

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00279

RNAi 沉默 *polβ* 基因部分逆转食管鳞癌细胞顺铂耐药性

唐悦¹, 王黎², 柳璐璐¹, 李敏^{1*}

1. 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室, 郑州 450052

2. 郑州大学基础医学院寄生虫学教研室, 郑州 450052

[摘要] **目的** 通过 RNA 干扰(RNAi)技术沉默 DNA 聚合酶 *polβ* 的表达, 观察其对食管癌细胞顺铂(cDDP)耐药性的影响。**方法** 构建靶向 *polβ* 基因的 siRNA 重组慢病毒 pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*2 及阴性对照载体 pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*3C, 将其感染人食管鳞癌顺铂耐药细胞系 EC9706/cDDP, 通过 RT-PCR、蛋白质印迹分析和免疫荧光实验观察细胞 *polβ* 的表达情况, 采用 MTT 法观察不同浓度顺铂对细胞生长的抑制作用并计算 50% 细胞生长抑制所需的药物浓度(IC₅₀)和耐药指数(RI)。**结果** 靶向 *polβ* 的 siRNA 重组慢病毒 pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*1 和 pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*2 感染 EC9706/cDDP 后均可下调 *polβ* 的 mRNA 和蛋白表达水平, 其中前者效果更为显著。顺铂以剂量依赖方式抑制 EC9706/cDDP 细胞增殖, 感染 pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*3C 的 EC9706/cDDP 细胞及未感染 EC9706/cDDP 细胞对顺铂的 IC₅₀ 分别为 55.71、62.41、63.11 μg/mL, 耐药指数分别为 13.9、15.5、15.7, 其中前者与后二者相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** *polβ* 的表达与食管鳞癌细胞系 EC9706/cDDP 顺铂耐药性有关, 沉默其表达可部分逆转 EC9706/cDDP 细胞对顺铂的耐药性。

[关键词] 食管肿瘤; 肿瘤抗药性; 顺铂; *polβ*; RNA 干扰

[中图分类号] R 735.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)03-0279-06

RNAi silencing of *polβ* gene partly reversing drug-resistance of esophageal cancer cells to cisplatin

TANG Yue¹, WANG Li², LIU Lu-lu¹, LI Min^{1*}

1. Department of Microbiology and Immunology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

2. Department of Parasitology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

[Abstract] **Objective** To silence *polβ* gene by RNAi technique and to observe its effects on the drug-resistance of esophageal carcinoma cells to cisplatin (cDDP). **Methods** We constructed recombinant lentivirus containing siRNA targeting *polβ* genes. The two lentiviral vectors containing siRNA targeting the *polβ* gene were designated as pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*1 and pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*2, and the negative control vector as pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*3C; they were used to infect EC9706/cDDP cells, which was resistant to cDDP. The expression of *polβ* was then examined by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence. MTT was used to observe the inhibitory effect of cDDP; the IC₅₀ of cDDP and resistance index (RI) were calculated. **Results** Both pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*1 and pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*2 down-regulated *polβ* at mRNA and protein levels, with the effect of former being more prominent. Cisplatin inhibited EC9706/cDDP cell proliferation in a dose-dependent manner. The IC₅₀ values of cDDP in cells infected with pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*1, pRNAT-U6.2/Lenti-*polβ*3C and untreated EC9706/cDDP were 55.71 μg/mL, 62.41 μg/mL, and 63.11 μg/mL, respectively, with the first one being significantly different from the latter two ($P < 0.05$); and the corresponding RI values were 13.9, 15.5, and 15.7, respectively, also with the first one being significantly different from the latter two ($P < 0.05$). **Results** It is suggested that *polβ* expression is associated with cDDP resistance in EC9706/cDDP, and silencing *polβ* by RNAi can partly reverse the drug resistance of EC9706/cDDP to cDDP.

