

# 基因芯片筛选CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞中新的耐药基因

王红艳 郑少秋 涂永生 张雅洁

**【摘要】**背景与目的 肿瘤干细胞可能是肿瘤多药耐药的主要原因, CD133是目前较为公认的肿瘤干细胞标记物。本研究旨在应用功能分类基因芯片筛选CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞中差异表达的肿瘤耐药基因, 寻求新的肺癌耐药相关基因。方法 免疫磁珠分选法分选A549细胞, 采用功能分类基因芯片筛选CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞中差异表达的肿瘤耐药基因, 并使用RT-qPCR验证。顺铂半数有效抑制浓度(half inhibiting concentration, IC<sub>50</sub>)、阿霉素IC<sub>50</sub>作用A549细胞48 h后, RT-qPCR检测肿瘤耐药基因CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta/\delta$ 的表达变化。结果 共筛选出31个差异表达的肿瘤耐药基因, 与CD133<sup>-</sup>细胞相比, CD133<sup>+</sup>细胞有30个基因表达上调, 1个基因表达下调。RT-qPCR结果与芯片一致。A549细胞经1.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂或0.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿霉素作用48 h后, CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta/\delta$ 等肿瘤耐药基因表达上调。结论 利用功能分类基因芯片筛选出31个可能与CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞耐药相关的基因, 其中CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta/\delta$ 为新发现的肺癌耐药相关基因。

**【关键词】** CD133; 肺肿瘤; 耐药; 肿瘤耐药基因芯片

## Screening and Identification of Novel Drug-resistant Genes in CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> Lung Adenosarcoma Cells Using cDNA Microarray

Hongyan WANG<sup>1</sup>, Shaoqiu ZHENG<sup>1</sup>, Yongsheng TU<sup>2</sup>, Yajie ZHANG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China;

<sup>2</sup>Department of Physiology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China

Corresponding author: Yajie ZHANG, E-mail: yajie.zhang@163.com

**【Abstract】** Background and objective Cancer stem cells (CSCs) are responsible for multi-drug resistance in tumors. CD133 is a known biomarker of CSCs. The aim of this study is to screen for drug-resistant differentially expressed genes in CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> lung cancer cells and to identify novel lung tumor drug-resistant genes. **Methods** Magnetic activated cell sorting was used to isolate CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells from human lung cancer cell line A549, and drug-resistant microarray was used to detect drug-resistant genes in the these cells. RT-qPCR was used to examine the expression of six lung tumor drug-resistant genes in pre- and post-chemotherapeutic A549 cells. **Results** A total of 31 differentially expressed genes were screened by microarray analysis. Of these genes, 30 were upregulated and one was downregulated in CD133<sup>+</sup> cells compared with CD133<sup>-</sup> cells. Results were verified by RT-qPCR. CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, GSK3 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and PPAR $\beta/\delta$  were significantly upregulated after the A549 cells were treated with 1.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DDP or 0.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doxorubicin for 48 h. **Conclusion** The drug resistance of lung adenosarcoma may be correlated with 31 differentially expressed genes screened by drug-resistant microarray. CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, GSK3 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and PPAR $\beta/\delta$  might be novel lung adenosarcoma drug-resistant genes.

**【Key words】** CD133; Lung neoplasms; Multi-drug resistant; Drug-resistant microarray

This study was supported partly by the grants from Doctoral Fund of Ministry of Education of China (to Yajie ZHANG)(No.20134423110001), Guangdong Province Natural Science Foundation(to Yajie ZHANG)(No.S2012010010181), Science and Technology Program of Guangzhou (to Yajie ZHANG)(No.2014Y2-00171), Guangzhou Municipal Education Department Innovation team grant (to Yajie ZHANG)(No.13C06), and Guangzhou City-belonged Universities Scientific Research Program (to Hongyan WANG)(No.2012C135).

