

OLA1通过抑制细胞凋亡影响乳腺癌细胞耐药性机制探讨

缪晓宇, 刘建洲, 杨青, 肖桂山*

(大连理工大学 化工与环境生命学部, 辽宁 大连 116024)

摘要: 乳腺癌是世界上发病率最高的癌症之一, 在临床治疗中以手术为主, 化学药物治疗为辅。为解决化疗进行中, 病患身上出现的对药物的耐受性问题, 通过构建乳腺癌耐药细胞株研究 OLA1 变化对乳腺癌耐药性影响, 依靠 siRNA 转染改变 OLA1 在细胞内的表达情况, 接着使用流式细胞仪检测 OLA1 变化对细胞凋亡影响。最终发现 OLA1 通过影响细胞凋亡相关蛋白表达, 降低紫杉醇对乳腺癌细胞的杀伤效果, 由此提高乳腺癌细胞对药物的耐受性。

关键词: 乳腺癌; 耐药性; OLA1; 细胞凋亡; 机制

中图分类号: Q2; R737.9 文献标识码: A doi:10.7511/dllgxb201905002

0 引言

根据统计, 2018 年全球预计会新增 210 万乳腺癌患者, 每 4 个女性癌症患者中就有一个是乳腺癌患者。尽管乳腺癌在大多数国家中都是最容易被诊断出的癌症, 但是并不妨碍它成为致死数最高的疾病^[1]。在中国, 乳腺癌是女性中最为常见的恶性肿瘤, 2015 年一年的发病例数就有 30.4 万, 由此死亡的也有 3.1 万^[2]。乳腺癌的临床治疗一般以手术为主, 化疗为辅。根据乳腺癌的不同分型, 有着侧重不一的化疗方案, 但在其中, 紫杉醇在各类临床化疗方案中都占据着一席之地。紫杉醇是一类天然抗癌药物, 最早由 Wall 从太平洋紫杉树中提取^[3], 并在之后广泛应用于各类癌症治疗中。但在临床治疗中发现, 患者经过一段时间化疗比较容易出现对药物的耐受性, 导致生存率的下降, 由此耐药性成了临床治疗中亟待解决的问题。Obg-like ATPase 1 (OLA1, 也称 DOC45) 是一种 p-loop GTP 酶, 属于 TRAFAC(翻译因子相关)类, Obg 家族和 YchF 亚群。TRAFAC GTP 酶的主要功能包括翻译因子和核糖体连接蛋白、信号转导、细胞内运输和应激反应的蛋白^[4-6], 所以 OLA1 在细胞中有着非常重要的功能。关于 OLA1 的研究目前还不多, 但已有的发现也已经

表明 OLA1 在癌症治疗中会有一定作用。Zhang 等研究表明, 敲低 OLA1 可以调控细胞的氧化应激水平, 从而抑制肿瘤的侵袭迁移^[7]; Mao 等研究发现, OLA1 通过与 HSP70 相互作用, 可以在热应激状态下保护细胞^[8]; Takahashi 等发现, OLA1 基因突变可能会引起遗传性的乳腺癌与口腔癌^[9]; Bai 等发现 OLA1 通过调节 GSK3β/Snail/E-钙黏蛋白信号传导促进 EMT, 其过表达与肺癌患者的临床进展和较差的存活率相关^[10]。然而, 关于 OLA1 与乳腺癌耐药性之间的关系尚无研究, 本文通过构建乳腺癌耐药细胞株, 研究 OLA1 细胞内表达水平与耐药性间的关系, 分析 OLA1 对药物诱导细胞凋亡的影响, 并探讨其相关作用机制, 为 OLA1 作为临床耐药治疗的靶标打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料: 乳腺癌细胞系 MCF-7 购自 ATCC 公司。MTT(1 g)试剂、总 RNA 提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒为北京索莱宝生物科技有限公司产品。胎牛血清、DMEM 高糖培养基、Trypsin-EDTA 胰酶购自 Gibco 公司。磷酸缓冲

