

· 基础研究 ·

## PLOD2对卵巢癌奥沙利铂化疗耐药的影响及机制研究

边苏苏<sup>1,2</sup>, 陈玉凤<sup>1,2</sup>, 张雯晴<sup>1,2</sup>, 蒯兴旺<sup>2</sup>, 常新霞<sup>2</sup>, 唐奇<sup>2</sup>, 冯振卿<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学病理学系, <sup>2</sup>国家卫生健康委员会抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的:探讨赖氨酸羟化酶2(procollagenlysinase 2, PLOD2)对卵巢癌奥沙利铂化疗耐药的影响及机制。方法:应用慢病毒转染将 PLOD2 干扰和过表达质粒转染至卵巢癌 A2780 和 OV1063 细胞株,嘌呤霉素筛选出稳定转染质粒的细胞株;qRT-PCR 和 Western blot 检测 PLOD2 表达的变化;CCK-8 实验、克隆形成实验、流式细胞术检测干扰或过表达 PLOD2 对卵巢癌细胞奥沙利铂作用下增殖和细胞凋亡的影响;建立异种移植瘤裸鼠模型,观察 PLOD2 表达下调后奥沙利铂对肿瘤生长抑制作用的变化;通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 PLOD2 干扰和过表达对乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)、多药耐药蛋白 1(multidrug resistance protein 1, MRP1)mRNA 水平和蛋白水平的影响。结果:在稳定转染 PLOD2 干扰或过表达质粒后, PLOD2 mRNA 和蛋白表达水平分别较转染空载体质粒组明显下调或升高。在相同药物浓度条件下,奥沙利铂对卵巢癌 PLOD2 干扰组细胞的增殖抑制率显著高于对照组,半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 下降,克隆形成能力下降,细胞凋亡率增加;同样,在相同药物浓度条件下,奥沙利铂对卵巢癌 PLOD2 过表达组细胞的增殖抑制率显著低于对照组, IC<sub>50</sub> 升高,克隆形成能力增强,细胞凋亡率下降。 PLOD2 干扰组奥沙利铂作用下的瘤体体积和瘤重均低于对照组。稳定转染 PLOD2 干扰质粒或过表达质粒后, BCRP、MRP1 mRNA 和蛋白表达水平明显下调或上调。结论: PLOD2 可增强卵巢癌对奥沙利铂的化疗耐药性,这一作用可能与药转蛋白 BCRP 和 MRP1 表达上调有关。

**[关键词]** 赖氨酸羟化酶 2; 卵巢癌; 耐药; 奥沙利铂; 乳腺癌耐药蛋白; 多药耐药蛋白 1

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2022)07-0903-11

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20220701

## Effects and mechanism of PLOD2 on oxaliplatin chemoresistance in ovarian cancer

BIAN Susu<sup>1,2</sup>, CHEN Yufeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Wenqing<sup>1,2</sup>, KUAI Xingwang<sup>2</sup>, CHANG Xinxia<sup>2</sup>, TANG Qi<sup>2</sup>, FENG Zhenqing<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, <sup>2</sup>National Health Commission Key Laboratory of Antibody Techniques, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects and mechanism of PLOD2 on oxaliplatin chemoresistance in ovarian cancer. **Methods:** A2780 cells and OV1063 cells were infected with the lentivirus encoding shRNA against PLOD2 or lentivirus encoding OERNA against PLOD2 respectively. The stably transfected cell lines were selected by puromycin. The expression levels of PLOD2 were detected by qRT-PCR and Western blot. CCK-8 proliferation test, clone formation assay and flow cytometry were used to detect effects of oxaliplatin on cell proliferation and apoptosis. The xenograft nude mouse tumor model was used to observe inhibition effect of oxaliplatin on tumor growth after PLOD2 downregulation; The mRNA and protein expressions of BCRP and MRP1 were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results:** The mRNA and protein expressions of shPLOD2 (transfected with PLOD2 shRNA) and OEPLD2 (transfected with PLOD2 OERNA) were significantly lower or higher compared with the control groups (transfected with the scrambled shRNA or OERNA). At the same concentration of oxaliplatin, the shPLOD2 group showed higher proliferation inhibition rate, the IC<sub>50</sub> value of the shPLOD2 was lower, the ability of clone formation of shPLOD2 group decreased significantly, and the apoptosis rate increased significantly than those in the control group. In contrast, at the same concentration of oxaliplatin, the OEPLD2 group showed lower proliferation inhibition rate, the IC<sub>50</sub> value of the OEPLD2 was higher, the ability of clone formation of OEPLD2 group increased significantly, and the apoptosis rate decreased significantly than those in the control group. Compared with

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81773100)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

the shControl group, the volume and weight of transplanted tumors in the shPLOD2 group under oxaliplatin treatment were significantly decreased. The mRNA and protein expressions of chemoresistance-related gene BCRP and MRP1 decreased after interference with PLOD2 expression. However, the mRNA and protein expressions of chemoresistance-related gene BCRP and MRP1 increased after PLOD2 overexpression. **Conclusion:** The study suggests that PLOD2 can intensify the oxaliplatin chemoresistance of ovarian cancer, which may be related to the upregulation of BCRP and MRP1 expression.

[Key words] PLOD2; ovarian cancer; chemoresistance; oxaliplatin; BCRP; MRP1

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(06): 903-912, 1000]

卵巢癌在全球女性恶性肿瘤中,发病率和病死率分居第7位和第8位,5年生存率低于45%。在中国女性生殖系统恶性肿瘤中卵巢癌的发病率和病死率分别居第3位和第1位,每年的新发病例为52 100例,死亡达22 500例。手术联合铂类化疗作为一线治疗方案,很大程度上缓解了患者病情,但仍有高达70%的病例会复发<sup>[1-2]</sup>。卵巢癌复发与耐药性的产生密切相关,深入探讨卵巢癌耐药的发生机制,提高化疗的敏感性,对于改善卵巢癌患者的预后具有重要意义。

赖氨酸羟化酶2(procollagenlysine 2-xoglutarate 5-dioxygenase 2, PLOD2)是PLOD家族的一员,由PLOD2基因编码,是胶原交联形成过程中的关键酶<sup>[3]</sup>。PLOD2可促进多种肿瘤的侵袭进展,包括乳腺癌、肝癌、非小细胞肺癌等<sup>[4-6]</sup>。铂类药物常作为卵巢癌一线化疗的首选药物,其中奥沙利铂作为第三代铂类化疗药,被广泛应用于卵巢癌治疗,但容易产生获得性耐药。PLOD2表达与多种肿瘤的预后不良有关,但PLOD2对卵巢癌化疗耐药的影响及分子机制尚不清楚。本研究拟采用干扰或过表达PLOD2的方法,观察PLOD2对卵巢癌奥沙利铂化疗耐药的影响,初步探讨其分子机制,为卵巢癌临床化疗耐药的研究及逆转提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人卵巢癌细胞株A2780、OV1063、PEO4、HO8910、SKOV3,工具细胞293T由本实验室保存。RPMI 1640培养基、DMEM培养基、100×青霉素/链霉素双抗、胎牛血清(Gibco公司,美国);pPLK/GFP-Puro-PLOD2 shRNA和pLenti-CMV-PLOD2-Flag-GFP-Puro质粒(南京晶百生物公司);Lenti-Pac慢病毒包装试剂盒(GeneCopoeia公司,美国);嘌呤霉素(Sigma公司,美国);RIPA裂解液、BCA蛋白定量检测试剂盒、蛋白上样缓冲液(南京碧云天生物公

