

分类号:  
学 号: 2012109023

密 级: 公开  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### rhPDCD5 蛋白对肺腺癌 A549 细胞 化疗作用的研究

学 位 申 请 人	苏 帆
指 导 教 师	巩 平
申请学位门类级别	医 学 硕 士
学 科 、 专 业 名 称	免 疫 学
研 究 方 向	分 子 免 疫
所 在 学 院	医 学 院

中国·新疆·石河子  
2015 年 6 月

分类号：  
学 号：2012109023

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### rhPDCD5 蛋白对肺腺癌 A549 细胞 化疗作用的研究

学 位 申 请 人      苏 帆

---

指 导 教 师      巩 平

---

申请学位门类级别      医 学 硕 士

---

学 科 、 专 业 名 称      免 疫 学

---

研 究 方 向      分 子 免 疫

---

所 在 学 院      医 学 院

---

中国 新疆 石河子

2015 年 6 月

**Study of the Influence of RhPDCD5 Protein on Chemotherapy  
in Lung Adenocarcinoma A549 Cells**

A Dissertation Submitted to  
**Shihezi University**  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
**Master of Medicine**

**By**  
**Su Fan**  
**(Immunology)**

Dissertation Supervisor: Prof. Gong Ping

June, 2015

## 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

### 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：苏帆

时间：2015年6月9日

### 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：苏帆

时间：2015年6月9日

导师签名：苏帆

时间：2015年6月9日

# 摘 要

## 目的:

本研究通过将重组人程序性细胞死亡分子 5 (rhPDCD5) 蛋白与顺铂联合作用于肺腺癌 A549 细胞, 观察 rhPDCD5 蛋白对顺铂化疗的影响, 并探讨其可能的作用机制。

## 方法:

1. 计数法绘制 A549 细胞生长曲线;
2. 采用激光扫描共聚焦荧光显微镜检测不同浓度的 rhPDCD5 蛋白作用于 A549 细胞后对 PDCD5 蛋白表达的影响;
3. 采用 Elisa 法测不同浓度顺铂作用于 A549 细胞后对 PDCD5 蛋白的表达影响;
4. 采用 MTT 法分别检测不同浓度的 rhPDCD5 蛋白、不同浓度的顺铂对人肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率的影响, 并检测对照组、rhPDCD5 (15 mg/L)、顺铂组 (20 mg/L)、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂 20 mg/L 组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组对 A549 细胞的生长抑制作用;
5. 采用流式细胞仪检测各组对细胞凋亡、细胞周期的影响;
6. 采用 Caspase-3 活性荧光检测试剂盒检测各组细胞 Caspase-3 活性的表达。

## 结果:

1. 细胞计数法计算 A549 细胞倍增时间为 18h;
2. 激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜结果显示随着 rhPDCD5 蛋白浓度的升高, A549 细胞内 PDCD5 蛋白表达增强;
3. ELISA 结果显示随着顺铂浓度的升高, A549 细胞分泌 PDCD5 蛋白增加 ( $F=354.125, P<0.001$ );
4. MTT 结果显示, 与对照组相比, 不同浓度 rhPDCD5 蛋白对细胞增殖抑制率的作用不明显 ( $F=0.114, P=0.949$ ); 随着顺铂浓度的增高, 抑制作用逐步增强, 药物剂量与细胞增殖抑制率呈正相关 ( $F=88.564, P<0.01$ ); 对照组、rhPDCD5、顺铂组、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂 20 mg/L 组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组的抑制率分别为 (0.00±0.00) %、(0.6±1.07) %、(49.67±1.43) %、(68.17±1.49) %、(78.03±0.94) %、, 联合用药组对细胞有更强的抑制作用 ( $F=1095.472, P<0.001$ );
5. 流式细胞仪检测细胞周期结果显示, 以上各组各组间 G0/G1 期所占比例分别为 (26.43±0.95) %、(27.34±0.34) %、(47.88±0.39) %、(59.75±0.38) %、(73.78±2.11) %, 组间比差异有统计学意义 ( $F=365.501, P<0.001$ );
6. 流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示, 以上各组凋亡率分别为 (6.563±0.49) %、(5.07±0.49) %、(22.31±0.64) %、(43.30±0.62) %、(64.25±0.54) %, 组间比差异有统计学意义 ( $F=2054.594, P<0.001$ );
7. 蛋白活性荧光检测结果显示各组间 Caspase-3 的活化程度分别为 22.28±0.06、2.26±0.13、3.93±0.25、9.76±0.11、11.62±0.24, 各组间差异有统计学意义 ( $F=877.907, P<0.001$ )。

## 结论:

1. RhPDCD5 蛋白可以进入细胞发挥作用, 顺铂可以促进 A549 细胞内 PDCD5 蛋白的表达;
2. 单独应用对 A549 细胞无杀伤作用;
3. RhPDCD5 蛋白联合顺铂将细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 抑制肺腺癌, 细胞增殖;
4. RhPDCD5 蛋白联合顺铂使肺腺癌 A549 细胞 Caspase-3 活化增强, 促进细胞凋亡。

## 关键词:

肺癌; PDCD5; 化疗

## Abstract

### Objective:

The purpose of this study was to investigate the effect of rhPDCD5 combined with cisplatin on chemotherapy of A549 cells and to explore its possible mechanism.

### Methods:

1. Draw the A549 cell growth's curve by Cell counting method;
2. Using laser scanning confocal fluorescence microscope to detection the expression of PDCD5 protein after treatment with various concentrations of rhPDCD5;
3. Using Elisa method to measure the expression of PDCD5 protein after treatment with various concentrations of cisplatin;
4. The proliferation inhibition rate of the A549 cells that were treated with various concentrations of rhPDCD5 and cisplatin on 24h were detected by MTT assay; The cells were divided into 5 groups: the control group, rhPDCD5(15 mg/L) group, cisplatin group (20 mg/L), rhPDCD5 15 mg/L + cisplatin (20 mg/L) group, rhPDCD5 30 mg/L + cisplatin (20 mg/L) group , after 24h treatment, the effects of drugs on growth were detected by MTT assay;
5. The apoptoses and cell cycle were measured by flow cytometric;
6. The Caspase 3 activity was detected by fluorescence detection kit.

### Results:

1. Draw A549 cell's survival curve according the cell counting method and the cell doubling time was 18 h;
2. Laser scanning confocal fluorescence microscope showed that with the increase of rhPDCD5 protein concentration, the expression of PDCD5 protein in A549 cells was increased;
3. The ELISA showed that with the increase of cisplatin concentration, the secrete of PDCD5 protein in A549 cells was increased ( $F = 354.125$ ,  $P < 0.001$ );
4. The proliferation inhibition rate of the cancer cells treated with different concentrations of rhPDCD5 were similar to those of controls( $F=0.114$ ,  $P=0.949$ ), while those of the cells treated with different concentrations of cisplatin( $F=88.564$ ,  $P<0.01$ ); Compared to the single treatment, the combined treatment with rhPDCD5 and cisplatin has a higher inhibiting cell proliferation( $F = 130.147$ ,  $P < 0.001$ ), the proliferation inhibition rate of the control group, rhPDCD5(15 mg/L) group, cisplatin group (20 mg/L), rhPDCD5 15 mg/L + cisplatin group 20 mg/L, rhPDCD5 30 mg/L + cisplatin group 20 mg/L were  $(0.00\pm 0.00)\%$ ,  $(0.6\pm 1.07)\%$ ,  $(49.67\pm 1.43)\%$ ,  $(68.17\pm 1.49)\%$ ,  $(78.03\pm 0.94)\%$ , respectively, and there was statistically significant among these five groups( $F=1095.472$ ,  $P<0.001$ );
5. The G0 / G1 phase of the groups were  $(26.43\pm 0.95)\%$ ,  $(27.34\pm 0.34)\%$ ,  $(47.88\pm 0.39)\%$ ,  $(59.75\pm 0.38)\%$ ,  $(73.78\pm 2.11)\%$ , respectively, there was statistically significant among these five groups ( $F=365.501$ ,  $P<0.001$ );
6. Apoptotic ratio of the groups were  $(6.563\pm 0.49)\%$ ,  $(5.07\pm 0.49)\%$ ,  $(22.31\pm 0.64)\%$ ,  $(43.30\pm 0.62)\%$ ,  $(64.25\pm 0.54)\%$ , respectively, there was statistically significant among these five groups( $F=2054.594$ ,  $P<0.001$ );
7. Fluorescent protein activity tests showed the groups' Caspase 3 activation were  $22.28\pm 0.06$ ,  $2.26\pm 0.13$ ,  $3.93\pm 0.25$ ,  $9.76\pm 0.11$ ,  $11.62\pm 0.24$ , respectively, there was statistically significant among these four groups ( $F=877.907$ ,  $P<0.001$ ).

### Conclusion:

1. RhPDCD5 protein could enter the A549 cells to play a role, and cisplatin could promote the

expression of PDCD5 in A549 cells in vitro;

2.RhPDCD5 protein alone couldn't work for A549 cells;

3.RhPDCD5 combined cisplatin could arrest A549 cell line cell cycle in G0 / G1 phase, and inhibit A549 cells proliferation ;

4.RhPDCD5 protein combined cisplatin could enhance the activation of Caspase-3 to promote apoptosis.

**Keywords:**

lung cancer, PDCD5, chemotherapy.

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract .....	II
缩略语中英文对照表.....	V
引 言.....	1
材 料 与 方 法.....	5
1 材料.....	5
1.1 细胞株来源.....	5
1.2 主要试剂.....	5
1.3 主要实验仪器设备.....	5
1.4 主要溶液及药品的配制与保存.....	6
2 实验方法.....	7
2.1 A549 细胞的复苏与培养.....	7
2.2 A549 细胞的传代.....	7
2.3 A549 细胞的冻存.....	7
2.4 计数法绘制细胞生长曲线.....	7
2.5 激光扫描共聚焦荧光显微镜检测不同浓度的 rhPDCD5 蛋白作用细胞后 PDCD5 蛋白表达.....	8
2.6 Elisa 法测不同浓度顺铂对 PDCD5 蛋白的表达影响.....	8
2.7 MTT 比色法检测不同药物、不同浓度作用于 A549 细胞后细胞生长抑制作用.....	9
2.9 流式细胞仪检测细胞凋亡.....	10
2.10 流式细胞仪检测细胞周期.....	10
2.11 Caspase-3 活性荧光检测试剂盒检测各组细胞 Caspase-3 活性表达.....	10
2.12 统计学方法.....	11
结 果.....	12
1 A549 细胞的生长曲线和倍增时间.....	12
2 激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜检测不同浓度的 rhPDCD5 蛋白对 A549 细胞 PDCD5 蛋白表达的影响.....	12
3 ELISA 法检测不同浓度的顺铂对 A549 细胞 PDCD5 蛋白表达的影响.....	13
4 单药 MTT 结果.....	14
5 MTT 法检测 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对 A549 细胞细胞增殖的影响.....	15
6 流式细胞仪检测 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对肺腺癌 A549 细胞周期的影响.....	16
7 流式细胞仪检测 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对细胞凋亡影响.....	17
8 活性荧光检测试剂盒检测 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对 A549 细胞 Caspase-3 活化表达的影响.....	18
讨 论.....	20
1 RhPDCD5 蛋白单独应用对 A549 细胞的作用.....	20
2 RhPDCD5 蛋白对 A549 细胞 PDCD5 蛋白的影响.....	21
3 顺铂对肺腺癌 A549 细胞释放 PDCD5 蛋白的影响.....	21
4 RhPDCD5 蛋白对顺铂诱发凋亡及 Caspase-3 的活化的影响.....	21
5 RhPDCD5 联合顺铂对肺腺癌 A549 细胞株细胞周期的影响.....	23
6 前景与展望.....	23
结 论.....	25
参考文献.....	26
文献综述.....	29
致 谢.....	38
作 者 简 介.....	39
导师评阅表.....	40

## 缩略语中英文对照表 (Abbreviations)

英文缩写	英文全称	中文全称
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer	非小细胞肺癌
SCLC	Small Cell Lung Cancer	小细胞肺癌
PDCD5	Programmed Cell Death 5	程序性细胞死亡分子5
Caspase	Cysteine Aspartate Specific Protease	半胱氨酸蛋白酶家族
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope	激光扫描共聚焦显微镜
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PI	Propidium Iodide	碘化丙啶
DDP	Cisplatin	顺铂
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
mRNA	Messenger RNA	信使RNA
Elisa	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附剂测定
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling	原位末端凋亡法
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
HE	Hematoxylin-Eosin	苏木精 — 伊红染色法
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸

## 引 言

### (Introduction)

近年来,肺癌的发病率以及死亡率随着环境污染的逐渐加重以及吸烟人口的与日俱增亦呈逐年上升趋势,成为威胁全人类生命健康的一大主要杀手。据美国癌症协会2014年报道的肿瘤统计数据显示,在美国仅2014年肺癌新发病例数就有224,210例,新发病率占有所有恶性肿瘤的13.46%,男女肺癌均位居第二;2014年死亡病例数为159,260例,死亡率占有所有恶性肿瘤的27.19%,位居首位<sup>[1]</sup>。据近期由《中国癌症研究杂志》报道的陈万青等学者在177个癌症登记处获得的数据统计结果显示,2011年在这177个癌症登记处统计到新发恶性肿瘤的病例数约为337万例,死亡病例数约为211万例,其中肺癌的发病率占19.31%、死亡率占25.04%,均居我国恶性肿瘤发病率以及死亡率首位<sup>[2]</sup>,成为我国增长速度最快、危害最为严重的恶性肿瘤。

