

赵峻秀, 霍明洋, 陈振宇, 等. 线粒体铁蛋白调控上皮-间质转化对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 42-50.

Zhao JX, Huo MY, Chen ZY, et al. Cisplatin resistance in non-small lung cancer cells is affected by ferritin mitochondrial through EMT regulation [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 42-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.006

线粒体铁蛋白调控上皮-间质转化对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药的影响

赵峻秀¹, 霍明洋², 陈振宇¹, 白雪松¹, 马洪波¹, 郝艳丽^{1*}

(1. 吉林医药学院公共卫生学院, 吉林 吉林 132013; 2. 延边大学基础医学院, 吉林 延边 133002)

【摘要】 目的 研究线粒体铁蛋白(FtMt)对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药株 A549/DDP 和非小细胞肺癌细胞株 A549 上皮-间质转化(EMT)的影响,探讨其改善顺铂耐药的分子机制。方法 流式细胞术检测 A549 和 A549/DDP 的凋亡率和细胞周期情况,Western blot 检测 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和 FtMt 蛋白表达水平,RT-qPCR 法检测细胞中 E-cadherin、N-cadherin、snail、slug、twist、波形蛋白(vimentin)、铁转运蛋白(ferroportin,FPn)、二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1,DMT1)、铁调素和转铁蛋白受体 1(transferrin receptor1,TfR1)基因表达水平。细胞划痕实验检测细胞迁移情况。结果 随着顺铂使用剂量增加,A549/DDP 和 A549 细胞凋亡率逐渐升高,且 A549 细胞凋亡率显著高于 A549/DDP 细胞。顺铂处理后,与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂组比较,顺铂各剂量组 A549 细胞 G0/G1 期和 G2/M 期逐渐降低,A549/DDP 细胞 G0/G1 期和 G2/M 期先升高后降低($P<0.05$)。A549/DDP 细胞 E-cadherin 和 mRNA 水平低于 A549 细胞,A549/DDP 细胞 N-cadherin 和 mRNA 水平高于 A549 细胞,A549/DDP 细胞中 snail、slug、vimentin、FPn、铁调素(hepcidin)和 TfR1 mRNA 水平高于 A549 细胞($P<0.05$),A549/DDP 细胞中 DMT1 mRNA 水平低于 A549 细胞($P>0.05$),A549/DDP 细胞迁移的速度显著快于 A549 细胞($P<0.05$),A549/DDP 细胞中 FtMt 蛋白表达水平显著高于 A549 细胞($P<0.05$)。结论 肺癌细胞的顺铂耐药与 EMT 过程有关,FtMt 在肺癌细胞耐顺铂过程中可能发挥了重要作用。

【关键词】 线粒体铁蛋白;顺铂耐药;非小细胞肺癌;上皮-间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0042-09

Cisplatin resistance in non-small lung cancer cells is affected by ferritin mitochondrial through EMT regulation

ZHAO Junxiu¹, HUO Mingyang², CHEN Zhenyu¹, BAI Xuesong¹, MA Hongbo¹, XI Yanli^{1*}

(1. School of Public Health, Jilin Medical University, Jilin 132013, China

2. School of Basic Medicine, Yanbian University, Yanbian 133002)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of mitochondrial ferritin (FtMt) on epithelial mesenchymal transition (EMT) of cisplatin-resistant non-small lung cancer line A549/DDP and non-small lung cancer line A549, and to explore the molecular mechanism in improving cisplatin resistance. **Methods** Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate and cell cycle of A549 and A549/DDP cells. Western blot was used to analyze expression of E-cadherin, N-cadherin and FtMt. RT-qPCR was used to measure gene expression of E-cadherin, N-cadherin, snail, slug, twist,

【基金项目】 国家级大学生创新创业训练项目(201816);吉林省科技厅项目资助(20170623093-11TC);吉林省教育厅资助项目(JJKH20210480KJ)。

【作者简介】 赵峻秀(1998—),本科,研究方向:非小细胞肺癌发病机制的基础研究。E-mail:zjx1147501221@163.com

【通信作者】 郝艳丽(1981—),博士,副教授,研究方向:非小细胞肺癌发病机制的基础研究。E-mail:jilin2534126@163.com

vimentin, FPN, DMT1, hepcidin and TfR1 in cells. Cell migration was assessed by a scratch assay. **Results** The apoptotic rate of A549/DDP and A549 cells was increased with the increase in cisplatin concentration, and the apoptotic rate of A549 cells was significantly higher than that of A549/DDP cells. After cisplatin treatment, A549 cells in G0/G1 and G2/M phases were gradually decreased in all groups compared with the 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin group, whereas A549/DDP cells in G0/G1 and G2/M phases were first increased and then decreased ($P < 0.05$). The protein and mRNA levels of E-cadherin in A549/DDP cells were lower than those in A549 cells, while the protein and mRNA levels of N-cadherin in A549/DDP cells were higher than those in A549 cells. The mRNA levels of snail, slug, vimentin, FPN, hepcidin and TfR1 in A549/DDP cells were higher than those in A549 cells ($P < 0.05$). The mRNA level of DMT1 in A549/DDP cells was lower than that in A549 cells ($P > 0.05$). The cell migration rate was significantly faster in A549/DDP cells than in A549 cells ($P < 0.05$). The expression of FtMt in A549/DDP cells was significantly higher than that in A549 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Cisplatin resistance of lung cancer cells is related to the EMT process, and FtMt might play an important role in cisplatin resistance of lung cancer cells.