收稿日期: 2019-03-29; 修回日期: 2019-07-30。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81770846)。

作者简介: 缪晓宇(1993-), 男, 硕士生, E-mail: mxy123@mail.dlut.edu.cn; 肖桂山*(1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: gxiao@dlut.edu.cn。

溶液 PBS(细胞用)购自 HyClone 公司. RIPA 裂解液购自普利莱公司. 紫杉醇(10 mg)、苯甲基磺酰氟(PMSF, 5 g)从阿拉丁试剂(上海)有限公司(上海晶纯生化科技股份有限公司)采购. Page Ruler Prestained Protein Ladder(250 μ L)购自 Thermo 公司. 蛋白免疫印迹实验相关化学试剂购自天津大茂化学试剂厂. Tween 20 购自 Sigma 公司. 溴酚蓝购自 Amresco 公司. 印迹膜专印缓冲液(10 \times)购自生工生物工程(上海)股份有限公司. Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3、OLA1 一抗购自 Cell Signaling Technology(CST)公司.

仪器:低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、冷冻离心机(Thermo 公司)、RT-qPCR 仪(罗氏公司)、荧光显微镜(奥林匹斯公司)、酶标仪(BioTek 公司)、凝胶成像仪(Alpha Innotech 公司)、Life Attune 声波聚焦流式细胞仪(Thermo Fisher 公司)、生物安全柜(Thermo 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 细胞放于 37 °C、含 5% CO₂ 饱和湿度的温箱,用含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基培养. 每隔 2 d 换液,细胞密度达到 80% 时传代.

1.2.2 MTT 检测 待 MCF-7 细胞生长至对数生长期,使用胰酶消化至 96 孔板中,每孔 6 000 个细胞,加入不同浓度的紫杉醇(1.56、3.13、6.25、12.50、25.0、50.0、100.0 μ mol/L),每组设置 6 个复孔并加入一组对照组,在培养箱孵育 48 h. 结束后每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),在 37 °C 温箱孵育 4 h 后,吸走上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,放置于 96 孔板摇床振摇 15 min,用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光值,计算药物对细胞抑制率,并用 SPSS 计算其 IC₅₀.

1.2.3 低浓度诱导法构建耐药细胞株 检测紫杉醇对 MCF-7 的 IC₅₀,由此筛选出合适的初浓度,加入培养瓶中孵育 24 h 后,吸走加药培养基,用 PBS 清洗,加入正常培养基培养,直至细胞长满 80%,传代. 视细胞生长情况加入等浓度药物孵育,或是加入 4 倍剂量药物孵育. 循环往复,直至耐药性达到实验需求.

1.2.4 RT-qPCR 分析 使用 Trazol 从细胞中提取总 RNA,用酶标仪测定其浓度与质量,按照

PrimeScript® RT Reagent Kit 试剂盒说明将其反转录成 cDNA,经过扩增稀释后,上机检测. GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 的前引物: 5-CATGAGAAGTATGACAAACAGCCT; 后引物: 5-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT. OLA1 的前引物: 5-TGGACAAGTATGACCCAGGT; 后引物: 5-GCTGCAAACCCAGCCTTAATG.

1.2.5 Western blot 分析 用胰酶消化目标细胞,预冷 PBS 清洗 3 遍,离心留取细胞,加入 RIPA 裂解液,置于冰上孵育 10 min,每隔 5 min 涡旋振荡 30 s,离心后留取上清液加入 PMSF 保存于 -80 °C. 使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒定量,按比例加入上样缓冲液后 95 °C 煮沸,保存于 -20 °C 冰箱. 制取 1.5 mm SDS-PAGE 凝胶,每条泳道加入 30 μ g 蛋白样品,80 V 恒压跑完浓缩胶,140 V 恒压跑完分离胶. 切取目标蛋白条带转移至 PVDF 膜上,牛奶封闭 2 h. 用 TBST 清洗膜 3 次(10 min/次),加入一抗 4 °C 过夜孵育,再用 TBST 清洗 3 次(10 min/次),孵育二抗 2 h, TBST 清洗后将膜用 ECL 高敏显影液孵育,然后置于凝胶成像仪中显影.

