

Trop2对胃癌细胞耐药性的影响及机制研究

蒯兴旺^{1,2}, 黄晓辰^{1,2}, 唐奇², 赵薇³, 章明炯⁴, 陈渊⁵, 贾立周^{1,2}, 杨婷婷^{1,2}, 仇镇宁², 朱进^{2,6}, 冯振卿^{1,2*}

¹南京医科大学病理学系, ²国家卫计委抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学附属南京医院病理科, 江苏 南京 210006; ⁴南京医科大学第二附属医院消化科, ⁵耳鼻喉科, 江苏 南京 210011; ⁶华东医学生物技术研究所, 江苏 南京 210002

[摘要] 目的:探讨滋养层细胞表面抗原2(Trop2)对胃癌细胞化疗耐药的影响及机制。方法:应用慢病毒转染技术将Trop2 shRNA转染至BGC823细胞株,通过嘌呤霉素筛选出稳定转染质粒的细胞株;qRT-PCR、Western blot和免疫荧光方法检测质粒干扰效率;CCK-8细胞增殖试验和流式细胞术检测柔红霉素对BGC823细胞株增殖能力和细胞凋亡的影响;qRT-PCR、Western blot检测耐药相关基因Topo II α 的mRNA和蛋白表达变化。结果:在稳定转染Trop2 shRNA质粒的shTrop2组中,Trop2 mRNA及蛋白表达水平较对照组(未处理)和shNC组(转染空载体质粒)明显下调;在相同药物浓度下,柔红霉素对shTrop2组的增殖抑制率明显高于对照组和shNC组,shTrop2组半数抑制浓度低于对照组和shNC组($P < 0.05$),shTrop2组中柔红霉素诱导的细胞凋亡率显著高于对照组和shNC组($P < 0.05$);稳定干扰Trop2表达后耐药相关基因Topo II α 的表达显著上调。结论:Trop2通过抑制Topo II α 的表达,可增强胃癌细胞对柔红霉素的耐药性。

[关键词] Trop2;胃癌;耐药;柔红霉素;Topo II α

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-885-07

doi:10.7655/NYDXBNS20180704

Effects and mechanism of Trop2 on drug resistance of gastric cancer cells

Kuai Xingwang^{1,2}, Huang Xiaochen^{1,2}, Tang Qi², Zhao Wei³, Zhang Mingjiong⁴, Chen Yuan⁵, Jia Lizhou^{1,2}, Yang Tingting^{1,2}, Qiu Zhenning², Zhu Jin^{2,6}, Feng Zhenqing^{1,2*}

¹Department of Pathology, ²Key Laboratory of Antibody Technology, National Health and Family Planning Commission, NMU, Nanjing 211166; ³Department of Pathology, the Nanjing Hospital Affiliated to NMU, Nanjing 210006; ⁴Department of Gastroenterology, ⁵Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011; ⁶Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of trophoblast cell-surface antigen 2(Trop2) on drug resistance of gastric cancer and the underlying mechanism. **Methods:** BGC823 cells were infected with the lentivirus encoding shRNA against Trop2 and puromycin was used to select stable cell lines; The effects of interference were detected by qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence; CCK-8 proliferation test and flow cytometric detection were performed to detect the influence of daunorubicin on cell proliferation and apoptosis. The mRNA and protein expressions of Topo II α were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results:** The mRNA and protein expressions of Trop2 in the shTrop2 group (transfected with Trop2 shRNA) were significantly lower than those in the control group (untreated) and the shNC group (transfected with normal control shRNA); The shTrop2 group showed higher proliferation inhibition rates after daunorubicin treatment than these in the control group and the shNC group, and the IC50 value of the shTrop2 group was lower than that in the control group and the shNC group ($P < 0.05$); The daunorubicin-induced cell apoptosis rate in the shTrop2 group was higher than that in the control group and the shNC group ($P < 0.05$); The mRNA and protein expressions of drug resistance-related gene Topo II α decreased after interference with Trop2 expression stably. **Conclusion:** Trop2 can intensify daunorubicin resistance of gastric cancer cells by inhibiting the expression of Topo II α .

