

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201301007

· 论著 ·

EphA2 蛋白调控鼻咽癌紫杉醇敏感性的实验研究

任舒灵,刘 勇,李 果,谭平清,粟忠武,朱刚才,张 欣,田勇泉,邱元正

(中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科,耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室,湖南 长沙 410008)

摘 要: **目的** 探讨促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor, EphA2) 蛋白对鼻咽癌细胞紫杉醇化疗敏感性的影响。**方法** 采用脂质体 2000 将 EphA2 蛋白过表达载体 pEGFP-N1-EphA2 和空白载体 pEGFP-N1 分别转染鼻咽癌 5-8F 细胞, Western blot 验证转染效果, CCK-8 法检测各组细胞生存率, 并计算各组紫杉醇药物 IC50 值; 流式细胞术检测紫杉醇作用后鼻咽癌 5-8F 细胞周期及凋亡率的改变。**结果** 鼻咽癌 5-8F 细胞 EphA2 蛋白上调后, 紫杉醇药物在亲本细胞组和空白载体对照组中的 IC50 值分别为 $(1.4 \pm 0.05) \text{ nM/L}$ 和 $(1.3 \pm 0.06) \text{ nM/L}$, 而实验组中的表达为 $(3.8 \pm 0.52) \text{ nM/L}$, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。细胞周期结果显示实验组 $(45.76 \pm 3.89) \%$ 较亲本细胞组 $(65.85 \pm 2.28) \%$ 和对照组 $(64.52 \pm 3.31) \%$ 的 G0/G1 期细胞的比例明显减少, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 S 期细胞的实验组 $(31.56 \pm 1.59) \%$ 较亲本细胞组 $(25.76 \pm 1.89) \%$ 和对照组 $(24.55 \pm 3.64) \%$ 和 G2/M 期细胞的实验组 $(23.10 \pm 4.55) \%$ 较亲本细胞组 $(8.39 \pm 0.81) \%$ 和对照组 $(10.94 \pm 3.27) \%$ 的比例则明显增多, 两组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而细胞凋亡率 3 组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 该研究结果表明 EphA2 蛋白能通过影响鼻咽癌细胞周期改变而调控其对紫杉醇药物的敏感性。

关 键 词: 鼻咽癌; 促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2 蛋白; 紫杉醇; 细胞周期

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2013)01-0028-05

Mediation of paclitaxel sensitivity with EphA2 protein in nasopharyngeal carcinoma *in vitro*

REN Shu-ling, LIU Yong, LI Guo, et al.

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Key Laboratory of Otolaryngology major disease research of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of EphA2 protein on the chemosensitivity of paclitaxel in nasopharyngeal carcinoma (NPC) *in vitro*. **Methods** NPC 5-8F cells were transfected with EphA2 overexpression vector pEGFP-N1-EphA2 and empty vector pEGFP-N1 by LipofectAMINE 2000 and Western blot was used for detecting the transfection efficiency. The IC50 values of paclitaxel in each group were obtained by CCK-8 assays. Changes of cell cycle and apoptosis of 5-8F cells were examined with fluorescence-activated cell sorting analysis. **Results** Compared with parental 5-8F cells $(1.40 \pm 0.05) \text{ nM/L}$ and 5-8F cells transfected with empty vector $(1.30 \pm 0.06) \text{ nM/L}$, the IC50 value of paclitaxel was significantly up-regulated in 5-8F cells transfected with EphA2 overexpression vector $(3.80 \pm 0.52) \text{ nM/L}$ ($P < 0.05$). Meantime, cells in G0/G1 phase were greatly decreased [$(45.76 \pm 3.89) \%$ vs $(65.85 \pm 2.28) \%$, $(45.76 \pm 3.89) \%$ vs $(64.52 \pm 3.31) \%$], but cells in S phase [$(31.56 \pm 1.59) \%$ vs $(25.76 \pm 1.89) \%$, $(31.56 \pm 1.59) \%$ vs $(24.55 \pm 3.64) \%$] and G2/M phase [$(23.10 \pm 4.55) \%$ vs $(8.39 \pm 0.81) \%$, $(23.10 \pm 4.55) \%$ vs $(10.94 \pm 3.27) \%$] were obviously increased ($P < 0.05$). However, no significant difference was found in cell apoptosis rate among

基金项目: 国家自然科学基金(81202128, 81272974, 81071757, 81172558); 高等学校博士学科点专项科研基金课题(20100162110036, 20090162110065); 湖南省科技厅重点项目(2010TP4012-1); 中南大学自由探索计划青年教师助推基金(2012QNZT099)。

作者简介: 任舒灵, 女, 硕士研究生。

通讯作者: 邱元正, Email: xyqyz@medmail.com.cn.