本研究受教育部博士点基金(No.20134423110001)、广东省自然科学基金(No.S2012010010181)、广州市科技计划项目(No.2014Y2-00171)、广州市教育系统创新学术团队项目(No.13C06)和广州市属高校科研项目(No.2012C135)资助

作者单位: 510182 广州, 广州医科大学病理教研室(王红艳, 郑少秋, 张雅洁); 生理教研室(涂永生)(通讯作者: 张雅洁, E-mail: yajie.zhang@163.com)

肺癌是人类发病率和死亡率均居首位的恶性肿瘤。化学药物治疗是主要的治疗手段之一,但肿瘤细胞的耐药性却严重影响了抗肿瘤药物的治疗效果。肺癌细胞的耐药是多基因异常表达共同作用的结果,如P-糖蛋白(P-glycoprotein, *P-gp*)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance protein, *MRP*)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, *BCRP*)和肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, *LRP*)等基因的过表达,拓扑异构酶II、谷胱甘肽-S-转移酶和蛋白激酶C的改变,另外,促进DNA修复和抑制细胞凋亡的基因表达改变以及某些癌基因的活化也可导致多药耐药<sup>[1]</sup>。但是有些肺癌耐药现象并不能用已知的耐药基因的表达来解释,还需要发现新的耐药相关基因。目前,国内外研究进行肿瘤耐药基因的筛选多利用生物芯片、差异显示PCR和抑制消减杂交等技术对肿瘤亲本细胞株和耐药细胞株的基因表达谱进行测定,寻找差异表达基因。肿瘤干细胞的发现使人们对肿瘤耐药的机制又有了许多新的认识,基于肿瘤干细胞理论对肺癌耐药的研究成了当今的热点。本研究以肿瘤干细胞分子标记CD133作为标志物,利用功能分类基因芯片技术对免疫磁珠分选后未经培养的CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>肺癌细胞的肿瘤耐药基因进行检测,筛选出差异表达基因,结合国内外文献,寻求新的肺癌耐药相关基因,为肺癌耐药的研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** A549细胞培养在含10%新生牛血清的1640完全培养基(美国Gibco公司)中,放置在5%CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度培养箱中培养。

**1.2 CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>肺癌细胞的分离** 收集对数生长期的A549细胞5×10<sup>7</sup>个,离心后重悬于300 μL缓冲液(2%胎牛血清、2 mmol/L EDTA、0.01% PBS),再依次加入100 μL FCR阻断剂及100 μL CD133磁性微珠(德国Miltenyi Biotec公司),充分混悬后4℃暗处孵育30 min,续加缓冲液洗涤、离心、重悬。将细胞悬液移入已经安装在磁性分选架的MS阳性分选柱中,待细胞悬液流出,加入2倍体积的缓冲液洗涤分选柱(洗脱下来的含CD133<sup>+</sup>细胞)。待洗涤缓冲液流出后加入500 μL缓冲液,装上分选柱配套的柱芯,快速推柱芯,收集流出液为CD133<sup>+</sup>细胞。取LD阴性分选柱安装在磁性分选架上,将MS分选过程收集的流出液加入LD分选柱中,续用缓冲液洗涤,收集流出液为CD133<sup>-</sup>细胞。

**1.3 CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>肺癌细胞差异基因的基因芯片筛选**

MS柱分选获得CD133<sup>+</sup>细胞及LD柱分选获得CD133<sup>-</sup>细胞,不经培养,直接离心沉淀细胞,每5×10<sup>6</sup>-10×10<sup>6</sup>细胞加入1 mL TRIzol试剂(Invitrogen公司)。提取的RNA用RNeasy<sup>®</sup> MinElute<sup>™</sup>纯化试剂盒(Qiagen公司)纯化。用核酸定量仪检测纯化后的RNA的浓度及纯度并进行琼脂糖凝胶电泳。cDNA合成按RT-PCR Array First Strand Kit(美国SABiosciences公司)的说明书完成。合成后的cDNA加入SuperArray功能基因芯片RT2 Profiler<sup>™</sup> PCR Array Human Cancer Drug Resistance & Metabolism (PAHS-004A, 美国SABiosciences公司)中,经荧光定量PCR仪扩增。数据分析采用ΔΔCt方法。首先计算每个处理组中的每个耐药基因的ΔCt。ΔCt=平均值Ct-管家基因平均值Ct。然后计算2个PCR Array(或两组)中每个耐药基因的ΔΔCt。ΔΔCt=ΔCt(CD133<sup>+</sup>细胞组)-ΔCt(CD133<sup>-</sup>细胞组)。最后通过2<sup>-ΔΔCt</sup>计算CD133<sup>+</sup>细胞组与CD133<sup>-</sup>细胞组对应基因的表达差异。筛选出2<sup>-ΔΔCt</sup>≥2.0或≤0.5的基因作为差异表达基因。