[Key words] esophageal neoplasms; neoplasm drug-resistance; cisplatin; *polβ*; RNA interference

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(3):279-284]

[收稿日期] 2013-07-18

[接受日期] 2013-09-04

[作者简介] 唐悦, 讲师. E-mail: tangyue@zzu.edu.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0371-67781976, E-mail: liminzzu@gmail.com

DNA聚合酶 $\text{pol}\beta$ 是 Weissbach 等^[1]1971年在牛胸腺细胞中发现的单肽链小分子蛋白,广泛存在于哺乳动物细胞核内。 $\text{pol}\beta$ 相对分子质量为 39 000,是目前已知的 DNA 聚合酶中最小的,也是哺乳动物体内复制保真度最低、最不精确的一种 DNA 聚合酶,它在细胞内的稳定表达对于 DNA 的正常复制与修复及细胞的正常分化有着重要作用^[2-4]。顺铂(cisplatin, cDDP)为一广谱、高效抗癌药,是目前最重要的临床抗癌药物之一。我国是食管癌的高发地区,尤其是河南省林州市(原河南省林县)及其毗邻的辉县等地。食管鳞癌对顺铂耐药是化疗失败的重要因素之一,其发生机制仍不清楚。我们前期进行的耐药基因筛查研究显示在人食管鳞癌顺铂耐药细胞系 EC9706/cDDP 中 $\text{pol}\beta$ 的表达水平明显高于亲本细胞 EC9706,提示 $\text{pol}\beta$ 很可能在 EC9706/cDDP 细胞顺铂耐药的形成中起一定作用^[5-6]。为进一步研究 $\text{pol}\beta$ 在顺铂耐药中的作用并探索有效的逆转方法,本研究拟构建靶向 $\text{pol}\beta$ 基因的 siRNA 重组慢病毒,观察 $\text{pol}\beta$ 基因沉默后 EC9706/cDDP 细胞对顺铂敏感性的改变,明确 $\text{pol}\beta$ 的沉默是否会在一定程度上逆转其耐药性。

1 材料和方法

1.1 实验材料 高分化人食管鳞癌顺铂耐药细胞系 EC9706/cDDP 由本课题组构建^[6]。慢病毒包装细胞 293FT 和大肠杆菌 DH5 α 、pRNAT-U6. 2/Lenti siRNA 表达载体为本室保存。Opti-MEM[®] I 培养基购自美国 Gibco 公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I 购自 Promega 公司。ViraPower[™] Packaging Mix(经优化的包含 3 种包装质粒的混合物)、转染试剂 Lipofectamine[™] 购自美国 Invitrogen 公司。胶回收试剂盒及小量质粒提取试剂盒购自 Axxygen 公司。兔抗人 $\text{pol}\beta$ 抗体、羊抗兔多克隆抗体及 TRITC 标记的羊抗兔抗体购自北京中山生物技术有限公司。编码发卡样 siRNA 的 DNA 单链模板序列及相关引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 靶向 $\text{pol}\beta$ 基因的 siRNA 慢病毒的构建

1.2.1 siRNA 靶点设计与合成 参照 $\text{pol}\beta$ mRNA 序列(GenBank: M13140),用 Ambion siRNA 靶序列分析设计系统根据 siRNA 设计原则设计 siRNA

靶点。针对靶基因序列设计多个 RNA 干扰靶点序列,最终确定 2 个长为 19 bp 的靶序列: 5'-CGT GAG CCA AGC TAT CCA C-3'(197~215 位点)、5'-CTG TTA CAT CAG GTT GTG G-3'(741~759 位点),设计分别针对这 2 个靶序列的 2 对编码短发夹 RNA 的 DNA 单链模板(第一对命名为 $\text{pol}11$ 、 $\text{pol}12$,第二对命名为 $\text{pol}21$ 、 $\text{pol}22$),同时随机组合出一条无关对照序列 5'-GTC AAT GGT CGT GTA GAG T-3',针对该序列的编码短发夹 RNA 的 DNA 单链模板命名为 $\text{pol}c1$ 、 $\text{pol}c2$ 。合成的成对引物干粉溶于退火缓冲液,90℃水浴 15 min,自然冷却。

