

人胃癌耐药细胞株中锌指蛋白139和多药耐药基因表达的关系及意义

李勇 赵群 檀碧波 范立侨 刘庆伟 焦志凯 赵雪峰 郝英杰

河北医科大学第四医院外三科, 河北 石家庄 050011

[摘要] **背景与目的:** 研究发现锌指蛋白139(ZNF139)在胃癌中表达异常, 但ZNF139与胃癌的多药耐药性(multidrugresistance, MDR)关系尚不明确。本研究检测了人胃癌细胞株SGC7901和耐药细胞株SGC7901/ADR中ZNF139和MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 的mRNA和蛋白表达情况, 并对其表达关系和意义进行分析。**方法:** 体外培养SGC7901、SGC7901/ADR, 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测两种细胞ZNF139和MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π mRNA表达情况, 采用蛋白质印迹法(Western blot)法检测各基因蛋白表达变化情况。合成针对ZNF139的小干扰RNA(siRNA-ZNF139)重组质粒并转染SGC7901/ADR, 检测转染前后SGC7901/ADR中MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 表达的变化。**结果:** SGC7901和SGC7901/ADR两种细胞中均有ZNF139、MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π mRNA和蛋白阳性表达, SGC7901/ADR细胞中ZNF139、MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π mRNA和蛋白表达均明显高于SGC7901细胞($P<0.05$)。转染siRNA-ZNF139后SGC7901/ADR细胞中ZNF139表达明显受到抑制, MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 表达也明显降低($P<0.05$)。**结论:** ZNF139通过上调MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 基因表达而参与胃癌多药耐药形成。

[关键词] 锌指蛋白139; 胃癌; 多药耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.07.003

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)07-0493-06

Relationship between ZNF139 and multidrug resistance(MDR) related genes in SGC7901 and SGC7901/ADR cell lines LI Yong, ZHAO Qun, TAN Bi-bo, FAN Li-qiao, LIU Qing-wei, JIAO Zhi-kai, ZHAO Xue-feng, HAO Ying-jie (Department of Gastrointestinal Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050011, China)

Correspondence to: LI Yong E-mail: li_yong_hbth@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** It was reported that zinc finger protein 139 (ZNF139) was expressed aberrantly in gastric cancer. But the relationship between ZNF139 and multidrug resistance (MDR) of gastric cancer is still not clear. The purpose of this research was to investigate the expressions and significance of ZNF139, MRP-1, MDR1/P-gp, GST- π in human gastric carcinoma cell lines SGC7901 and SGC7901/ADR. **Methods:** The expressions of ZNF139, MRP-1, MDR1/P-gp, GST- π were determined with RT-PCR and Western blot in SGC7901 and SGC7901/ADR cell lines. Then siRNA recombinant plasmid of targeting ZNF139 gene was constructed and imported into gastric cancer cell line SGC7901/ADR, and the expressions of MRP-1, MDR1/P-gp, GST- π were tested simultaneously. **Results:** The expressions of ZNF139, MRP-1, MDR1/P-gp, GST- π were higher in SGC7901/ADR than in SGC7901($P<0.05$). ZNF139 was inhibited obviously after siRNA-ZNF139 was transfected into SGC7901/ADR, and expression of MRP-1, MDR1/P-gp, GST- π decreased($P<0.05$). **Conclusion:** ZNF139 may be involved in multidrug resistance (MDR) of gastric cancer by up-regulating MRP-1, MDR1/P-gp and GST- π .

