

网络出版时间: 2023-12-28 11:40:31 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0757.016>

沉默 *MPZL1* 调控 β -catenin 对 A549/Tax 细胞干性及耐药性的影响

臧超^{1,2}, 戈巧^{1,2}, 李超^{1,2}, 洪海宁³, 李伟¹, 苏君¹, 黎传奎¹, 陈力维¹, 王安生¹

摘要 目的 探讨髓磷脂蛋白零样蛋白 1 (*MPZL1*) 沉默后是否通过调控 β -catenin 表达对 A549/Tax 耐药性和细胞干性产生影响。方法 采用不同浓度阿霉素和紫杉醇处理 A549 和 A549 紫杉醇耐药性 (A549/Tax) 细胞, 观察两种细胞的耐药性差异。实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 和 Western blot 检测 A549 和 A549/Tax 细胞中 *MPZL1* 的表达量差异。对 A549/Tax 细胞沉默或者过表达 *MPZL1*, 进一步将细胞分为对照 (control) 组、短发卡 RNA 阴性对照 (sh-NC) 组、*MPZL1* 沉默 (sh-*MPZL1*) 组、过表达阴性对照 (OE-NC) 组、*MPZL1* 过表达 (OE-*MPZL1*) 组, 运用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 和平板克隆实验分别检测 *MPZL1* 的表达变化对 A549/Tax 细胞增殖和克隆形成能力的影响。Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 抑制剂 XAV939 和激活剂 CHIR-99201 处理细胞后, 不同蛋白的表达变化。结果 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的半数抑制浓度 (IC_{50}) 较 A549 细胞明显增加 ($P < 0.01$)。沉默 *MPZL1* 在 A549/Tax 中呈更高的表达趋势。*MPZL1* 敲除后 A549/Tax 对阿霉素和紫杉醇的 IC_{50} 分别为 2.731 mg/ml 和 4.939 μ g/ml, 较阴性对照组的 4.541 mg/ml 和 13.55 μ g/ml 降低 ($P < 0.01$)。CCK-8 和克隆形成实验结果显示, *MPZL1* 敲除抑制肺癌 A549/Tax 细胞的增殖活力和克隆形成能力 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示, 与阴性对照组相比, *MPZL1*、肿瘤干性相关蛋白 (CD44 和 CD133)、多药耐药蛋白 1 (MDR1)、肺耐药相关蛋白 (LRP) 和 β -catenin 在 sh-*MPZL1* 中的表达水平明显减少 ($P < 0.01$)。此外, XAV939 可抑制 *MPZL1*、CD44、CD133、MDR1、LRP 和 β -catenin 的表达。CHIR-99201 处理细胞后部分逆转敲除 *MPZL1* 对上述蛋白的抑制作用。结论 *MPZL1* 在肺癌 A549/Tax 细胞中高表达。敲除 *MPZL1* 可抑制肿瘤干性和细胞增殖, 增强肺癌 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的敏感性。

关键词 *MPZL1*; 肿瘤干性; A549/Tax 肺癌细胞; 多药耐药; 紫杉醇

2023-11-16 接收

基金项目: 安徽省科研编制计划项目 (编号: 2022AH051513)

作者单位: ¹ 蚌埠医学院第一附属医院胸外科, 蚌埠 233004² 蚌埠医学院研究生院, 蚌埠 233030³ 蚌埠医学院附属第三人民医院胸外科, 蚌埠 233000

作者简介: 臧超, 男, 硕士研究生;

王安生, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 807435169@qq.com

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0099-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.016

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的发病人数约占肺癌的 80%~85%。肺癌的治疗借助包括手术、放疗、化疗、免疫疗法或分子靶向治疗^[1-3]。紫杉醇是基础的化疗药物, 然而多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 会降低紫杉醇的疗效, 导致肿瘤复发, 阻碍患者的治疗进程。MDR 是影响药物临床使用效果的最主要原因^[4]。因此, 开发针对 MDR 发展的有效分子靶标具有重要意义。癌症干细胞样特性是化疗耐药性产生的重要机制之一^[5-6]。髓磷脂蛋白零样蛋白 1 (myelin protein zero like 1, *MPZL1*) 是一种参与细胞外基质诱导的信号转导的跨膜糖蛋白, 在多种癌症的病理过程中扮演重要角色, 其高表达会增强肿瘤细胞的增殖和迁移^[7-9]。前期的研究^[10]证实沉默 *MPZL1* 可抑制 NSCLC 的进展。然而 *MPZL1* 对 NSCLC 的 MDR 作用尚未有明确研究。本研究利用 A549 紫杉醇耐药性 (A549 Taxol resistant, A549/Tax) 细胞探讨 *MPZL1* 对 NSCLC 增殖、干细胞样特性和耐药性的影响及其作用机制, 为开发新的 NSCLC 治疗策略提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 细胞、设备与主要试剂 肺癌细胞系 A549 购自中科院上海细胞库; 紫杉醇耐药性 A549/Tax 细胞系购自上海研生实业有限公司。阿霉素和紫杉醇购自西安齐岳生物科技有限公司; *MPZL1* 过表达质粒和敲除慢病毒及其阴性对照均由上海吉凯基因医学技术股份有限公司设计提供; 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 逆转录试剂盒和 cDNA 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司; Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培养基购自于上海源培生物科技股份有限公司; *MPZL1*、肺癌耐药相关