[Key words] Trop2; gastric cancer; drug resistance; daunorubicin; Topo II α

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07): 885-891]

[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

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤,化疗在胃癌综合治疗中发挥重要作用,但是肿瘤细胞耐药现象的发生常导致化疗效果不佳或失败,严重影响胃癌患者的预后。滋养层细胞表面抗原2(human trophoblast cell surface antigen 2, Trop2)是一种细胞表面糖蛋白受体和钙信号转导子,本实验室前期研究发现Trop2在胃癌组织中高表达,Trop2蛋白高表达与胃癌患者较差的生存预后有关^[1]。有文献报道,Trop2与肿瘤耐药具有相关性^[2]。但Trop2对胃癌细胞耐药性的影响及分子机制尚不清楚。DNA拓扑异构酶 α (topoisomerase II, Topo II α)被认为是抗肿瘤药物的分子基础,细胞内Topo II α 蛋白的表达水平决定蒽环类抗生素对肿瘤细胞的疗效^[3]。本研究拟采用Trop2短发夹干扰RNA(shRNA),干扰Trop2高表达胃癌细胞株BGC823上Trop2的表达,观察胃癌细胞对蒽环类药物柔红霉素敏感性的变化,初步探讨Trop2与耐药相关基因Topo II α 的相关性,为今后胃癌临床化疗耐药的研究提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞株BGC823、293T细胞由本实验室保存,pGCsi-U6/Neo/DsRed/shRNA载体(广州复能基因有限公司),RPMI 1640培养基、DMEM培养基、100 \times 青霉素/链霉素双抗、胎牛血清(Gibco公司,美国),Lenti-Pac慢病毒包装试剂盒(GeneCopoeia公司,美国),嘌呤霉素(Sigma公司,美国),TRIzol试剂、High-Capacity cDNA逆转录试剂盒(Invitrogen公司,美国),SYBR荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本),RIPA裂解液、BCA蛋白定量检测试剂盒、蛋白上样缓冲液(南京碧云天生物技术有限公司),胰蛋白酶、预染标记蛋白标准、Alexa Fluor 488标记的羊抗兔IgG、ECL发光液(Thermo公司,美国),兔抗人Trop2单克隆抗体、鼠抗人Topo II α 单克隆抗体(Santa Cruz公司,美国),鼠抗人GAPDH单克隆抗体、HRP标记的羊抗兔IgG抗体、HRP标记的兔抗小鼠IgG抗体(Abcam公司,美国),注射用柔红霉素(山东齐鲁制药有限公司),CCK-8试剂盒(同仁公司,日本),AnnexinV Alexa Fluor647/PI/凋亡检测试剂盒(南京福麦斯生物技术有限公司)。引物合成由南京金斯瑞生物公司完成,Trop2:5'-ACAACGATGGCCTCTACGAC-3'(上游),5'-GTCCAGGTCTGAGTGGTTGAA-3'(下游);Topo II α :5'-AGCCATT-

GACGCAGTTCATGT-3'(上游),5'-GCCTGGCAAAGGTAACCTCC-3'(下游);GAPDH:5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'(上游),5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'(下游)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

常规复苏人胃癌细胞BGC823,培养基为含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI 1640培养基;常规复苏293T细胞,培养基为含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养基。细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温生物培养箱,每2~3 d换液1次,待细胞融合度达到90%,用0.25%胰蛋白酶进行细胞消化和传代。

1.2.2 Trop2 shRNA表达质粒的构建与鉴定

根据Trop2基因序列设计Trop2 shRNA序列,序列为5'-CCTTCAACCACTCAGACCTGG-3',Blast检测与其他基因编码序列无同源性。Trop2 shRNA序列与pGCsi-U6/Neo/DsRed载体克隆连接,阴性对照为pGCsi-U6/Neo/DsRed/Non。以上质粒由广州复能基因有限公司合成。将质粒转化至DH5 α 感受态细胞,涂板于含氨苄青霉素的LB平板,37 $^{\circ}$ C培养过夜。挑单克隆菌落接种于含氨苄青霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min,振荡过夜。菌液送南京金斯瑞生物公司测序,以证实Trop2 shRNA序列克隆入pGCsi-U6/Neo/DsRed中。

1.2.3 慢病毒包装

10 cm培养皿接种1.5 \times 10⁶个293 T细胞,添加含10%FBS的10 mL DMEM培养基(胎牛血清提前进行热灭活)。待细胞长至约80%汇合度,按Lenti-Pac慢病毒包装试剂说明书将空载体质粒和Trop2 shRNA转染至293 T细胞。培养48 h后,离心收集上清并用0.45 μ m滤器过滤。上清与浓缩试剂(6 \times)按5:1比例混合,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,混合液4 $^{\circ}$ C离心3 500 g,25 min。弃上清,收集沉淀物即为慢病毒颗粒。取适量PBS吹打慢病毒沉淀,操作轻柔,保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱。