[Key words] Zinc finger protein 139; Gastric cancer; Multidrug resistance

化疗在胃癌的综合治疗中占有重要地位, 然而肿瘤多药耐药性(multidrugresistance, MDR)严重影响化疗的效果。迄今关于胃癌MDR的机制研究尚未取得突破, 已发现多种基因及调控机制在其中发挥作用^[1-3]。最近研究表明, 转录因子锌指蛋白(ZNF)家族在多种肿瘤的发生、发展及MDR中发挥了重要作用^[4-5]。我们前期蛋白质组学研究鉴定出的与胃癌关系密切的ZNF139即为锌指蛋白超家族成员^[6], 而关于ZNF139是否与胃癌MDR有关鲜见报道。MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 是目前认为导致胃癌MDR作用比较确切的基因。故本研究检测了耐药性不同的胃癌细胞株ZNF139、MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 的表达, 并合成了针对ZNF139的小干扰RNA重组质粒siRNA-ZNF139, 以该质粒转染高表达ZNF139的胃癌细胞株, 进一步检测了转染前后多药耐药基因的表达变化, 为探讨ZNF139参与胃癌MDR的调节机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞株SGC7901购自中国科学院上海细胞研究所, 胃癌耐多柔比星(ADR)细胞SGC7901/ADR由第四军医大学消化病研究所樊代明院士惠赠, 本研究室保种。RPMI-1640培养基购自美国GIBCO公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, TRIzol购自美国Invitrogen公司, 逆转录试剂盒购自美国Promega公司, PCR引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司设计合成, 全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物公司, 蛋白定量BCA试剂盒购自上海捷瑞生物工程公司, 兔抗人ZNF139单克隆抗体购自美国Sigma公司, 兔抗人多克隆抗体MRP-1、P-gp、GST- π 购自美国Santa Cruz公司, siRNA-ZNF139质粒由上海吉玛制药技术有限公司合成, 质粒中提试剂盒EndoFree Plasmid Maxi Kit购自北京天根公司, X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent购自美国Sigma公司。

1.2 细胞培养

SGC7901用10%胎牛血清的RPMI-1640培养基进行培养, SGC7901/ADR细胞在含有0.4 mg/L ADR中培养以维持其耐药表型。取对数生长期细胞进行实验。

1.3 靶向siRNA-ZNF139干扰质粒的构建

由上海吉玛技术有限公司合成针对ZNF139的siRNA。siRNA-ZNF139模板序列为: 5'-GATCCACCTCGGAAGATTCAGCATTTCAGAGAATGCTGAATCTTCCGAGGTTTA-3' (正义链), 5'-AGCTTAAACCTCGGAAGATTCAGCATTCTCTTGAAATGCTGAATCTTCGAGGTG-3' (反义链); 同时设计合成siRNA-ZNF139无效对照序列: 5'-GATCCGACGAGTTGACTGCGATTGTTCAAGAGACAATCCGAGTCAACTCGTCAGA-3' (正义链), 5'-AGCTTCTGACGAGTTGACTGCGATTGTCTCTTGACAATCGCAGTCAACTCGTCG-3' (反义链)。各重组质粒经扩增及纯化后用于后续实验。

1.4 细胞转染

SGC7901/ADR细胞分为空白对照组(0.9%NaCl溶液组)、阴性对照组(含无效对照序列的质粒)和阳性质粒组, 阴性对照组和阳性质粒组转染浓度均为0.8 μ g/mL。用X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent转染试剂, 转染细胞融合度为70%~90%的胃癌细胞后37 $^{\circ}$ C培养48 h。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测各基因mRNA表达

取 2×10^7 个细胞进行总RNA提取。分别收集SGC7901和SGC 7901/ADR, TRIzol法提取组织RNA, 按照试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA, 进行RT-PCR检测ZNF139、MRP-1、MDR1、GST- π 各基因mRNA表达。ZNF139基因的上游引物为: 5'-GCACAGGAGAAGGATGGTATCG-3', 下游引物5'-TGTTTGAAGTGGGACTGGGTG-3'; MRP1基因的上游引物为: 5'-ATACCTGCTGTTTCGGATTT-3', 下游引物

5'-CGCATAGTGGATGGCTTT-3';
MDR1: 5'-TTGTTTGCCACCACGATAG-3'
和5'-ACTGCTTCGCTTTCTGTGTC-3';
GST- π : 5'-AGTCCAATACCATCCTGCGTC-3'
和5'-CACTGTTTCCCGTTGCCATT-3';
GAPDH的上游引物为: 5'-AGAAGGCTGG
GGCTCATTG-3', 下游引物5'-AGGGGC
CATCCACAGTCTTC-3'。RT-PCR按试剂盒说
明书配制20 μ L反应体系: 上游引物1 μ L,
下游引物1 μ L, PCR蓝色体系10 μ L, 稀释
10倍的cDNA样品2 μ L, 去离子水6 μ L。反
应条件为: 94 $^{\circ}$ C 10 min预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s,
(ZNF139, 55 $^{\circ}$ C; MDR1、MRP1 57 $^{\circ}$ C; GAPDH
58 $^{\circ}$ C)退火60 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共30个循环, 72 $^{\circ}$ C
5 min延伸。扩增产物以GAPDH基因作内参照,
用凝胶成像系统观察并照相。使用Syngene凝胶
分析系统软件扫描各条带灰度值, 以各自指数
(灰度值和内参照灰度值的比值)进行mRNA表达
水平的半定量分析。