正常的呼吸道上皮细胞类型众多,致使了肺癌的组织学形态极其复杂,而在肿瘤发生发展过程中,向不同方向分化的多能干细胞使得肺癌在组织学上具有显著异质性。而小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)因为与其他种类的肺癌的生物学行为显著不同,所以,目前从临床角度考虑,按组织学类型将肺癌分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)以及小细胞肺癌两大类,其中80%以上为NSCLC,剩余约20%为SCLC。由于肺癌患者早期多无明显临床症状或仅有咳嗽、咳痰等轻微症状而被患者忽视导致延误诊治以及肿瘤的早期诊断具有很大的局限性,以致NSCLC早期发现率极低,仅有约20%-30%的患者为I期和II期,III期所占比列约为40%-50%,余30%患者确诊时已为局部晚期或出现脑、骨、肝脏等器官的一处或多处远处转移,为IV期,丧失最佳手术切除的时机和放疗机会<sup>[3]</sup>,因此,药物治疗在非小细胞肺癌肺癌的治疗上尤为重要。对于晚期NSCLC患者化疗成为主要治疗方法,然而,由于药物的细胞毒性导致的不良反应以及患者的耐药等因素,传统化疗药物的疗效目前已处于平台期,很难进一步延长NSCLC患者的总体生存期,并且对于老年患者及体能状态评分差的患者,由于化疗的毒副作用更大,大多数患者因不能耐受不能完成化疗周期甚至放弃治疗,影响了晚期NSCLC化疗的疗效。近年来,随着生物工程学及细胞分子生物学等诸多基础研究的深入,发现肿瘤的发生发展可能与某些遗传物质的改变及染色体的异常等导致细胞内某些基因丢失、活化或突变,致使细胞异常增殖或为肿瘤细胞提供有利于其生长、增殖的内环境。随后在进一步研究中逐渐找到了肿瘤发病的可能的关键基因靶点,出现了继手术治疗、放射治疗、化学治疗三大传统治疗后的又一新型治疗方式,即生物靶向治疗。遗憾的是,虽然具有特异性强、毒副作用小等优势的新兴分子靶向治疗药物(如酪氨酸激酶信号传导通路抑制剂)正在不断发展,但是由于靶向药物用药的局限的性以及耐药性,目前肺癌治疗仍缺乏毒性小且持久有效的药物。

顺铂(cisplatin, DDP),作为一种广谱的抗肿瘤药物,是最早被合成的第一代抗肿

瘤的铂类的金属化合物,属于细胞周期非特异性的药物,作用似烷化剂,具有细胞毒性。顺铂主要以肿瘤细胞内DNA为作用靶点,可以作用于DNA链间以及链内交链,与DNA结合构成DDP-DNA复合物,进而使肿瘤细胞的DNA复制过程得到抑制<sup>[4,5]</sup>,或者可以与肿瘤细胞内核蛋白及胞质蛋白结合来诱导细胞的凋亡,并损伤细胞膜结构,是肺癌化学药物治疗的经典药物之一<sup>[6]</sup>。以顺铂为基础药物的联合化疗方案目前亦是国际癌症组织推荐的非小细胞肺癌患者的一线标准化疗方案,并取得了一定的疗效。但是伴随着铂类药物的普遍应用,不可避免地会引起肿瘤细胞对铂类药物产生耐药性,使得化疗效果明显降低<sup>[7]</sup>。有研究显示,70-80%的肺癌患者在接受以铂类为基础的联合化疗时,在应用化疗的初期病情可暂时得到缓解,但随着应用时间的延长则会不同程度的对铂类药物产生抗性,导致肺癌的复发率或疾病进展高达60%以上,而对于复发性肺癌患者因为耐药性明显增加,继续使用以铂类为基础的化疗药物的缓解率则不足30%<sup>[8]</sup>,而且会产生更强的毒副作用。顺铂的耐药性以及毒副作用的不能耐受已成为当前使得肺癌治疗失败的重要原因。因此,如何能够在使非特异性的细胞毒性不增加的前提下更有效杀灭肿瘤细胞就成为提高化疗药物疗效的一个关键问题<sup>[9,10]</sup>,而寻找提高顺铂治疗肺癌敏感性的有效药物和方法具有非常重要的临床意义。

细胞凋亡(apoptosis),也被称为程序性细胞死亡,是存在于细胞内的一种基本的生物学现象,是维持细胞内环境的稳定以及由基因调控的细胞的一种自主的、有序的死亡。凋亡在胚胎发育的过程、维持稳定的生物体内环境方面以及多细胞生物防御来自各方面伤害方面起着极其重要的作用。细胞凋亡的过程是由多基因严格控制的极其复杂的过程,如caspase家族基因、抑制凋亡基因如Bcl-2家族基因、促进凋亡基因如P53、双向调控基因如C-myc等基因。虽然分子生物学技术及基因组学技术近年来不断地得到发展使得研究者们对多种细胞的凋亡过程有了全新的认识,但是到目前为止确切的凋亡过程机制尚未有定论,但是紊乱的凋亡过程已证实可能与多种疾病的发生、发展有着直接或间接的关系,如凋亡不足可见于肿瘤以及自身免疫性疾病,凋亡过度可见于心血管系统疾病等,而诱发细胞凋亡的因素也很多,如射线、微生物、药物等。而异常的肿瘤细胞凋亡机制是导致肿瘤逃脱免疫细胞的攻击,并产生免疫豁免,使肿瘤得以生存和发展的重要原因<sup>[11-13]</sup>,亦是导致肿瘤耐药性的产生进而导致化疗失败的重要因素之一<sup>[14,15]</sup>。

TFAR19(TF-1 cell apoptosis related gene 19),是一个人类新基因,是由白血病TF-1细胞株中克隆得到的于1999年由北京大学人类疾病基因中心在国际上首先报道,又称为程序化细胞死亡因子5(Programmed Cell Death 5, PDCD5),是我国拥有自主知识产权的新功能基因<sup>[16]</sup>。PDCD5基因全长约为6Kb,是由6个外显子和5个内含子构成,其cDNA全长为559个碱基,而PDCD5蛋白是由第25~399位碱基读码框架编码的125个氨基酸残基组成的蛋白序列,Western Blot及计算机分析显示PDCD5蛋白的相对分子质量为14kd,基因定位于染色体19q12-q13.1,其等电点为5.65<sup>[16]</sup>。PDCD5作为一个新的凋亡相关基因,在许多组织、细胞中具有促进细胞凋亡的作用。有研究表明,在人类50种组织中,PDCD5的mRNA均有表达,其在造血系统和成年的肾脏、心脏、肾上腺、睾丸及胎盘中

表达较其他组织高,而在胚胎组织的表达却明显低于成年组织,PDCD5蛋白在种属进化过程中是高度保守的基因,并且随着种属从低等到高等的进化,同源性不断增加,PDCD5基因的进化保守性提示它是具有重要生物学功能的基因<sup>[16,17]</sup>。

PDCD5与肿瘤关系密切,在如卵巢癌<sup>[18]</sup>、肾癌<sup>[19]</sup>、肺癌<sup>[20]</sup>等人类多种肿瘤表达均下调。Spinola等<sup>[21]</sup>在德国和意大利两种欧洲人群中应用SNP( Single-nucleotide polymorphisms,单核苷酸多态性)全基因组扫描技术进行肺癌易感基因研究发现,正常肺组织中的PDCD5的mRNA表达水平比肺腺癌组织中的PDCD5的mRNA表达水平高2.4倍,这提示PDCD5基因在NSCLC发生、发展中起抑制作用,在NSCLC恶性转化中可能起保护作用。随着人们对细胞凋亡机制的进一步研究,大致可以把凋亡分为半胱氨酸蛋白酶家族(cysteine aspartate specific protease, Caspase)依赖的和以线粒体以及内质网肿胀使胞浆空泡化为特征的非Caspase依赖的凋亡。而目前人们了解得较多的凋亡通路包括死亡受体诱导途径和线粒体诱导途径,均为Caspase依赖的凋亡通路,因此Caspase依赖的凋亡占据了主要位置。而随着Caspase的活化,细胞的功能蛋白以及结构蛋白被降解,进而导致细胞凋亡<sup>[22]</sup>。在已经发现的14个Caspase的家族成员中,处于凋亡有序级联反应的下游起执行作用的家族成员是Caspase-3,因此Caspase-3是最重要的效应型Caspase<sup>[23]</sup>。若Caspase-3蛋白被激活或持续活化,则可以使多种细胞周期相关、细胞结构蛋白以及与DNA修复有关的蛋白或激酶失活,最终抑制细胞增殖导致凋亡的发生,而若Caspase-3蛋白失活或者活性收到抑制时,就可以使细胞增殖而抑制细胞凋亡。张雪梅等通过采用免疫组织化学染色法检测了非小细胞肺癌患者肿瘤组织和正常肺组织中Caspase-3蛋白、PDCD5蛋白的表达情况以及与患者临床资料的相关性,结果显示在非小细胞肺癌组织中PDCD5蛋白和Caspase-3蛋白的表达均明显低于正常肺组织,且二者在非小细胞肺癌患者癌组织中的表达随患者的临床分期的上升以及组织学分级的下降表达逐渐减弱,并且PDCD5和Caspase-3在非小细胞肺癌患者癌组织中表达呈正相关,PDCD5蛋白可能通过参与某些通路或通过调节别的细胞因子正调控Caspase-3使其活化或活化延长从而促进细胞凋亡<sup>[24]</sup>。以上研究结果提示我们PDCD5蛋白极有可能在不同程度上参与了NSCLC的发生以及发展,而在非小细胞肺癌患者癌组织中由于PDCD5蛋白表达下降进而致使Caspase-3蛋白表达降低导致凋亡的阻滞,促进肿瘤生长。

关于PDCD5在抗肿瘤作用中的研究发现,利用脂质体将载有PDCD5重组基因的质粒导入细胞或者将重组蛋白加入多种细胞后,若不加入诱导因子,细胞不会发生明显变化,但若联合化疗药物,则可具有明显的杀伤肿瘤细胞的作用,PDCD5联合化疗药物具有协同抗肿瘤的作用,它可以通过促进凋亡、影响细胞周期等来增强化疗药物的抗肿瘤效果<sup>[25]</sup>。刘磊玉等以前列腺癌DU145细胞为研究对象,将PDCD5重组质粒稳定的转染至细胞后联合顺铂发现,前列腺癌细胞高表达PDCD5蛋白后能够增强顺铂诱导前列腺癌细胞凋亡,促进顺铂的抗肿瘤作用<sup>[26]</sup>。Li等以转染PDCD5重组质粒及转染空质粒的神经胶质瘤细胞为研究对象,分别加入顺铂、卡铂、长春新碱、依托泊苷四种脑胶质瘤常用化疗药物诱导两种细胞凋亡发现,转染PDCD5重组细胞顺铂、卡铂

以及长春新碱的  $IC_{50}$  均明显低于未转染组，而对于依托泊苷诱导的细胞凋亡却未发现这种现象<sup>[27]</sup>，表明细胞内 PDCD5 高表达可以增强某些化疗药物的敏感性但不包含全部的化疗药物。重组 PDCD5 (rhPDCD5) 蛋白是 PDCD5 基因的重组质粒转入目的蛋白的宿主细胞后表达的。rhPDCD5 蛋白可以通过发生于 HSPGs (Heparan sulfate proteoglycan, 硫酸乙酰肝素蛋白多糖) 连接以及脂筏的依赖于网格蛋白的内吞途径进入细胞发挥重要作用<sup>[28]</sup>。陈长宝等以骨肉瘤 SW1353 细胞以及以 SW1353 制成的裸鼠为研究对象发现，rhPDCD5 蛋白不仅可以增强顺铂对细胞的化疗敏感性，同时与顺铂联合可以使裸鼠所形成的瘤体较单用顺铂体积缩小、重量减轻<sup>[29]</sup>，提示 rhPDCD5 蛋白可以促进顺铂对骨肉瘤治疗的敏感性。另外，史琳等报道 rhPDCD5 蛋白可以联合伊达比星(IDR)或者阿糖胞苷(Ara-C)化疗药物杀伤慢性髓系 (CML) 白血病细胞 K562 细胞，裸鼠成瘤实验也证明 PDCD5 重组蛋白可以显著提高 IDR 的杀伤肿瘤作用，同时 HE 染色和 TUNEL 实验还显示 PDCD5 蛋白可以保护动物肝和骨髓，没有发现明显的毒副作用<sup>[30]</sup>，提示 rhPDCD5 蛋白可能作为 CML 的有效的化疗增敏剂。另外，Wang 等还报道 PDCD5 重组蛋白可以体内外增加增敏紫杉醇对乳腺癌的化疗效果<sup>[31]</sup>。这些研究提示我们，PDCD5 在某些肿瘤细胞的低表达可能降低了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，从而导致耐药的产生，rhPDCD5 蛋白可能作为化疗增敏剂应用于部分肿瘤的治疗。

综上所述，PDCD5 基因作为我国自主研发的一个新基因，其在某些组织的表达下调导致的凋亡阻滞可能与肿瘤发生、发展有着密切相关，是国内外研究的热点。在肺癌与 PDCD5 之间的相关研究，国内外相关报道很少，rhPDCD5 蛋白对肺癌化疗敏感性的研究更是鲜有报道。本研究以肺腺癌 A549 细胞作为研究对象，通过激光扫描共聚焦显微镜、ELISA 观察 rhPDCD5 蛋白以及顺铂对细胞 PDCD5 蛋白的表达影响，通过 MTT、流式细胞术体外观察 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对 A549 细胞增殖、凋亡与周期的影响，并探讨其促进凋亡的可能机制，为提高顺铂的抗肿瘤效果提供实验依据，进而为晚期非小细胞肺癌患者的个体化治疗提供更完善的方案，提高肿瘤患者的生活质量及生存率。

# 材料与方 法

## (Materials & Methods)

### 1 材料

#### 1.1 细胞株来源

肺癌细胞株A549购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

#### 1.2 主要试剂

4%多聚甲醛	武汉博士德生物工程有限公司
凋亡试剂盒	杭州联科生物技术有限公司
1640培养基	美国HycLone公司
胎牛血清(FBS)	美国Gibco公司
小鼠抗人PDCD5单克隆抗体	北京大学陈英玉教授提供
FITC 标记羊抗小鼠 IgG	武汉博士德生物工程有限公司
MTT	美国Sigma公司
PBS	美国Sigma公司
rhPDCD蛋白	北京宝赛生物技术公有限公司
山羊血清	北京康为世纪生物科技有限公司
顺铂	山东齐鲁制药
0.9%生理盐水	新疆华世丹药业
Caspase-3活性荧光检测试剂盒	凯基生物
PI (碘化丙啶)	美国Sigma公司
RNA酶	美国Sigma公司
胰蛋白酶	美国Hyclone公司
青链霉素溶液	美国Hyclone公司
无水乙醇	北京化学试剂公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Amresco 公司

#### 1.3 主要实验仪器设备

由石河子大学医学院《新疆地方与民族高发病》教育部重点实验室提供。

CO <sub>2</sub> 培养箱	日本Heraeus公司
显微拍照系统	日本OLympus公司
SW-CJ-2FD 超净工作台	苏州泰安空气技术有限公司生产
普通离心机	长沙湘仪离心机仪器有限公司产品

倒置相差显微镜XD-101-2B	日本OLympus公司
普通显微镜	日本OLympus公司
荧光显微镜	日本OLympus公司
大、中、小培养瓶	沧州复康医药用品公司
10uL、20uL、100uL、200uL、1mL移液器	德国Eppendof公司产品
TYK-4021型超纯水机	上海南汇电讯器械厂
S/N 高压消毒锅	日本三洋公司
YLD-2000 型电热恒温干燥箱	湖北恒丰医疗器械有限公司
6孔、12孔、24孔板	上海生物工程有限公司
纯水装置	美国 MiLLipiore 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
酶标仪	美国 Bio-Rad 生物工程公
电热恒温水浴箱	北京光明医疗仪器
电子分析天平	上海精密科学仪器有限公司
涡旋振荡器	上海精科实验有限公司
4℃、-20℃冰箱(海尔)	山东海尔公司
-80℃冰箱	美国Thermo公司
离心管	丹麦Nunc公司
低温离心机	美国Thermo公司
激光扫描共聚焦显微镜	日本OLympus公司

