

多柔比星诱导乳腺癌细胞PARP-1 活性上调依赖于Kif4A蛋白低表达

王辉 鲁常青 田波 李青 陈铜兵

苏州大学附属第三医院病理科, 江苏 常州, 213003

[摘要] 背景与目的: 化疗作为乳腺癌术后治疗的重要手段, 由其引发的耐药现象备受关注, 而耐药的
出现与DNA损伤修复异常增强密切相关。驱动蛋白家族成员4A(kinesin family member 4A, Kif4A)和聚腺苷酸
二磷酸核糖聚合酶-1[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP-1]是重要的DNA损伤修复分子。本研究探讨Kif4A在
多柔比星诱导乳腺癌细胞PARP-1活性上调中的作用及意义。**方法:** 蛋白质印迹法检测多柔比星处理后乳腺癌
MDA-MB-231和MCF-7细胞Kif4A蛋白表达及PARP-1活性的变化; 并检测高表达Kif4A蛋白后, 乳腺癌细胞PARP-1
蛋白表达及其活性变化; 流式细胞技术检测多柔比星联合PARP-1抑制剂3-氨基苯酰胺(3-Aminobenzamide,
3-ABA)干预后乳腺癌细胞的凋亡情况。**结果:** 多柔比星能上调PARP-1活性并诱导乳腺癌细胞Kif4A蛋白低表
达, 两者都呈浓度和时间依赖性; 高表达Kif4A后, PARP-1活性被明显抑制, 细胞凋亡数增加, 而多柔比星能
部分逆转由Kif4A高表达而引起的PARP-1活性抑制。多柔比星和3-ABA都诱导乳腺癌细胞凋亡, 联合使用能增加
细胞凋亡, 与单独使用比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结果还显示, 多柔比星、PARP-1抑制剂3-ABA及高
表达的Kif4A诱导的MDA-MB-231细胞凋亡数高于MCF-7细胞, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 多柔比星诱导
乳腺癌细胞PARP-1活性上调依赖于细胞Kif4A蛋白低表达, Kif4A有望成为逆转多柔比星耐药的新靶点。

[关键词] 驱动蛋白家族成员4A; 聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶-1; 多柔比星; MCF-7细胞; MDA-MB-231
细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.10.005

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)10-0804-09

Epirubicin up-regulates PARP-1 activity dependent on Kif4A low expression in breast cancer cells WANG
Hui, LU Chang-qing, TIAN Bo, LI Qing, CHEN Tong-bing (Department of Pathology, the Third Affiliated
Hospital of Suzhou University, Changzhou Jiangsu 213003, China)

Correspondence to: LU Chang-qing E-mail: 344575914@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** Chemotherapy is the important way of breast cancer treatment, but
the drug-resistance has attracted special attention. The emergence of drug resistance is closely related to the abnormal
enhancement of DNA-damage repair. Both Kif4A and PARP-1 are important molecules of DNA repair. The research
investigated the function of Kif4A in epirubicin up-regulating the activity of PARP-1 in breast cancer cells and
possible significance. **Methods:** Western blot was used to detect the expression of Kif4A and PARP-1 after treatment
with epirubicin in MDA-MB-231 and MCF-7 cells; the expression of PARP-1 and its activity were detected after
high expression of Kif4A and treatment with epirubicin; FCM was used to detect cell apoptosis after treatment with
epirubicin combined with PARP-1 inhibitor 3-ABA. **Results:** Epirubicin up-regulated PARP-1 activity and induced
low expression of Kif4A in breast cancer cells, both of them showed dose-dependent and time-dependent. After high
expression of Kif4A, the activity of PARP-1 was inhibited and the apoptosis of cells increased, epirubicin partially
reversed the activity of PARP-1 inhibited by high Kif4A expression. Both of epirubicin and 3-ABA induced cell
apoptosis, combination of them further increased cell apoptosis compared with alone used ($P<0.05$). The results also
showed the apoptosis rate of MDA-MB-231 cells induced by epirubicin, PARP-1 inhibitor 3-ABA and high expression

Kif4A was higher than that of MCF-7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Epirubicin increases the activity of PARP-1 dependent on the low expression of Kif4A in breast cancer cells. Kif4A might become a novel target for overcoming resistance of epirubicin.

[Key words] Kif4A; PARP-1; Epirubicin; MCF-7 cell; MDA-MB-231 cell

多柔比星是临床上常用的化疗药物，能与DNA发生交联，抑制DNA复制，阻断细胞分裂，达到杀伤肿瘤细胞的目的。然而最近临床用药显示，多柔比星的化疗特别是对乳腺癌的化疗耐药现象常见，而化疗耐药原因可能与肿瘤细胞DNA损伤修复能力异常增强有关。聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶-1 [poly(ADP-ribose) polymerase, PARP-1] 在DNA损伤修复中起着重要作用。研究发现多柔比星能上调多种乳腺癌细胞PARP-1的活性^[1-2]。本研究通过实验证明驱动蛋白家族成员4A(kinesin family member 4A, Kif4A)在多柔比星诱导乳腺癌细胞PARP-1活性上调中起着重要作用，为乳腺癌耐药研究提供线索。

1 材料和方法

1.1 细胞及试剂

1.1.1 细胞株

乳腺癌细胞MCF-7购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，乳腺癌细胞MDA-MB-231购于南京凯基生物技术有限公司。

