*Gankyrin*基因沉默对人卵巢癌SKOV3/CDDP细胞顺铂耐药性的逆转作用和机制

王倩　程堃

天津市水阁医院妇产科，天津 300120

［摘要］ **背景与目的：**卵巢癌是常见的妇科肿瘤，抗肿瘤药耐药性的产生是卵巢癌治疗失败的主要原因之一，*Gankyrin*基因被认为与肿瘤耐药性密切相关，本文探讨了*Gankyrin*基因沉默对卵巢癌耐顺铂细胞系SKOV3/DDP顺铂耐药性的逆转作用及机制。**方法：**应用real-time PCR技术考察Gankyrin在SKOV3和SKOV3/DDP细胞中的表达，应用MTS法检测Gankyrin对SKOV3/DDP细胞顺铂耐受性的影响，应用流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡和细胞内罗丹明-123(Rhodamine-123，Rh-123)含量的变化，Western blot和real-time PCR技术检测肿瘤细胞耐药相关蛋白MDR1、Caspase-3/8、Survivin和Bcl-2蛋白表达，Western blot法检测p53、NF-κB和PTEN蛋白表达和AKT磷酸化水平。**结果：**Gankyrin在SKOV3/DDP细胞中表达升高，沉默*Gankyrin*基因后可增加SKOV3/DDP细胞对顺铂的敏感性。基因沉默前后耐药逆转倍数(resistant factor，RF)为1.81和2.45，肿瘤细胞中Rh-123含量提高了1.73和2.42倍，细胞凋亡率是对照组的2.23倍和4.23倍，耐药相关蛋白MDR1、Survivin和Bcl-2蛋白水平显著下降，MDR1 mRNA表达是对照组的62.8%和21.6%，Survivin mRNA表达是对照组的24.5%和10.3%，Bcl-2 mRNA表达是对照组的47.5%和18.4%，Caspase-3/8、p53和PTEN表达水平上升，AKT磷酸化和NF-κB水平下降。**结论：**沉默*Gankyrin*基因可逆转SKOV3/DDP对顺铂的耐药性，可能与抑制药物外排，促进细胞凋亡有关，PTEN/AKT/NF-κB/p53信号通路可能是其中心环节。

［关键词］ *Gankyrin*基因；卵巢癌；顺铂耐药

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.01.006

中图分类号：R737.31　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-3639(2014)01-0035-06

The effects and mechanisms of *Gankyrin* silencing on reversing the cisplatin resistance of human ovarian cancer SKOV3/DDP cell line

WANG Qian, CHENG Kun (Department of Gynaecology and Obstetrics, Tianjin Shui Ge Hospital, Tianjin 300120, China)

Correspondence to: WANG Qian E-mail: wangqian_sgh@126.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** Ovarian cancer is the common gynecological cancer, and the drug resistance of anti-tumor drug was one of major reasons for therapy failure, some studies considered that there is a closed relationship between *Gankyrin* and drug resistance. In this study, we investigated the effects and mechanisms of *Gankyrin* silencing on reversing the cisplatin resistance of ovarian cancer drug-resistant SKOV3/DDP cell line. **Methods:** The expression of Gankyrin in SKOV3 and SKOV3/DDP cells was measured by real-time PCR assay, MTS assay was employed to determine the effect of Gankyrin on SKOV3/DDP sensitivity to cisplatin, apoptosis rate and intracellular concentration of rhodamine-123 (Rh-123) were determined by flow cytometry, the expression of multi-drugs resistant protein MDR1, Caspase-3/8, Survivin and Bcl-2 were determined by Western blot and real-time PCR. The phosphorylation of AKT and expression of p53, NF-κB and PTEN were analyzed by Western blot assay. **Results:** The expression of Gankyrin was increased in SKOV3/DDP cells, *Gankyrin* silencing was able to increase the cisplatin sensitivity of SKOV3/DDP. Before and after gene silencing, the reverse folds (RF) to cisplatin were 1.81 and 2.45, respectively, the intracellular levels of Rh-123 were 1.73 and 2.42 fold, the apoptosis rates were 2.23 and 4.23 fold,