1.2.4 病毒感染及稳定株筛选

将BGC823细胞以5 \times 10⁴个/孔的密度种植于24孔板,24 h后从-80 $^{\circ}$ C冰箱取出慢病毒颗粒,置于冰上融化,感染目的细胞。未处理细胞标记为对照组,转染空载体质粒的细胞标记为shNC组,转染Trop2 shRNA质粒的细胞标记为shTrop2组。24 h后更换为含10%热灭活FBS的RPMI 1640培养基。72 h后加入终浓度为0.5 μ g/mL的嘌呤霉素并持续筛选1周。荧光显微镜下观察转染效率,shNC组和

shTrop2组细胞荧光率达100%,0.25 μg/mL嘌呤霉素维持培养2周。

1.2.5 检测Trop2 shRNA质粒的干扰效果

1.2.5.1 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测Trop2 mRNA表达

待细胞进入对数生长期,依据TRIzol试剂说明书分别提取对照组、shNC组和shTrop2组细胞总RNA,OneDrop分光光度计测定RNA浓度和纯度,按照High-Capacity cDNA逆转录试剂盒说明书逆转录总RNA为cDNA。根据SYBR荧光定量PCR试剂盒说明书于StepOne Plus定量PCR仪上进行荧光定量扩增,反应体系如下:Premix 10 μL、Trop2/GAPDH上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL、Dye 0.4 μL、cDNA模板2 μL、去离子水6.8 μL。扩增条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s,56℃ 1 min,循环40次;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。每个样品设3个复孔,实验重复3次。反应结束后,以GAPDH为内参照基因,计算各个样本扩增的C_t值,基因表达的相对定量值(RQ值)以2^{-ΔΔCT}计算。

1.2.5.2 Western blot检测Trop2蛋白表达

取对数生长期对照组、shNC组和shTrop2组细胞,根据RIPA裂解液说明书分别裂解细胞提取总蛋白,BCA检测试剂盒测定总蛋白浓度,总蛋白和上样缓冲液按比例混合,95℃加热10 min,充分变性后于-20℃保存。取等量蛋白质样品,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,分别加入用抗体稀释液配制的兔抗人Trop2单克隆抗体(1:1 000)、小鼠抗人GAPDH单克隆抗体(1:2 000),4℃过夜。次日,PVDF膜用PBST漂洗3次,每次10 min,分别加入HRP标记的羊抗兔IgG抗体(1:1 000)和HRP标记的兔抗小鼠IgG抗体(1:1 000)。室温孵育1 h,PBST漂洗3次,每次10 min,膜表面覆盖ECL显色液,置于ChemiDoc XRS+曝光仪曝光,拍照并采用Image-Pro Plus 6.0软件检测灰度值。该实验重复3次。

1.2.5.3 免疫荧光检测Trop2蛋白表达

以5×10³个/孔的密度分别种植对照组、shNC组和shTrop2组细胞于12孔板,细胞贴壁后,去培养基,PBS轻柔漂洗3次,加入4%多聚甲醛溶液固定细胞,15 min后5%牛血清白蛋白溶液封闭,室温孵育1 h。去封闭液,加入5%牛血清白蛋白溶液配制的兔抗人Trop2单克隆抗体(1:500),4℃过夜。次日PBST漂洗3次,每次10 min,加入5%牛血清白蛋白溶液配制的Alexa Fluor 488标记的羊抗兔IgG

(1:500),避光置于37℃恒温箱,孵育1 h。PBST漂洗3次,每次10 min,加入PBS稀释的Hoechst 33342(1:500),避光室温孵育10 min。去除稀释液,PBST漂洗5 min,荧光显微镜观察实验结果并拍照,Image-Pro Plus 6.0软件检测荧光强度。该实验重复3次。

1.2.6 CCK-8细胞增殖试验检测细胞增殖

将对照组、shNC组和shTrop2组细胞分别以8×10³个/孔的密度种植于96孔板,每孔加入100 μL含10%FBS的RPMI 1640培养基,并以无细胞培养基作为空白组,每组设置3个复孔。96孔板置于恒温培养箱培养,细胞贴壁后,加入生理盐水配制的柔红霉素(0.1 mg/mL),终浓度分别为0、0.050、0.125、0.250、0.500、1.000 μg/mL。48 h后去除原培养基,每孔加入10 μL CCK-8试剂和90 μL培养基,37℃置于细胞培养箱3 h。Multiskan Spectrum酶标仪检测各孔在450 nm波长下的吸光值,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)]×100%。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