1.1.2 试剂

DMEM细胞培养液购于Invitrogen公司；胎牛血清购于美国Hyclone公司；一抗Kif4A多克隆抗体和PAR多克隆抗体购于SAB公司，PARP多克隆抗体和 α -tubulin多克隆抗体购于Cell Signaling公司；二抗HRP标记的羊抗鼠二抗及羊抗兔二抗购于Amersham公司；多柔比星购于美国Sigma公司；PARP-1抑制剂3-氨基苯酰胺(3-Aminobenzamide, 3-ABA)购于Amresco公司；Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物有限公司。

1.2 细胞培养

MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞均用

含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素和2 mmol/L谷氨酰胺的高糖DMEM完全培养液，于37℃、CO₂体积分数为5%培养箱中培养，每2~3天用0.25%胰蛋白酶和0.5% EDTA混合液传代。

1.3 实验分组及细胞处理

接种MCF-7和MDA-MB-231细胞(MCF-7细胞接种密度为 3×10^5 个细胞/孔，MDA-MB-231细胞接种密度为 5×10^5 个细胞/孔，下面实验细胞接种密度与此相同)于6孔板中，次日换新鲜的含10%胎牛血清的DMEM培养液2 mL，分别用0.05、0.1、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 的多柔比星处理MCF-7细胞24 h，恢复12 h，裂解细胞，收集蛋白，备用与蛋白印迹法检测。以不加多柔比星细胞为对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)。每组设3个重复孔。

1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度多柔比星处理MCF-7/MDA-MB-231细胞24 h，分别在恢复6、12、24和48 h后，用PBS洗细胞2次，裂解细胞，收集蛋白，并进行蛋白定量，备用与蛋白印迹法检测。以不给予恢复时间细胞组为对照组。每组设3个重复孔。

构建并转染HA-Kif4A质粒至MCF-7和MDA-MB-231细胞中，1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的多柔比星处理24 h，恢复12 h，裂解细胞，收集蛋白，并进行蛋白定量，备用与蛋白印迹法检测。以转染空载质粒和未加多柔比星细胞组为对照组。每组设3个重复孔。

接种MCF-7/MDA-MB-231细胞，用1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的多柔比星联合5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的3-ABA分别处理MCF-7和MDA-MB-231细胞24 h，恢复12 h，收取上清液及培养皿底部贴壁细胞，用PBS洗涤2次，用FCM法检测细胞凋亡。以不加多柔比星和3-ABA的MCF-7细胞组为对照组。每组设3个重复孔。

1.4 蛋白质印迹法(Western blot)

Western blot检测Kif4A、PARP-1的表达及PARP-1的活性,用细胞裂解液提取各组总蛋白;考马斯亮蓝比色法测定蛋白含量,取等量蛋白进行8%的SDS-PAGE凝胶电泳,PVDF转膜,非特异性封闭;加入抗Kif4A多克隆抗体、抗PARP-1多克隆抗体、抗PAR多克隆抗体及抗 α 微管蛋白多克隆抗体,4℃过夜;加入辣根过氧化物酶标记的相应的二抗进行杂交2 h。ECL发光剂温浴5 min,曝光、显影、定影。用 α 微管蛋白作为内参。数码成像分析系统软件对结果进行分析,用Image-Pro Plus 6.0软件对蛋白条带进行光密度分析,目的蛋白的相对表达量=(待检测蛋白光密度/ α 微管蛋白光密度)。实验重复3次。

1.4 RT-PCR检测

提取HEK293(购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)细胞总RNA,并以其为模板,扩增Kif4A;Kif4A引物序列:上游5'-TGAAGC TTACATGAAGGAAGAGGTGAAG-3';下游5'-AGATGTCGACTCCAACCTTCAGTGGG-3',反应条件94℃ 2 min;98℃ 10 s,55℃ 10 s,72℃ 4.5 min,30个循环;72℃ 5 min。

1.5 FCM法检测细胞凋亡

按实验要求处理MCF-7和MDA-MB-231细胞,用不含EDTA胰酶消化收集细胞,合并上清液和细胞,用PBS再洗涤2次,然后用500 mL结合缓冲液悬浮细胞,加入5 mL的Annevin V-FITC混匀,加入5 mL的PI混匀,室温避光反应5~15 min,流式细胞仪检测(1 h内完成细胞检测)。计算细胞凋亡率。实验重复3次。

1.6 统计学处理

应用SPSS 17.0统计分析软件进行实验结果数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数的比较采用 t 检验,多组均数间的比较采用单因素方差分析,再用Tukey post hoc进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 多柔比星对乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231表达Kif4A和PARP-1的影响

分别用0.05、0.1、0.5、1和2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度多柔比星干预MCF-7和MDA-MB-231细胞24 h,恢复12 h,以不加多柔比星细胞为对照组(0 $\mu\text{mol/L}$),蛋白质印迹法检测结果显示,随着多柔比星浓度的升高,MCF-7和MDA-MB-231细胞PARP-1活性即多聚核糖基化修饰[poly(ADP-ribose), PAR]在整个过程中逐渐增强,在1 $\mu\text{mol/L}$ 时,其活性是对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)的2倍以上,差异有统计学意义($P<0.05$);相反Kif4A蛋白却呈现出逐渐低表达,在多柔比星浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 时,Kif4A蛋白基本不表达,差异有统计学意义($P<0.05$);而全长PARP-1(113×10^3)蛋白表达在整个过程中变化不大,其断裂(89×10^3)略有减少(图1)。