通信作者：王倩　E-mail:wangqian_sgh@126.com

the expressions of MDR1, Survivin and Bcl-2 were downregulated, the mRNA expressions of MDR1 were 62.8% and 21.6%, the mRNA expressions of Survivin were 24.5% and 10.3%, the mRNA expressions of Bcl-2 were 47.5% and 18.4%, the levels of Caspase-3/8, p53 and PTEN were elevated, phosphorylation of AKT and expression of NF-kB were downregulated compared with control group. **Conclusion:** *Gankyrin* silencing was able to reverse the cisplatin resistance of SKOV3/DDP cells by inhibiting the drug efflux and promoting cell apoptosis, the PTEN/AKT/NF-κB/p53 may be the key pathway.

［**Key words**］ *Gankyrin* gene; Ovarian cancer; Cisplatin resistant

卵巢癌是世界范围内最常见的妇科恶性肿瘤之一[1]，由于早期症状不明显，大多数卵巢癌患者在确诊时已到了晚期。近年来，尽管卵巢癌的治疗现状已经得到显著的改善，但肿瘤细胞对药物的耐受性问题仍亟待解决。顺铂可通过抑制DNA的合成和转录阻止肿瘤细胞生长，但是在临床应用中，卵巢癌细胞往往出现对顺铂的耐药性[2]。因此，克服肿瘤细胞耐药，探讨其机制，寻求克服耐药性的方法，对提高临床患者的治愈率有十分重要的意义。

*Gankyrin*基因是近年来新发现的原癌基因，与肿瘤的发生、发展密切相关，可调控肿瘤细胞对药物治疗的应答，在癌症中的作用备受关注。研究发现Gankyrin蛋白在胆管癌和肝细胞癌等多种肿瘤中的表达上调，沉默其表达可抑制细胞的迁移和侵袭[3]。然而，Gankyrin在卵巢癌耐药性中的作用尚无太多的研究。

肿瘤细胞产生耐药的机制包括减少药物的吸收，通过结合盒(ATP-binding cassette，ABC)转运蛋白增加药物的外排与凋亡抑制途径，减少肿瘤细胞内药物浓度并抑制肿瘤凋亡[4]。在本研究中，我们发现沉默Gankyrin蛋白的表达可以逆转SKOV3/DDP的耐药性，抑制该细胞的生长并促进其凋亡。我们认为Gankyrin在卵巢癌逆转顺铂耐药中发挥重要作用，其机制可能与调控多种耐药和凋亡相关蛋白等有关。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

人卵巢癌SKOV3和SKOV3/DDP细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；细胞培养基购自Gibco公司；Gankyrin shRNA质粒和单克隆抗体购自Santa Cruz公司；TaqMan MicroRNA assay kit购自Applied Biosystems公司；Lipofectamine™ 2000购自Gibco公司；细胞凋亡流式检测试剂盒购自BD公司；Western blot抗体购自SantaCruz公司；ECL免疫印迹底物试剂盒购自Millipore公司；顺铂购自Sigma公司。

1.2 细胞培养与*Gankyrin*基因沉默

SKOV3和SKOV3/DDP细胞培养于37 ℃、CO_2体积分数为5%、饱和湿度的培养箱中，培养基为含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基，0.25%胰酶-EDTA消化传代，所有试验均采用对数生长期细胞。将SKOV3/DDP细胞暴露于底剂量(1/10 IC_{50}值)的顺铂中维持细胞耐药性。