#### 1.4 主要溶液及药品的配制与保存

1.4.1 10%培养基：按照胎牛血清（FBS）10mL、改良型 RPMI1640 培养基 90mL 和  $10^5$  U/mL 的青链霉素溶液 1000 $\mu$ L 配制 100mL 培养基至无菌瓶，用移液枪吹打混匀后，4℃冰箱保存，备用。

1.4.2 1×PBS（磷酸盐缓冲液）：取 20×PBS5mL 加入含 195mL 双蒸水的无菌瓶内，混匀，高压，待放置室温后置于 4℃冰箱保存，备用。

1.4.3 冻存液：将二甲基亚砷（DMSO）、FBS、RPMI1640 按照 1：4：5 比例混匀后，放入 4℃冰箱保存，备用，一般现配现用或在冻存细胞前 24h 配制。

1.4.4 碘化丙啶（PI）：在含 10mgPI 粉剂的试剂盒内加入 1×PBS 缓冲液 4mL 避光混匀，充分溶解，配制为母液浓度为 2.5mg/mL，放置于 4℃冰箱避光保存；用时取 40 $\mu$ L 母液加入 960 $\mu$ L 1×PBS，配制为终浓度为 100 $\mu$ g/mL，过滤分装，放置于 4℃冰箱避光保存，备用。

1.4.5 70%乙醇：取 95%的乙醇 73.68mL 加入去离子水定容至 100mL，搅拌后置于 -20℃冰箱保存，备用。

1.4.6 MTT（Methyl Thiazolyl Tetrazolium，四甲基偶氮唑盐）：天平称取 MTT 粉末

0.5 克，溶于 100 ml 的 PBS，配制终浓度为成 5g/L，用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌，分装，-20 $^{\circ}$ C 避光保存。在配制和保存的过程中，注意避光。

1.4.7 顺铂：将 20mg 顺铂内加入 20mL 无菌生理盐水，配制终浓度为 1 g/L，37 $^{\circ}$ C 水浴锅溶解，混匀，过滤除菌，分装，-20 $^{\circ}$ C 避光保存。在配制和保存的过程中，注意避光。

## 2 实验方法

### 2.1 A549 细胞的复苏与培养

快速从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出 A549 细胞冻存管，直接浸入装有 37 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C 温水的烧杯中，并不断摇晃至冻存管内细胞完全融化，一般时间控制在 1-2min 左右即可，在超净工作台内，将冻存管内的细胞悬液迅速移至已加 5ml 培养基的离心管内，1200rpm、5min 离心，弃上清液，加入含 10% FBS、1% 双抗的 1640 培养基 2mL，重悬细胞后计数，将约  $1 \times 10^5$  个细胞接种至培养瓶，放置于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养，次日更换一次培养液，继续培养。

### 2.2 A549 细胞的传代

选取处于对数生长期、生长状态良好且细胞密度达培养瓶瓶底 80% 的 A549 细胞，3mL PBS 清洗 3 遍，弃液，加入 1mL 含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶液消化细胞，轻摇，使细胞与消化液充分接触后作用数分钟，并于倒置显微镜下观察，当细胞质回缩使细胞分离且变圆、脱落时，加入 1mL 含 10% FBS 的培养基终止消化，移液器吹打培养瓶瓶底至细胞充分悬浮，转移细胞至无菌离心管，1200rpm 离心 5min 后，弃上清液，加入含 10 FBS 的 1640 培养基 2mL 重悬细胞、计数，按照  $1 \times 10^4$ /mL 的密度接种于新的培养瓶中，48h 换液 1 次。

### 2.3 A549 细胞的冻存

选取状态良好且处于对数生长期的 A549 细胞，消化后收集至无菌离心管中，计数细胞后于 1200rpm 离心 5min，弃上清液，根据细胞数目加入细胞冻存液，吹打混匀，转移至 1mL 无菌冻存管中，封口，记号笔标注细胞种类、冻存日期，经过 4 $^{\circ}$ C 30min，-20 $^{\circ}$ C 1h 后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

### 2.4 计数法绘制细胞生长曲线

选取生长状态良好且处于对数生长期的 A549 细胞，清洗、消化、收集细胞至无菌离心管中，1200rpm 离心 5min，弃上清，加入含 10% FBS、1% 双抗的 1640 培养基中，混匀、重悬细胞并计数，调整细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个/mL，按照每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔板中，每组设置 3 个复孔，放于培养箱中培养，24h 后计数 3 个孔的细胞数，计算平均值，此后每 24h 计数一次，每次分别取 3 孔细胞计数，计算平均值，连续计数 7d，根据细胞数绘制

A549细胞生长曲线, 计算对数增长期细胞的倍增时间, 按照 Patterson 公式<sup>[32]</sup>计算:  $TD = T \times \text{Log}2 / (\text{Log}N_t - \text{Log}N_0)$  (T: 培养时间,  $N_0$ : 接种起始的细胞数,  $N_t$ : 培养到 T 时的细胞数)。

## 2.5 激光扫描共聚焦荧光显微镜检测不同浓度的 rhPDCD5 蛋白作用细胞后 PDCD5 蛋白表达

2.5.1 细胞爬片: 选取生长状态良好且处于对数生长期的A549细胞, 清洗后用胰蛋白酶消化、收集细胞并重悬计数细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^4$ 个/mL, 将 $1 \times 10^4$ 个细胞接种在6孔板中的玻片上, 分为对照组、rhPDCD5 15 mg/L组、rhPDCD5 30 mg/L组, 待细胞爬片后, 弃培养基, 用PBS洗3次, 加入浓度为0mg/L、15 mg/L、30 mg/L 的rhPDCD5蛋白的培养基, 培养24h后, 弃培养基, 用预冷的PBS洗3次, 取出玻片细胞面朝上置于载玻片上;

2.5.2 固定: 在盖玻片上加入冷的4%多聚甲醛至覆盖玻片, 室温下固定20min, PBS洗3次, 吸水纸吸干液体;

2.5.3 封闭: 盖玻片上加入正常山羊血清200 $\mu$ L, 在室温下封闭30min后, 不清洗, 直接用吸水纸吸干封闭液;

2.5.4 一抗孵育: 将玻片放入湿盒, 湿盒内加入一定量的PBS, 盖玻片上滴加按照1:100稀释的鼠抗人PDCD5单克隆抗体40 $\mu$ L, 避光, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜后PBS洗3次, 吸水纸吸干液体;

2.5.5 二抗孵育: 盖玻片上滴加按照1:200稀释的羊抗鼠IgG-FITC 40 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1h, PBS洗3次, 吸水纸吸干液体;

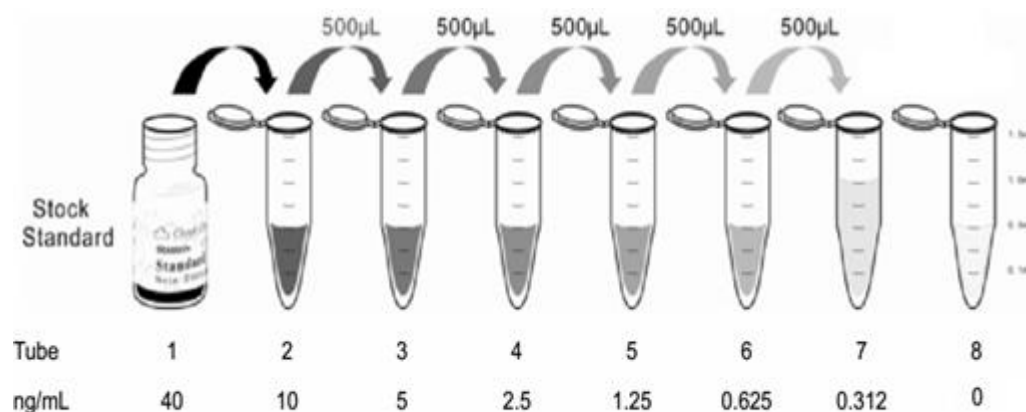
2.5.6 封片: 将40 $\mu$ L甘油滴加在盖玻片上后迅速将玻片翻过, 使盖玻片细胞面与载玻片接触, 封片;

2.5.7 检测: 将载玻片置于激光扫描共聚焦荧光显微镜下观察各组细胞PDCD5蛋白的表达情况, 并记录。

## 2.6 Elisa 法测不同浓度顺铂对 PDCD5 蛋白的表达影响

采用Elisa试剂盒检测细胞上清液中PDCD5蛋白含量, 操作过程严格按照Elisa试剂盒内说明书进行操作并设立复孔, 按照标准曲线法计算上清液内PDCD5蛋白含量。具体操作步骤如下:

2.6.1 标准品的稀释: 将1mL标准品稀释液加入标准品中, 使标准品的浓度为40ng/mL (贮液), 再取贮液250 $\mu$ L加入到750 $\mu$ L标准品稀释液中将贮液稀释为10ng/mL后, 准备7个稀释标准品的EP管, 第一个 EP 管中加入1mL浓度为10ng/mL的标准品稀释液, 2-7个EP管内各加500 $\mu$ L标准品稀释液(0ng/mL), 取500 $\mu$ L 1管内的液体加入2管, 混匀后取500 $\mu$ L 2管内液体加入至3管, 依次直至加至7管, 如图所示依次倍比稀释成10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.312ng/mL, 标准品稀释液(0ng/mL)直接作为空白孔;



2.6.2 待测样品的制备：选取生长状态良好且处于对数生长期的A549细胞，清洗后用胰蛋白酶消化后收集细胞并计数，将 $2 \times 10^5$ 个细胞接种在6孔板，分为空白对照组（顺铂0 mg/L）、顺铂10 mg/L组、顺铂20 mg/L组、顺铂40 mg/L组，待细胞贴壁后，弃培养基，用PBS洗3次，加入浓度为10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L的顺铂培养基，0.9%生理盐水作为空白对照，培养24h后弃培养基，分别加入不含EDTA的胰蛋白酶消化收集细胞，离心收集细胞，将收集到的细胞用预冷的PBS洗3次后，将细胞放置于 $-20^\circ\text{C}$ 以下冰冻后于室温融解，反复冻融3次，使细胞溶胀破碎，并于 $4^\circ\text{C}$   $1500 \times g$  离心10 min，收集上清备用；

2.6.3 加样：酶标板上分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。标准孔内标准品的浓度（如上图），空白孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的标准品稀释液，待测样品孔加入 $100 \mu\text{L}$ 各组待测样品，酶标板加上覆膜，置于 $37^\circ\text{C}$ 温箱中孵育2小时后弃液体，甩干；

2.6.4 加检测溶液A：加入检测溶液A工作液 $100 \mu\text{L}$ ，覆膜， $37^\circ\text{C}$ 温箱中孵育1小时，弃液体，洗涤液洗涤后甩干；

2.6.5 加检测溶液B：加入检测溶液B工作液 $100 \mu\text{L}$ ，覆膜， $37^\circ\text{C}$ 温箱中孵育30分钟，弃液体，甩干，洗板；

2.6.6 加底物溶液：每孔内加底物溶液 $90 \mu\text{L}$ ，覆膜， $37^\circ\text{C}$ 避光显色；

2.6.7 终止反应：当前3-4个孔的标准孔有明显的梯度蓝色变化，而后3-4孔梯度不明显时，每个孔L加入 $50 \mu\text{L}$ 终止溶液终止反应；

2.6.8 检测：终止反应后立即用酶标仪读取450nm波长处测量得到的各孔的光密度(O.D.值)。

## 2.7 MTT 比色法检测不同药物、不同浓度作用于 A549 细胞后细胞生长抑制作用

选取生长状态良好且处于对数生长期的A549细胞，PBS清洗细胞3次，用0.25%的胰蛋白酶消化后收集细胞并重悬计数，调整细胞浓度为 $5 \times 10^4$ 个/mL，将 $1 \times 10^4$ 个细胞接种在96孔板，待细胞贴壁后，齐培养基，PBS清洗2次后，分别给予rhPDCD5蛋白（浓度5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、30 mg/L）、顺铂（浓度分别为5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、

40 mg/L)，设PBS为对照组，同时设置调零孔，干预后继续培养24h，每孔加入20  $\mu$ L (5 g/L) MTT溶液，37  $^{\circ}$ C 孵育4 h后，弃去上清液，加入150  $\mu$ L DMSO溶解紫蓝色结晶，轻轻震荡10 min，用酶联免疫标记分析仪在490nm处检测96孔吸光度，取每一处理组各复孔的吸光度值平均值，计算增殖抑制率。增殖抑制率(%) = (1 - 实验组A值/对照组A值)  $\times$  100%。生存率(%) = 实验组A值/对照组A值  $\times$  100%。每组设置3个平行孔，每个实验重复3次。

## 2.8 MTT比色法检测联合用药对细胞的生长抑制作用

根据MTT结果及相关文献报道，选择rhPDCD5浓度15 mg/L、30 mg/L，顺铂浓度为20 mg/L。细胞铺板方法同上，细胞培养24 h后，将细胞分为对照组、rhPDCD5组（15 mg/L）、顺铂组（20 mg/L）、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂20 mg/L组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂20 mg/L组，干预24h后，每孔加入20  $\mu$ L (5 g/L) MTT溶液37  $^{\circ}$ C 孵育4 h后弃去上清液，加入150  $\mu$ L DMSO，轻轻震荡10 min，用酶联免疫标记分析仪在490nm处检测96孔吸光度，增殖抑制率及生存率的计算方法同前。每组设3个平行孔，每个实验重复3次。

## 2.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

选取生长状态良好且处于对数生长期的A549细胞，清洗后用胰蛋白酶消化细胞，收集细胞并计数，将 $2 \times 10^5$ 个细胞接种在6孔板，分为对照组、rhPDCD5组（15 mg/L）、顺铂组（20 mg/L）、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂20 mg/L组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂20 mg/L组，待细胞贴壁后，弃培养基，用PBS洗3次，加入浓度20 mg/L顺铂培养基或浓度20 mg/L顺铂以及浓度为15 mg/L、30 mg/L rhPDCD5蛋白的培养基，培养24h后弃培养基，PBS清洗后分别加入不含EDTA的胰蛋白酶消化收集细胞，离心，每孔加入500  $\mu$ L Binding Buffer重悬细胞，加入5  $\mu$ L FITC、10  $\mu$ L PI染液，避光孵育15min，用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

