JAB1 过表达增加人肺腺癌细胞对化疗的敏感性

胡明冬[1],周长喜[2],杨 昱[1],徐剑铖[1],李 琦[1] (1. 第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所,重庆 400037;2. 解放军总医院南楼呼吸内科,北京 100853)

[摘 要] **目的** 通过探讨缺氧诱导因子 1(HRE-1)启动子诱导 JAB1 过表达致人肺腺癌细胞(A549)对化疗敏感性的增加程度,来找到提高肺癌缺氧区肿瘤细胞对化疗敏感性的方法,最终达到逆转肺癌化疗耐药的目的。**方法** 首先成功构建缺氧反应元件启动子所驱动的 pUC57-HRE-JAB1 真核表达质粒。随后,将该质粒导入 A549 细胞,化疗药物顺铂(C-DDP)也同时加入处理 A549 细胞。采用 RFPCR 和 Western blot 分别检测转染后 A549 中 JAB1 的 mRNA 和蛋白表达水平。采用流式细胞术检测经 pUC57-HRE-JAB1 质粒转染后 A549 细胞周期和凋亡的改变。**结果** 较空白对照组和空载体组,经 pUC57-HRE-JAB1 真核表达质粒转染后,A549 细胞中 JAB1 的表达明显增加($P<0.05$)。同时,细胞周期被阻滞于 G_1 期,并且转染后顺铂所诱导的细胞凋亡率较单纯顺铂处理明显增加($P<0.01$)。更为重要的是,pUC57-HRE-JAB1 导入增加了 A549 细胞对 C-DDP 的敏感性。**结论** 缺氧诱导因子 1 启动子所诱导的 JAB1 过表达增加了肺癌细胞的化疗敏感性,为逆转肺癌化疗耐药提供了一种可行的治疗策略。

[关键词] 肺癌;缺氧诱导因子;JAB1;耐药;顺铂

[中图分类号] R734.2;R453;Q782 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)02-0145-04

Enhancement of human lung cancer cell sensitivity to chemotherapy by JAB1 over-expression

HU Ming-dong, ZHOU Chang-xi, YANG Yu, XU Jian-cheng, LI Qi (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To search for the methods to increase the sensitivity of tumor cells to chemotherapy in anoxic zone of lung cancer and finally to reverse chemotherapeutic resistance of lung cancer by discussing the increasing of sensitivity of human lung cancer cell(A549) to chemotherapy through over-expression of JAB1 induced by hypoxia-inducible factor 1(HRE-1) promoter. **Methods** An eukaryotic expression plasmid pUC57-HRE-JAB1 driven by hypoxia response elements promoter was constructed first and then the plasmid along with chemotherapeutic drug such as cis-diamminedichloroplatinum (C-DDP) was introduced into lung cancer cell line A549 to treat A549 cells. RFPCR and western blot were used to assay the mRNA and protein level of JAB1. Cell cycle and apoptosis of A549 cells were also assayed after the transfection. **Results** The results showed that JAB1 gene in the A549 was overexpressed after the transfection of pUC57-HRE-JAB1 compared with that in control group and blank group($P<0.05$). The cell proliferation was arrested at G1 phase and the cell apoptosis was significantly enhanced after the transfection($P<0.01$). Importantly, pUC57-HRE-JAB1 introduction significantly increased the chemotherapeutic susceptibility of A549 to C-DDP. **Conclusion** Hypoxia-inducible factor 1 promoter-induced JAB1 overexpression significantly increased the chemotherapeutic sensitivity of lung cancer cells. It might provide an efficient strategy to overcome the chemotherapeutic resistance of lung cancer.

