、青霉素 100 u/mL 和链霉素 100 u/mL 的 RPMI 1640 培养液中,待细胞汇合度达 90% ~100% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,并进行传代培养,将细胞状态调至对数生长期后进行后续实验研究。

1.2.2 细胞转染 转染前 1 d,将一定量细胞接种至 96 孔板或 6 孔板中,以第 2 天细胞汇合度为 70% ~90% 为宜;转染时,先将 lipofactamine 3000 加入到无血清 RPMI 1640 培养基,即得 lipofactamine 3000 稀释液;再将重组质粒与 P3000 试剂加入到 RPMI 1640 无血清培养基中,即得 DNA 预混液。将以上两种混合液轻轻混匀并室温下孵育 5 min,然后轻轻加入到 96 孔板或 6 孔板中,培养一段时间后进行后续实验。

1.2.3 MTT 实验 在 96 孔板中每孔种入约 1×10^4 个细胞,待细胞贴壁 24 h 后,以每孔 10 μL 加入 5 mg/mL MTT,37 ℃孵育 4 h。弃上清,每孔中加入 150 μL DMSO,溶解 MTT 和活细胞线粒体反应形成的蓝紫色结晶甲瓒。使用酶标仪 490 nm 波长检测 OD 490 nm 值。

1.2.4 细胞总蛋白提取 将 1 mL 含有 PMSF 的 RIPA 裂解液加入到长有细胞的 6 孔板中,水平放置并于冰上裂解 30 min,裂解过程中应经常来回晃动 6 孔板。裂解完成后于 4 ℃,12 000 rpm 离心 5 min,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,蛋白变性煮沸 5 min 后即可进行 Western blot 等实验。

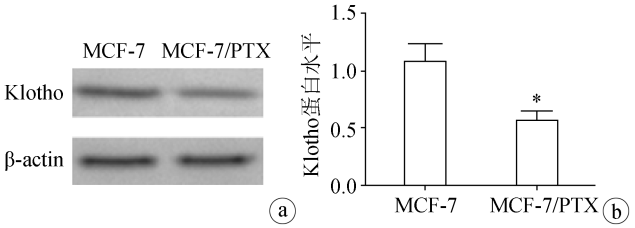
1.2.5 Western blot 实验 对各组细胞分别取 40 μg总蛋白进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 mV 恒流湿转至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h,分别用 Klotho 抗体(1∶1 000 稀释)、Beclin1 抗体(1∶1 000 稀释)和 β-actin(1∶5 000 稀释)4 ℃孵育过夜;然后,采用辣根过氧化物酶标记二抗(1∶5 000 稀释),37 ℃孵育 1 h,ECL 显影液处理后曝光;最后,利用 Image-Pro Plus 6.0 系统采集与分析图像。

1.2.6 统计分析 实验数据均以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,实验结果采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Klotho 在 MCF-7 与 MCF-7/PTX 细胞中的表达

将处于对数生长期的 MCF-7 与 MCF-7/PTX 细胞进行总蛋白提取,然后进行 Western blot 检测,检测结果如图 1 所示,MCF-7/PTX 细胞中 Klotho 蛋白的表达较 MCF-7 细胞降低了 47.53%($P < 0.05$),表明相较于正常的 MCF-7 细胞,紫杉醇耐药的 MCF-7 细胞中 Klotho 表达明显降低。

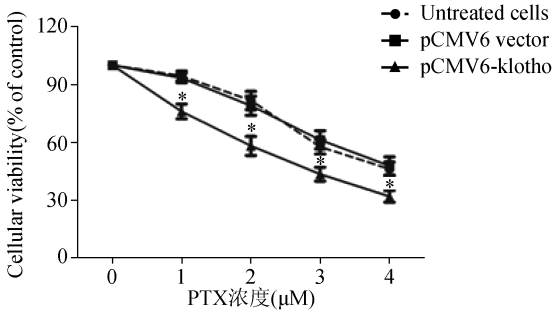


a:Western blot 分析 Klotho 在 MCF-7 与 MCF-7/PTX 细胞中的表达;b:Western blot 实验结果的柱状图 *:与 MCF-7 组比较,$P < 0.05$