司);鼠抗人PLOD2单克隆抗体(Proteintech生物公司,美国);鼠抗人PLOD2单克隆抗体(R&D生物公司,美国);兔抗人MRP1多克隆抗体、兔抗人BCRP多克隆抗体(沈阳万类生物公司);HRP标记的兔抗小鼠IgG抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(Abcam公司,美国);CCK-8试剂盒(同仁公司,日本);细胞/组织总RNA提取试剂盒、High-Capacity cDNA逆转录试剂盒、SYBR荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞生物公司);Annexin V-kFluor647/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

按照10%胎牛血清和1%双抗的比例配制RPMI 1640、DMEM完全培养基,卵巢癌细胞株A2780、OV1063、PEO4、HO8910和SKOV3培养于RPMI 1640完全培养基,293T细胞培养于DMEM完全培养基,置于37℃和5% CO<sub>2</sub>的恒温生物培养箱中。每2 d换液,待细胞融合度达90%,进行胰酶消化及传代培养。

#### 1.2.2 PLOD2低表达细胞株和高表达细胞株的鉴定

培养卵巢癌细胞OV1063、HO8910、SKOV3、PEO4、A2780,待其处于对数生长期,根据细胞量用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,按照1:4的比例加入5×上样缓冲液,95℃煮沸10 min,分装后存放于-20℃。取等量蛋白质,用SDS-PAGE法分离后转至PVDF膜,5%的脱脂奶粉溶液封闭后孵育鼠抗人PLOD2单克隆抗体(1:1 000)、鼠抗人GAPDH单克隆抗体(1:1 000),4℃过夜;次日孵育HRP标记的兔抗小鼠IgG抗体(1:10 000),滴加ECL发光液后曝光。ImageJ进行蛋白定量分析。实验重复3次。

#### 1.2.3 PLOD2干扰和过表达质粒的构建及鉴定

PLOD2干扰和过表达质粒及空载体质粒均由晶百生物公司合成,其中干扰质粒目标基因长度为61 bp(Gene ID:852; Accessions:NM\_000435),PLOD2

shRNA序列为5'-CCAGTTACTGAAAGGTCTTT-3';过表达质粒目标基因长度为2 238 bp(Gene ID:5352;Accessions:NM\_000935)。DH5 $\alpha$ 感受态细胞进行质粒转化,均匀涂抹菌液于含氨苄青霉素(ampicillin, AMP)的LB平板,倒置平放12~16 h,进行单克隆挑选,并放置于LB液体培养基,37℃摇床200 r/min,12~16 h,可见菌液浑浊,保存菌液于-80℃。取少量送南京金斯瑞公司进行测序,以验证PLOD2干扰序列克隆入pPLK/GFP+Puro载体和PLOD2过表达序列克隆入pLenti-CMV-GFP-Puro载体。

#### 1.2.4 慢病毒包装及滴度测定

10 cm培养皿培养293T细胞,待融合度达80%左右,用三质粒包装系统按照Lenti-Pac慢病毒包装试剂说明书进行慢病毒包装。6~8 h换液,48 h和72 h各收1次病毒,混合后2 000 r/min,离心10 min去除细胞碎片,并用0.45  $\mu$ m滤器过滤。慢病毒浓缩液浓缩4℃过夜。次日,5 000 r/min离心40 min,离心机提前4℃预冷。小心吸弃上清,用RPMI 1640进行重悬得慢病毒。1 $\times$ 10<sup>4</sup>个/孔293T细胞铺于96孔板,设定10个孔,第1个是空白对照,从第2个孔开始,慢病毒1:10倍比稀释,培养48 h根据293T细胞的荧光率计算慢病毒滴度。

#### 1.2.5 病毒感染及稳定株筛选

将A2780细胞株和OV1063细胞株分别接种于6孔板,次日按照病毒感染复数MOI40和MOI30进行慢病毒感染,感染含干扰质粒和过表达质粒的慢病毒的细胞分别标记为shPLOD2和OEPLOD2,感染空载体慢病毒的细胞分别标记为shControl和OEControl,并添加polybrene增强感染效率。48 h观察荧光并进行嘌呤霉素筛选。同时设立空白对照组,待空白对照组细胞全部死亡,并且转染病毒组细胞呈现簇状生长,进行半量维持筛选2周。

#### 1.2.6 检测PLOD2表达变化

##### 1.2.6.1 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

待细胞进入对数生长期,根据细胞/组织总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,再根据High-Capacity cDNA逆转录试剂盒说明书逆转录总RNA为cDNA。最后根据SYBR荧光定量PCR试剂盒说明书进行荧光定量扩增。反应体系为:Premix 10  $\mu$ L, PLOD2或18S上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各0.4  $\mu$ L, cDNA模板2  $\mu$ L,去离子水7.2  $\mu$ L。每个样品3个复孔,该实验重复3次。相关引物序列:PLOD2上游引物5'-CTCGAGCATCCCCACAGATAA-3',下游引物

5'-TTGACCAAGGACCTTCACAGT-3';18S上游引物5'-AACCCGTTGAACCCATT-3',下游引物5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'。PCR扩增条件:95℃30 s预变性;95℃10 s,60℃30 s,40个循环;95℃15 s,60℃1 min,95℃15 s。反应结束后检测目的基因和相应内参18S的C<sub>t</sub>值,基因表达的相对定量值以2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>计算。

##### 1.2.6.2 免疫印迹试验(Western blot)

取shPLOD2组、shControl组、OEPLOD2组、OEControl组对数生长期细胞,提取蛋白、测定蛋白浓度、进行Western blot并计算灰度值与1.2.2方法相同。

##### 1.2.7 CCK-8实验

胰酶消化各组对数生长期细胞后,以5 000个/孔细胞铺于96孔板,每孔含100  $\mu$ L RPMI 1640完全培养基,每组3个复孔。过夜后,设定奥沙利铂浓度依次为0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00  $\mu$ mol/L,继续培养48 h后,吸弃旧培养基,后加入每孔10  $\mu$ L CCK-8和90  $\mu$ L培养基,同时设定不含细胞只含CCK-8的空白对照孔,37℃和5% CO<sub>2</sub>的恒温生物培养箱培养2 h,用Multiskan Spectrum酶标仪测定450 nm波长处的吸光度。该实验重复3次。细胞抑制率=[1-(加药组-空白组)/(未加药组-空白组)] $\times$ 100%。

##### 1.2.8 克隆形成实验

取对数生长期的各组细胞,按照500个/孔的浓度种植于6孔板,贴壁后用奥沙利铂1.25  $\mu$ mol/L药物处理,继续培养14 d。用4%多聚甲醛固定30 min后,用结晶紫染色20 min。进行拍照并统计,该实验重复3次。

