

研究论文

Wnt5a通过PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路调控人卵巢癌SKOV3/VCR细胞对长春新碱的敏感性

吴凤兰, 陈红莲, 胡小伟, 梁利英, 徐宛玲*

漯河医学高等专科学校医疗系, 漯河 462002

摘要: 本研究旨在探究Wnt5a对人卵巢癌SKOV3细胞长春新碱(vincristine, VCR)耐药性的影响, 并探讨其分子机制。采用浓度梯度递增法构建耐药株SKOV3/VCR细胞, 将人WNT5A基因的干扰质粒转染SKOV3/VCR细胞并筛选出稳定干扰Wnt5a的细胞株, 用RT-PCR检测Wnt5a的mRNA表达水平, 用CCK-8法检测细胞活力, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 用Western blot法检测Wnt5a、MDR1、Survivin、 β -catenin、Akt、p-Akt(S473)、GSK3 β 和p-GSK3 β (Ser9)的蛋白表达水平。结果显示, SKOV3/VCR细胞中Wnt5a、MDR1、 β -catenin和Survivin蛋白的表达水平、Akt和GSK3 β 蛋白的磷酸化水平以及Wnt5a mRNA表达水平均显著高于其亲代SKOV3细胞; WNT5A基因沉默使VCR抑制SKOV3/VCR细胞活力的IC₅₀从38.412降至9.283 mg/L, 提高SKOV3/VCR细胞凋亡率并协同增强VCR诱导的细胞凋亡($P < 0.05$), 下调MDR1、 β -catenin和Survivin蛋白的表达水平($P < 0.05$), 抑制Akt和GSK3 β 蛋白磷酸化($P < 0.05$); 此外, PI3K抑制剂LY294002也可下调SKOV3/VCR细胞中MDR1、 β -catenin和Survivin蛋白表达水平, 并降低Akt和GSK3 β 蛋白磷酸化水平($P < 0.05$)。以上结果提示, 沉默WNT5A基因可在体外逆转人卵巢癌耐药株SKOV3/VCR细胞耐药性, 作用机制可能与其抑制PI3K/Akt/GSK3 β -catenin通路, 继而下调MDR1和Survivin蛋白表达有关。

关键词: Wnt5a; 卵巢癌; 长春新碱; 耐药性; Akt; β -连环蛋白; 多药耐药基因1; 存活素

中图分类号: R737.31

Wnt5a modulates vincristine resistance through PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway in human ovarian carcinoma SKOV3/VCR cells

WU Feng-Lan, CHEN Hong-Lian, HU Xiao-Wei, LIANG Li-Ying, XU Wan-Ling*

Department of Medicine, Luohe Medical College, Luohe 462002, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of Wnt5a on the vincristine (VCR) resistance in human ovarian carcinoma SKOV3 cells and its possible mechanism. The drug-resistant SKOV3/VCR cells were established by stepwise exposure to VCR, and then the SKOV3/VCR cells were stably transfected with specific shRNA interference plasmid vector targeting for Wnt5a. The mRNA expression level of Wnt5a was measured by RT-PCR. CCK-8 assay was used to detect the cell viability of SKOV3/VCR cells. The apoptosis was analyzed by flow cytometry. The protein expression levels of Wnt5a, MDR1, Survivin, β -catenin, Akt, p-Akt(S473), GSK3 β and p-GSK3 β (Ser9) were detected by Western blot. The result showed that SKOV3/VCR cells had significantly higher protein expression levels of Wnt5a, MDR1, Survivin and β -catenin, phosphorylation levels of Akt and GSK3 β , and mRNA expression level of Wnt5a, compared with SKOV3 cells ($P < 0.05$). WNT5A gene silencing significantly increased the sensitivity of SKOV3/VCR cells to VCR, the IC₅₀ of VCR being decreased from 38.412 to 9.283 mg/L ($P < 0.05$), synergistically enhanced VCR-induced apoptosis of SKOV3/VCR cells ($P < 0.05$), down-regulated the protein expression levels of MDR1, β -catenin and Survivin ($P < 0.05$), and inhibited phosphorylation of Akt and GSK3 β ($P < 0.05$). Meanwhile, LY294002 (PI3K inhibitor) decreased the protein expression levels of MDR1,

Received 2018-06-16 Accepted 2018-11-12

This work was supported by the Science and Technology Development Project of Henan Province, China (No. 132300410315).

*Corresponding author. Tel: +86-395-2970063; E-mail: 872189991@qq.com

β -catenin and Survivin, as well as the phosphorylation levels of Akt and GSK3 β in SKOV3/VCR cells ($P < 0.05$). These results suggest that *WNT5A* gene silencing reverses VCR resistance in SKOV3/VCR cells possibly through blocking the PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway, and thus down-regulating the protein expression levels of MDR1 and Survivin.

Key words: Wnt5a; ovarian carcinoma; vincristine; drug resistance; Akt; β -catenin; MDR1; Survivin

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤之一。据统计,全世界每年新增卵巢癌患者 238 700 例,发病率居妇科恶性肿瘤第 3 位,而每年死亡人数高达 151 900 例,死亡率居妇科恶性肿瘤的第二位^[1]。约 80% 的卵巢癌患者就诊时已经发展到了 III~IV 期,需要采取手术治疗与化学治疗相结合的综合治疗策略^[2]。尽管大部分患者初始化学治疗有效,但通常又在 6~12 个月后复发,由于多种药物耐药性的出现,二线化学治疗的有效率仅为 8%~21%^[3,4]。长春新碱(vincristine, VCR)是从夹竹桃科植物长春花中提取出的一种生物碱,具有广谱的抗肿瘤作用,常与放线菌素 D 和环磷酰胺组成 VCR 方案治疗卵巢癌,但耐药性的产生严重限制了 VCR 的临床有效性^[5,6]。因此逆转 VCR 耐药性成为卵巢癌研究的热点,也是临床亟待解决的问题。