1.2.6 细胞凋亡率检测 设置对照组为 MCF-TAX 细胞,实验组为敲低 OLA1 的 MCF-TAX 细胞,向 6 孔板培养皿中加入计数好的两组细胞,使每孔细胞数量为 2×10^5 个. 待细胞贴壁后,加入紫杉醇 20 μ mol/L,孵育 24 h. 结束后,收集培养基,再用不含 EDTA 的胰酶消化,合并到之前收集的培养基中,离心收集细胞. 按照 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒操作步骤,依次加入双染试剂,室温避光孵育 10 min,然后用流式细胞仪进行凋亡分析检测.

1.2.7 统计学处理 用 SPSS17.0 对数据进行处理,结果以均值±标准差表示,两组间差异比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结 果

2.1 OLA1 在人体内表达情况

通过 GEPIA 公共数据库^[11]检索 OLA1 在人体内的表达情况,如图 1(a)所示,OLA1 在人体内各个器官都有分布,无论是在肿瘤患者还是在正常人中,OLA1 都有着较高的表达水平. 其中,在乳腺癌患者中,OLA1 在癌组织中的表达与正常组织的表达有显著性差异($P < 0.05$). 这就表

明 OLA1 与乳腺癌存在着联系,在肿瘤的发生发展中起到一定作用.

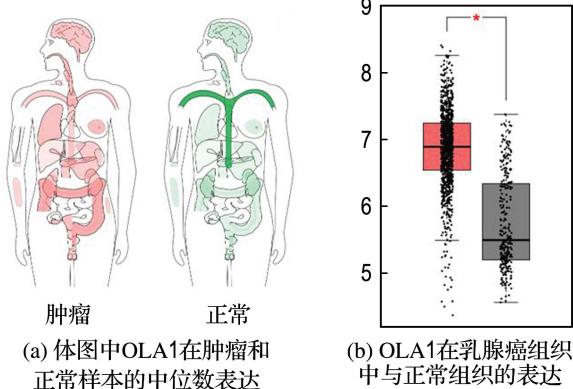


图 1 OLA1 在样本与组织中的表达

Fig. 1 Expression of OLA1 in samples and tissues

2.2 乳腺癌耐药细胞株构建情况

紫杉醇是乳腺癌临床治疗中常用的化疗药物,本文选择它来构建乳腺癌耐药细胞株.利用低浓度诱导法,构建了 MCF-7 的耐药细胞株.如图 2 所示,耐药细胞株相比亲本细胞株,细胞生长更为分散,细胞形态更为圆润.用 SPSS 计算 IC_{50} , MCF-TAX 为 $(76.92 \pm 0.29) \mu\text{mol/L}$, MCF-7 为 $(5.06 \pm 0.13) \mu\text{mol/L}$, 耐药指数为 15.2, 相比起亲本株,耐药株的耐药性得到显著提升.

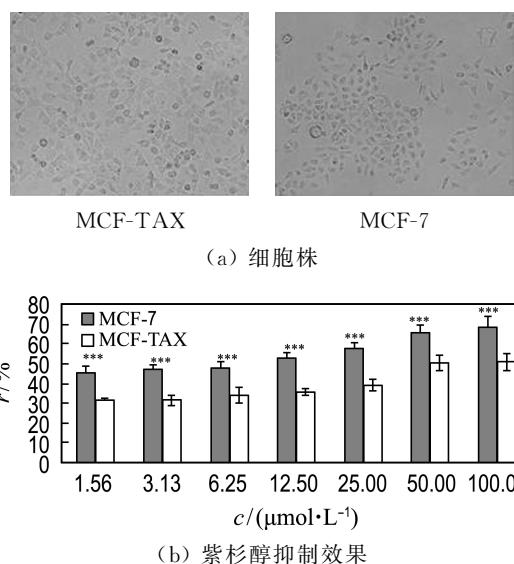


图 2 耐药细胞株和亲本细胞株及紫杉醇对耐药株和亲本株的抑制效果

Fig. 2 Drug-resistant cell line, parental cell line and the inhibitory effect of paclitaxel on drug-resistant and parental strains