【Keywords】 mitochondrial ferritin; cisplatin resistance; non-small lung cancer; epithelial mesenchymal transition

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺癌是全球致死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)大约能占肺癌总数的 80%~85%^[1-2]。多数肺癌患者确诊时已处于临床晚期,临床上缺少疗效显著的治疗药物,生物靶向药物的针对性强,很多患者因基因配型不符而错失最佳治疗机会。此外,许多肺癌患者对临床常用的化疗或放射疗法存在耐药,导致肺癌患者的 5 年生存率较低,仅有 4%~17%^[3]。顺铂(cisplatin, DDP)是临床上常用的抗肿瘤药物,抗癌谱广,与多种抗肿瘤药物有协同作用、且无交叉耐药^[4],但顺铂的单独长期使用会造成患者耐药^[5]。研究发现,肺癌患者的顺铂耐药可能诱导上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,抑制肺癌细胞的 EMT 过程,可能会有效抑制肺癌细胞的耐药与侵袭^[6]。持续性铁过载能促进胰腺癌细胞发生 EMT 过程^[7]。在乳腺癌细胞中,通过抑制膜铁转运蛋白的表达可以促使细胞内铁浓度升高,进而导致 EMT 发生^[8]。由此推测,铁过载可能与肿瘤细胞的耐药及 EMT 过程有关。线粒体铁蛋白(ferritin mitochondrial, FtMt)是一种定位在线粒体上、与铁代谢密切相关的蛋白,具有组织受限性表达的特点,由于其 mRNA 上缺乏铁依赖的、能翻译调控铁反应元件的共有序列,所以它的翻译不受铁反应元件(iron responsive element, IRE)-铁调节蛋白(iron regulatory protein, IRP)机制的调控,而该机制被认为是调控细胞铁稳态的重要机制^[9-10]。已证实 FtMt 参与了线粒体中的铁调节并维持线粒体内铁稳态^[11],但目前关于 FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂及 EMT 过程中的作用尚不清楚。为此,本研究通过

比较顺铂耐药细胞株 A549/DDP 与非耐药细胞株 A549 之间 FtMt 表达水平、EMT 过程及相关信号通路的差异,探索 FtMt 与顺铂耐药和 EMT 之间的关系,为进一步了解肺癌的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人非小细胞肺癌 A549 细胞株(中国科学院典型培养物宝藏委员会细胞库);人非小细胞肺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP(长春晶美生物工程有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(以色列 BI);RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone);凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);线粒体铁蛋白一抗(Ferritin mitochondrial, FtMt)、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、 β -actin、HRP-Goat Anti-Rabbit IgG、HRP-Goat Anti-Mouse IgG(武汉三鹰生物技术有限公司);cDNA 合成试剂盒(北京康润诚业生物科技有限公司);BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix 和线粒体提取试剂盒(碧云天生物技术);顺铂(cisplatin, DDP)(美国 sigma);引物(生物工程上海股份有限公司)。

NBS Galaxy 170S 二氧化碳培养箱(德国, Eppendorf);Epoch 多功能酶标仪(美国 BioTek);C6 流式细胞仪(美国 BD);7500 FastPCR 仪(美国 ABI);Mastercycler nexus gradient 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf);IX73 活细胞工作站(日本奥林巴斯);Mini-Protean 电泳槽、Mini Trans-Blot 转印槽和 Gel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞凋亡检测

A549 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养液(完全培养液)中,37°C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。A549/DDP 细胞培养于富含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素、2 μg/mL DDP 的 RPMI-1640 培养液(完全培养液)中,37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。按如下分组给予受试物处理:对照组加入 2 mL 的不完全培养液(不含血清,其余同完全培养液),给药组分别加入相同体积的 1.0、2.5 和 5.0 μg/mL 的顺铂溶液(不含血清,其余同完全培养液)。37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,消化并收集细胞,离心去上清,向沉淀中加入预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI 染色液,混匀,室温避光孵育 20 min,立即上机检测。实验重复 3 次。

1.3.2 细胞周期检测

细胞处理同 1.3.1。处理终点后,用 1×PBS 洗 3 次,消化并收集细胞,1000 r/min 离心 3 min,弃上清,向沉淀中加入 70% 冷乙醇,4°C 固定过夜,PBS 洗涤,RNaseA 在 37°C 孵育 30 min。1000 r/min 离心 3 min,弃上清,加入 0.5 mL、10 μg/mL 的 PI 溶液,室温避光反应 30 min。PBS 洗去未结合染色液,立即上机检测。实验重复 3 次。Modfit 软件分析结果。

1.3.3 蛋白表达检测

A549 和 A549/DDP 细胞接种于 6 孔板,37°C、5% CO₂ 培养 24 h 后,用 1×PBS 洗 3 次,每孔加入 100 μL 细胞裂解液,冰浴 10 min,待细胞裂解完全,移入 1.5 mL EP 管中,100°C 变性 15 min,3000 r/min

离心 5 min 后,取上清进行 Western blot 检测 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达水平。按照线粒体提取试剂盒说明书步骤,提取线粒体,检测 FtMt 蛋白表达水平。通过 Image Lab 软件对蛋白印迹进行分析,以 β-actin 为内参计算蛋白的相对含量。

1.3.4 mRNA 表达水平检测

细胞处理同 1.3.1。处理终点后,胰蛋白酶消化收集细胞,1000 r/min 离心 5 min,去上清留沉淀,加入 1 mL TRIzol,冰浴 15 min 以充分裂解,加入 0.2 mL 氯仿并剧烈摇荡 15 s,12 000 r/min 离心 15 min,留取上清,加入 0.5 mL 异丙醇,静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清后加入 1 mL、75% 预冷乙醇,7500 r/min 离心 5 min 后弃上清,37°C 干燥后,加入 20 μL DEPC 水融解。用提取的 RNA 作为模板,按照试剂盒说明书的步骤合成 cDNA,并进行 Real-time PCR 检测。以 GAPDH 为内参,反应条件为:95°C 2 min,95°C 15 s,60°C 15 s,共进行 35 个循环。扩增后采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。引物序列参照 PrimerBank,见表 1。

