

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.014

· 基础研究 ·

唾液酸糖基转移酶 ST3GAL5 抑制白血病 NB4 细胞株的化疗多药耐药性

高舒航^a, 魏巍^b, 杨光^b, 苗小艳^b (大连医科大学 a. 附属第一医院 肿瘤科; b. 检验医学院 检验综合实验室, 辽宁大连 116044)

[摘要] **目的:** 通过研究 ST3 β -半乳糖苷 α -2,3 唾液酸转移酶 5 (ST3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 5, ST3GAL5) 在人急性粒细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) NB4 及其耐药细胞株 NB4/ADR 的差异表达, 明确 ST3GAL5 对白血病细胞体内及体外药敏性的影响。**方法:** 采用 Real-time PCR 和 Western blotting 技术检测人 AML 细胞株 ST3GAL5 的表达情况。特异性调控 ST3GAL5, MTT 及小鼠移植瘤模型实验检测干扰前后 NB4 和 NB4/ADR 细胞在体内、外对化疗药物敏感性的变化、PI3K/Akt 信号通路的激活情况。**结果:** ST3GAL5 在亲本细胞株 NB4 中高表达, 在耐药细胞株 NB4/ADR 中低表达; 特异性上调 NB4/ADR 细胞中 ST3GAL5 的表达, 该细胞的药物敏感性增强 ($P < 0.05$), PI3K/Akt 信号通路分子和 P-gp 表达降低 ($P < 0.05$); 特异性下调 NB4 细胞中 ST3GAL5 的表达, 该细胞的药物敏感性减弱, PI3K/Akt 信号通路分子和 P-gp 表达升高。**结论:** ST3GAL5 在人 AML 细胞及其耐药细胞株中表达均有显著差异, 这些特征性改变与人 AML 多药耐药有关; AML 多药耐药性可能是通过 ST3GAL5 介导 PI3K/Akt 信号通路分子和 P-gp 表达的改变实现。

[关键词] ST3 β -半乳糖苷 α -2,3 唾液酸转移酶 5; 白血病细胞株; 多药耐药; PI3K/Akt 信号通路

[中图分类号] R733.71; R730.51; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)02-0235-08

ST3 β -galactoside α -2,3 sialyltransferase 5 inhibited the multidrug resistance of leukemia NB4 cell line

GAO Shuhang^a, WEI Wei^b, YANG Guang^b, MIAO Xiaoyan^b (a. Oncology Department, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University; b. Department of Comprehensive Laboratory, College of Laboratory Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

[Abstract] **Objective:** To confirm the effect of ST3 β -galactoside α -2,3 sialyltransferase 5 (ST3GAL5) on drug resistance of AML in vivo and in vitro through studying the differential expression of ST3GAL5 between acute myeloid leukemia (AML) NB4 cell line and its drug-resistant cell line NB4/ADR. **Methods:** The expressions of ST3GAL5 in AML cell lines were detected by Real-time PCR and Western blotting assays. Expressions of ST3GAL5 in the cells were specifically regulated to increase or decrease. Before and after the interferences, Changes of sensitivities to chemotherapy drugs and activation of PI3K/Akt signaling pathway in the NB4 and NB4/ADR cells in vivo and in vitro were examined by MTT assay and experiments with xenograft mouse model. **Results:** ST3GAL5 was highly expressed in NB4 cell line but low expressed in its drug-resistant cell line NB4/ADR. Drug sensitivity and PI3K/Akt signaling pathway molecules of NB4/ADR cells in which expressions of ST3GAL5 were specifically up-regulated respectively increased and decreased (all $P < 0.05$). Contrarily, drug sensitivity, PI3K/Akt signaling pathway molecules and P-gp of NB4 cells in which expressions of ST3GAL5 were down-regulated respectively decreased and increased. **Conclusion:** There were obvious differences of ST3GAL5 expressions between AML cell and its drug-resistant cell lines. These characteristic alterations are associated with multidrug resistance in AML, which is probably achieved through ST3GAL5 mediated-PI3K/Akt signaling pathway and alteration of P-gp expression.

[Key words] ST3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 5 (ST3GAL5); leukemia cell line; multidrug resistance; PI3K/Akt signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 235-242. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.014]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81271910)。Project supported by the Natural National Science Foundation of China (No. 81271910)

[作者简介] 高舒航 (1990 -), 女, 硕士生, 辽宁省大连市人, 从事肿瘤糖生物学研究, E-mail: 10940735@qq.com

[通信作者] 苗小艳 (MIAO Xiaoyan, corresponding author), E-mail: lidan65081@sina.com

耐药性是目前白血病治疗中最大的难题^[1]。探讨急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)的多药耐药机制和寻求逆转耐药手段仍是白血病化疗研究的热点和难点问题之一。白血病多药耐药机制非常复杂,经典的多药耐药机制与药物外排相关的能量依赖型转运体,如ABC家族的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)有关。从糖生物学角度研究肿瘤细胞的耐药机制,虽然有资料^[2]显示糖链在白血病耐药细胞表面存在结构异常,但对其中的机制还未完全了解。ST3 β-半乳糖苷 α-2,3 唾液酸转移酶 5(ST3 β-galactoside α-2, 3 sialyltransferase 5, ST3GAL5)是 α-2,3 唾液酸糖基转移酶家族成员之一,唾液酸糖基以 α-2,3 糖苷键的形式转移。本实验旨在探讨 ST3GAL5 与人 AML 多药耐药的相关性,可能为肿瘤的治疗及抗肿瘤药物研发提供新靶点。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