SKOV3/DDP细胞培养于10 cm培养皿中，转染Gankyrin shRNA质粒或者阴性对照质粒进行转染，继续培养72 h后，300 ng/mL G418筛选3周后，经单克隆培养，构建*Gankyrin*基因沉默SKOV3/DDP细胞系，定量检测Gankyrin蛋白表达水平，考察沉默效果，同时检测SKOV3和SKOV3/DDP母细胞中Gankyrin表达，考察Gankyrin在SKOV3和SKOV3/DDP细胞表达量的不同。

1.3 MTS法检测*Gankyrin*基因沉默表达对SKOV3/DDP细胞耐药性的逆转作用

将3×10^3个细胞接种至96孔板中培养过夜，分别加入0、1、2、5、10、20、50和100 μmol/L顺铂，继续培养72 h，更换新鲜培养基，加入100 μL MTS (0.5 mg/mL)，继续培养4 h，应用酶标仪测定吸光度值(A_{490})。抑制率=$(1-A_{Gankyrin基因沉默组}/A_{对照组})\times100\%$，计算$IC_{50}$值。耐药逆转倍数(resistant factor，RF)=$IC_{50\ Gankyrin沉默组}/IC_{50\ 对照组}$。

1.4 流式细胞术检测*Gankyrin*基因沉默表达对SKOV3/DDP细胞内罗丹明-123含量和细胞凋亡的影响

将3×10^{5}肿瘤细胞接种至6孔板中，培养过夜，加入20 μL 10 μmol/L的罗丹明-123，培养2 h后，消化、离心、收集细胞，应用流式细胞仪在490 nm激发波长检测细胞中罗丹明-123的平均荧光强度，考察*Gankyrin*基因沉默表达对SKOV3/DDP细胞内罗丹明-123含量的影响。

将3×10^{5}肿瘤细胞接种至6孔板中，培养过夜，经10 μmol/L顺铂作用24 h后，收集细胞采用PI/Annexin V-FITC双染法，均根据试剂盒说明书操作用流式细胞仪检测细胞中PI和FITC的荧光强度，考察细胞凋亡率。

1.5 Western blot法检测SKOV3/DDP细胞中耐药相关蛋白的表达

将3×10^{5}个肿瘤细胞接种至6孔板中，培养过夜，消化、离心、收集细胞，应用细胞裂解液裂解细胞，离心收集总蛋白。取120 μg细胞总蛋白，经过12%SDS-PAGE分离蛋白后，将蛋白转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride，PVDF)膜，脱脂牛奶4 ℃封闭1 h，加入单克隆抗体(MDR1、Caspase-3/8、Survivin、Bcl-2、p53、NF-κB、PTEN、p-AKT和β-actin)4 ℃过夜温育，洗涤3次去除一抗，应用羊抗兔-HRP标记二抗室温温育1 h，洗涤3次后，应用ECL显色试剂盒显示Western blot条带。

1.6 RT-PCR检测SKOV3/DDP肿瘤细胞中多种蛋白基因的mRNA水平

将3×10^{5}个肿瘤细胞接种至6孔板中，培养过夜，应用TRIzol法提取各组总RNA，逆转录得到cDNA。*Gankyrin*上游引物序列：5'-TCCTCTTCATATTGCGGCTT-3'，下游引物序列：5'-CTTGAGCACCTTTTCCCAGAA-3'；*MDR1*上游引物序列：5'-CAGGAGATAGGCTGGTTTGATGGT-3'，下游引物序列：5'-TTAGCTTCCAACCACGTGTAAATC-3'；*Survivin*上游引物序列：5′-CTGAGAACGAGCCAGACTTG-3′，下游引物序列：5′-CACTTTCTTCGCAGTTTCCT-3′；*Bcl-2*上游引物序列：5′-TGAACCGGCATCTGCACAC-3′，下游引物序列：5′-CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG-3′；*GAPDH*上游引物序列：5′-AGCAGTCCCGTACACTGGCAAAC-3′，下游引物序列：5′-TCTGTGGTGATGTAAATGTCCTCT-3′；94 ℃变性3 min后，按下述条件扩增40个循环：95 ℃ 15 s，65 ℃ 30 s，72 ℃ 95 s，75 ℃延伸10 min。

