

## · 基础研究 ·

# GRP78表达下调可降低 肺腺癌细胞对VP-16的耐药

姜莉 张黎川 王琪 王斯炎

**【摘要】**背景与目的 GRP78 (Glucose-regulated protein 78) 是GRPs家族的成员之一, 其高表达与某些肿瘤细胞化疗耐药相关。本研究旨在探讨在BAPTA-AM作用下肺腺癌SPCA-1细胞GRP78表达水平的变化及GRP78表达下调与细胞对VP-16耐药的相关性。方法 将SPCA-1细胞随机分为BAPTA-AM处理组、A23187处理组及对照组。采用RT-PCR和免疫荧光细胞化学方法分别检测各组细胞中GRP78在核酸和蛋白水平的表达。采用流式细胞仪测定细胞在化疗药物足叶乙甙 (VP-16) 作用下的细胞生存率。结果 与对照组和A23187处理组相比, BAPTA-AM处理组细胞GRP78在核酸和蛋白水平的表达均明显降低, 而其在VP-16作用下的细胞凋亡率则明显升高 (细胞凋亡率: BAPTA-AM处理组为 $10.84\pm 0.86$ ; 对照组为 $6.85\pm 0.20$ ; A23187处理组为 $4.95\pm 0.19$ ;  $P<0.01$ )。结论 BAPTA-AM能够抑制SPCA-1细胞GRP78的表达, GRP78表达下调能够提高SPCA-1细胞对VP-16的敏感性。因此, 采用化学药物或反义RNA等方法抑制GRP78的表达可能成为未来治疗肺癌的新手段。

**【关键词】** GRP78; BAPTA-AM; VP-16; 肺肿瘤; 耐药

**【中图分类号】** R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2009.11.06

## Down-regulation of GRP78 Enhances Chemotherapy Sensitivity to VP-16 in Lung Adenocarcinoma

Li JIANG<sup>1</sup>, Lichuan ZHANG<sup>2</sup>, Qi WANG<sup>3</sup>, Siyan WANG<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Disease, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030029, China; <sup>2</sup>Department of Respiratory Disease, Zhongshan Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian 116001, China; <sup>3</sup>Department of Respiratory Diseases, the Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China

Corresponding author: Qi WANG, E-mail: wqdmu@yahoo.com.cn

**【Abstract】** Background and objective GRP78, a member of GRPs, plays a critical role in chemotherapy resistance in some cancers. To investigate the relationship between the expression of GRP78 and resistance to anti-cancer drug VP-16 *in vitro* in lung adenocarcinoma SPCA-1 cell line. **Methods** SPCA-1 cells were divided into three groups: BAPTA-AM-treated group, A23187-treated group and the control group. RT-PCR and immunofluorescence were used to analyze the expression of GRP78 at both mRNA and protein levels, respectively. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry in order to evaluate the therapeutic sensitivity to VP-16. **Results** The expression of GRP78 at both protein and mRNA levels in the BAPTA-AM-treated cells dramatically decreased as compared to that of both A23187-treated and control groups. After treatment by VP-16, the percentages of apoptotic cells were  $10.84\pm 0.86$ ,  $6.85\pm 0.20$ ,  $4.95\pm 0.19$  in BAPTA-M-treated group, the control group and A23187-treated group, respectively. **Conclusion** BAPTA-AM is highly effective in the inhibition of GRP78, down-regulation of GRP78 can significantly increase the sensitivity of adenocarcinoma lung cancer to VP-16. All these suggest that inhibition of the expression of GRP78 by chemicals such as BAPTA-AM or anti-sense RNA may be a new therapeutic strategies to lung cancer.

**【Key words】** GRP78; BAPTA-AM; VP-16; Lung neoplasms; Drug resistance

This study was supported by grant from the National Nature Science Foundation of China (to Qi WANG) (No.30470464).

