

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.015

转染 PDCD5 质粒促进顺铂诱导 A549 细胞凋亡作用的研究*

戴玲丽¹,梅同华^{1△},张明川²

(1.南昌大学第一附属医院呼吸内科,南昌 330006;2.重庆市铜梁县人民医院呼吸内科 402560)

摘要:目的 观察程序化死亡因子 5(PDCD5)基因联合顺铂诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的作用,探索其可能机制。方法 利用脂质体瞬时转染 PDCD5 重组质粒入 A549 细胞,RT-PCR 检测其转染效率。Western blot 检测转染后 PDCD5、Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达情况。MTT 法及流式细胞仪检测 PDCD5 单药和联合顺铂后的细胞凋亡情况。结果 PDCD5 重组质粒成功转染入 A549 细胞,Western bolt 结果显示转染重组质粒组中 PDCD5 蛋白表达高于空白对照组及转染空质粒组,Bcl-2 和 Survivin 蛋白则低于空白对照组及转染空质粒组,差异有统计学意义($P<0.05$)。MTT 及流式细胞仪检测显示转染重组质粒组较空白对照组及转染空质粒组细胞凋亡率高($P<0.05$)。结论 PDCD5 基因可以促进顺铂诱导的 A549 细胞凋亡。

关键词:程序化死亡因子 5;顺铂;Bcl-2;Survivin;细胞凋亡

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)26-3449-03

Transfection of PDCD5 plasmid for promoting cisplatin-induced A549 cells apoptosis*

Dai Lingli¹,Mei Tonghua^{1△},Zhang Mingchuan²

(1. Department of Respiration,First Affiliated Hospital,School of Medicine,Nanchang University,Nanchang,Jiangxi 330006,China;2. Department of Respiration,Tongliang County People's Hospital,Chongqing 402560,China)

Abstract: **Objective** To observe the role of programmed cell death 5(PDCD5) gene combined with cisplatin for inducing the apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells and to investigate its possible mechanism. **Methods** The PDCD5 recombinant plasmid was transiently transfected into A549 cells by lipofectamine. Its transfection efficiency was detected by RT-PCR. The expressions of trasfected PDCD5 protein,Bcl-2 and Survivin protein were examined by Western bolt. The apoptosis of A549 cells by single PDCD5 and its combination with cisplatin was measured by the MTT method and the flow cytometry. **Results** PDCD5 recombinant plasmid was transfect into A549 cells successfully. The Western blot results showed that the expression of PDCD5 protein in the transfection recombinant plasmid group was higher than that in the blank control group and the transfection empty plasmid group,while the expression of Bcl-2 and Survivin protein was lower than that in the other two groups,the difference was statistically significant($P<0.05$). The MTT and flow cytometry results demonstrated that the cell apoptosis rate in the transfection recombinant plasmid group was higher than that in the blank control group and the transfection empty plasmid group($P<0.05$). **Conclusion** PDCD5 gene may promote cisplatin induced A549 cells apoptosis.

Key words: programmed cell death 5;cisplatin;Bcl-2;Survivin;cell apoptosis

肺癌是危害人类健康的常见肿瘤之一,其中约 80% 为非小细胞肺癌^[1]。对非小细胞肺癌治疗中化疗占重要地位,其中铂类起到了重要作用,但几年来报道对铂类药物的敏感性有所下降,限制了其抗肿瘤效果^[2-4],如何提高其化疗敏感性成为肿瘤治疗研究的重点。有研究提到调节细胞凋亡信号通路有关蛋白的表达可以影响顺铂的敏感性^[5-6]。程序化死亡因子 5(programmed cell death 5,PDCD5)基因是北京大学人类疾病中心发现的一个高度保守的凋亡调控基因,在细胞凋亡中发挥正调控作用。随着对 PDCD5 基因研究的深入,发现 PDCD5 基因可以增加顺铂诱导大肠癌细胞 SW480 凋亡的敏感性^[7]。但目前尚未有关于 PDCD5 基因与顺铂在非小细胞肺癌细胞中的协同作用的报道。本研究拟探讨 PDCD5 基因协同顺铂对于肺腺癌 A549 细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 pcDNA3.1-PDCD5 重组质粒由北京鼎国生物科