2.3 OLA1 在耐药细胞株中表达情况

确认耐药株构建成功后,对 OLA1 的表达用 Western blot 进行了检测.发现随着耐药性的增加,OLA1 的表达也有明显提高($P < 0.01$),说明 OLA1 在肿瘤耐药性的发生发展过程中起到了一定作用,见图 3.

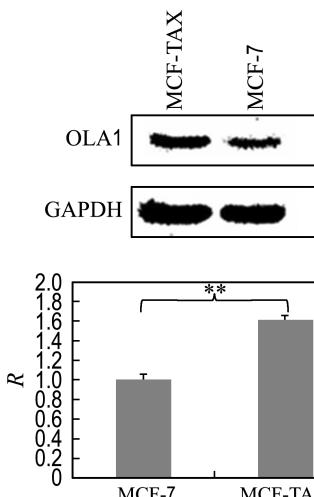


图 3 OLA1 在 MCF-TAX 与 MCF-7 中的表达

Fig. 3 Expression of OLA1 in MCF-TAX and MCF-7

2.4 敲低 OLA1 对耐药细胞株影响

利用 siRNA 干扰 OLA1 在 MCF-TAX 细胞内的表达水平,通过 RT-qPCR 和 Western blot 对转染效率进行检测,OLA1 在细胞内的表达水平显著降低($P < 0.01$).用 MTT 法检测敲低 OLA1 之后,MCF-TAX 对紫杉醇的敏感性.发现降低 OLA1 表达水平后,耐药株对紫杉醇敏感性得到明显提升($P < 0.001$).经过 SPSS 计算,耐药株 IC_{50} 从 $(76.92 \pm 0.29) \mu\text{mol/L}$ 降到 $(3.28 \pm 0.34) \mu\text{mol/L}$,耐药指数为 23.45,见图 4.表明在乳腺癌细胞耐药性的发生发展过程中,OLA1 确实发挥着重要作用.

2.5 OLA1 对细胞凋亡的影响

利用流式细胞仪,对 OLA1 进行了细胞凋亡的检测.敲低 MCF-TAX 中 OLA1 的表达,用紫杉醇孵育,发现降低 OLA1 的表达水平后,耐药株凋亡率显著提升,差异明显($P < 0.01$).同时,降低 OLA1 在细胞内的表达水平后,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平降低,促凋亡蛋白 Bax 与凋亡终末因子 Caspase-3 表达水平升高,表明 OLA1 通过影响细胞凋亡,从而改变细胞对紫杉醇的敏感性.见图 5.