1.2.2 siRNA 慢病毒表达载体克隆制备与鉴定 (1)寡核苷酸的退火、纯化:用缓冲液溶解 DNA 单链片段。退火体系:正、反义模板链各 2 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1×退火 buffer 46 μL 。退火反应条件:95℃ 5 min,70℃ 10 min,缓慢降至 30℃,维持 30 min,缓慢降至 4℃。-20℃保存。将退火后产物用 2.0%低熔点琼脂糖凝胶电泳回收纯化,纯化具体步骤参照 AXYGEN 胶回收纯化试剂盒操作规程。(2)连接与转化:用 *Bam*H I/*Pst* I 双酶切载体,酶切产物电泳,胶回收纯化开环 pRNAT-U6. 2/Lenti 载体。*Pol* β siRNA 模板寡核苷酸胶回收产物 3 μL ,开环 pRNAT-U6. 2/Lenti 载体 1 μL ,T₄ DNA 连接酶 1 μL ,4℃过夜。将重组慢病毒载体转化到 DH5 α 感受态细菌中,取菌液 50 μL 涂于 Amp⁺ LB 平板,37℃过夜。(3)阳性克隆的 PCR 鉴定及测序:随机挑取若干菌落,扩增后煮沸裂解法提取细菌 DNA,用 pRNAT-U6. 2/Lenti 的插入鉴定通用引物 PCR 扩增、电泳,鉴定出阳性重组克隆,之后转平板培养 2 次,上法鉴定仍阳性者,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序进一步鉴定,鉴定正确的 3 种 siRNA 慢病毒表达载体分别命名为 pRNAT-U6. 2/Lenti- $\text{pol}\beta 1$ 、pRNAT-U6. 2/Lenti- $\text{pol}\beta 2$ 、pRNAT-U6. 2/Lenti- $\text{pol}\beta C$ 。

1.2.3 产生 siRNA 的慢病毒包装 将 9 μg ViraPower[™] Packaging Mix 和 3 μg pRNAT-U6. 2/Lenti- $\text{pol}\beta 1$ (pRNAT-U6. 2/Lenti- $\text{pol}\beta 2$ 或 pRNAT-U6. 2/Lenti- $\text{pol}\beta C$)表达质粒 DNA(共 12 μg)溶于 1.5 mL Opti-MEM[®] I 无血清培养液中,轻轻混匀,制得溶液 A。将 36 μL Lipofectamine[™] 2000 用 1.5 mL Opti-MEM[®] I 无血清培养液稀释,轻轻混匀,室

温孵育 5 min, 制得溶液 B。将稀释好的溶液 A 和 B 混合, 轻轻混匀。室温孵育 20 min, 使 DNA-脂质体复合物形成。胰酶消化并计数 293FT 细胞, 制备细胞密度为 1.2×10^6 /mL 的细胞悬液。将 DNA-脂质体复合物加至含 5 mL Opti-MEM[®] I 含血清培养液的 10 cm 组织培养皿(不含抗生素), 再加入 5 mL 制备好的 293FT 细胞悬浮液(共 6×10^6 细胞), 轻轻混匀, 置 CO₂ 培养箱 37℃ 孵育过夜。移去含 DNA-脂质体复合物的培养液, 换含 1 mol/L 丙酮酸钠的完全培养液。转染 48~72 h 后将含病毒上清液移至 15 mL 无菌锥形管。4℃ 100 000×g 离心 5 min, 除去细胞碎片。210 000×g 离心 90 min, 弃上清, 450 μL PBS 重悬。吸取病毒悬浮液至冷冻管分装, -80℃ 保存。

1.2.4 病毒效价测定 将 293FT 细胞按 2×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板中, 待 24 h 后感染病毒。取病毒原液作不同比例稀释(1:10³~1:10¹⁰), 每一浓度设 3 个复孔。按每孔 400 μL 加病毒稀释液至细胞培养板中, 37℃ 培养 4~6 h。换新鲜培养液, 继续培养 24 h, 荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数。按下述公式分别计算重组慢病毒的滴度: 病毒滴度(CTU/mL)=GFP 细胞阳性数×病毒上清稀释倍数/病毒感染液体积。

1.3 病毒感染 EC9706/cDDP 细胞 用胰蛋白酶消化 EC9706/cDDP 细胞, 以 2.5×10^5 细胞/孔的密度接种于 6 孔板上, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。接种 24 h 后, 按细胞与病毒 1:10 的比例加入病毒稀释液, 感染细胞 48 h。

1.4 *polβ* 表达的检测

1.4.1 半定量 RT-PCR 检测 分别用相关基因引物进行 PCR 扩增, 以 *β-actin* 作参照。PCR 扩增反应体系(30 μL): dH₂O 20.45 μL, 10×Buffer 3.0 μL, *Taq* 酶 0.15 μL, dNTP 2.4 μL, 上、下游引物各 1.0 μL, 模板(反转录产物)2.0 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环; 72℃ 终末延伸 5 min。