技公司构建;lipofectamine2000 购自 invitrogen 公司;人肺癌 A549 细胞由重庆医科大学附属第一医院呼吸科实验室赠送;1640 胎牛血清(FBS)购自美国 Gibico 公司;顺铂购自 Selleck-chem 公司;兔抗人 PDCD5 多克隆抗体购自 Abcam 公司;兔抗人 bcl-2 多克隆抗体购自武汉三鹰生物公司;兔抗人 Survivin 抗体购自 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养。转染前 24 h,将长至 70%~90% 密度的细胞以 0.25% 胰酶消化,以 2×10⁵ 个/孔接种到 6 孔板中,待细胞长至 90%~95% 密度后,将 pcDNA3.1-PDCD5 重组质粒与 lipofectamine2000 按 4 μg:10 μL 的比例各稀释于 250 μL 无血清 1640 培养基中,按 lipofectamine2000 说明书转染。

* 基金项目:江西省科技支撑计划项目(20121BBG70053)。 作者简介:戴玲丽(1989—),硕士研究生,主要从事肺癌的防治研究。

△ 通讯作者,Tel:18983466333;E-mail:mtonghua@163.com。

1.2.2 RT-PCR 检测 mRNA 的表达 细胞转染 48 h 后,加入 Trizol,按 Trizol 说明书操作,常规方法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 纯度。根据 GenBank 提供的 PDCD5 序列,设计引物如下:上游引物 5'-AAA GCA CAG GGA AGC AGA AAT-3',下游引物 5'-TTG TCC ATA TCT TGC CAT CTG T-3',以 GAPDH 为内参:上游引物 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',下游引物 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。扩增条件:94 ℃ 2 min;98 ℃ 10 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环;4 ℃ 1 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳跑样。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达 用细胞裂解液将转染 48 h 后的 A549 细胞裂解,提取细胞总蛋白并进行定量,SDS-PAGE 凝胶电泳,按抗体说明书比例进行一抗、二抗孵育,暗室曝光观察蛋白表达情况。

1.2.4 MTT 比色法检测细胞存活率 分别将空白对照组、转染 PDCD5 重组质粒组和转染空质粒组的细胞以 5×10^5 个/孔密度接种至 96 孔板中,每组细胞再设置成 4 个小组,分别加入终浓度为 1.25、2.50、5.00、10.00 mg/L 的顺铂,每小组取 3 个复孔,继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 g/L),放入 37 ℃ 孵箱继续培养 4 h 后,终止培养,每孔加入 150 μ L 二甲亚砜(DMSO)溶液,轻微振荡 10 min。设定 490 nm 波长,酶联免疫检测仪上检测各孔细胞的吸光度(A)值,细胞存活率=(药物组 A 值-调零孔 A 值)/(对照孔 A 值-调零孔 A 值) $\times 100\%$ 。同样的方法将顺铂作用时间设置为 0、6、12、18、24 h,每小组取 3 个复孔,计算各组的细胞存活率。

1.2.5 流式细胞仪测细胞凋亡 向正常培养空白对照组、转染 PDCD5 重组质粒组和转染空质粒组分别加入终浓度为 10 mg/L 顺铂处理 24 h,0.25%胰酶消化后收集细胞,以冷 PBS 冲洗 2 遍,加入 100 μ L 结合 buffer 液重悬细胞至 5×10^5 /mL 密度,再加入 Annexin V-FITC,室温孵育 15 min。结合 buffer 冲洗细胞后,用 500 μ L 含 10 μ L PI 染色剂 (20 g/mL) 结合 buffer 重悬细胞,冰上孵育 25 min。流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 运用 SPSS18.0 软件分析数据。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数采用 ANOVA 方差分析,组内比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

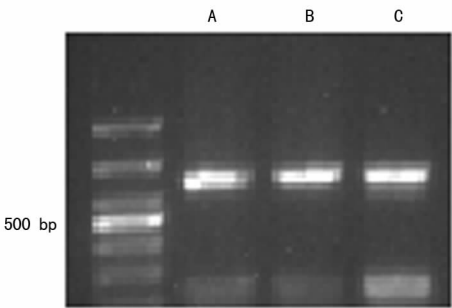
2.1 瞬时转染表达结果 RT-PCR 检测显示在 250~500 bp 有清晰的条带,表示 A549 细胞成功转染重组质粒,并表达 PDCD5 基因,见图 1。转染 PDCD5 重组质粒组中表达的 PDCD5 的 mRNA 水平高于空白对照组和转染空质粒组 ($P < 0.05$)。

2.2 Western blot 检测结果 PDCD5 蛋白在转染 PDCD5 重组质粒组细胞中高表达,在空白对照组及转染空质粒组低表达,Bcl-2 及 Survivin 蛋白则在转染 PDCD5 重组质粒组低表达,空白对照组及转染空质粒组高表达,与 PDCD5 蛋白表达呈负相关,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。PDCD5 蛋白在转染 PDCD5 重组质粒组中表达高于空白对照组和转染空质粒组 ($P < 0.05$);Bcl-2、Survivin 蛋白在转染 PDCD5 重组质粒组表达低于空白对照组和转染空质粒组 ($P < 0.05$)。