1.3.5 细胞迁移检测

细胞以 2×10^5 个/皿接种 30 mm 培养皿,待细胞贴壁后,用 20 μL 枪头在培养皿底部画一条直线,制备出细胞划痕区域。加入不完全培养液洗净划痕区域残留的细胞碎片,分别加入 2 mL 不同浓度的顺铂溶液,置于活细胞工作站,观察细胞迁移情况。观察时间为 24 h。每个实验重复 3 次,利用 Image J 软件统计分析划痕区域的宽度。宽度 = 24 h 划痕区域的宽度/0 h 划痕区域的宽度。

1.4 统计学方法

SPSS 16.0 软件进行数据处理,所有数据均用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	上游引物序列(5'→3') Upstream primer sequence	下游引物序列(5'→3') Downstream primer sequence	长度(bp) Length
<i>E-cadherin</i>	GAACGCATTGCCACATACAC	GAATTCGGGCTTGTTCAT	125
<i>N-cadherin</i>	GTGCCATTAGCCAAGGAATTCAGC	GCGTTCCTGTTCCTCATAGGAGG	370
<i>Snail</i>	ACCACTATGCCGCTCTT	GGTCGTAGGGCTCTGGAA	115
<i>Slug</i>	GCGCATGCTCCATTGTCTTAC	AGGCACTTGGAAAGGGTATTG	167
<i>Twist</i>	AGAAGTCTGCGGGCTGTGGCG	GAGGGCAGCGTGGGGATGATC	193
<i>Vimentin</i>	TGAGTACCGGAGACAGGTCCGAG	TAGCAGCTTCAACGCAAAGTTC	119
<i>FPn</i>	TTACCAGAAAACCCAGCTC	CAGGGGTTTTGGCTCAGTAT	103
<i>DMT1</i>	GTGGTTACTGGGCTGCATCT	CCCACAGAGGAATTCCTCCT	172
<i>Hepcidin</i>	CTGAGCAGTGCTCTGTTTTTC	GAAGTGGGTGTCTCGCCTC	129
<i>TjR1</i>	CATGTGGAGATGAAACTTGC	TCCCATAGCAGATACTTCCA	106
<i>GAPDH</i>	AAATCCCATCACCATCTTCCAG	GAGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG	136

用最小显著差法(LSD)检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞凋亡的比较

结果显示,随着顺铂给药剂量的增加,细胞凋亡率和坏死率逐渐增多。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞早期凋亡、晚期凋亡和坏死率均显著高于 0、1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P < 0.05$)。1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞早期凋亡、晚期凋亡和坏死率虽高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组,但比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞之间早期凋亡、晚期凋亡和坏死率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 早期凋亡率显著高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P < 0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 早期凋亡率显著高于 1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂

组 ($P < 0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞晚期凋亡率显著高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P < 0.05$)。与 A549 细胞 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,A549/DDP 细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和坏死率显著降低 ($P < 0.05$)。与 A549 细胞 1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,A549/DDP 细胞的坏死率显著降低 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

2.2 细胞周期的比较

与 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞 G0/G1 期显著降低 ($P < 0.05$);2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞 S 期显著升高 ($P < 0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞 G2/M 期显著低于 0、1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P < 0.05$)。各剂量组 A549 细胞凋亡率之间比较有显著差异 ($P < 0.05$)。1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 G2/M 期显著高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组;5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 G2/M 期显著低于 0、1.0 和 2.5

表 2 A549 和 A549/DDP 细胞凋亡率及坏死率的比较(%)

Table 2 Comparison of apoptosis rate and necrosis rate between A549 and A549/DDP cells

剂量 ($\mu\text{g/mL}$) Dose	A549			A549/DDP		
	早期凋亡 Early apoptosis	晚期凋亡 Late apoptosis	坏死 Necrosis	早期凋亡 Early apoptosis	晚期凋亡 Late apoptosis	坏死 Necrosis
0	1.90 \pm 0.28	1.05 \pm 0.35	1.00 \pm 0.28	1.55 \pm 0.45	1.20 \pm 0.11	0.55 \pm 0.15
1.0	2.40 \pm 0.42	1.45 \pm 0.35	1.50 \pm 0.28	3.35 \pm 0.10*	1.40 \pm 0.10	0.70 \pm 0.05 ⁽¹⁾
2.5	3.55 \pm 0.64	1.60 \pm 0.28	1.85 \pm 0.35	4.40 \pm 0.28*	1.55 \pm 0.05	0.80 \pm 0.10 ⁽¹⁾
5.0	13.55 \pm 2.06* ^{#&}	3.70 \pm 1.41* ^{#&}	3.00 \pm 0.57* ^{#&}	6.10 \pm 0.30* ^{#&(1)}	1.60 \pm 0.20* ⁽¹⁾	0.95 \pm 0.15 ⁽¹⁾

注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, * $P < 0.05$;与 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, # $P < 0.05$;与 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, & $P < 0.05$;与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, * $P < 0.05$. Compared with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, # $P < 0.05$. Compared with 2.5 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, & $P < 0.05$. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