1.7 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 构建*Gankyrin*基因沉默SKOV3/DDP细胞系

SKOV3/DDP细胞系Gankyrin蛋白表达显著高于SKOV3细胞系，SKOV3/DDP细胞经Gankyrin shRNA转染后，其细胞内Gankyrin的蛋白表达相对未转染的SKOV3/DDP显著降低，而对照质粒转染的细胞，其Gankyrin蛋白表达与对照细胞大致一致。与SKOV3细胞相比，SKOV3/DDP细胞Gankyrin mRNA表达上调345.6%，SKOV3/DDP细胞空载体转染组Gankyrin mRNA表达上调339.3%。与SKOV3/DDP未处理细胞组相比，SKOV3/DDP细胞*Gankyrin*基因沉默后，其mRNA表达下调67.2%和33.4%，结果说明经过shRNA转染后，*Gankyrin*基因沉默SKOV3/DDP细胞系构建成功。SKOV3/DDP未处理细胞作为对照组，转染空载体质粒SKOV3/DDP细胞作为空载体组，根据*Gankyrin*基因沉默水平不同，分为shRNA 1组和shRNA 2组，shRNA 2组Gankyrin表达低于shRNA 1组(图1)。

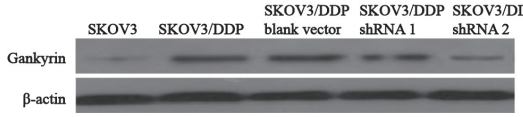

图 1 Gankyrin在人卵巢癌细胞系中的表达

Fig. 1 The expression of Gankyrin in human ovarian cancer cell lines

Western blot assay results showed that there was an increased protein expression of Gankyrin in SKOV3/DDP cells compared with SKOV3 cells, meanwhile, there was a decreased protein expression of Gankyrin in *Gankyrin* gene silencing SKOV3/DDP cells compared with untreated SKOV3/DDP and SKOV3/DDP blank vector transfection cells. β-actin was as internal control.

2.2 MTS试验结果

MTS试验结果显示，Gankyrin沉默的细胞对顺铂的敏感性与母细胞SKOV3/DDP相比显著上升，对照组IC_{50}为44.6 μmol/L，shRNA 1组和shRNA 2组IC_{50}分别为24.7 μmol/L和18.2 μmol/L，RF分别为1.81和2.45。流式细胞术结果显示*Gankyrin*沉默后，细胞吸收荧光染料Rh-123的能力显著提高，分别为对照组的1.73倍和2.42倍，进一步研究发现，细胞凋亡率显著上升，分别为对照组的2.23倍和4.23倍(图2)。