**1.4 RT-qPCR验证芯片中部分差异基因表达** 随机选取基因芯片中耐药差异基因MET、IGF2R、RARG、PPARβ/δ进行RT-qPCR分析。同时检测筛选出的新的肺癌耐药相关基因CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3α和PPARα等的表达水平。根据RT-qPCR引物设计原则,利用Primer Premier5.0进行引物设计。各差异基因和内参照GAPDH引物均由TAKARA公司合成,具体见表1。收集分选后培养的CD133<sup>+</sup>细胞及CD133<sup>-</sup>细胞,提取RNA,方法同1.3.1。cDNA合成按TAKARA公司PrimeScript RT Reagent kit说明书完成。RT-qPCR按照Roche公司RT-qPCR试剂盒说明书,于冰上配制反应体系:FastStart Universal SYGreen Master (ROX) 12.5 μL, Forward primer (10 μM) 0.75 μL, Reverse primer (10 μM) 0.75 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 10 μL。反应条件:50℃ 2 min, 95℃预变性2 min, 循环参数:95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 共循环40次。每个样品设2个复孔,按上述条件置RT-qPCR仪上进行扩增反应,实验重复3次。采用ΔΔCt法进行相对定量分析,结果由ABI7500软件自动生成。

**1.5 A549细胞针对顺铂(cisplatin, DDP)和阿霉素的IC50浓度确立** 将A549细胞密度调整至5×10<sup>4</sup>个/mL,接种入96孔细胞培养板中,100 μL/孔,培养24 h后轻轻吸掉培养液,加入经RPMI1640培养液系列稀释的DDP或阿霉素(齐鲁制药有限公司),200 μL/孔,DDP终浓度分别为0.156 μg/mL、0.3125 μg/mL、0.625 μg/mL、1.25 μg/mL、2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL,阿霉素终浓度分别为0.0625 μg/mL、0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、

表 1 RT-qPCR中各差异表达的耐药基因和内参基因GAPDH的引物序列

Tab 1 Primers for qPCR amplification

Gene	Sense strand (5' to 3')	Antisense strand (5' to 3')
<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
<i>MET</i>	CTCCCATCCAGTGTCTCCAGAAG	TGCAGCCCAAGCCATTCA
<i>IGF2R</i>	CCGCTAAACAGTTCGCAAGGA	CAGTTTGGGTTTCTGCCTCACA
<i>RARG</i>	CCAGCCCTACATGTTCCCAAG	CATCTCAAACATTTAGGGTTCTC
<i>PPARβ/δ</i>	CTACGGTGTTCATGCATGTGAGG	GCACTTCTGGAAGCGGCAGTA
<i>CYP2C19</i>	GGAAAACGGATTGTGTGGGA	GGTCCTTTGGGTCAATCAGAGA
<i>CYP2D6</i>	ACCAGGCTCATGCCCTA	TTCGATGTCACGGGATGTCAT
<i>CYP2E1</i>	ATGTCTGCCCTCGGAGTCA	CGATGATGGGAAGCGGGAAA
<i>GSK3α</i>	GGAAAGGCATCTGTCGGGG	GAGTGCTACGACTGTGGTC
<i>PPARα</i>	ATGGTGGACACGGAAAGCC	CGATGGATTGCGAAATCTCTTGG

4 μg/mL, 对照组不加药。各组设3个复孔, 48 h后用CCK-8比色法检测细胞存活情况, 测定波长为450 nm处各孔的吸光度 (optical density, OD) 值, 按以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率 = (OD药物组/OD对照组) × 100%。实验重复3次。通过线性拟合法计算出药物的半数有效抑制浓度 (half inhibiting concentration, IC<sub>50</sub>)。

**1.6 RT-qPCR检测肺癌耐药差异基因mRNA表达** 收集A549细胞和DDP IC<sub>50</sub>和阿霉素IC<sub>50</sub>处理48 h后的A549细胞, 抽提总RNA, cDNA合成, qPCR方法和相对定量分析同1.4。