AML 细胞株 NB4 购于南京凯基生物科技发展有限公司,AML 耐药细胞株 NB4/ADR 由本实验室诱导建立并保存。细胞培养于 15 ml 含热灭活 10% FBS、1% 青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 μg/ml)的完全 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

裸鼠(雌性、4 周龄、体质量 18~24 g),SPF 级,动物合格证编号:SYXK(辽)2013-0006,购自大连医科大学 SPF 动物中心。完全 RPMI 1640 培养基、FBS、青霉素、链霉素、胰酶均购自美国 Gibco 公司。多柔比星(adriamycin, ADR)、紫衫醇、长春新碱、PVDF 膜均购自美国 Pall 公司。转染试剂 lip2000 购自美国 Invitrogen 公司。MTT 购自美国 Sigma 公司。目的基因 ST3GAL5 由大连宝生物公司合成。

短发夹 RNA(shRNA)由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。载体 pEGFP-N2 购自美国 BD 公司。兔抗人 ST3GAL5、PI3K p110α、p-Akt473、p-Akt308、GAPDH、Akt 多抗、羊抗兔 IgG 均购自美国 Santa 公司。ECL 发光试剂盒购自美国 Amersham Biosciences 公司。Real-time PCR 仪(Thermal Cycler Dice Real Time System TP800)购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 ADR 耐药 NB4/ADR 细胞株的构建

用上述培养基将对数期生长的 NB4 细胞重悬为 1 × 10⁶ 个/ml,取 10 ml 细胞悬液置于培养瓶中培养 24 h。待细胞进入对数期生长时,将培养基换成含 ADR(0.025 mg/L)的培养基,继续培养,每隔 24 h 观察细胞生长情况,待细胞正常增殖后,换成含 ADR(0.05 mg/L)的培养液,继续培养。待细胞耐受该浓度 ADR 后,更换成含浓度倍增的 ADR 培养基,直至细胞能在含 ADR(1.0 mg/L)的培养基中正常生长,即为耐药细胞株 NB4/ADR。实验前 NB4/ADR 细胞需停药培养一周。

1.3 Real-time PCR 检测 NB4 和 NB4/ADR 细胞内 ST3GALs 和 ST6GALs mRNA 的表达

用 TRIzol 法提取 NB4 及 NB4/ADR 细胞株的总 RNA。用紫外分光光度计检测浓度和纯度后按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书操作。反转录体系为 20 μl,反应条件为 25 °C、5 min,42 °C、60 min,70 °C、5 min。将反转录得到的 cDNA 按照 SYBR Premix Ex Taq II 加样体系配制 Real-time PCR 反应体系,置于 Real-time PCR 仪进行实时定量 PCR 扩增。Real-time PCR 反应体系总体积为 25 μl,反应条件为 95 °C、30 s 后,95 °C、5 s,60 °C、30 s,40 个循环。所用引物见表 1。同时扩增管家基因 GAPDH 作为对照,分别比较 NB4 和 NB4/ADR 细胞中 ST3GAL 家族基因的表达情况。目的基因表达水平根据 2^{-ΔΔCt} 公式计算。实验重复 3 次。

表 1 Real-time PCR 所用的引物序列及扩增产物分子量大小
Tab.1 Primer sequences and amplicon size of Real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
ST3GAL1	5'-CAGAGATGGACGGTCACT-3'	5'-CAACTGTGTTTTCTGACG-3'	197
ST3GAL2	5'-GTGCTCCGACTGGTTTG-3'	5'-GAAGCGGTAGGGGTCTC-3'	191
ST3GAL3	5'-TATGCTTCAGCCTTGATG-3'	5'-TTGGTGACTGACAAGATGG-3'	164
ST3GAL4	5'-ATGTTGGCTCTGGTCCTG-3'	5'-AGGAAGATGGGCTGATCC-3'	176
ST3GAL5	5'-CAAAGCAAGATGAGAAGG-3'	5'-AAACTTGGGACGACATTC-3'	213
ST3GAL6	5'-ATGTCTATTGGGTGGCAC-3'	5'-CGCACACAGAAAAGGGTG-3'	189
GAPDH	5'-CTCCTCCACCTTTGACGCTG-3'	5'-TCCTCTTGTGCTCTTGCTGG-3'	175

1.4 流式细胞术分析 NB4 和 NB4/ADR 细胞 P-gp 的表达

收集对数期生长的 NB4 和 NB4/ADR 细胞,调整密度至 1×10^6 个/ml,分别取 200 μl 细胞悬液 $180 \times g$ 离心 5 min,弃上清,加 5% 脱脂奶粉,置 37°C 孵育 30 min。PBS 洗 2 次,加 FITC(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 标记的凝集素,用和人 P-gp 抗体同型的无 FITC 标记 Ig 抗体作为阴性对照, 4°C 避光孵育 40 min,PBS 洗 2 次后流式细胞仪检测细胞内 P-gp 的表达量,Cell Quest Pro 软件分析荧光强度。