##### 1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的各组细胞,以4 $\times$ 10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔板,待过夜贴壁后加入1.25  $\mu$ mol/L奥沙利铂,对照组加入等量PBS作为对照。48 h后,收集旧培养基,用不含EDTA的胰酶消化细胞,终止消化,1 000 r/min离心5 min后,用PBS重悬细胞并2 000 r/min离心5 min,重复1次。加入Annexin V-kFluor647/PI双染细胞凋亡检测试剂,4℃避光15 min,用BD FACS Aria II SORP分选型流式细胞仪和Beckman Coulter CytoFLEX流式细胞仪进行细胞凋亡率测定。该实验重复3次。

##### 1.2.10 裸鼠皮下成瘤实验

取4~6周龄雌性BALB/c-NUL裸鼠30只,购自南京医科大学实验动物中心,饲养于SPF级动物房屏障系统的洁净层流架内,保持相对湿度

40%~60%, 温度(25±1)℃, 生长所需的垫料、饲料和饮水均经灭菌处理, 自由进食和饮水, 每日保持10 h的光照, 14 h无光的明暗周期, 实验前适应性饲养1周。所开展的动物实验均通过南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准(批准编号为IACUC-2106029)。收集shPLOD2和shControl的对数生长期细胞, 80%左右密度用胰酶进行消化, RPMI 1640培养基调整细胞密度为 $1 \times 10^8$ 个/mL的细胞悬液。细胞悬液100 μL/只注射到裸鼠皮下, 7 d成瘤, 舍弃未成瘤和瘤体直径超过1 cm的裸鼠。shPLOD2组和shControl组再分为奥沙利铂处理组和PBS对照组, 每组6只。奥沙利铂处理组每周1次腹腔内注射奥沙利铂(10 mg/kg), 对照组则注射等量PBS溶液。每3 d用游标尺测量肿瘤大小并记录, 肿瘤体积=长径×短径<sup>2</sup>/2<sup>[7]</sup>。1个月后, 处死裸鼠, 分离裸鼠皮下的瘤体, 并进行称重。

#### 1.2.11 检测BCRP和MRP1的表达变化

##### 1.2.11.1 qRT-PCR检测BCRP和MRP1 mRNA变化

待细胞进入对数生长期, 根据细胞/组织总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 再根据High-Capacity cDNA逆转录试剂盒说明书逆转录总RNA为cDNA。最后根据SYBR荧光定量PCR试剂盒说明书进行荧光定量扩增。反应体系为: Premix 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL, cDNA模板2 μL, 去离子水7.2 μL。每个样品3个复孔, 该实验重复3次。相关引物序列: BCRP上游引物5'-CAGGTGGAGGCAAATCTTCGT-3', 下游引物5'-ACCCTGTTAATCCGTTTCGTTTT-3'; MRP1上游引物5'-CTCTATCTCTCCCGACATGACC-3', 下游引物5'-AGCAGACGATCCACAGCAAAA-3'; 18S上游引物5'-AACCCGTTGAACCCATT-3', 下游引物5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'。扩增条件和计算方法与前文相同。

##### 1.2.11.2 Western blot检测BCRP和MRP1的蛋白表达

取对数生长期细胞, 根据细胞量用RIPA裂解液提取细胞总蛋白, BCA试剂盒测定蛋白浓度, 按照1:4的比例加入5×上样缓冲液, 95℃煮沸10 min, 分装后存放于-20℃。取等量蛋白质, 用SDS-PAGE法分离后转至PVDF膜, 5%的脱脂奶粉溶液封闭后孵育兔抗人MRP1多克隆抗体(1:1 000)、兔抗人BCRP多克隆抗体(1:1 000)、鼠抗人GAPDH单克隆抗体(1:1 000), 4℃过夜; 次日孵育对应的HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(1:10 000)和兔抗小鼠IgG抗体(1:10 000), 滴加ECL发光

液后曝光。ImageJ进行蛋白定量分析。实验重复3次。

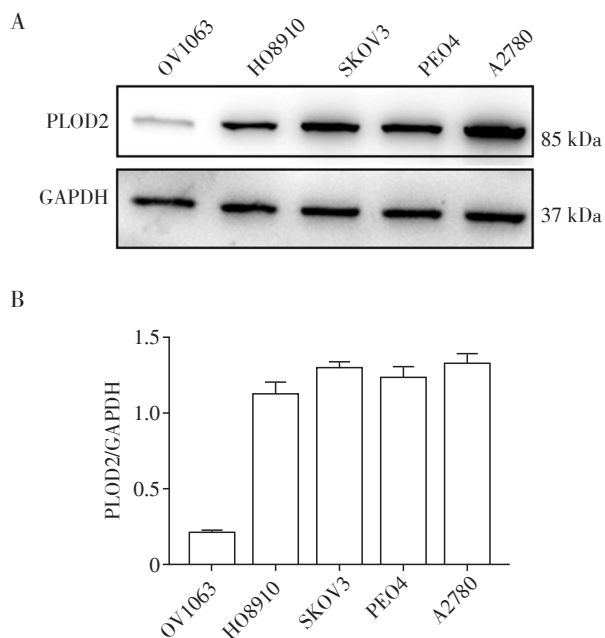
#### 1.3 统计学方法

用Graphpad Prism 7.0进行统计学分析, 计量资料以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组比较采用*t*检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 用Tukey法进行两两比较检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PLOD2在不同卵巢癌细胞中的表达

提取不同卵巢癌细胞OV1063、HO8910、SKOV3、PEO4、A2780中的总蛋白, 进行Western blot实验。结果表明, PLOD2在OV1063细胞中相对低表达, 在A2780细胞中相对高表达(图1)。选择OV1063为PLOD2低表达细胞株, A2780为PLOD2高表达细胞株进行后续实验。



A:不同卵巢癌细胞中的PLOD2表达水平;B:直方图定量分析( $n=3$ )。

图1 PLOD2在卵巢癌细胞株中的蛋白表达情况

Figure 1 Protein expression of PLOD2 in ovarian cancer cell lines

### 2.2 慢病毒干扰和过表达质粒的构建及鉴定

将针对PLOD2基因的干扰和过表达质粒进行DNA测序, 测序结果通过Blast序列比对, 证实shPLOD2已正确克隆入pPLK/GFP+Puro载体, 表明重组shPLOD2质粒构建成功; OEPLD2已正确克隆入pLenti-CMV-GFP-Puro载体, 表明OEPLD2质粒构建成功。

### 2.3 shPLOD2质粒和OEPLD2质粒的转染效率

慢病毒表达载体pPLK/GFP+Puro和pLenti-CMV-GFP-Puro带有绿色荧光蛋白(GFP)基因,可以通过观察绿色荧光来评估转染效率。shPLOD2组和shControl组的荧光较空白对照组有显著升高,转染效率 > 90% (图 2A)。OEPLD2组和OEControl组的荧光较空白对照组有显著升高,转染效率 > 90% (图 2B)。