the 5-8F cells of the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** EphA2 can regulate the chemosensitivity of paclitaxel via influencing the cell cycle in NPC cells.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm; Erythropoietin-producing hepatocellular receptor; Paclitaxel; Cell cycle

紫杉醇 (paclitaxel) 在鼻咽癌患者的化疗中取得了令人鼓舞的治疗效果^[1]。然而,其在运用过程中耐药性的产生和因剂量过大所产生的毒副作用制约了临床运用的效果^[2]。因此,如何减轻鼻咽癌对紫杉醇的耐药性为目前临床与基础研究中的热点和难点。促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2, EphA2) 为一种受体蛋白酪氨酸激酶,其在恶性肿瘤侵袭转移中的作用一直以来备受关注^[3-4]。近年来在卵巢癌的研究中发现,抑制 EphA2 的表达能在体内外实验中提高卵巢癌细胞对紫杉醇的敏感性^[5-6]。因此,本研究拟在体外实验中阐明 EphA2 是否对鼻咽癌细胞的紫杉醇药物敏感性具有调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

改良型 RMPI-1 640 细胞培养基 (Hyclone, 美国), 特级胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), 0.25% 胰蛋白酶消化液 (含乙二胺四乙酸), 双抗 (青霉素-链霉素, Gibco, 美国), EphA2 过表达载体 pEGFP-N1-EphA2 和空白载体 pEGFP-N1 (上海吉凯基因化学技术有限公司), LipofectAMINE 2 000 脂质体转染试剂盒 (Invitrogen, 美国), 兔抗人 EphA2 多克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 美国), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 检测试剂盒、小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体及 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒, 紫杉醇 (Sigma, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 鼻咽癌 5-8F 细胞培养 本研究所采用的 5-8F 细胞为鼻咽部低分化鳞癌细胞, 由中南大学湘雅医院耳鼻咽喉科实验室提供。该细胞株在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 用含有 10% 特级胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的改良型 RMPI-1640 细胞培养基进行培养, 常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代。所有试验均选用处于对数生长期的

细胞。

1.2.2 鼻咽癌 5-8F 细胞重组质粒转染过程 严格按照 LipofectAMINE 2 000 脂质体转染试剂盒说明书的操作步骤进行。将 EphA2 蛋白过表达载体 pEGFP-N1-EphA2 和空白载体 pEGFP-N1 分别转染鼻咽癌 5-8F 细胞。转染 72 h 后采用 Western blot 检测 EphA2 蛋白的上调效果。实验共分为 3 组: ①亲本细胞组 (未进行基因转染的 5-8F 细胞); ②对照组 (转染空白载体 pEGFP-N1 的 5-8F 细胞); ③实验组 (转染过表达载体 pEGFP-N1-EphA2 的 5-8F 细胞)。

1.2.3 蛋白印迹法 (Western blot) 检测 EphA2 蛋白的表达 提取各组细胞总蛋白, 二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid, BCA) 测定细胞总蛋白浓度。50 μ g 总蛋白变性处理后, 进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳。蛋白电泳分离后转膜至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。兔抗人 EphA2 多克隆抗体 (1: 400) 于 37℃ 下孵育 1 h。洗膜后, 辣根过氧化物酶标记的二抗 (1: 3 000) 室温下孵育 1 h。洗膜后, 经化学发光剂显影曝光摄片。以小鼠抗人 β -actin 抗体 (1: 2 000) 检测 β -actin 含量作为内参。实验均重复 3 次。

1.2.4 CCK-8 法检测紫杉醇作用后鼻咽癌 5-8F 细胞生存率 选取对数生长期的各组细胞, 0.25% 胰酶消化并以每孔 7 000 个细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 每组细胞分别给予梯度浓度紫杉醇作用 (0、0.001、0.01、0.1、1、5、10、20、30 nM/L), 每个浓度梯度设有 3 复孔, 阴性对照孔加入同体积培养基。紫杉醇作用 48 h 后, 各孔分别加入 10 μ l CCK-8 溶液, 培养箱中孵育 1 h, 酶标仪 (检测条件为: 主波长 450 nm, 滤过波长 630 nm) 检测各孔吸光度 (OD) 值, 根据 OD 值计算各浓度紫杉醇作用后细胞的生存率, 绘制各组细胞生存曲线, 计算各组细胞紫杉醇 IC₅₀ 值。本实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.5 流式细胞术检测紫杉醇作用后鼻咽癌 5-8F 细胞周期及凋亡率的改变 选择对数生

