

人膀胱癌耐药细胞株原癌基因 c-jun、c-fos 表达与 -谷氨酰半胱氨酸合成酶及谷胱甘肽的关系

曾晓勇, 叶章群, 杨为民, 陈 忠

Relation between the expression of oncogenes c-jun, c-fos and the expression of γ -glutamylcysteinyl synthetase (γ -GCS) and glutathione (GSH) in drug-resistant human bladder cancer line

ZENG Xiao-yong, YE Zhan-qun, YANG Wei-min, et al

Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To investigate the relationship of expression of oncogenes c-jun and c-fos with the multidrug resistance (MDR) in human bladder cancer cell. **Methods** The expression of c-jun and c-fos in human bladder cell line BIU87 and Adriamycin (ADM)-induced MDR subline BIU87/A were examined by RT-PCR and Western blotting; the relationship of the expression of these two genes and γ -glutamylcysteinyl synthetase (γ -GCS) gene and intracellular GSH levels were analyzed. **Results** The intracellular GSH level and the expression of γ -GCS mRNA in BIU87/A were significantly higher than those in BIU87 ($P < 0.01$); there was a higher expression of c-jun mRNA in BIU87/A than that in BIU87 but no difference was found for c-fos gene in both cells, which is paralleled by their protein levels by Western blotting analysis. **Conclusion** Oncogenes c-jun can regulate the expression of γ -GCS and the intracellular GSH content in resistant bladder cancer cells, which can contribute to the acquisition of drug resistance of bladder cancers; c-jun has probably a minor role on the resistance of BIU87/A.

Keywords: c-jun; c-fos; Glutathione (GSH); Drug resistance

摘要:目的 研究原癌基因 c-jun 和 c-fos 的表达对谷胱甘肽介导的膀胱癌多药耐药的影响。方法 应用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western Blotting), 检测 c-jun、c-fos 基因在人膀胱癌细胞株 BIU87 及其阿霉素诱导的多药耐药亚株 BIU87/A 的表达, 并分析其与两株细胞的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -GCS) 表达和细胞内谷胱甘肽 (GSH) 水平的关系。结果 BIU87/A 细胞 γ -GCS mRNA 的相对表达水平明显高于 BIU87 ($P < 0.05$), 与此相应, BIU87/A 细胞内 GSH 水平也高于 BIU87 ($P < 0.01$); c-jun 基因 mRNA 及其蛋白在 BIU87/A 的表达均高于 BIU87, 而 c-fos 基因在 BIU87 和 BIU87/A 的表达未见明显差异 ($P > 0.05$)。结论 原癌基因 c-jun 上调 γ -GCS 表达和 GSH 的合成可能是 BIU87/A 细胞多药耐药形成的重要机制之一, 而 c-fos 对 BIU87/A 的耐药形成可能不起主要作用。

关键词: c-jun; c-fos; 谷胱甘肽; 耐药

中图分类号: R737.14, Q55, Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578 (2004) 01-0030-03

0 引言

原癌基因 c-fos, c-jun 产物 c-Fos, c-Jun 蛋白常以同源或异源二聚体的形式结合核内 DNA 转录调控子——AP-1 序列, 从而启动基因的转录^[1]。有研究认为 AP-1 序列为调节 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -glutamylcysteinyl synthetase, γ -GCS) 的关键位点^[2,3]。本研究检测了 c-fos 和 c-jun 基因在人膀胱癌细胞株 BIU87 及其阿霉素诱导的多药耐药亚株 BIU87/A 的表达, 并分析其与细胞内 γ -GCS 催化亚基—— γ -GC

Sh 表达及 GSH 水平的关系, 旨在探讨两者表达在 GSH 介导的膀胱癌化疗耐药形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株及培养

人膀胱癌细胞株 BIU87 引自北京大学泌尿外科研究所, 经阿霉素 (ADM) 自低浓度递增持续培养 10 个月, 形成对多种化疗药物具有耐药性的多药耐药 (MDR) 细胞亚株 BIU87/A, 并可在含有 0.8 μ g/ml ADM 的培养基中稳定生长^[4]。

两株细胞均在含有 10% (v/v) 小牛血清 (CS), 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基 (美国 Gibco 公司产品) 中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% (v/v) CO₂, 湿度 100% 的培养环境中培养传代。