蛋白(lung resistance protein, LRP)、CD44、CD133、 β -catenin 和 MDR1 一抗购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;XAV939 和 CHIR-99201 购自美国 Selleckchem; Real-time PCR 仪(型号: ABI 7500) 购自美国 Applied Biosystems; 二氧化碳培养箱(型号: 3111); 生物安全柜(型号: 1300-A2) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 酶标仪(型号: Infinite F50) 购自瑞士 Tecan 公司。

1.2 细胞培养及转染 A549 细胞和 A549/Tax 细胞均在 RPMI-1640 培养基中培养, 该培养基含有 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, A549/Tax 细胞培养液中添加 0.5 μ g/ml Tax 维持细胞耐药性, 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。细胞生长至 80% 融合时, 按照慢病毒转染和质粒转染说明书对细胞进行转染, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和 Western blot 检测转染后 MPZLI 的表达水平。

1.3 不同药物处理 将 A549/Tax 细胞系分为 5 组: 对照(control) 组、短发卡 RNA 阴性对照(small hairpin RNA negative control, sh-NC) 组、MPZLI 沉默慢病毒转染(sh-MPZLI) 组、过表达阴性对照(OE-NC) 组和 MPZLI 过表达(OE-MPZLI) 组。将不同组的细胞采用不同浓度的阿霉素(0.15、0.30、0.60、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 mg/ml) 和紫杉醇(0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μ g/ml) 进行处理, 采用 CCK-8 实验检测细胞活力, 计算细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.4 qRT-PCR 利用 TRIzol 法提取获得每组细胞的总 RNA, 然后采用反向逆转录合成 cDNA, 以上述 cDNA 作为基础模板, 以 Actin 作为内参, 使用两步法进行实时定量 PCR 实验, 最终 Ct 值采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分析数据。预变性(95 $^{\circ}$ C、30 s); PCR 循环反应(95 $^{\circ}$ C、5 s; 60 $^{\circ}$ C、30 s), 共 33 次反应循环。所有试验均重复 3 次。

1.5 Western blot 检测蛋白的表达水平 采用 radio immunoprecipitation assay (RIPA) 裂解提取法提取蛋白质。使用 bicinchoninic acid assay (BCA) 法测定总蛋白浓度, 加入 1 \times 的蛋白上样缓冲液混匀, 95 $^{\circ}$ C 自发变性后进行凝胶电泳和转膜, Tris buffered saline with Tween 20 (TBST) 洗涤 3 次, 使用 5% 牛血清白蛋白快速封闭 30 min, MPZLI、LRP、CD44、

CD133、 β -catenin 和 MDR1 一抗于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。TBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, 采用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和兔抗羊 IgG 二抗(1:8000) 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 曝光 30 s 即可完成显影。采用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值, 分析蛋白水平。

1.6 CCK-8 法检测各组细胞活力 将细胞接种于 96 孔板中, 每孔 2000 个细胞, 待细胞贴壁后, 采用 10 μ g/ml 的紫杉醇处理 24 h, 每组设 3 个平行实验孔。培养 48 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 继续培养 2 h 后, 以 450 nm 波长检测每孔吸光度值。

1.7 克隆形成实验检测各组细胞增殖 将各组细胞转染 2 d 后, 种板, 持续培养 11 d。当克隆完成后, 在显微镜下对细胞进行拍照, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS) 洗 1 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 ml 固定 30 min, PBS 洗 1 次; 每孔加入结晶紫染液 1 ml 染色 10 min; PBS 洗涤细胞数次, 晾干, 拍照。

1.8 统计学处理 采用 Graphad Prism 8.0 软件进行统计分析, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 来表示, Student's *t* 检验用来计算组间比较 3 组及以上数据差异采用方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞和 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的药物敏感性变化 A549 细胞对阿霉素和紫杉醇的 IC₅₀ 分别为 2.70 mg/ml 和 5.29 μ g/ml, A549/Tax 对阿霉素和紫杉醇的 IC₅₀ 值分别为 4.77 mg/ml 和 13.36 μ g/ml。见图 1。