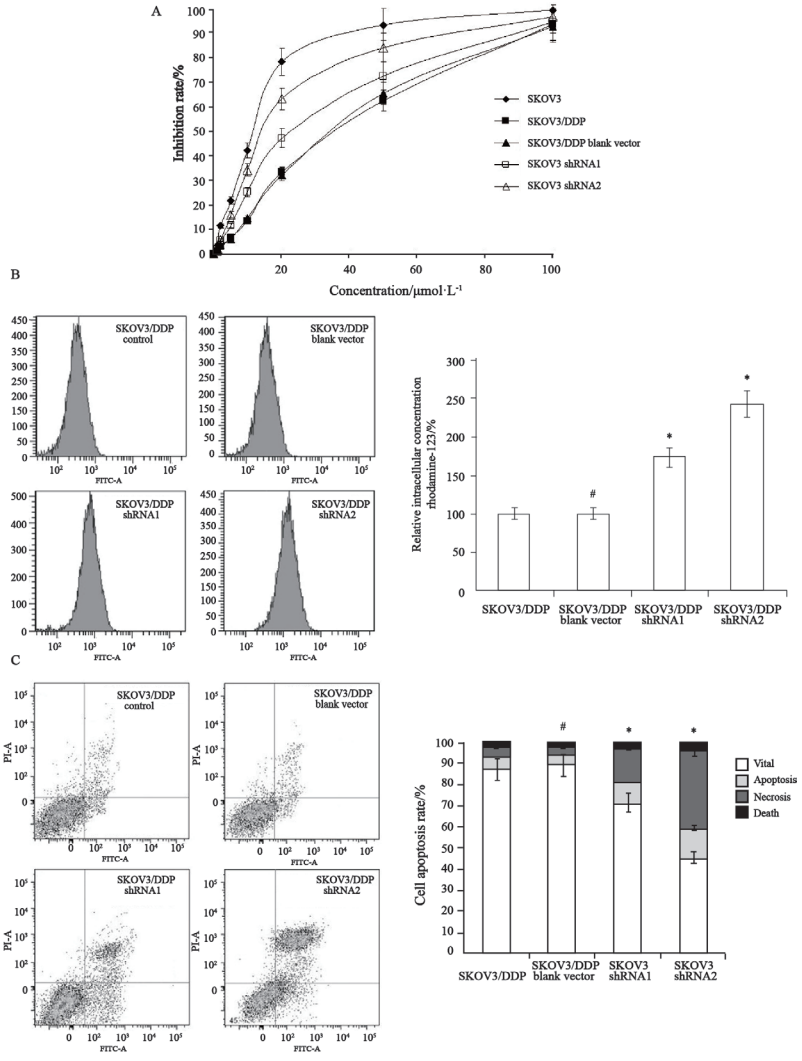

图 2 Gankyrin对人卵巢癌细胞系顺铂敏感性、rhodamine–123含量和凋亡的影响

Fig. 2 The effect of Gankyrin on cisplatin sensitivity, intracellular concentration of rhodamine-123 and apoptosis of human ovarian cancer cell lines

A: MTS assay results showed that there was an increased cisplatin sensitivity in *Gankyrin* silencing SKOV3/DDP cells compared with untreated SKOV3/DDP and SKOV3/DDP blank vector transfection cells. Bars indicated SD, n=10. B: Flow cytometry assay results showed that there was an increased intracellular concentration of rhodamine-123 in *Gankyrin* silencing SKOV3/DDP cells compared with untreated SKOV3/DDP and SKOV3/DDP blank vector transfection cells. Bars indicated SD, n=3; #: Compared to the SKOV3/DDP group, P>0.05; *: Compared to the SKOV3/DDP group, P<0.05. C: Flow cytometry assay results showed that there was an increased apoptosis rate in Gankyrin silencing SKOV3/DDP cells compared with untreated SKOV3/DDP and SKOV3/DDP blank vector transfection cells. Bars indicated SD, n=3; #: Compared to the SKOV3/DDP group, P>0.05; *: Compared to the SKOV3/DDP group, P<0.05.

2.3 *Gankyrin*沉默对耐药相关基因表达的调节作用

为了研究*Gankyrin*沉默逆转SKOV3/DDP耐药性，促进肿瘤细胞凋亡的机制，我们研究了多种相关蛋白的表达。结果显示，耐药蛋白MDR1和抗凋亡蛋白Survivin和Bcl-2的蛋白表达水平显著下调，同时*Gankyrin*沉默上调了Caspase-3/8的蛋白表达(图3)。Real-time PCR研究显示，*Gankyrin*沉默后MDR1 mRNA表达是对照组的62.8%和21.6%，Survivin mRNA表达是对照组的24.5%和10.3%，Bcl-2 mRNA表达是对照组的47.5%和18.4%，表明*Gankyrin*沉默对耐药相关基因表达的调节是通过转录水平实现的。