收稿日期: 2003-07-24; 修回日期: 2003-09-22

基金项目: 湖北自然科学基金资助项目 (99J124)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科

1.2 MTT 法检测细胞耐药性

分别接种密度 8×10^4 /ml 的 BIU87 和 BIU87/A 细胞 100 μ l 于 96 孔板,培养 24h 后,加入等倍浓度梯度的阿霉素等 8 种化疗药物,继续培养 72h,弃去培养液,每孔加入浓度为 5mg/ml 的四甲基偶氮唑蓝(MTT) 10 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4h 后,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 100 μ l,于酶标仪测定每孔 A₅₇₀ 值,每种药物每个浓度设 8 个样品孔,取其平均值。化疗药物对癌细胞抑制率 = (对照孔 A₅₇₀ 值 - 加药孔 A₅₇₀ 值) / 对照孔 A₅₇₀ 值 $\times 100\%$ 。以每个浓度的抑制率和相应的药物浓度的对数作图,推算出每种药物对细胞的半数效应剂量(IC₅₀),并计算耐药细胞亚株 BIU87/A 对于每种药物的相对耐药系数(Relative Resistance, RR) [RR = (耐药细胞亚株 IC₅₀ / 亲本细胞株 IC₅₀) $\times 100\%$]。

1.3 细胞内谷胱甘肽水平的检测

分别收获两株细胞 2×10^7 左右,反复冻融三次,使细胞成分裂解,4000r/min 离心 10min,取上清,以 Bradford 比色法(A₅₉₅ nm)测定蛋白质浓度(μ mol/ml);然后应用酶循环法,通过荧光比色(A₄₁₂ nm)和以标准曲线法检测单位蛋白的 GSH 含量(μ mol/m gprot)。GSH 检测试剂盒为南京建成生物工程公司产品,具体操作按说明书进行。

1.4 定量 RT-PCR 检测 mRNA 表达

表 1 四种基因 RT-PCR 引物核苷酸序列及扩增产物片段

基因	序 列	扩增产物(bp)
-GCSH	S.5 -AGGCCAGATACCTTTATGATCAGF3 R.5 -GCTGTCTATTGAGTCATATCGGGA - TTTAC-3	221
c-fos	S.5 -AAGGAGAATCCGAAGGGAAAGGAA- TAAGATGGCT-3 R.5 -AGACGAAGGAAGACGTGTAAGCAGT- GCAGCT-3	612
c-jun	S.5 -GCATGAGGAACCGCATCGCTGCCTC- CAAGT-3 R.5 -GCGACCAAGTCCTTCCCACTCGTGT- GCACACT-3	409
-actin	S.5 -GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3 R.5 -GGTGGCGTTTACGAAGATC-3	320

收获两株细胞 24×10^6 ,TRIzol 试剂(美国 Gibco 公司产品)一步法提取细胞总 RNA,具体步骤按说明书进行;常规逆转录反应生成 cDNA 用于 PCR 扩增;取 1 μ l cDNA,94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,加入 Taq 酶(美国 Promega 公司产品)2.5u,引物各 1 μ l(-actin 引物加入各特异反应体系作为内参照)等,于 PCR 扩增仪(美国 MJRsearch 公司产品)行 PCR 循环扩增。-GCSH, c-jun, c-fos 和 -actin 引物设计分别参照文献^[5-7](表 1)(引物由上海生物工程技术公司合成)。反应产物于 1.5% ~ 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,

数码照相。计算机凝胶成像分析系统(英国 UVP 公司产品)对荧光灰度行半定量分析。

1.5 蛋白质印迹(Western Blotting)分析

收获两株细胞 $(3 \sim 4) \times 10^6$,用细胞裂解液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、150mmol/L NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、2mmol/L EDTA、10mmol/L NaVO₃、1mmol/L PMSF、10mmol/L TPCK)冰上裂解后,提取其总蛋白,取等量蛋白经 SDS-PAGE 蛋白电泳后,电转法将凝胶电泳带(蛋白质)转移至硝酸纤维素膜,5% 低脂奶粉封闭过夜后,加入鼠抗人 c-jun 和 c-fos 单抗(抗体均为北京中山生物技术公司产品),LSAB 法免疫显色,反应后以计算机图象分析系统计算单位面积吸光度积分(A/mm²)行半定量蛋白表达分析。

