

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0355-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240208

非小细胞肺癌 A549 细胞基因组不稳定性和 MYC 基因突变 在吉西他滨耐药中的作用

陈宗军¹, 陈亚红², 黄丽云³, 梁紫盈⁴

(1. 海南医学院第二附属医院药学部, 海南 海口 570311; 2. 海南医学院第二附属医院呼吸科, 海南 海口 570311; 3. 海南医学院第一附属医院药学部, 海南 海口 570216; 4. 海口市第四人民医院体检科, 海南 海口 571100)

[摘要] **目的:** 探讨非小细胞肺癌 (NSCLC) A549 细胞基因组不稳定性和 MYC 基因突变在吉西他滨耐药中的作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 采用 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉西他滨持续作用 A549 细胞 (A549 组), 构建耐药细胞株 A549R (A549R 组), 并将 si-NC 和 si-MYC 转染至 A549R 细胞, 作为 si-NC A549R 组和 si-MYC A549R 组。采用 CCK-8 法检测不同浓度 (0、1、2、4、8、16 和 $32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 吉西他滨对各组细胞的抑制率, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率。转录组测序技术 (RNA-seq) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析 A549 组及 A549R 组细胞中的差异表达基因, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 A549 组和 A549R 组细胞中基因组不稳定性相关基因错配修复基因 2 (MSH2)、错配修复基因 6 (MSH6) 和 DNA 修复蛋白 RAD50 (RAD50) 的表达水平, Western blotting 法检测基因组不稳定性相关蛋白 MYC 原癌基因 (MYC) 和磷酸化组蛋白 (γH2AX) 的表达水平, 染色质免疫共沉淀 (ChIP) 法检测 RNA pol II 和 γH2AX 在 MYC 基因上的富集程度, PCR 法扩增并检测 A549R 细胞 MYC 基因突变情况。**结果:** 与 A549 组比较, 2、4、8、16 和 $32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉西他滨作用后 A549R 组细胞抑制率降低 ($P<0.05$), $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉西他滨作用后细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)。与 A549 组比较, A549R 组细胞中有 234 个 mRNAs 表达水平升高, 205 个 mRNAs 表达水平降低, 其中错配修复相关基因 (MSH2 和 MSH6)、RAD50 和 MYC 表达水平明显升高 ($P<0.05$)。KEGG 信号通路富集分析, 表达水平升高基因主要参与非同源末端连接、mRNA 监测途径和 DNA 复制等信号通路。与 A549 组比较, A549R 组细胞中 MYC 和 γH2AX 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。ChIP 法检测, RNA pol II 和 γH2AX 在 MYC 转录起始位点及 exon 2 上富集程度增加, MYC exon 2 上存在 G254A 基因突变。与 si-NC A549R 组比较, si-MYC A549R 组细胞中 MYC mRNA 和蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), 2、4、8、16 和 $32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉西他滨作用后 si-MYC A549R 组细胞抑制率升高 ($P<0.05$), 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$)。**结论:** 对吉西他滨耐药的 NSCLC 细胞中 A549R 基因组不稳定性增加, MYC 基因发生突变和扩增, 而敲减 MYC 可以恢复 A549R 细胞对吉西他滨的敏感性。

[关键词] 吉西他滨; 癌, 非小细胞肺; 基因组不稳定性; MYC 扩增; MYC 突变

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A

Effects of genomic instability and MYC gene mutation of non-small cell lung cancer A549 cells on resistance of gemcitabine

CHEN Zongjun¹, CHEN Yahong², HUANG Liyun³, LIANG Ziyong⁴

[收稿日期] 2023-04-20

[基金项目] 海南省卫健委 2021 年度海南省卫生健康行业科研项目 (21A200045)

[作者简介] 陈宗军 (1989-), 男, 海南省万宁市人, 主管药师, 主要从事药理学基础与临床方面的研究。

[通信作者] 陈亚红, 副主任医师 (E-mail: qicjpm@163.com)

(1. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570311, China; 2. Department of Respiratory, Second Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570311, China; 3. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570216, China; 4. Department of Physical Examination, Fourth People's Hospital, Haikou City, Haikou 571100, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effects of genomic instability and MYC gene mutation of non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells on the resistance of gemcitabine, and to clarify the mechanism. **Methods:** The A549 cells were continuously treated with $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of gemcitabine (A549 group) to establish the resistant cell line A549R (A549R group), and si-NC and si-MYC were transfected into the A549R cells to regarded as si-NC A549R group and si-MYC A549R group, respectively. CCK-8 assay was used to detect the inhibitory rates of the cells in various groups after treated with various concentrations of gemcitabine (0, 1, 2, 4, 8, 16, and $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; transcriptome sequencing technology (RNA-seq) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were used to identify the differentially expressed genes in the A549 and A549R cells; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of mismatch repair protein homolog 2 (MSH2), mismatch repair protein homolog 6 (MSH6), and recombinant DNA repair protein RAD50 (RAD50) in the A549 and A549R cells; Western blotting method was used to detect the expression levels of genome instability-related proteins MYC proto-oncogene (MYC) and phosphorylated H2AX (γH2AX) in the cells in various groups; chromatin immunoprecipitation (ChIP) was used to detect the enrichment of RNA pol II and γH2AX on the MYC gene; PCR method was used to amplify and detect the mutations in MYC gene in the A549R cells. **Results:** Compared with A549 group, the inhibitory rates of the A549R cells in A549R group treated with 2, 4, 8, 16, and $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gemcitabine were decreased, and the apoptotic rate of the cells after treated with $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gemcitabine was decreased ($P < 0.05$). Compared with A549 group, a total of 234 mRNAs in the cells in A549R group were upregulated and 205 mRNAs in the cells were downregulated, and the expression levels of mismatch repair-related genes (MSH2 and MSH6), RAD50, and MYC were significantly increased ($P < 0.05$). The KEGG signaling pathway enrichment analysis showed that the upregulated genes were mainly involved in non-homologous end-joining, mRNA surveillance pathway, and DNA replication signaling pathways. Compared with A549 group, the expression levels of MYC and γH2AX proteins in the cells in A549R group were increased ($P < 0.05$). The ChIP assay results showed that the enrichment of RNA pol II and γH2AX at the MYC transcription start site and exon 2, with a G254A mutation identified in MYC exon 2 was increased. Compared with si-NC A549R group, the expression levels of MYC mRNA and protein in the cells in si-MYC A549R group were decreased ($P < 0.05$), the inhibitory rates of the cells after treated with 2, 4, 8, 16, and $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gemcitabine were increased ($P < 0.05$), and the apoptotic rates were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The genome instability of the A549R NSCLC cells resistant to gemcitabine is increased, and the mutations and amplification occur in the MYC gene. Knockdown of MYC can restore the sensitivity of A549R cells to gemcitabine.

