

乳铁蛋白活性六肽(LfcinB 4-9)增加人宫颈癌细胞对顺铂的敏感性及其机制

刘芸¹,徐怡²,刘力伟²,戚楠¹,秦宜德^{1,2}

摘要 **目的** 研究乳铁蛋白活性六肽(LfcinB 4-9)增加人宫颈癌细胞对顺铂的敏感性并探究其作用机制。**方法** MTT检测顺铂(DDP)联合不同浓度的LfcinB 4-9对人宫颈癌细胞Hela细胞株、敲除p62基因的Hela细胞株(Hela/KO p62)增殖的影响;平板克隆实验检测DDP联合LfcinB 4-9对人宫颈癌细胞克隆形成能力的影响;流式细胞术实验检测联合用药对人宫颈癌细胞凋亡的影响;qRT-PCR检测联合用药对人宫颈癌细胞Hela、Hela/KO p62中SIAH、PSMA、 β -catenin等基因表达水平的影响;Western blot检测联合用药对人宫颈癌细胞中SIAH、PSMA、 β -catenin等蛋白表达水平的影响。**结果** LfcinB 4-9和DDP联合用药对宫颈癌细胞的抑制率高于DDP单独作用组或单独LfcinB 4-9组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与DDP单独组相比,DDP联合LfcinB 4-9作用后人卵巢癌细胞克隆形成能力降低,凋亡增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。qRT-PCR和Western blot实验显示,DDP联合LfcinB 4-9作用时联合用药SIAH、PSMA1的表达量增加,而 β -catenin的表达量降低。**结论** LfcinB 4-9与DDP联合作用后增强了宫颈癌细胞对DDP的敏感性,其作用是通过蛋白酶体途径来实现的。

关键词 宫颈癌细胞;乳源六肽;顺铂;耐药性;基因表达

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1268-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.017

宫颈癌是全世界妇女最常见的癌症之一^[1],其存活率低,预后不佳^[2]。化疗和放疗常见的是宫颈癌治疗方案。顺铂是常用的化疗药物,目前针对该药物的主要研究目标是不断提高药效以降低该药物的副作用及降低机体产生的耐药^[3]。p62是一种自噬受体,近期被证明^[4]可以将泛素化蛋白质递送到蛋白酶体进行降解。p62增加会延迟泛素化蛋白向泛素蛋白酶体系统的降解,而p62缺失会加剧细胞

损伤。乳铁蛋白活性源六肽(LfcinB 4-9)来自于牛乳铁蛋白的乳铁蛋白抗菌肽(bovine lactoferricin, LfcinB),是其活性中心,序列为RRWQWR,其中3个Arg残基(带有正电荷)通过肿瘤细胞外膜负电荷吸引而结合,通过翻转扩散(flip-flop)进入胞内。该文主要研究LfcinB 4-9增加药物敏感性的作用,探索LfcinB 4-9与DDP联合作用在宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移中发挥的作用,以期对宫颈癌治疗提供潜在的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 本实验使用的Hela细胞、p62 KO Hela细胞由许尹教授(美国贝勒医学院)馈赠。LfcinB 4-9由上海生工公司合成;顺铂购自云南植物药业有限公司;MTT购自美国Promega公司;TRIzol购自美国Thermo Fisher公司;逆转录试剂盒购自美国Thermo Fisher公司;PCR引物由上海生工合成;PCR MIX购自美国Promega;胎牛血清购自杭州四季青公司;Annexin V/PI双染凋亡试剂盒购自上海贝博公司。 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记抗鼠IgG、辣根过氧化物酶标记抗兔IgG购自北京中杉金桥有限公司;SIAH抗体购自爱博泰克生物技术公司;PSMA、 β -catenin抗体购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞Hela和Hela/KO p62使用含有10% FBS、1%青霉素-链霉素的DMEM培养,并置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 细胞增殖实验 分别取对数生长期的HeLa细胞和p62 KO HeLa细胞以 5.0×10^3 /孔的密度接种到96孔板中,用不同浓度的LfcinB 4-9(0.15、1.5、15 μ mol/L)和DDP(IC₅₀)刺激24、48和72 h后,每孔加入20 μ l MTT置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育4 h。弃去上清液,每孔加200 μ l DMSO。用酶标仪(Bio-Rad)在490 nm波长处测量吸光度(optical density, OD)值,以空白为对照,按照计算公

2022-04-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472448)

作者单位:安徽医科大学基础医学院¹生物化学与分子生物学教研室、²免疫教研室,合肥 230032

作者简介:刘芸,女,硕士研究生;