1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度多柔比星处理MCF-7细胞24 h,分别恢复6、12、24、48 h,以未处理组和不予恢复时间作为对照组,蛋白质印迹法检测结果显示,多柔比星处理后随着恢复时间的延长,两种细胞的PARP-1活性PAR都呈现出逐渐增加的趋势,在多柔比星处理后不予恢复时间组中PAR被抑制,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);相反Kif4A蛋白却呈现出逐渐低表达,差异有统计学意义($P<0.05$);而全长PARP-1蛋白表达在整个过程中变化不大,随着恢复时间的延长,断裂PARP-1略有减少,与加入多柔比星但不予恢复时间组相比较,给予恢复时间组PARP-1断裂减少,差异有统计学意义($P<0.05$,图2)。

2.2 Kif4A高表达对MCF-7和MDA-MB-231细胞表达PARP-1及其活性的影响

构建HA-Kif4A(结果未显示),转染HA-Kif4A至MCF-7和MDA-MB-231细胞内,

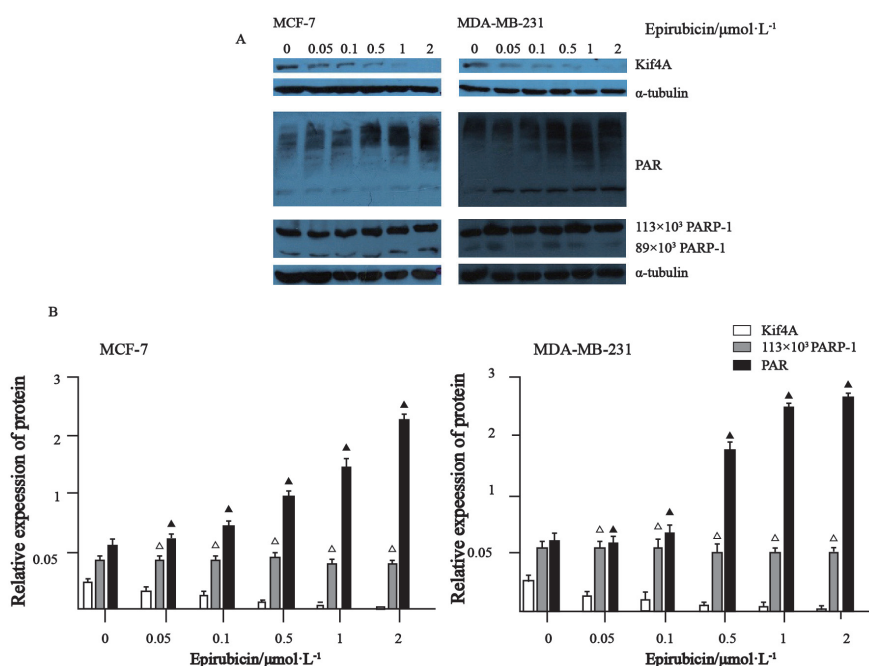


图 1 蛋白质印迹法检测不同浓度多柔比星处理MCF-7和MDA-MB-231细胞24 h且恢复12 h后Kif4A及PARP-1的表达情况

Fig. 1 The expressions of Kif4A and PARP-1 after treatment with epirubicin for 24 h, and recovery for 12 h were detected by Western blot in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

A: The change of Kif4A and PARP-1 expression and PARP-1 activity after treatment with epirubicin; B: Image-Pro Plus 6.0 detected the relative expression of Kif4A and PARP-1 and the activity of PARP-1, compared with control (0 μmol/L) (Kif4A); ▲: $P < 0.05$, compared with control (PAR); △: $P > 0.05$, compared with control (113×10^3 PARP-1, $n=3$).

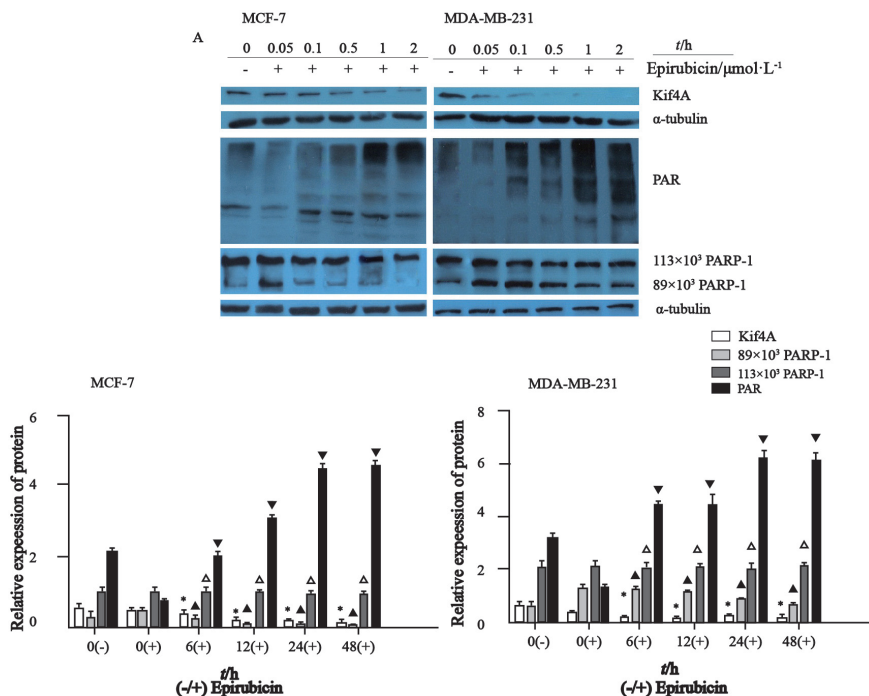


图 2 蛋白质印迹法检测1 μmol/L浓度多柔比星处理MCF-7细胞24 h，恢复不同时间后Kif4A及PARP-1的表达情况

Fig. 2 The expression of Kif4A and PARP-1 after treatment with 1 μmol/L epirubicin for 24 h and recovery for different time were detected by Western blotting in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