KEYWORDS Gemcitabine; Cancer, non-small cell lung; Genomic instability; MYC augmentation; MYC mutation

目前,肺癌是全球第二大常见癌症,男性和女性的肺癌死亡率均超过20%^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的

85%^[2],随着全球人口增长、老龄化和生活方式的改变,NSCLC的患病率不断升高^[3]。因此迫切需提高NSCLC的预防、诊断和治疗水平。而抗肿

瘤药物耐药性的产生是在临床上影响癌症患者预后的主要因素之一^[4]。因此解决肿瘤耐药性也是肿瘤治疗的关键。吉西他滨是一种抗代谢药物, 广泛应用于乳腺癌、肺癌和胰腺癌的治疗^[5]。作为 NSCLC 患者的首选治疗方法, 吉西他滨的化疗耐药性严重限制了其治疗的有效性^[6]。LIU 等^[7]对胰腺癌的吉西他滨耐药机制进行系统研究, 结果表明: 吉西他滨耐药样本显示出高度的基因组不稳定性, 并且 DNA 损伤程度较高。钱麒钰等^[8]研究发现: NSCLC 形成表皮间质转化后可以增加其对吉西他滨的耐药性。目前研究主要集中在 NSCLC 吉西他滨耐药细胞系的建立及其生物学特性研究以及相关药物对 NSCLC 吉西他滨耐药细胞的影响^[9], 但肿瘤细胞对吉西他滨产生耐药性的潜在机制仍不清楚。因此, 本研究构建吉西他滨的耐药株, 探讨引发 NSCLC 耐药的可能机制, 旨在为解决 NSCLC 对吉西他滨的耐药性问题提供可能的靶点。

1 材料与方 法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人 NSCLC 细胞株 A549 购自上海复祥生物科技有限公司; 吉西他滨购自北京沃凯生物科技有限公司, DMEM 培养基、蛋白酶 K、青霉素-链霉素和胰酶消化液购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清购自美国 Gibco 公司, Annexin V -FITC/PI 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, NEXTflex Small 转录组测序技术 (RNA sequencing, RNA-Seq) Kit v3 购自美国 PerkinElmer 公司, PrimeScript RT Kits 逆转录试剂盒和 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司, 染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) Assay Kit 购自美国 Millipore 公司, si-NC、si-MYC 和 CCK-8 试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司, 染色体组蛋白 H2A 家族成员 (γ H2A histone family member X, γ H2AX) 抗体、GAPDH 抗体、MYC 原癌基因 (MYC proto-oncogene, MYC) 抗体和 RNA pol II 抗体购自美国 Abcam 公司, TRIzol 试剂和 RIPA 裂解液购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 流式细胞仪 (型号: Attune CytPix) 和酶标仪 (型号: Multiskan SkyHigh) 购自美国 Thermo 公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: OPENQPCR) 购自美国 Chaibio 公司。

1.2 细胞培养及吉西他滨耐药细胞的制备 使用

添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养 A549 细胞, 细胞置于含有 5% CO₂、37 °C 的培养箱中, 待细胞生长密度达到 80% 时, 去掉培养基, 采用灭菌 PBS 缓冲液清洗 3 次后, 使用胰酶消化液消化 2 min, 培养基终止消化, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集细胞后加入培养基重悬细胞, 传代培养。不同浓度的吉西他滨培养 A549 细胞 1 周后, 2 mg·L⁻¹ 吉西他滨的培养基中大部分细胞死亡, 将小部分活细胞转入新培养瓶中培养, A549 细胞持续给药 1 个月, 所得细胞命名为 A549R, 随后与正常培养的 A549 细胞进行后续对比实验。

1.3 细胞转染及分组 将 A549R 细胞分为 si-NC A549R 组和 si-MYC A549R 组。按照 Lipofectamine™ 2000 说明书步骤进行转染。调整细胞数并接种于 6 孔细胞培养板, 使用不含抗生素的完全培养基培养, 使转染时细胞生长密度达 70%。制备 si-MYC 与脂质体的复合物, 同时制备无干扰作用的 si-RNA (si-NC) 与脂质体复合物, 将复合物分别加入 si-NC A549R 组和 si-MYC A549R 组的 6 孔细胞培养板相应孔内, 摇动混合, 5~6 h 倒掉细胞培养基, PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 更换为 DMEM 培养基, 24 h 后更换培养液, 48 h 后进行后续实验。

