

## Med19 基因敲减增加乳腺癌细胞化疗敏感性及其可能的机制

刘贝贝<sup>a</sup>, 张秀芬<sup>a</sup>, 高丹凤<sup>a</sup>, 郭子健<sup>b</sup>, 李莉华<sup>a</sup>(江南大学附属医院 a. 肿瘤研究所, b. 肿瘤外科, 江苏无锡 214062)

**[摘要]** **目的:** 研究中介体(mediator, Med)19对乳腺癌化疗敏感性的影响并分析其分子机制。**方法:** 选用多柔比星(adriamycin, ADM)耐药的人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 和亲本细胞 MCF-7(NC组), 采用慢病毒载体介导 RNA 干扰方法构建 Med19 稳定低表达的 MCF-7/ADM 与 MCF-7 细胞株(KD组), 并用 Real-time PCR 和 Western blotting 方法验证干扰效果。CCK-8 法检测慢病毒介导的 Med19 敲减前后两种细胞对 ADM、顺铂(cisplatin, DDP)和紫杉醇(taxinol, TAX)药物敏感性的变化。Real-time PCR 和 Western blotting 检测 Med19 敲减对多药耐药基因 1(multidrug resistance 1, MDR1)和细胞凋亡基因 Bcl2、Bax 及 Caspase-3、active Caspase-3 的表达的影响。流式细胞术检测敲减 Med19 及 ADM 处理对细胞凋亡的影响。**结果:** 与 MCF-7 相比, MCF-7/ADM 细胞对 ADM、DDP 和 TAX 均具有耐药性。成功构建 Med19 稳定低表达的 MCF-7/ADM 与 MCF-7 细胞株, 并且其对 ADM、DDP、TAX 的敏感性增加, 药物作用 IC<sub>50</sub> 显著降低(均  $P < 0.05$ )。MCF-7/ADM 细胞 Med19 mRNA 和蛋白表达显著高于 MCF-7 细胞, Med19 的敲减可降低 MCF-7/ADM 细胞中 MDR1 mRNA 与蛋白表达水平(均  $P < 0.05$ )并可增加 MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞中凋亡相关 active Caspase-3、Bax 的蛋白表达, 降低 Bcl2 的蛋白表达(均  $P < 0.05$ )。此外, 与 NC 及 NC + ADM 组相比, KD 组及 KD + ADM 组凋亡水平显著增加(均  $P < 0.05$ )。**结论:** Med19 高表达参与乳腺癌化疗耐药, 其机制可能与 Med19 调节 MDR1 的表达并影响细胞凋亡有关。

**[关键词]** 中介体 19; 乳腺癌; 多药耐药; 多柔比星

**[中图分类号]** R730.5; R737.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)04-0380-09

## Med19 knockdown promotes chemosensitivity of breast cancer cells and its possible mechanism

LIU Beibei<sup>a</sup>, ZHANG Xiufen<sup>a</sup>, GAO Danfeng<sup>a</sup>, GUO Zijian<sup>b</sup>, LI Lihua<sup>a</sup>(a. Oncology Institute, b. Department of Oncological Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214062, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect and molecular mechanism of mediator 19 (Med19) on drug sensitivity of breast cancer cells. **Methods:** Human breast cancer cell line MCF-7/ADM (adriamycin resistant) and its parental cell line MCF-7 (NC groups) were selected. Lentivirus-mediated RNA-interference was used to construct MCF-7/ADM and MCF-7 cell lines that stably expressing low Med19 (KD groups), and the infection efficiency were detected by Real-time PCR and Western blotting assays. The change of drug-susceptibility to ADM, cisplatin (DDP) and taxinol (TAX) were examined with CCK-8 assay before and after Med19 knockdown. The effects of Med19 knockdown on the expressions of multidrug resistance gene 1 (MDR1), Bcl2, Bax, Caspase-3 and active caspase-3 in breast cancer cells were detected by RT-PCR and Western Blotting assays, respectively. Effect of Med19 down-regulation and ADM treatment on apoptosis rates of MCF-7 and MCF-7/ADM cells were detected with flow cytometry assay. **Results:** Compared with MCF-7 cells, MCF-7/ADM cells exhibited drug resistance to ADM, DDP and TAX. MCF-7/ADM and MCF-7 cell lines that stably expressing low Med19 level were successfully established; their drug-susceptibilities to ADM, DDP, TAX were increased,

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目资助(No. 81472485); 无锡市卫计委资助项目(No. Q201615, YGZXM14038No. YGZXQ1311)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81472485), and the Project of the Wuxi Health and Family Planning Commission (No. Q201615, YGZXM14038, YGZXQ1311)

**[作者简介]** 刘贝贝(1990-), 女, 药理学硕士, 主要从事肿瘤与分子药理学方向的研究, E-mail: liubeibei0123@126.com

**[通信作者]** 李莉华(LI Lihua, corresponding author), 医学博士, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为肿瘤基因诊断和治疗, E-mail: LLHWX-SY@aliyun.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170413.1025.014.html>

and the  $IC_{50}$  values of these three cytotoxic agents decreased obviously ( all  $P < 0.05$  ). The mRNA and protein expressions of *Med19* in MCF-7/ADM cells were significantly higher than those in MCF-7 cells, however, *Med19* knockdown significantly inhibited the expressions of *MDR1* mRNA and protein in MCF-7/ADM cells ( all  $P < 0.05$  ); in addition, it significantly increased the expressions of active caspase-3 and Bax protein in both MCF-7/ADM and MCF-7 cells ( all  $P < 0.05$  ) and decreased the expression of Bcl2 protein ( all  $P < 0.05$  ). Besides, compared with NC or NC + ADM group, the apoptosis rate of the cells significantly increased in KD group or KD + ADM group ( all  $P < 0.05$  ). **Conclusions:** High *Med19* expression plays a particularly important role in chemoresistance of breast cancer, and the mechanism might correlate with *Med19* regulating *MDR1* expression and affecting apoptosis related genes.