本研究受国家自然科学基金 (No.30470464) 资助

作者单位: 030029 山西, 山西省人民医院呼吸内科 (姜莉); 116001 大连, 大连大学附属中山医院呼吸内科 (张黎川); 116023 大连, 大连医科大学附属二院呼吸内科 (王斯炎, 王琪) (通讯作者: 王琪, E-mail: wqdmu@yahoo.com.cn)

在实体肿瘤生长过程中, 因血液供应不足等原因导致细胞常处于低糖、缺氧及酸中毒的微环境中, 这种微环境能够引起内质网应激反应, 诱导内质网分子伴侣糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein78, GRP78) 表达, 并与肿瘤的进展有关<sup>[1-3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明应激引起的GRP78高表达与乳腺癌、肝癌、大肠癌等肿瘤细胞对拓扑异构

酶抑制剂等化疗药物的耐药具有一定的相关性。但目前的研究多集中在GRP78表达上调对化疗耐药的影响，而关于GRP78表达下调的研究报道则很少。本研究旨在通过采用钙离子螯合剂BAPTA-AM抑制肺腺癌SPCA-1细胞GRP78表达的方法，探讨GRP78表达下调与肺腺癌细胞对VP-16耐药的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺腺癌标准细胞株SPCA-1（购自上海的美国ATCC代理公司）、RPMI-1640培养基（Sigma公司）、BAPTA-AM（Sigma公司）、碘化丙啶（PI，Sigma公司）、A23187（北京中山生物公司）、VP-16（江苏恒瑞医药股份有限公司）、多克隆羊抗GRP78抗体（美国Santa Cruz公司）、异硫氰酸荧光素（美国Santa Cruz公司）。

1.2 细胞培养 将SPCA-1细胞在含有10%小牛血清、青霉素、链霉素各100 U/mL的RPMI-1640培养基中，置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>的孵箱中无菌培养。0.25%胰蛋白酶消化传代。取指数生长期的SPCA-1细胞，以5×10<sup>5</sup>/mL细胞接种于培养皿中。细胞长至80%融合时，弃去培养基，PBS液洗2次，待用。

1.3 细胞分组与处理 将SPCA-1细胞随机分为3组，即BAPTA-AM处理组、A23187处理组和对照组。参照文献方法<sup>[5,6]</sup>，BAPTA-AM处理组中分别加入浓度为0 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM的BAPTA-AM与细胞共孵育1 h；A23187处理组中加入浓度为2 μM的A23187共孵育24 h；对照组中则加入PBS培养24 h。然后分别采用RT-PCR和免疫荧光细胞化学方法检测各组细胞GRP78在核酸和蛋白水平的表达。

1.4 RNA提取以及RT-PCR 按Trizol试剂说明书分别提取各组细胞的总RNA，取2 μL溶液，应用分光光度仪测RNA浓度及纯度。制备cDNA，进行PCR产物扩增。GRP78 mRNA上游引物序列为5' GATAATCAACCAACTGTTAC 3'，下游引物序列为5' GTATCCTCTCACCAGTTGG 3'；内参β-actin上游引物序列为5' TCGTCACCAACTGGGACGACATGG 3'，下游引物序列5' GATCTTGATCTTCATTGTGCTGGG 3'。取PCR扩增产物10 μL，行1.5%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，用美国UVP凝胶成像系统EC3 System进行扫描分析，计算公式为：某样品GRP78 mRNA的相对表达水平=样品GRP78的IOD值/样品β-actin的IOD值。

1.5 免疫荧光细胞化学 将各组细胞以固定液（冷甲醇：

丙酮=1:1）固定10 min，然后用0.1%PBST冲洗3次。加入一抗（羊抗人GRP78多克隆抗体），4℃过夜。PBS冲洗后，加入二抗（FITC标记的兔抗羊抗体），闭光，室温下放置1 h。甘油封片。荧光显微镜照相观察荧光出现的位置及强度。

1.6 细胞凋亡率检测 以1×10<sup>6</sup>/mL的密度将细胞接种于培养瓶中，向各组细胞中分别加入浓度为30 μM化疗药物VP-16，作用6 h，用PBS（pH7.4）洗2次后更换培养液再培养48 h。离心后收集细胞，加入细胞孵育液及PI和FITC-AV，闭光孵育20 min。然后用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.7 统计学处理 所有实验均重复3次以上，数据以Mean±SD表示，采用SPSS 12.0软件进行方差分析，P<0.05为有统计学差异。