1.4 CCK-8 法检测 A549 和 A549R 细胞抑制率

取对数生长期 A549 和 A549R 细胞, 调整细胞密度为每孔 5×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板。分别给予 0、1、2、4、8、16 和 32 mg·L⁻¹ 吉西他滨处理 24 h。结束后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 继续培养 4 h, 采用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。细胞抑制率 = (1 - 各浓度孔 A 值 / 对照孔 A 值) \times 100%, 分别绘制 2 株细胞的浓度-抑制率曲线, 计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。细胞耐药指数 (resistance index, RI) = 实验组 IC₅₀ / 对照组 IC₅₀。A549R 细胞反复冻存复苏后, IC₅₀ 保持稳定, 表示 A549R 细胞构建成功。

1.5 RNA-Seq 法和生物信息学分析 A549 和 A549R 细胞中差异表达基因

TRIzol 法提取细胞的总 RNA, 使用 NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 将 400 ng RNA 进行 16 个 PCR 循环, 随机制备成 Small RNA-seq 文库。在 Illumina 的 NextSeq 500 系统中进行文库测序, 并捕获 50 bp 单端读数。以 miRBase 20.0 为参考, mirdeep2 和 srna-tools-cli 软

件用于获取潜在 miRNA 并绘制二级结构^[10]。使用 Benjamini & Hochberg 方法调整 P 值。默认情况下, 将校正的 P 值 0.05 设置为显著差异表达的阈值。使用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库 (网址: <https://www.kegg.jp/kegg/kegg1.html>) 分析差异基因参与的信号通路。

1.6 流式细胞术检测 A549R 组、si-NC A549R 组和 si-MYC A549R 组细胞凋亡率 8 mg·L⁻¹ 吉西他滨处理各组细胞 12 h, 用预冷的 PBS 缓冲液清洗 2 次, 1 000 g 离心 5 min, 收集细胞并重悬, 制成单细胞悬液后, 分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 室温 (25 $^{\circ}$ C) 避光孵育 20 min, 随后置于冰浴中。采用流式细胞仪进行检测, 细胞凋亡率 = Annexin V 阳性细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.7 RT-qPCR 法检测各组细胞中错配修复基因 (mutS homology, MSH) 2、MSH6、DNA 修复蛋白 RAD50 (recombinant DNA repair protein RAD50, RAD50)、MYC 原癌基因转录起始位点 (MYC proto-oncogene-transcriptional start site, MYC-TSS) 和 MYC 外显子 2 (MYC proto-oncogene exon 2, MYC exon 2) mRNA 表达水平 使用 TRIzol 法收集总细胞和组织 RNA, 然后使用 PrimeScript RT Kits 逆转录试剂盒将 RNA 制备成 cDNA。采用 Mx3000P 实时 PCR 系统进行 RT-qPCR。RT-qPCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s, 共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行数据分析, 以 GAPDH 为内参。引物序列: GAPDH 上游引物, 5'-AATGGGCAGCCGTTA-GGAAA-3', GAPDH 下游引物, 5'-GCGCCCAA-TACGACCAAATC-3'; MSH2 上游引物, 5'-ACCAGGAGGTGAGGAGGTTT-3', MSH2 下游引物, 5'-TTAAGGGCTCTGACTGCTGC-3'; MSH6 上游引物, 5'-CCCCACCAAGTTGTGACTTCT-3', MSH6 下游引物, 5'-TCTTCCGCTTTCGAGCAACT-3'; RAD50 上游引物, 5'-GCAAGCAGATCGCCATCAAG-3', RAD50 下游引物, 5'-GGGAGTAACTGCTGTGGCT-3'; MYC 上游引物, 5'-GCAATGCGTTGCTGGG-TTAT-3', MYC 下游引物, 5'-TCCCTCCGTTCTTTTCCCG-3'; MYC-TSS 上游引物, 5'-AT-TCCAGCGAGAGGCAGAG-3', MYC-TSS 下游引物, 5'-CAAATGGGCAGAATAGCCTC-3';

MYC exon 2 上游引物, 5'-ATTCGAGCTGCTG-CCCACCC-3', MYC exon 2 下游引物, 5'-GTCA-CCATCTCCAGCTGGTCG-3'。