[ **Key words** ] mediator19; breast cancer; multidrug resistance; adriamycin

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24( 4 ): 380-388. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.008 ]

化疗是乳腺癌治疗的重要手段之一,而多药耐药的产生严重影响了化疗疗效。本课题组前期研究<sup>[1-6]</sup>发现,中介体( mediator, Med )19 在乳腺癌组织中高表达,并与肿瘤的低分化相关;抑制 *Med19* 的表达,可抑制癌细胞的生长增殖和侵袭迁移;*Med19* 的敲减可增加紫杉醇( taxinol, TAX )对 P53 野生型 MCF-7 细胞的治疗效果。本课题组近期发现,与亲本细胞 MCF-7 相比,多柔比星( adriamycin, ADM )耐药的乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 中 *Med19* 及多药耐药基因 1( multidrug resistance 1, *MDR1* )基因呈异常高表达。本研究探讨 *Med19* 表达对乳腺癌细胞化疗敏感性的影响并初步分析其影响机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

RPMI 1640 培养基为赛默飞世尔公司生产,胎牛血清为美国 Hyclone 公司生产;兔抗人 *Med19* 一抗购自 Proteintech 公司,鼠抗人 *MDR1* 单抗、兔抗人 Bcl2 单抗、兔抗人 Bax 单抗、Caspase-3 单抗、GAPDH 单抗购自 Cell Signaling Technology,羊抗兔 *Med19* 二抗购自 Santa Cruz 公司;Cell Counting Kit-8 ( CCK-8 )细胞周期试剂盒购自南京凯基诺唯赞生物科技发展有限公司;ADM、顺铂( cisplatin, DDP ),TAX 注射液分别购自浙江海正药业股份有限公司( 批号: H33021980; 规格:10 mg/5 ml )、江苏豪森药业股份有限公司( 批号:H20040813; 规格:30 mg/6 ml )、扬子江药业集团有限公司( 批号:H20053001; 规格: 30 mg/5 ml );MCF-7/ADM 及 MCF-7 由本所保存。反转录试剂盒购自日本 TOYOBO 公司。*Med19* RNA 干扰( RNA interference, RNAi )相关慢病毒载体由上海吉凯基因公司构建。

### 1.2 细胞培养及多药耐药性的鉴定

MCF-7/ADM、MCF-7 细胞以含 10% 胎牛血清的改良型 RPMI 1640 培养基于 37 ℃、5%  $CO_2$  饱和

湿度培养箱中培养,取对数生长期的细胞悬液 100  $\mu$ l (  $5 \times 10^4$  个/ml )接种于 96 孔板中培养。24 h 后分别加入不同浓度的抗肿瘤药物 ADM ( 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 和 6.4  $\mu$ g/ml )、DDP ( 0.4、0.8、1.6、3.2 和 6.4  $\mu$ g/ml )及 TAX ( 浓度同 DDP ),培养 48 h 后每孔加 10  $\mu$ l CCK-8 继续培养 1.5 h。用酶标仪测定 490 nm 波长各孔光密度(  $D$  )值,计算  $IC_{50}$  值( 药物半数抑制浓度 )。设置调零孔( 不加细胞 )和阴性对照孔( 不加抗肿瘤药物 ),每孔各设 3 个复孔。 $IC_{50}$  采用寇氏改良法计算:  $lgIC_{50} = X_m - I( P - ( 3 - P_m - P_n ) / 4 )$ 。  $X_m$ :lg( 最大剂量 );  $I$ :lg( 最大剂量/相邻剂量 );  $P$ :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。

### 1.3 *Med19* RNAi 慢病毒感染法构建 *Med19* 低表达稳定株

MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞均分为 *Med19* 基因敲减组( KD 组:感染 *Med19* RNAi 慢病毒 )、空载体感染组( NC 组:感染慢病毒空载体 )、对照组( CON 组:未感染慢病毒 )。感染 72 h 后,荧光显微镜检测绿色荧光蛋白,计算慢病毒感染率。并采用 RT-PCR、Western blotting 检测感染后细胞内 *Med19* mRNA 与蛋白的表达,鉴定敲减效率达 80% 时进行细胞扩大培养。MCF-7/ADM 细胞转染后,通过有限稀释法挑单克隆,获取阳性程度逐渐增强的细胞,依次设为 KD1、KD2 和 KD3 组。

### 1.4 Real-time PCR 检测 *Med19* 敲减对 MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞内 *Med19*、*MDR1* 及凋亡相关基因表达的影响

用 TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA。按照反转录试剂盒说明书进行反转录,将得到的 cDNA 按照 ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 的 SYBR<sup>®</sup> Green 掺入法加样体系配置 Real-time PCR 反应体系,总体积为 20  $\mu$ l,反应条件为 95 ℃、60 s 后,95 ℃、15 s,60 ℃、15 s,72 ℃、45 s,40 个循环。所用引物见表 1。以 *GAPDH*

作为对照, 目的基因表达水平根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  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大小  
Tab. 1 Primer sequences and amplicon size of Real-time PCR

Gene	Forward primer( 5'-3' )	Reverse primer( 5'-3' )	Size ( bp )
<i>Med19</i>	GTAAGTTCCTGCCTGACCTG	TGTGCTTGTGCTTATTCTTCTTC	31
<i>MDR1</i>	GGAGCCTACTTGGTGGCACATAA	TGGCATAAGTCAGGAGCAAATGAAC	170
<i>Bcl2</i>	TGGGAGAACAGGGTACGATAAC	GAACTCAAAGAAGGCCACAATC	26
<i>Bax</i>	CATGTTTTCTGACGGCAACTTC	AGGGCCTTGAGCACCAGTTT	20
<i>Caspase-3</i>	AGAACTGGACTGTGGCATTGAG	GCTTGTCCGCATACTGTTTCAG	35
<i>GAPDH</i>	TGAGAAGTATGACAACAGCCTCA	AGTCCTTCCACGATACCAAAGTT	37