2.3 PDCD5 基因对 A549 细胞的促凋亡作用

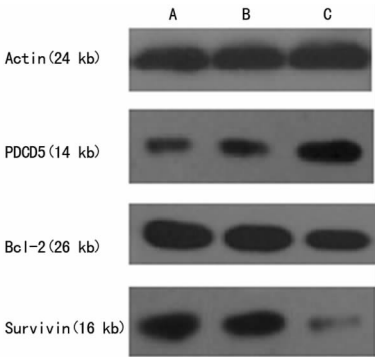
2.3.1 MTT 结果 在用终浓度为 1.25、2.50、5.00 和 10.00

mg/L 的顺铂处理 24 h 后,空白对照组、转染 PDCD5 重组质粒组和转染空质粒组细胞的生存率表现为浓度依赖性(图 3)。不同浓度顺铂作用后转染 PDCD5 重组质粒组细胞生存率较空白对照组和转染空质粒组低 ($P < 0.05$)。在用终浓度为 10 mg/L 顺铂处理 0、6、12、18、24 h 后,空白对照组、转染 PDCD5 重组质粒组和转染空质粒组细胞的生存率表现为时间依赖性(图 4),且转染 PDCD5 重组质粒组细胞生存率较空白对照组和转染空质粒组显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A:空白对照组;B:转染空质粒组;C:转染 PDCD5 重组质粒组。

图 1 RT-PCR 检测 PDCD5 表达情况



A:空白对照组;B:转染空质粒组;C:转染 PDCD5 重组质粒组。

图 2 Western blot 检测 PDCD5、Bcl-2 及 Survivin 蛋白表达

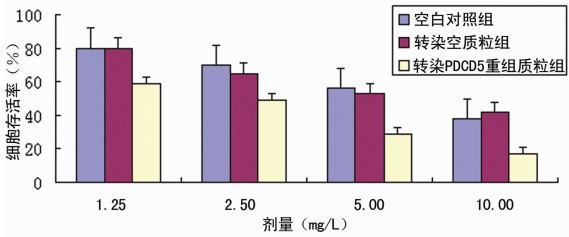


图 3 MTT 检测不同浓度顺铂作用后的细胞生存情况

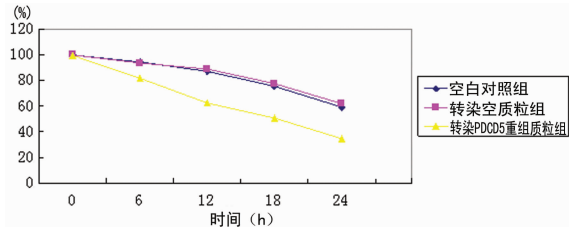
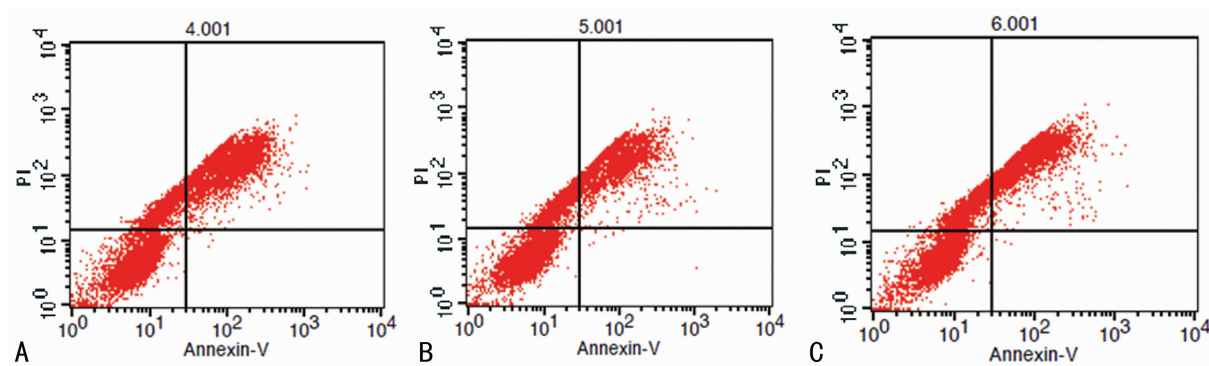