### 2.4 shPLOD2质粒的干扰效果和OEPLD2质粒的过表达效果

qRT-PCR结果表明,在shPLOD2细胞株中PLOD2 mRNA表达水平较shControl组明显下降( $P < 0.01$ ,图 3A),OEPLD2细胞株中PLOD2 mRNA表达水平较OEControl组明显升高( $P < 0.01$ ,图 3B)。Western blot检测各组细胞中PLOD2蛋白表达,结果显示,shPLOD2组细胞的PLOD2蛋白表达水平较shControl组明显下调( $P < 0.01$ ,图 3C、

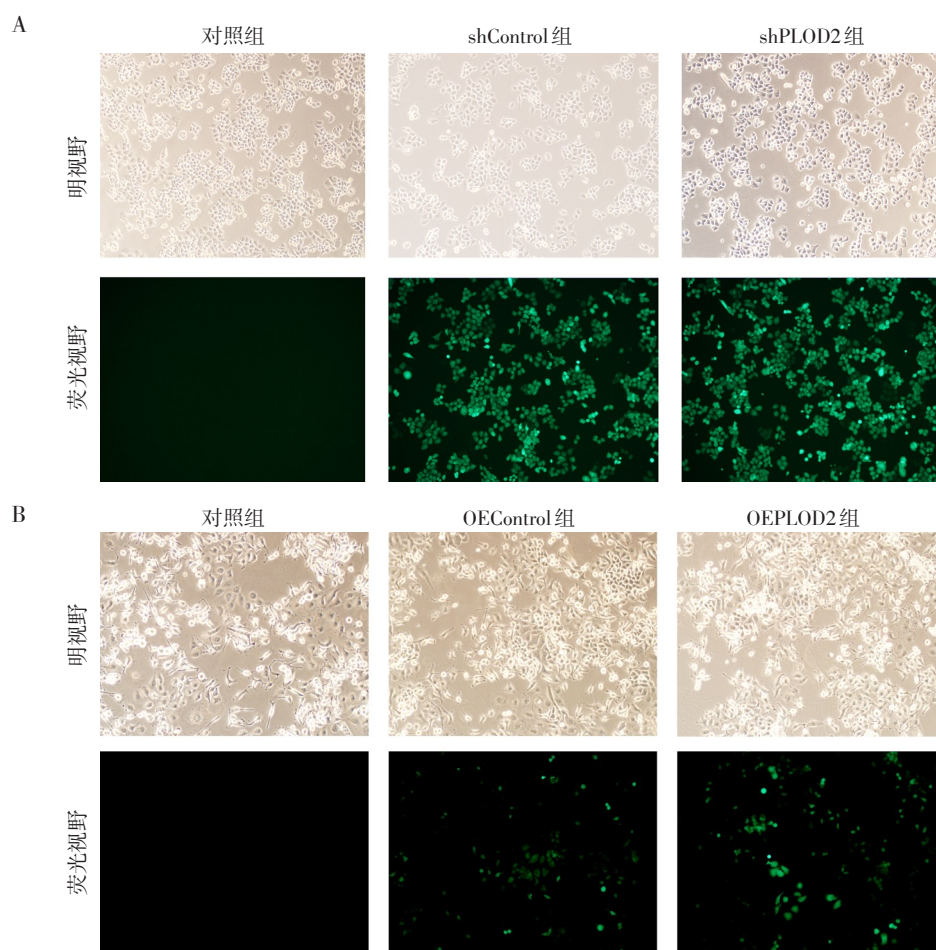
E),OEPLD2组细胞的PLOD2蛋白表达水平较OEControl组明显上调( $P < 0.01$ ,图 3D、F)。

### 2.5 CCK-8法检测PLOD2干扰或过表达对奥沙利铂作用下卵巢癌细胞增殖抑制的影响

结果显示,在奥沙利铂相同药物浓度作用条件下,shPLOD2组细胞较shControl组增殖抑制能力增强(图 4A),半数抑制浓度 $IC_{50}$ 由 $(1.444 \pm 0.149) \mu\text{mol/L}$ 下降至 $(0.536 \pm 0.026) \mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.001$ )。同时,OEPLD2组细胞较OEControl组增殖抑制能力减弱(图 4B), $IC_{50}$ 由 $(0.890 \pm 0.048) \mu\text{mol/L}$ 升高至 $(4.341 \pm 0.289) \mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.001$ )。

### 2.6 克隆形成试验检测PLOD2干扰或过表达对奥沙利铂作用下卵巢癌细胞增殖的影响

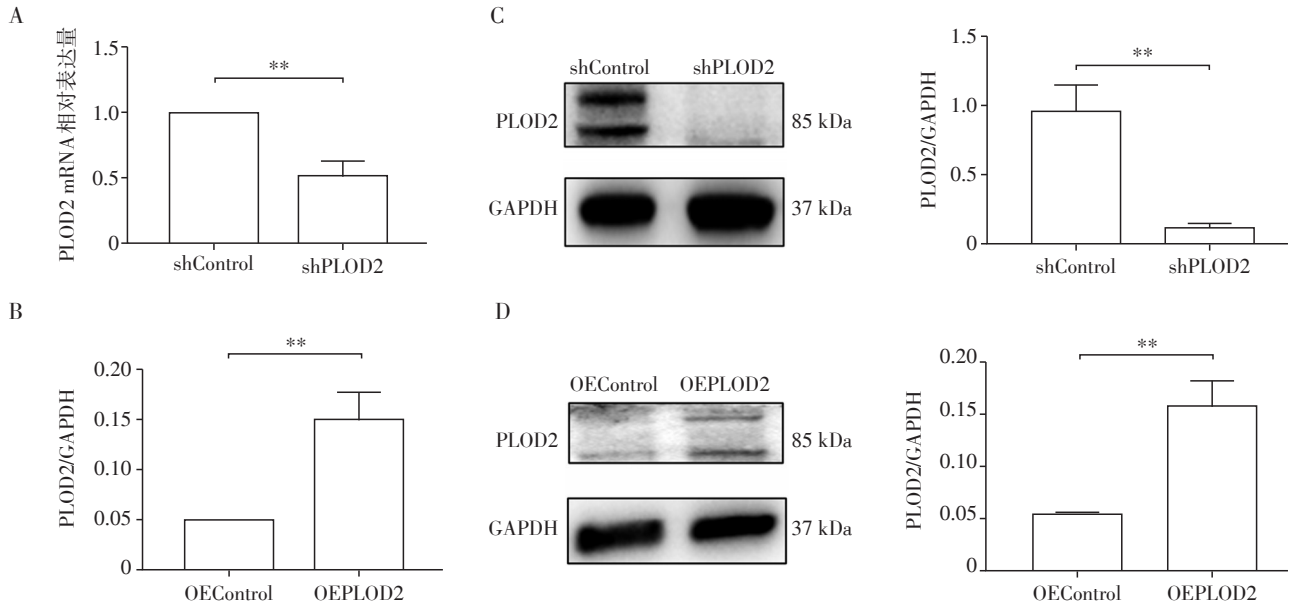
结果显示,在奥沙利铂处理条件下,shPLOD2细胞较shControl细胞集落形成明显减少,分别为 $(19 \pm 3)$ 个和 $(41 \pm 4)$ 个( $P < 0.01$ ,图 5A),OEPLD2细胞较OEControl细胞集落形成明显增加,分别为