将对照组、shNC组和shTrop2组细胞以5×10⁴个/孔的密度分别种植于6孔板,常温静置30 min,37℃培养箱培养。细胞贴壁后,每孔加入柔红霉素(终浓度0.1 μg/mL)。48 h后,用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞,37℃孵育2~3 min,显微镜下观察细胞皱缩变圆,加入完全培养基终止消化,收集细胞悬液离心。弃上清,PBS重悬离心细胞3次,加入AnnexinV Alexa Fluor647/PI凋亡检测试剂,避光室温孵育15 min,BD FACS Aria II SORP分选型流式细胞仪检测。该实验重复3次。

1.2.8 检测Topo II α表达变化

1.2.8.1 qRT-PCR检测Topo II α mRNA表达

提取对照组、shNC组和shTrop2组细胞总RNA,逆转录总RNA为cDNA,进行荧光定量扩增,反应体系如下:Premix 10 μL、Topo II α/GAPDH上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL、Dye 0.4 μL、cDNA模板2 μL、去离子水6.8 μL。扩增条件和计算方法与上文相同。

1.2.8.2 Western blot检测Topo II α蛋白表达

提取对照组、shNC组和shTrop2组细胞总蛋白,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至PVDF膜,室温封闭后分别加入抗体稀释液配制的小鼠抗人Topo II α单克隆抗体(1:500)和小鼠抗人GAPDH单克隆抗体(1:2 000),4℃过夜。次日加入HRP标记的兔抗小鼠IgG抗体(1:1 000),室温孵育1 h。漂洗后ChemiDoc XRS+曝光仪检测蛋白条带。以上实验重

复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计分析,计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Trop2 shRNA 质粒的构建和鉴定

将针对Trop2基因的shRNA质粒进行DNA测序,测序结果通过Blast序列比对,证实Trop2 shRNA序列已正确克隆入pGCsi-U6/Neo/DsRed/shRNA载体,表明重组Trop2 shRNA质粒构建成功。