秦宜德,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: yideqin@ahmu.edu.cn

式细胞存活率(%),计算公式如下如下:抑制率(I)(%) = $1 - (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})$,计算化疗药物的抑制率和半抑制浓度(IC₅₀)并建立细胞生长抑制曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中培养过夜。分为 6 组加药:正常对照组、15 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组、DDP (IC₅₀) 组、DDP (IC₅₀) + 0.15 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组、DDP (IC₅₀) + 1.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组、DDP (IC₅₀) + 15 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组。作用 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化后收集细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次。将细胞重悬于 400 μl $1 \times$ Annexin 结合液中,在细胞悬液中加入 5 μl 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (FITC),轻轻摇匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min,加入 10 μl PI 染色液后轻轻混匀并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 min。在 2 h 内用流式细胞仪检测,并用 FlowJo7.6.1 软件分析实验结果。

1.2.4 平板克隆检测细胞克隆形成 将 HeLa 细胞 (1×10^3) 和 HeLa/KO p62 细胞 (1×10^3) 分别接种在 6 孔板中,按照上述分组加药,每 2 d 更换 1 次新鲜培养基,在完全培养基中培养 2 周。弃去培养基,用 4% 多聚甲醛固定细胞并用 0.1% 结晶紫染色 30 min。拍摄图像,并计算每个孔中的克隆数。细胞克隆抑制率 (%) = $1 - (\text{加药组形成的克隆数} / \text{空白对照组形成的克隆数})$ 。

1.2.5 RT-qPCR 检测 E3 泛素连接酶 (seven in absentia homologue, SIAH)、蛋白酶体 (蛋白酶体,巨蛋白因子) 亚基- α 型 [proteasome (prosome-macropain) subunit alpha type, PSMA]、 β -连环蛋白 (β -catenin) 的 mRNA 表达情况 通过 RT-qPCR 定量检测相关基因表达的 mRNA。使用 TRIzol 试剂从宫颈癌细胞中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为互补 DNA (cDNA)。按照试剂盒说明配置 10 μl 体系后上机。使用 qPCR 测定法 (SYBR Green; Bio-Rad, USA) 测定蛋白 mRNA 的表达; β -actin 用作内部对照。qPCR 条件如下:预变异 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,扩增 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环,溶解 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 1 s, 冷却 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算相对 mRNA 表达。见表 1。

1.2.6 Western blot 检测 SIAH、PSMA、 β -catenin 的蛋白的表达情况 将宫颈癌细胞分为 6 组加药:对照组、1.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组、DDP (IC₅₀) 组、DDP (IC₅₀) + 0.15 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组、DDP (IC₅₀) +

1.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组、DDP (IC₅₀) + 15 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组。培养 48 h 后收集细胞总蛋白,经电泳、电转、孵育一抗、二抗,洗涤后显影并用 Image J 进行灰度值分析。

表 1 引物的序列

名称	引物序列 (5'-3')
SIAH	F: GCTAAATGGTCATAGGCGACG R: ATGGCTGTTGCAATTCCTTCAT
β -catenin	F: AGGGTCTGGGACAATTAGTCG R: CGAAAGCCAATCAAACACAA
PSMA1	F: TTGCGGGTCTAACTGCTGATG R: GGAAGTGGTCTGTCAAACACA
β -actin	F: CGTCGCTAGACCAAGACACC R: CCCAGTTGGAGACAATACCGT

1.3 统计学处理 使用 SPSS 20.0 和 GraphPad 5.0 对数据进行处理。用 Image J (1.8.0) 对数据进行处理。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的差异使用方差分析进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 HeLa/KO p62 内 p62 蛋白表达的检测 通过 Western blot 检测敲除株 p62 蛋白的表达,结果表明敲除株内 p62 蛋白不表达,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。

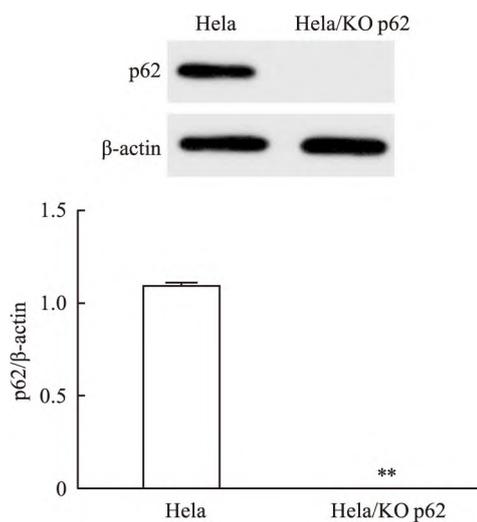


图 1 Western blot 检测敲除株 p62 蛋白表达与 HeLa 比较: ** $P < 0.01$

2.2 联合用药对宫颈癌细胞的增殖的影响 为了研究 LfcinB 4-9 与 DDP 联合用药对宫颈癌细胞的影响,HeLa 和 p62 KO HeLa 细胞系用不同浓度的 Lf-

cinB 4-9 和相同浓度的 DDP 处理 24 ~ 72 h, 并评估细胞增殖。结果显示单独用 LfcinB 4-9 细胞生长抑制率较小, 当 DDP 和 LfcinB 4-9 联合作用时, 细胞的生长抑制率增高, 并且随着 LfcinB 4-9 的浓度的增高而逐渐增高, 差异有统计学意义 ($F = 56.72, P < 0.01$; 24 h: 21.3 ± 1.06 ; 48 h: 28.5 ± 1.13 ; 72 h: 30.5 ± 0.98)。见图 2。