Keywords: lung cancer; hypoxia-inducible factor; JAB1; resistance; cisplatin

化疗是治疗肺癌主要方法之一。细胞毒药物将导致大多数肿瘤细胞发生凋亡,然而仍会留下少数存活的肿瘤细胞,而这部分肿瘤细胞主要位于缺氧区。缺氧诱导因子 1(HIF-1)在缺氧条件下,缺氧反应元件(HIF-1/HRE)的一个启动子受到了明显的影响。HIF-1/HRE 可明显促进靶基因 HIF-1 的表达,而对于其他癌基因的表达并没有明显影响[1]。Jun 活化域结合蛋白 1(JAB1),可与 c-Jun 和 JunD 相互作用,并选择性增强转录活性,从而促进细胞增殖[2]。对于 E2F1 所诱导的肿瘤细胞凋亡,JAB1 是一个特异性的抑制子[3],E2F1 可协同 JAB1 共表达诱导细胞凋亡。然而,JAB1 却不能协同 E2F1 促进细胞周期的进入。同时,在 JAB1 缺失的细胞中并没有发现 E2F1 诱导的凋亡和 p53 聚集的诱导[4]。本研究首先扩增了人类 JAB1 全长片段,并将其插入含有 6 个 HIF/HRE 序列的 pUC57 载体构建 pUC57-HRE-JAB1 真核表达质粒。将该质粒导入肺腺癌细胞株 A549 中。通过 qRT-PCR

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30801366)

[作者简介] 胡明冬(1976-),男,重庆市人,主治医师,博士,主要从事 ARDS 和肺癌方面的研究。电话:(023)68774603, E-mail: huhanshandd@yahoo.com.cn

[通讯作者] 徐剑铖, E-mail: xu822036@sohu.com, 电话:(023)268755003

[收稿日期] 2010-12-13 [修回日期] 2011-01-15

与 Western blot 检测转染后的细胞中 JAB1 基因的表达情况。通过流式细胞术检测顺铂存在与不存在的情况下细胞的周期与凋亡的变化情况。探讨 JAB1 在肺癌细胞化疗抵抗中的作用,并为靶向治疗肺癌的多药耐药提供一种有效、可行的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肺腺癌细胞株 A549,由本室保存。胎牛血清、胰蛋白酶、RNA 提取试剂 Tripure reagent 为 Roche 公司产品;M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司;Taq 酶、DNaseI(RNase free)购自 TaKaRa 公司;PCR 引物均由上海英骏生物技术公司合成;C-DDP 由 F. H. Faulding 公司提供。阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 购于上海英骏生物技术公司。2720 型 PCR 仪由美国 ABI 提供;Bio-Rad 核酸蛋白测定仪、192 型 Sub-Cell 电泳槽和全自动凝胶成像系统均由美国 Bio-Rad 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 pUC57-HRE-JAB1 质粒构建及转染 通过 BLAST 确认 NCBI 上人类 JAB1 5'-非翻译区。随后,人类 JAB1 cDNA 序列(NM.006837)被挑选用于后续实验。A549 细胞中一个含有 JAB1 基因的 5'端上游区域的片段通过 PCR 扩增出来。上游引物 5'-ATGGCGGCGTCCGGGAGCGG-3',下游引物 5'-TTAAGAGATGTTAATTTGAT-3', HER 核心序列是 ACGTG(DJ058533)。PCR 扩增后将 JAB1 基因全长序列克隆进入含有 6 个 HIF/HRE 序列的 pUC57 载体中,酶切位点为:BamHI/NotI。参照分子克隆方法将重组质粒导入 200 μl 双歧杆菌感受态细胞中,将转化后的细胞悬液均匀涂布于 LB 固体培养基平板上,37 ℃孵育 16 ~ 24 h,挑单克隆菌落行 PCR 检测,阳性克隆进行测序。细胞转染采用阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000。首先将 A549 细胞在含有质粒 pUC57-HRE-JAB1(1 ng)培养 10 h,随后将培养基更换为普通培养基培养 48 h。加入 400 μg/mL 遗传霉素 G418 培养 14 d 筛选阳性细胞(JAB1 组)。空载体对照组(HRE 组)细胞转染 pUC57-HRE 质粒,空白对照组(A549 组)不加质粒。

1.2.2 A549 细胞缺氧培养及转染 在一个缺氧手套盒中,将 A549 细胞暴露于缺氧环境(0.3% O_2)中 24 h[5]。同时,采用 2 μg/mL C-DDP 处理转染的细胞。另外,缺氧暴露后如要更换培养液,被更换的培养液用前将在缺氧环境中平衡 24 h。