Wnt 蛋白是一类分泌型糖蛋白家族,目前在哺乳动物中发现了至少 19 种 Wnt 蛋白亚型。Wnt 蛋白通过细胞膜受体介导的信号途径,对细胞的分化、增殖、凋亡和迁移等生命活动发挥重要的调节作用^[7]。Wnt 信号通路一般分为两类,即依赖 β -连环蛋白(β -catenin)的经典通路和不依赖 β -catenin 的非经典通路。Wnt5a 是 Wnt 蛋白家族中非经典 Wnt 信号途径的代表,可与 Ror2 受体结合激活非经典的 Wnt 信号通路,但也可与 FZD-4 受体结合激活经典的 Wnt 信号通路^[8]。近年来有研究显示, Wnt5a 在人黑色素瘤耐药株 A375/PLX4720 细胞和 MEL624/PLX4720 细胞、人子宫肉瘤耐药株 MES-SA/Dx5 细胞以及人乳腺癌耐药株 MCF-7/ADR2 细胞中呈高表达,下调 Wnt5a 表达可逆转肿瘤耐药性^[9,10]。但有关 Wnt5a 在卵巢癌化学治疗耐药中的作用及其机制鲜有报道。本研究在体外通过构建卵巢癌 VCR 耐药株 SKOV3/VCR 细胞,观察 Wnt5a 在 SKOV3/VCR 细胞中的表达情况及其对耐药性的影响,并探究可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人卵巢癌 SKOV3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;胎牛血清

(fetal bovine serum, FBS) 和 RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司;硫酸 VCR (批号 420039-201601、HPLC $\geq 98\%$) 购自中国食品药品检定研究院;PI3K 抑制剂 LY294002 和嘌呤霉素购自 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、EdU-555 细胞增殖检测试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RT-PCR 试剂盒和 PCR 引物购自大连宝生物公司;人 *WNT5A* 基因干扰质粒 (pRS-Wnt5a) 和无义对照质粒 (pRS-scrambled) 购自 Origene 公司;脂质体 Lipofectamine[®] 2000 购自 Invitrogen 公司;无内毒素质粒提取试剂盒购自北京康为世纪公司;兔抗人 Wnt5a、多药耐药基因 1 (multidrug resistance 1, MDR1)、存活素 (Survivin)、 β -catenin、Akt、p-Akt(S473)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)、p-GSK3 β (Ser9)、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自 Abcam 公司。

1.2 细胞培养 人卵巢癌 SKOV3 细胞采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 条件下进行培养,待细胞覆盖率达到 80% 以上时,以 0.25% 的胰蛋白酶消化,按 1:3 的比例传代。

1.3 建立 VCR 耐药细胞株 SKOV3/VCR 取对数生长期 SKOV3 细胞,用 0.01 mg/L VCR 处理 48 h 后,更换为正常培养液继续培养,待细胞覆盖率再次达到 80% 时,重复以上处理,当 SKOV3 细胞在该药物浓度下能稳定生长传代时,将 VCR 浓度提高至下一梯度。VCR 的浓度梯度为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 和 1 mg/L,整个诱导过程历时约 8 个月,最终得到耐药细胞株 SKOV3/VCR。SKOV3/VCR 细胞在含有 1 mg/L VCR 的培养液中培养以维持耐药性。停止加入 VCR 两周后,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.4 构建稳定干扰 Wnt5a 的细胞株 取对数生长期 SKOV3/VCR 细胞,用脂质体转染试剂 Lipofectamine[®] 2000 将质粒 pRS-Wnt5a 和 pRS-scrambled 分别转染 SKOV3/VCR 细胞;转染 48 h 后,更换为含 0.5 mg/L 嘌呤霉素的培养液进行筛选,2 周后得到稳定转染细胞株。其中转染 pRS-Wnt5a 质粒的为

Wnt5a 干扰细胞株 (shWnt5a), 转染 pRS-scrambled 质粒的为对照干扰细胞株 (shControl)。

1.5 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期细胞, 以每孔 5 000 个接种于 96 孔板, 培养 24 h。加入含有不同浓度 VCR 的培养液, 对于非耐药株细胞, VCR 的终浓度分别为 0.01、0.03、0.1、0.3、1 和 3 mg/L; 对于耐药株细胞, VCR 的终浓度分别为 2、5、10、20、50 和 100 mg/L, 同时设对照孔和调零孔, 每组设 5 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 用酶标仪检测各孔 450 nm 波长吸光度 A 值。计算细胞活力, 细胞活力 = (加药孔 A 值 / 对照孔 A 值) \times 100%。使用 SPSS16.0 软件的 Probit 回归模型计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。计算耐药倍数与逆转倍数, 耐药倍数 = 耐药细胞 IC_{50} / 敏感细胞 IC_{50} , 逆转倍数 = 耐药细胞 IC_{50} / 逆转细胞 IC_{50} 。实验重复 3 次。

1.6 EdU 掺入法检测细胞增殖 取 shControl 组、shWnt5a 组以及经 5 mg/L VCR 处理 48 h 后的 shControl 组和 shWnt5a 组细胞, 加入 1 mL 用细胞培养液按 1:500 稀释的 EdU 溶液; 孵育 2 h 后, PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL 固定液, 室温固定 15 min; PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL 通透液, 室温孵育 15 min; PBS 洗涤 2 次, 加入 0.5 mL Click 反应液, 室温避光孵育 30 min; PBS 洗涤 2 次, 用 FACSCalibur 流式细胞仪 (购自美国 BD 公司) 检测 EdU 标记的阳性细胞比例。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞处理同 1.6 节, 收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 用 200 μ L 结合缓冲液重悬细胞; 加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀; 加入 10 μ L PI 染色液, 轻轻混匀; 室温避光孵育 15 min 后, 用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.8 RT-PCR 检测 Wnt5a 的 mRNA 水平 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 进行反转录, 反转录条件: 42 $^{\circ}$ C, 60 min; 70 $^{\circ}$ C, 15 min。取 2 μ L 上述反应液进行 PCR, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 第 2 步至第 4 步进行 35 个循环。引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 经 PubMed Blast 验证。Wnt5a (160 bp): 上游引物: 5'-TGAACCTGCACAA-CAACGAG-3', 下游引物: 5'-TCGIACCTCTCCTTCAG-GGC-3'; GAPDH (276 bp): 上游引物: 5'-CCTGACCT-