## 2 结果

**2.1 功能分类基因芯片结果** 与CD133<sup>+</sup>细胞相比, CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞在84个检测的耐药基因中表达差异达两倍或以上的有31个, 占36% (31/84), 其中30个基因表达上调, 1个基因表达下调, 表达差异最为明显的基因是RARG与ESR2, 它们的表达水平分别上调或下调了8.93倍和2.52倍 (表2)。这31个差异表达基因中, 未被文献报道过的与肺癌耐药相关的基因有CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3α、PPARα和PPARβ/δ。

**2.2 功能分类基因芯片中部分差异表达基因的验证** 应用RT-qPCR检测了随机选取的RARG、PPARβ/δ、IGF2R、MET等四个差异基因和新发现的CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3α和PPARα等肺癌耐药基因在CD133<sup>+</sup>细胞与CD133<sup>-</sup>细胞中的表达, 结果见图1。与CD133<sup>-</sup>细胞比较, CD133<sup>+</sup>细胞RARG、PPARβ/δ、IGF2R、MET、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3α、PPARα等基因mRNA的表达均上调。该结果与功能分类基因芯片的检测结果一致。

**2.3 A549细胞针对DDP和阿霉素的IC<sub>50</sub>浓度确立** 不同浓度的DDP和阿霉素对A549细胞的增殖有明显的抑制作用, 通过线性拟合法计算A549细胞的DDP IC<sub>50</sub>为1.97 μg/mL, 阿霉素IC<sub>50</sub>为0.61 μg/mL (表3)。

**2.4 RT-qPCR对部分肺癌耐药相关基因的检测结果** A549细胞经DDP IC<sub>50</sub>和阿霉素IC<sub>50</sub>分别作用48 h后, CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3α、PPARα和PPARβ/δ等耐药相关基因表达均不同程度地上调 (图2)。

## 3 讨论

CD133是目前使用较广泛的肿瘤干细胞标记物。研究发现, CD133<sup>+</sup>肺癌细胞具有干细胞样的特性, 对化疗不敏感<sup>[2-5]</sup>。本研究以CD133作为标记物, 分离CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞, 并筛选出二者之间的肿瘤耐药差异表达基因, 为肺癌耐药的研究提供实验依据。

干细胞在体外培养过程中容易发生分化而失去干细胞的特性, 为了维持CD133<sup>+</sup>细胞的未分化状态, 我们将分选未经培养的CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞直接用于后续实验。研究采用美国SuperArray公司生产的第二代功能分类基因芯片 (RT2 Profiler™ 芯片), 该芯片包含目前研究已证实与人类肿瘤耐药相关的84个基因。结果显示: 在筛查的84个耐药基因中, 有31个基因表达差异达两倍或两倍以上。与CD133<sup>-</sup>细胞相比, CD133<sup>+</sup>细胞有30个基因表达升高, 1个基因表达降低。表达升高的基因按功能分类分别为: ①药物转运蛋白相关基因, 包括ABCC1、ABCC2、ABCC6、MVP; ②药物代谢酶类相关基因, 包括ARNT、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3α、TPMT; ③细胞增殖相关基因, 包括IGF2R、MET、PPARα、PPARβ/δ、RARG、

表 2 CD133<sup>+</sup>与CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞表达差异2倍以上的肿瘤耐药基因

Tab 2 Differentially expressed drug-resistant genes between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells

RefSeq	Gene symbol	Gene description	Chromosomal localization	Fold change
NM_000966	<i>RARG</i>	Retinoic acid receptor, gamma	12q13	+8.93
NM_000367	<i>TPMT</i>	Thiopurine S-methyltransferase	6p22.3	+7.39
NM_019884	<i>GSK3α</i>	Glycogen synthase kinase 3 alpha	19q13.2	+5.66
NM_001800	<i>CDKN2D</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	19p13	+5.17
NM_017458	<i>MVP</i>	Major vault protein	16p11.2	+4.16
NM_006509	<i>RELB</i>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	19q13.32	+4.04
NM_021976	<i>RXRβ</i>	Retinoid X receptor, beta	6p21.3	+3.59
NM_002503	<i>NFKB1B</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	19q13.1	+3.23
NM_005229	<i>ELK1</i>	ELK1, member of ETS oncogene family	Xp11.2	+3.17
NM_006238	<i>PPARβ/δ</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	6p21.2	+3.10
NM_000059	<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2, early onset	13q12.3	+2.98
NM_001171	<i>ABCC6</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	16p13.1	+2.91
NM_000769	<i>CYP2C19</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	10q24	+2.91
NM_000122	<i>ERCC3</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	2q21	+2.81
NM_000106	<i>CYP2D6</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	22q13.1	+2.71
NM_002467	<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	8q24.21	+2.62
NM_000876	<i>IGF2R</i>	Insulin-like growth factor 2 receptor	6q26	+2.54
NM_001437	<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2 (ER beta)	14q23.2	-2.52
NM_053056	<i>CCND1</i>	Cyclin D1	11q13	+2.45
NM_000546	<i>TP53</i>	Tumor protein p53	17p13.1	+2.43
NM_000038	<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	5q21-q22	+2.36
NM_000392	<i>ABCC2</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	10q24	+2.30
NM_000321	<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1	13q14.2	+2.27
NM_004324	<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein	19q13.3-q13.4	+2.21
NM_005036	<i>PPARα</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	22q13.31	+2.15
NM_004996	<i>ABCC1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	16p13.1	+2.14
NM_001668	<i>ARNT</i>	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	1q21	+2.14
NM_138579	<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1	20q11.21	+2.13
NM_000245	<i>MET</i>	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	7q31	+2.11
NM_000773	<i>CYP2E1</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	10q24.3-qter	+2.02
NM_003839	<i>TNFRSF11A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator	18q22.1	+2.01

If the fold change is positive, it means up-regulation. If the fold change is negative, it means down-regulation.

*RXRβ*; ④诱导凋亡相关基因, 包括*BAX*、*BCL-XL*、*RB1*、*TP53*; ⑤转录因子, 包括*ELK1*、*MYC*、*NF-κB1B*、*RELB*、*TNFRSF11A*; ⑥DNA修复相关基因, 包括*APC*、*BRCA2*、*ERCC3*; ⑦细胞周期调控基因, 包括*CDKN2D*、*CCND1*。表达降低的基因是抑制细胞增殖的*ESR2*基因。这31个差异表达基因中, 未被文献报道过的与肺癌耐药相关的

基因有*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP2E1*、*GSK3α*、*PPARα*和*PPARβ/δ*。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 属于血红蛋白超基因家族。作为重要的一相代谢酶, CYP450广泛参与人体内羟化、氧化、还原、水解等多种一相反应, 对外源性药物、致癌化合物以及内源性物质如类固醇进行

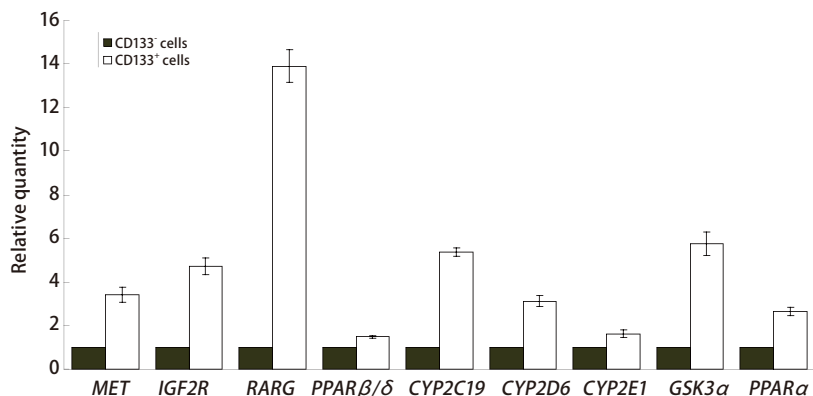


图 1 RT-qPCR验证部分差异表达基因在CD133<sup>+</sup>与CD133<sup>-</sup>细胞中的表达

Fig 1 Some drug-resistant genes expression between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells

