

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.003

干扰素诱导基因 IFIT3 对膀胱癌细胞生物学功能及化疗耐药性的影响 *

徐志成 秦卫军 杨力军 韩东辉 田春娟[△]

(中国人民解放军空军军医大学第一附属医院泌尿外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨干扰素诱导基因 IFIT3 在膀胱癌中的表达及对膀胱癌细胞生物学功能和化疗耐药性的影响。**方法:**本研究通过 qRT-PCR 或 Western blot 检测了 30 例膀胱移行细胞癌患者的肿瘤组织和配对正常癌旁组织标本以及人膀胱癌细胞系 T24 及人膀胱上皮永生细胞 SV-HUC-1 中 IFIT3 的表达水平。通过浓度递增法构建顺铂(DDP)耐药 T24 细胞(T24/DDP), 然后对细胞转染靶向 IFIT3 的 siRNA(si-IFIT3)及阴性对照(si-NC)。将细胞分为 4 组, 分别为 T24-si-NC 组、T24-si-IFIT3 组、T24/DDP-si-NC 组、T24/DDP-si-IFIT3 组, 通过 MTT 法检测细胞增殖, 使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡, 使用 Transwell 法检测细胞侵袭能力。通过 qRT-PCR 或 Western blot 检测 HSP90 α (HSP90AA1)、MMP2、MMP9、Cleaved-caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达水平。**结果:**与配对癌旁组织和 SV-HUC-1 相比, 膀胱癌组织和 T24 细胞中 IFIT3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.001$)。与正常 T24 细胞相比, T24/DDP 细胞中的 IFIT3 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$)。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组的 IC₅₀ 值和侵袭细胞数显著降低, 而细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组的 Bcl-2、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量显著降低, 而 Bax 和 Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。String 数据库显示, IFIT3 与 HSP90AA1 基因存在互作关系。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组的 HSP90 α (HSP90AA1)表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论:**下调 IFIT3 的表达可抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭, 并促进细胞凋亡, 下调 IFIT3 可部分通过抑制 HSP90 α (HSP90AA1)的表达来降低膀胱癌细胞对顺铂的耐药性。

关键词: 干扰素诱导基因; IFIT3; 膀胱癌; 化疗耐药性; 热休克蛋白 90

中图分类号: R-33; R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)21-4011-08

The Mechanism of Interferon-inducible Gene IFIT3 in Chemotherapy Resistance of Bladder Cancer*

XU Zhi-cheng, QIN Wei-jun, YANG Li-jun, HAN Dong-hui, TIAN Chun-juan[△]

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Airforce Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of interferon-induced gene IFIT3 in bladder cancer and its influence on the biological function and chemotherapy resistance of bladder cancer cells. **Methods:** In this study, IFIT3 expression in 30 bladder transitional cell carcinoma patients' tumor tissues and paired normal adjacent tissue specimens as well as human bladder cancer cell line T24 and human bladder epithelial immortalized cells SV-HUC-1 were detected by qRT-PCR or Western blot. The cisplatin (DDP) resistant T24 cells (T24/DDP) were constructed by the concentration increasing method, and then the cells were transfected with siRNA targeting IFIT3 (si-IFIT3) and a negative control (si-NC). The cells were divided into 4 groups, namely T24-si-NC group, T24-si-IFIT3 group, T24/DDP-si-NC group, T24/DDP-si-IFIT3 group. MTT method was used to detect cell proliferation, Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit was used to detect cell apoptosis, and Transwell method was used to detect cell invasion ability. The expressions of HSP90 α (HSP90AA1), MMP2, MMP9, Cleaved-caspase-3, Bcl-2 and Bax were detected by qRT-PCR or Western blot. **Results:** Compared with paired adjacent tissues and SV-HUC-1, the expression levels of IFIT3 mRNA or protein in bladder cancer tissues and T24 cells were significantly increased ($P<0.001$). Compared with normal T24 cells, IFIT3 mRNA and protein expression levels in T24/DDP cells were significantly increased ($P<0.001$). Compared with the T24/DDP-si-NC group, the IC₅₀ value and the number of invaded cells in the T24/DDP-si-IFIT3 group were significantly reduced, while the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the T24/DDP-si-NC group, the relative expression of Bcl-2, MMP2 and MMP9 protein in the T24/DDP-si-IFIT3 group was significantly reduced, while the relative expression of Bax and Cleaved-caspase-3 protein was significantly increased ($P<0.05$). The String database showed that there was an interaction between IFIT3 and HSP90AA1 genes. Compared with the T24/DDP-si-NC group, the expression level of HSP90 α (HSP90AA1) in the T24/DDP-si-IFIT3 group was significantly lower ($P<0.05$). **Conclusion:** Down-regulating the expression of IFIT3 can inhibit the proliferation and invasion of bladder cancer cells, and promote cell apoptosis. Down-regulating the

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81772734)

作者简介: 徐志成(1982-), 男, 硕士, 主治医师, E-mail: ZhichengXu1982@163.com

[△] 通讯作者: 田春娟(1981-), E-mail: 992097543@qq.com

(收稿日期: 2021-03-15 接受日期: 2021-04-10)

expression of IFIT3 can reduce the resistance of bladder cancer cells to cisplatin in part by inhibiting the expression of HSP90 α (HSP90AA1).