1.5 转染 ST3GAL5 shRNA 构建 ST3GAL5 低表达 NB4 细胞株

取对数生长期 NB4 细胞,无血清培养基调节细胞密度至 2×10^5 个/ml,加入 24 孔板,每孔加入 400 μl 。将 3.6 μl 靶向 ST3GAL5 基因的 shRNA(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 加入不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基中组成总体积 40 μl 体系,同时在不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基中加入 2.4 μl shRNA 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 组成总体积 40 μl 体系,将上述含 shRNA 和转染试剂的两个体系在室温下作用 20 min,构成 shRNA/转染试剂混合物。之后将混匀好的 shRNA/转染试剂混合物加入相应孔内,继续培养细胞 6 h。离心弃上清,用含抗生素和 FBS 的培养基重新悬浮细胞至 500 μl ,继续培养 24 h,收集细胞,Real-time PCR、Western blotting 分析检测干扰效果,同时设对照组无转染意义序列 shRNA 作为阴性对照。通过对 3 条靶向 shRNA(shRNA1、shRNA2 和 shRNA3) 的转染效果分析发现,shRNA1 的转染效果最好,后续干扰实验均用 shRNA1 转染。

1.6 构建 ST3GAL5 过表达 NB4/ADR 细胞株

依据转染试剂盒操作要求将 5 μg 重组表达载体 pEGFP-N2/ST3GAL5 转入 NB4/ADR 细胞中,同时加入 60 μl lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂,阴性对照用空载体 pEGFP-N2 转染。800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418(遗传霉素)选择性培养,4 周后建立稳定表达 ST3GAL5 的细胞株,收集细胞,Real-time PCR、Western blotting 分析检测 ST3GAL5 的过表达效果。

1.7 MTT 法检测下调或上调 ST3GAL5 表达对 NB4 和 NB4/ADR 细胞化疗药物敏感性的影响

取对数生长期下调或上调 ST3GAL5 表达的 NB4 或 NB4/ADR 细胞悬液 200 μl (1×10^5 个/ml) 接种于 96 孔培养板中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h。分别加入 6 个不同梯度浓度(0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 mg/L) 的抗肿瘤药物 ADR、紫杉醇和长春新碱,置培养箱中培养 72 h。每孔加

入 10 μl MTT(5 mg/ml),置培养箱中培养 4 h。再向每孔加入 100 μl 三联裂解液(10 g SDS,5 ml 异丁醇,加 0.012 mol/l 盐酸至 100 ml),置培养箱培养 4 h。终止培养后,用酶标仪测定 570 nm 波长各孔光密度(D)值,计算 IC_{50} 值(抗肿瘤药物半数抑制浓度)。设置一个调零孔(不加细胞,)和一组阴性对照孔(不加抗肿瘤药物)。阴性对照孔和每个梯度浓度实验孔都做 5 个复孔。 IC_{50} 采用寇氏改良法计算: $\lg\text{IC}_{50} = X_m - I(P - (3 - P_m - P_n)/4)$ 。 X_m : \lg (最大剂量); I : \lg (最大剂量/相临剂量); P : 阳性反应率之和; P_m : 最大阳性反应率; P_n : 最小阳性反应率。

1.8 检测 ST3GAL5 的表达对裸鼠体内移植瘤化疗药物耐药性的影响

随机将 100 只 4 周龄 SPF 级裸鼠,分为 6 组,每组 16 只,剩余 4 只为空白组(不做任何处理)。将培养的 NB4, NB4-control shRNA(ST3GAL5 低表达阴性对照组), NB4-ST3GAL5 shRNA1(ST3GAL5 低表达组), NB4/ADR, NB4/ADR/mock(ST3GAL5 过表达阴性对照组), NB4/ADR/ST3GAL5(ST3GAL5 过表达组)细胞用 PBS 缓冲液重悬为 5×10^7 个/ml 的细胞悬液。每只裸鼠右侧腋窝皮下分别注射 200 μl 上述细胞悬液,每组裸鼠注射一种细胞悬液。2 周后,将注射上述不同细胞悬液开始长出肿瘤块各组裸鼠(每组 16 只)再随机分为 2 组,即:空白对照组(8 只)和阿霉素治疗组(8 只)。阿霉素治疗组每隔 3 天腹腔注射 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 阿霉素(4 $\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{d}$),空白对照组注射等量生理盐水。于治疗 32 d 后脱颈处死并解剖,计算肿瘤块体积。肿瘤体积(V/mm^3) = $1/2(\text{长} \times \text{宽}^2)$ 。

1.9 Western blotting 检测细胞内 PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达

培养后的 NB4, NB4/ADR 及转染过后的细胞用 2x 上样缓冲液混合加热、震荡提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上。转膜后用 TTBS 配制的 5% 脱脂奶粉 37°C 条件下封闭 2 h。再分别与兔抗小鼠 ST3GAL5(1:200), PI3K p110 α 、p-Akt 308、p-Akt 473、Akt(均 1:500), GAPDH(1:1 000) 多克隆抗体 4°C 孵育过夜。用 TTBS 洗膜 3 次,每次 10 min。然后加 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:5 000), 37°C 孵育 1.5 h,用 TTBS 洗膜 3 次,每次洗 10 min。ECL 发光试剂盒检测结果。

1.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。所有的实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,每个实验至少重复三次。两组数据比较用 t 检验,三组及以上数据比较 ANOVA

分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ST3GAL* 家族在 AML 细胞 NB4 和 NB4/ADR 株中差异表达

Real-time PCR 检测结果(图1)显示, *ST3GAL* 家族成员 mRNA 在 NB4 和 NB4/ADR 细胞株中呈差异性表达。*ST3GAL4* 在 NB4/ADR 耐药细胞株中呈高表达;*ST3GAL1* 和 *ST3GAL5* 在亲本细胞株 NB4 中表达量增高,其中 *ST3GAL5* 的表达量尤高,是耐药细胞株的 4.5 倍,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。两个细胞株 *ST3GAL2* 和 *ST3GAL3* 的 mRNA 表达差异无统计学意义;而 NB4 和 NB4/ADR 细胞株均未检测到 *ST3GAL6* 的表达。