长期的各组 5-8F 细胞,0.25% 胰酶消化制备成细胞悬液,以每孔 20 万个细胞接种于 6 孔板中,细胞培养 24 h 后,更换含有 IC30 浓度的紫杉醇溶液的培养基继续作用 48 h。胰酶消化后常规培养基吹打成细胞悬液,转移至离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,以 PBS 溶液重悬、离心、去上清,重复洗涤细胞 2 次后弃去上清,每组细胞加入 1ml 70% 乙醇重悬固定细胞,18 h 后行流式细胞术检测细胞周期。同法,收集各组细胞进行 Annexin V-FITC 和 PI 双染色,1h 内行流式细胞术检测各组细胞凋亡率。以上实验均重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用多样本均数的方差分析进行组间样本均数的比较。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 上调 EphA2 蛋白在鼻咽癌 5-8F 细胞中的表达

为阐明 EphA2 蛋白在鼻咽癌细胞紫杉醇化疗敏感性中的调控作用,我们首先采用脂质体 2000 将 EphA2 蛋白过表达载体 pEGFP-N1-EphA2 和空白载体 pEGFP-N1 分别转染鼻咽癌 5-8F 细胞。转染 72 h 后 Western Blot 验证转染效果。结果显示空白载体对照组和亲本细胞组 EphA2 蛋白表达较低,而转染了目的基因的实验组 EphA2 蛋白表达量显著升高,见图 1。

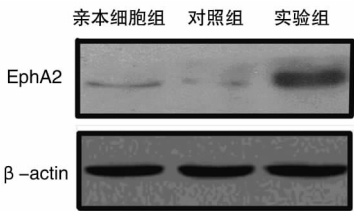


图 1 Western Blot 验证 EphA2 蛋白的上调效果

2.2 EphA2 蛋白过表达降低鼻咽癌 5-8F 细胞对紫杉醇化疗敏感性

为了进一步验证 EphA2 蛋白对鼻咽癌细胞化疗敏感性的调控作用,本实验利用梯度浓度紫杉醇作用于亲本细胞组、对照组和实验组。

结果显示实验组细胞对紫杉醇作用 IC50 为 (3.8 ± 0.52) nM/L,较亲本细胞组 IC50 (1.4 ± 0.05) nM/L、对照组 IC50 (1.3 ± 0.06) nM/L 均显著升高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。提示 EphA2 蛋白表达上调后鼻咽癌 5-8F 细胞对紫杉醇的药物敏感性显著降低。

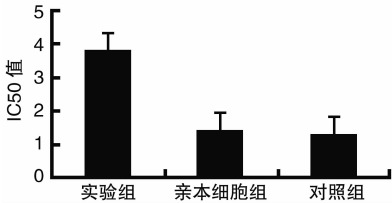


图 2 上调 EphA2 蛋白的表达对紫杉醇作用的鼻咽癌 5-8F 细胞化疗敏感性的影响

2.3 EphA2 蛋白过表达通过改变鼻咽癌 5-8F 细胞的细胞周期调控其紫杉醇化疗敏感性

在紫杉醇作用 48 h 后,流式细胞术分析各组细胞周期结果发现:实验组 $(45.76 \pm 3.89)\%$ 较亲本细胞组 $(65.85 \pm 2.28)\%$ 和对照组 $(64.52 \pm 3.31)\%$ 的 G0/G1 期细胞比例明显减少,两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而 S 期细胞的实验组 $(31.56 \pm 1.59)\%$ 较亲本细胞组 $(25.76 \pm 1.89)\%$ 和对照组 $(24.55 \pm 3.64)\%$ 和 G2/M 期细胞的实验组 $(23.10 \pm 4.55)\%$ 较亲本细胞组 $(8.39 \pm 0.81)\%$ 和对照组 $(10.94 \pm 3.27)\%$ 的比例则明显增多,两组比较差异均具有统计学意义 (F 值分别为 6.521 和 17.382, $P < 0.05$);而亲本细胞组与对照组比较,各周期细胞比例不具有统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。

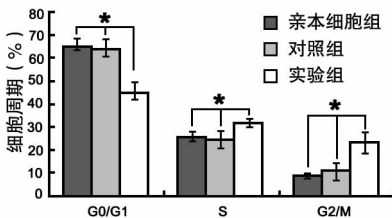


图 3 EphA2 蛋白过表达对紫杉醇作用的鼻咽癌 5-8F 细胞周期的影响

2.4 EphA2 蛋白过表达对紫杉醇作用后鼻咽癌 5-8F 细胞的细胞凋亡影响

亲本细胞组、对照组和实验组细胞在紫杉醇作用 48 h 后,流式细胞术检测各组细胞凋亡率分别为: $(8.66 \pm 1.59)\%$ 、 $(7.74 \pm 1.34)\%$ 及 $(9.84 \pm 2.08)\%$ 。多样本均数方差分析结果表明,3 组间差异均不具有统计学意义 ($F = 1.157$, $P > 0.05$),见图 4。