1.8 Western blotting 法检测各组细胞中 MYC 和 γ H2AX 蛋白表达水平 细胞分组处理后, 预冷的 PBS 缓冲液清洗 3 次, RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 收集各组细胞裂解物, 离心后收集上清液。BCA 蛋白定量试剂盒测定样品蛋白质浓度, 加入蛋白质上样缓冲液, 煮沸 5 min, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。依据蛋白质浓度测定结果每孔上样 10 μ g 蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳 (恒压 200 V、45 min) 后, 然后将蛋白质转至 PVDF 膜 (恒流 300 mA、60 min)。用含 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 1% TBST 洗膜 8 min \times 3 次, 加入荧光标记二抗室温避光孵育 1 h, 1% TBST 洗膜 8 min \times 3 次。加入 ECL 显色液显色后曝光。采用 Image J 软件进行条带定量分析, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.9 ChIP 法检测 RNA pol II 和 γ H2AX 在 MYC-TSS 及 MYC exon 2 上的富集程度 使用 ChIP Assay Kit 进行 ChIP 实验。细胞在 100 mm 细胞培养板中生长至 80% 汇合。使用含有 1% 甲醛的细胞培养基在室温下进行 10 min 的蛋白质和 DNA 的交联。通过超声波将染色质随机切割为 200~500 bp, 然后分别采用一抗 (RNA pol II 和 γ H2AX) 进行孵育和免疫沉淀, 将琼脂糖珠添加到反应中以结合蛋白偶联抗体, 然后用新鲜制备的洗脱缓冲液 (1% SDS 和 0.1 mol·L⁻¹ NaHCO₃) 洗脱, 然后在 45 $^{\circ}$ C 下加入蛋白酶 K 消化 1 h 逆转交联; 将与之相结合的 DNA 片段进行免疫沉淀, 解交联后纯化目的 DNA, 对 DNA 进行 qPCR 法检测。

1.10 A549 组和 A549R 组细胞 MYC 基因突变的检测 提取 A549 组和 A549R 组细胞基因组, 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司对 MYC 基因进行 PCR 扩增及测序, 测序结果通过 SnapGene 软件进行比对。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计学分析及绘图。各组细胞凋亡率, MSH2、MSH6 和 RAD50 mRNA 表达水平, MYC 和 γ H2AX 蛋白表达水平, RNA pol II 和 γ H2AX 在 MYC 基因上的富集程度均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本

均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

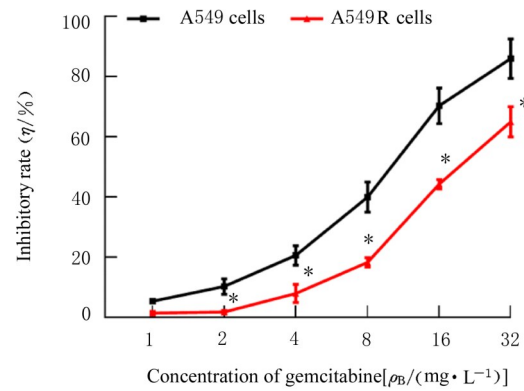
2 结果

2.1 吉西他滨耐药细胞株的构建及鉴定 A549 和 A549R 细胞的浓度-抑制率曲线见图 1。与 A549 组比较, 2、4、8、16 和 32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吉西他滨作用后, A549R 组细胞抑制率降低 ($P < 0.05$), 吉西他滨对 A549 细胞和 A549R 细胞的 IC_{50} 分别为 10.86 及 21.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。A549R 的 RI 为 1.93。使用 8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吉西他滨作用细胞后, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率, 结果显示: 与 A549 组 ($12.45\% \pm 1.12\%$) 比较, A549R 组 ($5.59\% \pm 0.87\%$) 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 A549 细胞和 A549R 细胞中差异表达基因

RNA-seq 法分析结果显示: 与 A549 组比较, A549R 组细胞中有 234 个 mRNA 表达水平升高, 205 个 mRNA 表达水平降低。见图 3A。KEGG 富集分析结果显示: 表达水平升高基因主要参与非同源末端连接、mRNA 监测途径和 DNA 复制等信号通路。见图 3B。

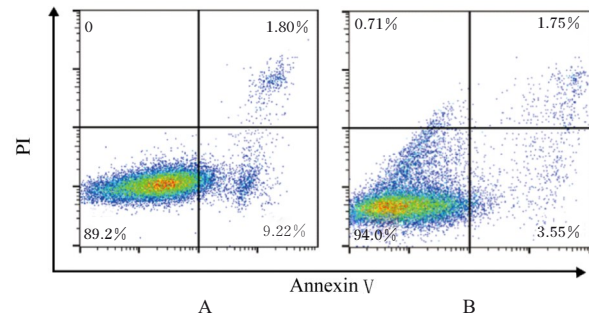
2.3 A549 组和 A549R 组细胞中 MSH2、MSH6 及 RAD50 mRNA 表达水平 RT-qPCR 法检测结果显示: 与 A549 组比较, A549R 组细胞 MSH2、MSH6 和 RAD50 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 4。



* $P < 0.05$ compared with A549 cells.