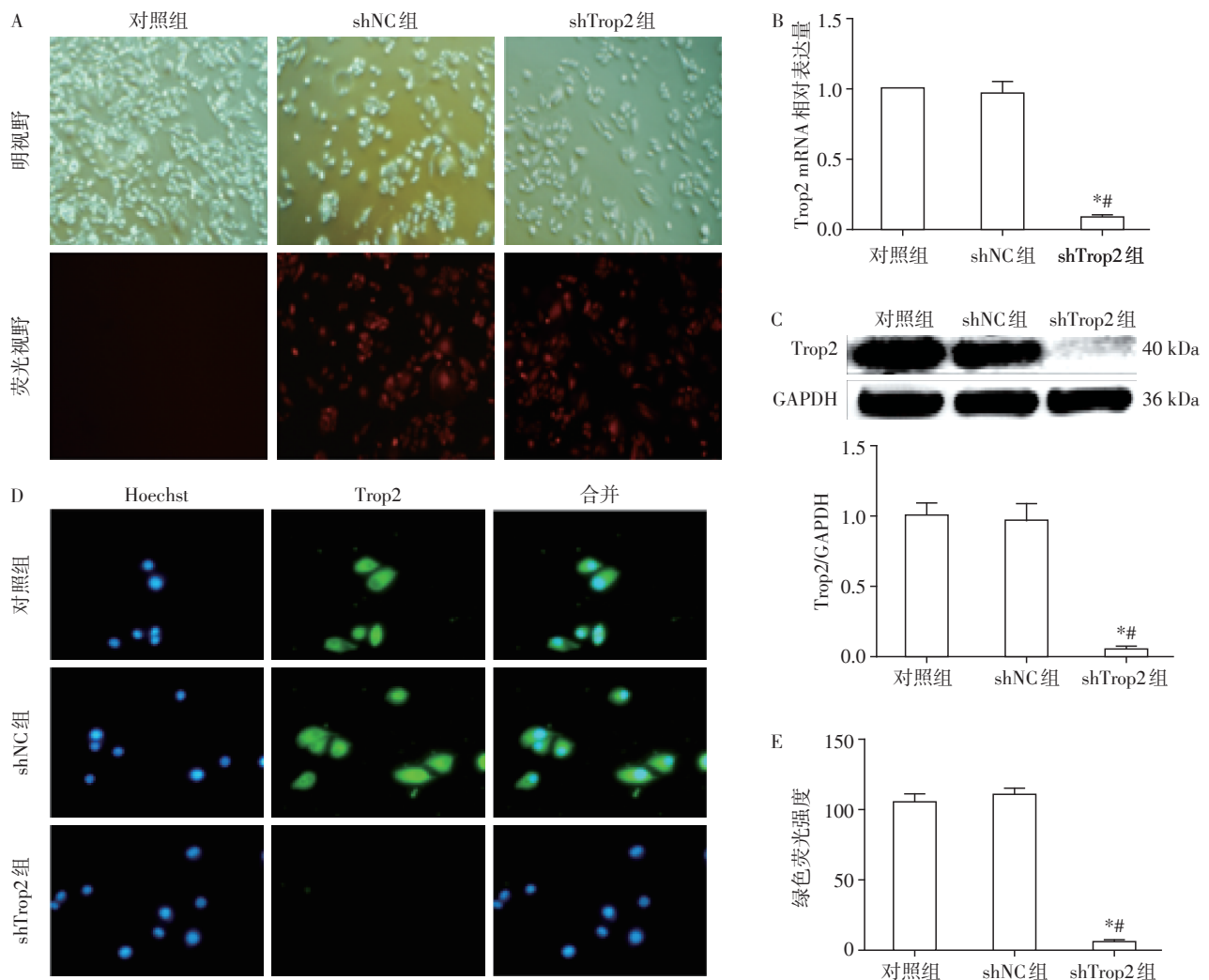
2.2 Trop2 shRNA 质粒的转染效率

慢病毒表达载体pGCsi-U6/Neo/DsRed带有红

色荧光基因,可通过观测红色荧光蛋白表达来评估转染效率。将细胞置于荧光倒置显微镜下进行观察,未作处理的对照组细胞株无红色荧光,转染空载体质粒的shNC组细胞株和转染Trop2 shRNA质粒的shTrop2组细胞株红色荧光率达100%(图1A)。

2.3 Trop2 shRNA 质粒的干扰效果

通过qRT-PCR技术检测细胞中Trop2 mRNA表达情况,结果显示,与对照组和shNC组相比,shTrop2组Trop2 mRNA的抑制率达90%,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图1B),对照组和shNC组之间无明显差异($P > 0.05$)。Western blot和免疫荧光方法检测各组细胞中Trop2蛋白表达,结果显示,shTrop2组中Trop2蛋白的表达水平,较对照组和shNC组明显降低($P < 0.05$,图1C~E);对照组和shNC组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: 荧光显微镜观察红色荧光蛋白表达($\times 40$); B: qRT-PCR 检测Trop2 mRNA 表达; C: Western blot 检测Trop2 蛋白表达; D、E: 免疫荧光检测Trop2 的蛋白表达($\times 200$)。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与shNC组比较, # $P < 0.05$ 。

图1 Trop2 shRNA 质粒的转染和干扰效率

Figure 1 Efficiencies of transfection and interference of Trop2 shRNA

2.4 Trop2表达下调增强柔红霉素对胃癌细胞的增殖抑制

通过CCK-8细胞增殖实验检测对照组、shNC组和shTrop2组细胞在柔红霉素处理下细胞增殖情况的变化。经计算得出,柔红霉素对shTrop2组的半数抑制浓度(IC₅₀)为(0.088 ± 0.009) μg/mL,低于对照组[(0.127 ± 0.006) μg/mL]和shNC组[(0.134 ± 0.017) μg/mL],差异有统计学意义($P < 0.05$),对照组和shNC组相比无明显差异($P > 0.05$)。结果表明,在相同药物浓度条件下,柔红霉素对shTrop2组细胞增殖的抑制率高于对照组和shNC组($P < 0.05$,图2)。