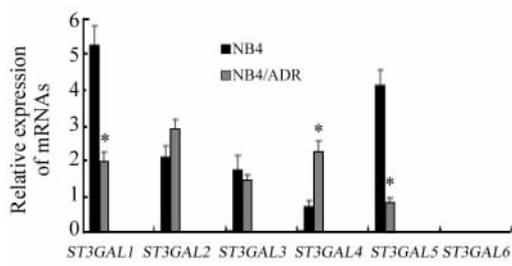


图1 *ST3GAL* 家族 mRNA 在 NB4 和 NB4/ADR 细胞株中的差异表达
Fig.1 Differential expressions of mRNA of *ST3GAL* family members in NB4 and NB4/ADR cell lines
* $P < 0.01$ vs NB4 cell line

2.2 特异性下调 *ST3GAL5* 表达提高 NB4 细胞株体内及体外耐药性

ST3GAL5 在 NB4 细胞中表达最高,转染靶向 *ST3GAL5* 的 shRNA 特异性下调 *ST3GAL5* 在 NB4 细胞中的表达,观察发现,与 NB4 细胞及 NB4-control shRNA 细胞相比,干扰后的 NB4 细胞 *ST3GAL5* 在 mRNA(图2A)和蛋白(图2B)水平上表达均显著降低。选择 NB4-*ST3GAL5* shRNA1 细胞进行后续试验,凝集素亲和技术联合流式细胞仪检测结果(图2C)发现,NB4-*ST3GAL5* shRNA1 细胞与 FITC-MAL 凝集素结合的平均荧光强度减弱,进一步证明干扰后的 NB4 细胞中 *ST3GAL5* 表达水平降低。

采用 MTT 法检测。结果显示,(1) NB4-control shRNA1 细胞与 NB4 细胞对抗肿瘤药物的敏感性基本一致;(2) NB4-*ST3GAL5* shRNA1 细胞对抗肿瘤药物的敏感性低于 NB4-control shRNA 细胞,IC₅₀ 值明显升高(表2)。

体内成瘤性实验结果显示:与 NB4 细胞相比,干扰后 NB4 细胞的平均瘤体积增大(图3)。以上结果表明,特异性下调 NB4 细胞中的 *ST3GAL5* 后,细胞的耐药性增强。

2.3 过表达 *ST3GAL5* 降低 NB4/ADR 细胞株体内及体外耐药性

采用质粒过表达技术特异性上调 NB4/ADR 细胞中 *ST3GAL5* 的表达。结果显示,在 NB4/ADR/

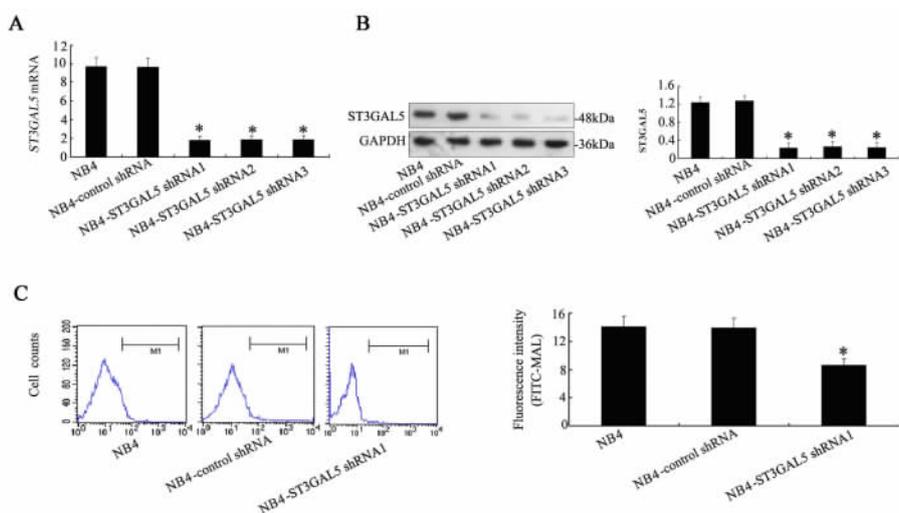


图2 特异性下调 *ST3GAL5* 在 NB4 细胞中的表达

Fig. 2 Expression of *ST3GAL5* in NB4 cells with specific downregulation of *ST3GAL5*

A: Expression of *ST3GAL5* mRNA in NB4 cells with various shRNA; B: Expression of *ST3GAL5* in NB4 cells with various shRNA; C: Fluorescence intensity of *ST3GAL5* in NB4 cells with shRNA1 tested by flow cytometry assay

* $P < 0.05$ vs NB4 cells or NB4-control shRNA cells

ST3GAL5 细胞中,ST3GAL5 在 mRNA(图 4A)和蛋白(图 4B)水平上表达均显著增多,凝集素亲和技术联合流式细胞仪检测结果显示(图 4C),NB4/ADR/ST3GAL5 细胞结合 FITC-MAL 凝集素的平均荧光强度显著增强。

表 2 下调 ST3GAL5 表达导致化疗药物杀伤 NB4 细胞的 IC₅₀ 值增加[$\rho_B/(mg \cdot L)$]