图 1 吉西他滨作用后 2 组细胞抑制率

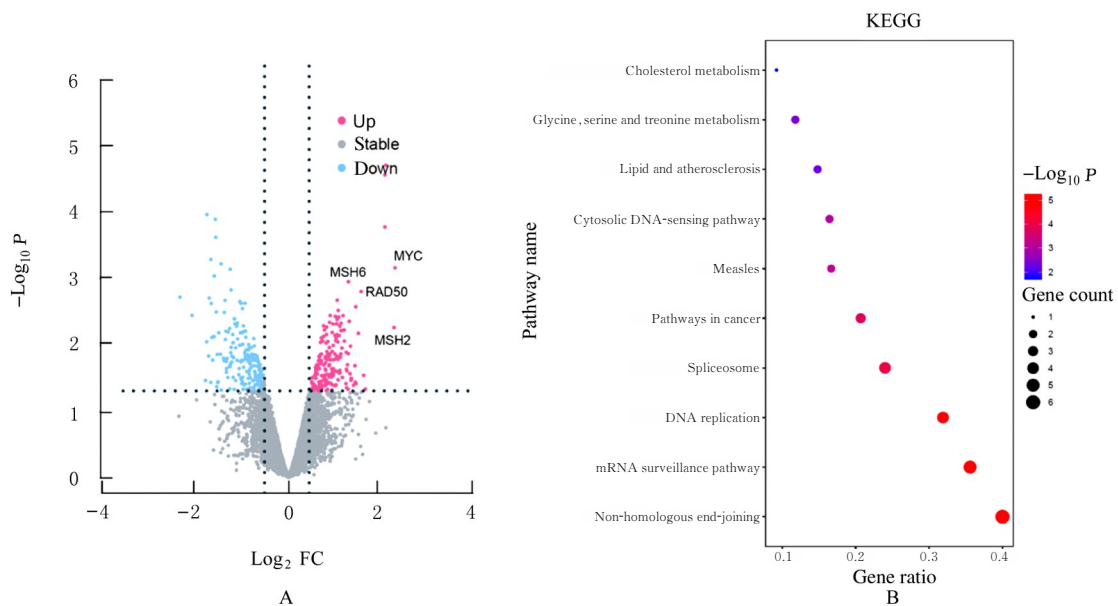
Fig. 1 Inhibitory rates of cells in two groups after treated with gemcitabine



A: A549 cells; B: A549R cells.

图 2 吉西他滨作用后 2 组细胞凋亡率

Fig. 2 Apoptotic rates of cells in two groups after treated with gemcitabine



A: Volcano map; B: KEGG signaling pathway analysis diagram.

图 3 RNA-seq 法检测吉西他滨耐药细胞株中差异表达基因

Fig. 3 Differential expression genes in gemcitabine-resistant cell stain detected by RNA-seq method

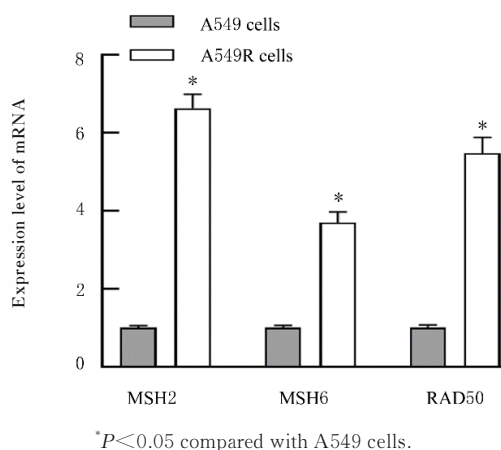
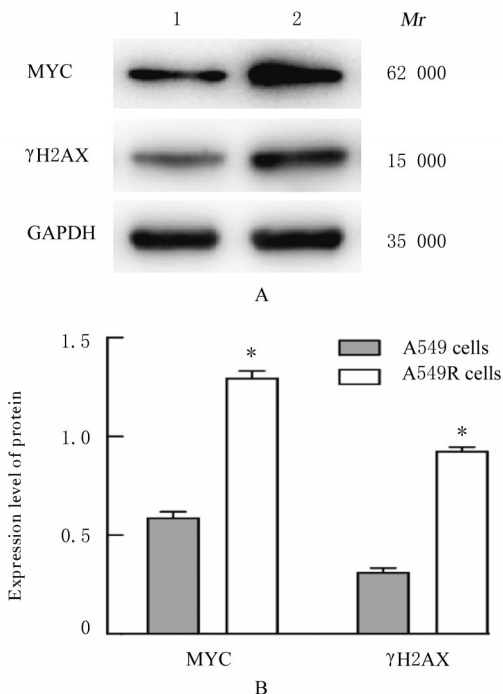


图4 RT-qPCR法检测MSH2、MSH6和RAD50 mRNA表达水平

Fig. 4 Expression levels of MSH2, MSH6, and RAD50 mRNA detected by RT-qPCR method

2.4 2组细胞中MYC和 γ H2AX蛋白表达水平

Western blotting法检测结果显示:与A549组比较, A549R组细胞中MYC和 γ H2AX蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。见图5。



Lane 1: A549 cells; Lane 2: A549R cells. * $P < 0.05$ compared with A549 cells.

图5 2组细胞中MYC和 γ H2AX蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of MYC and γ H2AX proteins in cells in two groups

2.5 A549组和A549R组细胞MYC基因突变和扩增情况

RT-qPCR法检测结果显示:与A549组比较, A549R组细胞MYC基因表达水平升高($P < 0.05$)。见图6A。ChIP法检测结果显示:与A549组比较, A549R组细胞中RNA pol II和 γ H2AX在MYC转录起始位点及exon 2上表达水平升高($P < 0.05$)。见图6B。将MYC基因PCR扩增后进行测序, 结果显示: A549R细胞原癌基因MYC exon 2上存在G254A基因突变。见图6C。