GCCGTCTAGAAA-3', 下游引物: 5'-TACTCCTTGG-AGGCCATGTG-3'。取 5 μ L 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下拍照, 用 ImageJ 1.45s 软件进行灰度分析, 以目的产物与内参 GAPDH 条带的灰度值比值表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.9 Western blot 检测蛋白水平 取 shControl 组、shWnt5a 组和 shControl+LY 组 (用 10 μ mol/L LY294002 处理 48 h 的 shControl 细胞), 用 RIPA 裂解各组细胞提取总蛋白, 用紫外分光光度法测定蛋白质浓度。取 25 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜, 用脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 (抗 Wnt5a、MDR1、Survivin、 β -catenin、Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 抗体均以 1:1 000 稀释, 抗 β -actin 抗体以 1:2 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:1 000 稀释) 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 进行发光反应, 暗室 X 胶片显影, 拍照后使用 ImageJ 1.45s 软件进行灰度分析, 以目标蛋白与内参 β -actin 条带的灰度比值作为目标蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.10 统计分析方法 实验数据用 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 16.0 分析数据, 两组间比较采用 t 检验和协方差分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 并用 Bonferroni 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 时认为差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药前后 VCR 对 SKOV3 细胞活力的影响

CCK-8 法检测结果显示, 与对照组 (0 mg/L) 相比, 经不同剂量 VCR 处理 48 h 后, SKOV3 和 SKOV3/VCR 组细胞活力均明显下降 ($P < 0.05$), 且随着 VCR 剂量的增加, 细胞活力有逐渐下降的趋势 (图 1), 其 IC_{50} 分别为 0.125 mg/L 和 38.412 mg/L; SKOV3/VCR 细胞的耐药倍数为 307.296, 表明 VCR 耐药株 SKOV3/VCR 细胞构建成功。

2.2 耐药前后相关蛋白表达的变化

与亲代 SKOV3 细胞相比, 耐药株 SKOV3/VCR 细胞中 Wnt5a、MDR1、 β -catenin 和 Survivin 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$) (图 2); 同时 Akt 和 GSK3 β 蛋白的磷酸化水平也明显升高 ($P < 0.05$) (图 3)。这提示 SKOV3 细胞耐药性的产生可能与 Wnt5a 蛋白高表达以及 Akt/GSK3 β 信号通路活化有关。

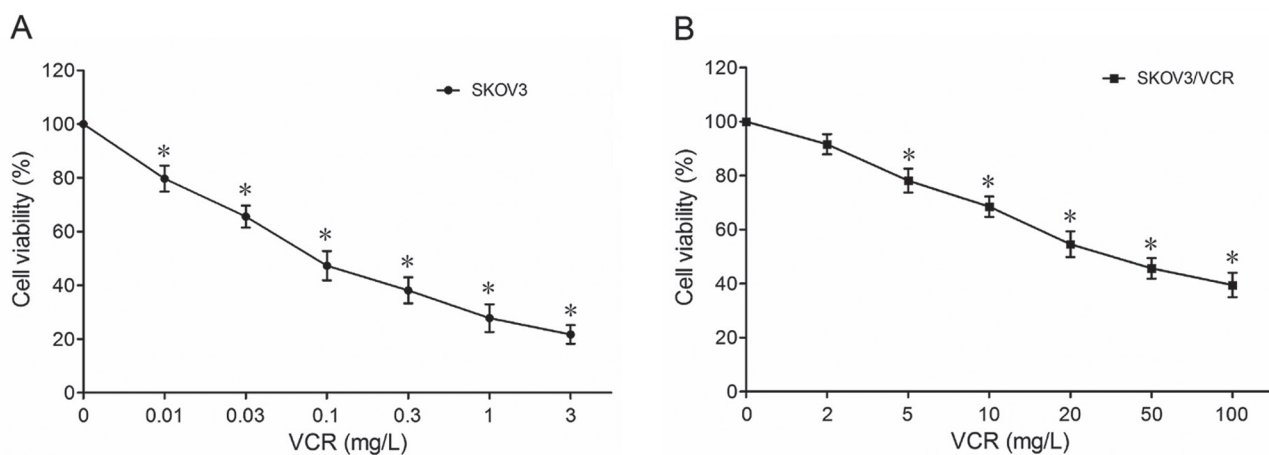


图 1. 耐药前后VCR对SKOV3细胞活力的影响

Fig. 1. Effect of vincristine (VCR) on cell viability of SKOV3 cells before and after VCR resistance detected by CCK-8 method. *A*: SKOV3 cells; *B*: SKOV3/VCR cells. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs 0 mg/L group.

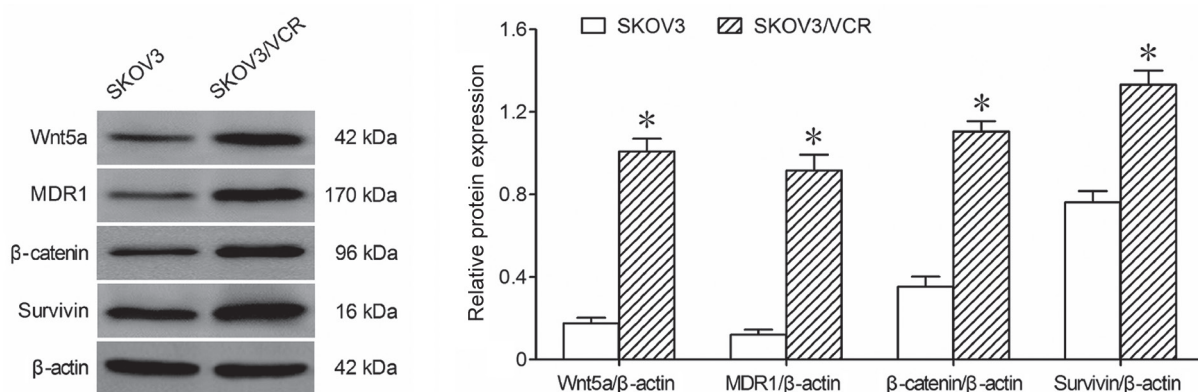


图 2. VCR耐药前后SKOV3细胞中Wnt5a、MDR1、β-catenin和Survivin蛋白表达水平的变化

Fig. 2. Changes in protein expression levels of Wnt5a, MDR1, β-catenin and Survivin before and after vincristine (VCR) resistance in SKOV3 cells detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs SKOV3 group.