1.2.3 A549 细胞中 JAB1 基因 mRNA 水平的检测 收集对数生长期 A549 细胞,抽提细胞总 RNA,部分用于 PCR 检测。其余 RNA 置 -20 ℃保存。各样本均取 2 μg RNA,补 Rnase-free dd H_2O 至 11 μl。于 70 ℃水浴 5 min 后立即放在冰浴上,各管中再分别加入 5 × RT Buffer、dNTPs、Rnain、Oligo、M-MLV。42 ℃水浴 60 min,70 ℃热灭活 M-MLV 10 min。qPCR 检测:JAB1 引物上游 5'-GCGAGGAGAACAAGGG-3',下游 5'-TGGCTGTGCGCAGGT-3';β-actin 引物上游 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游 5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。反应条件为 94 ℃预变性 1 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共计 40 个循环,最后 72 ℃10 min。数据采用 IQ5 软件进行分析。基因表达变化通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行计算。

1.2.4 MTT 检测 将 1.0×10^4 对数生长期细胞接种于 96 孔培养板中(每孔 100 μl),分组:A549(A 组),A549 加 C-DDP(B 组),A549/pUC57-HRE 加 C-DDP(C 组),A549/pUC57-HRE-JAB1 加 C-DDP(D 组)。同时,将 C-DDP(终浓度 2 μg/mL)加入孔中。各组细胞厌氧 12 h 后,去上清,每孔各加入 20 μl XTT(5 mg/mL)。再继续培养 24 h。去上清,各孔加入 150 μl 二甲基亚砜。将培养板轻轻振荡 5 min,采用酶标仪于 492 nm 处检测溶液吸光度值。

1.2.5 A549 细胞周期及凋亡检测 细胞分组:A549(1 组)、A549/pUC57-HRE(2 组)、A549/pUC57-HRE-JAB1(3 组)、A549 加 C-DDP(4 组)、A549/pUC57-HRE 加 C-DDP(5 组)、A549/pUC57-HRE-JAB1 加 C-DDP(6 组)。培养 48 h 后,收集细胞。采用 70% 乙醇固定,Annexin-V、PI 双着色。流式细胞仪进行检测。

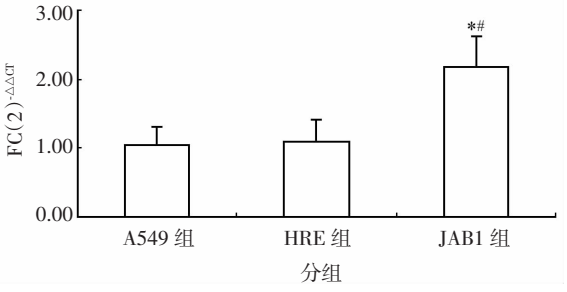
1.3 统计学处理

所有计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),$P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞中 JAB1 mRNA 和蛋白水平变化

pUC57-HRE-JAB1 质粒导入后,相对于空白对照组(A549 组)或空载体组(HRE 组),转染组(JAB1 组)的 mRNA(图 1)和蛋白水平(图 2)均明显升高,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 pUC57-HRE-JAB1 转染可明显增加缺氧环境中 JAB1 基因的表达水平。