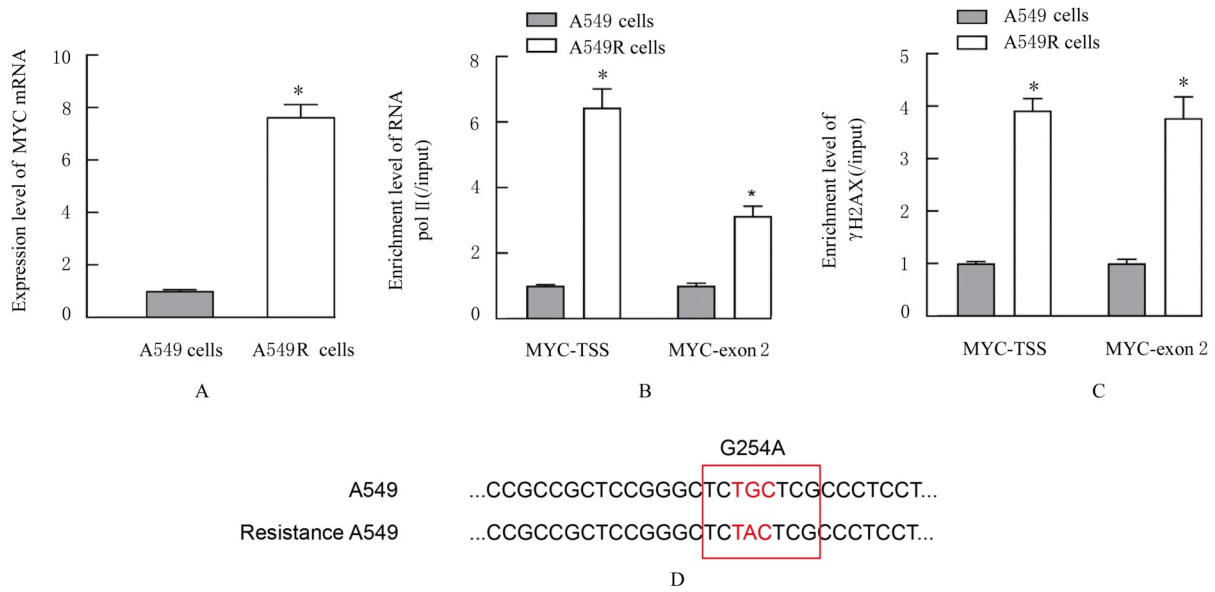
2.6 si-NC A549R组和si-MYC A549R组细胞对吉西他滨的耐药性

RT-qPCR法和Western blotting法检测结果显示:与si-NC A549R组比较, si-MYC A549R组细胞MYC mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。见图7。CCK-8法检测结果显示:与si-NC A549R组比较, 2、4、8、16和32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吉西他滨作用后, si-MYC A549R组细胞抑制率升高($P < 0.05$)。见图8。流式细胞术检测结果显示:与si-NC A549R组(5.68% \pm 0.63%)比较, si-MYC A549R组(11.37% \pm 0.98%)细胞凋亡率升高($P < 0.05$)。见图9。

3 讨论

联合化疗是临床上癌症治疗的主要方法^[11], 但长时间多次的药物化疗会增加癌细胞对药物的耐药性, 降低化疗效果^[12]。获得性耐药性是指肿瘤细胞与药物反复接触的过程中出现了耐药性, 使其对药物的敏感性下降甚至消失^[13]。肿瘤的耐药性突变可以使癌细胞逃避某些药物的抑制, 适应环境的变化来驱动肿瘤的生长。

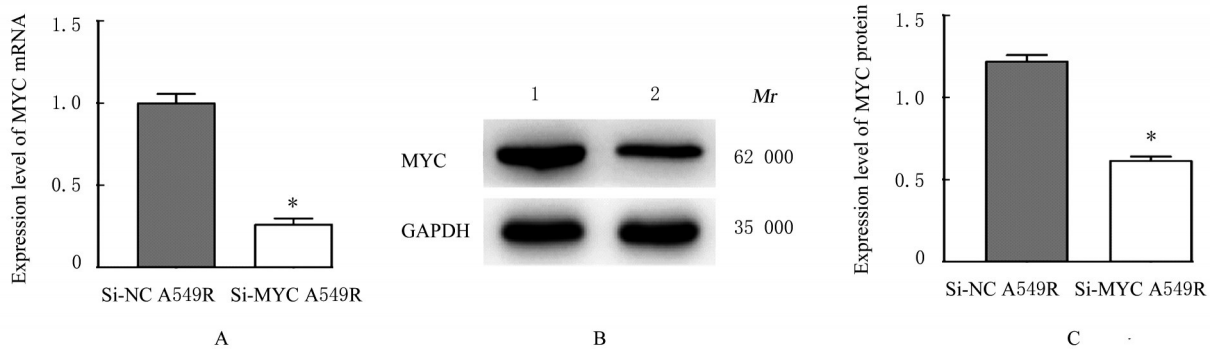
吉西他滨是嘧啶类抗代谢药物, 属于细胞周期特异性药物, 当进入肿瘤细胞后, 可被转化为具有活性的吉西他滨磷酸盐, 进而影响DNA合成和修复, 从而抑制肿瘤细胞分裂, 诱导肿瘤细胞凋亡^[14]。自1996年获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准以来, 吉西他滨已广泛应用于治疗各种实体瘤(乳腺癌、卵巢癌和肺癌等)^[15]。吉西他滨在NSCLC的一线治疗中已取得良好的效果。然而长期治疗患者会出现耐药性, 导致化疗的总有效率仅为20%左右^[16]。为了探讨吉西他滨对NSCLC基因组的影响, 本研究应用吉西他滨作用于A549细胞, 结果显示A549R的RI为1.93, 且与亲本细胞株A549细胞比较, 耐药细胞株A549R可拮抗由吉西他滨诱导的



A: Expression level of MYC mRNA detected by RT-qPCR method; B: Enrichment level of RNA pol II detected by ChIP-qPCR method; C: Enrichment level of γ H2AX detected by ChIP-qPCR; D: G254A mutation site. * $P < 0.05$ compared with A549 cells.