A: 荧光显微镜下观察干扰及其对照组绿色荧光蛋白表达( $\times 100$ ); B: 荧光显微镜下观察过表达及其对照组绿色荧光蛋白表达( $\times 100$ )。

图2 PLOD2干扰和过表达质粒的转染效率

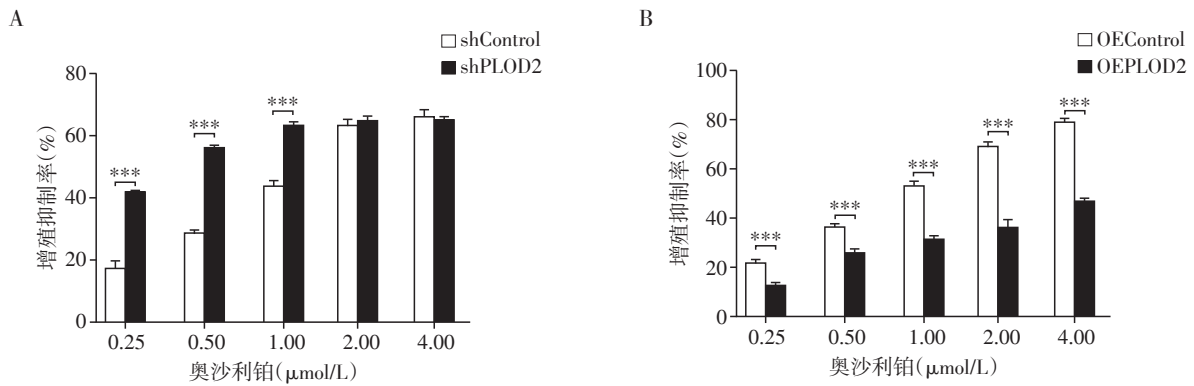
Figure 2 Transfection efficiency of PLOD2 interference and overexpressed plasmids



A、B:qRT-PCR检测PLOD2 mRNA表达;C、D:Western blot检测PLOD2蛋白表达。两组比较,\*\* $P < 0.01, n=3$ 。

图3 PLOD2质粒的干扰和过表达效率

Figure 3 Efficiencies of interference of shPLOD2 and overexpression of OEPLD2



A:PLOD2干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞增殖抑制变化;B:PLOD2过表达对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞增殖抑制变化。两组比较,\*\*\* $P < 0.001, n=3$ 。

图4 CCK-8实验检测奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞增殖抑制

Figure 4 Proliferation inhibitions under Oxaliplatin treatment of ovarian cancer cells were detected by CCK-8 assay

( $31 \pm 4$ )个和( $12 \pm 3$ )个( $P < 0.01$ ,图5B)。而在无奥沙利铂处理条件下,PLOD2干扰或过表达对卵巢癌细胞克隆形成能力的影响无统计学差异( $P > 0.05$ ,图5)。

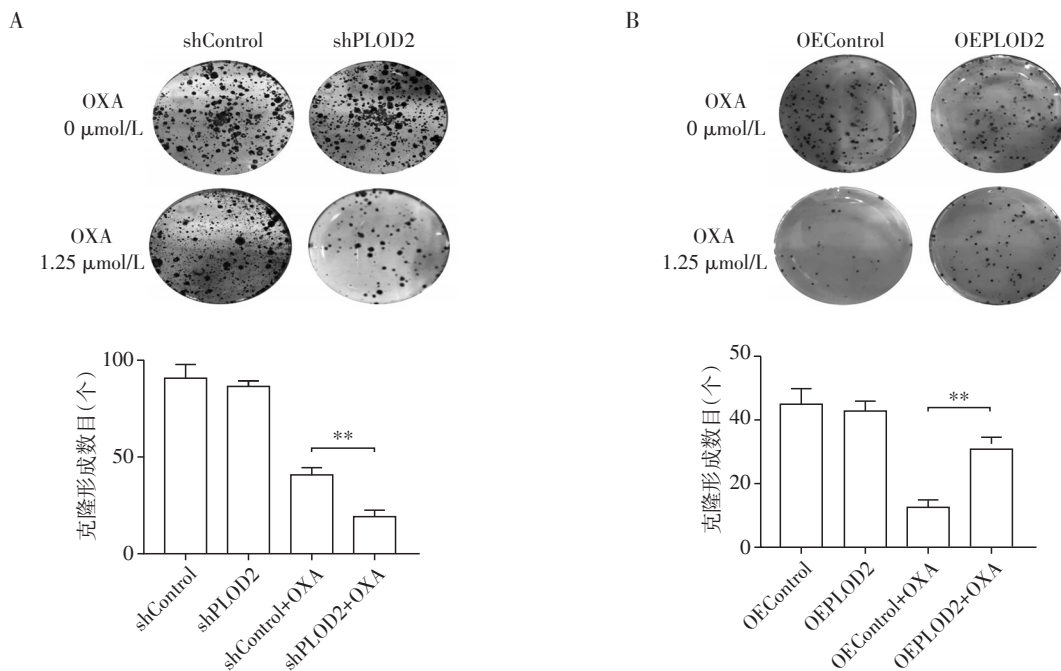
### 2.7 流式细胞术检测 PLOD2 干扰或过表达对奥沙利铂作用下卵巢癌细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测 shPLOD2 组、shControl 组、OEPLD2 组、OEControl 组在 PLOD2 干扰或过表达条件下的细胞凋亡率。结果显示,在无奥沙利铂作用条件下,shPLOD2 组和 shControl 组、OEPLD2

组和 OEControl 组细胞凋亡率无统计学差异( $P > 0.05$ ,图6A、B)。在奥沙利铂作用条件下,shPLOD2 组比 shControl 组细胞凋亡率有显著上升,分别为( $28.14 \pm 3.73$ )%和( $16.25 \pm 2.98$ )%( $P < 0.01$ ,图6A、C),OEPLD2 组比 OEControl 组细胞凋亡率有显著下降,分别为( $23.85 \pm 0.94$ )%和( $40.55 \pm 1.52$ )%( $P < 0.001$ ,图6B、D)。

### 2.8 PLOD2 干扰对 A2780 细胞裸鼠成瘤的影响

检测各组裸鼠肿瘤大小和瘤重并记录生长曲线,在未用奥沙利铂的条件下,shPLOD2 组肿瘤相



A: PLOD2干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞增殖能力变化;B: PLOD2过表达对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞增殖能力变化。两组比较, \*\* $P < 0.01, n=3$ 。

图5 克隆形成实验检测 PLOD2对奥沙利铂作用下卵巢癌细胞增殖的影响

Figure 5 Effects of PLOD2 on proliferation under oxaliplatin treatment in ovarian cancer cells were detected by clone formation assay