Tab. 2 Increase of IC₅₀ values after down regulating expression of ST3GAL5 in NB4 cells[$\rho_B/(mg \cdot L)$]

Drug	NB4	NB4-control shRNA	NB4-ST3GAL5 shRNA1
Adriamycin	0.86 ± 0.06	0.77 ± 0.06	1.83 ± 0.22 **
Paclitaxel	0.30 ± 0.040	0.29 ± 0.03	0.96 ± 0.09 **
Vincristine	1.42 ± 0.18	1.49 ± 0.26	3.75 ± 0.37 **

** $P < 0.05$ vs NB4-control shRNA group

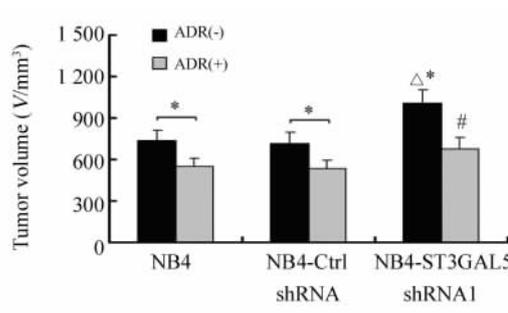


图 3 与 NB4-control shRNA 组相比, NB4-ST3GAL5 shRNA1 组瘤体积明显增大
Fig. 3 Increased tumor volume in mice group with NB4-ST3GAL5 shRNA1 tumors as compared with that in NB4-control shRNA1 group

* $P < 0.05$ vs ADR(+) group;

$P < 0.05$ vs NB4-Ctrl shRNA group;

△ $P < 0.05$ vs NB4-Ctrl shRNA group

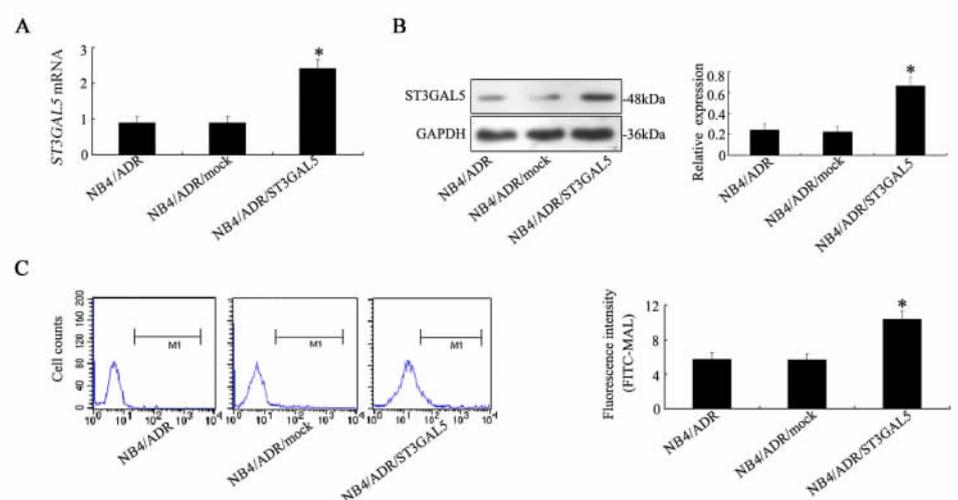


图 4 特异性上调 ST3GAL5 在 NB4/ADR 细胞中的表达

Fig. 4 Upregulated expression of ST3GAL5 in NB4/ADR cells

A: Increased level of *ST3GAL5* mRNA in NB4/ADR/ST3GAL5 cell after upregulated expression of *ST3GAL5* compared with NB4/ADR and NB4/ADR/mock cells by Real-time PCR; B: Increased expression of *ST3GAL5* protein in NB4/ADR/ST3GAL5 cell after upregulated expression of *ST3GAL5* compared with NB4/ADR and NB4/ADR/mock cells by Western blotting assay;

C: Fluorescence intensity and cell account in NB4/ADR/ST3GAL5 cell compared with NB4/ADR and NB4/ADR/mock cells by flow cytometry assay

* $P < 0.05$ vs NB4/ADR and NB4/ADR/mock group

体外药敏实验结果显示,过表达 NB4/ADR 细胞中 ST3GAL5 基因后,NB4/ADR/ST3GAL5 细胞对抗肿瘤药物的耐药性与对照组相比明显降低,其 IC₅₀ 值下调(表 3)。体内药敏实验结果显示(图 5),与 NB4/ADR 细胞相比,NB4/ADR/ST3GAL5 细胞的平均瘤体积减小。以上结果表明,特异性上调 NB4/ADR 中的 ST3GAL5 后,细胞的耐药性降低。

2.4 ST3GAL5 低表达通过 PI3K/Akt 信号通路促进 P-gp 表达

Western blotting 检测结果显示(图 6A, B),PI3K/Akt 信号通路主要分子 p110 α , p-Akt308 和 p-Akt473 在 NB4-ST3GAL5 shRNA1 细胞(ST3GAL5 低表达的 NB4 细胞)中呈高表达;相反,在 NB4/ADR/ST3GAL5 细胞(ST3GAL5 高表达的 NB4/ADR

细胞)中呈低表达。此外,验证了 ST3GAL5 对肿瘤耐药标志物 P-gp 表达的影响。流式细胞仪结果显示(图 6C, D),P-gp 在 NB4-ST3GAL5 shRNA1 细胞中显示平均荧光强度增高,而在 NB4/ADR/ST3GAL5 细胞中平均荧光强度下降。