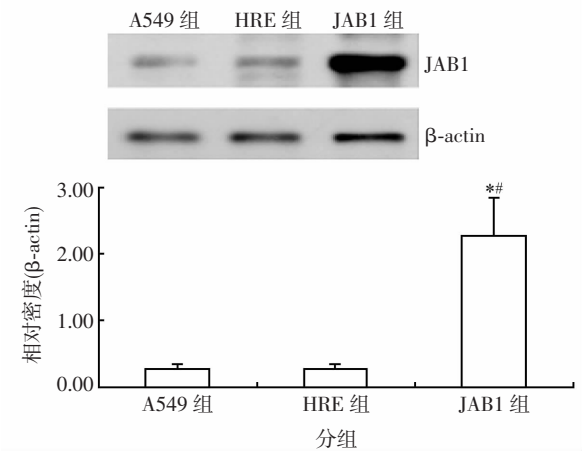


*:与 A549 组比较,$P < 0.05$;#:与 HRE 组比较,$P < 0.05$

图 1 pUC57-HRE-JAB1 导入对 A549 细胞中 JAB1 mRNA 水平的影响

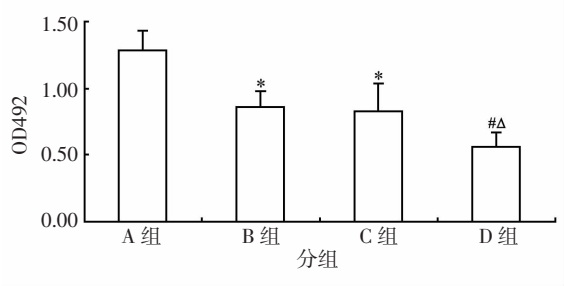
2.2 pUC57-HRE-JAB1 转染增加 A549 对 C-DDP 的敏感性

转染前,C-DDP 抑制了 A549 细胞的生长($P < 0.05$);转染后,A549 细胞对 C-DDP 变得更为敏感(图 3),表明上调的 JAB1 增强了 C-DDP 所诱导的生长抑制效应。



*:与 A549 组比较,$P<0.01$;#:与 HRE 组比较,$P<0.01$

图 2 pUC57-HRE-JAB1 导入对 A549 细胞中 JAB1 蛋白水平的影响



*:与 A 组比较,$P<0.05$;#:与 A 组比较,$P<0.01$;△:与 B 组比较,$P<0.05$

图 3 pUC57-HRE-JAB1 转染后 A549 对 C-DDP 敏感性的变化

2.3 pUC57-HRE-JAB1 导入对 A549 细胞周期与凋亡的影响

流式细胞术结果提示(表 1),经 pUC57-HRE-JAB1 质粒转染后,G_0/G_1期细胞数量明显增多,而 G_2/M 期细胞数量明显减少。相对于未转染组,转染组增殖指数[PI = (S + G_2M) ÷ (G_0/G_1 + S + G_2M)]明显降低($P<0.05$),表明 pUC57-HRE-JAB1 转染可将 A549 细胞周期明显阻滞于 G_1期。在 C-DDP 存在的情况下,G_0/G_1期细胞数量明显增多,G_2/M 期细胞数量明显减少;而经 pUC57-HRE-JAB1 转染后,G_0/G_1期细胞数量进一步增多,而 G_2/M 期细胞数量进一步减少。PI 也进一步降低。pUC57-HRE-JAB1 的导入明显增加了 A549 细胞的凋亡。同时,C-DDP 也显著诱导了 A549 细胞发生凋亡。pUC57-HRE-JAB1 的导入进一步增强了 C-DDP 的凋亡诱导效应(图 4)。

3 讨论

由于活跃的细胞增殖,氧供与氧耗的失衡必将导致组织缺氧的发生。而这与肿瘤的发生发展以及化疗的耐受密切相关[6]。起初,通过转染使化疗敏感基因增强表达是降低化疗耐受的重要手段之一。尽管这种方法在一定程度上可以发挥作用,但由于转染效率低及靶向特异性,使其难以取得令人满意的效果。在我们前期研究中发现,阳离子脂质体介导的肺腺癌细胞株 A549 中 p16INK4a 和 p14ARF 基因转染可明显增加细胞凋亡和化疗的敏感性。但是,它仍然未取得预想的效果[1]。可能的原因是这些基因在细胞周期调控路径中具有双重作用,既诱导细胞凋亡,也可阻滞细胞周期,可能后者无助于杀灭肿瘤细胞。

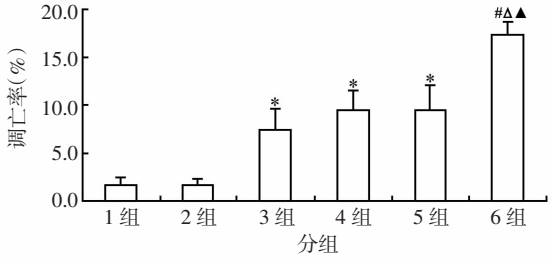
缺氧诱导因子是一种氧敏感的异二聚体转录因子,可促进含有缺氧反应元件(HRE)基因的表达[7]。当哺乳动物细胞面对缺氧环境时,HIF-1 可通过结合 HRE 而启动基因转录。有研究表明 HIF-1/HRE 可成功作为一种缺氧调节工具用于缺氧条件下基因治疗[3]。因此,本研究通过扩增人类 JAB1 片段并成功构建 pUC57-HRE-JAB1 质粒,用于后续探讨 JAB1 对于化疗耐受的影响。