图 6 吉西他滨耐药细胞株 MYC 基因鉴定

Fig. 6 MYC gene identification of gemcitabine-resistant cell stains



A: Expression level of MYC mRNA detected by RT-qPCR method; B: Electrophoretogram of expressions of MYC and γ H2AX proteins; C: Expression levels of MYC and γ H2AX proteins. Lane 1: Si-NC A549R cells; Lane 2: Si-MYC A549R cells. * $P < 0.05$ compared with si-NC A549R cells.

图 7 2 组细胞中 MYC mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 7 Expression levels of MYC mRNA and protein in cells in two groups

细胞凋亡, 表明吉西他滨耐药细胞株 A549R 构建成功。基因组不稳定性包括点突变、染色体畸变、微卫星 DNA 不稳定性和端粒异常, 其存在于多种恶性肿瘤和癌前病变中, 同时肿瘤的耐药性也与基因组不稳定性有关。DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 系统紊乱可降低基因组不稳定性, 诱发基因突变, MSH2/MSH6 是 MMR 中的重要组成部分^[17], RAD50 是非同源末端连接修复过程中的关键分子, 非同源末端连接修复过程易引发 DNA 突变。RAD50 在肿瘤组织中高表达, 且参与

肿瘤细胞对顺铂类药物化疗耐药, 与患者预后不良相关^[18]。 γ H2AX 是 DNA 双链断裂的标志物, 表明肿瘤细胞和组织中存在基因组不稳定性及端粒功能障碍^[19]。RNA-seq 法检测结合生物信息学分析发现: A549R 中参与非同源末端连接、mRNA 监测途径和 DNA 复制等信号通路的基因表达上调。随后的验证实验结果表明: 与 A549 组比较, A549R 组细胞中 MSH2、MSH6 和 RAD50 mRNA 及 γ H2AX 的蛋白表达水平均升高, 表明 A549R 细胞基因组不稳定性增加, DNA 容易发生断裂, 且

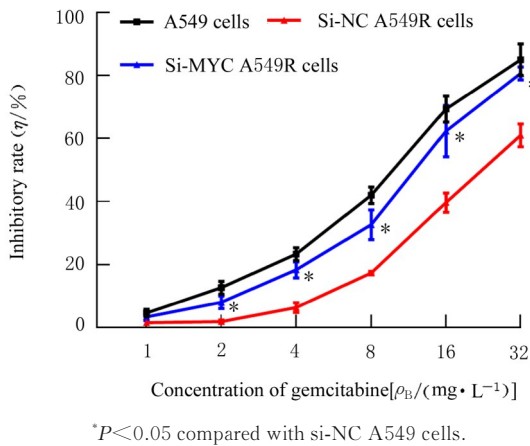


图8 吉西他滨作用后3组细胞抑制率

Fig. 8 Inhibitory rates of cells in three groups after treated with gemcitabine

断裂后的修复方式易引入基因突变, 该机制可能参与吉西他滨化疗耐药过程。

MYC作为一种原癌基因, 是维持多种癌症生长的多个细胞过程中的重要信号枢纽^[20]。MYC调节RNA的表达, 与肿瘤的中枢代谢途径、细胞死亡、增殖、分化和应激途径相关^[21]。Pol II可通过与一系列转录激活蛋白质相结合, 促进基因的转录^[22]。本研究结果显示: A549R细胞中RNA pol II在MYC-TSS和MYC exon 2上富集程度增加, MYC mRNA和蛋白表达水平升高, 而敲低MYC可恢复对吉西他滨的耐药性, 表明NSCLC对吉西他滨产生耐药性与MYC的表达水平有关。γH2AX在MYC-TSS和MYC exon 2上富集程度增加, A549R细胞MYC exon 2上也存在G254A基因突变, 表明吉西他滨耐药NSCLC细胞株中MYC基

因可能已发生DNA断裂和修复, 并由此产生了基因突变。研究^[23]显示: G254A基因型多态性与癌症风险增加显著, 提示G254A可能在吉西他滨诱导NSCLC产生耐药性中发挥重要作用, 还有待进一步研究。

综上所述, 本课题组发现吉西他滨耐药细胞株基因组不稳定性增加, MYC基因存在突变和扩增, 而敲低MYC恢复NSCLC细胞对吉西他滨的耐药性。MYC有望作为NSCLC中与吉西他滨联合用药的新治疗靶点, 可为进一步探讨NSCLC的耐药机制提供新的思路。

利益冲突声明:

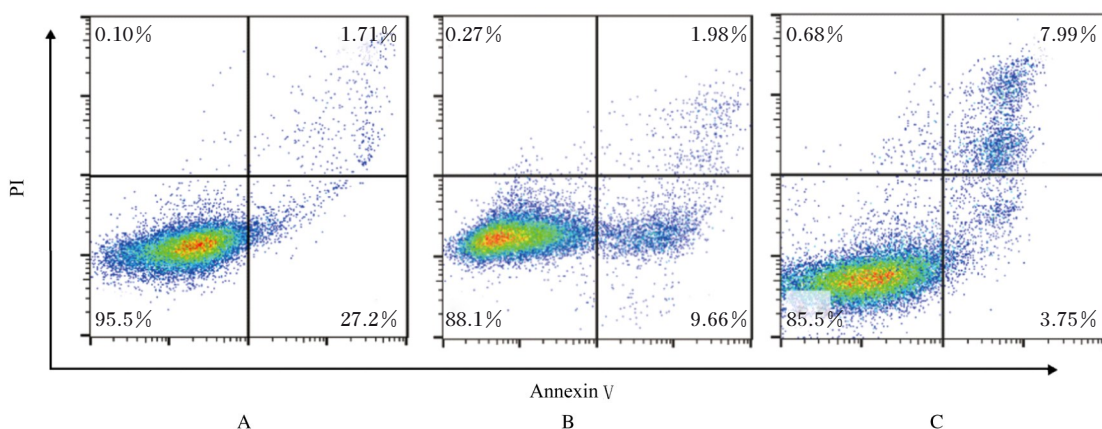
所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