A: The change of Kif4A and PARP-1 expression and PARP-1 activity after treatment with epirubicin and recovery for different time; B: Image-Pro Plus 6.0 detected the relative expression of Kif4A and PARP-1 and the activity of PARP-1; *: $P < 0.05$, compared with 0 μmol/L epirubicin group and 0 recovery time group (Kif4A); ▼: $P < 0.05$, compared with 0 μmol/L epirubicin group and 0 recovery time group (PAR); ▲: $P < 0.05$, compared with 0 recovery time group (89×10^3 PARP-1); △: $P > 0.05$, compared with 0 μmol/L epirubicin group and 0 recovery time group (113×10^3 PARP-1); $n=3$.

1 mmol/L浓度多柔比星处理24 h, 恢复12 h, 裂解细胞, 蛋白质印迹法检测结果显示: Kif4A的高表达能明显抑制MCF-7和MDA-MB-231细胞的PARP-1活性, 与未转染组和转染空载体组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而多柔比星能部分逆转由外源性Kif4A高表达引起的PARP-1活性抑制; 多柔比星处理组PARP-1活性明显增

强, 与不加多柔比星相比, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图3)。

2.3 多柔比星联合3-ABA作用对MCF-7和MDA-MB-231细胞凋亡的影响

用1 mmol/L浓度多柔比星联合5 mmol/L浓度3-ABA处理MCF-7和MDA-MB-231细胞24 h, 恢复12 h, 收取上清液及培养皿底部贴

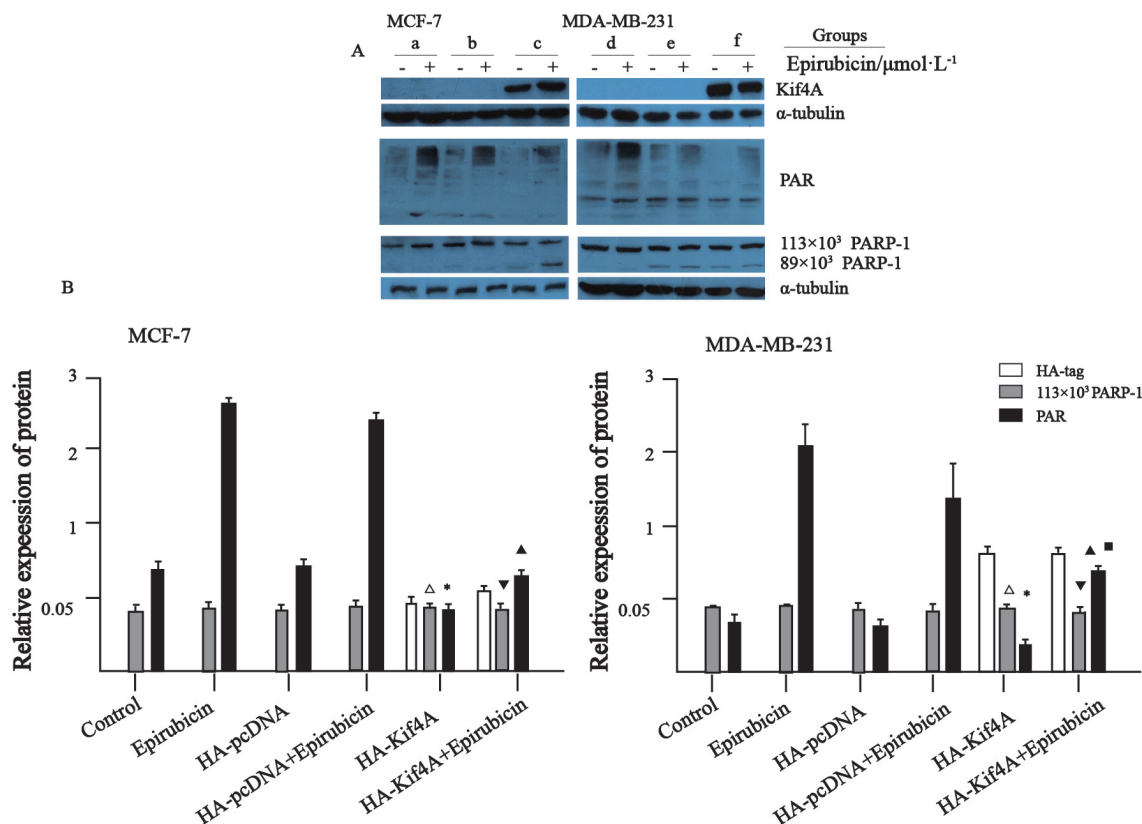


图3 蛋白质印迹法检测Kif4A高表达后1 μ mol/L浓度多柔比星处理MCF-7和MDA-MB-231细胞24 h、恢复12 h后PARP-1蛋白表达或活性的情况

Fig. 3 The expression of PARP-1 after transfected HA-Kif4A plasmid and treated with 1 μ mol/L epirubicin for 24 h and recovery for 12 h by Western blot in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

A: The change of PARP-1 expression and PARP-1 activity after transfected HA-Kif4A plasmid and treated with 1 μ mol/L epirubicin 24 h; a, d: Control group; b, e: HA-pcDNA3.0 group; c, f: HA-Kif4A group, -: no epirubicin; +: epirubicin. B: Image-Pro Plus 6.0 detected the relative expression of PARP-1 and the activity of PARP-1; *: $P<0.05$, compared with control group and HA-pcDNA group (PAR); \blacktriangle : $P<0.05$, compared with epirubicin group and HA-pcDNA + epirubicin group (PAR); \blacksquare : $P<0.05$, compared with HA-Kif4A group (PAR); \triangle : $P>0.05$, compared with control group and HA-pcDNA group (113 $\times 10^3$ PARP-1); \blacktriangledown : $P>0.05$, compared with epirubicin group and HA-pcDNA + epirubicin group (113 $\times 10^3$ PARP-1); $n=3$.