Claret 等采用酵母双杂交技术从人类淋巴细胞 cDNA 文库中成功筛选出 JAB1 基因[2]。JAB1 能够特异性地与 p27kip1 相互作用,并能够使 p27kip1 穿插并移动到胞浆,通过自身降解作用降低胞内 p27kip1 的含量[8]。同时,在一些肿瘤如胰腺癌、肺癌[9]中发现了 JAB1 的表达。将 JAB1 基因导入乳腺癌细胞中可明显降低 p27kip1 的表达水平。而降低的 p27kip1 表

表 1 pUC57-HRE-JAB1 导入对 A549 细胞周期分布的影响
($\bar{x} \pm s$, %)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
1 组	50.6 ± 3.8	40.8 ± 2.5	8.6 ± 1.5	49.1 ± 5.2
2 组	50.3 ± 2.7	39.7 ± 1.8	10.0 ± 1.4	49.2 ± 3.8
3 组	59.9 ± 4.5*	35.3 ± 2.4	4.8 ± 1.0*	38.3 ± 3.6*
4 组	61.3 ± 5.5*	36.4 ± 3.9	2.3 ± 0.5*	38.1 ± 4.3*
5 组	61.1 ± 5.4*	36.2 ± 3.4	2.7 ± 0.6*	37.6 ± 5.1*
6 组	72.6 ± 6.2#△▲	27.3 ± 2.5*△	1.1 ± 0.2#△▲	27.6 ± 2.3#△▲

*:与 1 组比较,$P<0.05$;#:与 1 组比较,$P<0.01$;△:与 3 组比较,$P<0.05$;▲:与 4 组比较,$P<0.05$



*:与 1 组比较,$P<0.05$;#:与 1 组比较,$P<0.01$;△:与 3 组比较,$P<0.01$;▲:与 4 组比较,$P<0.01$

图 4 pUC57-HRE-JAB1 导入对 A549 细胞周期与凋亡的影响

达与鼻咽癌的增殖活性与侵袭能力密切相关。而 JAB1 在细胞凋亡中的作用还存在争议。JAB1 与 Bcl-Gonad short form(BclGs)的共表达可协同诱导 HeLa 细胞的凋亡[10]。JAB1 能够与 Bcl-XL/Bcl-2 竞争结合到 BclGs 上,从而促进细胞凋亡。相反,当通过 RNAi 技术沉默 JAB1 基因时,BclGs 的前凋亡效应明显减弱。本研究中发现,JAB1 的过表达明显增加了 A549 细胞的凋亡,而这种促凋亡效应并不依赖于顺铂的存在与否,这一结果提示了 JAB1 的凋亡作用。细胞周期被明显阻滞于 G_0/G_1 期,而这与 Tomoda 研究结果在某种程度上基本一致[11]。同样发现,JAB1-/-小鼠的胚胎细胞增殖缓慢,且细胞周期延迟于 G_0 和 S 期之间。所有这些结果表明,JAB1 可能通过调节多重细胞周期信号通路发挥控制细胞周期进程和细胞生存的作用。

总之,作为 E2F1 诱导性凋亡一种特异性因子,JAB1 的过表达增强了 A549 细胞中化疗敏感性。同时,这可能为临床上克服肿瘤细胞化疗抵抗提供一种可行的治疗措施。

[参考文献]

[1] Xie QC, Hu YD, Wang LL, et al. The co-transfection of p16(INK4a) and p14(ARF) genes into human lung cancer cell line A549 and the effects on cell growth and chemosensitiv[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2005, 46(3): 188 – 196.

[2] Claret FX, Hibi M, Dhut S, et al. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors[J]. Nature, 1996, 383(6599): 453 – 457.

[3] Post DE, Van Meir EG. Generation of bidirectional hypoxia/HIF-responsive expression vectors to target gene expression to hypoxic cells[J]. Gene Ther, 2001, 8(23): 1801 – 1807.