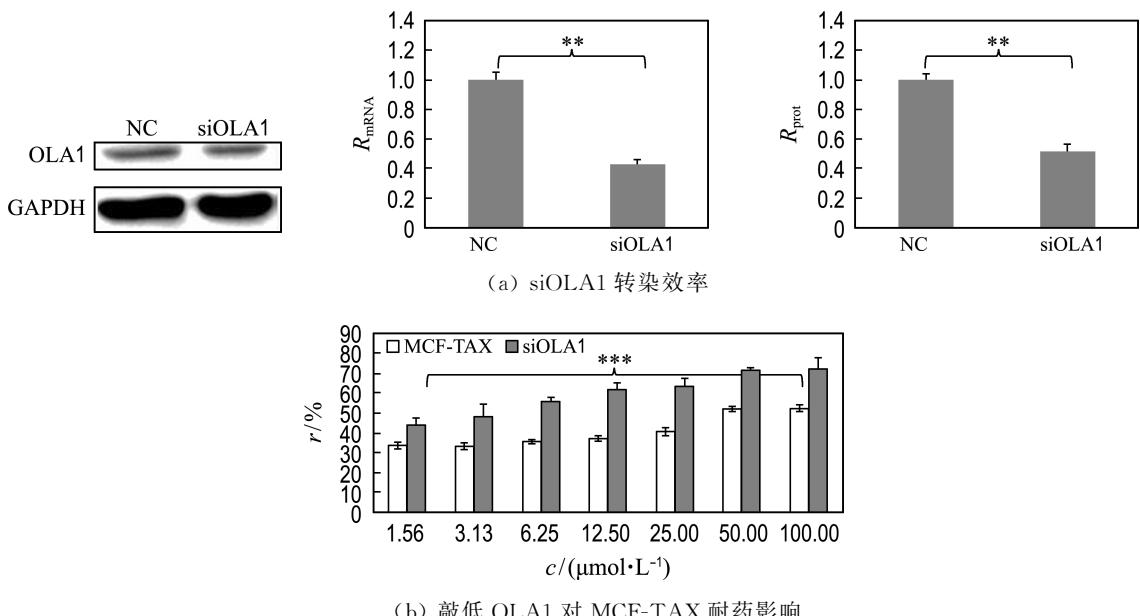


图 4 siOLA1 转染效率及敲低 OLA1 对 MCF-TAX 耐药影响

Fig. 4 siOLA1 transfection efficiency and effect of OLA1 down-regulation on MCF-TAX drug resistance

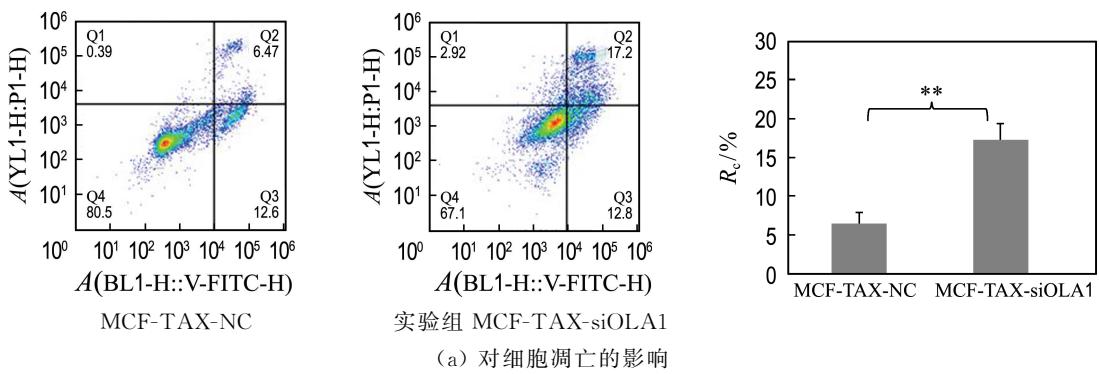


图 5 OLA1 对细胞凋亡及细胞凋亡相关蛋白影响

Fig. 5 Effect of OLA1 on apoptosis and apoptosis-related proteins

3 讨 论

在中国,乳腺癌的死亡率自 1973 年来持续上升,发病率呈现城市高于农村、发病年龄年轻化的趋势^[12]. 在乳腺癌临床治疗中,化疗占据了极大比重,但伴随而来的耐药性也是难以解决的问题. 耐药性的成因多种多样,目前的研究表明主要有

以下原因:(1)药物转运体如 ABC 家族蛋白 P 糖蛋白、BCRP 等将细胞内的化疗药物泵出体外,降低胞内药物浓度,影响临床疗效.(2)药物目标靶位点的状态被改变,比如 Topo II α ,这也可以降低化疗药物效果.(3)代谢酶通过与药物作用,使药物失活或者丧失毒性,以此来帮助癌细胞逃避