## 2.10 流式细胞仪检测细胞周期

选取生长状态良好且对数生长期的A549细胞，胰蛋白酶消化后收集细胞并计数，将 $1 \times 10^6$ 个细胞接种在6孔板，分为对照组、rhPDCD5组（15 mg/L）、顺铂组（20 mg/L）、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂20 mg/L组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂20 mg/L组，待细胞贴壁后，弃培养基，用PBS洗3次，加入浓度20 mg/L顺铂培养基或浓度20 mg/L顺铂以及浓度为15 mg/L、30 mg/L rhPDCD5蛋白的培养基，干预24h后弃培养基，PBS清洗后分别加入不含EDTA的胰蛋白酶消化收集细胞，离心，重悬细胞，冷PBS洗2次，70%冰乙醇于-20  $^{\circ}$ C 固定细胞24h，离心，弃乙醇，PBS洗2次，加入100  $\mu$ g/mL RNase 200  $\mu$ L于37  $^{\circ}$ C 消化30min后加入PI 50  $\mu$ g/mL，反应30min，上机检测。

## 2.11 Caspase-3 活性荧光检测试剂盒检测各组细胞 Caspase-3 活性表达

Caspase-3活性表达检测的操作过程严格按照Caspase-3活性荧光检测试剂盒内说明书进行操作。

2.11.1 样品裂解: 选取生长状态良好且对数生长期的A549细胞, 清洗后胰蛋白酶消化、收集细胞并计数, 将 $2 \times 10^6$ 个细胞接种培养瓶内, 分为对照组、顺铂组(20 mg/L)、rhPDCD5组(15 mg/L)、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂(20 mg/L)组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂(20 mg/L)组, 待细胞贴壁后, 弃培养基, 用PBS洗3次, 加入浓度20 mg/L顺铂培养基或浓度20 mg/L顺铂以及浓度为15 mg/L、30 mg/L rhPDCD5蛋白的培养基, 培养24h后弃培养基, 分别加入不含EDTA的胰蛋白酶消化后收集细胞, 用PBS洗细胞2次后离心(2000rpm, 5min), 收集细胞, 尽量去除PBS上清, 加入100  $\mu$ L冰冷的Lysis Buffer, 吹打均匀后置冰上裂解20-60min, 期间漩涡震荡4次, 每次10s, 4摄氏度离心(10000rpm, 1min), 小心吸取上清转移至新的EP管中, 置冰上待用;

2.11.2 蛋白浓度的测定: 上机检测蛋白浓度并计数;

2.11.3 计算各组样品所需细胞裂解上清(含100-200  $\mu$ g蛋白);

2.11.4 空白孔的设置: 以30 $\mu$ L Lysis Buffer+50 $\mu$ L 2 $\times$ Reaction Buffer+20 $\mu$ L 双蒸水作为空白对照;

2.11.5 检测: 用移液器分别吸取30  $\mu$ L含100-200  $\mu$ g蛋白的细胞裂解上清, 再加入50  $\mu$ L的2 $\times$ Reaction Buffer(50  $\mu$ L 2 $\times$ Reaction Buffer加入0.5 $\mu$ L DTT), 然后加入10 $\mu$ L 双蒸水, 加入10 $\mu$ L Caspase-3 Substrate反应液(19.5 $\mu$ L 2 $\times$ Reaction Buffer+0.5 $\mu$ L Caspase-3 Substrate), 并于37 $^{\circ}$ C避光孵育1.5小时, 用酶标仪测定荧光强度(激发波长=485nm, 发射波长=535nm);

2.11.6 计算: 诱导剂组Caspase-3的活化程度根据RFU诱导剂/RFU阴性对照的倍数来确定凋亡。

## 2.12 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件进行统计数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异用单因素方差分析, 组间多重比较采用LSD法(方差齐)或Dunnett's T3法(方差不齐), 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 结 果

### (Results)

#### 1 A549细胞的生长曲线和倍增时间

计数 d1-d7 共七天 A549 细胞生长数目, 如表 1, 生长曲线的绘制如图 1, 接种于 24 孔板上的 A549 细胞在培养的 d1~d2 增长速度缓慢, 当培养至 d3~d5 时, 细胞增长速度加快, 并进入细胞的指数生长期, 至 d6 时, 细胞进入平台期。A549 细胞倍增时间为 18h。

表 1 A549 细胞计数  
Table 1 The number of A549 cells

天数	1	2	3	4	5	6	7
细胞数( $\times 10^4$ 个)	1.00 $\pm$ 0.25	1.47 $\pm$ 0.13	2.2 $\pm$ 0.10	4.03 $\pm$ 0.25	7.88 $\pm$ 0.15	10.50 $\pm$ 0.50	12.28 $\pm$ 0.26

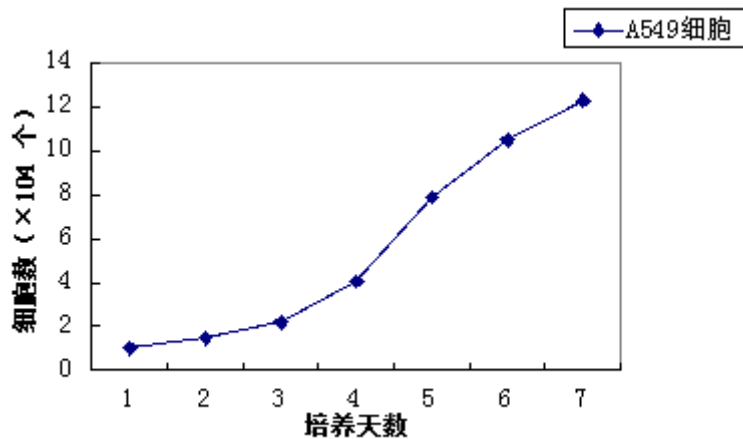
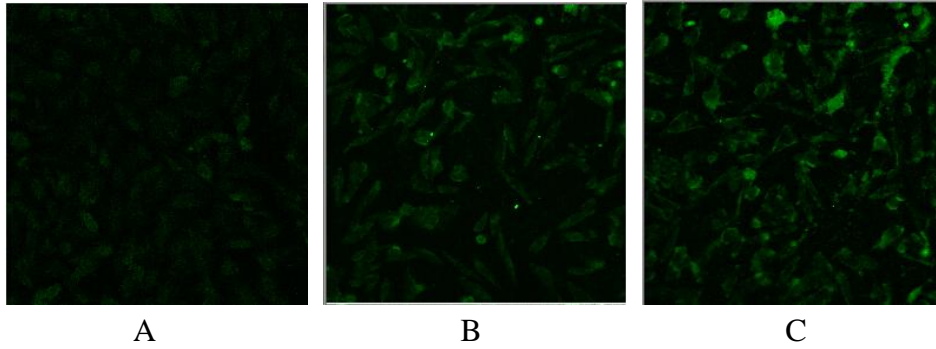


图 1 A549 细胞生存曲线  
Fig.1 A549 cell's survival curve

#### 2 激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜检测不同浓度的rhPDCD5蛋白对A549细胞PDCD5蛋白表达的影响

不同浓度的 rhPDCD5 蛋白 (0mg/L、15mg/L、30mg/L) 作用于 A549 细胞 24h 后, 激光扫描共聚焦荧光显微镜结果如图 2 所示, 三组的绿色荧光强度分别为 A: 10.71 $\pm$ 0.25, B: 15.76 $\pm$ 0.18, C: 19.35 $\pm$ 0.10, 随着 rhPDCD5 蛋白浓度的增加, 细胞内 PDCD5 蛋白表达增加 (F=531.235, P<0.001), 结果表明随着体外 rhPDCD5 蛋白浓度的增加, 细胞内的 PDCD5 蛋白亦增加, rhPDCD5 蛋白可以使细胞内 PDCD5 蛋白的表达增加进而发挥作用。



注：A：rhPDCD5 蛋白浓度：0mg/L、B：rhPDCD5 蛋白浓度：15mg/L、C：rhPDCD5 蛋白浓度：30mg/L

图 2：激光扫描共聚焦荧光显微镜检测不同浓度的 rhPDCD5 蛋白对 A549 细胞 PDCD5 蛋白表达的影响。

Fig. 2 LSCFM assay showed that the PDCD5 protein expression is up-regulated in A549 cells as the increased of concentrations rhPDCD5 protein.

### 3 ELISA法检测不同浓度的顺铂对A549细胞PDCD5蛋白表达的影响

标准品结果如表 2 所示，根据方程： $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$ ，得标准曲线为  $y = (2.61485 + 0.2605) / [1 + (x/3.35378)^{-0.94924}] - 0.2605$ ，不同浓度的顺铂（0mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L）作用于 A549 细胞 24h 后，细胞液内 PDCD5 蛋白表达量分别为  $0.2692 \pm 0.0001$ 、 $0.2723 \pm 0.0002$ 、 $0.2754 \pm 0.0002$ 、 $0.2773 \pm 0.0002$ （如图 4），方差齐性检验， $F=1.021$ ， $P=0.433$ ，方差齐。组间比，差异有统计学意义（ $F=354.125$ ， $P<0.001$ ），组内两两 LSD 比较显示， $P<0.001$ ，各组间差异有统计学意义，表明随着顺铂浓度的增高，细胞内的 PDCD5 蛋白的量增加，PDCD5 参与顺铂损伤 DNA 的过程，从而是顺铂可以促进细胞内 PDCD5 蛋白的表达。

表 2 标准品结果及计算值

Table 2 The standard results and the calculated value

X	Y	Y-平均值 CV (%)	Y-计算值	Y 残差
0.312	0		0.0126	0.0126
0.625	0.249		0.2246	-0.0244
1.25	0.543		0.549	0.006
2.5	0.958		0.978	0.02
5	1.468		1.4465	-0.215
10	1.855		1.8623	0.0073

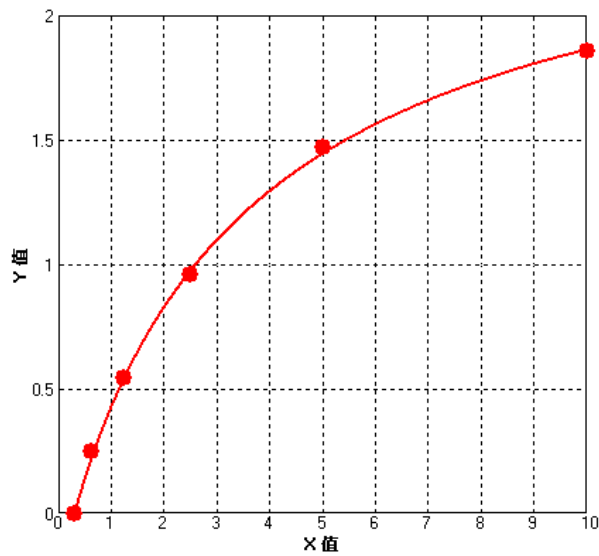


图 3 标准曲线

Fig. 3 The standard curve

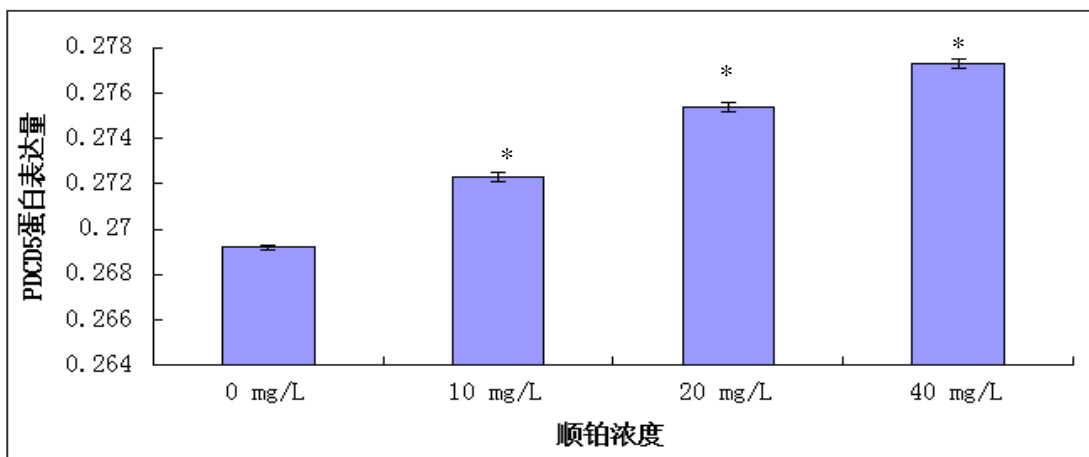


图 4 Elisa 检测不同浓度的顺铂对 A549 细胞 PDCD5 蛋白表达的影响

\*表示与对照组相比  $P < 0.001$ 

Fig. 4 The impact of different concentrations of cisplatin on the cell's expression of PDCD5 protein

#### 4 单药MTT结果

将不同浓度的 rhPDCD5 蛋白作用于 A549 细胞 24h 后, 各组间结果如表 3 所示, 随着 rhPDCD5 蛋白浓度的增大, 各组间细胞增殖抑制率相差不大,  $F=0.114$ ,  $P=0.949$ , 结果无统计学意义; 而将不同浓度的顺铂作用于 A549 细胞 24h 后, 各组结果如表 3 所示, 随着顺铂浓度的不断递增, A549 细胞的增殖受到抑制, 且随着顺铂浓度的不断增加, 顺铂对 A549 细胞的抑制作用呈逐步增强趋势, 药物剂量与细胞增殖抑制率呈正相关,  $F=88.564$ ,  $P < 0.001$ , 各组间差异有统计学意义, 表明 rhPDCD5 单独作用于细胞不能发挥作用, 随着顺铂浓度的增高, 顺铂可以抑制 A549 细胞的增殖。

表 3 不同浓度 rhPDCD5 蛋白和顺铂单药对 A549 细胞增殖抑制率的影响  
 Table 3 The impact of different concentrations of rhPDCD5 protein and cisplatin on the A549 cell proliferation inhibition rate

分组	抑制率(%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )
RhPDCD5 蛋白	
0 mg/L	0.00±0.00
5 mg/L	3.75±7.68
10 mg/L	2.77±6.09
15 mg/L	1.11±6.56
30 mg/L	3.64±4.21
顺铂	
0 mg/L	0.00±0.00
5 mg/L	12.66±1.16*
10 mg/L	23.22±9.02*
20 mg/L	51.40±2.50*
40 mg/L	57.49±4.61*