Key words: Interferon-inducible gene; IFIT3; Bladder cancer; Chemotherapy resistance; Heat shock protein 90

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4011-08

前言

据报道,三分之一的膀胱癌(bladder cancer,BCa)患者在确诊时存在肌层浸润,其中半数患者在2年内发生肺、肝和骨的远处转移^[1]。以顺铂(cisplatin,DDP)为基础的全身化疗是转移性膀胱癌的一线治疗选择。虽然顺铂化疗的初始有效率高达50-70%,但大多数膀胱癌患者可能复发,在过去的20年里,转移性膀胱癌的5年生存率只有6%^[2-4]。转移性膀胱癌患者的疗效并没有显著改善,主要与化疗耐药性有关。化疗或靶向治疗的失败往往与癌细胞的固有或获得性耐药性有关。抗癌药物耐药性可由多种内在细胞机制引起,包括细胞内药物分布的改变、药物代谢的改变、细胞凋亡的减少、ATP结合盒转运体促进药物外排、DNA损伤修复增强、细胞周期失调以及药物-靶点相互作用减少,这些耐药机制主要是由于异常的基因表达所引起。IFIT3(interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3)基因家族是干扰素诱导基因中被广泛研究的抗病毒基因^[5],参与多种生物学过程,如细胞增殖、迁移、病毒诱导的翻译起始、复制和双链RNA信号转导^[6]。最近的研究表明,在各种癌症中,与亲本细胞系相比,在DNA损伤抗性亚系中观察到IFIT1和IFIT3基因的表达增加^[7]。IFIT1和IFIT3在化疗后残留乳腺癌组织中也上调^[8]。各种药物治疗的疗效取决于癌细胞中活跃的细胞机制。因此,靶向特异性IFITs可能是治疗膀胱癌的一种新的策略。然而,目前尚不清楚IFIT3在膀胱癌中的功能,以及是否调节膀胱癌的化疗耐药性。因此,本研究旨在探究IFIT3在膀胱癌化疗耐药性中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DDP购自美国Sigma公司;RPMI 1640培养基购自Gibco公司;Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司;高纯度总RNA提取试剂盒和Super M-MLV逆转录酶购自北京百泰克生物技术有限公司;SYBR Premix Ex Taq购自日本TaKaRa公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司;IFIT3、HSP90 α 、基质金属蛋白酶2(MMP2)、MMP9、Cleaved-caspase-3、Bcl-2、Bax和 β -actin一抗及HRP标记的IgG二抗均购自英国Abcam公司;RIPA缓冲液、BCA蛋白分析试剂盒、结晶紫、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒和增强化学发光(ECL)试剂购自碧云天生物技术研究;Transwell购自美国康宁公司。人膀胱癌细胞系T24及人膀胱上皮永生细胞SV-HUC-1购自美国ATCC。

1.1.2 患者组织标本收集 收集2018年3月至2020年3月期间在中国人民解放军空军军医大学第一附属医院经病理诊断确诊的30例膀胱移行细胞癌患者的肿瘤组织和配对正常癌

旁组织标本。液氮冷冻后放入-80℃保存。患者为首次确诊、既往未进行过放化疗、入院前半个月无严重感染、无其他恶性肿瘤或严重心肝肾等器官损伤。男性和女性各15例,年龄60~80岁,中位年龄72岁,I~II期13例、III~IV期17例,淋巴结转移12例、无淋巴结转移18例,低分化13例、中分化6例、高分化11例。本研究方案经过我院伦理委员会批准,所有参与者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 T24细胞培养及耐药细胞株的建立 使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液培养T24及SV-HUC-1细胞,将细胞置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。2d换液1次,2~3d传代1次,对数生长期的细胞用于实验。参考文献^[9]方法建立耐药细胞株,DDP的初始剂量为0.05 μ g/mL,使用浓度递增法逐步增加DDP浓度,2~3d换液,当T24细胞最终能在含有0.6 μ g/mL DDP的细胞培养基中稳定生长时表示DDP耐药T24细胞株成功建立,命名为T24/DDP。

1.2.2 细胞转染与分组 委托上海吉玛制药技术有限公司设计并合成靶向IFIT3的siRNA(si-IFIT3)和阴性对照siRNA(si-NC)。序列如下:si-IFIT3,正向5'-GCUAUCUCGAUG-GAUAUAUAdTdT-3',反向5'-dTdTTCGCCUAAGAUAUAUGCU-UAU-3';si-NC,正向5'-UUCGAAGUCUCCACGCGUUTT-3',反向5'-UUCUCCUAGAAGUGCAUAUUA-3'。将T24细胞和T24/DDP细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种于六孔板,当达到80%融合时,利用Lipofectamine 3000对细胞进行转染。通过qRT-PCR方法检测转染效率。将细胞分为4组,分别为T24-si-NC组(T24细胞转染阴性对照siRNA)、T24-si-IFIT3组(T24细胞转染靶向IFIT3的siRNA)、T24/DDP-si-NC组(T24/DDP细胞转染阴性对照siRNA)、T24/DDP-si-IFIT3组(T24/DDP细胞转染靶向IFIT3的siRNA),然后进行后续实验。

1.2.3 细胞活力测定 通过四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖。细胞以 4×10^3 个/孔的密度接种在96孔板中。细胞贴壁后,分别用不同浓度的DDP处理各组T24细胞(0、5、10、15、20、25和30 μ g/mL),孵育24h后,更换为含0.5 mg/mL MTT的新鲜培养液。37℃孵育4h后,丢弃上清液,在黑暗中向每孔中加入150 μ L二甲基亚砜。10 min后,用BioTek Microplate Reader在570 nm处测量吸光度。计算各组DDP的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 细胞凋亡检测 使用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。将细胞置于6孔培养皿中,生长至90%汇合后,用10 μ g/mL DDP处理48h,收集细胞,洗涤,再悬浮在500 μ L结合缓冲液中。然后用5 μ L AnnexinV和10 μ L PI在室温黑暗中孵育15 min。Beckman Cytoflex流式细胞仪检测凋亡细胞百分率。

1.2.5 Transwell 试验 Transwell 法检测细胞侵袭能力。细胞转染及 10 $\mu\text{g/mL}$ DDP 处理后,以 1×10^5 个/mL 的密度重新悬浮。Transwell 小室预涂有 Matrigel。将 200 μL 的细胞悬液加入上室,下室加入含 30% 胎牛血清的 800 μL 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后,用棉签擦拭上表面去除非侵袭细胞。剩余细胞室温下用 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.5% 结晶紫染色 5 min。在光学显微镜下随机选择五个不同的区域对染色的细胞进行计数。