2 结果

2.1 GRP78核酸水平的表达 采用RT-PCR检测SPCA-1细胞GRP78核酸水平的表达，与A23187处理组和对照组相比，BAPTA-AM处理组的GRP78 mRNA的表达减少，且随着BAPTA-AM浓度由10 μM升至50 μM，GRP78 mRNA水平由0.751±0.223降至0.604±0.270，呈现一定的浓度依赖性；而A23187处理组的GRP78 mRNA则明显高于对照组（图1，表1，表2）。

表1 RT-PCR检测不同浓度BAPTA-AM作用下GRP78 mRNA表达  
Tab 1 The expression of GRP78 mRNA for the cells treated by BAPTA-AM at the different concentrations examined by RT-PCR

Concentrations (μM)	GRP78 mRNA
0	0.781±0.423
10	0.751±0.223 <sup>#*</sup>
20	0.752±0.201 <sup>*</sup>
30	0.685±0.299 <sup>#</sup>
40	0.641±0.211 <sup>*</sup>
50	0.604±0.270 <sup>#</sup>

Compare with 0 μM, <sup>#</sup>P<0.05; compare with 30 μM, <sup>\*</sup>P>0.05.

表2 各组细胞GRP78 mRNA的相对表达水平  
Tab 2 The expression of GRP78 mRNA for the cells of experimental groups

Experimental groups	GRP78 mRNA
Control group	0.780±0.423
A23187-treated group	1.009±0.463
BAPTA-AM-treated group	0.686±0.064

Compare with each other, P<0.05.

**2.2 GRP78蛋白水平的表达** 免疫荧光检测可见，在488 nm激发光的激发下，GRP78主要表达在细胞核周围，呈环形。与A23187处理组和对照组相比，BAPTA-AM处理组的荧光强度明显减弱，表明GRP78蛋白表达明显减少；而A23187处理组的荧光强度则明显高于对照组，表明GRP78蛋白表达量增加（图2）。

**2.3 细胞凋亡率** 本研究采用Annexin V/PI双染色法测定各组细胞的凋亡率。由于细胞凋亡早期，位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸（PS）迁移到细胞外侧，Annexin V与PS有高度亲和力，可用来检测细胞凋亡。Annexin V检测不能区分细胞的坏死或凋亡，而PI与DNA结合后使其着色。正常细胞对Annexin V、PI弱低染。凋亡细胞对Annexin V强染，PI弱染，坏死细胞对二者均强染。流式细胞仪检测结果显示，与A23187处理组和对照组相比，BAPTA-AM处理组的细胞凋亡率明显升高，三组细胞凋亡率分别为10.84±0.86（BAPTA-AM处理组）、4.95±0.19（A23187处理组）、6.85±0.20（对照组），具有统计学差异（ $P < 0.01$ ）（图3）。

**3 讨论**

化疗耐药已经成为现今实体肿瘤化疗治疗的“瓶颈”。内质网分子伴侣糖调节蛋白家族（GRPs）是细胞微环境的重要成分，与许多肿瘤的化疗耐药相关。关于GRPs，目前研究较多的是分子量为78 kDa的GRP78。GRP78又被称为免疫球蛋白重链连接蛋白（BiP），主要参与新合成蛋白的折叠、组装，也作用于错误折叠蛋白，纠正其折叠、组装方式或促进其降解，调节内质网应激感受器<sup>[7]</sup>。当细胞受到有害因素侵袭时，GRP78被诱导，合成明显增加。很多研究通过诱导、反义RNA及核酸内切酶等多种方法均证实GRP78和GRP94对细胞具有保护作用<sup>[8]</sup>，而这种保护作用主要通过维持细胞内环境的稳定、保持细胞在应激状态下蛋白质继续有效合成、

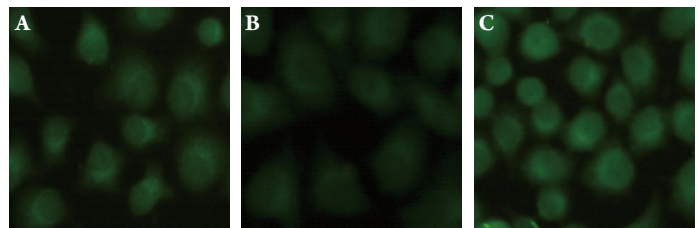


图2 免疫荧光方法检测GRP78蛋白表达 (×400)

Fig 2 The expression of GRP78 protein detected by immunofluorescence (×400)  
A: control cells; B: BAPTA-AM-treated cells (BAPTA-AM at 30 μM for 1 h); C: A23187-treated cells (A23187 at 2 μM for 24 h).

