

• 论 著 •

以 Ref-1 为靶点的基因治疗在大肠癌 5-FU 化疗增敏中的作用及机制研究*

向德兵¹,董 蕙¹,全 晋¹,孙贵银^{1△},李梦侠²,王 东²

(1. 重庆市江津区中心医院肿瘤科 402260; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心 400042)

摘要:目的 探讨以 Ref-1 为靶点的基因治疗在大肠癌 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗增敏中的作用及其可能机制。方法 构建 Ad5/F35-Ref-1 小干扰 RNA(siRNA)重组腺病毒(siRef-1)敲低 Ref-1 蛋白表达,MTT 法检测不同剂量 5-FU 作用 LOVO 细胞存活率的改变;TUNEL 法检测 LOVO 细胞凋亡;Western blot 检测 Ref-1 蛋白表达;EMSA 测定核转录因子 κ B(NF- κ B)的 DNA 结合活性。**结果** 感染 siRef-1 腺病毒较感染对照腺病毒的 LOVO 细胞对 5-FU 的敏感性明显增强,半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 1.69、7.04 μ mol/L;且 siRef-1 显著增加 5-FU 诱导的细胞凋亡。5-FU 呈剂量依赖性诱导 LOVO 细胞 Ref-1 蛋白表达,同时伴有 NF- κ B 活性增强。siRef-1 抑制 5-FU 诱导的 LOVO 细胞 Ref-1 蛋白表达以及 NF- κ B 激活。**结论** 以 Ref-1 为靶点的治疗显著增强大肠癌细胞 5-FU 化疗敏感性,其机制可能主要是通过抑制大肠癌细胞 NF- κ B 活性和碱基切除修复功能。

关键词:大肠癌; 氧化还原因子-1; 氟尿嘧啶; 腺病毒载体; 小干扰 RNA

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)02-0177-03

Adenoviral vector mediated Ref-1 siRNA enhances the sensitivity of human colon cancer cells to 5-fluorouracil*

XIANG Debing¹,DONG Hong¹,QUAN Jin¹,SUN Guiying^{1△},LI Mengxia²,WANG Dong²

(1. Department of Oncology, Jiangjin Central Hospital, Chongqing 402260, China; 2. Cancer Center,

Field Surgery Research Institute, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Ref-1 as a target gene therapy in the treatment of colorectal cancer with 5-FU and its possible mechanism. **Methods** We constructed chimeric adenoviral vector Ad5/F35 carrying human Ref-1 siRNA (siRef-1) to knockdown the expression of Ref-1 in LOVO cells. Cellular proliferation was detected with MTT assay. Cell apoptosis was detected by TUNEL. The expression of human Ref-1 protein was determined by Western blotting analysis. NF- κ B DNA binding was determined by EMSA. **Results** SiRef-1 enhanced sensitivity of LOVO cells to 5-FU. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value for LOVO cells pretreated with SiRef-1 and SiCon at 72 h after 5-FU treatment was 1.69 μ mol/L and 7.04 μ mol/L, respectively. SiRef-1 also increased 5-FU-induced cell apoptosis. The expression of Ref-1 protein in LOVO cells was induced by 5-FU in a dose dependent manner, accompanied with the enhanced activity of NF- κ B, and SiRef-1 could effectively inhibit 5-FU induced Ref-1 expression and NF- κ B activation. **Conclusion** The treatment with Ref-1 as the target can significantly enhance the sensitivity of 5-FU in colorectal cancer cells, and its mechanism may be mainly through the inhibition of NF- κ B in colorectal cancer cells.

Key words: colorectal cancer; Ref-1; fluorouracil; adenovirus vector; small interfering RNA

大肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,化疗是大肠癌综合治疗的主要方法之一^[1]。5-氟尿嘧啶(5-FU)是大肠癌的一线化疗药物,其在大肠癌化疗中的地位目前仍没有药物可以取代,但是临床上单药的化疗有效率较低,如何提高肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性是目前亟待解决的问题。氧化还原因子/脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(Ref-1/APE1)是一种独特的 DNA 氧化还原、损伤修复双功能蛋白,通过氧化还原激活多种下游转录因子,包括转录核因子- κ B(NF- κ B)和激活蛋白-1(AP-1),从而调控细胞分化、增殖、凋亡等^[2]。这些转录因子与肿瘤放化疗抵抗密切相关,因此,Ref-1 可能是决定大肠癌细胞 5-FU 化疗敏感性的潜在分子靶点。本研究应用重组腺病毒介导 Ref-1 小干扰 RNA(siRNA)抑制 Ref-1 表达,探讨以 Ref-1 为靶点的基因治疗在大肠癌 5-FU 增敏中的作用及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 人大肠癌 LOVO 细胞株引自美国 ATCC。鼠抗人 Ref-1 单克隆抗体购自美国 Novus 公司,鼠抗人视网膜