2.3 联合用药对宫颈癌细胞克隆形成的影响 通过克隆形成实验观察联合用药对宫颈癌细胞增殖的抑制。结果表明, 与对照组相比, 加药组细胞克隆形成显著降低, 并且 LfcinB 4-9 与 DDP 联合作用效果更强, 克隆形成能力随着 Lfcin B 4-9 的浓度的增加而逐渐降低。与 HeLa 对比, p62 敲除抑制了宫颈癌细胞的增殖, 集落数少于 HeLa 组, 差异有统计学意义 ($F = 72.5, P < 0.01$)。见图 3。

2.4 联合用药对宫颈癌细胞凋亡的影响 为了研究 LfcinB 4-9 是否可以调节 HeLa 和 p62 KO HeLa 细胞对 DDP 的抗性, 分别用不同浓度的 LfcinB 4-9 和相同浓度的 DDP 作用于这两种细胞。流式细胞术结果显示, 与对照组对比, 加药组的凋亡率增加。单独用 LfcinB 4-9 或者 DDP, 细胞凋亡率略有增加。

当联合用药时, 细胞凋亡率增加, 并且细胞凋亡率随着 LfcinB 4-9 浓度的增高而逐渐增高, 差异有统计学意义 ($F = 120.5, P < 0.01$)。与 HeLa 组对比, 联合用药对 HeLa/KO p62 组促进细胞凋亡作用更强。这些结果表明联合用药促进宫颈癌细胞的凋亡, LfcinB 4-9 可以通过促进体外 DDP 诱导的细胞凋亡调节宫颈癌细胞对 DDP 的抵抗力。见图 4。

2.5 LfcinB 4-9 联合 DDP 处理对人宫颈癌细胞的 PSMA、SIAH、 β -catenin 基因表达的影响 qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 单独用 LfcinB 4-9 处理的 HeLa 和 HeLa/KO p62 细胞中 PSMA、SIAH、 β -catenin 表达水平无明显变化。与 LfcinB 4-9 组相比, 联合用药组的 PSMA、SIAH 基因表达量增加, 且随着 LfcinB 4-9 浓度的增加表达水平逐渐增加, 而联合用药组 β -catenin 的表达水平降低, 随着 LfcinB 4-9 浓度的增加表达水平有不同程度的降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 HeLa 细胞相比, 相同加药组 HeLa/KO p62 细胞中 PSMA、SIAH 表达水平有不同程度的下降, β -catenin 表达水平变化差异无统计学意义。见图 5。

2.6 LfcinB4-9 联合 DDP 处理对人宫颈癌细胞的

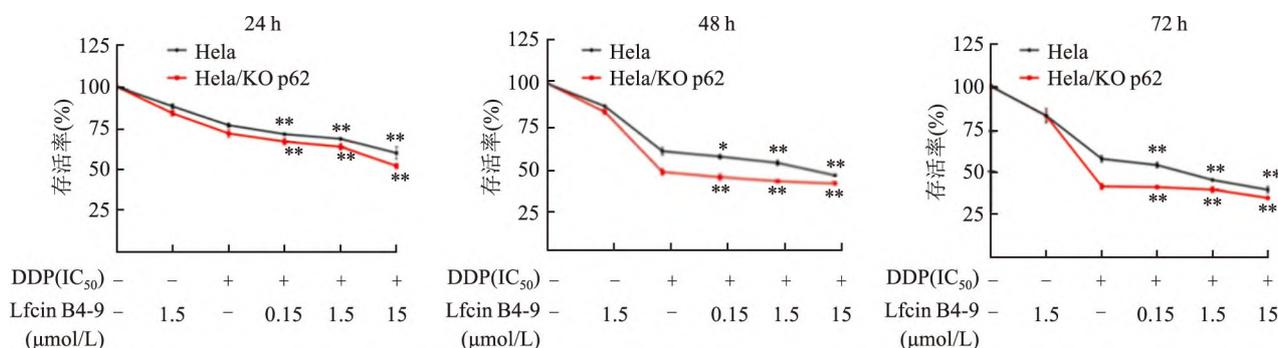


图 2 MTT 检测联合用药对 2 种细胞增殖能力的影响与 DDP (IC₅₀) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