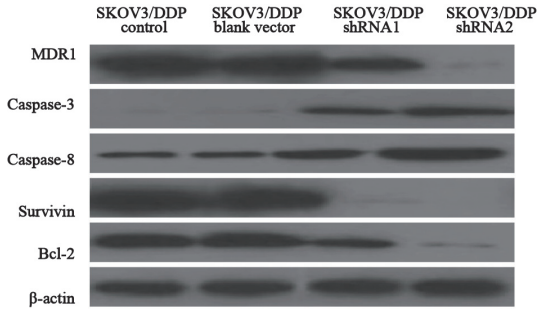

图 3 Gankyrin对人卵巢癌细胞系耐药相关基因蛋白表达的影响

Fig. 3 The effect of Gankyrin on the protein expression of drug-resistant related gene of human ovarian cancer cell lines

Western blot assay results showed that there was an increased protein expression of Caspase-3/8, meanwhile, there was a decreased protein expression of MDR1, Survivin and Bcl-2 in Gankyrin silencing SKOV3/DDP cells compared with untreated SKOV3/DDP and SKOV3/DDP blank vector transfection cells. β-actin was used as internal control.

2.4 *Gankyrin*沉默对耐药相关信号路径的调节作用

为了研究*Gankyrin*沉默逆转肿瘤细胞耐药性的机制，我们重点研究了AKT路径。Western blot结果显示，*Gankyrin*沉默后后，AKT磷酸化和NF-κB蛋白水平下降，说明AKT/NF-κB信号通路受抑制，而p53和PTEN表达水平上升，说明*Gankyrin*沉默可能通过上调AKT磷酸化抑制基因PTEN，抑制AKT活性，从而下调转录因子NF-κB表达，进而上调抑癌基因p53表达，最终调节耐药相关基因的表达(图4)。

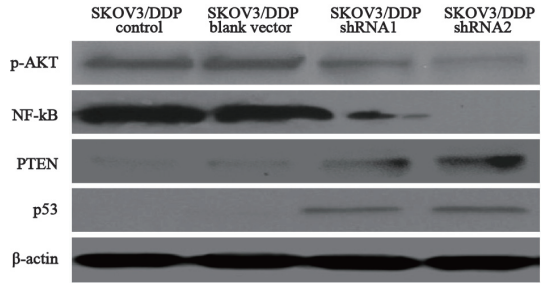

图 4 Gankyrin对人卵巢癌细胞系耐药相关信号转导通路的影响

Fig. 4 The effect of Gankyrin on the drug-resistant related signal pathway of human ovarian cancer cell lines

Western blot assay results showed that there was an increased expression of p53 and PTEN, meanwhile, there was a decreased expression of p-AKT and NF-κB in Gankyrin silencing SKOV3/DDP cells compared with untreated SKOV3/DDP and SKOV3/DDP blank vector transfection cells. β-actin was used as internal control.

3 讨 论

肿瘤细胞增加药物的外排、减少药物的吸收是其耐受化疗药物的一种主要手段。ABC家族的跨膜转运蛋白，例如MDR1可将药物从细胞内测泵到外侧，在耐药的肿瘤细胞中经常过表达[5]。*Gankyrin*沉默后，流式细胞术检测可见细胞内Rhodamin-123的含量升高，间接说明*Gankyrin*沉默逆转SKOV3/DDP的耐药性与减少药物的外排有关，进一步的研究发现，*Gankyrin*沉默下调了MDR1蛋白与mRNA的表达水平，为上述假设提供了佐证。