\*表示与对照组相比  $P < 0.001$

## 5 MTT法检测rhPDCD5蛋白联合顺铂对A549细胞细胞增殖的影响

对照组、rhPDCD5 组、顺铂组、rhPDCD5 15 mg/L +顺铂 20 mg/L 组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组的抑制率分别为 (0.00±0.00) %、(0.6±1.07) %、(49.67±1.43) %、(68.17±1.49) %、(78.03±0.94) % (如图 5)，方差齐性检验， $F=2.842$ ， $P=0.082$ ，方差齐。组间比，差异有统计学意义 ( $F=1095.472$ ， $P < 0.001$ )。组内两两 LSD 比较显示，rhPDCD5 组与对照组相比，差异无统计学意义 ( $P=0.712$ )，顺铂组与联合用药组相比，差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.001$ )，rhPDCD5 15 mg/L +顺铂 20 mg/L 组与 rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组相比，差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )，表明两药合应用较单用顺铂对 A549 细胞体外杀伤作用增强，且随着 rhPDCD5 蛋白浓度的升高，药物对 A549 细胞体外杀伤作用更强。

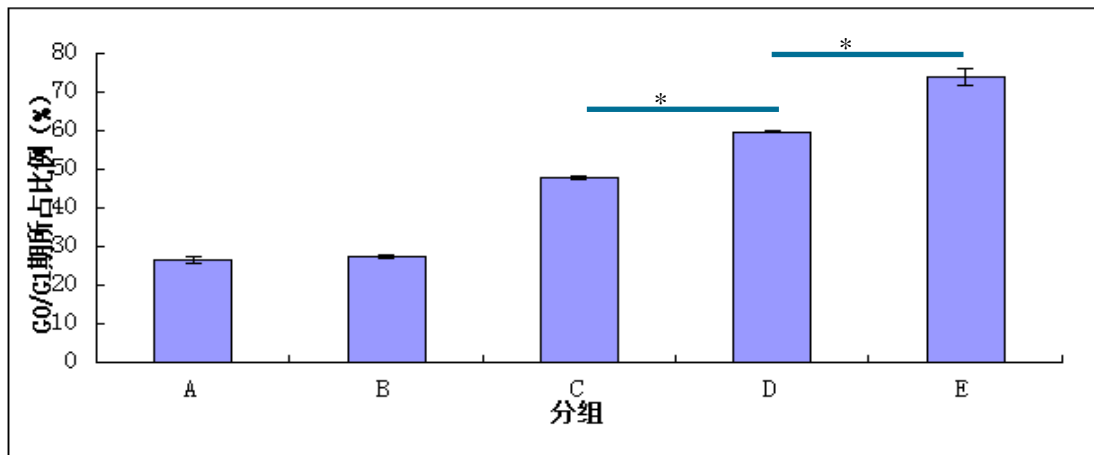


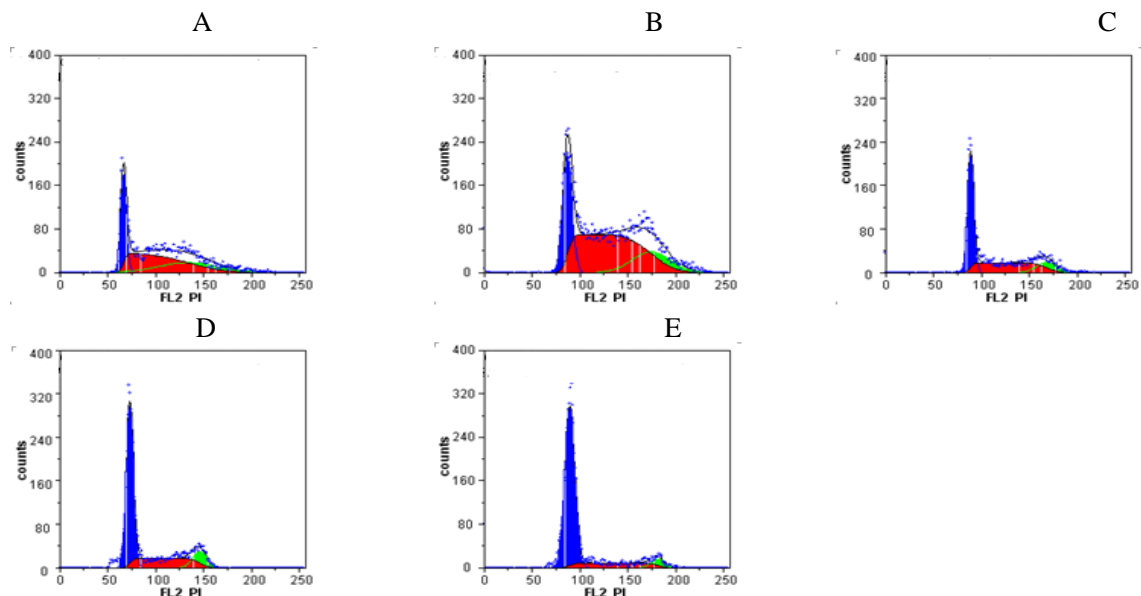
图 5 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对 A549 细胞细胞增殖的影响

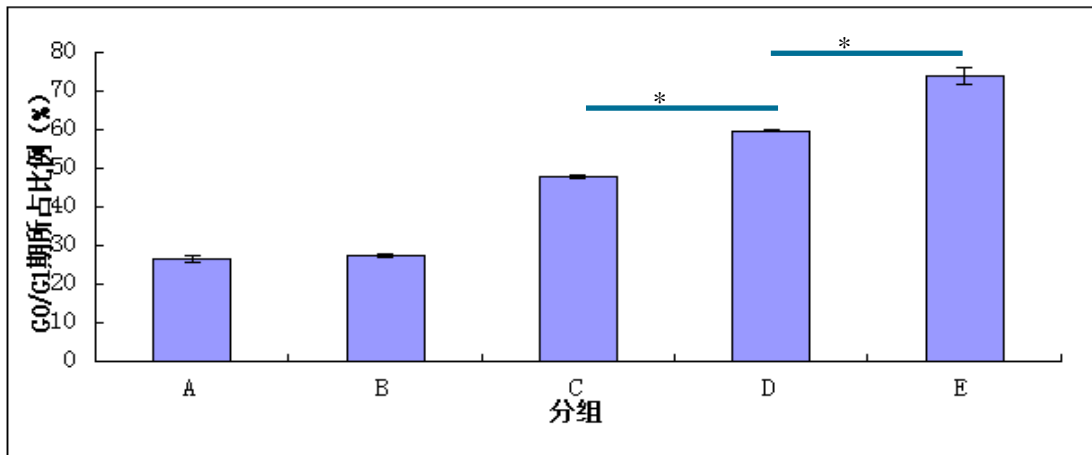
\*表示  $P < 0.001$ 

Fig .5 The influence of different treatment on the A549 cell proliferation inhibition rate

## 6 流式细胞仪检测rhPDCD5蛋白联合顺铂对肺腺癌A549细胞周期的影响

应用流式细胞仪检测对照组、rhPDCD5 组、顺铂组、rhPDCD5 15 mg/L +顺铂 20 mg/L 组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组五组间周期差异，如图 6，各组间  $G_0/G_1$  期所占比分别为  $(26.43 \pm 0.95)\%$ 、 $(27.34 \pm 0.34)\%$ 、 $(47.88 \pm 0.39)\%$ 、 $(59.75 \pm 0.38)\%$ 、 $(73.78 \pm 2.11)\%$ ，组间比差异有统计学意义 ( $F=365.501$ ,  $P < 0.001$ )，方差齐性检验， $F=2.607$ ,  $P=0.10$ ，方差齐，组内 LSD 法两两比较，单用 rhPDCD5 组与对照组相比差异无统计学意义 ( $P=0.564$ )，其与各组两两比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )， $G_0/G_1$  期所占比逐渐增多，而合成增殖的 S 期逐渐减少，从而阻滞细胞于  $G_0/G_1$  期，表明 rhPDCD5 蛋白联合顺铂能抑制细胞内的 DNA 合成，从而抑制细胞增殖。





注: A 对照组; B rhPDCD5 组; C 顺铂组;

C rhPDCD5 15 mg/L+顺铂 20 mg/L 组; D rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组

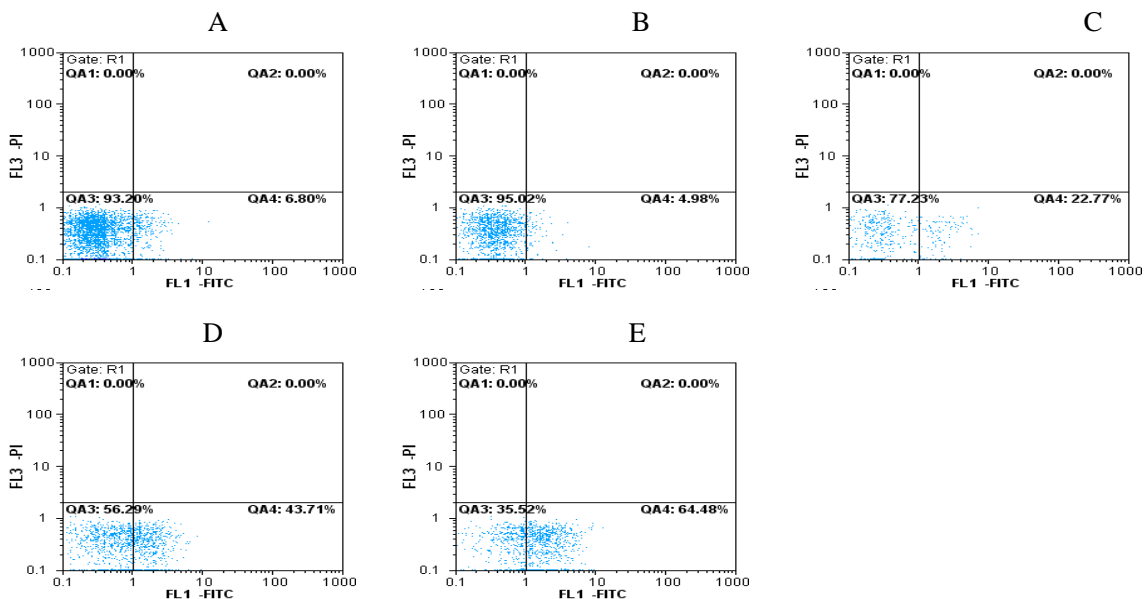
图 6 流式细胞仪测不同处理方法对细胞周期的影响

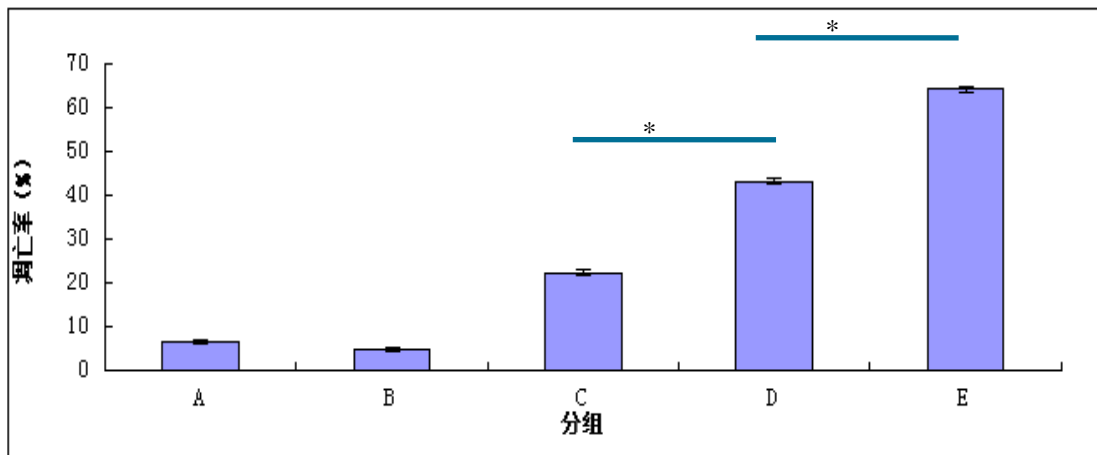
\*表示  $P < 0.001$

Fig.6 The influence of different treatment on the cell cycle

## 7 流式细胞仪检测rhPDCD5蛋白联合顺铂对细胞凋亡影响

应用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测对照组、rhPDCD5 组 (15 mg/L)、顺铂组、rhPDCD5 15 mg/L + 顺铂 20 mg/L 组、rhPDCD5 30 mg/L + 顺铂 20 mg/L 组五组间凋亡差异, 结果如图 7, 早期凋亡率分别为  $(6.563 \pm 0.49)\%$ 、 $(5.07 \pm 0.49)\%$ 、 $(22.31 \pm 0.64)\%$ 、 $(43.30 \pm 0.62)\%$ 、 $(64.25 \pm 0.54)\%$ , 方差齐性检验,  $F=0.224$ ,  $P=0.919$ , 方差齐。组间比较, 差异有统计学意义 ( $F=2054.594$ ,  $P < 0.001$ )。组内两两 LSD 比较显示, 对照组与 rhPDCD5 组 (15 mg/L) 差异无统计学意义 ( $P=0.088$ ), 其余各组两两比较均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.001$ ), 表明两药合应用较单用顺铂对 A549 细胞凋亡作用增强, 且随着 rhPDCD5 蛋白浓度的升高, 药物对 A549 细胞凋亡作用更强。





注: A 对照组; B rhPDCD5 组; C 顺铂组;

C rhPDCD5 15 mg/L+顺铂 20 mg/L 组; D rhPDCD5 30 mg/L+顺铂 20 mg/L 组

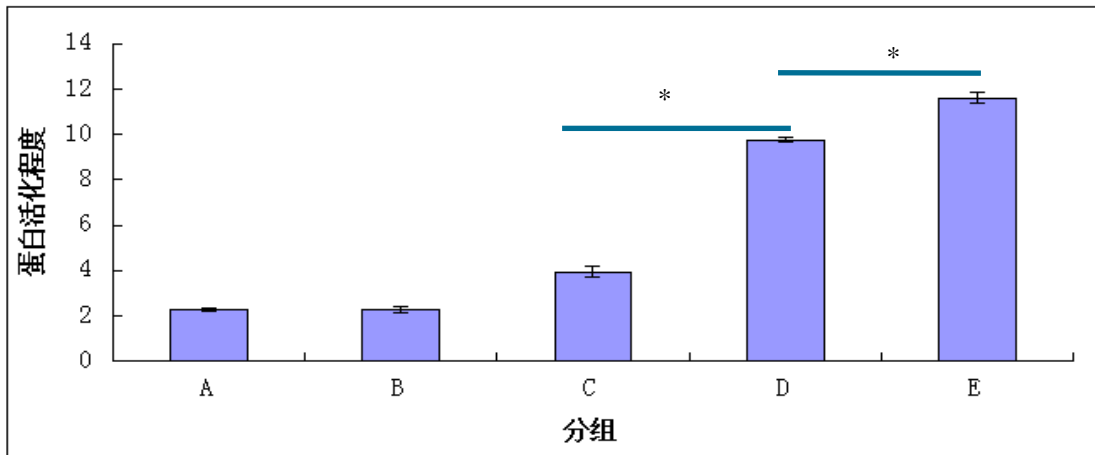
图 7 流式细胞仪测不同处理方法对细胞凋亡的影响

\*表示  $P < 0.001$

Fig. 7: rhPDCD5 facilitates cisplatin-induced A549 cell apoptosis.