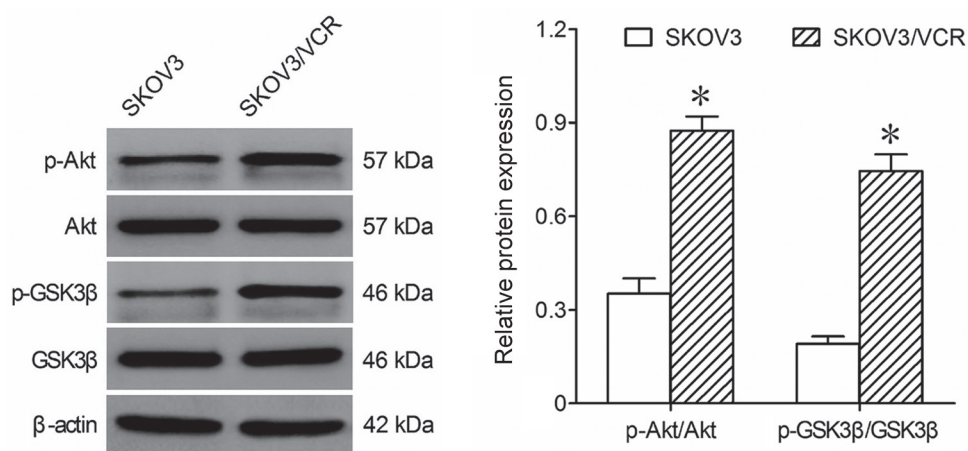


图 3. VCR耐药前后SKOV3细胞中Akt和GSK3β蛋白磷酸化水平的变化

Fig. 3. Changes in phosphorylation levels of Akt and GSK3β before and after vincristine (VCR) resistance in SKOV3 cells detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs SKOV3 group.

2.3 转染前后SKOV3/VCR细胞中WNT5A基因表达的变化

与未经转染的 SKOV3/VCR 细胞相比, shControl 组 SKOV3/VCR 细胞中 Wnt5a 的 mRNA 和蛋白表达水平无明显变化 ($P > 0.05$), 但 shWnt5a 组 SKOV3/VCR 细胞中 Wnt5a 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 4)。这表明特异性 shRNA 可

显著抑制 WNT5A 基因表达。

2.4 沉默WNT5A基因对SKOV3/VCR细胞耐药性的影响

CCK-8 法检测结果显示, 与 0 mg/L VCR 组相比, 经不同剂量 VCR 处理 48 h 后的 shControl 细胞和 shWnt5a 细胞活力均明显下降 ($P < 0.05$), 且随着 VCR 剂量的增加呈下降趋势, 其 IC_{50} 分别为 40.516

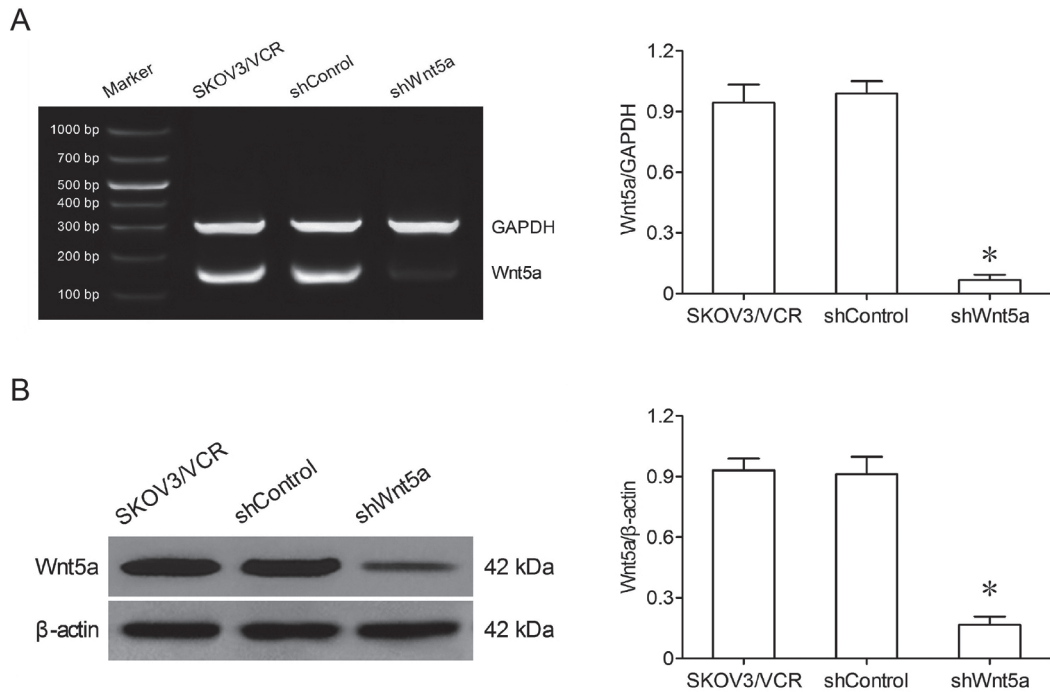


图 4. 特异性shRNA下调SKOV3/VCR细胞中WNT5A基因表达水平

Fig. 4. Specific shRNA down-regulates the expression of WNT5A gene in SKOV3/VCR cells. A: RT-PCR result; B: Western blot result. Mean ± SD, n = 3. *P < 0.05 vs shControl group.

mg/L 和 9.283 mg/L; shcontrol 组细胞的耐药倍数为 324.128, 而 shWnt5a 组细胞的耐药倍数降至 75.264, 逆转倍数为 4.307 (图 5)。这提示沉默 WNT5A 基因可提高耐药株 SKOV3/VCR 细胞对 VCR 的敏感性。