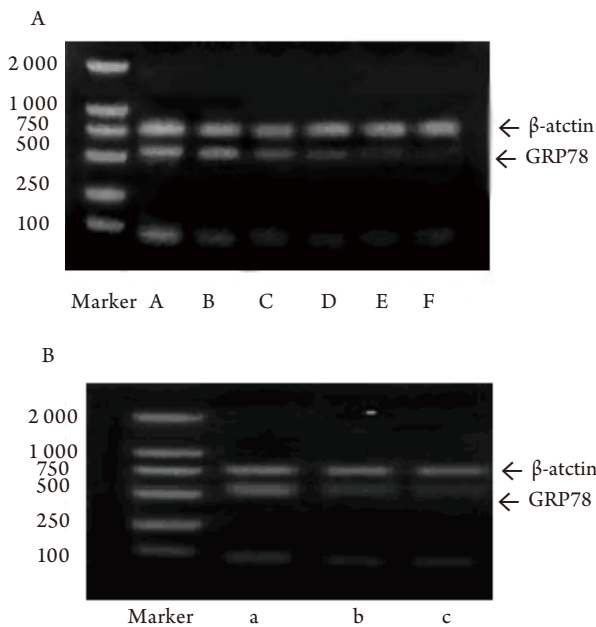


图1 GRP78 RT-PCR扩增产物的凝胶电泳图

Fig 1 The gel electrophoresis of GRP78 RT-PCR products for the SPCA-1 cells

A: BAPTA-AM-treated group cells treated by BAPTA-AM at different concentrations respectively, for 1 h. A-F: 0 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM; B: Cells in different groups. a: A23187-treated group (A23187 at 2 μM for 1 h); b: control (untreated cells); c: BAPTA-AM-treated group (BAPTA-AM at 30 μM for 24 h).

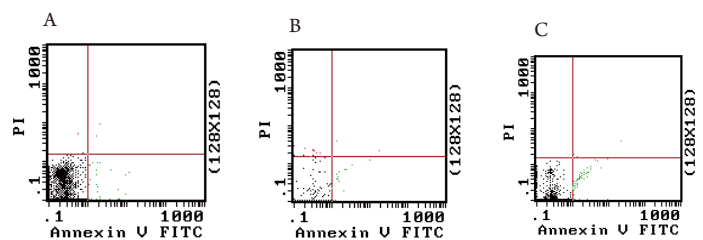


图3 流式细胞仪细胞凋亡率检测结果示意图

Fig 3 The sketch map of apoptotic rate by flow cytometry

Percentage of apoptotic cells treated by VP-16 (30 μM) for 6 h determined by FACS analysis. A: control cells; B: BAPTA-AM-treated cells (BAPTA-AM at 30 μM for 1 hour); C: A23187-treated cells (A23187 at 2 μM for 24 hours). The cells were labeled with annexin V and PI. Viable cells were those with low annexin or no annexin and PI staining (lower left panel). Early stage apoptotic cells were represented by high annexin and low PI staining (lower right panel), later stage apoptotic cells were represented by high annexin and high PI staining (upper right panel), and necrosis cells were represented by high PI and low annexin staining (upper left panel).

降低细胞对杀伤性T细胞的敏感性或延长在各种不利因素刺激下的细胞的生存期等方法抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。很多研究表明, GRP78高表达能够引起细胞对拓扑异构酶抑制剂, 如VP-16多柔比星等化疗药物耐药。拓扑异构酶抑制剂的主要作用是稳定拓扑异构酶与DNA复合物, 致DNA断裂, 同时启动凋亡体系, 包括BAK、caspase-7。GRP78诱导耐药的机制之一是抑制凋亡启动, 避免细胞发生由化疗药物引起的细胞凋亡<sup>[10]</sup>。诱导凋亡的因素有活性氧家族、细胞内钙离子的浓度、线粒体膜电位(MMP)及caspase-3的激活。GRP78主要通过抑制caspase-3的激活而抑制细胞凋亡。研究表明, GRP78不仅对正常细胞有保护作用, 且也能够通过抑制细胞凋亡、促进免疫逃逸保护肿瘤细胞。如肝癌细胞中, GRP78表达量约为正常肝细胞的1.5倍<sup>[11]</sup>, 大肠癌细胞则为周边正常肠组织的5倍左右<sup>[12]</sup>。