1.6 统计学处理

实验数据均以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间显著性差异采用 t 检验。

2 结果

2.1 BIU87/A 相对其亲本细胞 BIU87 的药物耐受性

BIU87/A 对于阿霉素(ADM)、表阿霉素(EPI)、鬼臼乙叉甙(VP-16)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、柔红霉素(DNR)和长春新碱(VCR)的 RR 值分别为 48.71、12.47、9.73、3.47、3.07 和 4.64 (P 均 < 0.05),与 BIU87 相比具有较强的交叉耐药性,而对于顺铂(CDDP)和丝裂霉素(MMC)则保持了与其亲本细胞 BIU87 类似的药物敏感性(RR 值分别为 1.13 和 0.91, P 均 > 0.05)。

2.2 BIU87 和 BIU87/A 细胞内 GSH 水平及 -GCSH mRNA 的表达

BIU87/A 细胞内的 GSH 平均水平为 183.02 nmol/m gprot*,明显高于 BIU87 细胞的 143.47 nmol/m gprot (P < 0.01)。-GCSH 基因 PCR 扩增产物片段大小为 221bp(图 1),与文献[7]相符。-GCSH mRNA 在 BIU87/A 细胞的相对表达水平(-GCSH mRNA / -actin mRNA)为 1.341,高于在 BIU87 细胞的表达(0.953) (P < 0.05)。

2.3 c-jun 和 c-fos 基因的表达

c-jun 和 c-fos 基因在 BIU87 和 BIU87/A 两个细胞株均有不同程度表达,RT-PCR 扩增产物的大小分别为 409bp 和 612bp(图 2),与文献[5]相符。c-jun mRNA 在 BIU87/A 细胞的表达水平明显强于在 BIU87 的表达(表 2);与此相应,Western blot 显示其蛋白在 BIU87/A 的表达水平也高于相应的 BIU87 细胞(表 2)。c-fos mRNA 及其蛋白质在两株细胞呈相对弱表达,且半定量分析未见明显差异 (P > 0.05),见图 2,表 2。

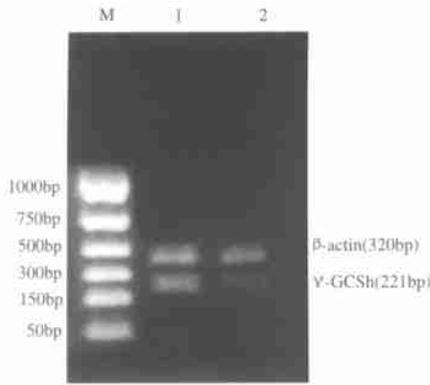


图 1 -GCSH 在 BIU87 和 BIU87/A 细胞表达半定量 RT-PCR 的电泳结果

Lane M PCR-Marker; Lane 1 BIU87/A; Lane 2 BIU87
以 β -actin 内参照作半定量分析

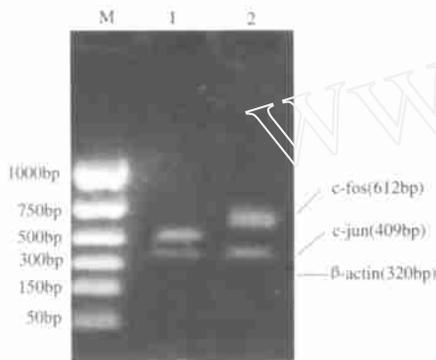


图 2 c-jun 和 c-fos 半定量 RT-PCR 典型电泳结果

Lane M PCRmarker; Lane 1 c-jun; Lane 2 c-fos
以 β -actin 内参照作半定量分析

表 2 c-jun 和 c-fos 在 BIU87 和 BIU87/A 表达的半定量分析

基因	mRNA 相对表达 (/ β -actin) *		蛋白印迹 (WesternBlot) (OD/mm ²) **	
	BIU87	BIU87/A	BIU87	BIU87/A
c-jun	0.84 ± 0.63	1.45 ± 0.22 ^a	2.7 ± 0.2	4.0 ± 0.6 ^b
c-fos	1.10 ± 0.27	0.96 ± 0.15 ^c	3.3 ± 0.5	2.9 ± 0.3 ^d

*待测基因 mRNA 相对表达水平以该基因 PCR 产物灰度/内对照 β -actin 灰度表示;