1.5 Western blotting 检测 *Med19* 敲减对 MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞内 *Med19*、MDR1 的表达及联合 ADM 处理前后凋亡基因的蛋白表达

冰上裂解各组细胞, 其中 MCF-7 及 MCF-7/ADM 的 CON、NC 和 KD 组细胞进行 *Med19* 及 MDR 检测; 48 h ADM 处理组( MCF-7: 0.2 μg/ml; MCF-7/ADM: 3 μg/ml ); NC 组、NC + ADM 组、KD 组、KD + ADM 组进行凋亡基因的蛋白表达检测。对每组样品, 上清 100 °C 煮 10 min 后用 BCA 法测定提取蛋白浓度。25 μl/孔上样, 经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入兔抗人 *Med19* 多抗 ( 1 : 500 )、鼠抗人 MDR1 多抗 ( 1 : 1 000 )、兔抗人 Bcl-2 单抗 ( 1 : 1 000 )、兔抗人 Bax 单抗 ( 1 : 1 000 )、兔抗人 Caspase-3 单抗 ( 1 : 1 000 )、兔抗人 GAPDH 单抗 ( 1 : 1 000 ), 4 °C 摇床孵育过夜后 1 × TBST 洗膜 3 次, 分别加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG ( 1 : 1 000 ) 或山羊抗鼠 ( 1 : 1 000 ), 室温孵育 1 h, 1 × TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 发光底物。Bio-Rad 成像系统扫描成像并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值。

1.6 CCK-8 法检测 *Med19* 敲减前后 MCF-7/ADM、MCF-7 细胞对 ADM、DDP、TAX 敏感性的变化

分别收集病毒感染后的 MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞, 按  $5 \times 10^4$  个/ml/孔接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后, MCF-7 ( CON、NC、KD ) 组加入不同浓度化疗药物: ADM ( 0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 μg/ml ), DDP ( 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 和 6.4 μg/ml ), TAX ( 浓度同 DDP ); MCF-7/ADM 组加入不同浓度化疗药物: ADM ( 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.5 和 25 μg/ml )、

DDP ( 浓度同 ADM )、TAX ( 0.8、1.6、3.2、6.4、12.5、25 和 50 μg/ml )。加药 48 h 后每孔加 10 μl CCK-8, 置于培养箱中培养 1.5 h。终止培养后, 用酶标仪测定 490 nm 波长各孔光密度 ( D ) 值, 计算 IC<sub>50</sub> 值。

1.7 流式细胞术检测 *Med19* 敲减对 MCF-7/ADM、MCF-7 细胞凋亡的影响

分别收集病毒感染后的 MCF-7/ADM 细胞及 MCF-7 细胞, 设置 NC 组、NC + ADM 组、KD 组、KD + ADM 组, 每组设 2 个复孔, 加药处理 ( MCF-7 各组: 0.2 μg/ml; MCF-7/ADM 各组: 3 μg/ml ), 48 h 后收集细胞, 冷的 PBS 洗 2 次后加入结合缓冲液重悬细胞, 制成单细胞悬液 (  $1 \times 10^6$  个/ml )。取 0.1 ml 细胞悬液, 加入 5 μl Annexin V/Alexa Flour 647 和 10 μl 20 μg/ml 的 PI 混匀后, 室温避光反应 15 min, 流式细胞仪检测病毒感染后细胞的凋亡率。

1.8 统计学处理

数据统计分析采用 SPSS 分析软件 ( 19.0 版 ), 所有的实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组数据比较用 *t* 检验, 3 组以上数据比较用单因素方差分析 ( One-way ANOVA ), 以 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MCF-7/ADM 细胞具有多药耐药性

不同浓度的化疗药物 ADM、DDP 及 TAX 处理 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞, CCK-8 法检测结果显示, 这 3 种化疗药物作用于 MCF-7/ADM 细胞的 IC<sub>50</sub> 值均显著高于 MCF-7 细胞, 差异有统计学意义 ( *P* < 0.05 ), 见表 2, 表明 MCF-7/ADM 细胞的药物敏感性均低于 MCF-7 细胞, 具有多药耐药性,

见图 1。

### 2.2 成功建立 *Med19* 低表达的 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞株

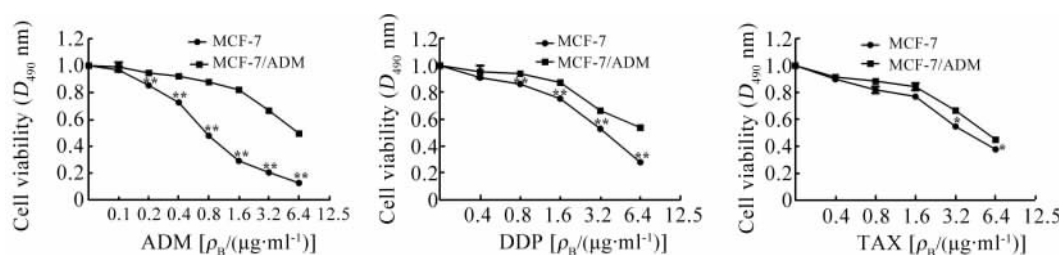
荧光显微镜观察慢病毒感染效果发现,在 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞中, KD 组和 NC 组的感染效率均大于 90%, 表明获得了良好的感染效率, 见图 2。与 CON、NC 组细胞相比, MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞的 KD 组中 *Med19* mRNA 和蛋白水平均显著降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。选取 KD3 组细胞进行后续功能实验。