母细胞瘤蛋白(Rb)单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体、MTT 和二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)、抗鼠 IgG-四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)二抗和化学发光试剂购自美国 Pierce 公司,RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司。

1.2 方 法

1.2.1 Ad5/F35-Ref-1 siRNA 重组腺病毒构建 Ad5/F35-Ref-1 siRNA 重组腺病毒(siRef-1)的包装、扩增纯化、鉴定、滴度与感染效率的测定见参考文献[3]。

1.2.2 细胞培养 将 LOVO 大肠癌细胞株复苏后,置于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、含 5%CO₂ 的孵箱中常规培养,培养液为 RPMI-1640,含有 10% FCS 和 100 U/mL 青霉素、链霉素,0.25% 胰酶消化传代。当细胞呈对数生长期时用于实验。

1.2.3 MTT 检测细胞存活率 将 LOVO 细胞按 5×10^5 个细胞/孔接种于六孔板中,培养 24 h 后以 20 MOI 腺病毒

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972874);重庆市卫生局科研项目(2011-2-445、2011-2-447、2012-1-106、2012-2-381)。

作者简介:向德兵,男,主任医师,主要从事临床肿瘤研究工作。△ 通信作者,E-mail:Sunriseok@126.com。

SiRef-1 或对照腺病毒 SiCon 感染 LOVO 细胞,90 min 后更换培养基,继续培养 48 h。胰酶消化后按 4×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后更换新的培养液,以 5-FU(0~100 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,继续培养 72 h 后按说明书进行 MTT 实验,计算 5-FU 的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 TUNEL 检测细胞凋亡 LOVO 细胞以 1×10^5 个细胞/孔接种于加有盖玻片六孔板内。20 MOI 的 SiRef-1 腺病毒或 SiCon 腺病毒感染 LOVO 细胞,48 h 后给予 5-FU(10 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,继续培养 24 h,按原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的 TUNEL 法说明书检测 LOVO 细胞凋亡。

1.2.5 Western blot 分析 收集细胞,常规提取细胞总蛋白。取等量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳后转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭后加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,室温下摇床孵育 1 h,加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗,室温下摇床孵育 1 h。以 ECL 试剂盒显色。用 Bio-Rad 公司 Quantity one 凝胶扫描分析系统扫描 X 线片,Labwork 3.0 图像分析软件进行图像分析,测定各条带光密度值,结果以积分光密度值(OD)表示。

1.2.6 EMSA 法检测 NF- κB 活性 常规提取细胞核蛋白;用 [γ -32P]ATP 标记 NF- κB 双链寡脱氧核苷酸探针(P1:5'-AGC TTA GAG GGG ACT TTC CGA GAG GA-3';P2:5'-TCC TCT CGG AAA GTC CCC TCT AAG CT-3');标记探针与核蛋白进行结合反应;产物经 5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(120 V,2 h);凝胶于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影 24 h。为了校正核蛋白上样的误差,以视网膜母细胞瘤基因 Rb 为核蛋白内参,Western blot 分析 Rb 蛋白表达。

1.3 统计学处理 以 CalcuSyn Demo Version 2 统计软件计算 IC₅₀。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 SPSS17.0 统计分析软件对各组数据进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SiRef-1 体外增强大肠癌细胞 5-FU 化疗敏感性 5-FU 处理 LOVO 细胞 72 h 后,LOVO 细胞存活率随 5-FU 水平的增加逐渐下降,与 SiCon 组比较,SiRef-1 组下降更显著,在 5-FU 每个水平点差异均有统计学意义($P < 0.01$)。SiRef-1 和 SiCon 组的 IC₅₀ 分别为 1.69 $\mu\text{mol/L}$ 和 7.04 $\mu\text{mol/L}$ 。LOVO 细胞存活曲线见图 1。