图 4 MTT 检测顺铂作用不同时间后细胞生存情况

2.3.2 流式细胞学结果 如图 5 所示,在 10 mg/L 的顺铂处理各组细胞 24 h 后,转染 PDCD5 重组质粒组的细胞凋亡率要

高于其他两组($P<0.01$),转染 PDCD5 重组质粒组为(41.0 ± 1.9)%、转染空质粒组为(27.5 ± 1.1)%和空白对照组为(25.7 ± 0.9)%。转染 PDCD5 重组质粒+顺铂组细胞凋亡率

明显高于转染空质粒+顺铂组和空白对照+顺铂组($P<0.01$)。



A: 转染 PDCD5 重组质粒+顺铂组; B: 转染空质粒+顺铂组; C: 空白对照+顺铂组。

图 5 MTT 检测顺铂作用不同时间后细胞生存情况

3 讨 论

顺铂是肺癌化疗的经典组合药物之一,临床上作为许多恶性肿瘤的一线化疗方案用药。但随着顺铂的广泛运用,耐药情况屡见不鲜,使其对于肿瘤治疗的有效性大大降低。因此如何提高顺铂的敏感性及开发肿瘤治疗新方法日益重要,其中基因靶向药物是当前肿瘤治疗研究的热点。PDCD5 基因是从白血病 TF-1 细胞中分离得来的一种凋亡调控正基因,低表达于人类多种恶性肿瘤中,如胃癌、肺癌、前列腺癌和白血病等^[8-11]。在进一步研究 PDCD5 与细胞凋亡之间关系时,发现利用真核表达载体或大肠杆菌表达重组蛋白将 PDCD5 导入多种细胞后,细胞变化不明显,但若联合其他诱导凋亡的因素,如撤销细胞因子、化疗药物处理、射线治疗等,细胞则可发生明显凋亡,种种研究结果显示 PDCD5 可促进细胞凋亡,不能直接诱导其凋亡^[12-14]。Yin 等^[7]在将 PDCD5 重组质粒转染入 SW480 细胞后分别进行了体内和体外实验,结果均证明 PDCD5 可以增加顺铂诱导 SW480 细胞凋亡的敏感性。但目前尚无研究明确指出 PDCD5 基因是如何提高顺铂化疗敏感性的。

在实验中,利用脂质体将 PDCD5 重组质粒导入 A549 细胞后,加入不同浓度的顺铂及同一浓度顺铂作用不同时间后,MTT 结果显示联合用药组较顺铂单药组更能抑制细胞的增殖,并呈现浓度依赖性和时间依赖性,在 10 mg/L 的浓度作用 24 h 时细胞凋亡最明显。同样在流式细胞学检测中,分别向空白对照组、转染空质粒组和转染 PDCD5 重组质粒组加入 10 mg/L 顺铂作用 24 h 后,流式检测结果显示转染 PDCD5 重组质粒组细胞凋亡率较其余两组明显增高。上述两个实验结果均显示 PDCD5 基因能协同顺铂促进 A549 细胞凋亡。Western blot 检测 PDCD5 重组质粒转染 A549 细胞中蛋白表达时显示 PDCD5 高表达,而 Bcl-2 蛋白和 Survivin 蛋白呈现低表达。有研究提示顺铂是通过抑制 DNA 复制和转录,导致 DNA 断裂和误码,从而抑制细胞的有丝分裂来发挥抗癌作用的^[15]。而 PDCD5 基因可以通过调节 Bcl-2 家族的表达来实现细胞凋亡,Li 等^[16]研究发现 PDCD5 可以促进顺铂诱导神经胶质瘤细胞凋亡,在实验中发现 PDCD5 的增敏作用是通过调节线粒体凋亡通路有关蛋白的表达实现的,而在线粒体途径中,

bcl-2 家族占重要地位。由此推测可能是顺铂破坏 DNA 结构同时促进了 PDCD5 基因的快速表达,而过表达的 PDCD5 基因又能促进细胞凋亡,两者相互作用,共同促进了细胞凋亡。

综合以上,本研究得出结论 PDCD5 基因在非小细胞肺癌的细胞凋亡中起重要作用,其在非小细胞肺癌中呈现低表达,通过外源性增加 PDCD5 基因的表达可以明显促进顺铂诱导的细胞凋亡,从而提高顺铂化疗的敏感性。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC [J]. Lung Cancer, 2011, 71(1): 3-10.
- [3] Garmann D, Warnecke A, Kalayda GV, et al. Cellular accumulation and cytotoxicity of macromolecular Platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells [J]. J Control Release, 2008, 131(2): 100-106.
- [4] Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2005, 352(25): 2589-2597.
- [5] Yan LH, Wang XT, Yang J, et al. Reversal of multidrug resistance in gastric cancer cells by CDX2 downregulation [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(26): 4155-4165.
- [6] Liu N, Sheng XG, Liu Y, et al. Increased CD70 expression is associated with clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy and poor survival in advanced ovarian carcinomas [J]. Onco Targets Ther, 2013, 6(6): 615-619.
- [7] Yin A, Jiang Y, Zhang X, et al. Transfection of PDCD5 sensitizes colorectal cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in vitro and in vivo [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1/3): 120-126.
- [8] Yang YH, Zhao M, Li WM, et al. Expression(下转第 3454 页)