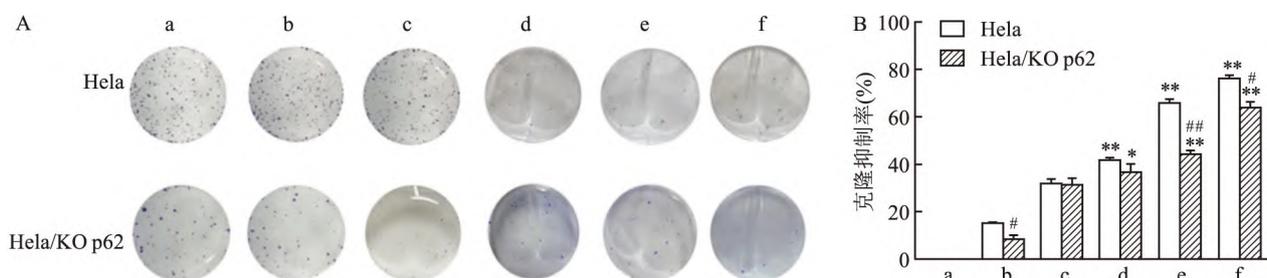


图 3 平板克隆实验检测联合用药对人宫颈癌细胞细胞克隆形成能力的影响

A: 平板克隆实验; B: 各组克隆形成率统计图; a: 对照组; b: 1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组; c: DDP (IC₅₀) 组; d: DDP (IC₅₀) + 0.15 μmol/L LfcinB 4-9 组; e: DDP (IC₅₀) + 1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组; f: DDP (IC₅₀) + 15 μmol/L LfcinB 4-9 组; 与 DDP (IC₅₀) 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 相同加药组与 HeLa 细胞比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

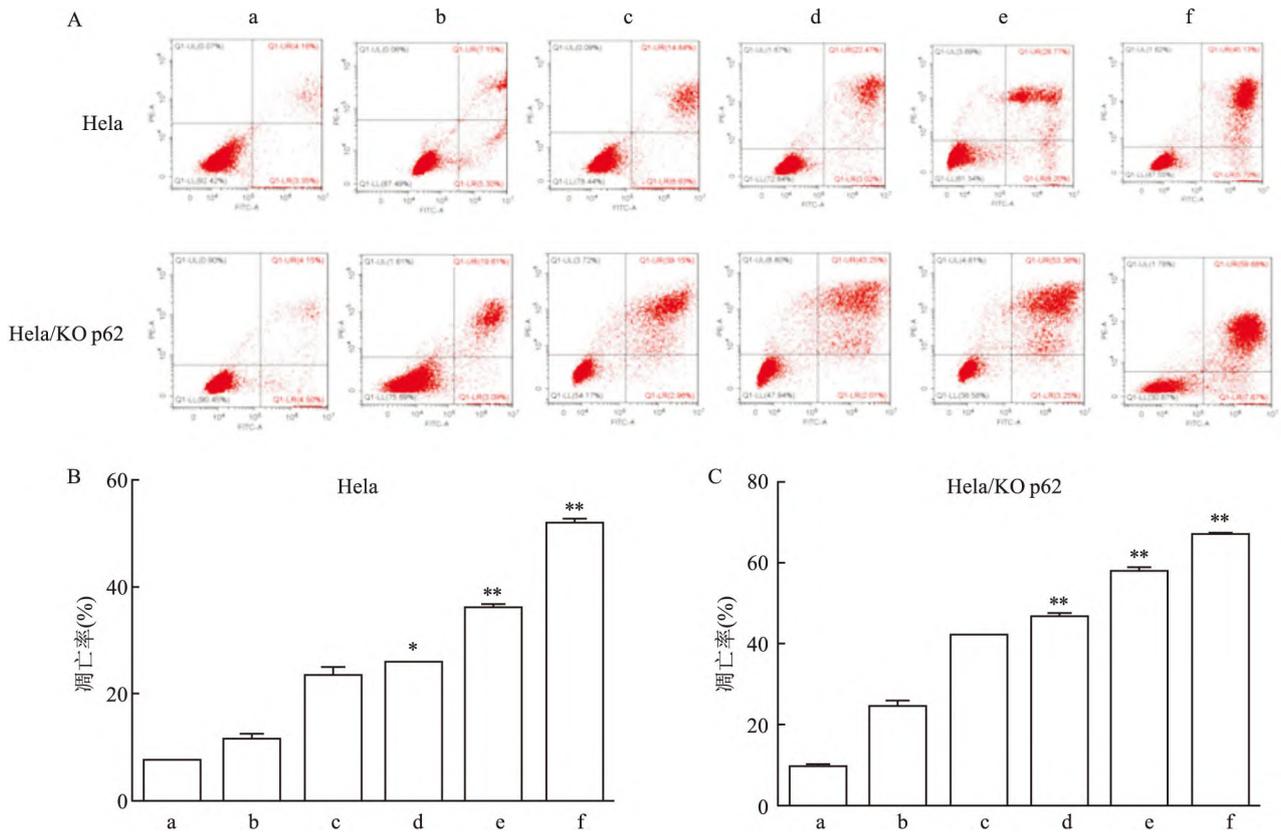


图4 不同浓度药物对 HeLa、HeLa/KO p62 凋亡的影响

A:不同浓度药物对 HeLa、p62 KO HeLa 凋亡的影响;B: 不同浓度药物对 HeLa 凋亡的影响;C:不同浓度药物对 HeLa/KO p62 凋亡的影响;a: 对照组;b:1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组;c:DDP(IC₅₀)组;d:DDP(IC₅₀) + 0.15 μmol/L LfcinB 4-9 组;e:DDP(IC₅₀) + 1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组; f: DDP(IC₅₀) + 15 μmol/L LfcinB 4-9 组;与 DDP(IC₅₀)组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