## 8 活性荧光检测试剂盒检测rhPDCD5蛋白联合顺铂对A549细胞Caspase-3活化表达的影响

测得对照组、rhPDCD5组、顺铂组、rhPDCD5 15 mg/L+顺铂20 mg/L组、rhPDCD5 30 mg/L+顺铂20 mg/L组五组蛋白浓度分别为30.077 mg/mL、31.042 mg/ml、5.476 mg/mL、11.452 mg/mL、10.428 mg/mL，分别吸取150 $\mu$ g蛋白测得各组间Caspase-3的活化程度分别为 $2.28 \pm 0.06$ 、 $2.26 \pm 0.13$ 、 $3.93 \pm 0.25$ 、 $9.76 \pm 0.11$ 、 $11.62 \pm 0.24$ （如图8），各组间差异有统计学意义（ $F=877.907$ ， $P < 0.001$ ）。方差齐性检验， $F=2.305$ ， $P=0.13$ ，方差齐。组内两两LSD比较显示，组内两两LSD比较显示，对照组与rhPDCD5组（15 mg/L）差异无统计学意义（ $P=0.947$ ），其余各组间差异均有统计学（ $P$ 均 $< 0.001$ ），表明与对照组及顺铂组相比，两药联合后能够使caspase-3活化进一步增强，两药合应用较单用顺铂对caspase-3活性作用增强，细胞凋亡增加，且随着rhPDCD5蛋白浓度的升高，活化作用进步增强促进细胞凋亡。



注: A 对照组; B rhPDCD5 组; C 顺铂组;

C rhPDCD5 15 mg/L + 顺铂 20 mg/L 组; D rhPDCD5 30 mg/L + 顺铂 20 mg/L 组

图 8 活性荧光检测试剂盒检测 A549 细胞 Caspase-3 活化的表达

\*表示  $P < 0.001$

Fig. 8: The influence of different treatment on the expression of cleaved Caspase-3

## 讨 论

### (Discussions)

当前,肺癌已被视为最为常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率是全球最高的恶性肿瘤之一,并呈逐年上升趋势,对人类健康与生命构成极大威胁。每年因肺癌死去的人数约为 140 万<sup>[33]</sup>,其中,非小细胞肺癌约占 80%<sup>[34,35]</sup>,数据如此庞大是因为到目前为止,肺癌发生的确切病因尚不明确,而早期由于诊断的局限性而不易被诊断,到中晚期,患者虽然已诊断但却失去了手术机会,且肿瘤转移快、恶性程度高,对于这部分患者,系统化疗则成为主要手段。目前,以铂类为基础的联合化疗方案是临床治疗晚期非小细胞肺癌的最常用治疗方案,而顺铂是最常用的铂类药物之一,也是最为有效的药物之一,但是由于有效率低、极易发生耐药使顺铂的疗效降低以及毒副反应,最终导致化疗失败。因此,在肺癌化疗方面,寻找既不会增加药物不良反应又可以减少化疗药物的抗药性进而提高化疗疗效的新方法受到极大的关注<sup>[9,10]</sup>。为了寻找解决这一问题的可能方法,我们以肺腺癌 A549 细胞株为研究对象,通过激光扫描共聚焦显微镜、ELISA 观察 rhPDCD5 蛋白以及顺铂对细胞 PDCD5 蛋白的表达影响,同时在不增加顺铂剂量的前提下,加入 rhPDCD5 蛋白,通过 MTT、流式细胞术体外观察 rhPDCD5 蛋白联合顺铂对 A549 细胞增殖、凋亡与周期的影响,并探讨其促进凋亡的可能机制,观察 rhPDCD5 对顺铂化疗敏感性的影响及其可能机制,为非小细胞肺癌化学治疗提供新的可行的方案。

### 1 RhPDCD5蛋白单独应用对A549细胞的作用

细胞凋亡是一个极为复杂的多基因参与的调节过程,机体最终保持平衡是由于凋亡抑制因子和凋亡促进因子相互作用的结果。而且,细胞是否进入程序性死亡阶段取决于凋亡促进因子和凋亡抑制因子相互作用的最终结果。PDCD5 基因是由北大人类疾病基因中心从 TF-1 细胞株中分离得到,它属于凋亡调控正基因,在人类多种恶性肿瘤细胞中表达下降,如胃癌细胞<sup>[36]</sup>、骨肉瘤细胞<sup>[37]</sup>、软骨肉瘤细胞<sup>[29]</sup>、乳腺癌细胞<sup>[31]</sup>、慢性粒细胞性白血病细胞<sup>[30]</sup>、神经胶质瘤细胞<sup>[27]</sup>、肝癌细胞<sup>[38]</sup>等。随着研究的深入以及 rhPDCD5 蛋白制备的成功发现,细胞中转入 PDCD5 基因或者导入重组人 PDCD5 蛋白后,细胞不会出现增殖抑制等变化,但如果同时联合放化疗处理等其他诱导凋亡的因素,细胞可以发生明显凋亡,表明 PDCD5 蛋白可通过促进其他诱导凋亡因素引起的细胞凋亡,但却不能如化疗药物一样直接诱导细胞凋亡。

本研究 MTT、流式细胞仪及 Caspase-3 活性表达检测结果显示,单独应用 rhPDCD5 蛋白,与空白对照组相比差异无统计学意义( $P$  均 $>0.05$ ),但 rhPDCD5 蛋白与顺铂联合后,顺铂诱导 A549 细胞凋亡的能力增强( $P<0.01$ ),细胞周期发生阻滞 ( $P<0.001$ ) 表明 rhPDCD5 蛋白单独应用对 A549 细胞无杀伤作用,必须加入诱导凋亡因素才能发挥促进凋亡作用,这一结果与王艳芳在白血病 U937 细胞株的结果一致<sup>[39]</sup>,但王巍<sup>[40]</sup>、王海斌

[41]等研究结果不一致,王巍等发现在胃癌细胞株 SGC-7901 加入 rhPDCD5 蛋白或转染含 PDCD5 质粒后,胃癌细胞增殖均受到明显抑制;王海斌等发现在骨肉瘤 U2-OS 细胞株中 PDCD5 基因过表达,撤除血清后转染重组质粒组细胞的增殖被明显抑制,可见 rhPDCD5 蛋白单独应用是否对细胞增殖起到抑制作用的说法尚不统一,考虑到一方面可能与细胞株的选择不同而其癌变机理存在差异从而导致的结果不一致,另一方面可能对于细胞撤除血清等操作也可作为诱导凋亡的方式,而 PDCD5 蛋白可促进诱导凋亡导致细胞增殖受到抑制,提示我们操作需严谨谨慎,PDCD5 极可能是一种凋亡促进剂,而非凋亡诱导剂。PDCD5 作为一种凋亡促进蛋白,能够抑制某些肿瘤的生长,并加速凋亡的发生,在成熟的组织细胞增殖分化和内环境中发挥着重要的负调节作用。

## 2 RhPDCD5蛋白对A549细胞内PDCD5蛋白的影响

本研究以肺腺癌 A549 为研究对象,外在加入不同浓度的 rhPDCD5 蛋白,应用激光扫描共聚焦显微镜技术检测到随着 rhPDCD5 蛋白浓度的升高,细胞内 PDCD5 蛋白表达增强, rhPDCD5 蛋白可以使细胞内 PDCD5 蛋白增加。最早, Spinola 等人以德国和意大利人群为研究对象,研究发现正常肺组织中 PDCD5 的 mRNA 表达水平较肺腺癌组织 PDCD5 的 mRNA 表达高 2.4 倍<sup>[21]</sup>。随后中国学者赵青等也采用免疫组化、Real-time PCR 等方法研究发现在非小细胞肺癌患者癌组织 PDCD5 蛋白的表达及 mRNA 的表达均低于癌旁组织中的结果,且随肺癌病理分级降低、TNM 分期的上升及淋巴结转移而下降,以上结果均表明 PDCD5 蛋白在肺癌组织中比正常组织表达下降<sup>[22]</sup>。Wang 等将 rhPDCD5 蛋白用荧光标记以及亚克隆和缺失诱导形成 PDCD5-FITC 及 EGFP-PDCD5,利用时间推移成像、荧光显微镜及电子显微镜等技术研究发现, rhPDCD5 蛋白可以通过与细胞表面的 HSPGs (Heparan Sulfate Proteoglycans, 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖) 连接以及依赖于脂筏的网格蛋白的内吞途径进入细胞发挥重要作用<sup>[28]</sup>。

## 3 顺铂对肺腺癌A549细胞释放PDCD5蛋白的影响

我们的研究表明,随着顺铂浓度的增加,A549 细胞表达的 PDCD5 蛋白增加。Chen 等以软骨肉瘤 SW1353 细胞为研究对象,利用 Western-blot 以及 qRT-PCR 发现顺铂处理后的 SW1353 细胞内 PDCD5 蛋白以及 PDCD5 基因白表达均增加,且具有时间依赖性 & 浓度依赖性<sup>[29]</sup>; Wang 等亦报道,紫杉醇处理过的乳腺癌细胞内 PDCD5 蛋白表达上调,且随着紫杉醇浓度的增加以及作用时间的延长,PDCD5 蛋白表达呈上升趋势<sup>[31]</sup>。基于以上研究,表明 PDCD5 可能在细胞 DNA 损伤中起着一定的作用,PDCD5 表达的恢复可以加速细胞凋亡。

## 4 RhPDCD5蛋白对顺铂诱发凋亡及Caspase-3的活化的影响

细胞凋亡这一概念是在 1972 年由澳大利亚病理学家 Keer 等初次提出来的,其定义是生理或病理条件下细胞,因基因调控而使其发生主动的程序化死亡的过程<sup>[42]</sup>。细胞凋亡的过程极其复杂,它由多个阶段、多种基因以及多组系统等共同参与。虽然目前对于

参与细胞凋亡的细胞因子以及基因等都尚处于研究阶段，但是肿瘤细胞凋亡减少以及化疗药物通过某些通路诱导凋亡发生进而发挥细胞毒作用杀灭肿瘤细胞却已经非常明确，而凋亡通路上某些细胞因子功能缺陷或凋亡通路的阻滞可以导致肿瘤细胞对化疗药物耐药以致导致治疗失败。因此，化疗药物对某种肿瘤细胞是否敏感可以根据其诱导的肿瘤的细胞凋亡的程度来评价。

已有研究证明，rhPDCD5 蛋白或 PDCD5 基因可以联合顺铂促进多种细胞的凋亡，如软骨肉瘤细胞<sup>[29]</sup>、神经胶质瘤细胞<sup>[35]</sup>等，但在肺腺癌中的研究还未发现。我们的研究发现，在肺腺癌 A549 细胞中，外源性加入 rhPDCD5 蛋白，顺铂诱导的 A549 细胞增加 ( $F=1908.874$ ,  $P<0.01$ )，且随着 rhPDCD5 蛋白浓度的增高，凋亡越高 ( $P<0.01$ )。基于以上研究表明，顺铂不仅可以促进顺铂诱导的骨肉瘤细胞、神经胶质细胞凋亡，同时 PDCD5 也可以促进顺铂诱导的 A549 细胞凋亡，为非小细胞肺癌的治疗提供了新的理论依据。

截止目前为止，细胞凋亡的机制研究主要围绕 Caspase 依赖的凋亡通路，而根据起始激活的 Caspase 不同，将 Caspase 依赖的凋亡通路又分为：1) 起始于线粒体，是线粒体内细胞色素 C 释放至细胞质，形成细胞色素 C-凋亡相关因子 1 的多聚体，导致 Caspase-9 活化的内源性途径又称为线粒体途径；2) 起始于细胞表面死亡受体，通过连接蛋白转导信号，使凋亡诱导复合物形成，活化 Caspase-8 的外源性途径，又称为死亡受体途径；3) 由内质网应激导致 Caspase-12 激活再进而导致 Caspase-9 剪切活化的内质网途径，因此 Caspase 家族的激活在细胞凋亡过程中起着关键作用，被认为是引起凋亡的直接效应物<sup>[43]</sup>。而活化的 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12 最后均可以活化切割 Caspase-3，执行细胞凋亡，因此，Caspase-3 在细胞凋亡过程中是重要的细胞因子以及主要效应分子，在细胞凋亡过程中起最后执行者的作用，其活化标志着凋亡进入不可逆阶段<sup>[44]</sup>，而其在细胞中表达量高低与细胞凋亡率密切相关。

迄今为止，PDCD5 蛋白高表达使凋亡率增高的机制尚不清楚，目前的研究主要倾向于：第一、PDCD5 可以作用于组蛋白乙酰转移酶 Tip60 的上游，并能够与其相互作用，而且可以增加 Tip60 的稳定性，同时也可以通过使 Tip60 介导的组蛋白乙酰化 (HAT) 增强，进而使下游凋亡相关分子 Bax (属于 Bcl-2 家族成员，而 Bcl-2 家族可以通过控制线粒体内膜以及外膜的通透性影响细胞内源性凋亡途径) 的表达上调，从而促进 DNA 损伤诱导的细胞凋亡<sup>[45]</sup>；第二、PDCD5 可以直接和 Caspase-3 结合并可以通过延长活化的 Caspase-3 半衰期，发挥 Caspase-3 正调节的效应，促进细胞凋亡<sup>[31]</sup>。第三、PDCD5 通过在 p53 (肿瘤抑制基因，可以参与到细胞周期、凋亡、自噬等细胞生物学活性) 通路发挥作用进而影响细胞凋亡，其又有两条作用途径：一是 PDCD5 可以与 p53 以及 p53 的 E3 连接酶 MDM2 (可以介导 P53 的泛素化和出核) 直接结合，形成 PDCD5-MDM2-P53 蛋白，PDCD5 与 MDM2 竞争结合 p53，保护 p53 使其维持稳定<sup>[46]</sup>，进而促进肿瘤细胞的凋亡，二是通过 PDCD5 与组蛋白乙酰化转移酶 Tip60 之间的相互作用影响 p53 的磷酸化，乙酰化 p53 赖氨酸 120 位，进而使下游凋亡相关分子 Bax 的表达上调，促进细