2.5 WNT5A基因沉默前后VCR对SKOV3/VCR细胞增殖的影响

流式细胞术检测结果显示, 与 shControl 组相比, shWnt5a 组、shControl+VCR 组和 shWnt5a+VCR 组细胞的 EdU 阳性率均显著降低 ($P < 0.05$); 采用协方差分析排除重组质粒对增殖的影响后, shWnt5a+VCR 组细胞的 EdU 阳性率显著低于 shControl+VCR 组 ($P < 0.05$), 见图 6。这表明沉默 WNT5A 基因可抑制 SKOV3/VCR 细胞增殖, 还可增强 VCR 对 SKOV3/VCR 细胞增殖的抑制作用。

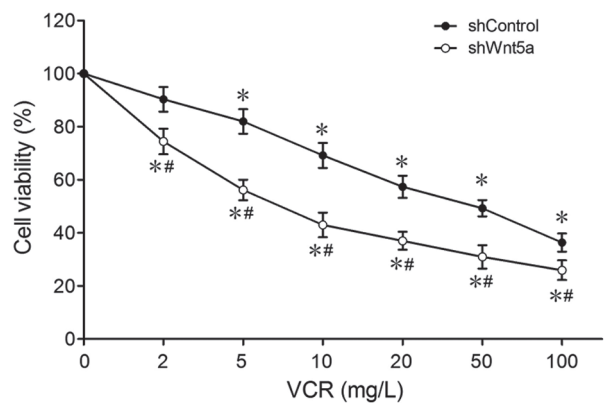


图 5. 沉默WNT5A基因对SKOV3/VCR细胞耐药性的影响

Fig. 5. Effect of silencing WNT5A gene on the drug resistance of SKOV3/VCR cells detected by CCK-8 method. Mean ± SD, n = 3. *P < 0.05 vs 0 mg/L group; #P < 0.05 vs shControl group under the same concentration of VCR.

2.6 *WNT5A*基因沉默前后VCR对SKOV3/VCR细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,与 shControl 组相比, shWnt5a 组、shControl+VCR 组和 shWnt5a+VCR 组

细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$); 此外, 采用协方差分析排除重组质粒对细胞凋亡的影响后, shWnt5a+VCR 组细胞凋亡率仍显著高于 shControl+VCR 组 ($P < 0.05$)(图 7)。这表明抑制 *WNT5A* 基因

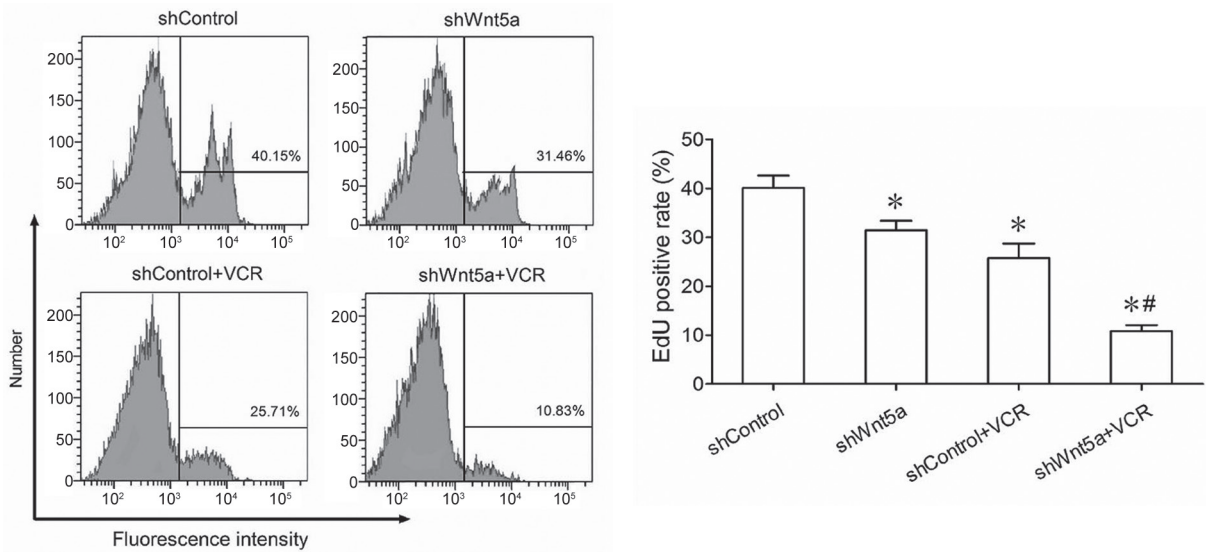


图 6. 沉默 *WNT5A* 基因增强 VCR 对 SKOV3/VCR 细胞增殖的抑制作用

Fig. 6. Silencing *WNT5A* gene enhances the inhibitory effect of VCR on proliferation of SKOV3/VCR cells. The cellular proliferation was detected by EdU staining. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs shControl group; # $P < 0.05$ vs shControl+VCR group after adjusting for EdU positive rate caused by interfering plasmid.