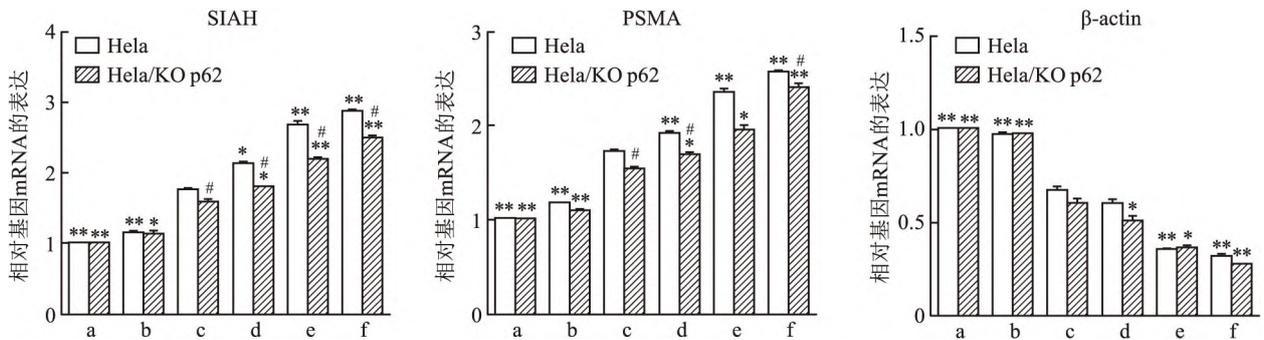


图5 不同浓度药物对 HeLa、HeLa/KO p62 细胞相关基因 mRNA 的影响

a:对照组;b:1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组;c:DDP(IC₅₀)组;d:DDP(IC₅₀) + 0.15 μmol/L LfcinB 4-9 组;e:DDP(IC₅₀) + 1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组; f: DDP(IC₅₀) + 15 μmol/L LfcinB 4-9 组;与 DDP(IC₅₀)组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 相同加药组与 HeLa 细胞比较: # P < 0.05

PSMA、SIAH、β-catenin 蛋白表达的影响 用 LfcinB 4-9(1.5 μmol/L)、DDP(48 h IC₅₀)、DDP(48 h IC₅₀) + LfcinB 4-9(0.15 μmol/L)、DDP(48 h IC₅₀) + LfcinB 4-9(1.5 μmol/L)、DDP(48 h IC₅₀) + LfcinB 4-9(15 μmol/L) 共 5 种不同浓度药物作用于 HeLa 和 HeLa/KO p62 48 h 后, Western blot 结果显示,单独用 LfcinB 4-9 组 SIAH、PSMA、β-catenin 蛋

白表达水平无明显变化,联合用药时,SIAH、PSMA 蛋白表达量上升,随着联合作用时用 LfcinB 4-9 浓度的增高,表达量有不同程度的上升。与对照组相比,联合用药时随着药物浓度的增加,β-catenin 的蛋白表达量有不同程度的下降,差异有统计学意义 (P < 0.01)。联合用药和单独 DDP 组相比,随着 LfcinB 4-9 浓度的增高,SIAH、PSMA 蛋白表达水平