1.4.2 蛋白质印迹检测 收集转染前后的细胞, 裂解后收集上清, 参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书对蛋白质进行定量。每孔上样 50 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE, 电泳后利用电转移法将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜放入杂交袋

中, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 封闭, 4℃ 过夜。将封闭后的 PVDF 膜置于另一干净杂交袋中, 加入用封闭液稀释的一抗兔抗人 *polβ*(1:200) 中, 室温摇床振荡 1 h 或 4℃ 过夜, 取出漂洗; 再加用封闭液稀释的二抗羊抗兔多克隆抗体(1:1 500) 中, 室温摇床振荡 1 h, 取出进行漂洗、显色、定影、保存。

1.4.3 免疫荧光实验 将细胞用 PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 用 0.3% Triton X-100 打孔。20% 正常山羊血清封闭 20 min, 加一抗(兔抗人 *polβ* 多抗)4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗 3 次后加二抗(TRITC 标记的羊抗兔抗体)。暗环境 37℃ 孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次, 蒸馏水冲洗 5 min。水溶性封片剂封片。

1.5 细胞对顺铂敏感性的检测 采用 MTT 法检测细胞对顺铂的敏感性。取对数生长期细胞以 3×10^4 细胞/mL 密度接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL。24 h 后更换含不同终浓度顺铂的培养液, 每一浓度设 3 个复孔, 并设不含药空白对照组, 48 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 继续培养 4 h 后, 每孔加入二甲亚砜(DMSO) 200 μL, 充分混匀, 上酶标仪在波长 550 nm 处测定各孔光密度值(D)。顺铂对细胞的相对抑制率用公式计算: 相对抑制率(%)=(1-加药孔 D 值/对照孔 D 值)×100%; 50% 细胞生长抑制所需的药物浓度(IC₅₀)用 IC₅₀ 计算器软件计算; 耐药指数(RI)用公式计算: RI=耐药细胞 IC₅₀/亲本细胞 IC₅₀。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数间的比较采用方差分析, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 靶向 *polβ* 基因的 siRNA 慢病毒构建成功 将重组慢病毒载体转化 DH5α, 在 Amp⁺ LB 平板上经氨苄青霉素初筛, 挑取菌落, 用 pRNAT-U6.2/Lenti 插入通用鉴定引物对重组质粒进行 PCR 鉴定, 电泳结果见图 1。阳性者条带位于 538 bp 左右, 阴性者条带位于 480 bp 左右。测序结果与我们设计合成的序列完全一致, 说明本实验已把合成的双链 DNA 模板插入到了 pRNAT-U6.2/Lenti 中, 成功构建了

2个能靶向 *polβ* 基因的慢病毒载体 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2 及阴性对照载体 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C。经测定 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C 三种病毒的滴度分别为 2.1×10^7 、 2.0×10^7 、 2.3×10^7 CTU/mL。

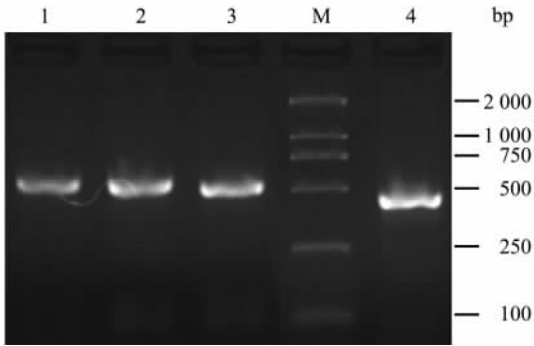


图 1 靶向 *polβ* 基因的 siRNA 慢病毒表达载体的 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR identification of lentiviral vector of siRNA specific for *polβ*

1: Positive clone pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1; 2: Positive clone pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2; 3: Positive clone pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C; 4: Negative clone; M: DNA marker

2.2 siRNA 慢病毒感染后下调 EC9706/cDDP 细胞 *polβ* 的表达 RT-PCR 检测显示,未感染 EC9706/cDDP 细胞及分别感染 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1 的 EC9706/cDDP 细胞内 *polβ* mRNA 的相对表达水平分别为 0.62 ± 0.03 、 0.67 ± 0.08 、 0.28 ± 0.05 、 0.09 ± 0.02 ,表明感染 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2 的细胞内 *polβ* mRNA 的表达明显低于未感染 EC9706/cDDP 及感染 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C 的细胞 ($P < 0.05$,图 2),与感染 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C 的细胞相比分别下调了 90.2% 和 54.8%。蛋白质印迹结果显示, pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2 对 *polβ* 蛋白的表达均有抑制作用,其中前者效果显著(图 3)。免疫荧光结果显示, pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1 感染 EC9706/cDDP 细胞后在荧光显微镜下发红色荧光的细胞数目少且荧光较弱(图 4),表明 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1 可有效抑制细胞内 *polβ* 的表达。