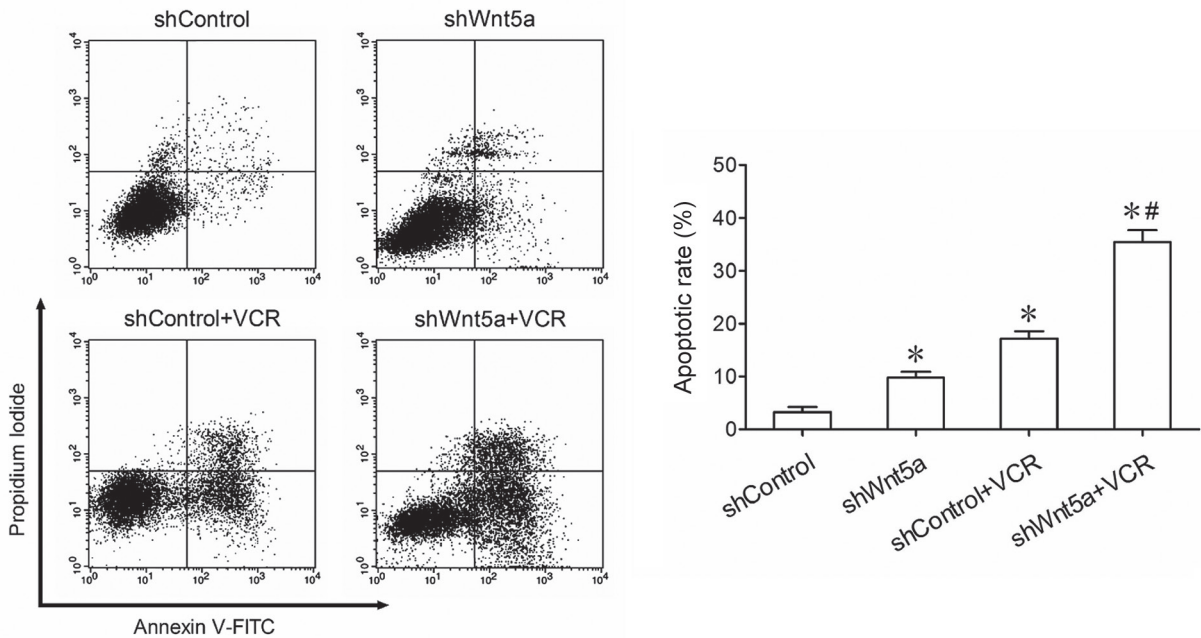


图 7. 沉默 *WNT5A* 基因增强 VCR 诱导的 SKOV3/VCR 细胞凋亡

Fig. 7. Silencing *Wnt5a* enhances VCR-induced apoptosis in SKOV3/VCR cells. The cellular apoptosis was detected by Annexin V/PI staining. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs shControl group; # $P < 0.05$ vs shControl+VCR group after adjusting for apoptosis caused by interfering plasmid.

表达可诱导 SKOV3/VCR 细胞凋亡, 还可增强 VCR 诱导的 SKOV3/VCR 细胞凋亡。

2.7 沉默WNT5A基因对耐药相关蛋白表达的影响

与 shControl 组相比, shWnt5a 组和 shControl+

LY 组 (LY294002 终浓度为 10 μmol/L) 细胞中的 MDR1、β-catenin 和 Survivin 蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.05$), 此外 shWnt5a 组细胞中 Wnt5a 蛋白表达水平也显著下调 ($P < 0.05$), 但 shControl+LY

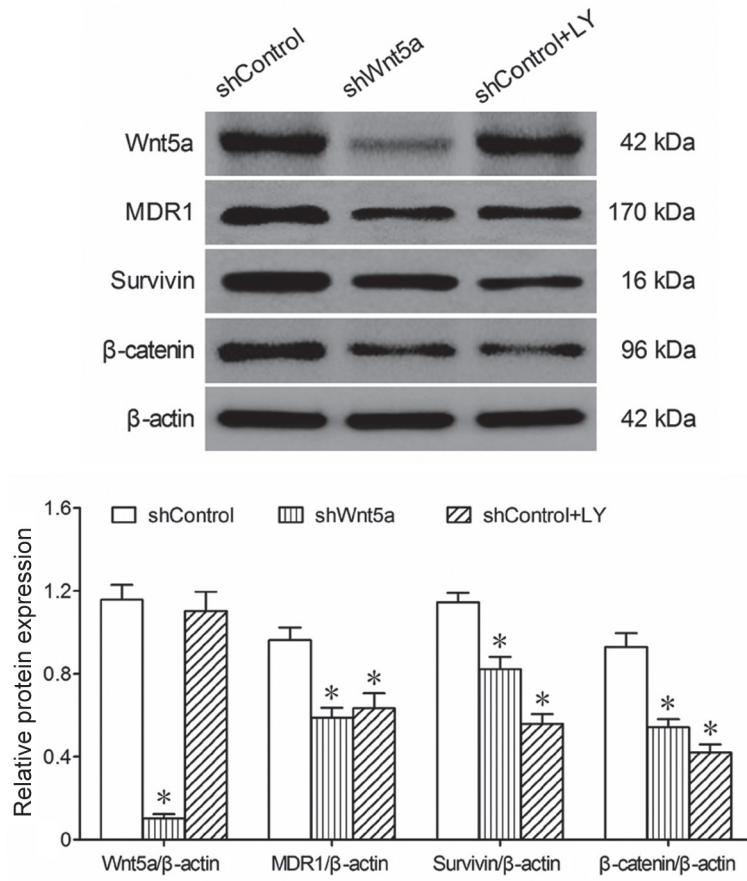


图 8. 沉默WNT5A基因对SKOV3/VCR细胞中Wnt5a、MDR1、β-catenin和Survivin蛋白表达水平的影响

Fig. 8. Effect of silencing WNT5A gene on protein expression levels of Wnt5a, MDR1, β-catenin and Survivin in SKOV3/VCR cells detected by Western blot. LY: LY294002. Mean ± SD, n = 3. *P < 0.05 vs shControl group.

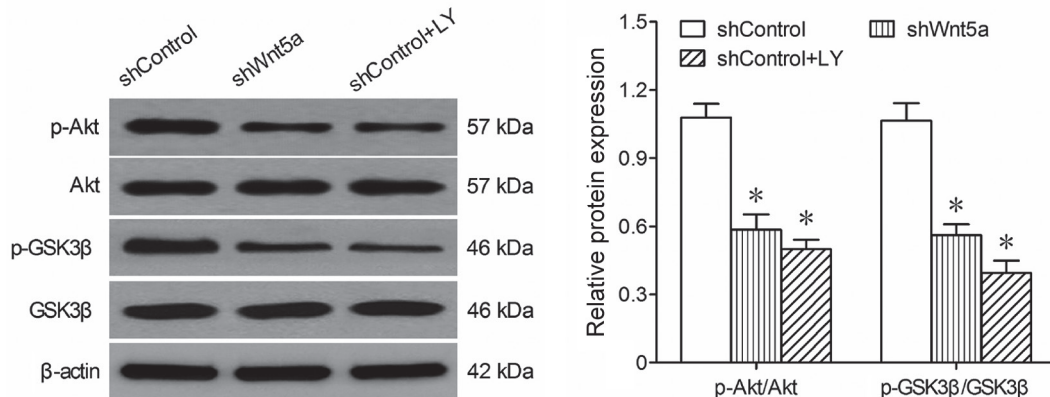


图 9. 沉默WNT5A基因对SKOV3/VCR细胞中Akt和GSK3β蛋白磷酸化水平的影响

Fig. 9. Effect of silencing WNT5A gene on phosphorylation of Akt and GSK3β in SKOV3/VCR cells detected by Western blot. LY: LY294002. Mean ± SD, n = 3. *P < 0.05 vs shControl group.