1.2.6 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平 用高纯度总 RNA 提取试剂盒提取组织或细胞总 RNA,用 Super M-MLV 逆转录酶合成 cDNA。在美国 ABI 7900HT 实时荧光定量 PCR 仪上使用 SYBR Premix Ex Taq 进行 PCR。引物序列为:IFIT3,上游引物:5'-TCAGAAGTCTAGTCACTTGGGG-3',下游引物:5'-ACACCTTCGCCCTTTCATTTC-3';HSP90AA1,上游引物:5'-TCGCCTTTCAGGCAGAAATTGC-3',下游引物:5'-CGACTTTTGT-CCACGACCCATA-3'; β -actin,上游引物:5'-ATGACGGCTTCATTGACC-3',下游引物:5'-GAAGATGGT-GATAAGATTT-3'。将 IFIT3 和 HSP90AA1 的表达水平标准化为 β -actin。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法确定基因相对表达量。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达水平 使用添加蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 缓冲液从细胞中提取总蛋白。用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后

转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h,然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与 IFIT3 (1:1000)、HSP90 α (1:1000)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2,1:500)、MMP9 (1:500)、Cleaved-caspase-3 (1:2000)、Bcl-2 (1:2000)、Bax (1:1000) 和 β -actin (1:2000)。的一抗体孵育过夜,然后将膜与 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:1000) 在室温下孵育 45 min,用增强化学发光 (ECL) 试剂显示条带。将目的蛋白的表达水平归一化为 β -actin 的表达水平。

1.3 统计分析

使用 SPSS21.0 软件进行统计分析。除了临床标本为 30 份外,本研究中的数据均以 3 至 6 次重复的平均值 $\pm$ 标准差表示。两组间比较使用 t 检验、多组间比较使用单因素方差分析及 LSD 事后检验。数据均符合正态分布。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌组织和细胞系中 IFIT3 的表达

与配对癌旁组织相比,膀胱癌组织中 IFIT3 mRNA 的相对表达量升高了 1.91 倍 ($P < 0.001$)。与人膀胱上皮永生细胞 SV-HUC-1 相比,人膀胱癌细胞系 T24 中 IFIT3 mRNA 的相对表达量升高了 5.21 倍,蛋白相对表达量升高了 2.13 倍 ($P < 0.001$)。见图 1。

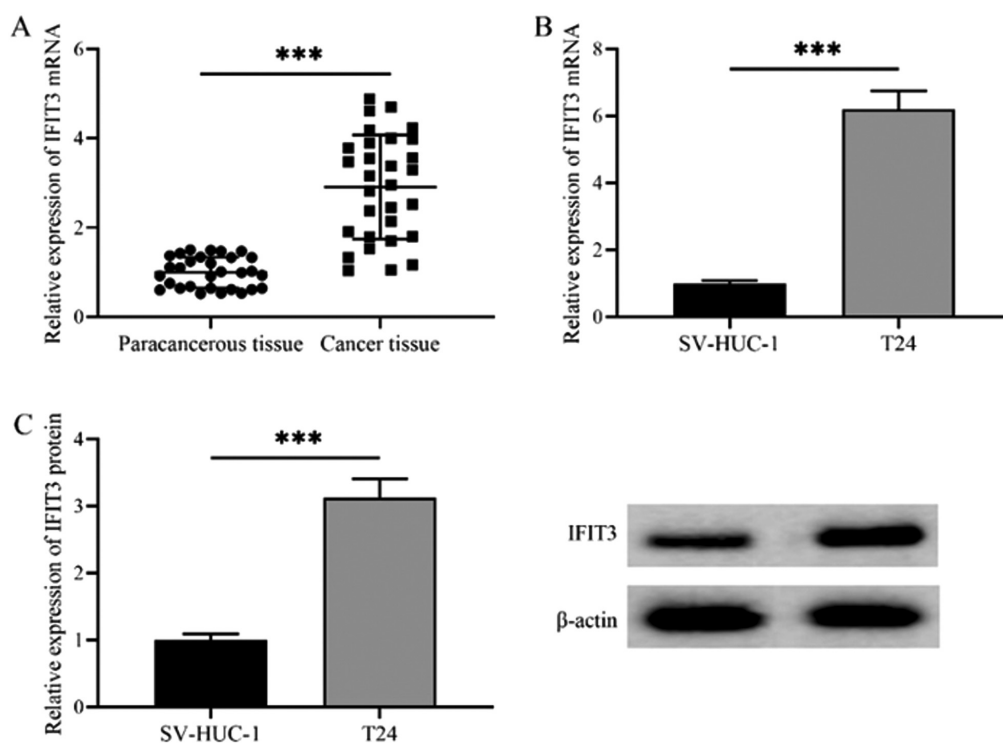


图1 膀胱癌组织和细胞系中 IFIT3 的表达

Fig. 1 Expression of IFIT3 in bladder cancer tissues and cell lines

Note: A: relative expression of IFIT3 mRNA in 30 bladder cancer tissues and paracancerous tissue, compared with paracancerous tissue; B and C: relative expression of IFIT3 mRNA and protein in T24 cells and SV-HUC-1 cells; compared with SV-HUC-1, *** $P < 0.001$.