壁细胞, 用PBS洗涤2次, 以不加多柔比星和3-ABA为对照组, FCM法检测细胞凋亡, 结果显示, 在MCF-7细胞, 多柔比星及3-ABA都能诱导MCF-7细胞发生凋亡, 细胞凋亡率分别为(5.94 \pm 0.27)%和(6.90 \pm 0.17)%, 与对照组 [(3.85 \pm 0.26)%] 相比, 差异有统计学意义($P<0.05$); 两者联合使用能进一步诱导细胞凋亡, 凋亡率为(10.24 \pm 0.81)%, 与多柔比星

及3-ABA单独使用相比, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4)。

多柔比星及3-ABA都能诱导MDA-MB-231细胞发生凋亡, 细胞凋亡率分别为(6.30 \pm 0.48)%和(7.83 \pm 0.58)%, 与对照组 [(3.14 \pm 0.67)%] 相比, 差异有统计学意义($P<0.05$); 两者联合使用则进一步诱导细胞凋亡, 凋亡率为(11.53 \pm 0.45)%, 与多柔比星和3-ABA单独使用

相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4)。

本研究同时还比较了多柔比星及3-ABA处理后, MCF-7与MDA-MB-231细胞的凋亡差异, 结果显示: 多柔比星、3-ABA、多柔比星+3-ABA处理后, MDA-MB-231细胞凋亡率分别为(6.30±0.48)%、(7.83±0.58)%和

(11.53±0.45)% , 显著高于MCF-7细胞相对应处理组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4)。

2.4 Kif4A高表达对多柔比星诱导MCF-7和MDA-MB-231细胞凋亡的影响

转染HA-Kif4A至MCF-7和MDA-MB-231细胞内, 1 mmol/L浓度多柔比星处理24 h, 恢

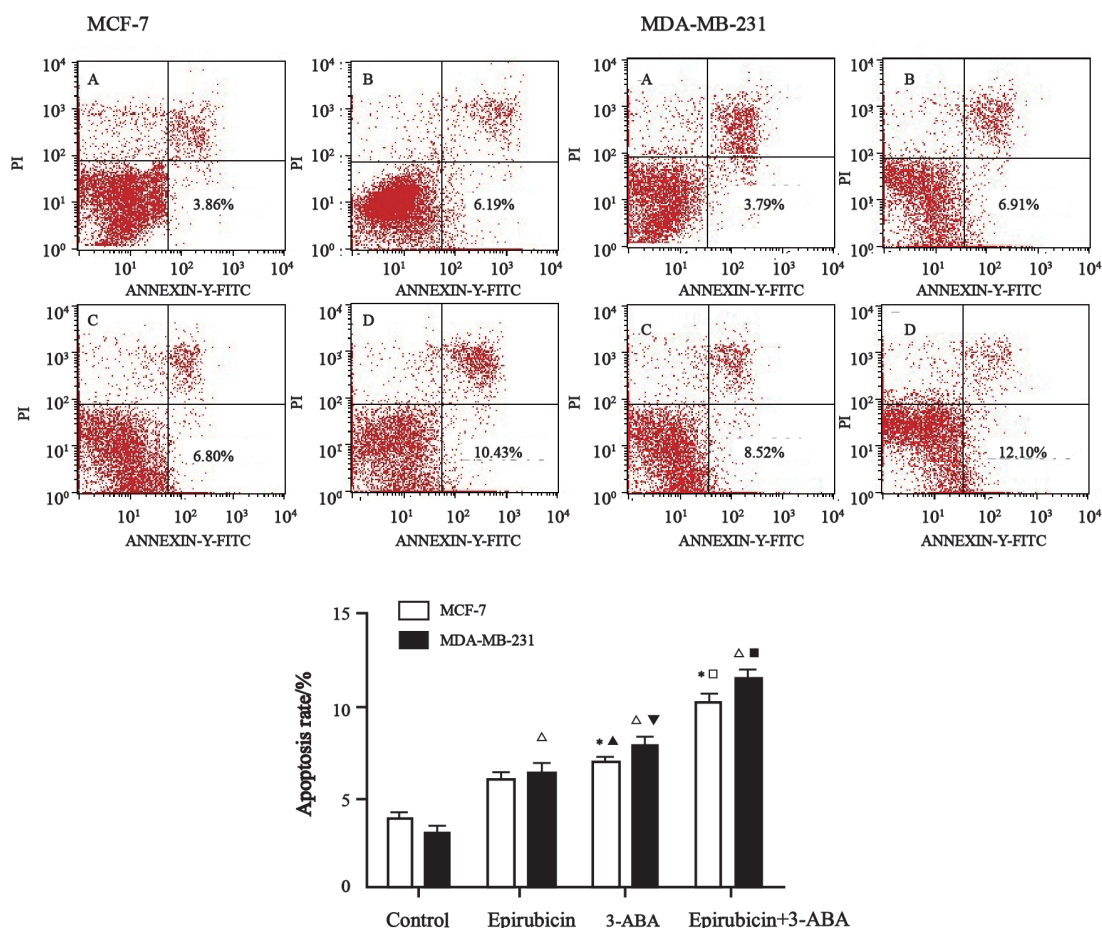


图4 FCM法检测多柔比星联合3-ABA对MCF-7和MDA-MB-231细胞凋亡影响

Fig. 4 The apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treated with PARP-1 inhibitor 3-ABA and epirubicin were detected by FCM