胞凋亡。众所周知, p53 是抑癌基因, 当正常细胞内的 DNA 发生损伤并且不能修复时, 通过各种途径使 p53 维持稳定并通过细胞凋亡途径的执行人 Caspase-3 引起细胞凋亡, 使受损的细胞发生凋亡, 避免了受损细胞演变成癌细胞, 相反, 若 p53 的作用受到抑制, 细胞凋亡发生紊乱, 则受损的细胞异常增殖, 最终演化为肿瘤。以上研究均提示 PDCD5 蛋白可能通过各种通路影响 Caspase-3 的表达进而发挥重要的抗肿瘤作用。

本研究结果亦显示, rhPDCD5 蛋白联合顺铂能够促进肺腺癌 A549 细胞株细胞凋亡, 且随着 rhPDCD5 蛋白的浓度的增加, 细胞凋亡率增加, 且通过活性荧光检测 Caspase-3 的活化程度结果显示顺铂能够激活 A549 细胞中的 Caspase-3 的活化, 联合用药能够进一步激活细胞内 Caspase-3 的活化, 从而促进肿瘤细胞凋亡。在肺癌 PDCD5 与 Caspase-3 的研究中, 张雪梅等研究亦发现 PDCD5 和 Caspase-3 在非小细胞肺癌患者癌旁正常肺组织中表达明显高于癌组织, 且二者在肺癌中的表达随 NSCLC 临床分期的上升及组织学分级的下降逐渐减弱<sup>[24]</sup>, 这提示 PDCD5 与 Caspase-3 在 NSCLC 中发挥着重要的作用。基于以上结果, 我们推断 PDCD5 蛋白联合顺铂可能通过激活 Caspase-3 相关凋亡途径导致细胞核 DNA 片段化等一系列凋亡反应的发生而诱导 A549 细胞凋亡。

## 5 RhPDCD5联合顺铂对肺腺癌A549细胞株细胞周期的影响

前文已经指出, PDCD5 可以通过与组蛋白乙酰化转移酶 Tip60 之间的相互作用影响 p53 磷酸化, 而磷酸化的 p53 可以参与 G1 期阻滞相关基因 p21 的转录调控, 使 p21 的表达上调, 引起细胞周期阻滞<sup>[46]</sup>, 使受损的细胞拥有足够的时间进行 DNA 修复或使肿瘤细胞 DNA 复制时间延长, 进而使受损的细胞恢复正常或使肿瘤细胞生长阻滞。顺铂属于周期非特异性药物, 可以使细胞阻滞在细胞分裂的各个时期, 本研究结果显示, 通过流式细胞仪检测到单用 rhPDCD5 组, 与对照组相比, A549 细胞处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的比例无差异, 而当顺铂联合 rhPDCD5 蛋白后可以发现 A549 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期所占比例逐渐增多, 而合成增殖的 S 期逐渐减少, 从而阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 表明 rhPDCD5 蛋白联合顺铂能抑制细胞内的 DNA 合成, 从而抑制细胞增殖, 且随着 rhPDCD5 的浓度升高, 阻滞作用增强。我们的这一结果却与 Han 等<sup>[37]</sup>在骨肉瘤的研究结果相反, Han 等将截断的 PDCD5 基因转染到骨肉瘤 MG-63 细胞, 发现转染 PDCD5 的基因的细胞 G<sub>1</sub> 期比例降低, 但 G<sub>2</sub> 期细胞所占的比例比未转染的细胞高 1.4-1.7。研究结果的差异可能与所用阻滞细胞周期的药物有差异或 PDCD5 可能通过多种复杂途径影响细胞周期, 我们还需要更深入的去了解 PDCD5 基因。

## 6 前景与展望

综上所述, 我们的研究发现, PDCD5 基因对非小细胞肺癌细胞的细胞凋亡及细胞周期起着非常重要作用, 通过将 rhPDCD5 蛋白外源性加入到肺腺癌 A549 细胞内使细胞内 PDCD5 蛋白高表达可以明显促进顺铂诱导的细胞凋亡及细胞周期的阻滞, 进而使顺铂对 A549 细胞的化疗敏感性得到提高。PDCD5 作为我国自行研究发现的新的凋亡相关蛋白, 能够非常有效的使细胞凋亡得到促进以及使细胞的生长得到抑制, 对细胞生长过

程发挥重要作用。因此，PDCD5 具有很值得期待研究价值及应用前景。近年来，随着国内外对 PDCD5 基因的动态表达以及其在细胞凋亡过程中的作用及发生机制等的研究逐渐增多及深入，其与肿瘤发生、发展的关系以及其抗肿瘤的作用亦被逐渐发现。目前研究发现 PDCD5 蛋白在口腔鳞癌食管癌<sup>[47]</sup>、肝癌<sup>[48]</sup>、食管癌<sup>[49]</sup>、大肠癌<sup>[50]</sup>等多种肿瘤组织中表达降低，且随着肿瘤的发展，PDCD5 的表达更低，那动态检测其表达状态及表达量，对于肿瘤的早期发现、早期诊断以及判定肿瘤的生长状况具有重要的临床检测价值。PDCD5 增强肿瘤药物化疗敏感性的研究亦逐渐增多，若将 PDCD5 作为肿瘤治疗的靶点，与药物协调应用，可以明显减轻患者化疗不良反应进而增加患者化疗的耐受性，以及明显增强化疗疗效，对于将来的个性化的肿瘤治疗应该会大有裨益。

## 结 论

### Conclusion

1. RhPDCD5 蛋白可以进入细胞发挥作用，顺铂可以促进 A549 细胞内 PDCD5 蛋白的表达；
2. 单独应用对 A549 细胞无杀伤作用；
3. RhPDCD5 蛋白联合顺铂将细胞周期阻滞于 G0/G1 期，抑制肺腺癌,细胞增殖；
4. RhPDCD5 蛋白联合顺铂使肺腺癌 A549 细胞 Caspase-3 活化增强，促进细胞凋亡。

## 参考文献

### (References)

- [1]Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics[J], 2014. CA Cancer J Clin. 2014, 9(1):9-29.
- [2]Chen WQ, Zheng RS, Zeng HM, et al. Annual report on status of cancer in China[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1):2-12.
- [3]王洁.晚期非小细胞肺癌化疗进展[R].中华医学会第五届全国胸部肿瘤及内窥镜学术会议,2011,中国海南海口.
- [4]Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(4):307-320.
- [5]Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene[J]. 2003, 22(47):7265-7279.
- [6]Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(15):1869-1883.
- [7]Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. J Thorac Dis, 2013, 5(4 suppl 1):389-396.
- [8]Bunn P A, Kelly K. New Combinations in the Treatment of Lung Cancer A Time for optimism [J]. CHEST Journal, 2000,117(4 suppl 1): 138-143
- [9]Zheng S, Du Y, Chu H, et al. Analysis of MAT3 gene expression in NSCLC[J]. Diagn Pathol, 2013, 8: 166.
- [10]Lu Q, Lu S, Huang L, et al. The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer[J]. Diagn Pathol, 2013, 8: 145.
- [11]Maher S, Toomey D, Condron C, et al. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack[J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80: 131-137
- [12]Hug H. Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defense[J]. Biol Chem, 1997, 378: 1405-1412.
- [13]Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, et al. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors[J]. Implications for immune privilege and immune escape. Cancer, 2002, 94: 2552-2560.
- [14]Yin F, Liu X, Li D, et al. Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer (Review)[J]. Oncol Rep, 2013, 30: 3-10.
- [15]Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer[J]. Front Pharmacol 2013, 4: 28.
- [16]马大龙. 新细胞因子及细胞凋亡基因的发现与功能研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34( 4): 488-492.
- [17]Chen YY, Sun RH, Han WL, et al. Uclear translocation ofPDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? [ J]. FEBS Letter, 2001, 509(27): 1961-1 964.
- [18]高丽,叶雪,昌晓红,等.促凋亡蛋白 PDCD5 在卵巢上皮性癌中的表达及其与生存

关系的研究[J].中国妇产科临床杂志,2012, 13(1): 46-49.

[19]谭万龙,熊林,郑少斌,等.肾透明细胞癌 PDCD5 表达及与预后的关系[J].南方医科大学学报, 2006, 26(9): 1316-1318.

[20]赵青,张明川,梅同华,等.促凋亡基因程序化死亡因子 5 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报. 2013, 38(8): 868-871.

[21]Spiola M, Meyer P, Kammerer S, et al. Association of the PDCD5 Locus with Lung cancer risk and prognosis in smokers [J]. J Clin Oncol, 2006, 24 (11): 1672-1678.

[22]刘春阳,张国俊,白华龙.人非小细胞肺癌组织中 Livin 和 Caspase -3 蛋白的表达. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(2): 332-335.

[23]Enarim, Sasanoh, Yokoyama H. A caspase activated Dnase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD [J]. Nature, 1998, 391( 6662): 43-50.

[24]张雪梅,刘启明,霍荣昌,等.PDCD5 与 Caspase-3 在人非小细胞肺癌中的表达.现代肿瘤医学[J]. 2010, 08(18):1533-1536.

[25]焦建峰,陈冠英,管增伟,等.rhTFAR19 蛋白质对 $\gamma$  射线诱导 MCF-7 细胞周期阻滞的影响[J],中华肿瘤杂志,2000,2(2):14-16.

[26]刘磊玉,赵彬佳惠,秦玮,转染 PDCD5 基因促进顺铂诱导前列腺癌细胞的凋亡作用[J].肿瘤防治研究,2012,39(01):32-35.

[27]Li HS, Zhang X, Song X, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cancer Biology & Therapy, 2014,13: 822-830.

[28]Wang Y, Li D, Fan H. Cellular Uptake of Exogenous Human PDCD5 Protein[J]. The Journal of Biological Chemistry Vol.2006 , 281(34):24803-24817.

[29]Chen C, Zhou. H, Xu L, et al. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcom as to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo[J]. Apoptosis 2010,15(7): 805-813.

[30] Shi L, Song QS, Zhang Y, et al. Potent antitumor activities of recombinant human PDCD5 protein in combination with chemotherapy drugs in K562 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2010, 396(2): 224-230.

[31]Wang L, Wang C, Su B, et al. Recombinant human PDCD5 protein enhances chemosensitivity of breast cancer in vitro and in vivo[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2013,91: 526-31.

[32]Pellat-Deceunynk C, Amiot M, BataiLLe R, et al. Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: a reappraisal 18 years after [J]. Blood, 1995, 86 (3) :4001-4002.

[33]Jemal A,Bray F,Center MM,et al.Global cancer statistics[J].CA Cancer J Clin, 2011,61(2):69-90.

[34]李学详,王愨杰,高佳,等.肺肿瘤患者临床病理特征回顾性分析[J].中华肿瘤防治杂志,2012,19(2):130-133.

[35]王建化,张武,陈文俊,等.奈达铂联合多西紫杉醇一线治疗复发晚期非小细胞肺癌

的临床研究[J].中华肿瘤防治杂志, 2012,19(7):525-528.

[36]Xu HY, Chen ZW, Pan YM, et al. Transfection of PDCD5 Effect on the Biological Behavior of Tumor Cells and Sensitized Gastric Cancer Cells to Cisplatin-Induced Apoptosis[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2012, 57: 1847-1856.

[37]Han XR, Sun Y, Bai XZ. The anti-tumor role and mechanism of integrated and truncated PDCD5 proteins in osteosarcoma cells[J]. Cellular Signalling, 2012, 24: 1713-1721.

[38]Fan GL, Yao Y, Yao L, et al. PDCD5 transfection increases cisplatin sensitivity and decreases invasion in hepatic cancer cells[J]. Oncology Letters, 2015, 9(1):411-417.

[39]王艳芳,宋泉声,张颖妹,等. 重组人 PDCD5 蛋白对 U937 细胞化疗的增敏作用及机制[J].中国实验血液学杂志,2010,02:277-281.

[40]王巍,张冰,王舰,等.PDCD5 对胃癌细胞株 SGC-7901 细胞周期的影响[J].现代肿瘤医学,2012,06:1120-1123.

[41]王海斌 孙永明, 胥正权,等.促凋亡基因 PDCD5 在骨肉瘤 U2-OS 细胞表达及其促凋亡作用的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2010,04:266-269.

[42]Keer JFR, Wyllie AH, Curric AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide -ranging implications in tissue genetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26: 239 -257.

[43]赵瑞杰,李引乾,王会,等.Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J].中国畜牧杂志, 2010, 46(17).73-78

[44] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. Methods Mol Biol, 2008, 414(1): 13-21.

[45]Xu L, Chen Y, Song Q, et al. PDCD5 interacts with Tip60 and functions as a cooperater in acetyltransferase activity and DNA damage-induced apoptosis[J]. Neoplasia, 2009, 11(4): 345-354.

[46]Xu L, Hu J, Zhao Y, et al. PDCD5 interacts with p53 and functions as a positive regulator in the p53 pathway[J]. Apoptosis, 2012,17(11): 1235-1245.

[47]Fenglei Xu, Kai Wu, Miaoqing Zhao, et al. Expression and clinical significance of the programmed cell death 5 gene and protein in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Journal of International Medical Research, 2013, 41(6): 1838-1847.

[48]Fu DZ, Cheng Y, He H, et al. PDCD5 expression predicts a favorable outcome in patients with hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Oncology, 2013, 43: 821-830.

[49]白艳,郑晓永,郭长青,等.PDCD5和Livin在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义 [J].中国现代医学杂志.2011, 21(31): 3890-3893.

[50]王士勇,曾雪,梁春艳,等.PDCD5和Bcl-2蛋白在大肠癌和癌前病变组织中的表达及其临床意义[J].使用肿瘤杂志.2012, 27(01): 59-63.

## 文献综述

### (Review)

#### 促凋亡基因 PDCD5 与肿瘤研究进展

**【摘要】** 细胞凋亡信号通路和机制的异常是肿瘤得以发生发展的原因之一。程序性细胞死亡因子 5(programmed cell death 5, PDCD5)是由北京大学人类疾病基因中心克隆的凋亡相关新基因,具有肿瘤抑制作用,在白血病、卵巢癌、胃癌和肺癌等恶性肿瘤中表达下调甚至缺失,其在肿瘤的发生发展中具有重要的意义,随着对 PDCD5 在肿瘤中表达异常的机制的深入研究,PDCD5 有望成为一个具有重要治疗价值的肿瘤治疗靶点。

**【关键词】** PDCD5, 肿瘤, 相关性

#### Recent advances on promoting apoptosis gene PDCD5 and tumor

**【Abstract】** The dysfunction of cell apoptosis signaling is involved in carcinogenesis. The programmed cell death 5 is a new apoptosis related gene cloned in the human disease center of Peking University. The PDCD5 has the function of tumor inhibition, and plays an important role in the development of cancer. Furthermore it has been reported that the expression of PDCD5 is down-regulated and even deleted in some kinds of malignant tumors, such as leukemia, ovarian, gastric and lung cancer. Increasing new findings on the precise role of PDCD5 in the regulation of cancer development provide new insights into the potential use of PDCD5 as a target for the prevention and treatment of cancer.