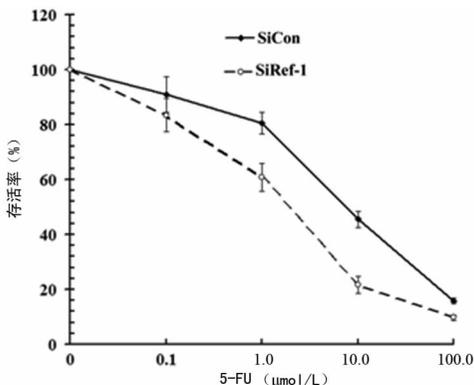
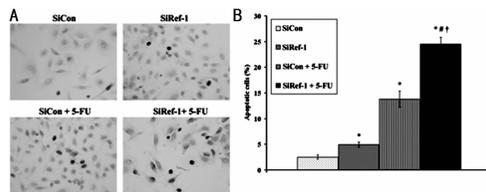


图 1 不同水平 5-FU 处理 72 h 后 LOVO 细胞存活曲线

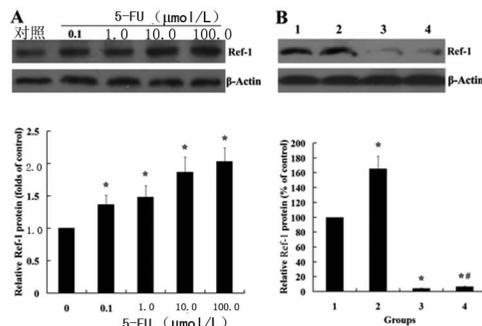
2.2 SiRef-1 对 5-FU 诱导大肠癌细胞凋亡的影响 对照 SiCon 组偶见凋亡细胞,SiRef-1 组较 SiCon 组凋亡细胞数增加($P < 0.01$)。5-FU 后处理 SiCon 组凋亡细胞数增加,SiRef-1 组凋亡细胞数增加更显著($P < 0.01$)。TUNEL 检测结果见

图 2。



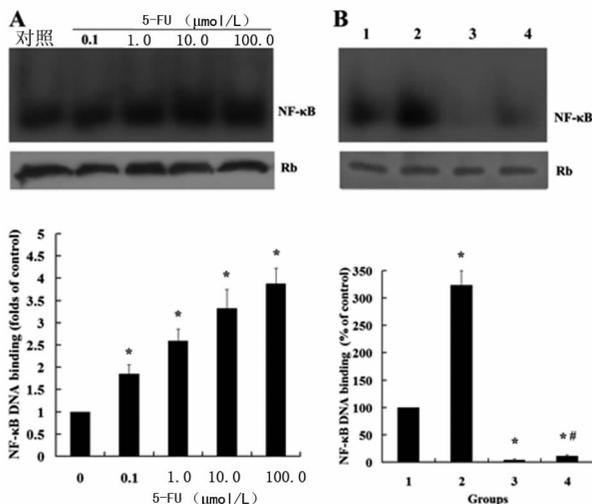
注:A 为 5-FU 处理后各组 LOVO 细胞可见 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞;B 为 5-FU 处理后各组 LOVO 细胞凋亡率。与 SiCon 比较,* $P < 0.01$;与 SiRef-1 比较,# $P < 0.01$;与 SiCon + 5-FU 比较,† $P < 0.01$ 。

图 2 TUNEL 法检测 5-FU 处理后 LOVO 细胞凋亡



注:A 为不同水平 5-FU 作用 LOVO 细胞后 Ref-1 蛋白表达;与对照比较,* $P < 0.01$;B 为 SiRef-1 抑制 5-FU 诱导的细胞 Ref-1 表达;1 表示 SiCon;2 表示 SiCon + 5-FU (10.0 $\mu\text{mol/L}$);3 表示 SiRef-1;4 表示 SiRef-1 + 5-FU (10.0 $\mu\text{mol/L}$);与 SiCon 比较,* $P < 0.01$;与 SiCon + 5-FU (10.0 $\mu\text{mol/L}$)比较,# $P < 0.01$ 。