分说明了 PUMA 的表达可以有效地抑制细胞生长,促进细胞凋亡,从而实现卵巢癌基因治疗的目的。为了更直接的判定 PUMA 的过量表达,本研究分别通过 Western blott 和 ELISA 技术对转染 48 h 内的 PUMA 进行检测。结果证实了 PUMA 的特异性过量表达,且远远高于未作任何处理的 COC1 细胞。

综上所述,首次尝试并实现了 Ad-hTERT-PUMA 在卵巢癌细胞中大量表达,从而达到抑制细胞生长,促进细胞凋亡的目的。为 PUMA 基因应用于卵巢癌的基因治疗创造可能。

参考文献:

[1] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological Cancer; The size of the problem[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006, 20(2): 207-225.

[2] 易晓芳, 丰有吉. 复发性卵巢癌的化疗进展[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12(2): 99-102.

[3] Pastor DM, Irby RB, Poritz LS. Tumor necrosis factor alpha induces p53 up-regulated modulator of apoptosis expression in colorectal cancer cell lines[J]. Dis Colon Rectum, 2010, 53(3): 257-263.

[4] Michalak EM, Villunger A, Adams JM, et al. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(6): 1019-1029.

[5] Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA, et al. p53 up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress [J]. J Biol Chem, 2010, 285(26): 19910-19920.

[6] Zhou Z, Sturgis EM, Liu Z, et al. Genetic variants of a BH3-only pro-apoptotic gene, PUMA, and risk of

HPV16-associated squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Mol Carcinog, 2012, 51 Suppl 1: S54-64.

[7] Spender LC, Carter MJ, O'Brien DI, et al. Transforming growth factor-β directly induces p53-up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) during the rapid induction of apoptosis in myc-driven B-cell lymphomas [J]. J Biol Chem, 2013, 288(7): 5198-5209.

[8] Ma B, Shi J, Jia L, et al. Over-expression of PUMA correlates with the apoptosis of spinal cord cells in rat neuro-pathic intermittent claudication model [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e56580.

[9] Din S, Mason M, Volkers M, et al. Pim-1 preserves mitochondrial morphology by inhibiting dynamin-related protein 1 translocation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(15): 5969-5974.

[10] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, et al. The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters [J]. Gene Ther, 2001, 8(7): 568-578.

[11] Jacob D, Bahra M, Schumacher G, et al. Gene therapy in colon cancer cells with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene driven by the hTERT promoter [J]. Anticancer Res, 2004, 24(5A): 3075-3079.

[12] Middelburg R, de Haas RR, Dekker H, et al. Induction of p53 up-regulated modulator of apoptosis messenger RNA by chemotherapeutic treatment of locally advanced breast Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 1863-1869.

(收稿日期: 2014-03-08 修回日期: 2014-06-09)

(上接第 3451 页)

of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cells[J]. Apoptosis, 2006, 11(6): 993-1001.

[9] 张雪梅, 滕琳, 刘启明, 等. PDCD5 与 Caspase-3 在人非小细胞肺癌中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(8): 1533-1536.

[10] Du YJ, Xiong L, Lou Y, et al. Reduced expression of programmed cell death 5 protein in tissue of human prostate Cancer[J]. Chin Med Sci J, 2009, 24(4): 241-245.

[11] Ruan GR, Qin YZ, Chen SS, et al. Abnormal expression of the programmed cell death 5 gene in acute and chronic myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2006, 30(9): 1159-1165.

[12] Wang Y, Li X, Wang L, et al. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/Troy and enhanced by PDCD5 overexpression[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 8): 1525-1532.

[13] Rui M, Chen Y, Zhang Y, et al. Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis [J]. Life Sci, 2002, 71(15): 1771-1778.

[14] 焦建峰, 陈冠英, 黄玫, 等. rhTFAR19 蛋白质对 γ 射线诱导 MCF-7 细胞周期及凋亡影响的初步研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 2(2): 14-16.

[15] 唐春兰, 杨和平, 周向东. DNA 损伤修复与肺癌顺铂耐药机制的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(12): 960-964.

[16] Li H, Zhang X, Song X, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(9): 822-830.

(收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-06-20)