A: Control group; B: Epirubicin group; C: 3-ABA group; D: epirubicin+3-ABA group; *: $P < 0.05$, compared with control group (MCF-7); Δ : $P < 0.05$, compared with control group (MDA-MB-231); \square : $P < 0.05$, compared with 3-ABA group and epirubicin group (MCF-7); \blacktriangle : $P < 0.05$, compared with epirubicin group (MCF-7); \blacktriangledown : $P < 0.05$, compared with epirubicin group (MDA-MB-231); \blacksquare : $P < 0.05$, compared with 3-ABA group and epirubicin group (MDA-MB-231); \diamond : $P < 0.05$, compared with epirubicin group (MCF-7); \blacklozenge : $P < 0.05$, compared with 3-ABA group (MCF-7); \bullet : $P < 0.05$, compared with epirubicin+3-ABA group (MCF-7, $n=3$).

复12 h, 收集细胞, FCM法检测细胞凋亡, 结果显示, Kif4A高表达后, 多柔比星能上调MCF-7细胞凋亡, 凋亡率为(9.23±0.70)% , 与HA-pcDNA+多柔比星组 [(7.19±0.75)%]和HA-Kif4A组 [(6.80±0.23)%]相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); HA-Kif4A高表达也能诱导MCF-7细胞凋亡, 凋亡率为(6.80±0.23)% , 与HA-pcDNA组 [(4.48±0.42)%]和对照组MCF-7

组 [(4.10±0.58)%]相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

Kif4A高表达后, 多柔比星能上调MDA-MB-231细胞凋亡, 凋亡率为(11.40±0.63)% , 与HA-pcDNA+多柔比星组 [(7.10±0.61)%]和HA-Kif4A组 [(8.36±0.79)%]相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); HA-Kif4A高表达也能诱导MDA-MB-231细胞凋亡,

凋亡率为(8.36 ± 0.79)%，与HA-pcDNA组 [(4.44±0.36)%] 和对照的MDA-MB-231组 [(3.85±0.66)%] 相比，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

本研究同时还比较在Kif4A高表达后MCF-7

与MDA-MB-231细胞的凋亡差异，结果显示，HA-Kif4A、HA-Kif4A+3-ABA处理后，MDA-MB-231细胞凋亡率分别为(8.36±0.79)%和(11.40±0.63)%，与相对照的MCF-7细胞组相比，差异有统计学意义($P<0.05$ ，图5)。