表 2 与 MCF-7 细胞相比 MCF-7/ADM 细胞化疗药物的  $IC_{50}$  呈高水平 [ $\rho_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$ ]

Tab.2  $IC_{50}$  values is higher in MCF-7/ADM cells as compared with that in MCF-7 cells [ $\rho_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$ ]

Drug	MCF-7	MCF-7/ADM
ADM	0.855 ± 0.072	6.997 ± 0.494**
DDP	3.634 ± 0.074	6.706 ± 0.271**
TAX	4.476 ± 0.057	5.548 ± 0.151*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs MCF-7 cells



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs MCF-7 cells

图 1 MCF-7 比 MCF-7/ADM 细胞对化疗药物更敏感

Fig.1 The drug susceptibilities to three chemotherapeutic drugs of MCF-7 cells are higher than those of MCF-7/ADM cells

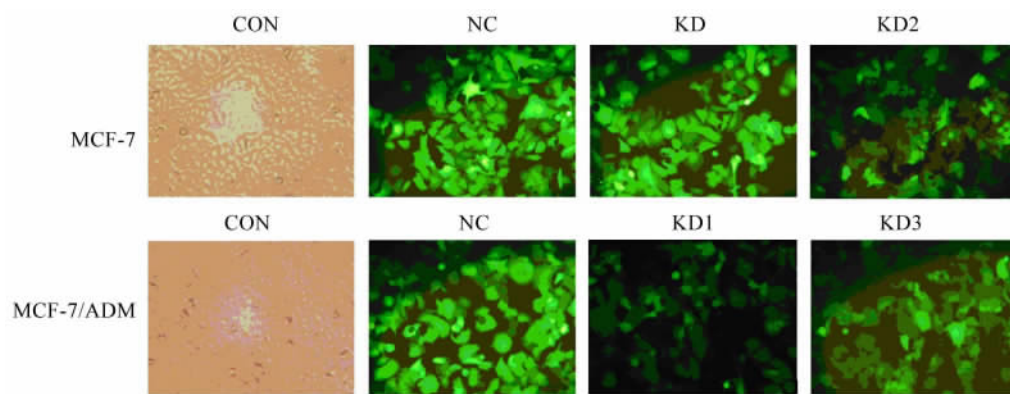


图 2 慢病毒感染效率的检测 (×200)

Fig.2 Detection of lentiviral infection efficiency (×200)

### 2.3 *Med19* 敲减增加 MCF-7、MCF-7/ADM 细胞化疗药物敏感性

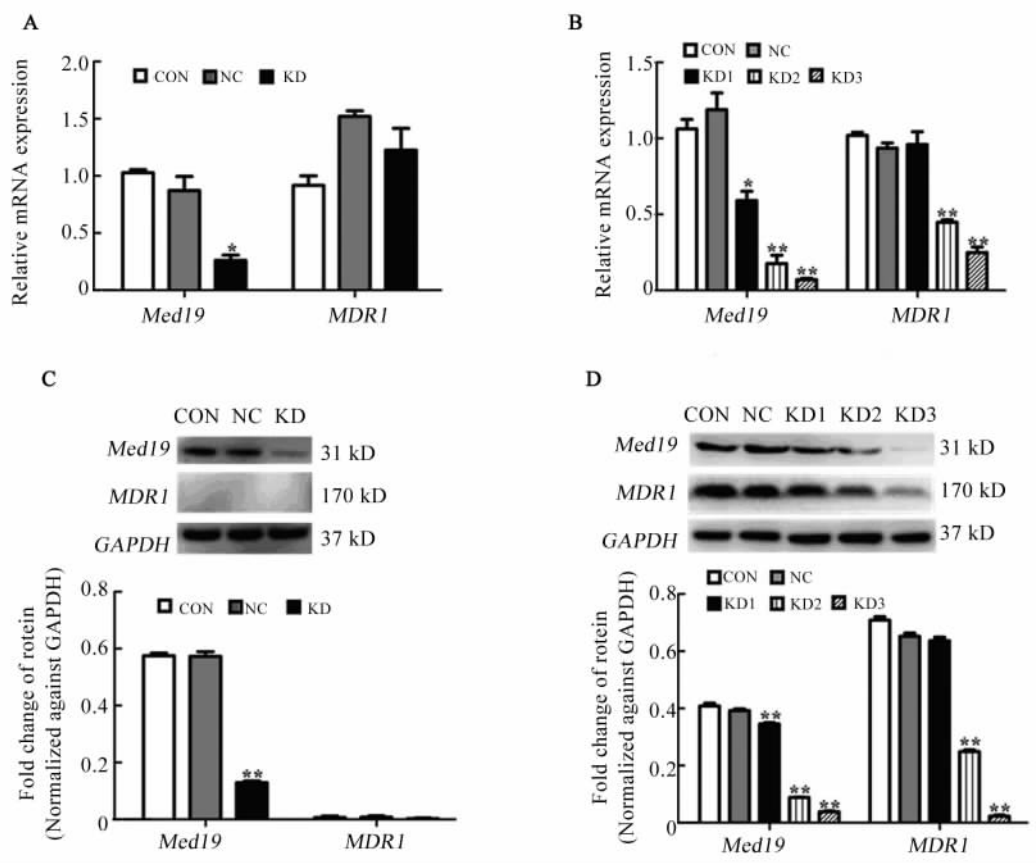
CCK-8 检测 *Med19* 的敲减对 MCF-7 药物敏感性的影响, 结果显示, KD 组中 ADM、DDP、TAX 的  $IC_{50}$  值显著低于 CON 及 NC 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明其药物敏感性显著高于 CON 及 NC 组, 见表 3。

CCK-8 检测 *Med19* 的敲减对 MCF-7/ADM 细胞耐药性的影响, 结果显示, 与 CON 及 NC 组相比, MCF-7/ADM 细胞 KD3 组 ADM、DDP 和 TAX  $IC_{50}$  值