2.2 MPZLI 在 A549 和 A549/Tax 细胞中的表达 MPZLI 在 A549/Tax 细胞中的表达量较高, 是 A549 细胞中的 2 倍左右, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 慢病毒转染和过表达质粒转染 A549/Tax 细胞后 MPZLI mRNA 和蛋白的表达 转染后 sh-NC 和 OE-NC 对 MPZLI mRNA 和蛋白的表达水平没有影响, sh-MPZLI 组 MPZLI 的 mRNA 和蛋白表达水平降低($P < 0.01$), OE-MPZLI 组 MPZLI 的 mRNA 和蛋白表达水平增加($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 MPZLI 敲除和过表达对 A549/Tax 药物敏感性的影响 采用如上 1.2.2 项中的不同浓度的阿霉素和紫杉醇处理转染 sh-MPZLI 和 OE-MPZLI 的 A549/Tax 细胞。与 NC 组阿霉素和紫杉醇的 IC₅₀ 值

(分别为 4.541 mg/ml 和 13.55 μ g/ml) 相比 sh-MPZL1 组 IC₅₀ 浓度(分别为 2.731 mg/ml 和 4.939 μ g/ml) 降低,OE-MPZL1 组的 IC₅₀ 浓度(分别为 8.626 mg/ml 和 26.22 μ g/ml) 增加。见图 4。

2.5 MPZL1 敲除和过表达对 A549/Tax 细胞增殖能力的影响 CCK-8 结果显示,相比 control 组,sh-NC 和 OE-NC 组 A549/Tax 细胞吸光度值差异无统

计学意义,OE-MPZL1 组细胞吸光度值增加($P < 0.01$),而 sh-MPZL1 组细胞吸光度值降低($P < 0.01$)。表明敲除 MPZL1 抑制 A549/Tax 细胞增殖。见图 5A。相比 control 组,sh-NC 组和 OE-NC 组,sh-MPZL1 组的细胞克隆数量降低($P < 0.01$),A549/Tax 细胞增殖能力降低,而 OE-MPZL1 组克隆数量增多($P < 0.01$)。见图 5B、C。

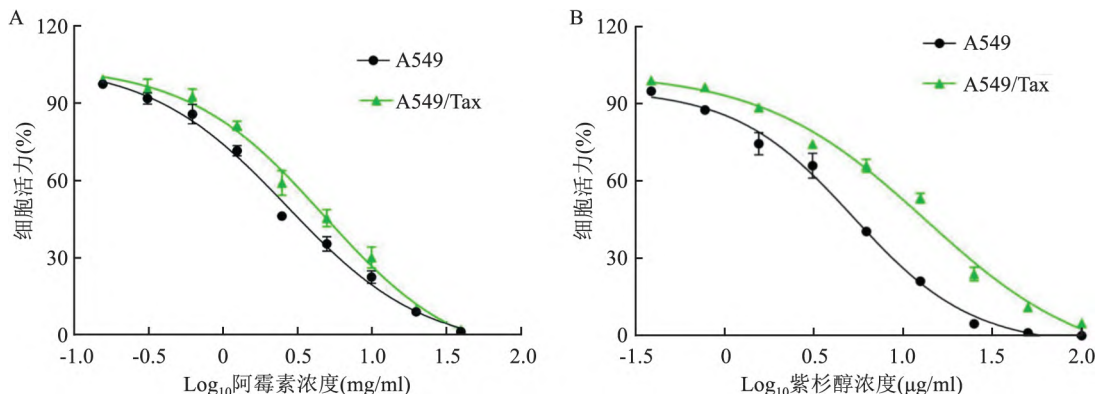


图1 CCK-8 检测 A549 和 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的敏感性变化

A: 不同浓度阿霉素处理 A549 和 A549/Tax 细胞的增殖活力曲线; B: 不同浓度紫杉醇处理 A549 和 A549/Tax 细胞的增殖活力曲线

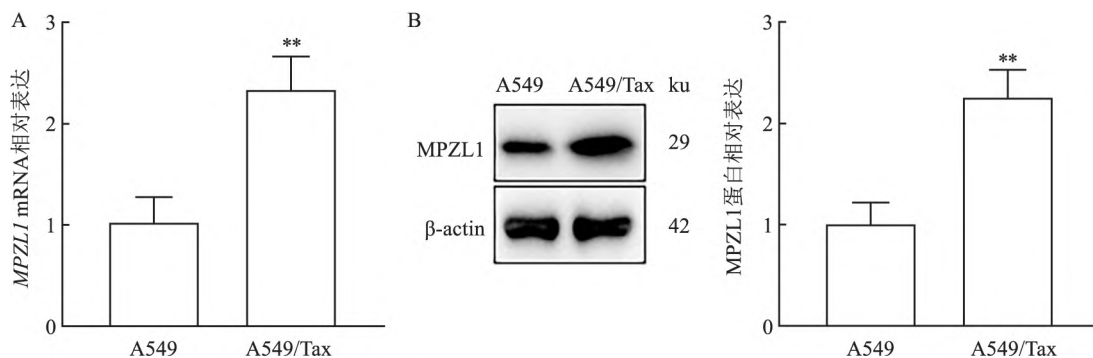


图2 QRT-PCR 和 Western blot 检测 MPZL1 mRNA 和蛋白在细胞中的表达

A: qRT-PCR 检测 MPZL1 mRNA 的表达; B: Western blot 检测 MPZL1 蛋白的表达结果及相对表达定量图; 与 A549 细胞比较: ** $P < 0.01$