1.6 蛋白质印迹法(Western blot)检测各基因蛋白表达情况

收集 2×10^7 个细胞提取蛋白, BCA法测定
蛋白浓度, 每个样品上样量50 μ g。经SDS-
PAGE电泳分离后, 切胶、转PVDF膜。20 mL
封闭液(含5%脱脂奶粉的PBST)室温摇床温育
1.5 h, 弃封闭液, 加入兔抗人ZNF139单克隆抗
体(1:400一抗稀释液稀释), 鼠抗人MRP-1、

P-gp、GST- π 单克隆抗体(1:200一抗稀释液稀
释), 4 $^{\circ}$ C温育过夜后洗膜, 加入羊抗兔/鼠二抗
(1:3000二抗稀释液稀释)室温摇床温育1.5 h。
洗膜后然后红外荧光扫描成像系统扫描, 以
GAPDH作为内参计算各蛋白质表达的相对表达
强度。

1.7 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件分析实验数据。数
据均用 $\bar{x} \pm s$, 计量资料采用两独立样本 t 检验,
 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SGC7901和SGC7901/ADR细胞中 ZNF139和MRP-1、MDR1、GST- π mRNA的 表达

人胃癌细胞SGC7901和耐药细胞SGC7901/
ADR中ZNF139、MRP-1、MDR1、GST- π
mRNA均有表达, 在耐药细胞SGC7901/ADR中
ZNF139、MRP-1、MDR1、GST- π mRNA表达
均明显高于人胃癌细胞SGC7901($P < 0.05$, 图1)。

2.2 SGC7901和SGC7901/ADR细胞中 ZNF139和MRP1蛋白表达

SGC7901和SGC7901/ADR中ZNF139、
MRP-1、P-gp、GST- π 蛋白均有表达, 但在
SGC7901/ADR细胞中ZNF139、MRP-1、P-gp、
GST- π 蛋白表达均明显高于在SGC7901细胞中
的表达($P < 0.05$, 图2)。

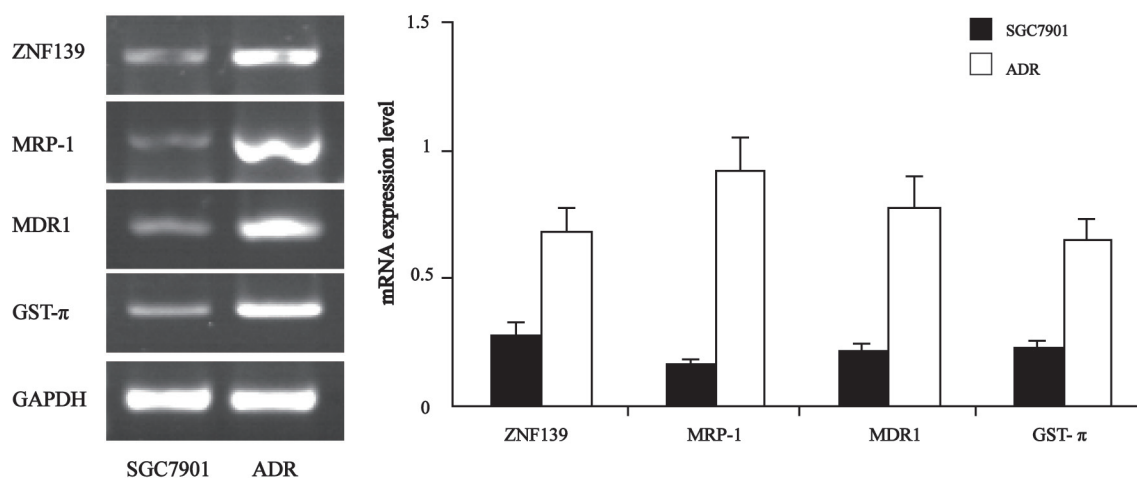


图1 胃癌细胞株SGC7901和耐药细胞株SGC7901/ADR中ZNF139、MRP-1、MDR1、GST- π mRNA的表达

Fig. 1 Expression of ZNF139, MRP-1, MDR1, GST- π mRNA in gastric cancer cell line SGC7901 and SGC7901/ADR

*: Compared with SGC7901, $P < 0.05$.