由于GRPs对肿瘤细胞具有保护作用, 并已有研究证明其高表达与乳腺癌、肝癌等化疗耐药相关, 因此抑制GRPs表达可能成为肿瘤治疗的新靶点。脱氧雪腐镰刀菌烯醇(vomitoxin)、VST、BAPTA-AM等均能抑制GRPs表达, 而目前关于BAPTA的研究较多。Chang等<sup>[13]</sup>研究发现BAPTA-AM能够抑制GRP78的表达, 并能够减弱或消除GRP78高表达对细胞的保护作用。Takano<sup>[14]</sup>研究发现, 在原始T细胞中抗CD3抗体等可以诱导GRP78的表达, 而BAPTA-AM则抑制其表达。BAPTA-AM为一细胞内快速的钙离子螯合剂, 可阻断线粒体膜上钙的流入, 抑制凋亡反应中的caspase-3和钙依赖的核酸内切酶的激活, 促使线粒体膜电位恢复正常, 降低细胞内钙浓度<sup>[15]</sup>, 从而使细胞的凋亡百分比大幅度减少。由此推测, BAPTA-AM抑制GRP78表达的可能机制是BAPTA-AM对细胞内钙离子的螯合作用, 因为改变了细胞内钙超载的内环境, 所以减弱了应激条件对GRP78的诱导作用。

目前已有研究表明在乳腺癌、肝癌、大肠癌等实体肿瘤细胞中存在GRP78的高表达, 而有关肺癌的研究甚少。本课题组既往研究已证实, 在肺小细胞、大细胞型肺癌中存在GRP78高表达, 且其高表达与肺癌细胞对VP-16耐药有一定相关性<sup>[6]</sup>。本研究旨在探讨BAPTA-AM能否抑制肺腺癌SPCA-1细胞系GRP78的表达以及GRP78表达下调与细胞对VP-16耐药的相关性。结果表明, BAPTA-AM可明显抑制人肺腺癌标准细胞株SPCA-1中GRP78在核酸和蛋白水平的表达, 而且, 这种抑制作用呈现一定的

BAPTA-AM浓度依赖性; 在BAPTA-AM作用下, 肺腺癌细胞对VP-16的敏感性明显提高。可见GRP78对肺腺癌细胞具有保护作用, 而BAPTA-AM可以极大地减弱这种保护作用, 降低肺腺癌对VP-16的耐药, 提高肺癌细胞对VP-16的敏感性, 且其程度与GRP78的下调水平具有一定的相关性, 采用BAPTA-AM等下调GRP78的表达, 可望成为提高肺癌化疗效果的新手段。

总之, 当今肺癌的发病率逐渐增高, 且有年轻化趋势, 提高肺癌化疗疗效已经成为一个急需解决的问题。采用药物及基因干预等手段抑制耐药相关蛋白的表达可能减少或消除耐药的发生, 进而提高肺癌化疗疗效, 提高生存率, 这将可能成为肿瘤治疗的一个新的靶向、新的希望。

#### 参考文献

- 1 Lee AS. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, 1987, 12: 20-23.
- 2 Pahl HL, Baeuerle PA. Endoplasmic-reticulum-induced signal transduction and gene expression. *Trends Cell Biol*, 1997, 7(2): 50-55.
- 3 Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, *et al*. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 1988, 332(6163): 462-464.
- 4 Sacchi CM, Schiaffonati L. The effect of etoposide (VP-16) on mouse L fibroblasts: modulation of stress response, growth and apoptosis genes. *Anticancer Res*, 1996, 16(6B): 3659-3664.
- 5 Inanami O, Yoshito A, Takahashi K, *et al*. Effects of BAPTA-AM and Forskolin on apoptosis and cytochrome c release in photosensitized Chinese hamster V79 cells. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(4): 650-655.
- 6 Wang Q, Wang T, Wang YY, *et al*. VP-16 resistance in the NIC-H460 human lung cancer cell line is significantly associated with glucose-regulated protein78 induction. *Anticancer Res*, 2007, 27(4B): 2359-2364.
- 7 Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(8): 504-510.
- 8 Miyake H, Isao Hara, Soichi A, *et al*. Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem*, 2000, 77(3): 396-408.
- 9 Yang GH, Li S, Pestka JJ, *et al*. Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/Bip by vomitoxin (Deoxynivalenol). *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 162(3): 207-217.
- 10 Lee E, Nichols P, Spicer D, *et al*. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7849-7853.