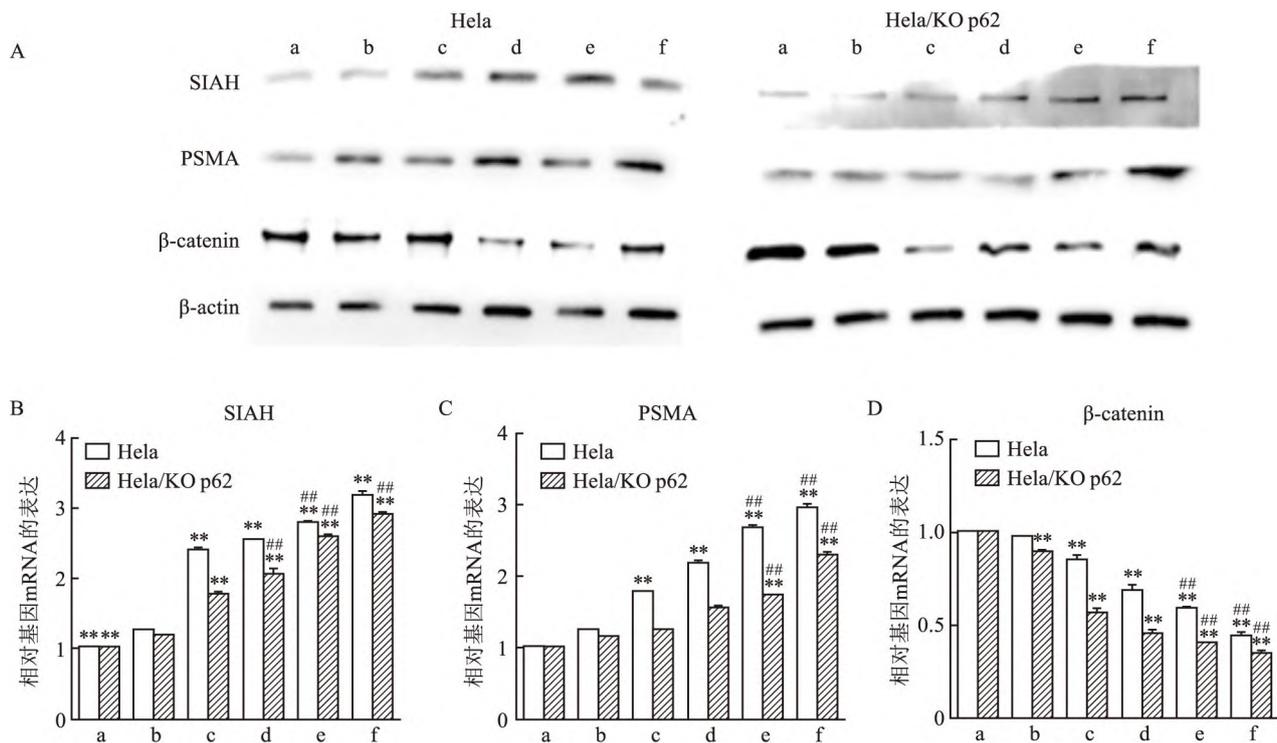


图6 Western blot 检测各组 SIAH、PSMA、β-catenin 蛋白表达

A: Western blot 检测各组 SIAH、PSMA、β-catenin 蛋白电泳图;B~D:不同浓度药物 HeLa、HeLa/KO p62 细胞 SIAH、PSMA、β-catenin 蛋白相对表达量;a:对照组;b:1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组;c:DDP (IC₅₀) 组;d:DDP (IC₅₀) + 0.15 μmol/L LfcinB 4-9 组;e:DDP (IC₅₀) + 1.5 μmol/L LfcinB 4-9 组;f:DDP (IC₅₀) + 15 μmol/L LfcinB 4-9 组;与 DDP (IC₅₀) 组比较: * P < 0.01; 相同加药组与 HeLa 细胞比较: # P < 0.01

有不同程度的上升,β-catenin 蛋白表达水平有不同程度的下降,差异有统计学意义(P < 0.01)。见图6。

3 讨论

宫颈癌是妇科可致死的恶性肿瘤,DDP 已被用作治疗这种癌症最有效的放化疗药物之一。然而,现已在宫颈癌细胞中发现了治疗耐药性,尤其是在转移性、复发性和晚期疾病的患者中^[5]。由于顺铂的耐药性,许多天然产物被用于研究抗癌药物的开发^[6]。源自牛、山羊、绵羊、水牛和骆驼奶的乳源活性肽具有多功能特性,包括免疫调节、抗氧化、酶抑制作用、抗血栓形成和对抗各种毒物的拮抗活性。其中大部分调节免疫、胃肠道、激素和神经反应,从而在预防癌症、骨质疏松症、高血压和其他疾病方面发挥重要作用^[7]。LfcinB 4-9 是一种来自牛乳铁蛋白的生物活性肽,安全无毒。

泛素-蛋白酶体途径 (UPP) 影响细胞功能,包括细胞生长、分化、凋亡、信号转导、抗原加工和炎症反应,现在已被认为是细胞蛋白质降解最重要的方

法之一。蛋白酶体控制蛋白质降解的执行并在泛素-蛋白酶体途径中发挥关键作用。蛋白酶体与癌症之间密切联系的展开为使用蛋白酶体抑制剂治疗癌症提供了潜在的策略^[8]。抑制蛋白酶体系统可能代表一种治疗和克服耐药性恶性肿瘤耐药性的新策略。泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 和自噬是两个不同且相互作用的蛋白水解系统。它们在正常条件下和压力下的细胞存活中起着关键作用。p62 是一种经典的自噬受体,是一种多功能蛋白质,位于整个细胞中,参与许多信号转导通路。它参与泛素化蛋白质的蛋白酶体降解。当细胞 p62 水平波动时,泛素化蛋白质的数量和位置也会发生变化,对细胞存活产生相当大的影响。抑制蛋白酶体所导致的应激可以通过 p62 磷酸化激活自噬。自噬缺陷可能会损害泛素-蛋白酶体系统,因为尽管蛋白酶体催化活性没有改变,但过多的 p62 会延迟蛋白酶体底物向蛋白酶体的递送^[8]。