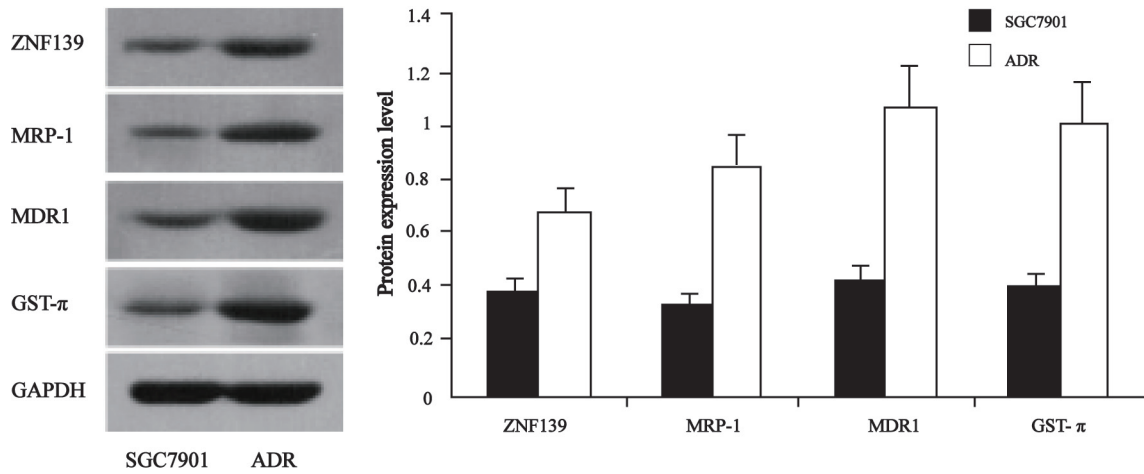


图2 胃癌细胞株SGC7901和耐药细胞株SGC7901/ADR中ZNF139、MRP-1、MDR1、GST-π蛋白的表达

Fig. 2 Expression of ZNF139, MRP-1, MDR1, GST-π protein in gastric cancer cell line SGC7901 and SGC7901/ADR

*: Compared with SGC7901, $P < 0.05$.

2.3 siRNA-ZNF139转染SGC7901/ADR细胞后细胞中ZNF139、MRP-1、MDR1、GST-π mRNA表达情况

RT-PCR结果显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, 阳性质粒组siRNA-ZNF139转染SGC7901/ADR细胞后细胞中ZNF139 mRNA明显降低, 同时多药耐药基因MRP-1、MDR1、GST-π mRNA也均明显降低($P < 0.05$, 图3)。

2.4 siRNA-ZNF139转染SGC7901/ADR细胞后细胞中ZNF139、MRP-1、MDR1、GST-π蛋白质表达情况

Western blot结果显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, 阳性质粒组siRNA-ZNF139转染SGC7901/ADR细胞后细胞中ZNF139蛋白水平明显降低, 同时多药耐药基因MRP-1、MDR1、GST-π的蛋白也均明显降低($P < 0.05$, 图4)。

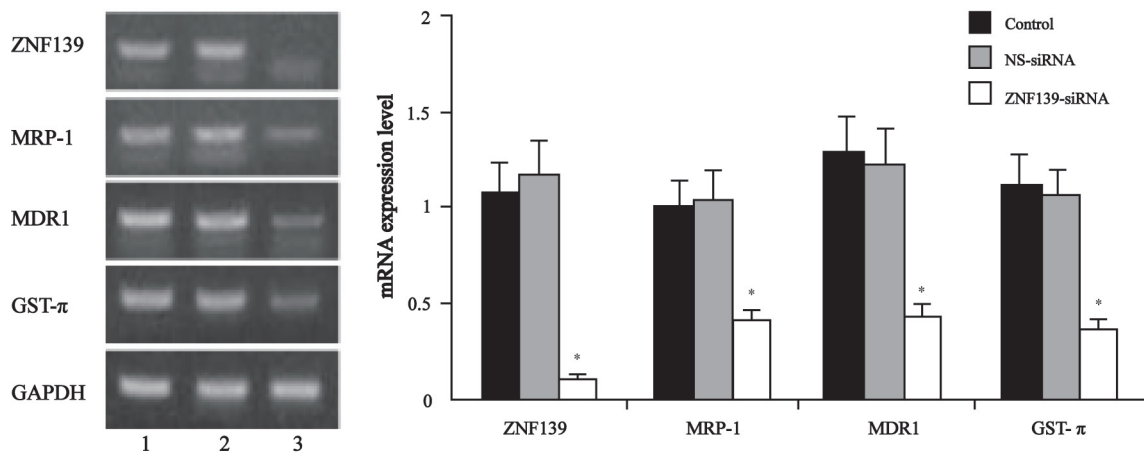


图3 siRNA-ZNF139转染胃癌耐药细胞株SGC7901/ADR后ZNF139、MRP-1、MDR1、GST-π mRNA的表达

Fig. 3 Expression of ZNF139, MRP-1, MDR1, GST-π mRNA in gastric cancer cell line SGC7901/ADR after transfected with siRNA-ZNF139