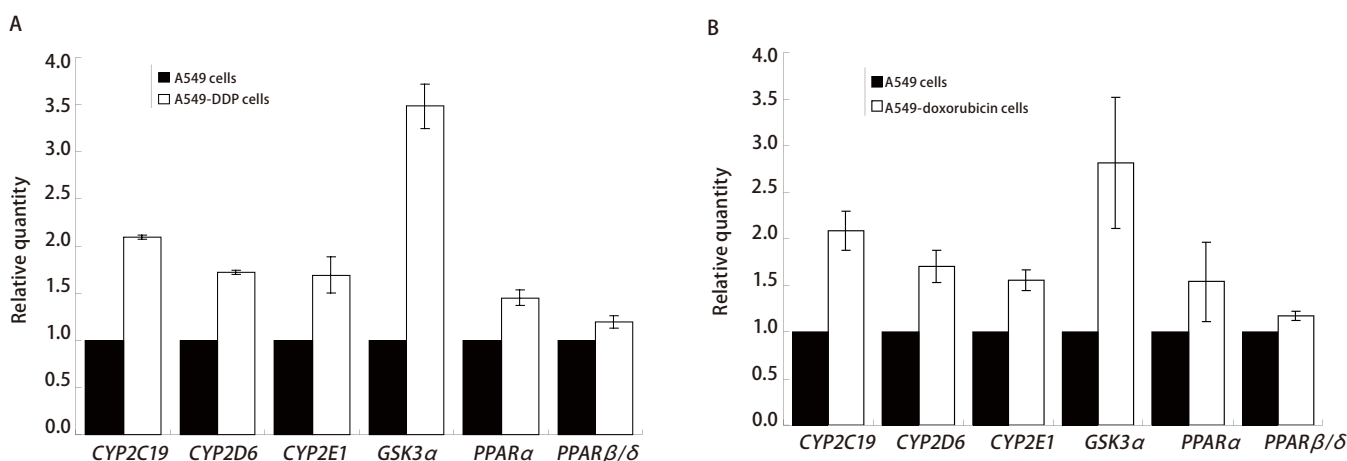


图 2 DDP IC<sub>50</sub> (A) 和阿霉素IC<sub>50</sub> (B) 作用前后A549细胞中肺癌耐药基因表达的变化。IC<sub>50</sub>:半数有效抑制浓度。

Fig 2 Drug-resistant genes expression levels of A549 cells in pre- and post-chemotherapy

表 3 不同浓度DDP和阿霉素对A549细胞的抑制率 (Mean±SD) (% , n=3)

Tab 3 The survival rate of DDP and Doxorubicin on A549 cells (Mean±SD)(%, n=3)

DDP		Doxorubicin	
Concentration (μg/mL)	Survival rate of cells	Concentration (μg/mL)	Survival rate of cells
Control	100	Control	100
0.156	95.50±2.06	0.062,5	96.40±2.52
0.312,5	88.60±2.09	0.125	87.56±2.71
0.625	80.25±1.98	0.25	79.20±2.91
1.25	66.01±1.29	0.5	53.97±3.30
2.5	40.32±3.15	1	34.86±4.33
5	24.70±1.54	2	21.3±2.06
10	11.17±1.63	4	7.06±3.02

代谢。研究<sup>[6]</sup>表明,部分CYP450在肿瘤组织中高表达且与肿瘤的多药耐药相关。如CYP3A4/5在骨肉瘤中的高表达预示着不良的药物治疗效果<sup>[7]</sup>。CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1在他莫西芬、吉非替尼、依托泊苷、长春新碱、沙

利度胺、伊马替尼、环磷酰胺等多种常用抗癌药物的代谢中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。现已证实CYP2C19在肝癌和结肠癌中高表达<sup>[9]</sup>,CYP2D6在胃癌组织中表达也较相应正常组织高<sup>[10]</sup>,CYP2E1在脑肿瘤、肝癌、乳腺癌、非小细胞肺癌

中表达升高<sup>[11]</sup>,但是这些基因的表达是否与肺癌耐药相关未见报道。本研究发现CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞较CD133<sup>-</sup>细胞高表达CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1,提示它们可能在CD133<sup>+</sup>细胞耐药过程中发挥重要作用。这些CYP450可通过增强对抗肿瘤药物的代谢作用从而减弱药物的抗肿瘤作用甚至使其灭活,使肿瘤发生耐药现象。