2.2 IFIT3 在 DDP 耐药 T24 细胞中的表达

与正常 T24 细胞相比,DDP 耐药 T24 细胞 (T24/DDP) 中的 IFIT3 mRNA 的相对表达量升高了 3.34 倍,蛋白相对表达量升高了 1.76 倍 ($P < 0.001$)。见图 2。

2.3 下调 IFIT3 对 T24 细胞增殖的影响

与 si-NC 组细胞相比,si-IFIT3 组 T24 细胞中 IFIT3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著降低 ($P < 0.001$)。使用不同浓度的 DDP 处理 T24 细胞 (0、5、10、15、20、25 和 30 $\mu\text{g/mL}$) 24 h 后,

计算各组 DDP 的半数抑制浓度(IC_{50}),结果显示,与 T24-si-NC 组 ($20.86 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$) 相比,T24-si-IFIT3 组 ($18.25 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$) 的 IC_{50} 显著降低 ($P<0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组 ($24.26 \pm 1.70 \mu\text{g/mL}$) 相比,T24/DDP-si-IFIT3 组 (21.83 ± 1.53

$\mu\text{g/mL}$) 的 IC_{50} 也显著降低 ($P<0.05$)。并且,T24/DDP-si-NC 组的 IC_{50} 高于 T24-si-NC 组,T24/DDP-si-IFIT3 组的 IC_{50} 高于 T24-si-IFIT3 组 ($P<0.05$)。见图 3。

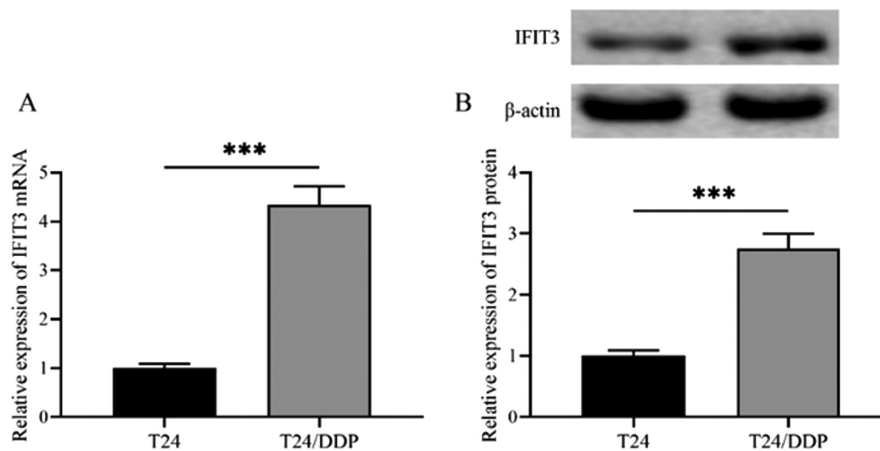


图 2 IFIT3 在 DDP 耐药 T24 细胞中的表达

Fig.2 Expression of IFIT3 in DDP-resistant T24 cells

Note: A: the relative expression of IFIT3 mRNA in normal T24 cells and DDP-resistant T24 cells; B: the relative expression of IFIT3 mRNA in normal T24 cells and DDP-resistant T24 cells; compared with T24 cell, *** $P<0.001$.

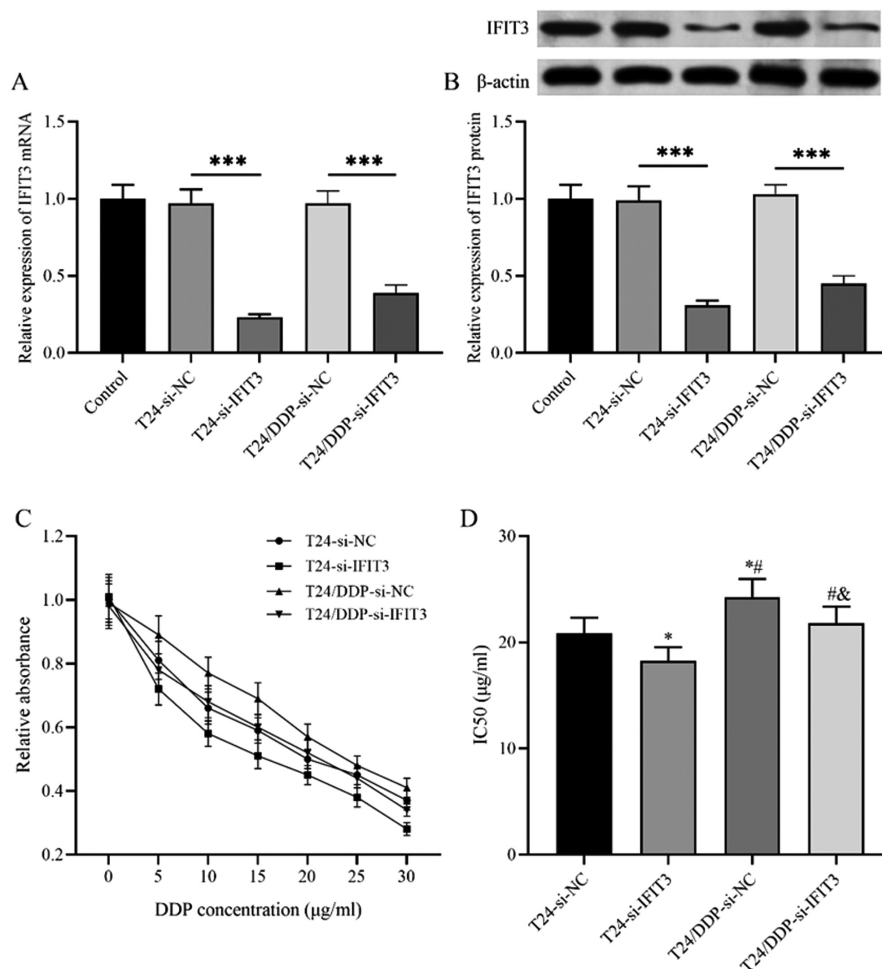


图 3 下调 IFIT3 对 T24 细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of down-regulation of IFIT3 on the proliferation of T24 cells

Note: A and B: transfection of si-IFIT3 down-regulated IFIT3 mRNA and protein expression in T24 cells, *** $P<0.001$; C: relative cell viability after treatment with different concentrations of DDP; D: IC_{50} value of each group of cells, compared with T24-si-NC group, * $P<0.05$; compared with T24-si-IFIT3 group, # $P<0.05$; compared with T24/DDP-si-NC group, & $P<0.05$.