组细胞中的 Wnt5a 蛋白表达水平未发生明显变化 ($P > 0.05$) (图 8); 同时, Akt 和 GSK3 β 蛋白的磷酸化水平也明显降低 ($P < 0.05$) (图 9)。这提示 Akt/GSK3 β 通路位于 Wnt5a 的下游, Wnt5a 可能通过 PI3K/Akt/GSK3 β 通路调控 MDR1、 β -catenin 和 Survivin 蛋白的表达。

3 讨论

本研究结果显示, 与耐药性相关的 Wnt5a、MDR1、 β -catenin、Survivin、p-Akt 和 p-GSK3 β 蛋白在人卵巢癌耐药株 SKOV3/VCR 细胞中呈现高表达。沉默 *WNT5A* 基因后, VCR 抑制 SKOV3/VCR 细胞活力的 IC₅₀ 下降至 9.283 mg/L, 逆转倍数为 4.307, 并且 VCR 诱导的细胞凋亡也显著增多。以上结果表明, 抑制 *WNT5A* 基因表达可逆转 SKOV3/VCR 细胞的 VCR 耐药性。

MDR1 基因过表达是肿瘤细胞产生多药耐药的重要机制之一。MDR1 基因的表达产物是一种分子量为 170 kDa 的跨膜糖蛋白。MDR1 蛋白通过水解 ATP 获取能量, 将进入肿瘤细胞的化学治疗药物转运至细胞外, 从而使肿瘤细胞产生多药耐药^[11]。大量研究证实, 通过抑制 MDR1 蛋白表达可增强肿瘤细胞对 VCR 的敏感性, 如卵巢癌、骨肉瘤、乳腺癌、纤维癌和口腔癌等^[12–16]。Odening 等^[17] 研究证实, MDR1 过表达可使人卵巢癌 SKOV3 细胞对 VCR 产生耐药性。本研究结果显示, 沉默 *WNT5A* 基因可显著下调 SKOV3/VCR 细胞中 MDR1 蛋白表达水平。

诱导恶性肿瘤细胞凋亡是化学治疗药物发挥杀伤作用的重要机制之一, 而抗凋亡蛋白 Survivin 可通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 蛋白活性降低化学治疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用^[18,19]。Tsubaki 等^[19] 研究发现, 抑制 Survivin 表达可逆转人骨髓瘤耐药株 RPMI8226/VCR 细胞耐药性。Salzano 等^[20] 研究证实, 采用 siRNA 干扰 *Survivin* 基因表达可增强耐药株 SKOV3/PXL 细胞对紫杉醇的敏感性。本研究结果显示, 当采用 shRNA 技术使 *WNT5A* 基因表达下调后, SKOV3/VCR 细胞中 Survivin 蛋白表达水平显著降低, 同时 SKOV3/VCR 细胞凋亡率也明显升高。这提示 Wnt5a 可通过促进 Survivin 蛋白表达增强 SKOV3/VCR 细胞的抗凋亡能力, 以降低其对 VCR 的敏感性。

多项研究证实, MDR1 和 Survivin 是受 β -catenin 调控的下游靶基因^[21,22]。在正常情况下, 胞浆中的

β -catenin 与轴蛋白、结肠腺瘤性息肉病 (adenomatous polyposis coli, APC) 蛋白、酪蛋白激酶 1 (casein kinase 1, CK1) 以及 GSK3 β 形成复合物, β -catenin 被该复合物磷酸化后会经泛素蛋白酶体途径降解。活化的 Akt 可将 GSK3 β 蛋白 N 端的第 9 位丝氨酸磷酸化而使其失活, 致使 β -catenin 在胞浆中累积并进入细胞核, 促进 MDR1 和 Survivin 等靶基因的表达^[23,24]。Zhang 等^[25] 研究发现, 抑制 β -catenin 表达可下调 MDR1、多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)、乳癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 和 Bcl-2 蛋白表达水平, 从而逆转人大肠癌耐药株 HCT-8/VCR 细胞的耐药性。

本研究结果进一步显示, 沉默 *WNT5A* 基因可下调 SKOV3/VCR 细胞中 β -catenin 蛋白的表达水平, 抑制 Akt 活化, 以及降低 GSK3 β 在 Ser9 处的磷酸化水平。同时, 本研究使用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 处理 SKOV3/VCR 细胞后, MDR1、 β -catenin 和 Survivin 蛋白表达水平以及 Akt 和 GSK3 β 蛋白的磷酸化水平均显著降低, 这与沉默 *WNT5A* 基因产生的上述效果相似。这提示 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 信号通路可能介导了 Wnt5a 对 MDR1 和 Survivin 蛋白表达的调控。

综上所述, 沉默 *WNT5A* 基因可在体外增强人卵巢癌耐药株 SKOV3/VCR 细胞对 VCR 的敏感性, 这可能与抑制 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 通路, 继而下调 MDR1 和 Survivin 蛋白表达有关。本研究将为解决 VCR 治疗卵巢癌过程中产生的耐药性问题提供新的理论依据。

参考文献

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87–108.
- 2 Marchetti C, Romito A, Musella A, Santo G, Palaia I, Perniola G, Di Donato V, Muzii L, Benedetti Panici P. Combined plasma fibrinogen and neutrophil lymphocyte ratio in ovarian cancer prognosis may play a role? *Int J Gynecol Cancer* 2018; 28(5): 939–944.
- 3 Shen J, Zhu X, Fei J, Shi P, Yu S, Zhou J. Advances of exosome in the development of ovarian cancer and its diagnostic and therapeutic prospect. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 2831–2841.
- 4 Lindemann K, Gao B, Mapagu C, Fereday S, Emmanuel C, Alsop K, Traficante N, Harnett PR, Bowtell DDL, deFazio A.