显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明 *Med19* 敲减增加 MCF-7/ADM 细胞对抗肿瘤药物的敏感性, 见表 4。

### 2.4 *Med19* 和 *MDR1* 在 MCF-7/ADM 细胞中呈高表达

Real-time PCR 和 Western blotting 检测结果显示, MCF-7/ADM 细胞中 *Med19* 和 *MDR1* 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著高于 MCF-7 细胞, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。



A, B: Expressions of *Med19* and *MDR1* mRNA in MCF-7 and MCF-7/ADM cells;  
 C, D: Expressions of *Med19* and *MDR1* protein in MCF-7 and MCF-7/ADM cells  
 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs CON or NC group

图 3 靶向 *Med19* RNAi 慢病毒感染后 *Med19* 和 *MDR1* 在 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中的表达  
 Fig. 3 Expressions of *Med19* and *MDR1* in MCF-7 and MCF-7/ADM cells after infection of *Med19* RNAi lentivirus

表 3 下调 *Med19* 表达导致化疗药物杀伤 MCF-7 细胞的  $IC_{50}$  值增加 [ $\rho_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$ ]

Tab. 3 Down-regulating expression of *Med19* increased  $IC_{50}$  of drugs against MCF-7 cells [ $\rho_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$ ]

Drug	CON	NC	KD
ADM	0.659 ± 0.070	0.757 ± 0.138	0.346 ± 0.015 **
DDP	3.702 ± 0.178	3.870 ± 0.372	2.525 ± 0.107 **
TAX	4.534 ± 0.288	4.639 ± 0.108	2.659 ± 0.145 **

\*\*  $P < 0.01$  vs CON or NC group

### 2.5 *Med19* 敲减对 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中 *MDR1* 表达的影响

与 CON、NC 组细胞相比, MCF-7/ADM 细胞中, KD1、KD2、KD3 组细胞 *MDR1* mRNA 和蛋白水平依

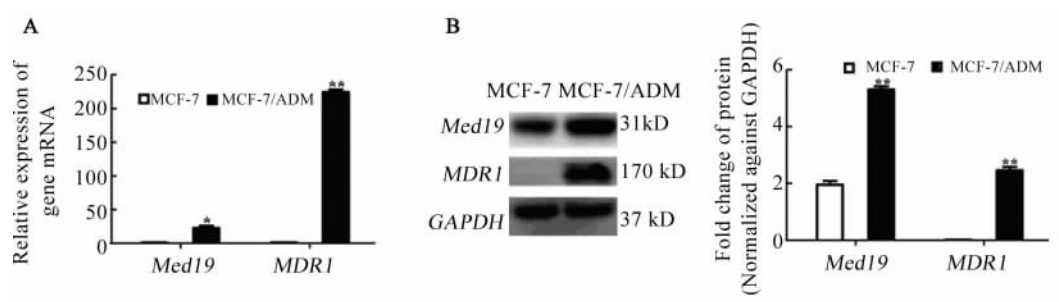
次降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 MCF-7 细胞中, KD 组与 CON、NC 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 3。

表 4 下调 *Med19* 表达导致化疗药物杀伤 MCF-7/ADM 细胞的  $IC_{50}$  值增加 [ $\rho_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$ ]

Tab. 4 Down-regulating expression of *Med19* increased  $IC_{50}$  of drugs against MCF-7/ADM cells [ $\rho_B / (\mu g \cdot ml^{-1})$ ]

Drug	CON	NC	KD3
ADM	7.392 ± 0.283	6.885 ± 0.305	3.423 ± 0.263 **
DDP	6.512 ± 0.281	6.476 ± 0.291	3.563 ± 0.326 **
TAX	6.293 ± 0.757	5.252 ± 0.227	3.339 ± 0.323 **

\*\*  $P < 0.01$  vs CON or NC group



A: Expressions of *Med19* and *MDR1* mRNA in MCF-7 and MCF-7/ADM cells;

B: Expressions of *Med19* and *MDR1* protein in MCF-7 and MCF-7/ADM cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs MCF-7 cells

图4 *Med19* 和 *MDR1* 在 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞中的差异表达

Fig. 4 Differential expressions of *Med19* and *MDR1* in MCF-7 and MCF-7/ADM cells

## 2.6 *Med19* 敲减促进 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图5)显示,在 MCF-7 或 MCF-7/ADM 细胞中,*Med19* 敲减组细胞凋亡率(27.3 ± 1.5)%、(10.55 ± 2.1)% 均显著高于 NC 组

细胞凋亡率(4.9 ± 0.71)%、(1.1 ± 0.14)% ,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );且 KD + ADM 组凋亡率(31.8 ± 1.3)%、(49.7 ± 5.2)% 较之于对照组 NC + ADM 组凋亡率(17.9 ± 0.71)%、(12.75 ± 1.5)% 均显著增高( $P < 0.05$ )。