2.4 下调 IFIT3 对 T24 细胞凋亡的影响

与 T24-si-NC 组 ($14.17 \pm 0.99\%$) 相比, T24-si-IFIT3 组 ($37.50 \pm 2.62\%$) 的细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组 ($3.24 \pm 0.23\%$) 相比, T24/DDP-si-IFIT3 组 ($13.59 \pm 0.95\%$) 的细胞凋亡率也显著升高 ($P < 0.05$)。此外, 与

T24-si-NC 组相比, T24-si-IFIT3 组的 Bcl-2 蛋白相对表达量显著降低, 而 Bax 和 Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组 Bcl-2 蛋白相对表达量显著降低, 而 Bax 和 Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。见图 4。

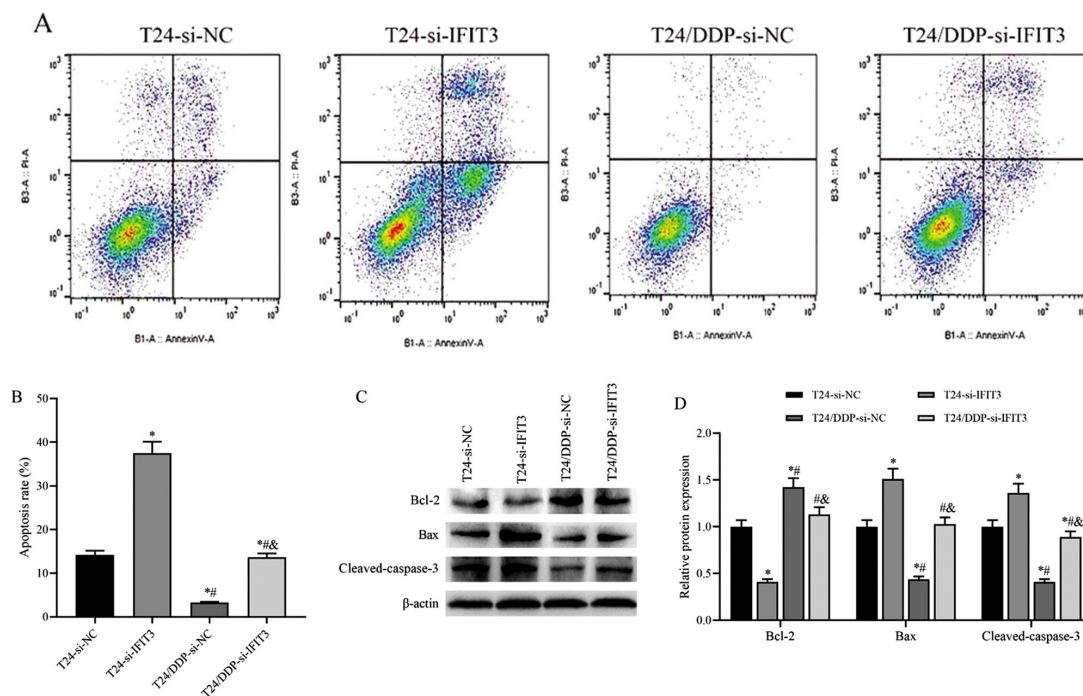


图 4 下调 IFIT3 对 T24 细胞凋亡的影响

Fig. 4 The effect of down-regulation of IFIT3 on T24 cell apoptosis

Note: A and B: Apoptosis rate of each group detected by flow cytometry; C and D: Western blot detection of the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and Cleaved-caspase-3 in each group of cells; compared with T24-si-NC group, * $P < 0.05$; compared with T24-si-IFIT3 group, # $P < 0.05$; compared with T24/DDP-si-NC group, & $P < 0.05$

2.5 下调 IFIT3 对 T24 细胞侵袭的影响

与 T24-si-NC 组 (64.50 ± 4.51) 相比, T24-si-IFIT3 组 (19.17 ± 1.34) 的侵袭细胞数显著降低 ($P < 0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组 (89.00 ± 6.22) 相比, T24/DDP-si-IFIT3 组 (63.00 ± 4.41) 的侵袭细胞数也显著降低 ($P < 0.05$)。此外, 与 T24-si-NC 组相比, T24-si-IFIT3 组的 MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组的 MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 下调 IFIT3 对 T24 细胞中 HSP90 α (HSP90AA1) 表达的影响

为了确定 IFIT3 如何介导膀胱癌的化疗耐药, 使用 String 软件构建了 IFIT3 的蛋白互作网络图谱。结果显示, IFIT3 与 HSP90AA1 基因存在互作关系。与 T24-si-NC 组相比, T24-si-IFIT3 组的 HSP90AA1 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组的 HSP90AA1 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。此外, 与 T24-si-NC 组相比, T24-si-IFIT3 组的 HSP90 α 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 T24/DDP-si-NC 组相比, T24/DDP-si-IFIT3 组的 HSP90 α 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