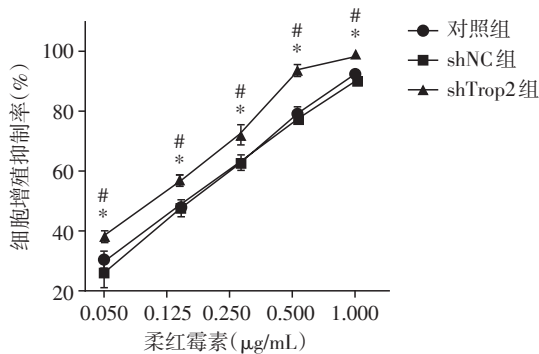
2.5 Trop2表达下调促进柔红霉素诱导的细胞凋亡

采用流式细胞术检测对照组、shNC组和sh-

Trop2组细胞在柔红霉素处理下的细胞凋亡率。正常培养的对照组、shNC组、shTrop2组3组细胞凋亡率分别为(3.773 ± 0.411)%、(3.103 ± 1.004)%、(6.343 ± 1.928)%;经过柔红霉素处理的对照组、shNC组、shTrop2组细胞凋亡率分别为(10.660 ± 1.718)%、(10.763 ± 2.133)%、(25.167 ± 3.486)% (图3)。正常培养时shTrop2组细胞凋亡率略高于对照组和shNC组,差异有统计学意义($P < 0.05$);加药处理后shTrop2组柔红霉素诱导的细胞凋亡率显著高于对照组和shNC组($P < 0.05$),对照组和shNC组无明显差异($P > 0.05$)。结果表明,Trop2表达下调能促进细胞凋亡,且导致柔红霉素诱导的凋亡增多。

2.6 Trop2表达下调能促进耐药相关基因Topo II α的表达

通过qRT-PCR技术检测Topo II α mRNA在各组胃癌细胞中的表达水平,结果显示,与对照组和shNC组相比,shTrop2组中的Topo II α mRNA显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图4A),对照组和shNC组相比无明显差异($P > 0.05$)。Western blot检测Topo II α蛋白在3组胃癌细胞中的表达情况,结果显示,shTrop2组中Topo II α蛋白的表达水平,较对照组和shNC组明显增高($P < 0.05$,图4B);对照组和shNC组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



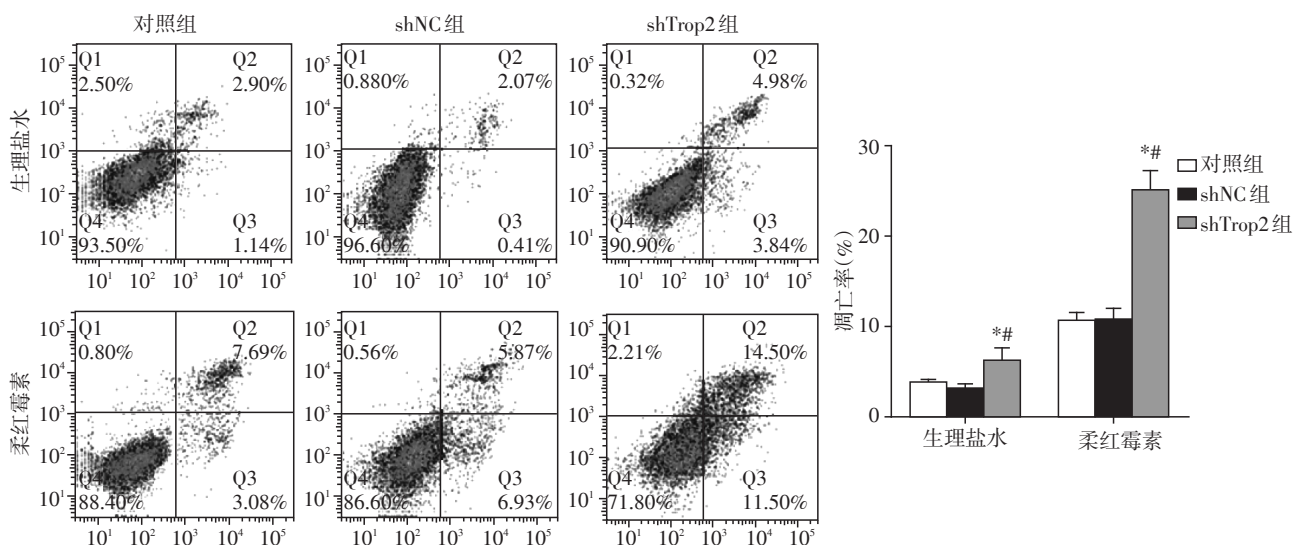
与对照组比较, $P < 0.05$; 与shNC组比较, $P < 0.05$ 。

图2 CCK-8试验检测柔红霉素诱导的增殖抑制

Figure 2 Daunorubicin-induced proliferation inhibitions were detected by CCK-8 assay