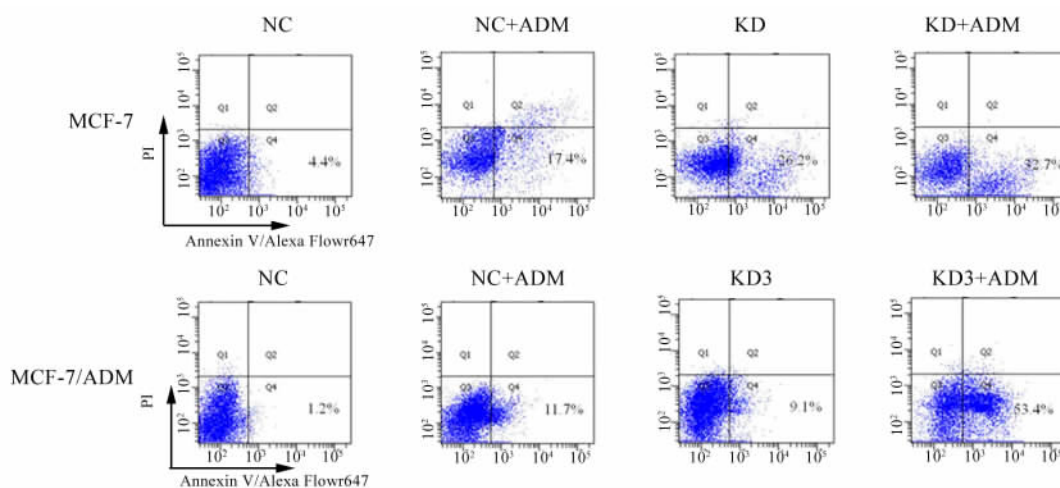


图5 下调 *Med19* 的表达对 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞凋亡率的影响

Fig. 5 Effect of *Med19* down-regulation on apoptosis rates of MCF-7 and MCF-7/ADM cells

## 2.7 *Med19* 敲减提高 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中凋亡相关蛋白的表达

Real-time PCR 检测结果显示, MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞 KD 组中, 凋亡抑制基因 *Bcl2* 均呈低表达, 而凋亡基因 *Bax* 则呈高表达, 总的 *Caspase-3* 水平无明显变化(图6); 此外, 在 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中, 检测 *Med19* 敲减或联合 ADM 处理前后, 凋亡相关基因 *Bcl2*、*Bax*、*Caspase-3* 及 active *caspase-3* 的表达, Western blotting 结果(图7)显示,

在 ADM 处理或未经处理的 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中, *Med19* 的敲减均能够降低 *Bcl2* 的蛋白表达, 增加 *Bax* 的蛋白表达, 并活化 *Caspase-3*。

## 3 讨论

化疗药物持续使用致使癌细胞对化疗药物敏感性降低, 继而产生药物抵抗导致化疗失败。ADM 是一种临床上广泛使用的抗癌药物, 用于治疗乳腺癌、急性白血病、胃癌、肝癌等多种恶性肿瘤疾病。其作用机制是

通过嵌入到癌细胞的 DNA 碱基片段中, 阻碍 DNA 的转录和复制, 从而抑制肿瘤生长<sup>[7]</sup>。鉴于 ADM 抑癌作用, 它的耐药性成为亟待解决的问题之一。

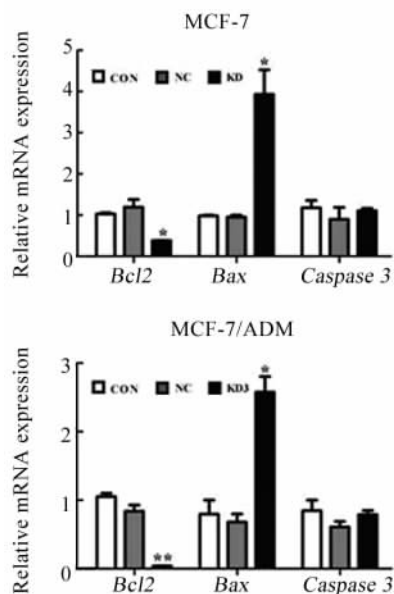


图 6 下调 *Med19* 的表达对 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞内 *Bcl2*、*Bax* 和 *Caspase3* mRNA 表达的影响

Fig. 6 Effect of *Med19* down-regulation on expressions of *Bcl2*, *Bax* and *Caspase3* mRNA in MCF-7 and MCF-7/ADM cells

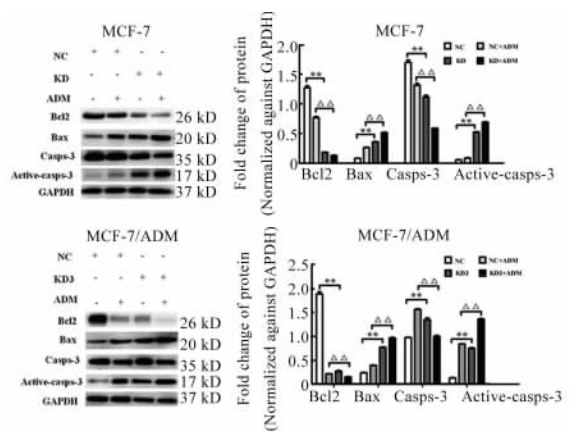


图 7 下调 *Med19* 的表达对 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of *Med19* down-regulation on expressions of apoptosis-related proteins in MCF-7 and MCF-7/ADM cells

*Med19* 是中介体复合物的主要组分之一, 在乳腺癌、前列腺癌、骨肉瘤及肺癌中均能促进细胞增殖, 起到一定的致癌作用<sup>[1-2, 8-10]</sup>。此外, *Med19* 也可影响多种化疗药物对癌细胞的作用效果, 本课题组前期研究发现 *Med19* 的敲减能够增加 *P53* 野生型乳腺癌细胞 MCF-7 对 TAX 的敏感性, 促进细胞凋

亡, 对 *P53* 突变型的 MDA-MB-231 细胞无显著影响<sup>[6]</sup>。Wei 等<sup>[11]</sup>报道在非小细胞肺癌中 *Med19* 敲减能抑制增殖、增加细胞对铂类化疗药物的敏感性。近期研究发现中介体复合物其他亚基也影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 例如 Germer 等<sup>[12]</sup>报道敲减中介体复合物亚基 1 (mediator1, *Med1*) 能使 HER2 阳性乳腺癌细胞对他莫昔芬更加敏感; Marissa Leonard 等<sup>[13]</sup>报道 *Med1* 的敲减能增加乳腺癌细胞对氟维司群的敏感性。然而在乳腺癌治疗中, *Med19* 对 ADM 敏感性的影响及其机制尚未阐明, 为此本研究选取 MCF-7/ADM 及亲本 MCF-7 细胞为研究对象, 结果显示 *Med19* 敲减能增加 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞对化疗药物 ADM、DDP、TAX 的敏感性。