表 3 上调 ST3GAL5 表达导致化疗药物杀伤 NB4/ADR 细胞的 IC₅₀ 下降 [ρ_B/(mg·L)]

Tab. 3 Decreased IC₅₀ values after the overexpression of ST3GAL5 in NB4/ADR cells [ρ_B/(mg·L)]

Drugs	NB4/ADR	NB4/ADR/ mock	NB4/ADR/ ST3GAL5
Adriamycin	79.35 ± 7.79	75.86 ± 7.42	51.38 ± 5.03 **
Paclitaxel	9.57 ± 0.84	9.36 ± 0.98	5.26 ± 0.61 **
Vincristine	67.25 ± 6.75	64.96 ± 6.26	35.16 ± 3.90 **

** P < 0.05 vs NB4/ADR/mock group

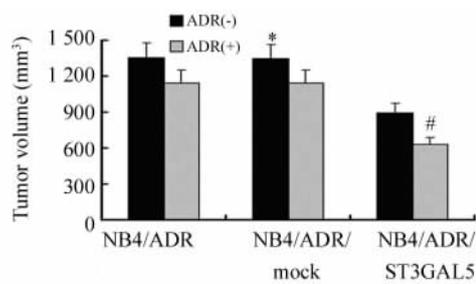


图 5 与 NB4/ADR/mock 组相比,NB4/ADR/ST3GAL5 组瘤体体积明显减小

Fig. 5 Decreased tumor volume in NB4/ADR/ST3GAL5 mouse group, as compared with that in NB4/ADR/mock group

* P < 0.05 vs NB4/ADR/ST3GAL5 group;
P < 0.05 vs NB4/ADR/mock group or NB4/ADR/ST3GAL5 (ADR⁻) group

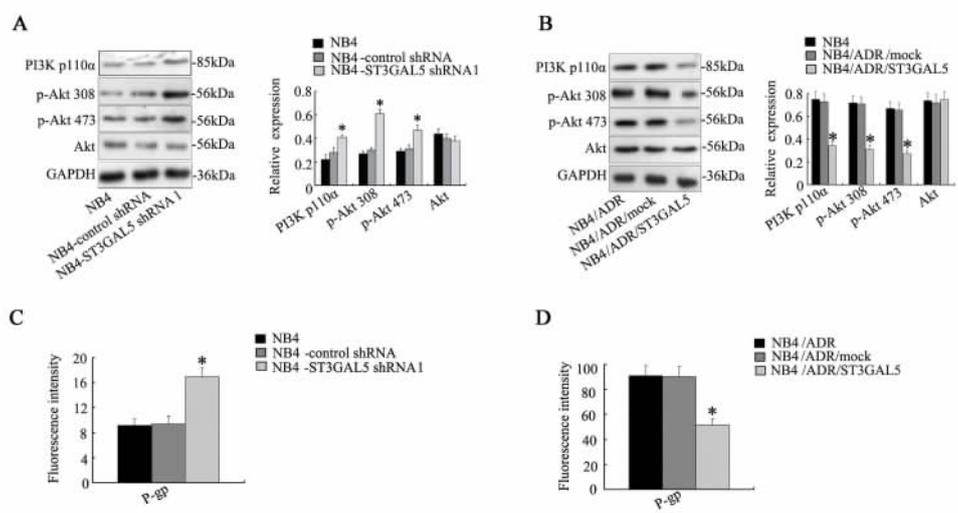


图 6 ST3GAL5 介导的 PI3K/Akt 信号通路对 P-gp 表达的影响

Fig. 6 Effect of ST3GAL5-mediated PI3K/Akt signaling pathway on the expression of P-gp

A, B: Expressions of PI3K/Akt signaling molecules;C,D: Expression of P-gp protein measured by flow cytometry

* P < 0.05 vs NB4 and NB4-control shRNA groups or NB4/ADR and NB4/ADR/mock groups

3 讨论

由于耐药问题的存在,肿瘤化疗多数以失败告终^[3]。因而探讨肿瘤耐药发生机制和寻找新型耐药逆转剂成为必然。多年来,众多学者在体内外的各种研究中发现肿瘤耐药性的产生是多基因多因素综合作用的复杂过程^[4-6]。神经节苷脂 GM3 的形成是由 ST3GAL5 催化的。GM3 是高度唾液酸化的三糖抗原,在各类型肿瘤中都有过量表达,是肿瘤治疗

策略中的新兴分子靶点^[7]。ST3GAL5 基因还参与慢性粒细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML)多药耐药的形成^[8],AML 多药耐药是否有 ST3GAL5 的异常表达是一个值得研究的问题。本实验发现 ST3GAL1、ST3GAL4 和 ST3GAL5 在 AML 细胞株 NB4 及其耐药细胞株 NB4/ADR 中均有差异表达,说明细胞表面 α-2, 3 唾液酸化的不同可能与 AML 多药耐药有关。