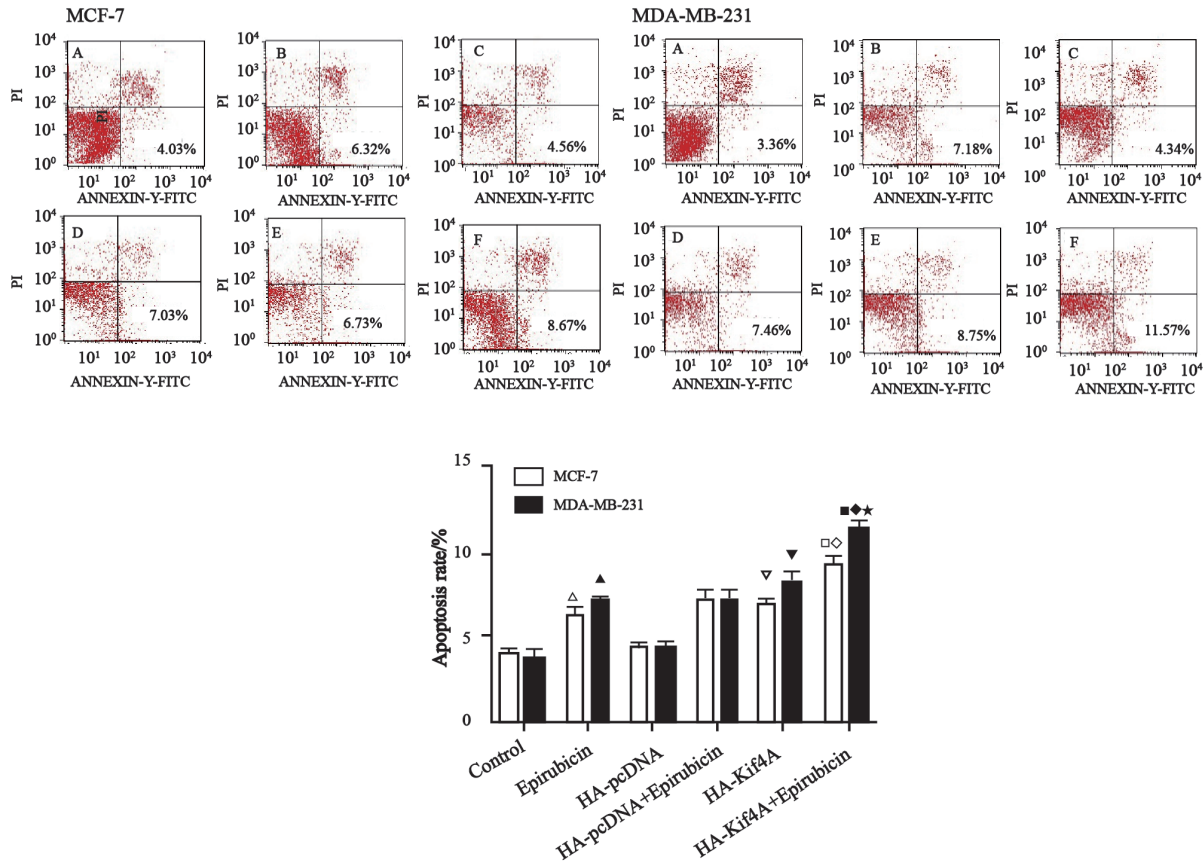


图5 FCM法检测Kif4A高表达对多柔比星诱导MCF-7和MDA-MB-231细胞凋亡的影响

Fig.5 The apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after transfected with HA-Kif4A plasmid and treated with 1 μmol/L epirubicin were detected by FCM

A: Control group; B: Epirubicin group; C: HA-pcDNA3.0 group; D: HA-pcDNA3.0+epirubicin group; E: HA-Kif4A group; F: HA-Kif4A+epirubicin group; Δ: $P<0.05$, compared with control group (MCF-7); ▲: $P<0.05$, compared with control group (MDA-MB-231); ▽: $P<0.05$, compared with control group and HA-pcDNA group (MCF-7); ▼: $P<0.05$, compared with control group and HA-pcDNA group (MDA-MB-231); □: $P<0.05$, compared with epirubicin group and HA-pcDNA+epirubicin group (MCF-7); ■: $P<0.05$, compared with epirubicin group and HA-pcDNA+epirubicin group (MDA-MB-231); ◇: $P<0.05$, compared with HA-Kif4A group (MCF-7); ◆: $P<0.05$, compared with HA-Kif4A group (MDA-MB-231); ★: $P<0.05$, compared with HA-Kif4A+epirubicin MCF-7 cells group ($n=3$).

3 讨论

多柔比星作为一种常用的乳腺癌化疗药物，在乳腺癌的治疗中起着重要作用，然而由其引起的化疗耐药也越来越多^[3]。研究表明P-糖蛋白(permeability glycoprotein, P-gp)^[4]、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)、耐药相关蛋白

(multidrug resistance-associated proteins, MRPs)^[5]、乳腺癌易感基因BRCA1(breast cancer associated 1, BRCA1)^[6]、PARP-1^[7]在癌症化疗耐药中都起着重要作用。Nelson等^[8]研究前列腺癌、乳腺癌和卵巢癌患者化疗干预后发现，在肿瘤附近的正常细胞(成纤维细胞)的DNA被化疗破坏时，也会向肿瘤微环境中释放一种称为WNT16B的蛋白，这种蛋白的高表达导致癌细胞生长、侵入附近组织并减弱了化疗药物在机体内的细

胞毒性,促进肿瘤细胞存活、加速癌症病理过程。Daemen等^[9]和Hiller等^[10]研究结果显示, BRCA1突变的乳腺癌和(或)三阴性乳腺癌对PARP-1抑制剂治疗较多柔比星敏感,提示多柔比星处理后可能上调了PARP-1活性,增强了其损伤修复功能。Munoz-gamez等^[2]在研究乳腺癌MDA-MB-231细胞时也发现,多柔比星处理后PARP-1活性能迅速上调,增强细胞损伤修复功能抑制MDA-MB-231细胞的凋亡。Midorikawa等^[11]在研究大脑神经元发育中发现Kif4A可通过其羧基末端直接与PARP-1相结合,抑制PARP-1的活性,介导神经元细胞的凋亡,提示Kif4A在调节PARP-1活性中起着重要作用。

Kif4A属于驱动蛋白(kinesin)超级家族,是以微管为轨道的分子马达(molecular motor)^[12]。Kif4A蛋白含有N端保守的马达区(motor domain)、中间的卷曲螺旋颈区(neck region)和C端的尾区(tail domain)^[13]。其马达区具有ATP酶活性,能通过水解ATP获得能量,改变构型,使Kif4A在以微管构成的轨道上进行滑行;而在Kif4A颈区,存在核定位信号(nuclear localization signal, NLS),使Kif4A能分布在细胞内和具有结合DNA的能力,这为Kif4A参与调节DNA损伤修复途径提供了可能;而Kif4A的尾区有一些分布规律的半胱氨酸,既可结合货物(cargo),进行细胞内物资运输,又可结合相关蛋白,调节DNA损伤修复途径,参与细胞有丝分裂过程中染色体的固缩、纺垂体的形成及分离等^[14-15]。

PARP-1是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶,其参与的聚ADP核糖化是真核细胞中蛋白质翻译后的重要修饰方式之一^[16]。PARP-1的相对分子质量为 113×10^3 ,其蛋白由6个结构域组成:其中Zn1、Zn2结构域中存在核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和KRK-X(11)-KKKSKK序列,使其具有DNA结合能力,故Zn1、Zn2结构域也称为DNA结合结构域(DNA-binding domain, DBD);而BRCT结构域与WGR结构域之间有一个富含赖

氨酸和谷氨酸的高度保守的聚ADP核糖基化[poly(ADP-ribose), PAR]结合位点,这为PARP-1催化结构域CAT介导PAR修饰提供了可能; Zn3是PARP-1中相对比较保守的结构域,其主要功能是与WGR结构域一同参与调节PAR修饰^[17]。PARP-1可作为NF- κ B和低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF1)的协同刺激因子调节基因转录,并且能与碱基切除修复因子(base excision repair, BER)和X线修复交叉互补基因(X-ray repair cross-complementing, XRCC)结合,单链DNA损伤能诱导PARP-1、XRCC及固缩蛋白I表达增加,上调PAR修饰,促进损伤DNA的修复^[18-19]。