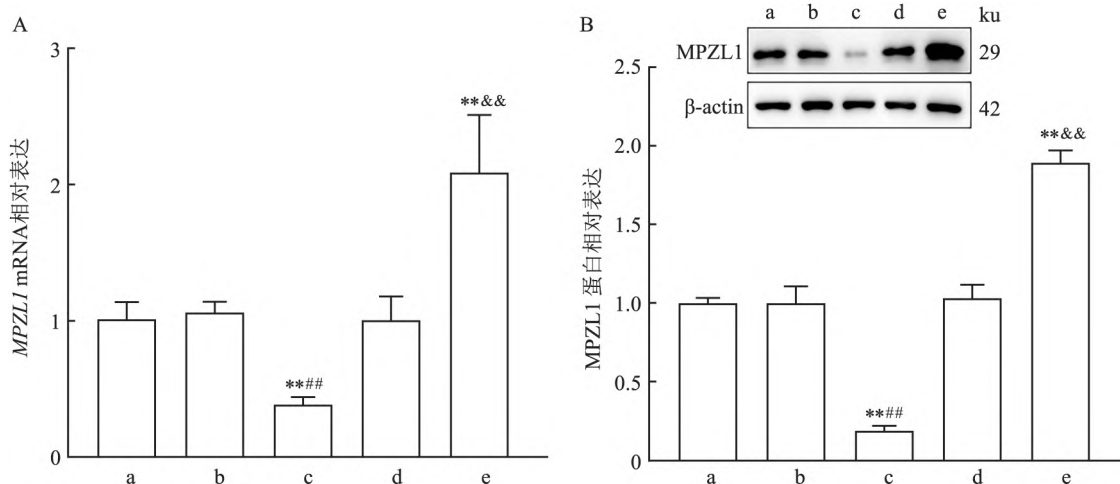


图3 转染后 MPZL1 mRNA 和蛋白在 A549/Tax 细胞中的表达水平差异

A: QRT-PCR 检测 MPZL1 mRNA 的表达; B: Western blot 检测 MPZL1 蛋白的表达结果及相对表达定量图; a: control 组; b: sh-NC 组; c: sh-MPZL1 组; d: OE-NC 组; e: OE-MPZL1 组; 与 control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 sh-NC 组比较: ## $P < 0.01$; 与 OE-NC 组比较: && $P < 0.01$

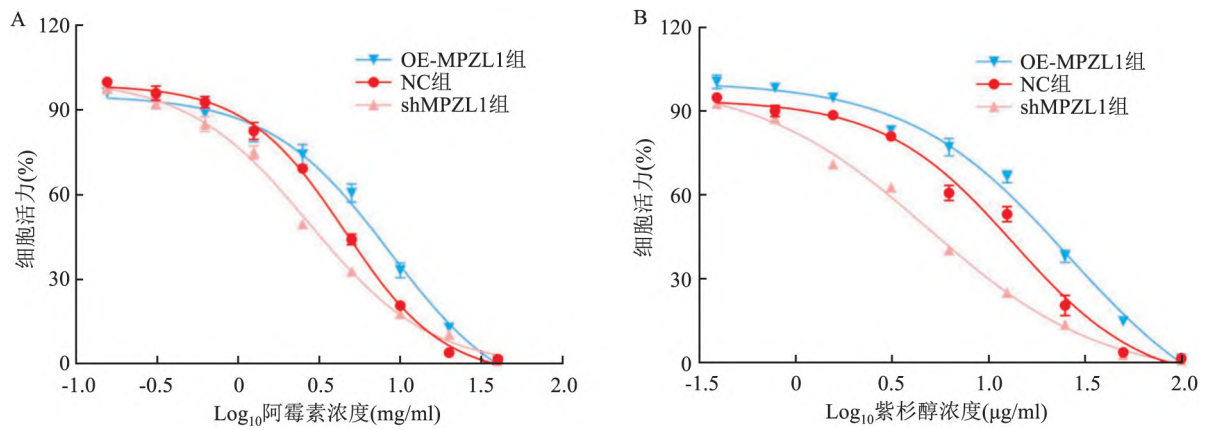


图4 CCK-8 检测 *MPZL1* 转染后 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的敏感性变化

A: CCK-8 检测 *MPZL1* 沉默和过表达后 A549/Tax 细胞对阿霉素的敏感性变化; B: CCK-8 检测 *MPZL1* 沉默和过表达后 A549/Tax 细胞对紫杉醇的敏感性变化