研究^[9-13]表明,PI3K/Akt 信号通路在 AML 细胞

中过度激活,并在肿瘤细胞增殖、耐药、侵袭及抑制凋亡过程中担任重要角色。在急性儿童 B 淋巴细胞白血病中,PI3K/Akt 的异常激活与不良预后及化疗抵抗存在密切关系^[14],在小鼠淋巴瘤细胞中抑制 PI3K/Akt 信号通路可逆转肿瘤多药耐药^[15],在急性淋巴细胞白血病患者治疗过程中,抑制 PI3K/Akt 信号通路也成为一个新的治疗策略^[16]。国内外大量研究^[17-20]已经证实,在不同类型的细胞中,GM3 通过抑制上皮生长因子受体的磷酸化进一步抑制 PI3K/Akt 信号通路的活性,神经细胞黏附分子介导的粘附通路可激活诸如 Ras-MAPK、PI3K/Akt 等一系列信号通路^[21]。在本实验中,下调 ST3GAL5 的表达,可激活 PI3K/Akt 相关信号通路活性,而上调 ST3GAL5 的表达,可抑制相关 PI3K/Akt 信号通路活性。而且,P-gp 的表达水平随 ST3GAL5 表达、PI3K/Akt 信号通路活性的改变而改变。即下调 NB4 细胞中的 ST3GAL5 表达后,信号通路主要分子 p110 α 、p-Akt308 和 p-Akt473 表达量增加,P-gp 含量也增加;上调 NB4/ADR 细胞中的 ST3GAL5 表达后,p110 α 、p-Akt308 和 p-Akt473 表达量减少,P-gp 含量降低。可以推断 ST3GAL5 可能是通过调节 PI3K/Akt 信号通路相关分子的表达间接介导 P-gp 的表达,进而引起肿瘤细胞的多药耐药。以上结果表明,在 AML 中 ST3GAL5 介导的多药耐药,至少在部分程度上依赖 PI3K/Akt 信号通路调控 P-gp 表达来实现。

本实验中,ST3GAL5 异常表达导致 NB4 和 NB4/ADR 细胞耐药性改变,据此推论,ST3GAL5 可能在 AML 多药耐药形成过程中起一定作用。然而,由于 ST3GAL1 和 ST3GAL4 在 NB4 和 NB4/ADR 细胞中也有差异表达,这是否与 AML 多药耐药有关、是否与 ST3GAL5 调控白血病耐药具有协同作用,是本课题组下一步的研究方向。

综上所述,通过分析检测 ST3GAL 家族在 AML 及其耐药细胞株中的差异表达,发现差异表达的 ST3GAL5 与人 AML 耐药有关。AML 多药耐药机制可能涉及 ST3GAL5 调控 PI3K/Akt 信号通路,继而引起 P-gp 表达改变。今后,有待于从糖生物学角度进一步探究 AML 多药耐药的机制,寻找新的多药耐药糖标志物,为临床耐药性白血病的治疗及逆转耐药提供新的对策。

[参 考 文 献]

[1] 陈阳,何琪杨. 岩舒注射液影响人 HL-60 白血病耐药细胞耐药性的机制 [J]. 中国新药杂志, 2014, (5): 523-526 + 549.

- [2] NAKANO M, SALDANHA R, GOBEL A, et al. Identification of glycan structure alterations on cell membrane proteins in desoxyepithilone B resistant leukemia cells [J]. Mol Cellular Proteomics, 2011, 10(11): M111. 009001. DOI: 10. 1074/mcp. M111. 009001.
- [3] 牟丽秋,胡雄彬,胡旸耘,等. 普郎尼克逆转肿瘤细胞 MDR 的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, (20): 1780-1784. DOI: 10. 13286/j. cnki. chinhosppharmacyj. 2014. 20. 22
- [4] MORJANI H, MADOULET C. Immunosuppressors as multidrug resistance reversal agents [J]. Methods Mol Bio, 2010, 596: 433-446. DOI: 10. 1007/978-1-60761-416-6_19.
- [5] CASORELLI I, BOSSA C, BIGNAMI M. DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias [J]. Int J Environ Res Public Health, 2012, 9(8): 2636-2657. DOI: 10. 3390/ijerph9082636.
- [6] ROBAK T, WIERZBOWSKA A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia [J]. Clin Ther, 2009, 31(Pt 2): 2349-2370. DOI: 10. 1016/j. clinthera. 2009. 11. 017.
- [7] YU S, WANG Q, ZHANG J, et al. Synthesis and evaluation of protein conjugates of GM3 derivatives carrying modified sialic acids as highly immunogenic cancer vaccine candidates [J]. Medchem-comm, 2011, 2(6): 524-530. DOI: 10. 1039/c1md00033k.
- [8] ZHANG Z, ZHAO Y, JIANG L, et al. Glycomic alterations are associated with multidrug resistance in human leukemia [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(8): 1244-1253. DOI: 10. 1016/j. biocel. 2012. 04. 026.
- [9] YE Y, TANG X, SUN Z, et al. Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion [J]. Oncotarget, 2016, 17(2): 1-16. DOI: 10. 18632/oncotarget. 7439.
- [10] DENG W, ZHANG Y, GU L, et al. Heat shock protein 27 downstream of P38-PI3K/Akt signaling antagonizes melatonin-induced apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2016, 16(5): 283-291. DOI: 10. 1186/s12935 -016-0283-8.
- [11] PANDURANGAN A K. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2201-2205.
- [12] DOBBIN Z C, LANDEN C N. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 8213-8227. DOI: 10. 3390/ijms14048213.
- [13] ABDUL-GHANI R, SERRA V, GYORFFY B, et al. The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1 [J]. Oncogene, 2006, 25(12): 1743-1752. DOI: 10. 1038/sj. onc. 1209201.
- [14] SCHULTZ M J, SWINDALL A F, WRIGHT J W, et al. ST6Gal-I sialyltransferase confers cisplatin resistance in ovarian tumor cells [J]. J Ovarian Res, 2013, 6(1): 203-211. DOI: 10. 1186/1757-2215-6-25.
- [15] GARCIA M G, ALANIZ L D, CORDO RUSSO R I, et al. PI3K/Akt inhibition modulates multidrug resistance and activates NF-kappaB in murine lymphoma cell lines [J]. Leuk Res, 2009, 33(2): 288-296. DOI: 10. 1016/j. leukres. 2008. 06. 010.
- [16] BADURA S, TESANOVIC T, PFEIFER H, et al. Differential

- effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e80070 [2015-07-01] <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080070>. DOI: 10.1371/journal.pone.0080070.
- [17] WADA T, HATA K, YAMAGUCHI K, et al. A crucial role of plasma membrane-associated sialidase in the survival of human cancer cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26(17): 2483-2490. DOI: 10.1038/sj.onc.1210341.
- [18] SOTTOCORNOLA E, MISASI R, MATTEI V, et al. Role of gangliosides in the association of ErbB2 with lipid rafts in mammary epithelial HC11 cells [J]. *FEBS J*, 2006, 273(8): 1821-1830. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05203.x.
- [19] WANG X Q, SUN P, PALLER A S. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 48770-48778. DOI: 10.1074/jbc.M308818200.
- [20] MIRKIN B L, CLARK S H, ZHANG C. Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation and EGF receptor phosphorylation by gangliosides GM1, GM3, GD1A and GT1B [J]. *Cell Prolif*, 2002, 35(2): 105-115.
- [21] NEIENDAM J L, KOHLER L B, CHRISTENSEN C, et al. An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons [J]. *J Neurochem*, 2004, 91(4): 920-935. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02779.x.
- [收稿日期] 2015-07-06 [修回日期] 2016-03-04
[本文编辑] 宋关鸿

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

本刊论文后参考文献的著录格式严格遵守 2015 年新发布的国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求,相对于旧的国家标准和本刊原有的著录格式,主要有以下改动:(1)作者姓名的书写,国人作者拼音姓在前、全大写,名在后,取每个汉字拼音的首字母大写(其间加空格);外籍作者姓在前、全大写,名在后,取名的首字母大写(其间加空格);(2)参考文献著录项目中增加“数字对象唯一标识码(DOI)”,电子资源的各类文献(过去称电子文献)除“获取和访问路径”中包含 DOI 外,均须在“获取和访问路径”项后写上 DOI;非电子资源的各类文献(即传统纸质文献),凡文献原文中或检索到的文献著录条目中有 DOI 者也应在“起-止页”项后写上 DOI。DOI 的获取,中文文献通过查阅原文或中文 DOI 网站(<http://www.chinadoi.cn>)查询;外文文献通过查找原文或登录 PubMed 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)或 Crossref.org 网站(<http://www.crossref.org>)等查找。常用参考文献的著录格式举例如下:

1 连续出版物(期刊)析出文献

著录格式:主要责任者.题名[文献类型标识/文献载体标识].刊名,出版年,卷(期):起-止页. DOI.

- [1] KNUDSEN E S, MCCLENDON A K, FRANCO J, et al. RB loss contributes to aggressive tumor phenotypes in MYC-driven triple negative breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(1):109-122. DOI:10.4161/15384101.2014.967118.

2 电子连续出版物(期刊)析出文献

著录格式:主要责任者.题名[文献类型标识/文献载体标识].刊名,出版年,卷(期):起-止页(更新或修改日期)[引用日期].获取或访问路径. DOI.

- [1] GONG F, PENG X, SANG Y, et al. Dichloroacetate induces protective autophagy in LoVo cells: involvement of cathepsin D/thioredoxin-like protein 1 and Akt-mTOR-mediated signaling [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(11): e913 [2015-11-07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3847316>. DOI:10.1038/cddis.2013.438.

3 专著

- [1] ABRAMS W B, BEER M H, BERKOW R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠,王赞舜,刘厚钰,等,译.2版.北京:人民卫生出版社,1996:2-25.
[2] DEVERELL W, IGLER D. A companion to California history [M/OL]. New York: John Wiley & Sons, 2013: 21-22(2013-11-15) [2014-06-24]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444305036.ch2/summary>.

4 专著析出文献

- [1] WEINSTEIN L, SWARTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganisms [M] // SODERMAN W A Jr, SODERMAN W A. Pathogenic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

5 学位论文

- [1] 曹新广. Cathepsin 和 Cystatin 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州. 郑州大学, 2007.
[2] 刘乃安. 生物材料热解失重动力学及其分析方法研究 [D/OL]. 安徽:中国科学技术大学, 2000: 17-18 [2014-08-29]. http://wenku.baidu.com/link?url=GJDJxb4lxBUXnPmq1XoEGSIr1H8TMLbidW_LjYu33tp707u52rKliyp_U_FBGUmox70vPNaVIVBALAMd5_yfwuKUUOAG-YuB7cuZ-BYEhXa. DOI: 10.7666/d.y351065.

6 专利文献

- [1] 钱其军,李琳芳,吴红平,等.一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PiK),其制备方法及应用:中国,20101496839[P].2010-10-14.
[2] KOSEKI A, MOMOSE H, KAWAHITO M, et al. Compiler:US 8288402[P/OL]. 2002-05-25[2002-05-28]. <http://FF&p=1&u=netahm/PTO/search-bool.html&r=5&f=G&l=50&col=AND&d=PG01&sl=IBM.AS.&OS=AN/IBM/RS=AN/IBM>.