陈宗军和陈亚红负责论文的整体设计, 陈宗军负责论文的撰写, 黄丽云和梁紫盈负责数据的统计学分析。

[参考文献]

- [1] MILLER K D, FIDLER-BENAOUDIA M, KEEGAN T H, et al. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(6):443-459.
- [2] MOLINA J R, YANG P, CASSIVI S D, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5):584-594.
- [3] JONNA S, SUBRAMANIAM D S. Molecular diagnostics and targeted therapies in non-small cell lung cancer (NSCLC): an update[J]. Discov Med, 2019, 27(148):167-170.
- [4] NEGRI M, GENTILE A, ANGELIS C D, et al.



A: Si-NC A549R cells; B: Si-MYC A549R cells; C: A549 cells.

图9 吉西他滨作用后3组细胞凋亡率

Fig. 9 Apoptotic rates of cells in three groups after treated with gemcitabine

- Vitamin D-induced molecular mechanisms to potentiate cancer therapy and to reverse drug-resistance in cancer cells[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6):1798.
- [5] WEI L, WEN J Y, CHEN J, et al. Oncogenic ADAM28 induces gemcitabine resistance and predicts a poor prognosis in pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(37):5590-5603.
- [6] XIE X M, LEE J, LIU H, et al. Birinapant enhances gemcitabine's antitumor efficacy in triple-negative breast cancer by inducing intrinsic pathway-dependent apoptosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(2):296-306.
- [7] LIU K, GENG Y, WANG L, et al. Systematic exploration of the underlying mechanism of gemcitabine resistance in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(16):3034-3051.
- [8] 钱麒麟, 袁改利, 马珊珊, 等. 槲皮素通过 miR-101/EZH2 轴介导的 EMT 途径改善 NSCLC 吉西他滨耐药的机制研究[J]. *天津医药*, 2022, 50(2):125-130.
- [9] 曲智锋, 徐远, 王培. FTY720 联合吉西他滨对非小细胞肺癌肿瘤相关细胞株增殖和凋亡作用的研究[J]. *重庆医学*, 2017, 46(17):2334-2336.
- [10] LIN H, CHEN X N, PAN J N, et al. Secretion of miRNA-326-3p by senescent adipose exacerbates myocardial metabolism in diabetic mice [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1):278.
- [11] 赵坤宇, 亓妍文, 秦国慧, 等. 中性粒细胞淋巴细胞比值和淋巴细胞单核细胞比值对 PD-1 抑制剂治疗的晚期非小细胞肺癌患者预后的预测价值[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2022, 57(3):379-382.
- [12] KIM M S, YANG S H, KIM M S. TRPML3 enhances drug resistance in non-small cell lung cancer cells by promoting Ca^{2+} -mediated lysosomal trafficking [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 627:152-159.
- [13] SZAKÁCS G, PATERSON J K, LUDWIG J A, et al. Targeting multidrug resistance in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(3):219-234.
- [14] PARK J M, PENG J M, SHEN Y S, et al. Phosphomimetic Dicer S1016E triggers a switch to glutamine metabolism in gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Mol Metab*, 2022, 65:101576.
- [15] CHEN C, ZHAO S J, ZHAO X R, et al. Gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells is mediated by IGF1R dependent upregulation of CD44 expression and isoform switching[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8):682.
- [16] TOSCHI L, FINOCCHIARO G, BARTOLINI S, et al. Role of gemcitabine in cancer therapy[J]. *Future Oncol*, 2005, 1(1):7-17.
- [17] TUNG C L, CHIU H C, JIAN Y J, et al. Down-regulation of MSH2 expression by an Hsp90 inhibitor enhances pemetrexed-induced cytotoxicity in human non-small-cell lung cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 322(2):345-354.
- [18] SYED A, TAINER J A. The MRE₁₁-RAD₅₀-NBS₁ complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair[J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87:263-294.
- [19] KUO L J, YANG L X. Gamma-H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks [J]. *In Vivo*, 2008, 22(3):305-309.
- [20] WANG X F, ZHANG P H, DENG K. MYC promotes LDHA expression through microRNA-122-5p to potentiate glycolysis in hepatocellular carcinoma [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2022, 2022:1435173.
- [21] HINDS J W, FERIS E J, WILKINS O M, et al. S146L in MYC is a context-dependent activating substitution in cancer development [J]. *PLoS One*, 2022, 17(8):e0272771.
- [22] CHANG H W, FEOFANOV A V, LYUBITELEV A V, et al. N-terminal tails of histones H2A and H2B differentially affect transcription by RNA polymerase II *in vitro* [J]. *Cells*, 2022, 11(16):2475.
- [23] MAO H J, CUI R F, WANG X C. Association analysis of selenoprotein S polymorphisms in Chinese Han with susceptibility to gastric cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):10993-10999.