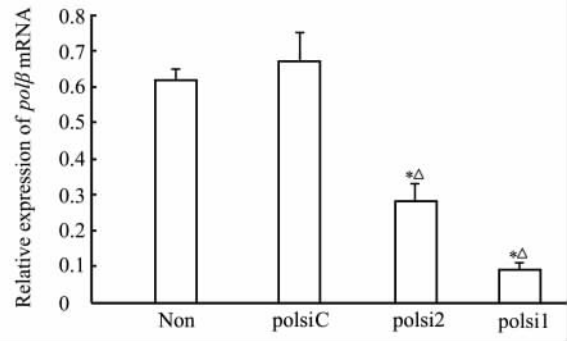


图 2 RT-PCR 检测 *polβ* mRNA 在不同慢病毒感染 EC9706/cDDP 细胞内的表达水平

Fig 2 Expression of *polβ* mRNA in EC9706/cDDP cells infected by different lentiviruses by RT-PCR

Non: Non-infected; polsiC: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C; polsi2: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2; polsi1: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1; cDDP: Cisplatin. * $P < 0.05$ vs non group; $\Delta P < 0.05$ vs polsiC group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

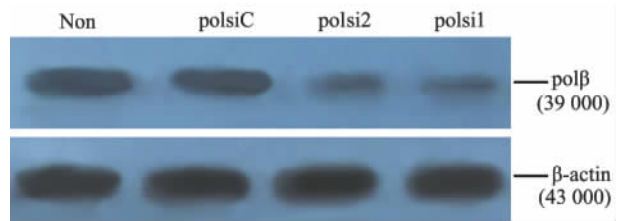


图 3 蛋白质印迹检测 *polβ* 蛋白在不同慢病毒感染 EC9706/cDDP 细胞内的表达

Fig 3 Expression of *polβ* protein in EC9706/cDDP cells infected by different lentiviruses by Western blotting analysis Non: Non-infected; polsiC: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C; polsi2: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2; polsi1: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1; cDDP: Cisplatin

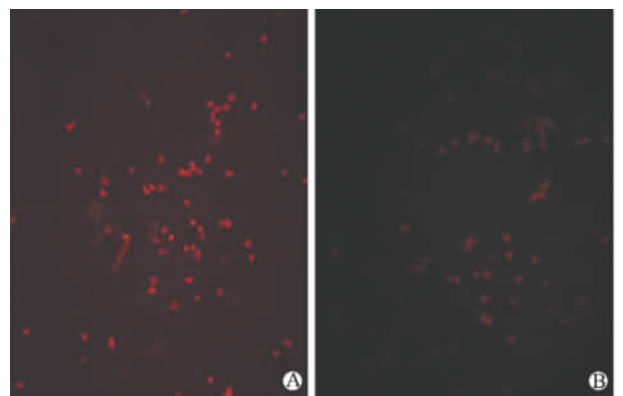


图 4 免疫荧光检测 *polβ* 蛋白在慢病毒感染 EC9706/cDDP 细胞内的表达

Fig 4 Expression of *polβ* in EC9706/cDDP cells infected by lentiviruses by immunofluorescence assay

A: Non-infected; B: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1. cDDP: Cisplatin

2.3 siRNA 慢病毒感染后部分逆转 EC9706/cDDP 细胞对顺铂的耐药性 经 MTT 法检测,一系列不同浓度顺铂处理细胞 48 h 后,顺铂以剂量依赖方式抑制 EC9706/cDDP 细胞增殖(图 5)。亲本细胞 EC9706 对顺铂的 IC_{50} 为 $4.02 \mu\text{g}/\text{mL}$,感染 pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1、pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C 的/cDDP 细胞及未感染 EC9706/cDDP 细胞对顺铂的 IC_{50} 分别为 55.71、62.41、63.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其耐药指数分别为 13.9、15.5、15.7,其中前者与后者相比差异有统计学意义($P < 0.05$),表明沉默 *polβ* 的表达可部分逆转 EC9706/cDDP 细胞对顺铂的耐药性。