药物杀伤,如 CYP3A4、谷胱甘肽 S-转移酶 Pi 等。(4)与细胞凋亡相关的调节因子,如 Bcl-2/Bax 等,它们在细胞内表达状态的改变会影响化疗药物诱导癌细胞凋亡的效果^[13-15]。对此的解决办法之一就是发现上游调控的耐药靶标,实行精准治疗。OLA1 在此前其他研究中,被发现参与维持细胞的多个生长进程,它是小鼠胚胎发育、脂肪含量稳定的重要一环^[16-17],同时,对于由 DNA 损伤引起的中心体放大,它也可以通过与 BRCA1 等蛋白结合进行调控^[18-19]。

对于 OLA1 的研究目前范围集中在它对体内代谢、肿瘤生长侵袭上,与肿瘤耐药性的关系还未有报道,本研究通过乳腺癌临床化疗之中经常出现的药物耐受性作为入口,通过构建 MCF-7 对紫杉醇的耐药细胞株,发现 OLA1 表达的变化会影响乳腺癌细胞的耐药性,为 OLA1 成为新药靶标提供了依据。同时,紫杉醇作用机制区别于其他微管蛋白抑制作用药物,它通过促进微管蛋白聚合、防止微管解聚,使细胞有丝分裂停止,从而诱导癌细胞凋亡,进而体现抗肿瘤效果^[3]。Bax、Bcl-2 共属于 Bcl-2 基因家族。Bcl-2 不像其他致癌基因,它不促进细胞增殖,它促进细胞生长。它在细胞内含量一般会比 Bax 多,而 Bax 含量增多会导致细胞凋亡^[20]。结合 Miele 等发现^[21-23]与本文研究成果,推测 OLA1 的作用机制可能为 OLA1 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 存在正反馈调节关系,与促凋亡蛋白 Bax 和凋亡终末因子 Caspase-3 是负反馈调节关系,当 OLA1 在细胞内表达减少时,Bcl-2 的表达也会减少,同时 Bax 表达增多,导致细胞内 Bcl-2 与 Bax 之间的平衡关系被打破,Bax 低聚化在线粒体膜上形成小孔,促进细胞色素 c 释放,并通过一系列协同反应,刺激 Caspase-3 表达,最终导致细胞死亡,从而降低了细胞对紫杉醇药物的耐受性。

4 结语

本研究拓展了 OLA1 在癌症研究上的应用层面,发现它与乳腺癌耐药性之间的作用关系,并对其可能的作用机制进行了讨论,为其作为肿瘤耐药的靶标提供了一定依据,对临床治疗提供了新的方向。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, **68**(6): 394-424.
- [2] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2018, **27**(1): 1-14.
- CHEN Wanqing, SUN Kexin, ZHENG Rongshou, et al. Report of cancer incidence and mortality in different areas of China, 2014 [J]. *China Cancer*, 2018, **27**(1): 1-14. (in Chinese)
- [3] WALL M E. Camptothecin and taxol: Discovery to clinic [J]. *Medicinal Research Reviews*, 1998, **18**(5): 299-314.
- [4] VERSTRAETEN N, FAUVART M, VERSEES W, et al. The universally conserved prokaryotic GTPases [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, **75**(3): 507-542.
- [5] TEPLYAKOV A, OBMOLLOVA G, CHU S Y, et al. Crystal structure of the YchF protein reveals binding sites for GTP and nucleic acid [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**(14): 4031-4037.
- [6] LEIPE D D, WOLF Y I, KOONIN E V, et al. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, **317**(1): 41-72.
- [7] ZHANG Jiawei, RUBIO V, ZHENG Shu, et al. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2009, **10**(11): 796-804.
- [8] MAO R F, RUBIO V, CHEN H, et al. OLA1 protects cells in heat shock by stabilizing HSP70 [J]. *Cell Death and Disease*, 2013 (4): e491.
- [9] TAKAHASHI M, CHIBA N, SHIMODAIRA H A, et al. OLA1 gene sequencing in patients with BRCA1/2 mutation-negative suspected hereditary breast and ovarian cancer [J]. *Breast Cancer*, 2017, **24**(2): 336-340.
- [10] BAI Li, YU Zubin, ZHANG Jiawei, et al. OLA1 contributes to epithelial-mesenchymal transition in lung cancer by modulating the GSK3β/snail/E-cadherin signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, **7**(9): 10402-10413.
- [11] TANG Zefang, LI Chenwei, KANG Boxi, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45** (W1): W98-W102.
- [12] 郑莹,吴春晓,吴凡. 中国女性乳腺癌死亡现状