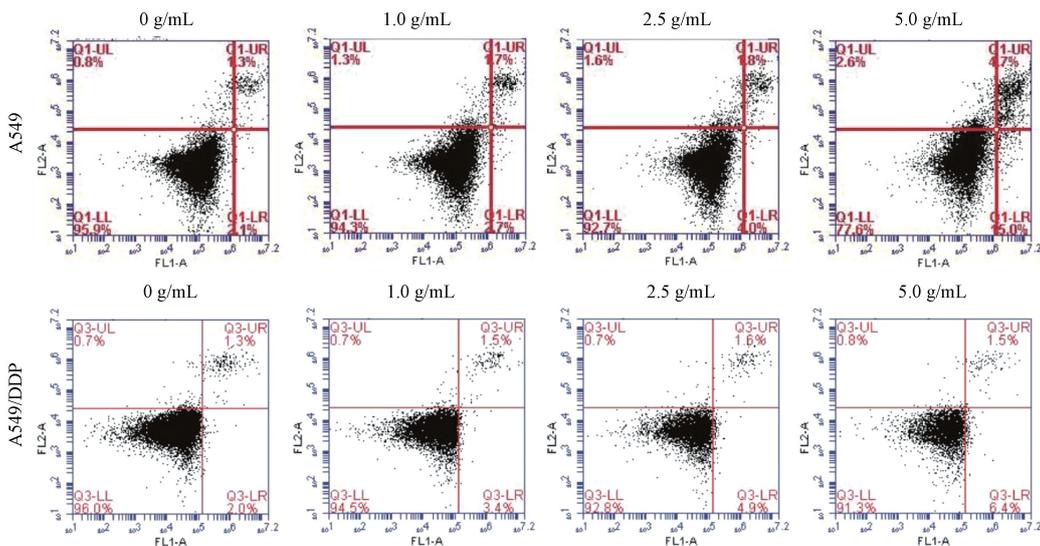


图 1 不同浓度顺铂处理下 A549 和 A549/DDP 细胞凋亡率及坏死率的流式图

Figure 1 Flow cytometry of apoptosis rate and necrosis rate of A549 and A549/DDP cells under different concentrations of cisplatin

μg/mL 顺铂组。5.0 μg/mL 顺铂组 A549/DDP 细胞凋亡率显著高于 0、1.0 和 2.5 μg/mL 顺铂组 ($P < 0.05$)。2.5 和 5.0 μg/mL 顺铂组 A549/DDP 细胞 G0/G1 期显著高于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。0 μg/mL 顺铂组 A549/DDP 细胞 S 期显著高于 A549 细胞 ($P < 0.05$)，G2/M 期显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。5.0 μg/mL 顺铂组 A549/DDP 细胞 S 期显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。1.0、2.5 和 5.0 μg/mL 顺铂组 A549/DDP 细胞凋亡率显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

2.3 E-cadherin 和 N-cadherin 表达水平的比较

由结果可知，与 A549 细胞比较，A549/DDP 细胞中 E-cadherin 表达水平虽降低，但比较差异无统计学意义 ($t = 1.919, P > 0.05$)；A549/DDP 细胞中 N-cadherin 表达水平显著升高，比较差异有统计学意义 ($t = 4.162, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 EMT 信号通路的比较

结果显示，与 A549 细胞比较，A549/DDP 细胞中 E-cadherin mRNA 水平降低，但比较差异没有统计学意义 ($t = 0.570, P > 0.05$)；A549/DDP 细胞中

N-cadherin、snail、slug 和 vimentin 的 mRNA 水平显著升高 ($t = 8.469, t = 8.768, t = 5.793, t = 7.118, P < 0.05$)；Twist 的 mRNA 水平虽然显著升高，但比较差异无统计学意义 ($t = 2.819, P > 0.05$)。见图 4。

2.5 细胞迁移的比较

由结果可知，与 A549 细胞比较，A549/DDP 细胞伤口划痕区域面积显著升高 ($t = 6.745, P < 0.05$)，表明 A549/DDP 细胞迁移的速度显著快于 A549 细胞。见图 5。

2.6 FPN、DMT1、hepcidin 和 TfR1 的 mRNA 水平比较

由图 6 可知，与 A549 细胞比较，A549/DDP 细胞中 DMT1 mRNA 水平虽降低，但比较差异无统计学意义 ($t = 2.112, P > 0.05$)。FPN、hepcidin 和 TfR1 mRNA 水平显著升高，且比较差异有统计学意义 ($t = 5.385, t = 2.893, t = 5.611, P < 0.05$)。

2.7 FtMt 表达水平的比较

由结果可知，与 A549 细胞比较，A549/DDP 细胞中 FtMt 蛋白表达水平显著升高 ($t = 2.804, P < 0.05$)。见图 7。

表 3 A549 和 A549/DDP 细胞周期的比较 (%)

Table 3 Comparison of cell cycle between A549 and A549/DDP

组别 (μg/mL) Groups	A549				A549/DDP			
	G0/G1	S	G2/M	凋亡率 (%) Apoptosis rate	G0/G1	S	G2/M	凋亡率 (%) Apoptosis rate
0	60.04±5.04	28.89±1.76	11.80±0.48	0.21±0.07	56.38±3.62	40.88±4.12 ⁽¹⁾	3.88±0.60 ⁽¹⁾	0.15±0.02
1.0	53.54±6.54	35.79±1.53	10.46±0.52	1.42±0.13*	60.73±6.27	33.15±2.85	6.57±0.68*	0.17±0.02 ⁽¹⁾
2.5	48.71±6.71	42.36±3.10*	8.06±0.30	2.46±0.25*#	65.57±4.44 ⁽¹⁾	30.78±2.23	6.62±0.71*	0.24±0.08 ⁽¹⁾
5.0	30.10±2.10*#	68.35±2.97*#&	2.22±0.21*#&	6.09±0.35*#&	52.07±2.94 ⁽¹⁾	46.26±4.26 ⁽¹⁾	0.89±0.46*#&	1.59±0.16*#& ⁽¹⁾