大量的研究证实, 肿瘤耐药性的发生可能与癌细胞产生的 *MDR1* 的表达水平密切相关<sup>[14]</sup>, *MDR1* 高表达的癌细胞较之于无 *MDR1* 表达的细胞, 其化疗敏感性降低至少三倍<sup>[15]</sup>。*MDR1* 的表达产物是 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), 该蛋白有 ATP 依赖性跨膜转运活性, 将细胞内药物泵至细胞外, 降低细胞内药物蓄积, 导致化学治疗的效果下降乃至消失。目前已有大量研究证实 *MDR1* 的下调有助于降低不同癌细胞耐药性, Li 等<sup>[16]</sup>发现 m-TOR 的抑制能通过下调 *MDR1* 的表达增加胆囊癌细胞对 5-FU 的敏感性; 肺癌中, miR-206 通过抑制 *MDR1* 的表达调节铂类耐药<sup>[17]</sup>; 在 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中, 研究者也发现薯蓣素可通过细胞自噬作用调节 *MDR1* 表达并影响其对 ADM 的敏感性<sup>[18]</sup>。本研究发现 MCF-7/ADM 细胞 *Med19* 表达显著高于 MCF-7 细胞, 在 MCF-7/ADM 细胞中 *Med19* 的敲减可降低 *MDR1* mRNA 及蛋白表达, 因此我们推测 *Med19* 敲减对 *MDR1* 表达水平的抑制可能成为解决 ADM 化疗耐药的有效方法之一。

此外, 多药耐药的产生与药物外排、DNA 损伤的增加及细胞增殖或凋亡信号通路改变密切相关<sup>[19-21]</sup>。由于在亲本 MCF-7 细胞中 *MDR1* 的表达呈较低水平, *Med19* 对 MCF-7 细胞的药物敏感性的影响可能通过 *MDR1* 非依赖性途径, 本研究发现, 在 MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞中, *Med19* 的敲减可促进凋亡并调节凋亡相关基因 *Bcl2*、*Bax* 的表达及 Caspase-3 的活化。Caspase-3 是白细胞介素 1- $\beta$  转化酶 (ICE) 家族成员之一, 是主要的效应 caspase, 在细胞凋亡中居于核心地位, 活化后的 Caspase-3 酶解切割 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK) 和聚腺苷二磷酸核糖多聚酶 (PARP) 等, 调节凋亡相关线粒体

通路及死亡受体通路, 从而影响细胞生长<sup>[22-23]</sup>。*Bcl2* 是一种原癌基因, 具有抑制凋亡的作用, *Bax* 基因属于 *Bcl2* 基因家族, 可与 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 蛋白结合形成异源二聚体, 抑制 *Bcl2* 的功能, 促进细胞凋亡<sup>[24]</sup>。研究发现肺癌细胞中, *Med19* 敲减可引起 *Bax* 表达上调促进癌细胞凋亡<sup>[25]</sup>。本研究结果显示, 在 ADM 处理或未处理组, *Med19* 的敲减均能抑制 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞中 *Bcl2* 的表达, 增加 *Bax* 的表达并激活 Caspase-3。此外, 流式细胞术检测结果显示 *Med19* 的敲减促进乳腺癌细胞凋亡的发生。因此推测, *Med19* 敲减可能易化细胞凋亡, 且可能联合对 *MDR1* mRNA 及蛋白表达的抑制解除乳腺癌细胞的多药耐药性, 增加化疗药物对癌细胞的杀伤作用。