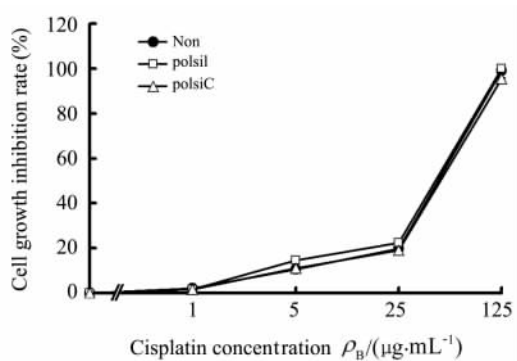


图 5 MTT 法检测顺铂对慢病毒感染后 EC9706/cDDP 细胞生长的抑制

Fig 5 Growth inhibition effect of cisplatin on EC9706/cDDP cells infected by lentivirus by MTT

Non: Non-infected; polsiC: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*C; polsi2: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*2; polsi1: pRNAT-U6. 2/Lenti-*polβ*1; cDDP: Cisplatin

3 讨论

研究肿瘤耐药的产生机制及其逆转策略对提高肿瘤的化疗效果、延长患者的生存期有着重要意义。DNA 损伤修复是活细胞利用各种途径对其基因组出现的损伤产生的保护性反应,在很大程度上保证了遗传物质的稳定性以及复制、转录的忠实性和准确性,使生命活动正常进行。许多化疗药物通过各种机制引起肿瘤细胞内 DNA 损伤以抑制肿瘤细胞的增殖,如铂类化疗药的细胞毒作用与 DNA 损伤有关,若损伤 DNA 的修复加强,抗肿瘤药物就不能发挥作用,导致耐药性的产生。近年来 DNA 损伤修复过程中的 *polβ* 与肿瘤耐药的关系逐渐引起人们的注

意,研究表明 *polβ* 的高表达与肿瘤细胞对顺铂等的耐药有关^[7-9],有学者发现使用 *polβ* 抑制剂能够提高肿瘤细胞对顺铂的反应性^[10]。使用 DNA 修复抑制剂提高肿瘤的治疗效果被认为具有重要应用前景^[11]。我们前期研究也观察到了食管癌顺铂耐药性与 *polβ* 表达的关系^[12],并发现抗凋亡因子 HAX-1 在增强 *polβ* 表达的同时也增强了食管癌细胞对顺铂的耐药性^[13]。本研究旨在观察抑制 *polβ* 表达对食管癌细胞顺铂耐药性的影响。

以特异性 shRNA 介导的 RNAi 技术,为逆转肿瘤细胞多药耐药的治疗开创了新的思路^[14-17]。Albertella 等^[18]转染靶向 *polβ* 的 siRNA 至 SKOV3 细胞和 HeLa 细胞系,发现转染 siRNA 后细胞系对顺铂的敏感性提高。韩丽萍等^[19]观察到,转染靶向 *polβ* 的 siRNA 组的人卵巢癌 HO-8910 细胞的活细胞数明显少于正常细胞组和空载体对照组,随着顺铂浓度的增加差别越来越明显,呈浓度依赖性;*polβ* 基因沉默后,人卵巢癌 HO-8910 细胞系对顺铂的敏感性增加。本研究用靶向 *polβ* 的 siRNA 重组慢病毒感染 EC9706/cDDP 后可下调 *polβ* 的 mRNA 及蛋白表达水平,对 cDDP 的耐药指数由 15.7 降为 13.9,进一步证明 *polβ* 的表达与细胞的顺铂耐药性有关,同时表明利用 RNAi 技术可增强食管癌细胞对顺铂的敏感性。