较于 shControl 组,肿瘤平均体积和瘤重无统计学差异( $P > 0.05$ ,图 7A、B、C)。在奥沙利铂处理条件下,shPLOD2组的平均体积小于 shControl 组( $P < 0.05$ ,图 7A、C),瘤重低于 shControl 组( $P < 0.05$ ,图 7B)。

### 2.9 PLOD2 干扰或过表达对卵巢癌细胞 BCRP、MRP1 表达的影响

采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 BCRP、MRP1 在各组细胞中的表达,结果显示,shPLOD2 组 BCRP 和 MRP1 mRNA 表达较 shControl 组明显下调( $P < 0.05, P < 0.001$ ,图 8A);BCRP、MRP1 蛋白表达均明显下调( $P = 0.001, P < 0.05$ ,图 8E)。OEPL0D2 组 BCRP 和 MRP1 mRNA 表达较 OECcontrol 组明显上调( $P$  均  $< 0.01$ ,图 8B);BCRP 和 MRP1 蛋白表达明显升高( $P < 0.01, P < 0.001$ ,图 8F)。

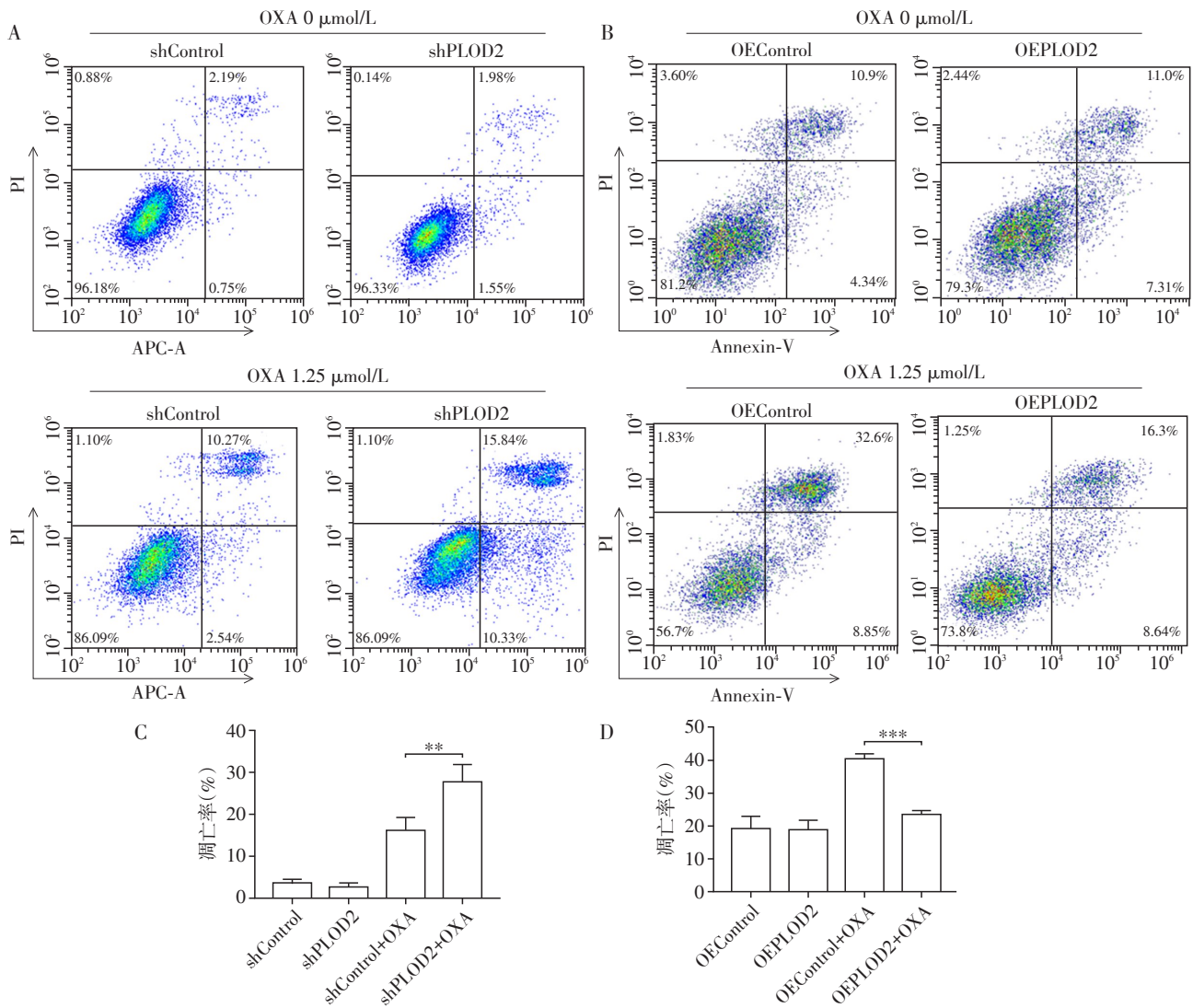
### 3 讨论

奥沙利铂等铂类药物已被广泛应用于治疗卵巢癌等实体肿瘤。然而,其疗效往往因癌细胞耐药性的发展而受到影响。耐药性机制主要包括:DNA 损伤修复能力增强、药物蓄积减少、解毒功能增强、细胞凋亡抑制增强、基因突变、肿瘤微环境等<sup>[8-9]</sup>。对化疗耐药机制的研究,有助于为抗癌新药研发和

化疗方案的优化提供新的见解。

PLOD2 是一种在人体组织中广泛表达的内质网膜结合蛋白,能使得前胶原分子螺旋区和端肽区的赖氨酸残基羟基化进而促进胶原交联的形成<sup>[10]</sup>。PLOD2 表达可通过 TGF $\beta$ 1/Smad3 信号通路促进肺纤维化,而米诺地尔作为 PLOD2 抑制剂可抑制这一过程的进展<sup>[11]</sup>。此外,PLOD2 被证实与多种肿瘤的发展有密切关系,包括乳腺癌、肝癌、非小细胞肺癌等<sup>[4-6]</sup>。PLOD2 与乳腺癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌的不良预后呈正相关。PLOD2 可通过直接和间接方式促进非小细胞肺癌转移<sup>[6]</sup>。PLOD2 通过作用于胶原纤维的形态改变,有助于形成肿瘤转移的“高速公路”<sup>[12]</sup>。另外有报道称,PLOD2 与化疗耐药有关<sup>[13-15]</sup>。