注：与 0 μg/mL 顺铂组相比，* $P < 0.05$ ；与 1.0 μg/mL 顺铂组相比，# $P < 0.05$ ；与 2.5 μg/mL 顺铂组相比，& $P < 0.05$ ；与 A549 细胞相比，⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with 0 μg/mL cisplatin group, * $P < 0.05$. Compared with 1.0 μg/mL cisplatin group, # $P < 0.05$. Compared with 2.5 μg/mL cisplatin group, & $P < 0.05$. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

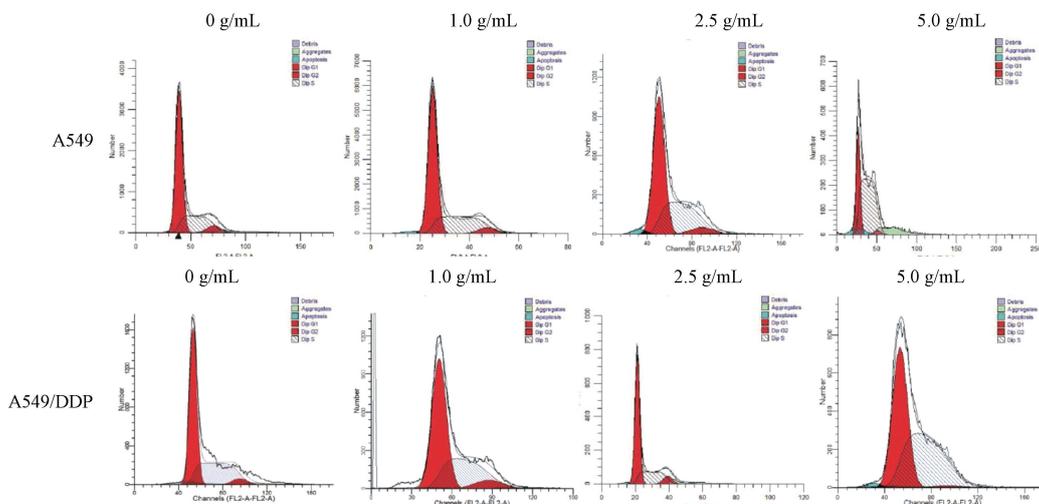
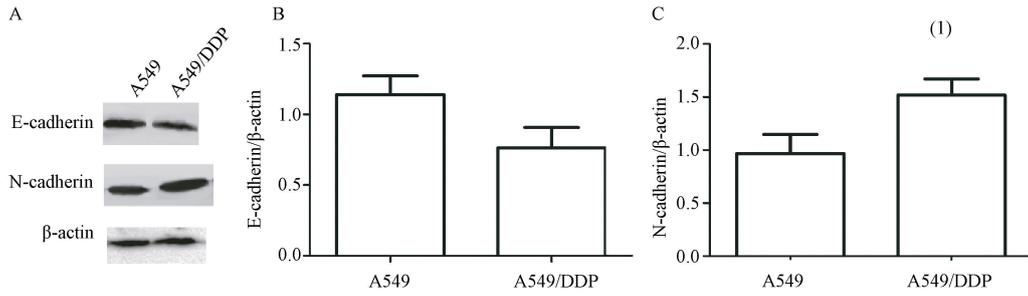


图 2 不同浓度顺铂处理下 A549 和 A549/DDP 细胞周期的流式图谱

Figure 2 Flow cytometry of A549 and A549/DDP cell cycles under different concentrations of cisplatin

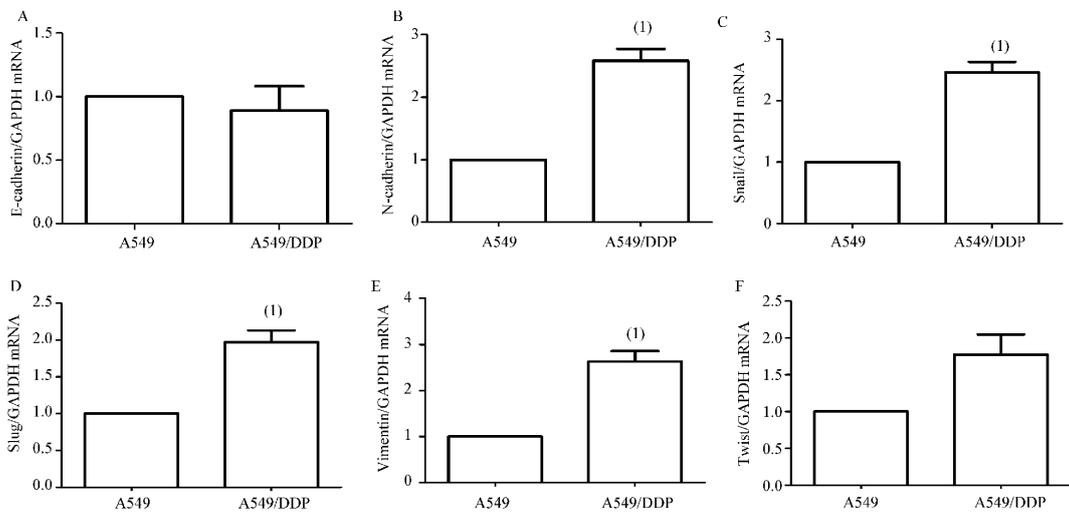


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 3 A549 和 A549/DDP 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达水平

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

Figure 3 Expression levels of E-cadherin and N-cadherin in A549 and A549/DDP cells