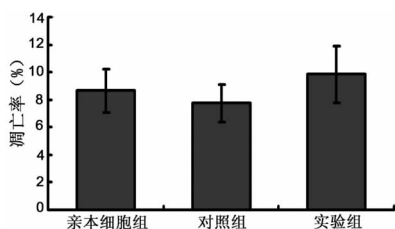


图 4 EphA2 蛋白过表达对紫杉醇作用的鼻咽癌 5-8F 细胞凋亡率的影响

3 讨论

紫杉醇为微管作用物质,通过影响微管聚合与解聚的动态平衡,导致细胞周期阻断于 G2/M 期,从而使癌细胞的生长抑制进而死亡。目前,紫杉醇在鼻咽癌患者的临床运用中取得了令人鼓舞的治疗效果,然而其在运用过程中耐药性的产生和因剂量过大所产生的毒副作用制约了临床运用的效果。现有研究表明紫杉醇耐药的可能因素如下:多药耐药基因 (MDR) 扩增而使其产物 P 糖蛋白 (P-gp) 过度表达, DNA 修复机制增强,多药耐药相关蛋白 (MRP) 等表达异常,凋亡信号途径改变 (bcl-2 家族等)。其中,MDR 及凋亡信号途径改变在紫杉醇耐药中发挥了重要作用^[7]。尽管紫杉醇耐药的相关性研究在上述各方面取得一定进展,但其具体分子机制目前仍不十分清楚,尚需从新的角度进行探讨。

促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2 (EphA2) 为一种受体蛋白酪氨酸激酶,为我们前期发现的头颈鳞癌组织与癌旁黏膜组织之间的重要差异表达基因。在前期研究工作中,我们发现 EphA2 蛋白的表达水平与头颈鳞癌患者的预后呈负相关,为预后的独立影响因素^[8];且通过体内外实验发现 EphA2 蛋白能调控头颈鳞癌的生长及转移^[9-10]。目前,国内外关于 EphA2 蛋白的研究多集中在肿瘤的侵袭转移方面,而有关 EphA2 蛋白对肿瘤细胞化疗

耐药影响的研究甚少。仅在卵巢癌^[5-6]的研究中发现,抑制 EphA2 蛋白的表达能在体内外实验中提高卵巢癌细胞对紫杉醇的药物敏感性。

我们前期研究及国内朱国臣等研究均发现 EphA2 蛋白阳性表达与鼻咽癌临床分期和转移密切相关^[10-11]。本研究则进一步在体外细胞实验中发现,EphA2 蛋白过表达后能显著降低鼻咽癌细胞对紫杉醇的药物敏感性,且该药物敏感性的改变与 EphA2 蛋白所致的细胞周期改变密切相关。本研究发现,EphA2 蛋白过表达后,在紫杉醇作用下,G1 期细胞明显减少,S 期和 G2/M 期细胞则明显增多,即 EphA2 蛋白过表达的鼻咽癌 5-8F 细胞较亲本细胞组和对照组表现出更强的生存能力,对紫杉醇的化疗敏感性降低。该研究结果目前在国内外尚未见文献报道。目前,有关 EphA2 蛋白对紫杉醇药物敏感性的调控仅停留在表型研究层面。鉴于 EphA2 为一种跨膜受体蛋白,可通过下游复杂的信号通路而影响最终生物学行为的改变。因此,EphA2 作为一上游受体蛋白,它是否是通过影响多药耐药基因 (MDR) 扩增或表达异常,或是 DNA 修复机制改变,或是凋亡信号途径改变,甚至或是通过肿瘤化疗耐药中的新现象——自噬作用^[12],而最终发挥其对紫杉醇药物敏感性的调控作用,都有待于我们进一步从体内外实验中予以佐证。

综上所述,本研究在体外水平阐明 EphA2 蛋白可降低鼻咽癌细胞对紫杉醇的药物敏感性。该研究结果进一步丰富了 EphA2 蛋白在肿瘤研究中的生物功能,为今后利用 EphA2 蛋白作为鼻咽癌紫杉醇化疗抵抗的分子靶点提供了新的实验数据和理论依据。

参考文献:

- [1] Fayette J, Montella A, Chabaud S, et al. Paclitaxel is effective in relapsed head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective study of 66 patients at a single institution [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(5): 553–558.
- [2] Holleman A, Chung I, Olsen RR, et al. miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2011, 30(43): 4386–4398.
- [3] Ireton RC, Chen J. EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5(3): 149–157.

(下转第 37 页)