图 1 Klotho 在 MCF-7 与 MCF-7/PTX 细胞中的表达

2.2 Klotho 可增强 MCF-7/PTX 细胞对紫杉醇的敏感性

为了考察 Klotho 在乳腺癌细胞紫杉醇耐药中的作用,MTT 检测 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇敏感性的影响(图 2)。不同浓度紫杉醇作用 MCF-7/PTX 细胞 24 h 后,与转染对照质粒 pCMV6 vector 的 MCF-7/PTX 细胞相比,转染 pCMV6-Klotho 的 MCF-7/PTX 细胞细胞存活率较低,这些结果表明 Klotho 表达上调可增强 MCF-7/PTX 细胞对紫杉醇的敏感性。

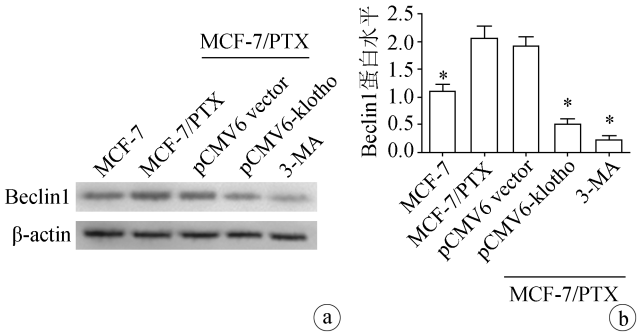


*:与 pCMV6 vector 组比较,$P < 0.05$

图 2 Klotho 过表达可增强 MCF-7/PTX 细胞对紫杉醇的敏感性

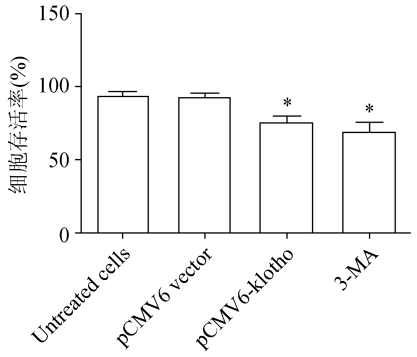
2.3 Klotho 通过抑制自噬逆转乳腺癌细胞紫杉醇耐药

Beclin1 是参与细胞自噬的标志性蛋白,本研究通过 Western blot 检测各组细胞 Beclin1 的表达情况,以此考查 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞自噬的影响。MCF-7/PTX细胞 Beclin1 表达相较于 MCF-7 细胞显著增高,而过表达 Klotho 或加入自噬抑制剂 3-MA 均可降低 MCF-7/PTX 细胞 Beclin1 的表达,这些结果表明 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇耐药的发生可能与细胞自噬水平增高有关,Klotho 与 3-MA 均可降低 MCF-7/PTX 细胞自噬水平(图 3)。进一步研究考查 Klotho 导致的自噬水平降低与其逆转紫杉醇耐药的关系,在紫杉醇(1 μM)作用下,Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇耐药的逆转作用与自噬抑制剂 3-MA 相仿(图 4)。



a:Western blot 分析各组细胞中 Beclin1 的表达;b:Western blot 实验结果的柱状图 *:与 MCF-7/PTX 组比较,$P<0.05$

图 3 Klotho 过表达可降低 MCF-7/PTX 细胞 Beclin1 蛋白水平



*:与 pCMV6 vector 组比较,$P<0.05$

图 4 Klotho 与 3-MA 对 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇耐药的影响

3 讨论

紫杉醇作为一线抗肿瘤药物被广泛用于乳腺癌的化学治疗,其耐药性的产生是导致乳腺癌化疗失败的主要因素之一[4]。研究发现,紫杉醇耐药与 ABC 转运蛋白、微管蛋白及细胞凋亡等有关[8-9]。然而,紫杉醇耐药机制繁冗复杂,其分子机制还不十分清楚。