本实验中虽然 *polβ* 基因的沉默可使 EC9706/cDDP 细胞耐药性降低,但其 IC_{50} 未达到敏感细胞水平($4.02 \mu\text{g}/\text{mL}$),原因可能是这个基因在 EC9706/cDDP 细胞的耐药性中仅起部分作用,除此之外,还有其他基因或机制的参与^[5],故单纯封闭该基因以逆转耐药的作用有限。结合前期研究^[5-7],我们认为 EC9706/cDDP 细胞对顺铂耐药性增强可能与细胞内 *polβ* 蛋白表达增加有关。*Polβ* 表达增加可以导致 DNA 修复能力增强及产生跨损伤合成,从而对顺铂形成耐受。但是由于 *polβ* 具有错误倾向,易产生突变,本实验中这种增加表达的 *polβ* 极有可能产生了突变,有待进一步研究。阐明 *polβ* 在降低顺铂蓄积、修复顺铂-DNA 加合物以及诱发细胞凋亡的分子生物学机制是我们下一步的工作方向。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Weissbach A, Schlabach A, Fridlender B, Bolden A. DNA polymerases from human cells[J]. *Nat New Biol*, 1971, 231:167-170.
- [2] Burgers P M. Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair[J]. *Chromosoma*, 1998, 107:218-227.
- [3] Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol R W, Wilson S H, Dogliotti E. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells[J]. *Biochemistry*, 1998, 37:3575-3580.
- [4] Matsuda T, Bebenek K, Masutani C, Hanaoka F, Kunkel T A. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase-eta[J]. *Nature*, 2000, 404:1011-1013.
- [5] 李敏, 王志举, 付庆, 赵国强, 董子明. 人食管癌顺铂耐药细胞系的建立及耐药相关基因的筛选[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17:18-20.
- [6] 李敏, 王志举, 李文涛, 董子明. 人食管癌顺铂耐药细胞系 EC9706/cDDP 的建立及其生物学特征[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14:3257-3260.
- [7] 李敏, 臧文巧, 付庆, 李文涛, 董子明. Pol β 高表达与食管癌细胞耐药的相关性[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28:1065-1068.
- [8] Illuzzi J L, Wilson D M 3rd. Base excision repair: contribution to tumorigenesis and target in anticancer treatment paradigms[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 3922-3936.
- [9] Ali-Osman F, Berger M S, Rairkar A, Stein D E. Enhanced repair of a cisplatin-damaged reporter chloramphenicol-O-acetyltransferase gene and altered activities of DNA polymerases alpha and beta, and DNA ligase in cells of a human malignant glioma following *in vivo* cisplatin therapy[J]. *J Cell Biochem*, 1994, 54:11-19.
- [10] Boudsocq F, Benaim P, Canitrot Y, Knibiehler M, Auseil F, Capp J P, et al. Modulation of cellular response to cisplatin by a novel inhibitor of DNA polymerase beta[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67:1485-1492.
- [11] Barakat K, Gajewski M, Tuszynski J A. DNA repair inhibitors; the next major step to improve cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12:1376-1390.
- [12] 崔华娟, 金戈, 杨洪艳, 黄幼田, 郑智敏, 赵继敏, 等. 人食管癌顺铂耐药细胞系 DNA 聚合酶 β 的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40:17-19.
- [13] Sun S J, Feng L, Zhao G Q, Dong Z M. HAX-1 promotes the chemoresistance, invasion, and tumorigenicity of esophageal squamous carcinoma cells[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57:1838-1846.
- [14] Li H, Zhou S, Li T, Liu Z, Wu J, Zeng G, et al. Suppression of BCRP expression and restoration of sensitivity to chemotherapy in multidrug-resistant HCC cell line HEPG2/ADM by RNA interference[J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59:2238-2242.
- [15] Zhao L J, Xu H, Qu J W, Zhao W Z, Zhao Y B, Wang J H. Modulation of drug resistance in ovarian cancer cells by inhibition of protein kinase C-alpha (PKC- α) with small interference RNA (siRNA) agents[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13:3631-3636.
- [16] Yin Q, Shen J, Chen L, Zhang Z, Gu W, Li Y. Overcoming multidrug resistance by co-delivery of Mdr-1 and survivin-targeting RNA with reduction-responsive cationic poly(β -amino esters)[J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 6495-6506.
- [17] Maddalena F, Laudiero G, Piscazzi A, Secondo A, Scorzello A, Lombardi V, et al. Sorcin induces a drug-resistant phenotype in human colorectal cancer by modulating Ca²⁺ homeostasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71:7659-7669.
- [18] Albertella M R, Lau A, O'Connor M J. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2005, 4:583-593.
- [19] 韩丽萍, 刘娟芳, 赵国强, 董子明. RNA 干扰靶向沉默 *pol* β 基因对人卵巢癌细胞增殖活性及对化疗药物敏感性的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38:197-199.

[本文编辑] 孙岩