- Response rates to second-line platinum-based therapy in ovarian cancer patients challenge the clinical definition of platinum resistance. *Gynecol Oncol* 2018; 150(2): 239–246.
- 5 Terenziani M, Massimino M, Casanova M, Cefalo G, Ferrari A, Luksch R, Spreafico F, Polastri D, Fontanelli R, Piva L, Fossati-Bellani F. Childhood malignant ovarian germ cell tumors: a monoinstitutional experience. *Gynecol Oncol* 2001; 81(3): 436–440.
 - 6 Liang B, Liu X, Liu Y, Kong D, Liu X, Zhong R, Ma S. Inhibition of autophagy sensitizes MDR-phenotype ovarian cancer SKVCR cells to chemotherapy. *Biomed Pharmacother* 2016; 82: 98–105.
 - 7 Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13(7): 513–532.
 - 8 Hosseini-Farahabadi S, Gignac SJ, Danescu A, Fu K, Richman JM. Abnormal WNT5A signaling causes mandibular hypoplasia in robinow syndrome. *J Dent Res* 2017; 96(11): 1265–1272.
 - 9 Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long GV, von Euw EM, Yang PT, Chen HW, Haydu L, Toroni RA, Lucero OM, Chien AJ, Moon RT. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest* 2014; 124(7): 2877–2890.
 - 10 Hung TH, Hsu SC, Cheng CY, Choo KB, Tseng CP, Chen TC, Lan YW, Huang TT, Lai HC, Chen CM, Chong KY. Wnt5A regulates ABCB1 expression in multidrug-resistant cancer cells through activation of the non-canonical PKA/ β -catenin pathway. *Oncotarget* 2014; 5(23): 12273–12290.
 - 11 Chufan EE, Sim HM, Ambudkar SV. Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies. *Adv Cancer Res* 2015; 125: 71–96.
 - 12 Koh I, Hinoi T, Sentani K, Hirata E, Nosaka S, Niitsu H, Miguchi M, Adachi T, Yasui W, Ohdan H, Kudo Y. Regulation of multidrug resistance 1 expression by CDX2 in ovarian mucinous adenocarcinoma. *Cancer Med* 2016; 5(7): 1546–1555.
 - 13 Ye S, Zhang J, Shen J, Gao Y, Li Y, Choy E, Cote G, Harmon D, Mankin H, Gray NS, Hornicek FJ, Duan Z. NVP-TAE684 reverses multidrug resistance (MDR) in human osteosarcoma by inhibiting P-glycoprotein (PGP1) function. *Br J Pharmacol* 2016; 173(3): 613–626.
 - 14 Yan CS, Wong IL, Chan KF, Kan JW, Chong TC, Law MC, Zhao Y, Chan SW, Chan TH, Chow LM. A new class of safe, potent, and specific P-gp modulator: Flavonoid dimer FD18 reverses P-gp-mediated multidrug resistance in human breast xenograft *in vivo*. *Mol Pharm* 2015; 12(10): 3507–3517.
 - 15 Cheon JH, Kim KS, Yadav DK, Kim M, Kim HS, Yoon S. The JAK2 inhibitors CEP-33779 and NVP-BSK805 have high P-gp inhibitory activity and sensitize drug-resistant cancer cells to vincristine. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490(4): 1176–1182.
 - 16 Liu Z, Zhu H, Qu S, Tang L, Cao L, Yu W, Yang X, Jiang S, Zhu D, Tan C, Yu L. Pyrimidatone (Z88) sensitizes vincristine-resistant human oral cancer (KB/VCR) cells to chemotherapeutic agents by inhibition of p-glycoprotein. *Anticancer Agents Med Chem* 2018; 18(2): 286–294.
 - 17 Odening KE, Li W, Rutz R, Laufs S, Fruehauf S, Fishelson Z, Kirschfink M. Enhanced complement resistance in drug-selected P-glycoprotein expressing multi-drug-resistant ovarian carcinoma cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 155(2): 239–248.
 - 18 Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality? *Cancer Treat Rev* 2013; 39(7): 802–811.
 - 19 Tsubaki M, Takeda T, Ogawa N, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Ishizaka T, Satou T, Nishida S. Overexpression of survivin via activation of ERK1/2, Akt, and NF- κ B plays a central role in vincristine resistance in multiple myeloma cells. *Leuk Res* 2015; 39(4): 445–452.
 - 20 Salzano G, Navarro G, Trivedi MS, De Rosa G, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles co-loaded with anti-Survivin siRNA and paclitaxel overcome drug resistance in an animal model of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(4): 1075–1084.
 - 21 Xia Z, Guo M, Liu H, Jiang L, Li Q, Peng J, Li JD, Shan B, Feng P, Ma H. CBP-dependent Wnt/ β -catenin signaling is crucial in regulation of MDR1 transcription. *Curr Cancer Drug Targets* 2015; 15(6): 519–532.
 - 22 Darshit BS, Ramanathan M. Activation of AKT1/GSK-3 β / β -Catenin-TRIM11/Survivin pathway by novel GSK-3 β inhibitor promotes neuron cell survival: Study in differentiated SH-SY5Y cells in OGD model. *Mol Neurobiol* 2016; 53(10): 6716–6729.
 - 23 Zhang K, Song H, Yang P, Dai X, Li Y, Wang L, Du J, Pan K, Zhang T. Silencing dishevelled-1 sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells via AKT/GSK-3 β / β -catenin signalling. *Cell Prolif* 2015; 48(2): 249–258.
 - 24 Oh S, Kim H, Nam K, Shin I. Silencing of Glut1 induces chemoresistance via modulation of Akt/GSK-3 β / β -catenin/survivin signaling pathway in breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 2017; 636: 110–122.
 - 25 Zhang K, Li M, Huang H, Li L, Yang J, Feng L, Gou J, Jiang M, Peng L, Chen L, Li T, Yang P, Yang Y, Wang Y, Peng Q, Dai X, Zhang T. Dishevelled1-3 contribute to multidrug resistance in colorectal cancer via activating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* 2017; 8(70): 115803–115816.