Survivin是重要的凋亡抑制蛋白，只表达于肿瘤和胚胎组织中，可抑制肿瘤细胞的凋亡，促进增殖和血管新生，因此被认为是一个具有很高价值的肿瘤治疗靶点[6]。实验结果显示，*Gankyrin*沉默可下调Survivin表达，这与*Gankyrin*增加肿瘤细胞凋亡的结果相符。Bcl-2也是一个重要的抗凋亡基因，研究发现Bcl-2的表达与肿瘤的耐药性密切相关[7]。本研究结果表明，在SKOV3/CDDP细胞中，*Gankyrin*沉默可以下调Bcl-2的表达，逆转肿瘤的耐药性可能是*Gankyrin*沉默逆转肿瘤耐药性的重要机制之一。

p53是一种重要的抑癌基因，可抑制肿瘤耐药基因的表达，促进凋亡。Caspase-3/8是在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族，可以激活肿瘤细胞凋亡程序，促进细胞凋亡[8-9]。因此我们认为上调p53和Caspase-3/8，促进细胞凋亡也是*Gankyrin*沉默逆转肿瘤耐药的重要机制。

AKT通路是对肿瘤耐药起着重要调节作用的信号通路，在本研究中，*Gankyrin*沉默同样可抑制AKT的磷酸化，抑制AKT信号通路的活性。NF-κB是重要的转录因子，在正常细胞和肿瘤细胞的增殖、凋亡及炎性反应因子的分泌中均发挥关键作用。PTEN是重要的抑癌基因，在多种恶性肿瘤中低表达，可以抑制AKT磷酸化，阻断AKT通路活性[10-12]。本研究显示，*Gankyrin*沉默可负调控AKT和NF-κB的表达，可能与上调抑癌基因PTEN表达有关，这种PTEN/AKT/NF-κB通路的调控作用可能是*Gankyrin*沉默逆转SKOV3/DDP耐药性的中心环节之一。

［参 考 文 献］

［1］ FURUKAWA S, SOEDA S, KIKO Y, et al. MCP-1 promotes invasion and adhesion of human ovarian cancer cells ［J］. Anticancer Res, 2013, 33(11): 4785-4790.

［2］ YUNOS N M, MUTALIP S S, JAURI M H, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects from sequenced combinations of andrographolide and cisplatin on ovarian cancer cell lines ［J］. Anticancer Res, 2013, 33(10): 4365-4371.

［3］ SONG X, WANG J, ZHENG T, et al. LBH589 inhibits proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via inhibition of gankyrin/STAT3/Akt pathway ［J］. Mol Cancer, 2013, 12(1): 114.

［4］ RABIK C A, DOLAN M E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents ［J］. Cancer Treat Rev, 2007, 33(1): 9-23.

［5］ KEPPLER D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy ［J］. Handb Exp Pharmacol, 2011, (201): 299-323.

［6］ HOROWITZ J C, AJAYI I O, KULASEKARAN P, et al. Survivin expression induced by endothelin-1 promotes myofibroblast resistance to apoptosis ［J］. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(1): 158-169.

［7］ WU S, LIU B, ZHANG Q, et al. Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma hepG2 cells ［J］. PLoS One, 2013, 8(11): e76886.

［8］ ALVAREZ-GONZALEZ R, MENDOZA-ALVAREZ H, FREY M, et al. Up-regulation of two distinct p53-DNA binding functions by covalent poly(ADP-ribosyl)ation: transactivating and single strand break sensing ［J］. Cancer Invest, 2013, 31(9): 563-570.

［9］ LIU J, LI J, ZHANG J F, et al. Combination of fenretinide and selenite inhibits proliferation and induces apoptosis in ovarian cancer cells ［J］. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 21790-21804.

［10］ MATSUDA S, NAKANISHI A, WADA Y, et al. Roles of PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for pharmaceutical therapy ［J］. Open Med Chem J, 2013, 7: 23-29.

［11］ CAI Z, TCHOU-WONG K M, ROM W N. NF-kappaB in lung tumorigenesis ［J］. Cancers (Basel), 2011, 3(4): 4258-4268.

［12］ 江克华, 董自强, 宋兴福, 等. Akt抑制剂鱼藤素对膀胱癌T-24细胞化疗敏感性的影响［J］. 中国癌症杂志, 2011, 21(8): 654-656.

（收稿日期：2013-12-10 修回日期：2014-01-05）