[4] Hallstrom TC, Nevins JR. Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis[J]. Genes Dev, 2006, 20(5): 613 – 623.

[5] Maher JC, Wangpaichitr M, Savaraj N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 732 – 741.

[6] Yasuda H. Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radioresistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer[J]. Nitric Oxide, 2008, 19(2): 205 – 216.

[7] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2000, 88(4): 1474 – 1480.

[8] Kouvaraki MA, Rassidakis GZ, Tian L, et al. Jun activation domain-binding protein 1 expression in breast cancer inversely correlates with the cell cycle inhibitor p27(Kip1)[J]. Cancer Res, 2003, 63(11): 2977 – 2981.

[9] Osoegawa A, Yoshino I, Kometani T, et al. Overexpression of Jun activation domain-binding protein 1 in nonsmall cell lung cancer and its significance in p27 expression and clinical features[J]. Cancer, 2006, 107(1): 154 – 161.

[10] Liu X, Pan Z, Zhang L, et al. JAB1 accelerates mitochondrial apoptosis by interaction with proapoptotic BclGs[J]. Cell Signal, 2008, 20(1): 230 – 240.

[11] Tomoda K, Yoneda-Kato N, Fukumoto A, et al. Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 43013 – 43018.

(编辑:余汇洋)

(上接第 144 页)

化胺及烧烫伤创面疱液。伤后第 2 天在全麻下行深Ⅱ度削痂、Ⅲ度切痂,手术中注意去除明显坏死组织,对瘀滞带的间生态组织尽量保留,特别是骨、韧带、肌腱等重要组织结构处间生态组织;于大腿前内外侧用取皮鼓取 0.3 mm 薄中厚皮片适量,洗净后,用制网机制成 1:3 的网状皮片,分别置于切削痂创面上,适当固定后,用 VSD 负压引流护创材料覆盖帖服创面,尽量避免创面暴露,尔后用 VSD 贴膜完全封闭创面,使创面成为密闭的负压环境。引流导管并连接负压引流器,持续负压吸引,每天等渗盐水冲洗 3 次。

2 结果

VSD 负压引流 7 d 后,液氨冻烧伤切削痂网状植皮创面植皮成活良好,20 d 网状皮扩展良好,1 个月创面完全覆盖,创面达到临床治愈。

3 讨论

液氨冻伤后,液氨遇水生成氢氧化胺为强碱,引起化学性烧伤。临床上对液氨冻烧伤创面早期切削痂,清除坏死组织,引流组织中残余的碱性物质。VSD 封闭式持续负压吸引适宜用于四肢等较易固定封闭的、烧伤面积 10% 以下、伤后 2 d 内入院的创面。其优点有:①可阻止外部细菌的入侵,起到床旁隔离作用。②及时引流烧伤后创基渗出水肿液及多种炎性因子,去除细菌生存的培养基。③负压环境可刺激组织增生,瘀滞带血流加速;减少创面毒素吸收,增加机体抵抗力,缩短抗生素使用时间。④不需频繁换药,减少医用耗材,减轻伤员换药痛苦和医务人员的工作量[1]。植皮创面保持持续负压,通过封闭膜外大气压,使皮片与创面贴合紧密,有利皮片存活;负压吸引压力均匀,植皮组织平整,外观良好,是普通植皮打包所不能比拟的[2]。切削痂早期网状植皮,因网眼分布均匀,引流通畅,避免皮片下形成积液或积血引起皮片下感染,且网状植皮成活后网状皮片分布均匀,皮片扩展同步迅速,创面同时愈合,愈合后皮肤弹性良好,并防止疤痕成大片增生,不影响功能及美观,也可使病人愈合时间及住院时间明显缩短,愈后功能恢复良好,减少患者的致残率。

[参考文献]

[1] 任汝飞,苗春旭,苗 青. 封闭式负压引流治疗慢性难愈创面的护理[J]. 局解手术学杂志, 2009, 18(6): 408.

[2] 沈 波,廖苏平,吴 波. 韧厚皮片结合封闭式负压吸引治疗感染性大面积皮肤缺损[J]. 临床外科杂志, 2007, 15(7): 497.

(编辑:左艳芳)