糖原合成酶激酶3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 是一种多功能的丝/苏氨酸磷酸激酶,有GSK3 $\alpha$ 和GSK3 $\beta$ 两种亚型。GSK-3的基本功能是识别和磷酸化特定序列,GSK-3 $\alpha$ 第21位点上丝氨酸的磷酸化可造成GSK-3的失活,失活的GSK-3通过调控Wnt/ $\beta$ -catenin、PI3K/Akt和NF- $\kappa$ B等多种信号传导通路参与肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡<sup>[12]</sup>。Fu等<sup>[13]</sup>报道GSK3 $\alpha$  mRNA及蛋白在卵巢癌耐紫杉醇细胞株中表达明显较亲本株高,认为高表达的GSK3 $\alpha$ 可能与耐药有关。Piazza等<sup>[14]</sup>发现在多发性骨髓瘤细胞中敲除基因GSK3 $\alpha$ 后,瘤细胞对bortezomib诱导的凋亡敏感性增加。本研究发现CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞较CD133<sup>-</sup>细胞高表达GSK3 $\alpha$ ,提示GSK3可能参与CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞的耐药。

过氧化物酶体增殖因子激活受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) 是一类由配体激活的转录因子,属于核激素受体超家族成员,有PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ / $\delta$ 和PPAR $\gamma$ 三种亚型。目前研究提示PPARs与肿瘤具有相关性,但PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta$ / $\delta$ 在肿瘤发生发展中的作用一直存有争议。体外实验研究发现PPAR $\alpha$ 激动剂可诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤新生血管形成,对子宫内腺癌、卵巢癌细胞、结肠癌细胞和黑色素瘤细胞均有不同程度的抗肿瘤活性<sup>[15]</sup>。但在NNK诱导的鼠肺癌模型上,激活PPAR $\alpha$ 可促进肺肿瘤的发生发展<sup>[16]</sup>。PPAR $\beta$ 在肺癌组织中表达降低,PPAR $\beta$ 激动剂可以下调Cyclin D1和PCNA,阻滞细胞周期G<sub>1</sub>期从而抑制肺腺癌细胞增殖<sup>[17]</sup>。但也有研究<sup>[18]</sup>报道PPAR $\beta$ / $\delta$ 激动剂可以促进肺癌细胞增殖,其机制涉及通过PI3K/AKT途径上调EP4的受体PGE2,下调PTEN和增加AKT磷酸化。本研究发现CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞较CD133<sup>-</sup>细胞高表达PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta$ / $\delta$ ,PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta$ / $\delta$ 在肺腺癌耐药中的确切作用究竟如何?这一课题值得深入研究。

肿瘤化疗耐药是一个多基因、多环节、多途径参与的过程,可能涉及影响不同生化途径的多种遗传因子表达的改变。本研究在CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞中筛选出31个可能与肺癌多药耐药相关的基因,其中CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、GSK3 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 和PPAR $\beta$ / $\delta$ 为新发现的

肺腺癌耐药相关基因,这些差异表达基因给肺腺癌耐药的研究提供了实验依据。进一步的研究将通过体内外试验证实这几个新颖的肺腺癌耐药相关基因在CD133<sup>+</sup>肺腺癌细胞耐药中的作用,以期肺腺癌耐药的逆转提供新策略。