3 讨论

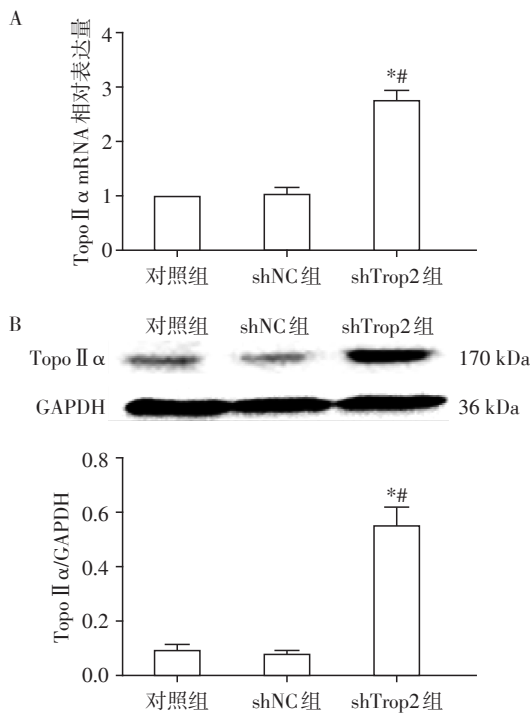
化疗在临床上被广泛应用于胃癌围手术期治疗和姑息性治疗,但胃癌原发性或获得性耐药现象



与对照组比较, $P < 0.05$; 与shNC组比较, $P < 0.05$ 。

图3 流式细胞术检测柔红霉素诱导的细胞凋亡

Figure 3 Daunorubicin-induced cell apoptosis was detected by flow cytometry



A: qRT-PCR 检测 Topo II α mRNA 表达; B: Western blot 检测 Topo II α 蛋白表达。与对照组比较, $P < 0.05$; 与 shNC 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图4 Trop2 表达下调后 Topo II α 的表达变化

Figure 4 mRNA Expressions of Topo II α were detected by qRT-PCR

的产生仍是影响胃癌患者生存期和生存质量的主要因素之一。胃癌耐药机制包括药物外排蛋白表达增多、药物代谢能力增强、DNA 修复能力提高、凋亡抑制增强等^[4]。胃癌耐药现象是多基因、多阶段、多机制共同作用的结果,因而全面深入地探究胃癌耐药的发生发展机制,有助于抗癌药物的研发和化疗方案的优化。

Trop2 最早被发现于人类胎盘滋养层组织,在胎儿肺、肠发育以及早期发育生长中发挥重要作用^[5-6]。Trop2 通过细胞周期蛋白 D1 和 ERK/MEK 途径促进肿瘤生长^[7],还通过参与上皮间质转化调节细胞间的黏附^[8-9]。Trop2 在乳腺癌^[10]、胰腺癌^[11]、宫颈癌^[12]等肿瘤中过表达,而在正常人体组织中低表达或不表达。Trop2 与 CREB、P27 等蛋白存在作用关联,因而可能对他莫西芬、吉西他滨等药物的治疗效果产生影响^[13-14]。Trop2 还能促进抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 VEGF 的表达,增强肺癌细胞对顺铂的耐受性^[15]。作为一个潜在的胃癌分子靶点,Trop2 在胃癌中高表达,并能促进胃癌细胞的迁移和侵袭^[16-17]。Trop2 对胃癌耐药性的影响及分子机制尚不清楚,仍需进一步研究。

DNA 拓扑异构酶(Topo)是在 DNA 复制、转录和

染色体分离中起重要作用的核酶。依托泊苷、米托蒽醌、柔红霉素等一系列化疗药物以 Topo II 为靶点,干扰基因的断裂重连过程,导致 DNA 降解和靶细胞凋亡^[18]。Topo II α 是 Topo II 亚型之一,由 17 号染色体编码,大多位于增殖的细胞中,其表达具有明显的细胞周期特异性。肿瘤细胞内 Topo II α 表达水平下降,使肿瘤对抗肿瘤药物的敏感性下降,可导致肿瘤细胞耐药^[19]。

本文选择 Trop2 相对高表达的胃癌细胞株 BGC823,通过转染 Trop2 shRNA,干扰 BGC823 细胞 Trop2 的表达,结果显示转染 Trop2 shRNA 质粒后,细胞中 Trop2 mRNA 和蛋白表达显著降低,表明 Trop2 shRNA 成功干扰 BGC823 细胞 Trop2 的表达。CCK-8 增殖实验和流式细胞术结果显示,柔红霉素处理后 shTrop2 组细胞增殖抑制率高于对照组和 shNC 组,柔红霉素对 shTrop2 组细胞的半数抑制浓度降低,shTrop2 组细胞凋亡率显著高于对照组和 shNC 组,表明 Trop2 表达下调后柔红霉素对胃癌细胞增殖的抑制作用增强,柔红霉素所致胃癌细胞的凋亡率增高。以上结果提示 Trop2 能增强胃癌细胞对柔红霉素的耐受性,干扰 Trop2 表达可以增强胃癌细胞对柔红霉素的敏感性。