**待测基因蛋白水平以 WesternBlot 斑点单位面积吸光度积分表示,以上两组数据数值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,为 3 次独立实验的平均结果。

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$, ^c $P > 0.05$, ^d $P > 0.05$

3 讨论

谷胱甘肽 (glutathion, GSH) 及其相关酶类对化疗药物的解毒作用是恶性肿瘤化疗耐药形成的主要原因之一^[2]。-GCS 是 GSH 体内生物合成的限速酶,由重链催化亚基 (-GCSH, 73kDa) 和轻链调节亚基 (-GCSI, 28kDa) 组成,其中 -GCSH 决定了全酶的催化活性。其活性在很大程度上影响细胞内 GSH 水平,因而常作为的研究 GSH 及其介导的肿瘤耐药现象的一个重要指标^[2,3]。本实验显示经长期接触 ADM 诱导形成的人膀胱癌的耐药细胞亚株

BIU87/A, 与其亲本细胞株 BIU87 相比,具有对多种化疗药物的交叉耐药的特性,同时其细胞内 -GCSH mRNA 表达和 GSH 水平也处于相对较高水平,这说明化疗应激可诱导 -GCSH mRNA 的过表达,进而促进 GSH 的细胞内合成。而 GSH 水平升高可能是 BIU87/A 耐药性形成的重要作用因素。

关于 -GCSH 基因的转录调控,目前已经初步明确该基因 5' 端非编码区域的激活剂蛋白-1 (activator-1, AP-1) 序列为调控基因转录的关键位点^[2]。原癌基因产物 c-jun 和 c-fos 蛋白为其主要的反式作用因子,两者可通过形成 c-jun/c-jun 或 c-jun/c-fos 二聚体的形式结合 DNA,从而启动 -GCSH 基因的转录。本实验显示 c-jun mRNA 及其蛋白在 BIU87/A 细胞均有较高表达,而 c-fos 基因在两株细胞的表达并无差异,这提示对于 BIU87/A 的 -GCSH 基因 AP-1 位点的活化,c-jun/c-jun 二聚体可能为主要 DNA 结合模式,c-jun 的上调可能为诱导化疗后 BIU87/A 细胞内 -GCSH 基因过表达、GSH 水平升高乃至多药耐药形成的重要机制,而 c-jun/c-fos 模式可能仅处于次要地位。有人认为 AP-1 位点活化模式的选择与不同的化疗药物诱导有关。c-jun/c-jun 模式多见于细胞暴露于那些以氧化或过氧化杀伤为主要作用机理的抗癌药物如烷化剂、顺铂等时,对于间接致 DNA 损伤的药物如丝裂霉素 C 等则以 c-jun/c-fos 模式多见^[5]。结合我们目前的研究均提示:对于 GSH 介导的肿瘤耐药,在其化疗应激反应通路中存在一定的差异,对其深入研究将有助于临床上个体化逆转剂的选择。

参考文献:

- [1] Liebermann DA, Gre gory B, Hoffman B. AP -1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis [J]. Int J Oncol, 1998, 12 (3): 685-700.
- [2] Yao KS, Andrew KG, Steven WJ, et al. Evidence for altered regulation of γ -glutamylcysteine synthetase gene expression in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line [J]. Cancer Res, 1995, 55 (19): 4367-4374.
- [3] Tetsuya I, Eri M, Katsuharu M, et al. Co-expression of γ -glutamylcysteine synthetase sub-units in response to cisplatin and doxorubicin in human cancer cells [J]. Int J Cancer, 1999, 82 (3): 405-411.
- [4] 陈忠, 章咏裳, 李家贵, 等. 人膀胱癌耐药细胞系 BIU87/A、BIU87/V 的建立及耐药分析 [J]. 同济医科大学学报, 1999, 28 (1): 68-70.
- [5] Shukla GS, Shukla A, Potts RJ, et al. Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induces the expression of γ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase π and μ isoforms: potential role of activator protein-1 [J]. Cell Biol Toxicol, 2000, 16 (6): 347-362.
- [6] Shen H, Kauvar, Tew KD. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response [J]. Oncol Res, 1997, 9 (6-7): 295-302.
- [7] Vries EGE, M üller M, Meijer C, et al. Role of the glutathione S-conjugate pump in cisplatin resistance [J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87 (7): 537-538.

(安 凤校对)