β-catenin 是一种多功能蛋白质,在生理稳态中起核心作用^[9]。β-catenin 的高水平细胞质表达和核定位总是诱导致瘤性状并促进癌细胞增殖和存

活。此外,它还可以通过抑制 T 细胞反应促进肿瘤的进展^[10]。 β -连环蛋白的稳定在肿瘤发生中至关重要,这通常是由异常 Wnt 激活和 β -连环蛋白的体细胞基因突变或破坏复合物组分诱导的^[11]。 β -catenin 的泛素化是一个复杂的过程,磷酸化的 β -catenin 被特定的 E3 泛素连接酶识别和泛素化,并在蛋白酶体中降解。相应的 E3 泛素连接酶在不同的亚细胞位置是不同的。在细胞质中, β -TrCP、Jade1、SIAH 是介导 β -连环蛋白泛素化的 E3 连接酶^[12]。除了 Jade1、SIAH 也诱导非磷酸化 β -catenin 泛素化,以响应肿瘤抑制因子 p53 以促进 β -catenin 降解^[9]。

本研究探究 LfcinB 4-9 与 DDP 联合作用对宫颈癌细胞增殖与迁移的影响,显示联合用药可以提高 DDP 在宫颈癌 HeLa 和 HeLa/KO p62 细胞中的药物作用,且细胞凋亡率比单独用 LfcinB 4-9 或 DDP 增长显著。在控制 DDP 浓度相同的条件下,细胞凋亡率随着 LfcinB 4-9 浓度的增加逐渐升高。同时,LfcinB 与 DDP 联合用药抑制宫颈癌细胞的增殖和克隆形成。通过干扰 p62 基因表达,宫颈癌细胞耐药性降低。此外,本研究还表明,联合用药使 SIAH、PSMA1 的表达量增加,而 β -catenin 的表达量降低,这表明 LfcinB 4-9 可能通过蛋白酶体途径抑制宫颈癌的耐药性,为宫颈癌治疗提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] Li H, Wu X, Cheng X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer[J]. J Gynecol Oncol, 2016, 27(4): e43.
- [2] Wang L, Zhao Y, Wang Y, et al. The role of galectins in cervical

- cancer biology and progression[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 2175927.
- [3] Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10167): 169–82.
- [4] Zhu H, Luo H, Zhang W, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1885–95.
- [5] Chen X, Xiong D, Ye L, et al. SPP1 inhibition improves the cisplatin chemo-sensitivity of cervical cancer cell lines[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 83(4): 603–13.
- [6] Sun Y S, Thakur K, Hu F, et al. Icariside II suppresses cervical cancer cell migration through JNK modulated matrix metalloproteinase-2/9 inhibition *in vitro* and *in vivo*[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 110013.
- [7] Mohanty D P, Mohapatra S, Misra S, et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review[J]. Saudi J Biol Sci, 2016, 23(5): 577–83.
- [8] Zhang J, Wu P, Hu Y. Clinical and marketed proteasome inhibitors for cancer treatment[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(20): 2537–51.
- [9] Shang S, Hua F, Hu Z W. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33972–89.
- [10] Novellasdemunt L, Foglizzo V, Cuadrado L, et al. USP7 is a tumor-specific WNT activator for APC-mutated colorectal cancer by mediating beta-catenin deubiquitination[J]. Cell Rep, 2017, 21(3): 612–27.
- [11] Hoffmeyer K, Junghans D, Kanzler B, et al. Trimethylation and acetylation of beta-catenin at lysine 49 represent key elements in ESC pluripotency[J]. Cell Rep, 2017, 18(12): 2815–24.
- [12] Katoh M. Multilayered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/beta-catenin signaling activation (Review)[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2): 713–25.

Lactoferrin active hexapeptide (LfcinB 4-9) increases the sensitivity of human cervical cancer cells to cisplatin and its mechanism

Liu Yun¹, Xu Qia², Liu Liwei², Qi Nan¹, Qin Yide^{1,2}

(¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, ²Dept of Immunology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the sensitivity of human cervical cancer cells to cisplatin which increased by the lactoferrin active hexapeptide (LfcinB 4-9) and to investigate its mechanism. **Methods** MTT was used to detect the proliferation inhibition of cisplatin (DDP) combined with different concentrations of LfcinB 4-9 on human cervical cancer HeLa cell line and the HeLa cell line with the p62 gene knocked out (HeLa/KO p62). The plate cloning assay was performed to detect the effect of DDP combined with LfcinB 4-9 on the cloning ability of human cervical cancer cells. The effect of DDP combined with LfcinB 4-9 on the apoptosis of human cervical cancer cells was detected by flow cytometry. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression levels of genes and protein