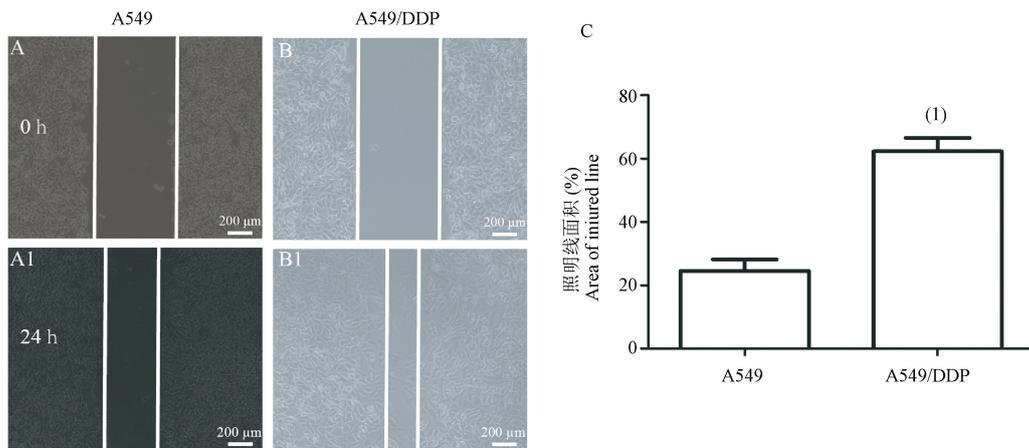


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 4 A549 和 A549/DDP 细胞 EMT 信号通路的比较

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of EMT signaling pathways in A549 and A549/DDP cells

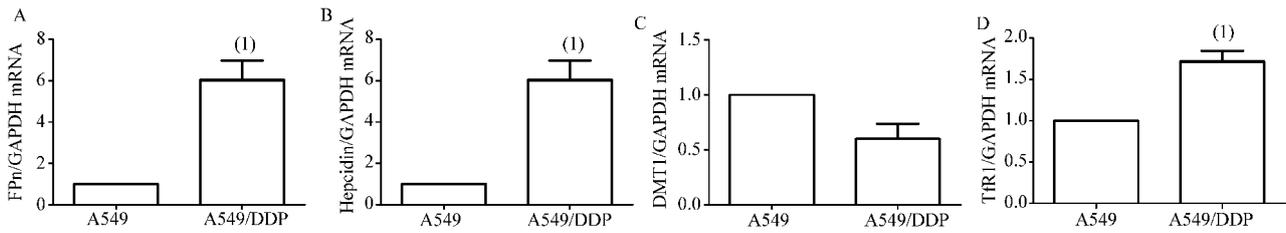


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 5 A549 和 A549/DDP 细胞迁移的比较

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

Figure 5 Comparison of A549 and A549/DDP cell migration

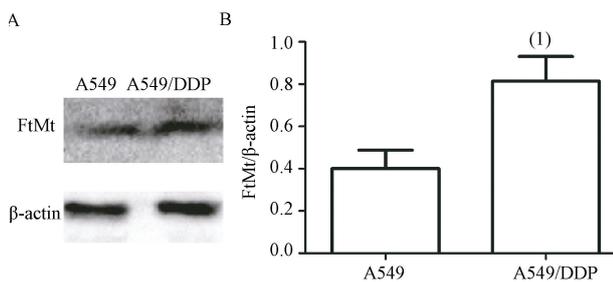


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 6 A549 和 A549/DDP 细胞中 FPn、DMT1、铁调素和 TfR1 的 mRNA 水平

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

Figure 6 mRNA levels of FPn, DMT1, hepcidin and TfR1 in A549 and A549/DDP cells



注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 7 A549 和 A549/DDP 细胞中 FtMt 的表达水平

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

Figure 7 Expression level of FtMt in A549 and A549/DDP cells

3 讨论

NSCLC 是常见的恶性肿瘤之一,临床对于 NSCLC 的治疗往往采用以铂类为基础的化学联合治疗,部分患者治疗 2~3 年后对铂类会产生继发性耐药^[12]。耐药细胞具有更强的侵袭转移特性,晚期 NSCLC 患者常死于铂类耐药后的广泛转移,寻找 NSCLC 铂类化疗耐药机制一直是医学界研究的热点^[13]。构建铂类耐药的肺癌细胞系将有利于探寻其耐药机制。在本研究中,购买了一株肺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP,在深入探讨肺癌耐药机制之前,首先验证了购买的 A549/DDP 细胞的顺铂耐药性。通过研究发现,A549/DDP 细胞与 A549 细胞经顺铂处理后,A549/DDP 细胞的存活率显著高于 A549 细胞,凋亡率和坏死率显著低于 A549 细胞。这表明 A549/DDP 细胞是顺铂耐药细胞系。

研究证实,顺铂可通过与肿瘤细胞 DNA 结合形成交叉键,从而抑制其复制^[14]。当 DNA 受损后,细胞停滞在 G0/G1 期,此时细胞发生修复,容易使化疗药物无效^[15]。若细胞周期大量停滞在 G2/M 期,细胞周期调控系统会发生失衡,可诱发肿瘤细胞失

控性生长^[16]。本研究结果显示,1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂处理后,A549 细胞的细胞周期主要停留在 G0/G1 期和 G2/M 期,随着顺铂给药剂量的增加,A549 细胞停留在 G0/G1 期和 G2/M 期的细胞数量逐渐降低,即在 1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,A549 细胞未发生顺铂耐药,细胞凋亡率随着顺铂给药剂量增加而增加。顺铂可以更好地与肺癌细胞 DNA 稳定结合,抑制肺癌细胞的自我修复,从而诱导肺癌细胞 A549 发生凋亡。1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂处理后,随着顺铂给药浓度的增加,进入 G0/G1 期和 G2/M 期的 A549/DDP 细胞数量先升高后降低。在顺铂低剂量给药条件下(1.0~2.5 $\mu\text{g/mL}$),其诱导的 A549/DDP 细胞凋亡率升高的不十分显著,此时 A549/DDP 细胞发生了顺铂耐药;当顺铂给药剂量增加到 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,其诱导的 A549/DDP 细胞凋亡率显著升高,此时 A549/DDP 细胞的耐药性因顺铂给药剂量的增加而得到缓解。但在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。因而在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。因而在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。因而在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。