综上所述, 我们的研究结果显示 *Med19* 在 MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞中存在差异表达, *Med19* 敲减一方面可能通过促进凋亡增加 MCF-7 细胞对化疗药物的敏感性, 另一方面, *Med19* 敲减亦可能通过降低高水平 *MDR1* mRNA 及蛋白表达并联合调控凋亡相关基因的蛋白表达降低 MCF-7/ADM 细胞的耐药性。由此可知 *Med19* 对乳腺癌细胞化疗药物疗效的影响可能通过多个基因或多条通路协调作用, 亟待深入探究, 从而为临床耐药性乳腺癌患者的治疗提供新的治疗思路。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] LI L H, HE J, HUA D, et al. Lentivirus-mediated inhibition of *Med19* suppresses growth of breast cancer cells in vitro [ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68 ( 1 ): 207-215. DOI: 10.1007/s00280-010-1468-9.
- [ 2 ] ZHANG X F, FAN Y L, LIU B B, et al. *Med19* promotes breast cancer cell proliferation by regulating *CBFA2T3/HEB* expression [ J/OL ]. *Breast Cancer*, 2016 [ 2016-10-05 ]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12282-016-0722-3>. DOI: 10.1007/s12282-016-0722-3. [ Epub ahead of print ].
- [ 3 ] 戴桂萍, 李莉华, 郭子健, 等. *Med19* 在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系 [ J ]. *江苏医药*, 2013, 39 ( 1 ): 39-42.
- [ 4 ] 王晓艳, 华东, 李莉华, 等. 沉默 *Med19* 对人乳腺癌裸鼠成瘤的影响 [ J ]. *实用医学杂志*, 2011, 27 ( 17 ): 3109-3112.
- [ 5 ] 王晓艳, 郭子健, 吴小红, 等. 沉默中介体 19 对人乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭及迁移的影响 [ J ]. *实用医学杂志*, 2014, 30 ( 9 ): 1373-1375.
- [ 6 ] 杨晓丹, 郭子健, 刘贝贝, 等. *Med19* 基因沉默对 P53 野生型和突变型乳腺癌细胞紫杉醇化疗疗效的影响 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22 ( 6 ): 716-723. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.007.
- [ 7 ] LEI H, WANG X, WU C. Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations [ J/OL ]. *J Mol Graph Model*, 2012, 38:279-289 [ 2016-10-05 ]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326312000678>. DOI: 10.1016/j.jmglm.2012.05.006.
- [ 8 ] ZHANG H, JIANG H, WANG W, et al. Expression of *Med19* in bladder cancer tissues and its role on bladder cancer cell growth [ J ]. *Urol Oncol*, 2012, 30 ( 6 ): 920-927. DOI: 10.1016/j.urolonc.2010.10.003.
- [ 9 ] YU W, ZHANG Z, MIN D, et al. Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19 promotes osteosarcoma growth and metastasis and associates with prognosis [ J ]. *Eur J cancer*, 2014, 50 ( 6 ):1125-1136. DOI:10.1016/j.ejca.2014.01.030.
- [ 10 ] XU L L, GUO S L, MA S R, et al. Mammalian mediator 19 mediates H1299 lung adenocarcinoma cell clone conformation, growth, and metastasis [ J ]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13 ( 8 ): 3695-3700.
- [ 11 ] WANG X W, SUN J J, et al. Knockdown of *Med19* suppresses proliferation and enhances chemo-sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cells [ J ]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16 ( 3 ):875-880.
- [ 12 ] CUI J, GERMER K, WU T, et al. Cross-talk between HER2 and MED1 regulates tamoxifen resistance of human breast cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2012, 72 ( 21 ):5625-5634. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1305.
- [ 13 ] ZHANG L, CUI J, LEONARD M, et al. Silencing MED1 sensitizes breast cancer cells to pure anti-estrogen fulvestrant in vitro and in vivo [ J/OL ]. *PLoS One*, 2013, 8 ( 7 ):e70641 [ 2016-10-05 ]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0070641>. DOI: 10.1371/journal.pone.0070641.
- [ 14 ] TAKAHASHI S, ITO Y, HATAKE K, et al. Gene therapy for breast cancer--review of clinical gene therapy trials for breast cancer and *MDR1* gene therapy trial in cancer institute hospital [ J ]. *Breast Cancer*, 2006, 13 ( 1 ): 8-15.
- [ 15 ] TROCK B J, LEONESSA F, CLARKE R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of *MDR1/gp170* expression and its possible functional significance [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89 ( 13 ): 917-931.
- [ 16 ] LI Q, MOU L J, TAO L, et al. Inhibition of mTOR suppresses human gallbladder carcinoma cell proliferation and enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil by downregulating *MDR1* expression [ J ]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20 ( 9 ): 1699-1706.
- [ 17 ] CHEN Q Y, JIAO D M, WANG J, et al. miR-206 regulates cisplatin resistance and EMT in human lung adenocarcinoma cells partly by targeting MET [ J ]. *Oncotarget*, 2016, 7 ( 17 ): 24510-24526. DOI: 10.18632/oncotarget.8229.
- [ 18 ] WANG C, HUO X, WANG L, et al. Dioscin strengthens the efficiency of adriamycin in MCF-7 and MCF-7/ADR cells through autophagy induction: more than just down-regulation of *MDR1* [ J/OL ]. *Sci Rep*, 2016, 6:28403 [ 2016-10-05 ]. <http://www.nature.com/articles/srep28403>. DOI: 10.1038/srep28403.
- [ 19 ] RGALLI J P, TOCCHETTI G N, ARANA M R, et al. The phytoestrogen genistein enhances multidrug resistance in breast cancer cell lines by translational regulation of ABC transporters [ J ].



Cancer Lett, 2016, 376( 1 ): 165-172. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2016. 03. 040.

[ 20 ] LI W, ZHANG H, ASSARAF Y G, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies [ J/OL ]. Drug Resist Updat, 2016, 27: 14-29 [ 2016-10-05 ]. [http://www. drupjournal. com/article/S1368-7646\( 16 \) 30012-7/abstract](http://www. drupjournal. com/article/S1368-7646( 16 ) 30012-7/abstract) . DOI: 10. 1016/j. drup. 2016. 05. 001.

[ 21 ] LI L, ZHU T, GAO Y F, et al. Targeting DNA damage response in the radio( chemo ) therapy of non-small cell lung cancer [ J/OL ]. Int J Mol Sci, 2016, 17( 6 ): E839 [ 2016-10-05 ]. <http://www. mdpi. com/1422-0067/17/6/839>. DOI: 10. 3390/ijms17060839.

[ 22 ] ODONKOR C A, ACHILEFU S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy [ J ]. Cancer Invest, 2009, 27( 4 ): 417-429. DOI: 10. 1080/07357900802438585.

[ 23 ] FULDA S, DEBATIN K M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy [ J ]. Oncogene, 2006, 25 ( 34 ): 4798-4811. DOI: 10. 1038/sj. onc. 1209608.

[ 24 ] OLTYAI Z N, MILLIMAN C L, KORSMEYER S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [ J ]. Cell, 1993, 74( 4 ): 609-619.

[ 25 ] XU Y, LI C, TIAN Q, et al. Suppression of lung cancer metastasis-related protein 1 promotes apoptosis in lung cancer cells [ J ]. Int J Mol Med, 2012, 30( 6 ): 1481-1486. DOI: 10. 3892/ijmm. 2012. 1160.

[ 收稿日期 ] 2016 - 12 - 12 [ 修回日期 ] 2017 - 02 - 08  
[ 本文编辑 ] 黄静怡



· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

中国临床试验注册中心( Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR )为卫生部下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构( World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register ),由卫生部中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公众利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以卫生部中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 [www. chictr. org](http://www. chictr. org), 公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。

( 本刊编辑部 )