人类 IFIT 基因家族由 4 个基因组成, 分别命名为 IFIT1、IFIT2、IFIT3 和 IFIT5。在大多数细胞中, IFIT 基因的表达非常低, 而干扰素 (IFN) 治疗、病毒感染和病原体相关分子模式则大大增强了 IFIT 基因的表达。IFIT 基因编码的蛋白质是细胞质蛋白, 没有已知的酶活性, 但具有多个 TPR (tetratricopeptide repeat) 结构域, 能够参与蛋白质间的相互作用^[10]。IFIT1、IFIT2 和 IFIT3 可以在细胞内形成蛋白质复合物, IFIT3 充当中央支架, 调节 IFIT1 和 IFIT2 的功能^[11]。另外, 异位表达 IFIT3 也以剂量依赖的方式诱导内源性 IFIT1 的表达^[12]。许多研究已经广泛证明了人类 IFIT 蛋白的抗病毒功能^[5]。另外, IFIT 蛋白是许多癌症的预后标志物, 如胶质母细胞瘤、肝细胞癌、乳腺癌和胰腺癌^[13-15]。最近 Huang 等人研究表明, IFIT5 的表达与膀胱癌的病理特征呈正相关, 并可预测患者的预后不良, IFIT5 可通过下调成熟 miR-99a 的表达, 诱导膀胱癌发生上皮间质转化, 从而促进细胞迁移和侵袭, 该文献认为 IFIT5 是膀胱癌中一个新的癌基因^[16]。然而, 目前尚不清楚 IFIT3 在膀胱癌中的表达模式。本研究结果显示, 膀胱癌组织和细胞系中 IFIT3 的表达显著增加, 说明 IFIT3 在膀胱癌中可能具有癌基因的作用。其他文献报道, IFIT3 在口腔鳞状细胞癌、胰腺导管腺癌中上调, 并且参

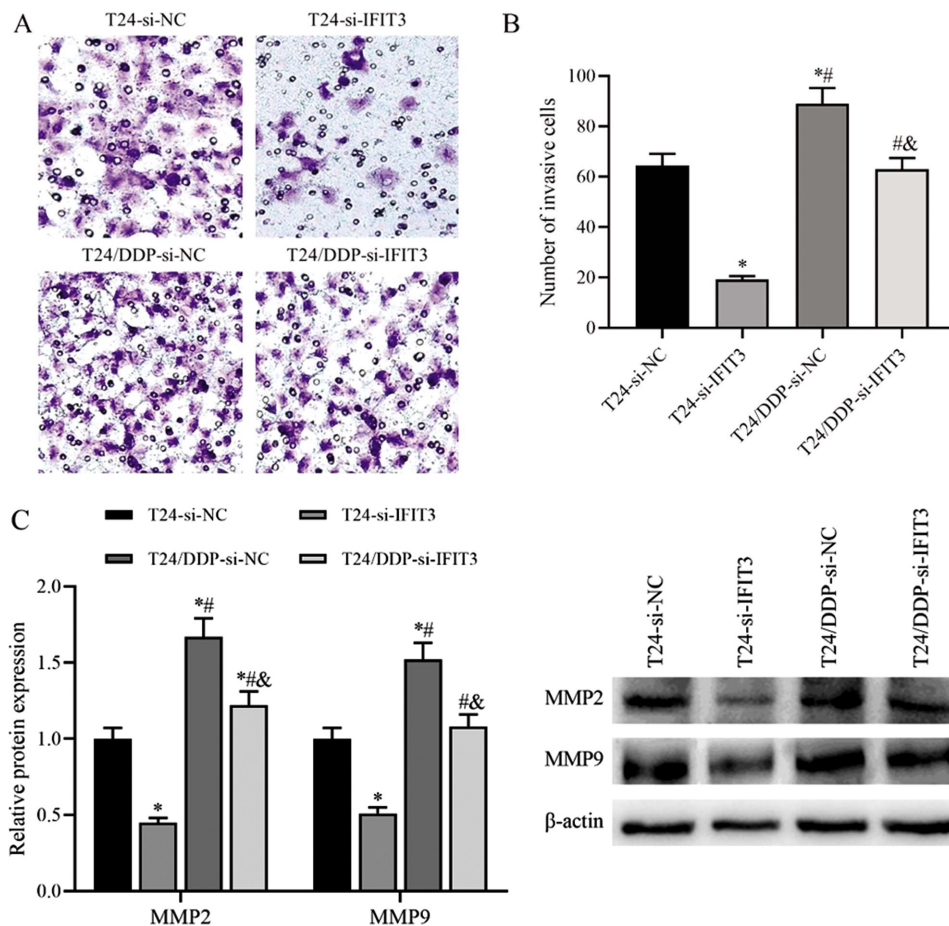


图 5 下调 IFIT3 对 T24 细胞侵袭的影响

Fig.5 The effect of down-regulation of IFIT3 on T24 cell invasion

Note: A and B: the number of cell migration in each group detected by Transwell, magnification: $\times 100$; C: Western blot detection of the expression of metastasis-related proteins MMP2 and MMP9 in each group of cells; compared with T24-si-NC group, * $P < 0.05$; compared with T24-si-IFIT3 group, # $P < 0.05$; compared with T24/DDP-si-NC group, & $P < 0.05$.

与调控癌细胞的增殖和转移^[10,15]。然而,IFIT3 已被证明通过增强白血病 U937 细胞中 p27 和 p21 等细胞周期负调控因子的表达而具有抗增殖活性^[17]。IFIT 蛋白根据细胞类型和组织类型执行多种复杂的细胞功能。因此,IFIT 蛋白的功能可以根据细胞系统的不同而改变。此外,本研究通过转染靶向 IFIT3 的 siRNA(si-IFIT3)下调了 T24 细胞中 IFIT3 mRNA 和蛋白的表达,结果显示,下调 IFIT3 抑制了 T24 细胞的增殖和侵袭活性,并且促进了细胞凋亡。这些结果说明 IFIT3 可能是膀胱癌的潜在靶向治疗靶点。

Pidugu 等人报道,IFIT1 和 IFIT3 可促进口腔鳞状细胞癌的转移,并导致顺铂和 5-FU 耐药^[10]。另外,IFIT1 和 IFIT3 被证明促进 p-EGFR 循环,导致口腔鳞癌细胞对吉非替尼的敏感性增加^[18]。IFIT3 在胰腺导管腺癌中上调,并且 IFIT3 的高表达与接受化疗的胰腺导管腺癌患者的生存不良相关,表明 IFIT3 与癌细胞的化疗耐药性有关^[15]。到目前为止,IFIT3 在膀胱癌化疗耐药中的分子基础尚不清楚。为了验证 IFIT3 是否参与膀胱癌细胞的耐药机制,本研究构建了 DDP 耐药的 T24 细胞株(T24/DDP),结果显示,T24/DDP 与正常 T24 细胞相比,T24/DDP 细胞中的 IFIT3 mRNA 和蛋白表达水平均升高,提示 IFIT3 可能参与了膀胱癌细胞的耐药机制。进一步研究显示,下调 IFIT3 可降低 DDP 处理的 T24/DDP 细胞的 IC₅₀、抑制