图 3 Western blot 检测 LOVO 细胞 Ref-1 蛋白表达



注:A 为不同水平 5-FU 处理细胞后 NF- κB 的 DNA 结合活性;与对照比较,* $P < 0.01$;B 为 SiRef-1 抑制 5-FU 诱导的细胞 NF- κB 激活;1 表示 SiCon;2 表示 SiCon + 5-FU (10.0 $\mu\text{mol/L}$);3 表示 SiRef-1;4 表示 SiRef-1 + 5-FU (10.0 $\mu\text{mol/L}$);与 SiCon 比较,* $P < 0.01$;与 SiCon + 5-FU (10.0 $\mu\text{mol/L}$)比较,# $P < 0.01$ 。

图 4 EMSA 检测 LOVO 细胞 NF- κB 的 DNA 结合活性

2.3 SiRef-1 体外抑制 5-FU 诱导的大肠癌细胞 Ref-1 表达 采用 Western blot 检测不同水平的 5-FU 处理 48 h 后 LOVO 细胞 Ref-1 蛋白表达。结果显示,5-FU 处理后 LOVO 细胞

Ref-1 蛋白表达增强,且随 5-FU 水平增加 Ref-1 蛋白表达逐渐增强,见图 3A。SiRef-1 腺病毒或对照 SiCon 腺病毒感染细胞 48 h 后,予 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-FU 处理细胞,继续培养 48 h。Western blot 检测 Ref-1 蛋白表达,结果显示,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-FU 诱导细胞 Ref-1 蛋白表达增强,SiRef-1 抑制对照组细胞和 5-FU 诱导的细胞 Ref-1 表达,见图 3B。

2.4 SiRef-1 体外抑制 LOVO 细胞 NF- κ B 组成性和 5-FU 诱导的激活 不同水平的 5-FU 处理 LOVO 细胞 3 h 后,常规收集细胞和提取核蛋白,采用 EMSA 方法检测 NF- κ B 的 DNA 结合活性。结果显示,对照组细胞 NF- κ B 组成性激活,5-FU 呈剂量依赖性诱导细胞 NF- κ B 的 DNA 结合活性增强,见图 4A。20 MOI 的 SiRef-1 腺病毒或对照 SiCon 腺病毒感染细胞 48 h 后,予 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-FU 处理细胞,培养 3 h 后收集细胞提取核蛋白,采用 EMSA 方法检测 NF- κ B 的 DNA 结合活性。结果显示,SiRef-1 抑制细胞 NF- κ B 组成性激活和 5-FU 诱导的 NF- κ B 激活,见图 4B。

3 讨 论

Ref-1 含有 2 个不同的结构域,其 N-末端具有氧化还原功能,C-末端具有核酸内切酶的功能。Ref-1 是 DNA 碱基切除修复通路中的限速酶,主要负责修复烷化剂和氧化性损伤的无嘌呤/无嘧啶(AP)位点,同时也包括 5-FU 与腺嘌呤的错配被尿嘧啶糖基化酶切除后遗留的 AP 位点,在 AP 位点的 5'端切开 DNA 链。笔者前期研究发现,Ref-1 siRNA 显著抑制大肠癌细胞 AP 内切酶活性^[3]。Seiple 等^[4]研究发现,缺乏 Apn1 内切酶(Ref-1 同源)的酵母菌对 5-FU 的治疗敏感性明显增强。因此,Ref-1 的碱基切除修复功能可能是 5-FU 化疗抵抗的分子机制之一。

同时 Ref-1 通过氧化还原调控多种转录因子的表达和激活,包括 NF- κ B、p53、AP-1、HIF-1 α 等,参与胚胎发育、氧化应激、细胞周期调控及凋亡等多种关键的细胞反应,这些转录因子与多种肿瘤细胞的化疗敏感性有关。研究显示 NF- κ B 激活与大肠癌等肿瘤细胞 5-FU 化疗敏感性降低有关,抑制 NF- κ B 活性能显著增强大肠癌和胃癌细胞等 5-FU 化疗敏感性^[5-7]。p53 和 HIF-1 α 等转录因子也与 5-FU 化疗敏感性密切相关。Ref-1 作为这些转录因子的上游调节基因,对肿瘤细胞的 5-FU 化疗敏感性可能会起关键的调控作用。因此,Ref-1 通过核酸内切酶和氧化还原功能可能决定 5-FU 治疗反应的诸多环节,以 Ref-1 为靶点的治疗可能提高大肠癌细胞对 5-FU 治疗的敏感性。