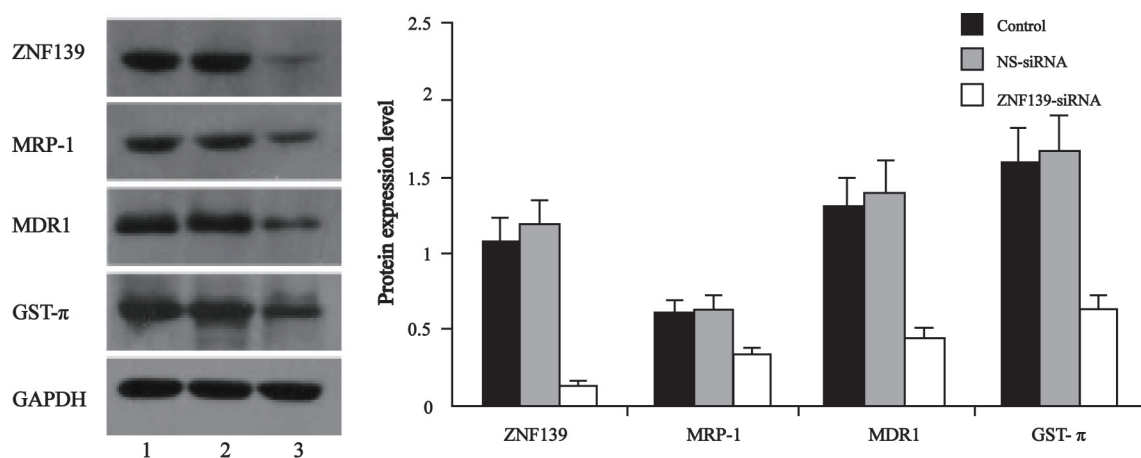


图4 siRNA-ZNF139转染胃癌耐药细胞株SGC7901/ADR后ZNF139、MRP-1、MDR1、GST- π 蛋白质的表达

Fig. 4 Expression of ZNF139, MRP-1, MDR1, GST- π proteins in gastric cancer cell line SGC7901/ADR after transfected with siRNA-ZNF139

3 讨 论

化疗是治疗胃癌的主要手段之一，但肿瘤细胞产生的MDR常导致化疗失败，造成肿瘤转移复发。关于胃癌MDR的机制，目前发现有经典MDR途径、凋亡抑制途径等在其中发挥作用，许多MDR相关基因参与其中，但机制还不明确。本课题组前期研究中，应用蛋白质组学技术发现ZNF139与胃癌关系密切^[6]。ZNF作为具有转录调控功能的一类蛋白质，含有特殊锌指结构域，与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭及MDR均有密切的关系^[7-9]。为了解ZNF139与胃癌MDR的关系，本研究检测了胃癌细胞株SGC7901和稳定的耐多柔比星细胞株SGC7901/ADR中ZNF139和MDR基因MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 的表达。本研究所使用的SGC7901/ADR由第四军医大学樊代明院士实验室培养建株，与亲本细胞相比，具有更强的MDR特性并能够稳定传代。结果显示，耐药细胞株中ZNF139和MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 的mRNA和蛋白质表达均高于亲本胃癌细胞株，说明SGC7901/ADR的强耐药性与MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 表达增强有关，在此过程中ZNF139表达也明显增高，提示ZNF139可能在胃癌MDR表型变化的过程中发挥了作用。

为进一步分析ZNF139参与胃癌细胞MDR

的机制，本研究应用RNA干扰技术合成了针对ZNF139的小干扰RNA重组质粒，并将该质粒转染进入高表达ZNF139的胃癌耐药细胞株SGC7901/ADR。结果发现，转染阴性质粒和空白对照的SGC7901/ADR中ZNF139并无明显变化；而转染阳性siRNA-ZNF139质粒的SGC7901/ADR中ZNF139明显降低。说明本研究合成的siRNA成功抑制了ZNF139表达，可作为直接结果对ZNF139的分子调控机制进行分析。对SGC7901/ADR中多药耐药基因的检测发现，随着ZNF139受到抑制，细胞中MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 表达明显降低。这一结果从反面提示ZNF139可通过促进MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 等多药耐药基因的表达参与胃癌细胞耐药性的形成。但有关ZNF139调节这些基因的具体机制还有待进一步研究。