实验结果显示多柔比星作用后,乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞的Kif4A蛋白低表达, PARP-1活性上调。高表达Kif4A后, MCF-7和MDA-MB-231细胞PARP-1活性明显被抑制,而多柔比星能部分逆转由外源性Kif4A高表达引起的PARP-1活性抑制。

多柔比星是通过何种机制诱导Kif4A低表达目前还不清楚,根据实验结果推测至少有两种可能情况:①多柔比星抑制乳腺癌细胞Kif4A蛋白表达;②多柔比星杀死乳腺癌细胞中Kif4A高表达的细胞,使Kif4A呈现出低的检测水平。此外多柔比星并不影响外源性Kif4A蛋白的表达,提示多柔比星对Kif4A的影响可能是在翻译水平(可能是对启动子的影响)。

多柔比星能诱导乳腺癌细胞后凋亡, PARP-1抑制剂抑制其活性后,细胞凋亡进一步增加。此外,MDA-MB-231细胞对PARP-1抑制剂3-ABA作用较MCF-7敏感,原因可能与MDA-MB-231细胞存在BRCA1突变(MCF-7细胞BRCA1野生型)有关。BRCA1作为乳腺癌中重要的一个损失修复蛋白,在同源重组修复发挥重要作用。已有报道证实Kif4A可通过BRCA1-BRCA2途径参与DNA损伤修复^[15], BRCA1的突变使该途径缺失, DNA损伤得不到有效修复,细胞凋亡增加。Kif4A的高表达抑制PARP-1的活性后,乳腺癌细胞凋亡,与MCF-7细胞相比,MDA-MB-231细胞凋亡明显;高表

达Kif4A后,再用多柔比星处理细胞,细胞凋亡也进一步增加;原因也可能是Kif4A高表达后,PARP-1活性明显被抑制,由其介导的损伤修复途径失活,细胞凋亡增加,而多柔比星处理后,内源性Kif4A蛋白低表达,由其介导的另一条损伤修复途径Kif4A-BRCA1-BRCA1失活,使细胞进一步凋亡。然而PARP-1介导的损伤修复途径和BRCA1介导的损伤修复途径何者起主要作用有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] GANGADHARAN C, THOH M, MANNA S K. Inhibition of constitutive activity of nuclear transcription factor kappaB sensitizes doxorubicin-resistant cells to apoptosis [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(2): 203-213.
- [2] MUNOZ-GAMEZ J A, MARTIN-OLIVA D, AGUILAR-QUESADA R, et al. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis [J]. *Biochem J*, 2005, 386(Pt 1): 119-125.
- [3] 王世清, 刘武红. 中、晚期乳腺癌术前表阿霉素介入治疗的临床观察 [J]. *中国癌症杂志*, 2000, 10(6): 574-574.
- [4] TSUJI K, WANG Y H, TAKANASHI M, et al. Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia [J]. *Hematol Rep*, 2012, 4(3): e18.
- [5] LAINEY E, SEBERT M, THEPOT S, et al. Erlotinib antagonizes ABC transporters in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle*, 2012, 11(21): 4079-4092.
- [6] LE CALVEZ-KELM F, OLIVER J, DAMIOLA F, et al. RAD51 and breast cancer susceptibility: no evidence for rare variant association in the Breast Cancer Family Registry study [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52374.
- [7] LEE KRAUS W, HOTTIGER M O. PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(6): 1109-1123.
- [8] SUN Y, CAMPISI J, HIGANO C, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B [J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1359-1368.
- [9] DAEMEN A, WOLF D M, KORKOLA J E, et al. Cross-platform pathway-based analysis identifies markers of response to the PARP inhibitor olaparib [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 135(2): 505-517.
- [10] HILLER D J, CHU Q D. Current Status of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors as Novel Therapeutic Agents for Triple-Negative Breast Cancer [J]. *Int J Breast Cancer*, 2012, 2012: 829315.
- [11] MIDORIKAWA R, TAKEI Y, HIROKAWA N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity [J]. *Cell*, 2006, 125(2): 371-383.
- [12] SAMEJIMA K, SAMEJIMA I, VAGNARELLI P, et al. Mitotic chromosomes are compacted laterally by KIF4 and condensin and axially by topoisomerase II α [J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(5): 755-770.
- [13] WU G, CHEN P L. Structural requirements of chromokinesin Kif4A for its proper function in mitosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(3): 454-458.
- [14] HU C K, COUGHLIN M, FIELD C M, et al. KIF4 regulates midzone length during cytokinesis [J]. *Curr Biol*, 2011, 21(10): 815-824.
- [15] WU G, ZHOU L, KHIDR L, et al. A novel role of the chromokinesin Kif4A in DNA damage response [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(13): 2013-2020.
- [16] HUAMBACHANO O, HERRERA F, RANCOURT A, et al. Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7149-7160.
- [17] LANGELIER M F, PLANCK J L, ROY S, et al. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(12): 10690-10701.
- [18] ELSER M, BORSIG L, HASSA P O, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(2): 282-290.
- [19] KONG X, STEPHENS J, BALL A R Jr, et al. Condensin I recruitment to base damage-enriched DNA lesions is modulated by PARP1 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23548.

(收稿日期: 2013-08-05 修回日期: 2013-09-30)