EMT 是指在特定生理病理条件下,具有极性的上皮细胞失去极性,向间质细胞表型转化,使其具有运动能力且能在细胞基质间自由运动,具有间质表型的细胞对化学药物的敏感性降低,但向周围组织及远端器官侵袭、迁移的能力增强^[17]。E-cadherin 的减少和 N-cadherin 的升高是 EMT 发生的重要标志,此时细胞间的粘附能力下降,运动能力和粘附能力增强^[18]。波形蛋白(vimentin)是细胞间质表型的重要标志,能使细胞的空间结构发生变化,增加细胞的迁移与侵袭能力^[19]。机体内参与调控 EMT 过程的关键转录因子包括锌指蛋白、snail、slug、twist 等,其中 snail、slug 和 twist 的研究最为多

见^[20]。Snail、slug、ZEB1、E12/E47 和 SIP1 均是转录抑制因子 snail 超家族的成员,该家族成员的结构非常相似,C-末端含有锌指 DNA 结合区域,N-末端含有 SNAG 结构域^[21]。Snail、slug 与 EMT 的进展有关^[22]。下调 snail 和 slug 水平,可以逆转 EMT 过程^[23]。Twist 与恶性肿瘤转移密切相关,在 NSCLC 肺癌组织中高表达。减少 twist 的表达可通过抑制 N-钙黏蛋白表达抑制癌细胞侵袭^[24]。Twist 作为碱性螺旋-环-螺旋转录因子的家族成员,是多种肿瘤的不良预后因子^[25]。大量研究表明,EMT 过程与肺癌的获得性耐药有关,抑制肺癌细胞的 EMT 过程,可能会有效抑制肺癌细胞的耐药与侵袭^[26]。本研究结果显示,A549/DDP 细胞迁移速度显著快于 A549 细胞,且 A549/DDP 细胞中的 E-cadherin 表达水平和 mRNA 水平低于 A549 细胞,N-cadherin 和 vimentin 蛋白的表达水平和 mRNA 水平显著高于 A549 细胞,参与 EMT 过程的 snail、slug 和 twist 的 mRNA 水平高于 A549 细胞。这一结果表明,A549/DDP 细胞不仅存在顺铂耐药,还具备较高的细胞侵袭和迁移能力,即肺癌细胞的顺铂耐药与 EMT 过程有关,肺癌细胞发生顺铂耐药,预示着其可能会同时发生远端转移。

FtMt 是一种由染色体 5q23.1 上无内含子基因编码的线粒体定位的铁存储蛋白,具有与铁蛋白重链同源结构,该结构有助于在 FtMt 的壳结构中储存铁^[11,27-28]。FtMt 主要在高耗氧量和代谢活性的细胞中表达,如精母细胞、神经元和心肌细胞。FtMt 会随着线粒体中铁的增加而增加,但在肝和脾中的 FtMt 表达相对较低,而这两个部位的细胞质内储存了大量的铁。FtMt 的水平似乎与线粒体丰度的相关性大于铁代谢的相关性^[29]。FtMt 作为铁库,储存铁的能力大于细胞质铁蛋白^[30-31]。FtMt 增加时会促进铁从胞质向线粒体重新分布,加入铁螯合剂后,这种作用会增强。FtMt 对铁的强烈储存作用解释了为什么大多数细胞一直保持低水平的 FtMt^[31]。目前关于 FtMt 在肺癌细胞中的表达情况研究较少,本课题组之前研究发现,在肺癌细胞 A549 中检测到了 FtMt mRNA 的表达,通过给予顺铂后,线粒体中 FtMt mRNA 水平下调^[32]。这提示 FtMt 在肺癌细胞中可能有重要作用,但具体机制尚不十分清楚。本研究发现,A549/DDP 细胞中的 FtMt 蛋白表达水平显著高于 A549 细胞,这提示在肺癌细胞耐受顺铂的过程中,存在着 FtMt 蛋白表达水平的变化,

FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂过程中可能发挥了重要作用,但具体作用机制有待进一步研究。

铁转运蛋白(ferroportin,FPn)、二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1,DMT1)和转铁蛋白受体 1(transferrin receptor1,TfR1)均是细胞中负责参与铁运输的重要信号因子。其中,FPn 是目前唯一已知的铁输出蛋白,而铁调素是一种铁稳态调节激素,可以与 FPn 结合,以防止铁外流^[33-34]。在本研究中,A549/DDP 细胞中 DMT1 和 FPn mRNA 水平显著高于 A549 细胞,这提示 A549/DDP 细胞中的铁代谢比 A549 细胞活跃。

组织可以通过 TfR1 从血液中吸收转铁蛋白结合铁,DMT1 可介导内吞小泡上转铁蛋白-TfR1 复合物上的铁进入细胞浆^[35]。当铁负荷时 TfR1 和 DMT1 表达会下调^[36]。在本研究中,A549/DDP 细胞中 DMT1 mRNA 水平虽低于 A549 细胞,但比较差异无统计学意义。这提示 DMT1 可能不是造成 A549/DDP 与 A549 细胞中铁代谢差异的主要基因。而 A549/DDP 细胞中 TfR1 mRNA 水平显著高于 A549 细胞,提示 TfR1 参与了肺癌顺铂耐药细胞的铁代谢,TfR1 的高表达可能是肺癌顺铂耐药细胞中铁代谢紊乱的重要机制之一。此外,Nie 等^[31]研究发现,细胞转染 FtMt 以后,细胞中的 TfR1 的表达水平会升高,这一结论与我们的结果相似。