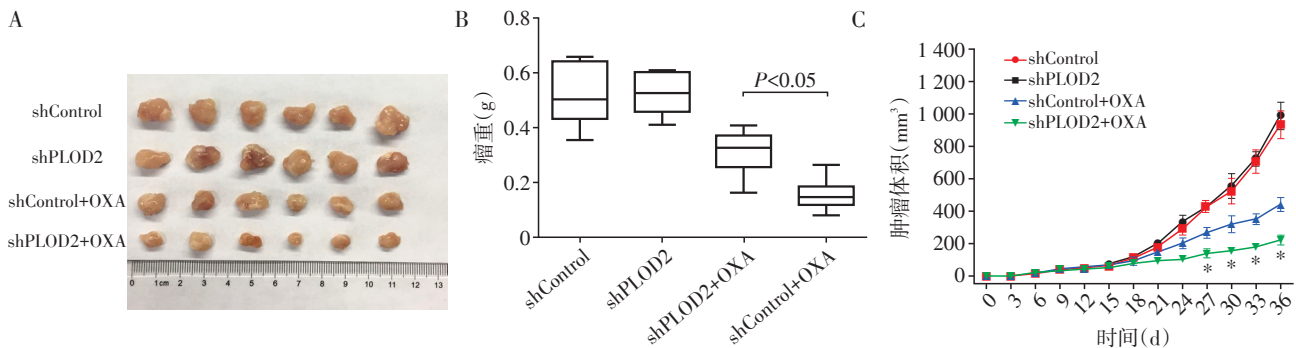
研究证实 PLOD2 可增强胆管癌对吉西他滨的耐药性,通过上调 PLOD2 的表达,耐药细胞株的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白 N-cadherin、Snail、Vimentin 表达上调<sup>[13]</sup>。同时,有研究结果也表明,PLOD2 的表达与胃癌细胞氟尿嘧啶(flourouracil, 5-FU)的化疗耐药性密切相关,其作用机制可能与通过上调 BCRP 药转蛋白和下调凋亡相关蛋白 Bax、上调 Bcl-2 的表



A: PLOD2 干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞凋亡的变化; B: PLOD2 过表达对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞凋亡的变化; C、D: 直方图定量分析。两组比较, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图6 流式细胞术检测 PLOD2 对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞凋亡的影响

Figure 6 Effects of PLOD2 on cell apoptosis under oxaliplatin treatment in ovarian cancer cells were detected by flow cytometry

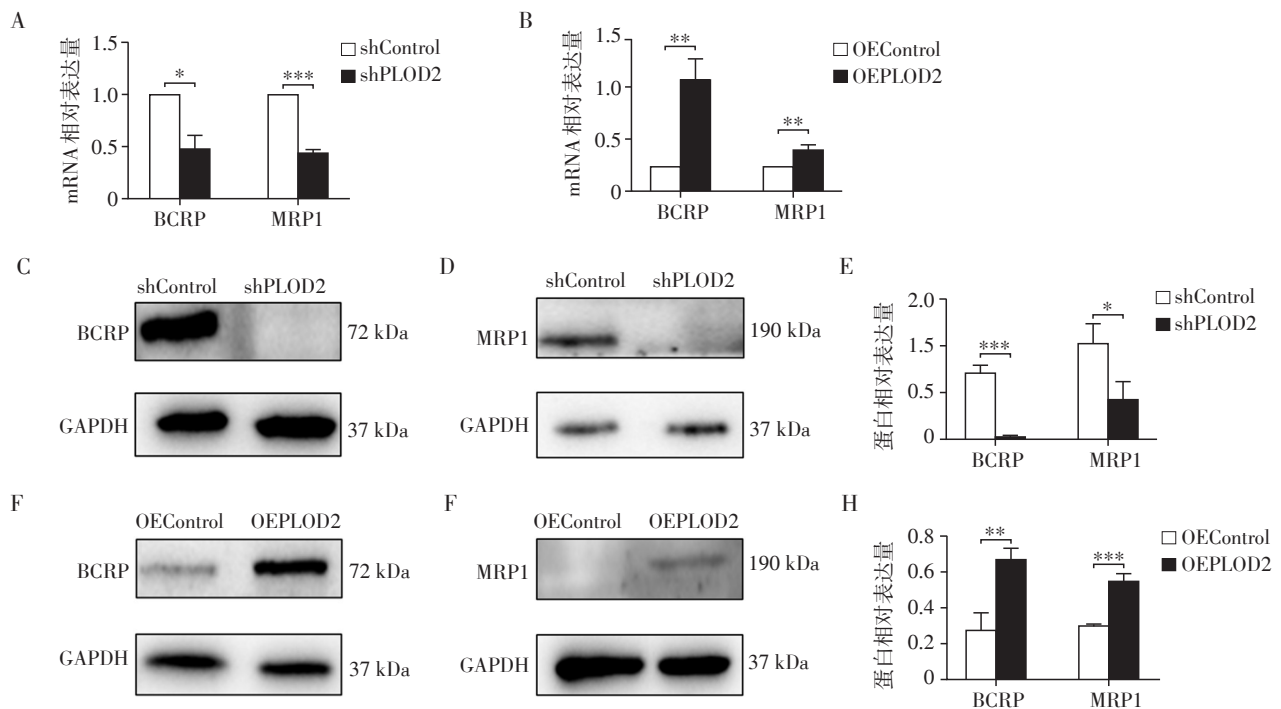


A: PLOD2 干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞裸鼠体内成瘤体积的影响; B: PLOD2 干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞裸鼠体内成瘤重量的影响; C: PLOD2 干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞裸鼠体内成瘤生长曲线的影响。与 shControl+OXA 组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n=6$ 。

图7 PLOD2 干扰对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞裸鼠成瘤能力的影响

Figure 7 Effects of knockdown of PLOD2 on the tumorigenic ability of nude mice under oxaliplatin treatment of ovarian cancer cells





A: qRT-PCR 检测结果表明在干扰 PLOD2 后 BCRP 和 MRP1 mRNA 表达水平明显下调; B: qRT-PCR 检测结果表明在过表达 PLOD2 后 BCRP 和 MRP1 mRNA 表达水平明显上调; C, D: 免疫印迹实验检测结果表明在干扰 PLOD2 后 BCRP、MRP1 蛋白表达水平的变化; E: 直方图定量分析; F, G: 免疫印迹实验检测结果表明在过表达 PLOD2 后 BCRP、MRP1 蛋白表达水平的变化; H: 直方图定量分析。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图8 PLOD2对奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞BCRP、MRP1表达水平的影响

Figure 8 Effects of PLOD2 on BCRP, MRP1 expressions of ovarian cancer cells under oxaliplatin treatment

达相关<sup>[14]</sup>。除此之外, PLOD2可能通过促进EMT相关蛋白的表达, 激活FAK-PI3K/AKT以及MAPK信号通路诱导奥希替尼耐药<sup>[15]</sup>。但是关于PLOD2在卵巢癌奥沙利铂耐药中的作用, 目前知之甚少。

本文选择卵巢癌 PLOD2 高表达细胞株 A2780 和低表达细胞株 OV1063, 通过慢病毒转染 shPLOD2 和 OEPLOD2 质粒, 探讨 PLOD2 对卵巢癌奥沙利铂化疗耐药的影响及机制。结果显示, 干扰组细胞中 PLOD2 的 mRNA 和蛋白表达显著下降, 而过表达组 PLOD2 的 mRNA 和蛋白表达显著升高, 表明已成功构建了卵巢癌干扰和过表达的稳转株 shPLOD2-A2780 和 OEPLOD2-OV1063。