笔者前期研究发现嵌合型腺病毒 Ad5/F35 介导的 Ref-1 siRNA 对大肠癌细胞具有很高的感染效率^[3]。本研究发现,SiRef-1 腺病毒显著增强大肠癌细胞 5-FU 化疗敏感性,SiRef-1 和 SiCon 组的 IC₅₀ 分别为 1.69 $\mu\text{mol/L}$ 和 7.04 $\mu\text{mol/L}$;且 SiRef-1 联合 5-FU 处理后大肠癌细胞凋亡显著增加。5-FU 处理大肠癌细胞后,Ref-1 蛋白表达增强,同时 NF- κ B 的 DNA 结合活性增强。提示 Ref-1 与 5-FU 获得性化疗抵抗有关。SiRef-1 能有效抑制 5-FU 诱导的大肠癌细胞 Ref-1 蛋白表达以及 NF- κ B 组成性和 5-FU 诱导的激活。本研究结果显示以 Ref-1 为靶点的治疗可显著增强大肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。

近年来 Ref-1 在肿瘤治疗敏感性方面的研究逐渐增多,研究发现 Ref-1 siRNA 可显著增强多发性骨髓瘤细胞对马法兰的敏感性和胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性^[8-9]。Montaldi 等^[10]发现 Ref-1 siRNA 可恢复耐药的胶质母细胞瘤对替莫唑胺的化疗敏感性。Lou 等^[11]发现 Ref-1 蛋白定位于大肠癌干

细胞核内,选择性 Ref-1 抑制剂 E3330 体外显著抑制大肠癌细胞生长,体内增强裸鼠移植瘤 5-FU 化疗敏感性。Wei 等^[12]研究发现 Ref-1 抑制剂 AT101 体外抑制胃癌细胞生长,诱导细胞凋亡和自噬,体内增强裸鼠移植瘤 5-FU 化疗敏感性。本研究发现 SiRef-1 体外显著增强大肠癌细胞 5-FU 化疗敏感性,其机制可能主要是通过抑制大肠癌细胞碱基切除修复和 NF- κ B 等放疗抵抗有关的转录因子活性。

参考文献

- [1] Davies JM,Goldberg RM. Treatment of metastatic colorectal cancer[J]. Semin Oncol,2011,38(4):552-560.
- [2] Choi S,Joo HK,Jeon BH. Dynamic regulation of APE1/Ref-1 as a therapeutic target protein[J]. Chonnam Med J, 2016,52(2):75-80.
- [3] Xiang DB,Chen ZT,Wang D,et al. Chimeric adenoviral vector Ad5/F35-mediated APE1 siRNA enhances sensitivity of human colorectal cancer cells to radiotherapy in vitro and in vivo[J]. Cancer Gene Ther,2008,15(10):625-635.
- [4] Seiple L,Jaruga P,Dizdaroglu M,et al. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast[J]. Nucleic Acids Res,2006,34(1):140-151.
- [5] Li F,Zhang J,Arfuso F,et al. NF- κ B in cancer therapy [J]. Arch Toxicol,2015,89(5):711-731.
- [6] Arriaga JM,Greco A,Mordoh J,et al. Metallothionein 1G and Zinc sensitize human colorectal cancer cells to chemotherapy[J]. Mol Cancer Ther,2014,13(5):1369-1381.
- [7] Hakibaei M,Mobasheri A,Lueders C,et al. Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF- κ B and Src protein kinase signaling pathways[J]. PLoS One,2013,8(2):e57218.
- [8] Yang ZZ,Chen XH,Wang D. Experimental study enhancing the chemosensitivity of multiple myeloma to melphalan by using a tissue-specific APE1-silencing RNA expression vector [J]. Clin Lymphoma Myeloma,2007,7(4):296-304.
- [9] Xiong GS,Sun HL,Wu SM,et al. Small interfering RNA against the apurinic or apyrimidinic endonuclease enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro[J]. J Dig Dis,2010,11(4):224-230.
- [10] Montaldi AP,Godoy PR,Sakamoto-Hojo ET. APE1/REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen,2015,793(11):19-29.
- [11] Lou D,Zhu L,Ding H,et al. Aberrant expression of redox protein Ape1 in colon cancer stem cells[J]. Oncol Lett, 2014,7(4):1078-1082.
- [12] Wei X,Duan W,Li Y,et al. AT101 exerts a synergetic efficacy in gastric cancer patients with 5-FU based treatment through promoting apoptosis and autophagy[J]. Oncotarget,2016,7(23):34430-34441.