- 11 Lim SO, Park SG, Yoo JH, *et al.* Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(14): 2072-2079.
- 12 Xing XM, Lai MD, Wang YH, *et al.* Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1-2): 308-315.
- 13 Chang WM, Chen KD, Chen LY, *et al.* Mitochondrial calcium-mediated reactive oxygen species are essential for the rapid induction of the grp78 gene in 9L rat brain tumour cells. *Cell Signal*, 2002, 15(1): 57-64.
- 14 Takano S, Ando T, Hiramatsu N, *et al.* T cell receptor-mediated signaling induces GRP78 expression in T cells: the implications in maintaining T cell viability. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4): 762-766.
- 15 Lin YT, Yang JS, Lin HJ, *et al.* Baicalein induces apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial pathway. *In Vivo*, 2007, 21(6): 1053-1058.
- (收稿: 2009-08-26 修回: 2009-10-29)  
(本文编辑 李博)

· 启事 ·

## 《中国肺癌杂志》关于开通Scholarone Manuscripts 在线稿件处理系统的通知

为了方便作者投稿、专家审稿及提高编辑部工作效率和管理水平,《中国肺癌杂志》(pISSN 1009-3419, eISSN 1999-6187, www.lungca.org)于2009年10月15日起采用国际著名投稿系统Scholarone Manuscripts,实行在线稿件处理,将大大提高本刊办刊水平。

原来的投稿方式(发邮件到信箱 cnlungca@gmail.com)在2009年10月仍然有效,欢迎您使用新的投稿方式。

投稿网址 中文 <http://mc03.manuscriptcentral.com/cjlc>

英文 <http://mc03.manuscriptcentral.com/lc>

如有不明之处,请联系《中国肺癌杂志》编辑部022-27219052或E-mail: cnlungca@gmail.com。

### 关于Scholarone Manuscripts

ScholarOne Manuscripts是汤森路透集团ScholarOne的旗舰产品之一,实现了自动化的期刊投稿,和轻松完成稿件的管理、编辑和评阅流程。ScholarOne Manuscripts在全球有1300多万用户,被3 000多种学会和出版社的期刊和图书所采用,包括《新英格兰医学杂志》等国际权威期刊。ScholarOne Manuscripts与汤森路透的ISI Web of Knowledge平台集成,后者为用户提供高质量和多学科文献的集成访问、发现和评价。在ISI Web of Knowledge平台上提供了Web of Science这一最权威的多学科引文数据库。通过该集成,审稿人和主编能够轻松地核实并访问稿件的参考文献,并且主编能够根据稿件内容搜寻新的审稿人。ScholarOne Manuscripts同时还与EndNote Web集成,使作者可以将收集的文献信息变成格式化的参考文献列表,方便了撰稿和投稿,也减少了参考文献著录中的差错。因此,这一完整的解决方案将科研人员、作者、审稿人和编辑,根据其各自的工作和信息流需要无缝地集成到一起。

若需更多信息,请访问:<http://www.thomsonscientific.com.cn/hyhg.html>或[http://www.thomsonreuters.com/products\\_services/scientific/Manuscript\\_Central](http://www.thomsonreuters.com/products_services/scientific/Manuscript_Central)。

### 关于汤森路透

汤森路透集团是全球领先的专业信息服务提供商。我们将专业知识与创新科技相结合,为金融、法律、税务与财会、科学技术、医疗保健和媒体领域的专业人员和决策者提供重要的信息。集团总部位于纽约,主要分支机构设于英国伦敦、美国明尼苏达州的伊根等地。集团在93个国家/地区的机构共有5万多名员工。

著名的《期刊引用报告》(Journal Citation Reports)即是该公司产品。请访问[www.thomsonreuters.com](http://www.thomsonreuters.com)。

《中国肺癌杂志》编辑部  
2009年10月