综上所述,肺癌细胞的顺铂耐药与 EMT 过程有关,肺癌细胞发生顺铂耐药的同时可能也发生了侵袭和转移。肺癌细胞顺铂耐药过程中,存在着 FtMt 蛋白表达水平的变化,提示 FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂过程中可能发挥了重要作用。铁代谢紊乱可能与肺癌细胞顺铂耐药有关。但具体作用机制有待进一步研究。下一步会通过构建过表达载体或敲除载体进一步评价 FtMt 在 EMT 和顺铂耐药过程中的作用,为非小细胞肺癌发病机制的探讨提供更多的实验数据。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(3): 288-300.
- [3] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.
- [4] 彭琳洁. 牡蛎肽对顺铂所致小鼠肠屏障损伤的干预作用

- [D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [5] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung cancer statistics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 1-19.
- [6] Peng DH, Ungewiss C, Tong P, et al. ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis [J]. *Oncogene*, 2017, 36(14): 1925-1938.
- [7] 刘鑫鑫, 田孝东, 杨尹默. 铁死亡机制在胰腺癌中的研究现状与进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(7): 1366-1368.
- [8] 段晓悦. 缺铁条件下高转移性乳腺癌细胞摄取铁的途径及机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- [9] 李若男, 郭昆全. 铁蛋白与 2 型糖尿病 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(10): 951-954.
- [10] Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800(8): 783-792.
- [11] Guan H, Yang H, Yang M, et al. Mitochondrial ferritin protects SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative stress and modulates α -synuclein expression [J]. *Exp Neurol*, 2017, 291: 51-61.
- [12] Ma X, Liang AL, Liu YJ. Research progress on the relationship between lung cancer drug-resistance and microRNAs [J]. *J Cancer*, 2019, 10(27): 6865-6875.
- [13] Phiboonchaiyanan PP, Petpiroon N, Sritularak B, et al. Phoyunnanin E induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via p53 activation and down-regulation of surviving [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6281-6290.
- [14] 蔡晓燕. MACC1、MRP、LRP 与肺腺癌顺铂耐药的相关性研究 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2021.
- [15] 陈媛媛. 长链非编码 RNA SCARNA2 介导的 DNA 损伤修复在结直肠癌放疗敏感性中的作用及机制 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
- [16] Ji T, Liu D, Shao W, et al. Decreased expression of *Lats1* is correlated with the progression and prognosis of glioma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 67.
- [17] Feng LM, Wang XF, Huang QX. Thymoquinone induces cytotoxicity and reprogramming of EMT in gastric cancer cells by targeting PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *J Biosci*, 2017, 42(4): 547-554.
- [18] Lee GH, Malietzis G, Askari A, et al. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? -A systematic review [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2015, 41(3): 300-308.
- [19] Williams MA, Biguetti C, Romero-Bustillos M, et al. Colorectal cancer-associated genes are associated with tooth agenesis and may have a role in tooth development [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2979.
- [20] Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, et al. Expression of EMT markers Slug and Twist in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(7): 3961-3968.
- [21] 李奇隆, 陈湘楠, 龙凤, 等. Snail 家族基因功能研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(4): 1287-1294.
- [22] Han J, Xue Y, Liang Y, et al. USP5 promotes epithelial-mesenchymal transition by stabilizing SLUG in hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2019, 9(2): 573-587.
- [23] Jin L, Zhu C, Wang X, et al. Urocortin attenuates TGF β ₁-induced Snail₁ and slug expressions: inhibitory role of Smad₇ in Smad_{2/3} signaling in breast cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11): 2494-2503.
- [24] Yang Z, Zhang X, Gang H, et al. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(3): 925-930.
- [25] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analysis [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1-33.
- [26] Lee JG, Wu R. Erlotinib-cisplatin combination inhibits growth and angiogenesis through c-MYC and HIF-1 α in EGFR-mutated lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neoplasia*, 2015, 17(2): 190-200.
- [27] Hagen WR, Hagedoorn PL, Honarmand Ebrahimi K. The workings of ferritin: a crossroad of opinions [J]. *Metallomics*, 2017, 9(6): 595-605.
- [28] Honarmand Ebrahimi K, Hagedoorn PL, Hagen WR. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(1): 295-326.
- [29] Drysdale J, Arosio P, Invernizzi R, et al. Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 29(3): 376-383.
- [30] Ciambellotti S, Pratesi A, Tassone G, et al. Iron binding in the ferroxidase site of human mitochondrial ferritin [J]. *Chemistry*. 2021, 27(59): 14690-14701.
- [31] Nie G, Sheftel AD, Kim SF, et al. Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis [J]. *Blood*, 2005, 105(5): 2161-2167.
- [32] 郝艳丽, 霍明洋, 覃锐, 等. 线粒体铁蛋白对顺铂诱导 A549 细胞凋亡的作用研究 [J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(2): 126-133, 142.
- [33] Saneela S, Iqbal R, Raza A, et al. Hecpudin: A key regulator of iron [J]. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(8): 1170-1175.
- [34] Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms [J]. *Nature*, 2020, 586(7831): 807-811.
- [35] 赵晋英, 曾佳佳, 李艳伟. 肺的铁稳态机制与肺疾病时铁代谢的变化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(9): 1002-1012.
- [36] Deschemin JC, Mathieu JRR, Zumerle S, et al. Pulmonary iron homeostasis in hepcidin knockout mice [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 804.