- 和发展趋势 [J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(2): 150-154.
- ZHENG Ying, WU Chunxiao, WU Fan. Current situation and development trend of female breast cancer death in China [J]. **Chinese Journal of Preventive Medicine**, 2011, 45(2): 150-154. (in Chinese)
- [13] BREWER F, FOLLIT C, MCCLEAN M, et al. Mechanism based inhibition of p-glycoprotein [J]. **FASEB Journal**, 2015, 29(1): 721-725.
- [14] AZNAR M A, LASA-SARACIBAR B, BLANCO-PRIETO M J. Edelfosine lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in K-562 leukemia cells by a caspase-independent mechanism [J]. **Molecular Pharmaceutics**, 2014, 11(8): 2650-2658.
- [15] ROLAIN J M, DIENE S M, KEMPF M, et al. Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France [J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013, 57(1): 592-596.
- [16] 刘月. OLA1 抑制 p53 和 p21 的表达维持细胞增殖和小鼠胚胎的正常发育 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- LIU Yue. OLA1 maintains cell proliferation and mouse embryo development by repressing p53 and p21 [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. (in Chinese)
- [17] 何金杰. OLA1 抑制 GSK-3 β 的活性维持小鼠脂肪含量稳定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- HE Jinjie. OLA1 maintains fat mass stable through inhibiting GSK-3 β ' s activity [D]. Hangzhou:
- Zhejiang University, 2017. (in Chinese)
- [18] QI Huicheng, YOSHINO Y, FANG Zhenzhou, et al. BRCA1-interacting protein OLA1 regulates centrosome amplification induced by DNA damage [J]. **Cancer Science**, 2018, 109(1): 211.
- [19] YOSHINO Y, QI Huicheng, FUJITA H, et al. BRCA1-interacting protein OLA1 requires interaction with BARD1 to regulate centrosome number [J]. **Molecular Cancer Research**, 2018, 16(10): 1499-1511.
- [20] MAES M E, SCHLAMP C L, NICKELLS R W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells [J]. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2017, 57: 1-25.
- [21] MIELE E, SPINELLI G P, MIELE E, et al. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer [J]. **International Journal of Nanomedicine**, 2009, 4(1): 99-105.
- [22] AKYOL Z, COKER-GURKAN A, ARISAN E D, et al. DENSpm overcame Bcl-2 mediated resistance against paclitaxel treatment in MCF-7 breast cancer cells via activating polyamine catabolic machinery [J]. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2016, 84: 2029-2041.
- [23] QUEIROZ E A I F, PUUKILA S, EICHLER R, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells [J]. **PLoS ONE**, 2014, 9(5): e98207.

Research on mechanism of OLA1 affecting drug resistance of breast cancer cells by inhibiting apoptosis

MIAO Xiaoyu, LIU Jianzhou, YANG Qing, XIAO Guishan*

(Faculty of Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Breast cancer is one of the most common cancers in the world. Surgical resection is the main method in clinical treatment and taking medicine is a supplement. With the progress of chemotherapy, drug tolerance has become an urgent problem in clinical treatment. To solve this problem, a breast cancer drug-resistant cell line is constructed to study the effect of OLA1 changes on breast cancer drug resistance, and the expression of OLA1 in cells is changed by siRNA transfection. Then the flow cytometry is used to detect the effect of OLA1 changes on cell apoptosis. Finally, it is found that OLA1 can reduce the lethal effect of paclitaxel on breast cancer cells by affecting the expression of apoptosis-related proteins, thereby improve the drug tolerance of breast cancer cells.

Key words: breast cancer; drug resistance; OLA1; apoptosis; mechanism