T24/DDP 细胞的侵袭能力并诱导细胞凋亡。这些结果证实了膀胱癌细胞的 DDP 耐药性升高与 IFIT3 的异常高表达有关。

为了进一步研究 IFIT3 参与膀胱癌耐药的分子机制,本研究使用 String 软件构建了 IFIT3 的蛋白互做网络图谱。分析表明,IFIT3 与 HSP90AA1 基因存在互作关系。HSP90AA1 基因编码 HSP90 α 蛋白。已知热休克蛋白 90(heat-shock protein 90, HSP90)是一种分子伴侣蛋白,参与调节许多癌蛋白的稳定性和功能,这些癌蛋白被称为客户蛋白,参与肿瘤细胞的恶性转化^[19,20]。HSP90 调节 200 多个客户蛋白的折叠和激活,包括 EGFR、AKT、p38 等^[21-23]。在健康细胞中,HSP90 伴侣复合体是细胞对细胞外信号反应的促进器。在癌细胞中,HSP90 激活许多致癌客户蛋白,刺激细胞存活、生长和侵袭。HSP90 的生物学功能依赖于其固有的 ATPase 活性,该活性受其许多辅助伴侣的调节。新的证据表明,许多 TPR 蛋白充当辅助伴侣,如 HSP90 组织蛋白和 Hsc70 相互作用蛋白的羧基末端,并在稳定伴侣蛋白与其客户蛋白与其客户蛋白之间的相互作用方面发挥关键作用^[24]。HSP90 蛋白包括 HSP90 α 和 HSP90 β 蛋白等多种亚型。目前,多种 HSP90 抑制剂正在用于几种癌症的临床前研究^[25-27]。此外,HSP90 参与调节多种癌细胞的化疗敏感性^[28]。最近的文献报道,HSP90 抑制剂 17-AAG 可能改善基于顺铂的联合化疗治疗晚期膀胱癌的疗效^[29]。本研究结果证实,下调

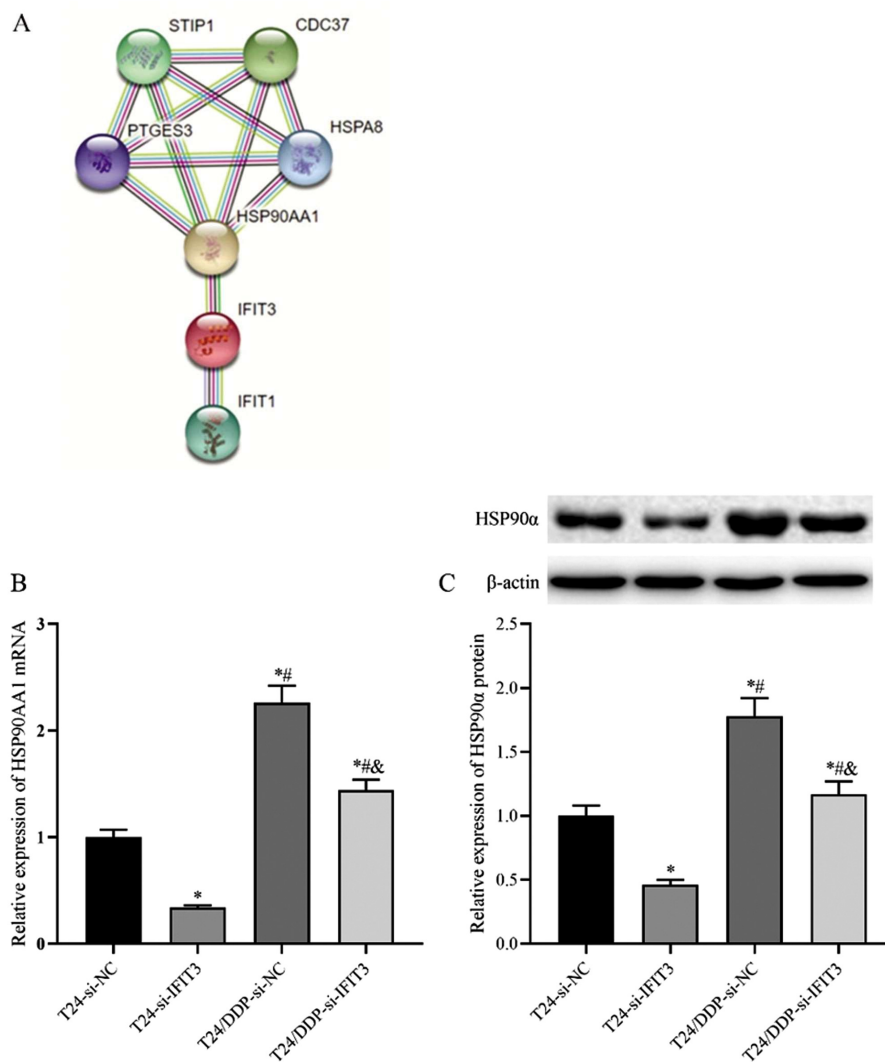


图 6 下调 IFIT3 对 T24 细胞中 HSP90α(HSP90AA1)表达的影响

Fig. 6 The effect of down-regulation of IFIT3 on the expression of HSP90α (HSP90AA1) in T24 cells

Note: A: IFIT3 protein interaction network map constructed by String software. B: qRT-PCR detection of HSP90AA1 mRNA expression in each group of cells; C: Western blot detection of HSP90α protein expression in each group of cells; compared with T24-si-NC group, * $P < 0.05$; compared with T24-si-IFIT3 group, # $P < 0.05$; compared with T24/DDP-si-NC group, & $P < 0.05$.