Klotho 是日本学者 Kuro-o 等[5]于 1997 年发现的新基因,该基因启动子在肿瘤组织中常常呈高度甲基化状态,其在肿瘤组织中的表达低于癌旁组织或正常组织[10-13]。Klotho 已被公认为一种抑癌基因而引起了广泛的研究[10-15]。Klotho 作为肿瘤抑制因子最早是在乳腺癌中被发现的,Klotho 在乳腺癌组织中的表达量较癌旁组织低,进一步研究发现,Klotho 可抑制乳腺癌细胞生长[16]。近期研究发现,Klotho 可通过 PI3K/Akt 途径逆转肺癌顺铂耐药[6];此外,在顺铂耐药的肺癌细胞中 Klotho 表达降低,并伴随着自噬活性的增强,而 Klotho 表达上调可降低自噬活性进而逆转肺癌细胞顺铂耐药性[7]。因此,Klotho 作为抑癌基因可能在肿瘤耐药中发挥着重要作用。

目前,有关 Klotho 与肿瘤耐药的报道甚少,且未见 Klotho 在乳腺癌耐药中的研究。本研究利用 Western blot 考查了 Klotho 在 MCF-7 与 MCF-7/PTX 细胞中的表达情况,发现 MCF-7/PTX 细胞中 Klotho 表达较低,表明 Klotho 可能与乳腺癌细胞 MCF-7 紫杉醇耐药有关。进一步研究通过 MTT 实验探究 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇耐药的影响,结果表明不同浓度紫杉醇作用 MCF-7/PTX 细胞 24 h 后,转染 pCMV6-Klotho 的 MCF-7/PTX 细胞存活率较低,提示 Klotho 可增强 MCF-7/PTX 细胞对紫杉醇的敏感性。最后,通过 Western blot 检测各组细胞自噬标志物 Beclin1 的表达情况,以此考查 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞自噬水平的影响。研究发现,MCF-7/PTX 细胞 Beclin1 表达显著增高,而过表达 Klotho 或加入自噬抑制剂 3-MA 均可降低细胞 Beclin1 的表达,这些结果表明乳腺癌紫杉醇耐药的发生可能与细胞自噬水平增高有关,Klotho 与 3-MA均可降低紫杉醇耐药的乳腺癌细胞自噬水平。此外,本研究还发现 Klotho 对 MCF-7/PTX 细胞紫杉醇耐药的逆转作用与自噬抑制剂3-MA 相仿,表明 Klotho 逆转乳腺癌紫杉醇耐药可能与其对细胞自噬的抑制作用有关。

综上,本研究首次发现 Klotho 可通过降低紫杉醇耐药的乳腺癌细胞自噬水平进而逆转其耐药性,并证实了 Klotho 对细胞自噬的抑制在乳腺癌紫杉醇耐药中的重要作用。本研究为临床上紫杉醇耐药乳腺癌患者的治疗提供了新的靶点,也为以 Klotho 为靶点的新的逆转紫杉醇耐药的药物研发提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Zhang Q, Wang J, He H, et al. Trametenolic acid B reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression level of P-glycoprotein[J]. Phytother Res, 2014, 28(7): 1037 – 1044. doi:

doi:10.11659/jjssx.01E017032

·临床研究·

肩关节前下盂唇损伤非牵引下关节镜修复术的临床分析

刘欣伟,刘松波,丁国成,刘 铭,郭 超,张敬东,王 宇 (沈阳军区总医院骨科,全军重症战创伤救治中心,辽宁 沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 探讨非牵引技术在肩关节前下盂唇损伤肩关节镜修复术中的应用效果。**方法** 回顾性分析2009年1月至2015年1月我科收治的182例肩关节前下盂唇损伤患者的临床资料,年龄18~39岁,平均(26.5±9.3)岁;病程1~10年,平均(3.2±2.6)年;复发脱位6~62次,平均(24.2±17.3)次。在非牵引技术下进行了侧卧位肩关节镜下非骨性修复术,术后采用Rowes评分、UCLA评分系统进行疗效评价。**结果** 182例获6~18个月随访,平均(12.5±6.7)个月。12例术后外旋活动受限20°,无法参加对抗性训练,余170例能够参加对抗性训练。全部患者平均肩关节外旋活动角度丢失(10.5±4.1)°。术后UCLA评分(89±3.5)分较术前(25±6.2)分明显提高,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后Rowes评分(28.7±2.2)分较术前(7.3±1.6)分明显提高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 非牵引技术在训练伤致肩关节前下盂唇损伤肩关节镜修复术中的应用疗效满意,术中因无巨大的外力牵引从而保护了臂丛神经、血管等组织,有利于患者快速康复,值得在基层医院推广应用。