CCK-8 实验证实, 在奥沙利铂相同浓度作用条件下, shPLOD2 组细胞增殖抑制率高于 shControl 组,  $IC_{50}$  较 shControl 组下降; OEPLOD2 组细胞增殖抑制率低于 OEControl 组,  $IC_{50}$  较 OEControl 升高。后续实验根据两种细胞株的  $IC_{50}$ , 选取  $1.25 \mu\text{mol/L}$  为奥沙利铂实验浓度。克隆形成和细胞凋亡实验证实, 在奥沙利铂处理条件下, shPLOD2 细胞比 shControl 细胞集落形成减少, 细胞凋亡率增高; OEPLOD2

细胞比 OEControl 细胞集落形成能力增强, 细胞凋亡率降低。这些结果表明, PLOD2 对在奥沙利铂作用下的卵巢癌细胞有促进增殖和抑制凋亡的作用。值得注意的是, 在无奥沙利铂作用条件下, shPLOD2 组与 shControl 组克隆形成能力、凋亡率无统计学差异, 这一点在 OEPLOD2 和 OEControl 细胞株上也得到了验证。通过将 shPLOD2 细胞和 shControl 细胞接种到裸鼠皮下, 发现在奥沙利铂处理条件下, shPLOD2 组的肿瘤体积和瘤重均小于 shControl 组。上述研究结果提示, PLOD2 可增强奥沙利铂诱导的卵巢癌细胞的耐药性。据已有报道, PLOD2 可促进结肠癌的增殖<sup>[16]</sup>, 但对非小细胞肺癌和胶质瘤、肉瘤的增殖没有影响<sup>[6, 17-18]</sup>, 同时对胃癌的凋亡也没有影响<sup>[14]</sup>, 这说明 PLOD2 在不同的肿瘤中所发挥的作用是有差异的。

ATP 结合盒转运蛋白, 主要成员为 ABCB1P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、ABCC1 (MRP1)、ABCG2 (BCRP)<sup>[19]</sup>。三者被认为是肿瘤化疗耐药性的重要调控因子, 其导致耐药性的增强主要是通过药物泵出细胞膜, 使得细胞内化疗药物浓度降低而实现

的。据报道,MRP1参与了奥沙利铂对结直肠癌的耐药<sup>[20]</sup>。MRP1和BCRP在上皮性卵巢癌组织中的表达量显著增加,MRP1和BCRP表达量的增加可能与化疗耐药有关,影响患者疗效和预后<sup>[21]</sup>。更为直接的证据是,在一项研究中发现MRP1介导了卵巢癌奥沙利铂耐药细胞株的多药耐药<sup>[22]</sup>。同时也有报道称,BCRP和MRP1参与了卵巢癌对顺铂的耐药<sup>[23]</sup>。

奥沙利铂作为第三代铂类化疗药,同时也是卵巢癌化疗的一线用药,其治疗效果受药转蛋白的影响。本文已证实PLOD2可增强卵巢癌细胞对奥沙利铂的耐药性,进而推测PLOD2可能与药转蛋白的表达有密切关系。qRT-PCR和Western blot实验结果发现干扰PLOD2表达,其BCRP、MRP1 mRNA和蛋白表达水平下调,同时在过表达OEPLD2细胞株,BCRP、MRP1 mRNA和蛋白表达上调。本研究结果提示PLOD2可能通过上调药转蛋白BCRP、MRP1的表达,而促使卵巢癌对奥沙利铂的耐药性增强。

综上所述,本研究通过构建PLOD2干扰和过表达质粒转染卵巢癌高表达和低表达细胞株,研究PLOD2对卵巢癌奥沙利铂化疗耐药的影响及机制。研究结果提示PLOD2可增强卵巢癌对奥沙利铂的化疗耐药性,这一作用可能与药转蛋白BCRP和MRP1表达上调有关。本研究为探索PLOD2在奥沙利铂诱导的卵巢癌耐药中的作用提供了新视角,进一步为逆转卵巢癌化疗耐药提供了新的理论基础。

#### [参考文献]

- [1] 周天域,吕天娇,冯炜炜. 卵巢癌中PARP抑制剂耐药机制的研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(1):128-132
- [2] 温灏,邹冬玲. 中国卵巢上皮性癌维持治疗指南(2021年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(6):640-649
- [3] CHEN Y, TERAJIMA M, YANG Y, et al. Lysyl hydroxylase 2 induces a collagen cross-link switch in tumor stroma[J]. J Clin Invest, 2015, 125(3): 1147-1162
- [4] GJALTEMA R A F, DE ROND S, ROTS M G, et al. Procollagen lysyl hydroxylase 2 expression is regulated by an alternative downstream transforming growth factor  $\beta$ -1 activation mechanism[J]. J Biol Chem, 2015, 290(47): 28465-28476
- [5] NODA T, YAMAMOTO H, TAKEMASA I, et al. PLOD2 induced under hypoxia is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Liver Int, 2012, 32(1): 110-118
- [6] DU H, CHEN Y, HOU X, et al. PLOD2 regulated by transcription factor FOXA1 promotes metastasis in NSCLC[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3143
- [7] AYERS G D, MCKINLEY E T, ZHAO P, et al. Volume of preclinical xenograft tumors is more accurately assessed by ultrasound imaging than manual caliper measurements[J]. J Ultrasound Med, 2010, 29(6): 891-901
- [8] 张林曦,潘亚敏. 药物联合逆转肿瘤细胞耐药的机制及研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(22): 4008-4012
- [9] 牛星燕,张冬萍,彭芸花. 卵巢癌铂耐药机制及相关靶向治疗研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(6): 661-663
- [10] SCHEGG B, HÜLSMEIER A J, RUTSCHMANN C, et al. Core glycosylation of collagen is initiated by two beta(1-O)galactosyltransferases[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(4): 943-952
- [11] 邵松军,方海燕,叶贤伟,等. TGF $\beta$ 1/Smad3信号通路介导的赖氨酸羟化酶2活性变化在肺纤维化胶原沉积中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(10): 1858-1863
- [12] DU H, PANG M, HOU X, et al. PLOD2 in cancer research[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 670-676
- [13] OKUMURA Y, NODA T, EGUCHI H, et al. Hypoxia-induced PLOD2 is a key regulator in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(12): 3728-3737
- [14] WANG X, GUO J, DAI M, et al. PLOD2 increases resistance of gastric cancer cells to 5-fluorouracil by upregulating BCRP and inhibiting apoptosis[J]. J Cancer, 2020, 11(12): 3467-3475
- [15] 康小红,王珂,王颖,等. 赖氨酸羟化酶2诱导肺癌HCC827细胞对奥希替尼耐药的机制研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(3): 210-215
- [16] CHERIYAMUNDATH S, KUMAR A, GAVERT N, et al. The collagen-modifying enzyme PLOD2 is induced and required during L1-mediated colon cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3552
- [17] 徐洋洋. 赖氨酸羟化酶PLOD2在乏氧诱导胶质瘤迁移与侵袭过程中的作用及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2017
- [18] EISINGER-MATHASON T S, ZHANG M, QIU Q, et al. Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis[J]. Cancer Discov, 2013, 3(10): 1190-205
- [19] WANG H, JIA X H, CHEN J R, et al. HOXB4 knock-

(下转第1000页)