总之，本研究初步证实ZNF139在胃癌MDR中发挥了重要的调控作用，该基因可上调MRP-1、MDR1/P-gp、GST- π 等基因的表达而参与胃癌多药耐药。但本研究的内容处于初级阶段，要了解ZNF139的准确功能，还需要进一步针对ZNF139的分子机制进行研究。

[参 考 文 献]

- [1] LI Y, TAN B B, FAN L Q, et al. Heterogeneity of COX-2 and multidrug resistance between primary tumors and regional lymph node metastases of gastric cancer [J]. Tumori, 2012,

- 98(4): 516-522.
- [2] SUN F, LU X, LI H, et al. Special AT-rich sequence binding protein 1 regulates the multidrug resistance and invasion of human gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(1): 156-162.
- [3] HUANG S, CHEN M, SHEN Y, et al. Inhibition of activated Stat3 reverses drug resistance to chemotherapeutic agents in gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(2): 198-205.
- [4] JIANG H, ZHANG L, LIU J, et al. Knockdown of zinc finger protein X-linked inhibits prostate cancer cell proliferation and induces apoptosis by activating caspase-3 and caspase-9 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(10): 684-689.
- [5] RAHMAN M T, NAKAYAMA K, RAHMAN M, et al. Gene amplification of ZNF217 located at chr20q13.2 is associated with lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(8): 3091-3095.
- [6] 李勇, 檀碧波, 范立桥, 等. 应用比较蛋白质组学方法筛选鉴定胃癌细胞分化相关蛋白质 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(3): 179-184.
- [7] MARCHINI S, POYNOR E, BARAKAT R R, et al. The zinc finger gene ZIC2 has features of an oncogene and its overexpression correlates strongly with the clinical course of epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(16): 4313-4324.
- [8] CHENG Y, LIANG P, GENG H, et al. A novel 19q13 nucleolar zinc finger protein suppresses tumor cell growth through inhibiting ribosome biogenesis and inducing apoptosis but is frequently silenced in multiple carcinomas [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(7): 925-936.
- [9] MEREDITH M M, LIU K, DARRASSE-JEZE G, et al. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btd4) defines the classical dendritic cell lineage [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(6): 1153-1165.
- (收稿日期: 2013-01-18 修回日期: 2013-05-28)

《中国癌症杂志》举办继续教育函授班通知

经本刊编委会讨论决定, 本刊从2013年下半年起举办2014年度继续医学教育函授班。具体方法如下:

一、2013年第8期起开设2014年度函授继续医学教育专栏, 本年度的主要内容包括: 胰腺癌、食管癌、胃癌的病理诊断、放射治疗及内外科治疗等。每期刊登1讲, 共12讲, 2014年第8期刊登考试试题, 第9期刊登正确答案, 要求学员认真阅读讲座后答题, 并将答案寄至编辑部(复印无效), 考卷经专人统一审阅, 合格者授予Ⅱ类继续教育学分10分, 学分证书由复旦大学附属肿瘤医院颁发。

二、参加对象: 所有正在从事医学专业技术工作的卫生技术人员。预参加者请写好本人姓名、年龄、性别、职称、职务、学历、选派单位名称(地址及邮政编码)、所在科室、联系电话等寄往本编辑部(E-mail: zgaz@chinajournal.net.cn; zgazz@163.com), 同时通过邮局汇款(单位名称: 《中国癌症杂志》编辑部; 地址: 上海市徐汇区东安路270号)的方式支付函授教育费, 请在汇款备注中注明“2014年度函授继续教育”。编辑部收到学员报名和函授教育费后编号登记注册, 随即寄出注册费发票, 并按时寄上每期刊物。即日起开始报名。

三、学员每人收费200元, 赠送12期杂志。编辑部依据学员报名登记注册编号、交费记录和考试成绩于2014年10月30日以前寄发学分证书。

四、为保证函授教育质量, 编委会邀请有关专家进行出题、阅卷工作, 编辑部设专人负责。咨询电话: 021-64188274; 传真: 021-64043766; 邮编: 200032; 联系人: 王露。欢迎广大医务人员踊跃参加。