[关键词] Bankart损伤;关节镜;肩关节不稳;盂肱关节

[中图分类号] R687.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-01-13

Application of arthroscopic repair without traction for non-osseous Bankart injury in shoulder

LIU Xin-wei, LIU Song-bo, DING Guo-cheng, LIU Ming, GUO Chao, ZHANG Jing-dong, WANG Yu (Department of Orthopedic, Laboratory of Severe Wound and Trauma of Chinese PLA, General Hospital of Shenyang Military Area Commond, Shenyang Liaoning 110016, China)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20170540942)

[通信作者] 王 宇, E-mail:deformitya@126.com

10.1002/ptr.5089.

[2] Kenicer J, Spears M, Lyttle N, et al. Molecular characterisation of isogenic taxane resistant cell lines identify novel drivers of drug resistance[J]. BMC Cancer, 2014, 14:762. doi:10.1186/1471-2407-14-762.

[3] Volk-Draper L, Hall K, Griggs C, et al. Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner[J]. Cancer Res, 2014, 74(19):5421-5434. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0067.

[4] Stengel C, Newman SP, Day JM, et al. In vivo and in vitro properties of STX2484: a novel non-steroidal anti-cancer compound active in taxane-resistant breast cancer[J]. Br J Cancer, 2014, 111(2):300-308. doi:10.1038/bjc.2014.188.

[5] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. Nature, 1997, 390(6655):45-51. doi:10.1038/36285.

[6] Wang Y, Chen L, Huang G, et al. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e57391. doi:10.1371/journal.pone.0057391.

[7] Chen T, Ren H, Thakur A, et al. Decreased level of klotho contributes to drug resistance in lung cancer cells: involving in klotho-mediated cell autophagy[J]. DNA Cell Biol, 2016, 35(12):751-757. doi:10.1089/dna.2016.3437.

[8] Lee JP, Hahn HS, Hwang SJ, et al. Selective cyclooxygenase inhibitors increase paclitaxel sensitivity in taxane-resistant ovarian cancer by suppressing P-glycoprotein expression[J]. J Gynecol Oncol, 2013, 24(3):273-279. doi:10.3802/jgo.2013.24.3.273.

[9] Banerjee A. Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(Ⅲ)-, and beta(Ⅳ)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(1):598-601. doi:10.1016/S0006-291X(02)00269-3.

[10] Rubinek T, Shulman M, Israeli S, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 133(2):649-657. doi:10.1007/s10549-011-1824-4.

[11] Zhou X, Zhang Y, Li Y, et al. Klotho suppresses tumor progression via inhibiting IGF-1R signaling in T cell lymphoma[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2):967-974. doi:10.3892/or.2017.5744.

[12] Adhikari BR, Uehara O, Matsuoka H, et al. Immunohistochemical evaluation of Klotho and DNA methyltransferase 3a in oral squamous cell carcinomas[J]. Med Mol Morphol, 2017, 50(3):155-160. doi:10.1007/s00795-017-0156-9.

[13] Lojkin I, Rubinek T, Orsulic S, et al. Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Lett, 2015, 362(2):149-157. doi:10.1016/j.canlet.2015.03.035.

[14] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

[15] Ligumsky H, Rubinek T, Merenbakh-Lamin K, et al. Tumor suppressor activity of klotho in breast cancer is revealed by structure-function analysis[J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(10):1398-1407. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0141.

[16] Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(56):7094-7105. doi:10.1038/onc.2008.292.

(编辑:左艳芳)