IFIT3 降低了 DDP 处理的 T24/DDP 细胞中 HSP90α (HSP90AA1) 的表达。因此, IFIT3 调节膀胱癌细胞 DDP 耐药机制部分通过调节 HSP90α(HSP90AA1) 实现的。其原因可能是由于 IFIT3 含有 TPR 结构域, 该结构域与 HSP90α 蛋白存在互作关系。然而, 在膀胱癌中介导蛋白质-蛋白质相互作用的 IFIT3 的 TPR 结构域还需要进一步的研究。

综上所述, 本研究表明 IFIT3 在膀胱癌组织和细胞系中高表达, 下调 IFIT3 的表达可抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭, 并促进细胞凋亡。此外, 下调 IFIT3 可部分通过抑制 HSP90α (HSP90AA1) 的表达来降低膀胱癌细胞对顺铂的耐药性。总之, IFIT3 可能是膀胱癌的新型诊断和治疗分子靶标。

参考文献(References)

- [1] Carlsson J, Wester K, De La Torre M, et al. EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides[J]. Radiol Oncol, 2015, 49(1): 50-58
- [2] Aragon-Ching JB, Trump DL. Systemic therapy in muscle-invasive and metastatic bladder cancer: current trends and future promises[J]. Future Oncol, 2016, 12(17): 2049-2058
- [3] Moon du G, Lee SE, Oh MM, et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells[J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 1027-1035
- [4] Park BH, Lim JE, Jeon HG, et al. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder cancer cell lines via ROS-mediated activation of ERK1/2[J]. Oncotarget, 2016, 7(39): 63870-63886
- [5] Fensterl V, Sen GC. Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis[J]. J Virol, 2015, 89(5): 2462-2468
- [6] Fensterl V, Sen GC. The ISG56/IFIT1 gene family[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(1): 71-78
- [7] Weichselbaum RR, Ishwaran H, Yoon T, et al. An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(47): 18490-18495
- [8] Legrier ME, Bièche I, Gaston J, et al. Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-nega-

- tive breast cancer[J]. Br J Cancer, 2016, 114(2): 177-187
- [9] 张义, 段良斌, 宋超, 等. Sox2 对膀胱癌细胞化疗耐药的影响及其分子机制的探讨[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(5): 387-392
- [10] Pidugu VK, Pidugu HB, Wu MM, et al. Emerging functions of human IFIT proteins in cancer[J]. Front Mol Biosci, 2019, 6: 148
- [11] Mears HV, Sweeney TR. Better together: the role of IFIT protein-protein interactions in the antiviral response [J]. J Gen Virol, 2018, 99(11): 1463-1477
- [12] Johnson B, VanBlargan LA, Xu W, et al. Human IFIT3 modulates IFIT1 RNA binding specificity and protein stability [J]. Immunity, 2018, 48(3): 487-499.e485
- [13] Yang Y, Zhou Y, Hou J, et al. Hepatic IFIT3 predicts interferon- α therapeutic response in patients of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2017, 66(1): 152-166
- [14] Zhang JF, Chen Y, Lin GS, et al. High IFIT1 expression predicts improved clinical outcome, and IFIT1 along with MGMT more accurately predicts prognosis in newly diagnosed glioblastoma [J]. Hum Pathol, 2016, 52: 136-144
- [15] Zhao Y, Altendorf-Hofmann A, Pozios I, et al. Elevated interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) is a poor prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(6): 1061-1068
- [16] Huang J, Lo UG, Wu S, et al. The roles and mechanism of IFIT5 in bladder cancer epithelial-mesenchymal transition and progression[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 437
- [17] Xiao S, Li D, Zhu HQ, et al. RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(44): 16448-16453
- [18] Pidugu VK, Wu MM, Yen AH, et al. IFIT1 and IFIT3 promote oral squamous cell carcinoma metastasis and contribute to the anti-tumor effect of gefitinib via enhancing p-EGFR recycling [J]. Oncogene, 2019, 38(17): 3232-3247
- [19] Neckers L, Blagg B, Haystead T, et al. Methods to validate Hsp90 inhibitor specificity, to identify off-target effects, and to rethink approaches for further clinical development [J]. Cell Stress Chaperones, 2018, 23(4): 467-482
- [20] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(6): 345-360
- [21] Ahsan A, Ramanand SG, Whitehead C, et al. Wild-type EGFR is stabilized by direct interaction with HSP90 in cancer cells and tumors [J]. Neoplasia, 2012, 14(8): 670-677
- [22] Basso AD, Solit DB, Chiosis G, et al. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function[J]. J Biol Chem, 2002, 277(42): 39858-39866
- [23] Ota A, Zhang J, Ping P, et al. Specific regulation of noncanonical p38 α activation by Hsp90-Cdc37 chaperone complex in cardiomyocyte[J]. Circ Res, 2010, 106(8): 1404-1412
- [24] Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(3): 624-635
- [25] Talaei S, Mellatyar H, Asadi A, et al. Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment[J]. Chem Biol Drug Des, 2019, 93(5): 760-786
- [26] Wang L, Zhang L, Li L, et al. Small-molecule inhibitor targeting the Hsp90-Cdc37 protein-protein interaction in colorectal cancer [J]. Sci Adv, 2019, 5(9): 2277
- [27] Zhang PC, Liu X, Li MM, et al. AT-533, a novel Hsp90 inhibitor, inhibits breast cancer growth and HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 172: 113771
- [28] 刘健, 刘静, 李胜泽, 等. 抑制热休克蛋白 70 表达可增强宫颈癌细胞对顺铂化疗的敏感性 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(004): 475-481
- [29] Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, et al. Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells[J]. Int J Cancer, 2012, 131(4): 987-996