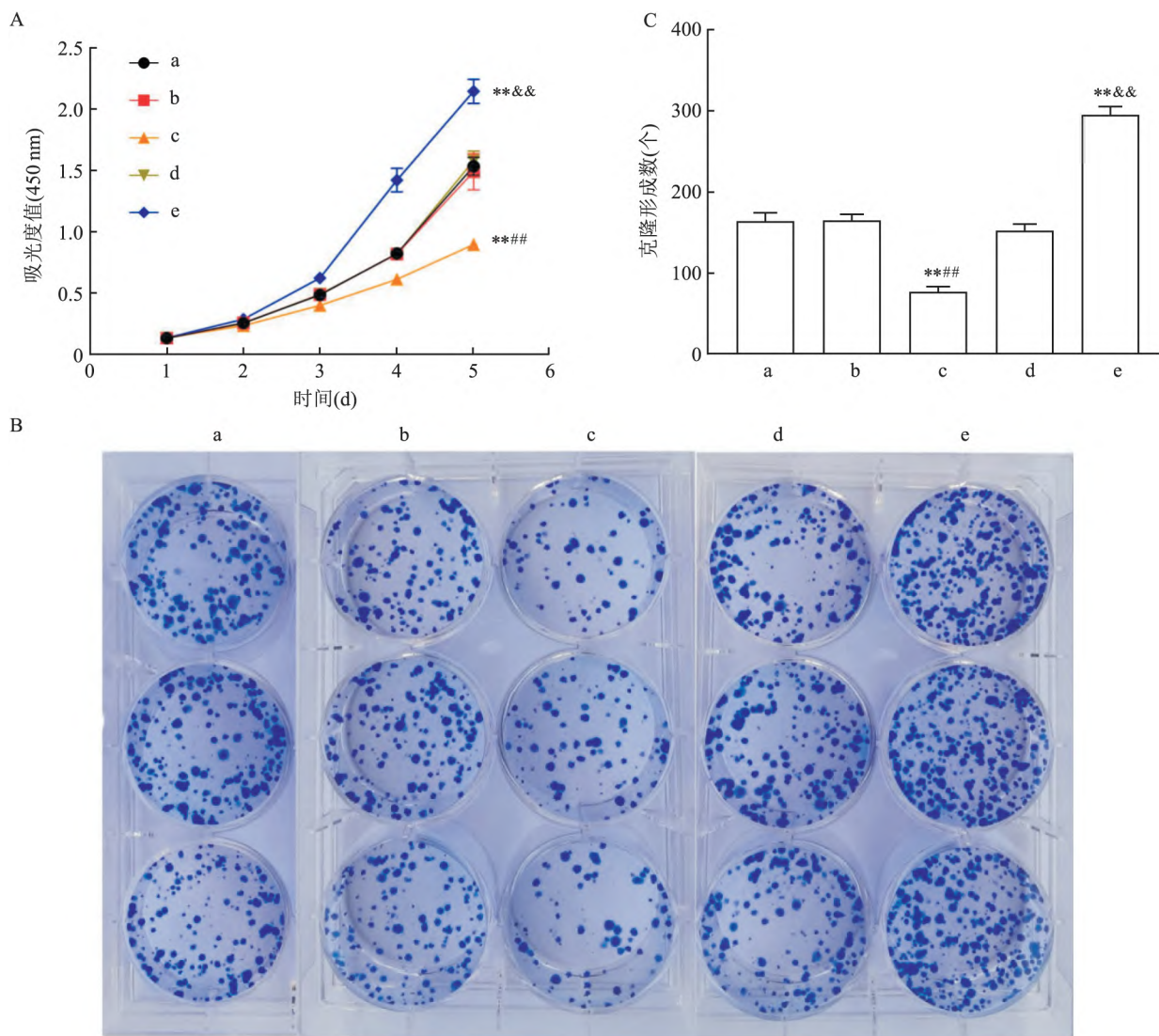


图5 CCK-8 和克隆形成实验检测 A549/Tax 细胞增殖能力

A: CCK-8 检测各组细胞增殖变化; B: 克隆形成实验结果; C: 克隆形成实验的定量统计图; a: control 组; b: sh-NC 组; c: sh-*MPZL1* 组; d: OE-NC 组; e: OE-*MPZL1* 组; 与 control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 sh-NC 组比较: ## $P < 0.01$; 与 OE-NC 组比较: && $P < 0.01$

2.6 添加 Wnt/ β -catenin 抑制剂 XAV939 和激活剂 CHIR-99021 对 A549/Tax 细胞中 MPZL1 mRNA 的表达水平变化的影响 相对于 NC 组, Wnt/ β -catenin 抑制剂 XAV939 组和 sh-MPZL1 组的 A549/Tax 细胞 MPZL1 的表达水平均降低, 其中 sh-MPZL1 组的 MPZL1 的表达水平最低。sh-MPZL1 + CHIR-99021 组 MPZL1 的表达水平较 sh-MPZL1 组增加 ($P < 0.05$) 见图 6。