柔红霉素属于蒽环类抗生素,其治疗效果受 Topo II α 蛋白水平影响。Trop2 能增强胃癌细胞对柔红霉素的耐受性,推测 Trop2 可能对 Topo II α 的表达产生影响。qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 Topo II α 表达,结果显示 shTrop2 组细胞 Topo II α mRNA 和蛋白水平均高于对照组和 shNC 组,表明 Trop2 表达下调能促进 Topo II α 的表达,提示 Trop2 能通过抑制耐药相关基因 Topo II α 的表达,促进胃癌细胞对柔红霉素的耐药。

综上所述,本研究证明 Trop2 能够通过抑制耐药相关基因 Topo II α 的表达促进胃癌对柔红霉素的耐药性,但体内实验以及 Trop2 对 Topo II α 的作用机制仍需进一步研究。本研究为探索 Trop2 在胃癌耐药中的作用提供了新视角,进一步为逆转胃癌化疗耐药提供了新的理论基础。

[参考文献]

[1] Wei Z, Zhu H, Shu Z, et al. Trop2 is overexpressed in gastric cancer and predicts poor prognosis [J]. *Oncotarget*, 2015, 7(5):6136-6145
 [2] Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications [J]. *Genes Canc*, 2015, 6(3-4):84-105

- [3] Luthra P, Aguirre S, Yen BC, et al. Topoisomerase II inhibitors induce DNA damage - dependent interferon responses circumventing ebola virus immune evasion [J]. *Mbio*, 2017, 8(2): e00368-17
- [4] Kartal-yandim M, Adan-gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(4): 716-726
- [5] Mcdougall ARA, Hooper SB, Zahra VA, et al. Trop2 regulates motility and lamellipodia formation in cultured fetal lung fibroblasts [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(7): 508-521
- [6] Mustata RC, Vasile G, Fernandez-vallone V, et al. Identification of Lgr5-independent spheroid-generating progenitors of the mouse fetal intestinal epithelium [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(2): 421-432
- [7] Guerra E, Trerotola M, Aloisi AL, et al. The Trop-2 signaling network in cancer growth [J]. *Oncogene*, 2013, 32(12): 1594-1600
- [8] Cheng N, Li H, Luo J. Trop2 promotes proliferation, invasion and EMT of nasopharyngeal carcinoma cells through the NF- κ B pathway [J]. *RSC Adv*, 2017, 7(84): 53087-53096
- [9] Li X, Teng S, Zhang Y, et al. TROP2 promotes proliferation, migration and metastasis of gallbladder cancer cells by regulating PI3K/AKT pathway and inducing EMT [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47052-47063
- [10] Lin H, Huang JF, Qiu JR, et al. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 94(1): 73-78
- [11] 王欢, 刘琼琼, 唐小军, 等. 人源抗TROP2全分子抗体IgG的真核表达及对胰腺癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(7): 863-869
- [12] 褚楚, 刘金荣, 张慧林, 等. 人源抗Trop-2 Fab对宫颈癌细胞生物学特性的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(3): 320-325
- [13] Vazirigohar A, Houston KD. GPER1-mediated IGFBP-1 induction modulates IGF-1-dependent signaling in tamoxifen-treated breast cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 422: 160-171
- [14] Pan J, Li X, Wu W, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 382(1): 64-76
- [15] Wang X, Long M, Dong K, et al. Chemotherapy agents-induced immunoresistance in lung cancer cells could be reversed by trop-2 inhibition *in vitro* and *in vitro* by interaction with MAPK signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(12): 1123-1132
- [16] 饶月丽, 沈定, 陈伟民, 等. Trop2过表达对人胃黏膜上皮细胞GES-1迁移能力的影响及机制 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(11): 1300-1305
- [17] Dai D, Chen D, Shao S. Silenced TROP2 gene inhibits the migration and invasion of gastric cancer BGC- 823 cells *in vitro* [J]. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2010, 30(2): 165-169
- [18] Pendleton M, Lindsey RH Jr, Felix CA, et al. Topoisomerase II and leukemia [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2014, 1310: 98-110
- [19] Pett L, Kiakos K, Satam V, et al. Modulation of topoisomerase II α expression and chemosensitivity through targeted inhibition of NF- κ B: DNA binding by a diamino p - anisyl - benzimidazole (Hx) polyamide [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1860(5): 617-629

[收稿日期] 2018-03-30

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。