#### 参 考 文 献

- 1 Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, *et al.* Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resist Update*, 2012, 15(1-2): 50-61.
- 2 Hsu HS, Huang PI, Chang YL, *et al.* Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in non-small cell lung cancer-derived CD133-positive cells. *Cancer*, 2011, 117(13): 2970-2985.
- 3 Salnikov AV, Gladkikh J, Moldenhauer G, *et al.* CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 2010, 126(4): 950-958.
- 4 Liu YP, Yang CJ, Huang MS, *et al.* Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133<sup>+</sup> cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 406-416.
- 5 Kubo T, Takigawa N, Osawa M, *et al.* Subpopulation of small-cell lung cancer cells expressing CD133 and CD87 show resistance to chemotherapy. *Cancer Sci*, 2013, 104(1): 78-84.
- 6 Azzariti A, Porcelli L, Quatrone AE, *et al.* The coordinated role of CYP450 enzymes and P-gp in determining cancer resistance to chemotherapy. *Curr Drug Metab*, 2011, 12(8): 713-721.
- 7 Mensah-Osman EJ, Thomas DG, Tabb MM, *et al.* Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines. *Cancer*, 2007, 109(5): 957-965.
- 8 Vanschaik RH. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug Resist Update*, 2008, 11(3): 77-98.
- 9 Pawłowska M, Augustin E. Expression systems of cytochrome P450 proteins in studies of drug metabolism *in vitro*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2011, 65: 367-376.
- 10 Canturk P, Caner V, Oruc N, *et al.* The mRNA expression of cytochrome P450 isoforms in human gastric tissue. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(98): 372-376.
- 11 Ye Q, Lian F, Chavez PR, *et al.* Cytochrome P450 2E1 inhibition prevents hepatic carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in alcohol-fed rats. *Hepatobil Surg Nutr*, 2012, 1(1): 5-18.
- 12 Osolodkin DI, Palyulin VA, Zefirov NS. Glycogen synthase kinase 3 as an anticancer drug target: novel experimental findings and trends in the design of inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(4): 665-679.
- 13 Fu Y, Hu D, Qiu J, *et al.* Overexpression of glycogen synthase kinase-3 in ovarian carcinoma cells with acquired paclitaxel resistance. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(3): 439-444.
- 14 Piazza F, Manni S, Tubi LQ, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 regulates multiple myeloma cell growth and bortezomib-induced cell death. *BMC*

- Cancer, 2010, 10: 526.
- 15 Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer challenges and opportunities. *Pharmacol*, 2011, 164(1): 68-82.
- 16 Li MY, Yuan H, Ma LT, *et al*. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in the development of non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(6): 674-683.
- 17 Fukumoto K, Yano Y, Virgona N, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  as a molecular target to regulate lung cancer cell growth. *FEBS Lett*, 2005, 579(17): 3829-3836.
- 18 Peters JM, Gonzalez FJ. Sorting out the functional role(s) of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in cell proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 230-241.
- (收稿: 2014-01-10 修回: 2014-03-04)  
(本文编辑 丁燕)



Cite this article as: Wang HY, Zheng SQ, Tu YS, *et al*. Screening and Identification of Novel Drug-resistant Genes in CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> Lung Adenosarcoma Cells Using cDNA Microarray. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(6): 437-443. [王红艳, 郑少秋, 涂永生, 等. 基因芯片筛选CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>肺腺癌细胞中新发现的耐药基因. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(6): 437-443.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.06.01.

## • 启事 •

### 《转化医学电子杂志》征稿启事

《转化医学电子杂志》是经国家新闻出版广电总局批准，中国人民解放军总后勤部主管，第四军医大学出版社主办的专业电子学术期刊。杂志国际标准刊号：ISSN 2095-6894，国内统一刊号：CN 61-9000/R。

本刊以全国各级医疗机构临床医护人员、医教科研人员及医药卫生管理者为主要读者对象，开展学术交流，服务军队和地方医学事业发展。现面向全国高等医学院校、卫生管理部门、医疗单位征集优秀学术论文。欢迎广大医学教育者、卫生管理人员、医学科研人员、医务工作者踊跃投稿，本刊对老作者本人及推荐的稿件优先录用。本刊具有容稿量大、刊登周期短、信息时效高等特点。本刊免收审稿费，凡刊登的稿件均赠当期杂志和光盘，酌付稿酬。目前开设的主要栏目：专家视野（述评）、基础与转化医学、预防与转化医学、生物医学工程与转化医学、临床与转化医学、短篇报告、医学教育、综述、转化医学动态与资讯、转化医学多媒体课件等。

投稿方式：登录<http://www.ejotm.com>注册后在线投稿；

联系方式：陕西省西安市新寺路569号第四军医大学唐都医院《转化医学电子杂志》编辑部。邮编：710038，联系电话：029-84778169；E-mail: zhyxdzzz@126.com

热忱欢迎广大医务工作者踊跃投稿！