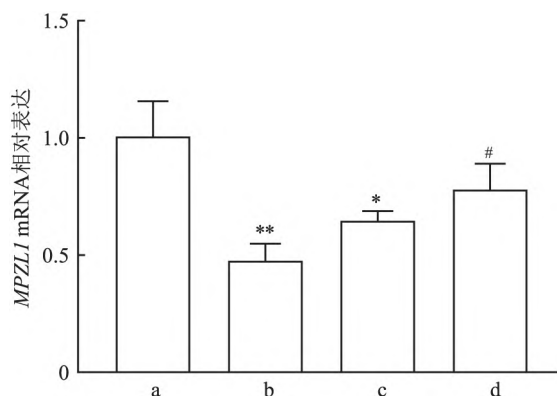


图6 QRT-PCR 检测细胞中 MPZL1 mRNA 的相对表达水平
a: NC 组; b: sh-MPZL1 组; c: XAV939 组; d: sh-MPZL1 + CHIR-99021 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 sh-MPZL1 组比较: # $P < 0.05$

2.7 MPZL1、CD44、CD133、 β -catenin、MDR1 和 LRP 蛋白在 A549/Tax 细胞中的表达 Western

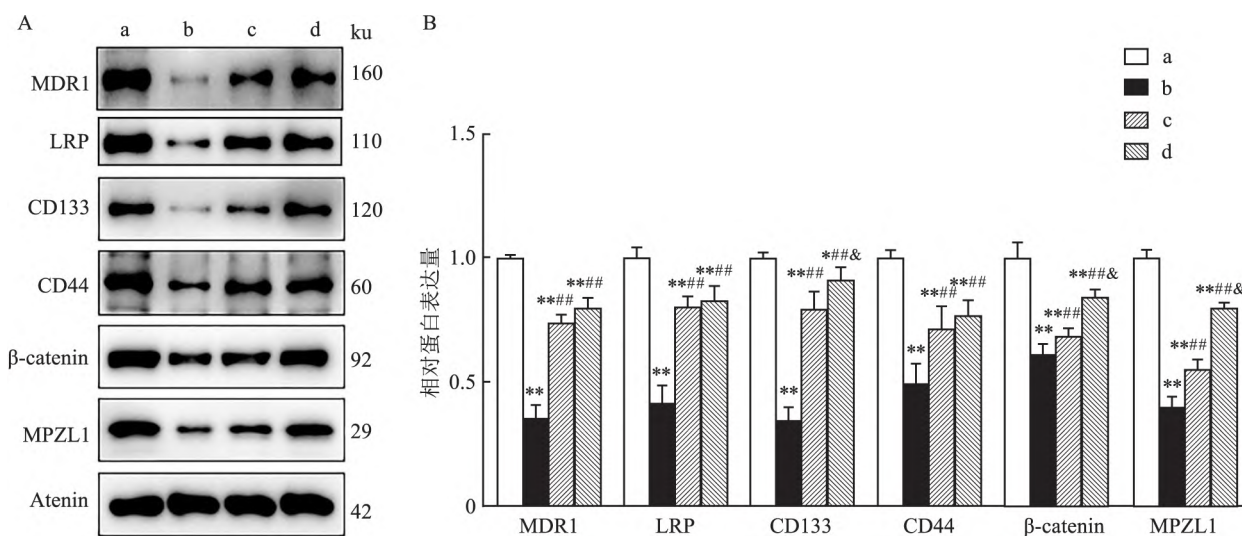


图7 Western blot 检测 MDR1、LRP、CD133、CD44、 β -catenin 和 MPZL1 在细胞中的表达水平变化

A: Western blot 检测 A549/Tax 细胞中 MDR1、LRP、CD133、CD44、 β -catenin 和 MPZL1 的蛋白表达水平变化; B: 蛋白相对表达定量图; a: NC 组; b: sh-MPZL1 组; c: XAV939 组; d: sh-MPZL1 + CHIR-99021 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 sh-MPZL1 组比较: ## $P < 0.01$; 与 XAV939 组比较: & $P < 0.05$

blot 结果显示, sh-MPZL1 组和 XAV939 组 MPZL1、MDR1、LRP、CD44、CD133 和 β -catenin 的表达水平明显低于 NC 组 ($P < 0.01$)。加入 CHIR-99021 激活剂后, XAV939 组及 sh-MPZL1 + CHIR-99021 组 MPZL1、MDR1、LRP、CD44、CD133 和 β -catenin 表达水平较 sh-MPZL1 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 7。