ADH1B 基因甲基化对卵巢癌细胞增殖及凋亡的影响

季维雪^{1,2}, 孙磊², 江玉², 陈颖², 李泽莲², 李敏², 肖兰^{1,2}

摘要 目的 探讨乙醇脱氢酶 1B (ADH1B) 基因甲基化对卵巢癌(OC)细胞增殖及凋亡的影响。方法 生物信息学方法比较 ADH1B 在卵巢癌与正常卵巢上皮组织中表达情况, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测卵巢癌与正常卵巢组织中 ADH1B 相对表达量, 对比两种研究结果的一致性。两株卵巢癌细胞 OV2008 及 C13K 经不同浓度甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-dc) 干预 48 h, CCK-8 法检测 5-Aza-dc 对两株细胞增殖的影响; Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡形态学改变; 甲基化特异性 PCR (MSP)、qRT-PCR 及 Western blot 法分别检测药物作用前后两株细胞株中 ADH1B 甲基化状态、ADH1B 在 mRNA 及蛋白水平表达。结果 生物信息学分析及 qRT-PCR 结果均显示卵巢癌中 ADH1B 表达量明显均低于正常卵巢组织; 中、高浓度 5-Aza-dc 作用 48 h 后, 两株细胞增殖受到抑制 ($P < 0.01$); 高浓度 5-Aza-dc 作用后, 两株细胞均出现典型细胞凋亡形态学改变; ADH1B 在两株细胞中均呈完全甲基化, 高浓度 5-Aza-dc 处理后, ADH1B 甲基化被部分逆转, 两株细胞 ADH1B mRNA 和蛋白表达均增加 ($P < 0.01$)。结论 5-Aza-dc 可下调卵巢癌细胞中 ADH1B 启动子区甲基化水平, 使 ADH1B 基因重新表达, 从而抑制卵巢癌细胞增殖与促进细胞凋亡。

关键词 乙醇脱氢酶 1B; 甲基化; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; 卵巢癌

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)08-1274-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.018

卵巢癌是女性生殖系统常见三大恶性肿瘤之一, 病死率居首位, 化疗耐药是导致卵巢癌疗效不佳的重要因素之一^[1]。越来越多研究^[2]显示卵巢癌发生、发展及耐药与表观遗传学改变密切相关。表观遗传修饰包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰等, 其中 DNA 甲基化异常在卵巢癌耐药形成中起着重要作用。文献^[3]报道, 通过 DNA 甲基化抑制剂逆转 DNA 甲基化状态, 为靶向治疗卵巢癌提供了一个新的靶点。酒精脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 是一种多态性酶, 乙醇脱氢酶 1B (alcohol dehydrogenase 1B, ADH1B) 也称为 ADH2, 目前 ADH1B 与癌症的联系主要集中在酒精代谢和饮酒行为等方面^[4]。新近研究^[5]表明甲基化下调的 ADH2 与乳腺癌不良预后相关, 人肿瘤细胞中 ADH2 基因亦受表观遗传机制调控, 提示 ADH2 基因有望成为潜在肿瘤个体化治疗靶点。该研究拟体外观察 5-Aza-dc 对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响, 旨在探讨 ADH1B 基因甲基化与卵巢癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 细胞株: 卵巢癌细胞 C13K 及 OV2008 为本室保存; 组织样本选取 2019 年 1 月—2021 年 5 月就诊于医院妇产科且均经病理学诊断卵巢癌患者 55 例, FIGO 分期: I ~ II 期 18 例, III ~ IV 期 37 例。同期因子宫肌瘤需手术患者 21 例 (留

2022-04-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81603138); 安徽省高校优秀拔尖人才培养项目 (编号: gxgwfx2019006); 安徽高校自然科学基金重大项目 (编号: KJ2019ZD25)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属阜阳医院妇产科, 阜阳 236112

² 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022

作者简介: 季维雪, 女, 硕士研究生;

肖兰, 女, 博士, 研究员, 副教授, 硕士生导师, 责任作者,

xiaolan@ahmu.edu.cn

such as SIAH, PSMA, and β -catenin in cancer cells Hela and Hela/KO p62. **Results** The inhibitory rate of the combination of LfcinB 4-9 and DDP on cervical cancer cells was significantly higher than that of DDP alone or LfcinB 4-9 alone ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with DDP group, the cloning ability of human ovarian cancer cells was significantly reduced, and apoptosis increased in combined treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The qRT-PCR and Western blot assay showed that when DDP combined with LfcinB 4-9, the expression of SIAH and PSMA1 increased, while the expression of β -catenin decreased. **Conclusion** The combined effect of LfcinB4-9 and DDP significantly enhances the sensitivity of cervical cancer cells to DDP, which is achieved *via* the proteasome pathway.

Key words cervical cancer cells; milk-derived hexapeptide; cisplatin; drug resistance; gene expression