3 讨论

MPZL1 是一种与肿瘤发展高度相关的表面糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族, 与髓磷脂蛋白 0 (髓磷脂的主要结构蛋白) 具有显著序列同源性的细胞外片段^[11]。MPZL1 在多种细胞中表达, 这表明它可能在细胞中发挥重要功能。然而, MPZL1 在人类癌症中的功能作用和临床意义在很大程度上仍是未知的。目前, MPZL1 基因已被发现其异常激活与各种类型癌症的发生及转移有着密切的联系, 其在肝癌、卵巢癌等中的作用已有报道。Chen et al^[8] 发现 MPZL1 的表达水平与卵巢癌症的恶性特征有关。MPZL1 的过度表达会增加 Src 激酶的磷酸化, 磷酸化的 Src 激酶会诱导前转移蛋白 p130 和 cor-tactin 的磷酸化和活化, 最终显著地促进了卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭。Feng et al^[7] 的研究显示, MPZL1 促进 NSCLC 转移的机制之一是通过上调 Collagen Type XI Alpha 1 Chain (COL11A1) 的表达。

本研究中 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的敏感性较 A549 细胞显著降低。通过检测 MPZL1 在 A549 和 A549/Tax 细胞中的表达差异, MPZL1 的 mRNA 和蛋白水平在 A549/Tax 细胞中均呈现更高的表达趋势。随后,慢病毒和过表达质粒转染的方式敲除和过表达 MPZL1 并采用不同浓度阿霉素和紫杉醇处理 A549/Tax 细胞。结果显示,敲除 MPZL1 后 A549/Tax 细胞的 IC₅₀ 值降低,表现为细胞对阿霉素和紫杉醇的敏感性增强。MPZL1 过表达后, A549/Tax 细胞的 IC₅₀ 值进一步增加,表明 A549/Tax 细胞对阿霉素和紫杉醇的敏感性降低。CCK-8 和平板克隆形成实验的结果显示,敲除 MPZL1 的表达会显著抑制 A549/Tax 细胞的增殖能力。反之,过表达 MPZL1 会增强 A549/Tax 细胞的活力,促进细胞增殖。本研究结果证实了 MPZL1 对 A549/Tax 细胞化疗药物敏感性产生影响。

MDR1 与肿瘤的原发性耐药性有关。研究表明 MDR1 的过表达与多种肿瘤的耐药性相关^[12]。肺耐药相关蛋白(LRP)是一种人类主要穹窿蛋白(MVP),以细胞类型依赖性的方式与癌症细胞的耐药性有关^[13]。该研究结果显示,敲除 MPZL1 后 MDR1 和 LRP 表达量均显著降低。提示抑制 MPZL1 可抑制 A549/Tax 的耐药性。Wnt/ β -catenin 信号是癌细胞干性发展的重要途径^[14],为了探究 MPZL1 对耐药细胞干细胞样特性影响的潜在机制,本研究进一步采用 Wnt/ β -catenin 信号的抑制剂和激活剂处理 A549/Tax 细胞,结果显示,敲除 MPZL1 和 XAV939 的使用均可降低 CD44、CD133 和 β -catenin 的表达水平。此外,当加入 CHIR-99021 后,敲除 MPZL1 对 CD44、CD133 和 β -catenin 的表达抑制作用被部分逆转。因此认为敲除 MPZL1 对 A549/Tax 细胞的抑制作用与 Wnt/ β -catenin 信号有关。

综上所述,MPZL1 在肺癌细胞中具有高水平的表达,与 NSCLC 细胞系的增殖、迁移的能力密切相关。敲除 MPZL1 可通过调控癌细胞干性抑制肺癌 A549/Tax 细胞的多药耐药性,潜在作用机制可能与 Wnt/ β -catenin 信号有关。该研究的局限性在于,一方面仅对一种细胞进行了研究,耐药性研究仅使用了紫杉醇和阿霉素;另一方面研究对于肿瘤细胞干细胞样特性的研究仅选择了两个因子,未来需要增加研究指标;最后本研究的重点在体外细胞研究,无法反映体内多药耐药性的动态变化,未来将着重于在多种细胞和动物模型中探讨 MPZL1 的下调是否会推动 NSCLC 多药耐药性的治疗进展。

参考文献

- [1] Yu W, Hua Y, Qiu H, et al. PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and β -catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 506.
- [2] Mithoowani H, Febraro M. Non-small-cell lung cancer in 2022: a review for general practitioners in oncology [J]. Curr Oncol, 2022, 29(3): 1828-39.
- [3] Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, et al. Treatment of non-small cell lung cancer with EGFR-mutations [J]. J UOEH, 2019, 41(2): 153-63.
- [4] Vaidya F U, Chhipa A S, Mishra V, et al. Molecular and cellular paradigms of multidrug resistance in cancer [J]. Cancer Rep (Hoboken), 2022, 5(12): e1291.
- [5] Zhang J, Wang S, Bai Y, et al. miR-197-3p promotes osteosarcoma stemness and chemoresistance by inhibiting SPOPL [J]. J Clin Med, 2023, 12(3): 1177.
- [6] Zhu M, Zhang P, Yu S, et al. Targeting ZFP64/GAL-1 axis promotes therapeutic effect of nab-paclitaxel and reverses immunosuppressive microenvironment in gastric cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 14.
- [7] Feng J, Ouyang H, Wang J, et al. MPZL1 upregulation promotes tumor metastasis and correlates with unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer [J]. Carcinogenesis, 2022, 43(10): 919-29.
- [8] Chen D, Cao L, Wang X. MPZL1 promotes tumor cell proliferation and migration via activation of Src kinase in ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 42(2): 679-87.
- [9] Tan D, Zhang W, Tao Y, et al. PZR promotes metastasis of colorectal cancer through increasing FAK and Src phosphorylation [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2019, 51(4): 356-64.
- [10] Wang A, Fan F, Zang C, et al. MPZL1 promotes lung adenocarcinoma progression by enhancing tumor proliferation, invasion, migration, and suppressing immune function via transforming growth factor- β 1 [J]. Hum Gene Ther, 2023, 34(11-12): 540-53.
- [11] Liu X, Huang J, Liu L, et al. MPZL1 is highly expressed in advanced gallbladder carcinoma and promotes the aggressive behavior of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(3): 2725-33.
- [12] Wang X, Zhu X, Ye M, et al. STS-NLSP: a network-based label space partition method for predicting the specificity of membrane transporter substrates using a hybrid feature of structural and semantic similarity [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 306.
- [13] Frascotti G, Galbiati E, Mazzucchelli M, et al. The vault nanoparticle: a gigantic ribonucleoprotein assembly involved in diverse physiological and pathological phenomena and an ideal nanovector for drug delivery and therapy [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(4): 707.
- [14] Wang J, Quan Y, Lv J, et al. BRD4 promotes glioma cell stemness via enhancing miR-142-5p-mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. Environ Toxicol, 2020, 35(3): 368-76.

Effect of silencing *MPZL1* on tumor cell stemness and drug resistance of A549/Tax cells via β -catenin signaling

Zang Chao^{1,2}, Ge Qiao^{1,2}, Li Chao^{1,2}, Hong Haining³, Li Wei¹,
Su Jun¹, Li Chuankui¹, Chen Liwei¹, Wang Ansheng¹

(¹Dept of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Bengbu Medical College, Bengbu 233004;

²Graduate School, Bengbu Medical College, Bengbu 233030;

³Dept of Thoracic Surgery, Third Affiliated People's Hospital, Bengbu Medical College, Bengbu 233000)

Abstract *Objective* To explore the effect of *MPZL1* knockdown in A549 Taxol resistant (A549/Tax) cells and whether it affect drug resistance and tumor cell stemness by regulating β -catenin. *Methods* A549 and A549/Tax cells were treated with different concentrations of doxorubicin and paclitaxel to observe the differences in drug resistance between the two cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the *MPZL1* expression level in A549 and A549/Tax cells. After knockdown or overexpression of *MPZL1* in A549/Tax cells, cells were divided into control group, small hairpin RNA negative control (sh-NC) group, *MPZL1* knockdown (sh-*MPZL1*) group, overexpression negative control (OE-NC) group, *MPZL1* overexpression (OE-*MPZL1*) group. Cell counting kit-8 (CCK-8) and clone formation assay were utilized to investigate cell proliferation and clone formation ability. Western blot assay was used to detect the protein expression after the cells treated with Wnt/ β -catenin signaling inhibitor XAV939 and activator CHIR-99201. *Results* The half inhibitory concentration (IC_{50}) of doxorubicin and paclitaxel in A549/Tax cells significantly increased compared to A549 cells ($P < 0.01$). *MPZL1* presented a higher expression trend in A549/Tax cells. The IC_{50} values of A549/Tax for doxorubicin and paclitaxel were 2.731 mg/ml and 4.939 μ g/ml after *MPZL1* knockdown, compared to 4.541 mg/ml and 13.55 μ g/ml in the NC group ($P < 0.01$). The results of CCK-8 and clone formation assay showed that the knockdown of *MPZL1* reduced the viability of cells proliferation and clonal formation ability ($P < 0.05$). Western blot results indicated that the expression levels of *MPZL1* protein, tumor cell stemness associated proteins (CD44, CD133), β -catenin and multidrug resistance protein 1 (MDR1), lung resistance-related protein (LRP) were significantly reduced in the sh-*MPZL1* group. Furthermore, XAV939 could inhibit the expression levels of *MPZL1*, CD44, CD133, MDR1, LRP and β -catenin ($P < 0.01$). The inhibitory effect of knockdown *MPZL1* on the aforementioned proteins was significantly reversed by CHIR-99201 treatment. *Conclusion* *MPZL1* is highly expressed in A549/Tax cells. Knockdown *MPZL1* suppresses the tumor cell stemness and proliferation, thereby reversing the drug resistance of doxorubicin and paclitaxel in A549/Tax cells.

Key words *MPZL1*; tumor stemness; A549/Tax lung cancer cell; multiple drug resistance; paclitaxel