**【Keywords】** Programmed cell death 5, tumor, correlation

#### 引言

细胞凋亡这一概念是在 1972 年由澳大利亚病理学家 Keer 等初次提出来的,其定义是生理或病理条件下细胞,因基因调控而使其发生主动的程序化死亡的过程<sup>[1]</sup>。细胞凋亡的过程极其复杂,它由多个阶段、多种基因以及多组系统等共同参与。虽然目前对于参与细胞凋亡的细胞因子以及基因等都尚处于研究阶段,但是肿瘤细胞凋亡机制的异常是导致肿瘤逃脱免疫细胞的攻击,产生免疫豁免,使肿瘤得以生存和发展的重要原因<sup>[2-4]</sup>,亦是导致肿瘤耐药性的重要因素之一<sup>[5,6]</sup>。程序化细胞死亡因子 5(Programmed Cell Death 5, PDCD5) 基因是由北京大学人类疾病基因中心 1999 年在国际上首先报道的一个人类新基因<sup>[7]</sup>,它在人体 50 多种组织中均有表达,参与调控细胞凋亡过程<sup>[6,8,9]</sup>。

#### PDCD5 基因简介

PDCD5 是北京大学医学部医学免疫学重点实验室在国际上首先报道的一个人类新基因,由白血病细胞株 TF-1 细胞中克隆得到的,是我国拥有自主知识产权的新功能基因<sup>[7]</sup>。PDCD5 定位于染色体 19q12-q13.1,由 6 个外显子和 5 个内含子组成,全长基因约有 6Kb, cDNA 全长为 559 个碱基,由 6 个外显子构成,第 25~399 位碱基读码框架编码 125 个氨基酸的蛋白质,计算机分析及 Western Blot 均证实其相对分子质量为  $14 \times 10^4$ ,等电点为 5.65。研究表明 PDCD5 的 mRNA 在 50 种人类组织中均有表达,在造血系统和成年的心脏、睾丸、肾脏、肾上腺及胎盘中高表达,其中胚胎组织表达明显低

于成年组织，PDCD5 在种属进化过程中是高度保守的基因，并且随着种属从低等到高等的进化，同源性不断增加，PDCD5 基因的进化保守性提示它是具有重要生物学功能的基因<sup>[7,10]</sup>。

### PDCD5 与凋亡的关系

细胞凋亡的机制研究主要围绕 Caspase 依赖的凋亡通路，而根据起始激活的 Caspase 不同，将 Caspase 依赖的凋亡通路又分为：1) 起始于线粒体，是线粒体内细胞色素 C 释放至细胞质，形成细胞色素 C-凋亡相关因子 1 的多聚体，导致 Caspase-9 活化的内源性途径又称为线粒体途径；2) 起始于细胞表面死亡受体，通过连接蛋白转导信号，使凋亡诱导复合物形成，活化 Caspase-8 的外源性途径，又称为死亡受体途径；3) 由内质网应激导致 Caspase-12 激活再进而导致 Caspase-9 剪切活化的内质网途径，因此 Caspase 家族的激活在细胞凋亡过程中起着关键作用，被认为是引起凋亡的直接效应物<sup>[11]</sup>。而活化的 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12 最后均可以活化切割 Caspase-3，执行细胞凋亡，因此，Caspase-3 在细胞凋亡过程中是重要的细胞因子以及主要效应分子，在细胞凋亡过程中起最后执行者的作用，其活化标志着凋亡进入不可逆阶段<sup>[12]</sup>，而其在细胞中表达量高低与细胞凋亡率密切相关。

迄今为止，PDCD5 蛋白高表达使凋亡率增高的机制尚不清楚，目前的研究主要倾向于：第一、PDCD5 可以作用于组蛋白乙酰转移酶 Tip60 的上游，并能够与其相互作用，而且可以增加 Tip60 的稳定性，同时也可以通过使 Tip60 介导的组蛋白乙酰化（HAT）增强，进而使下游凋亡相关分子 Bax（属于 Bcl-2 家族成员，而 Bcl-2 家族可以通过控制线粒体内膜以及外膜的通透性影响细胞内源性凋亡途径）的表达上调，从而促进 DNA 损伤诱导的细胞凋亡<sup>[13]</sup>；第二、PDCD5 可以直接和 Caspase-3 结合并可以通过延长活化的 Caspase-3 半衰期，发挥 Caspase-3 正调节的效应，促进细胞凋亡<sup>[14]</sup>。第三、PDCD5 通过在 p53（肿瘤抑制基因，可以参与到细胞周期、凋亡、自噬等细胞生物学活性）通路发挥作用进而影响细胞凋亡，其又有两条作用途径：一是 PDCD5 可以与 p53 以及 p53 的 E3 连接酶 MDM2（可以介导 P53 的泛素化和出核）直接结合，形成 PDCD5-MDM2-P53 蛋白，PDCD5 与 MDM2 竞争结合 p53，保护 p53 使其维持稳定<sup>[15]</sup>，进而促进肿瘤细胞的凋亡，二是通过 PDCD5 与组蛋白乙酰化转移酶 Tip60 之间的相互作用影响 p53 的磷酸化，乙酰化 p53 赖氨酸 120 位，进而使下游凋亡相关分子 Bax 的表达上调，促进细胞凋亡。众所周知，p53 是抑癌基因，当正常细胞内的 DNA 发生损伤并且不能修复时，通过各种途径使 p53 维持稳定并通过细胞凋亡途径的执行者 Caspase-3 引起细胞凋亡，使受损的细胞发生凋亡，避免了受损细胞演变成癌细胞，相反，若 p53 的作用受到抑制，细胞凋亡发生紊乱，则受损的细胞异常增殖，最终演化为肿瘤。

将 PDCD5 利用大肠杆菌表达重组蛋白或真核表达载体导入多种细胞后，细胞变化不明显，但如果联合其他诱导凋亡的因素，如加入化疗药物处理、撤销细胞因子、射线照射治疗等，细胞可以发生明显凋亡，表明 PDCD5 蛋白可促进多种细胞凋亡，但却不能直接诱导其凋亡<sup>[16]</sup>。PDCD5 的反义寡核苷酸可以部分抑制 VP16 诱导的 Jurkat 细胞的

凋亡,并能部分抑制 Caspase-3 的活性,ELISA 试验证实 PDCD5 可以结合活化 Caspase-3,并且纯化的 PDCD5 重组蛋白可以明显延长活化的胱天蛋白酶-3 的体外半衰期,提示 PDCD5 可能作为 Caspase-3 的正调控分子参与细胞凋亡<sup>[7]</sup>。PDCD5 蛋白在凋亡过程中不仅表达增加,而且在凋亡早期出现明显核转位现象<sup>[17]</sup>。重组 PDCD5 蛋白可以促进肝线粒体膜通透性转运孔的开放,导致膜电位降低和细胞色素 C 的释放,这表明 PDCD5 可能通过线粒体损伤加速细胞凋亡<sup>[18,19]</sup>。

### PDCD5 与呼吸系统肿瘤

近年来,随着环境污染的逐渐加重以及吸烟人口的与日俱增,肺癌的发病率以及死亡率亦随着呈逐年上升趋势,成为威胁全人类生命健康的一大主要杀手。据美国癌症协会2014年报道的肿瘤统计数据显示,在美国仅2014年肺癌新发病例数就有224,210例,新发病率占有所有恶性肿瘤的13.46%,男女肺癌均位居第二;2014年死亡病例数为159,260例,死亡率占有所有恶性肿瘤的27.19%,位居首位<sup>[20]</sup>。据近期由《中国癌症研究杂志》报道的陈万青等学者在177个癌症登记处获得的数据统计结果显示,2011年在这177个癌症登记处统计到新发恶性肿瘤的病例数约为337万例,死亡病例数约为211万例,其中肺癌的发病率占19.31%、死亡率占25.04%,均居我国恶性肿瘤发病率以及死亡率首位<sup>[21]</sup>,成为我国增长速度最快、危害最为严重的恶性肿瘤。Spinola等<sup>[22]</sup>在德国和意大利人群中研究PDCD5与肺癌及吸烟人群危险程度及预后的相关性研究中证实,肺腺癌组织中PDCD5的mRNA表达水平比正常肺组织低2.4倍。这提示PDCD5在NSCLC发生、发展中起抑制作用,在NSCLC恶性转化中可能起保护作用。赵青等<sup>[23]</sup>采用免疫组化及real-time PCR方法研究在NSCLC及癌旁组织中PDCD5蛋白和mRNA的表达,结果显示PDCD5在组织分级、临床分期及淋巴结转移过程中蛋白表达率差异均有统计学意义,且随肺癌病理分级降低、TNM 分期的上升及淋巴结转移而下降,同时染色强度也会随之减弱,表明PDCD5对NSCLC的恶性程度及远处转移可能有抑制作用,同时发现,抽烟患者PDCD5阳性率低于非抽烟患者,表达强度也随之降低,表明PDCD5可用于对高危人群筛查。这一结果与张婧雯等<sup>[24]</sup>的相关研究结果一致。另外,赵青等<sup>[25]</sup>还发现,相同化疗药物治疗情况下,PDCD5阳性组有效率达为80%(4/5),阴性组有效率为28%(7/25),差别有统计学意义,提示PDCD5高表达可以增强化疗的疗效。此外,张雪梅等<sup>[16]</sup>采用免疫组织化学法检测NSCLC肿瘤组织和癌旁正常肺组织中PDCD5和Caspase-3蛋白的表达情况,结果显示PDCD5和Caspase-3在NSCLC组织中表达明显低于癌旁正常肺组织,且二者在肺癌中的表达随NSCLC临床分期的上升及组织学分级的下降逐渐减弱,表明PDCD5和Caspase-3在非小细胞肺癌组织中表达下调,且二者在肺癌组织中的表达呈正相关,提示PDCD5可能作为Caspase-3蛋白的正调控因子促进细胞凋亡。

### PDCD5与造血系统肿瘤

PDCD5首先是在白血病细胞株TF-1细胞中克隆得到的,阮国瑞<sup>[19]</sup>等人发现PDCD5在慢性髓性白血病病人骨髓细胞中低表达,并可能在疾病进展中起一定作用,马曦等<sup>[27]</sup>人用21种不同荧光标记的单克隆抗体标记骨髓细胞,通过流式细胞术检测AML病人及正

常人骨髓不同群细胞的胞内PDCD5的表达,部分标本进行蛋白印迹实验检测AML病人及正常人骨髓细胞内PDCD5的表达。结果显示未治AML病人骨髓总有核细胞的PDCD5表达低于正常人,未治AML病人骨髓粒细胞、单核细胞、幼稚细胞及淋巴细胞内PDCD5表达均低于正常人组骨髓细胞,PDCD5的异常表达可能在AML的病理机制中起到一定的作用。马大龙等<sup>[28]</sup>利用流式细胞术检测rhPDCD5蛋白对化疗药诱导的细胞凋亡以及细胞周期的影响;Hochest33258荧光染色观察细胞凋亡的形态变化,用caspase-3荧光活性检测分析rhPDCD5蛋白诱导凋亡的可能机制,用RT-PCR检测rhPDCD5蛋白对耐药基因表达的影响,结果表明:rhPDCD5蛋白可以通过caspase-3相关的途径促进化疗药诱导的U937细胞凋亡,增强化疗药对细胞周期的阻滞作用。另外,rhPDCD5蛋白也能通过减少耐药基因的表达而增强肿瘤细胞对化疗药的敏感性。史琳等<sup>[29]</sup>报道PDCD5重组蛋白可以联合化疗药物伊达比星(IDR)或者阿糖胞苷(Ara-C)杀伤 K562细胞,裸鼠成瘤实验也证明PDCD5重组蛋白可以显著提高IDR的杀伤肿瘤作用,同时HE染色和TUNEL实验还是显示PDCD5蛋白具有保护肝和骨髓的作用,没有发现毒副作用。这提示PDCD5重组蛋白可能是慢性髓系白血病的有效的化疗增敏剂。

### PDCD5与消化系统肿瘤

消化系统肿瘤主要包括肝癌、胃癌、食管癌、结直肠癌和胰腺癌等。来自WHO的数据显示,全世界现有肿瘤患者达到3000多万,年新发病例870万,年死于肿瘤的更是高达 690 万人,在我国死亡病例中已经排到了第二位。在我国每年因为肿瘤死亡的病例中有2/3是消化道肿瘤,患者5年的生存率是30%。在胃癌组织、癌旁组织和正常胃粘膜中PDCD5蛋白及PDCD5mRNA在正常组织中高表达,在胃癌组织中低表达或不表达;随胃癌分化程度的降低PDCD5表达降低,高分化组、中分化组分别与低、未分化组比较差异具有显著性;有淋巴结转移组PDCD5阳性表达明显低于无淋巴结转移组<sup>[30]</sup>;应用二烯丙基三硫化物(DATs)诱导胃癌细胞凋亡,证实癌细胞中PDCD5出现了核转移,提示PDCD5表达率的降低可能是胃癌发生的早期信号,并且这种降低表达与病人的预后密切相关<sup>[31]</sup>。郑艳等<sup>[32]</sup>用免疫组织化学S-P法检测食管鳞癌组织和癌旁组织中PDCD5和Livin蛋白的表达,结果显示食管鳞癌组织中PDCD5的表达率低于癌旁组织,Livin的表达率显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义;PDCD5的阳性表达率与食管鳞癌的淋巴结转移、TNM分期呈密切相关,PDCD5与Livin食管鳞癌中的表达呈负相关,提示PDCD5与Livin的表达可能与食管癌的发生、发展相关。王士勇等<sup>[33]</sup>应用S-P免疫组织化学方法,检测大肠癌、腺瘤和慢性炎症患者的组织中PDCD5和Bcl-2蛋白的表达,结果显示PDCD5在慢性炎症组织中表达最高,但在大肠腺瘤和癌组织、以及不同分级的大肠癌之间的表达差异无统计学意义,随访病例中PDCD5表达高的患者,生存评分较高,提示PDCD5可能不同程度参与了大肠组织细胞癌变过程的调控,而且可能在癌变早期起一定的作用。肝癌是我国发病率及死亡率均较高的恶性肿瘤,其形成是一个多因素、多阶段长期相互作用的过程。研究表明,细胞凋亡与肝癌的发生发展密切相关。余康康等<sup>[34]</sup>通过对肝癌及癌旁组织中的PDCD5和Fas蛋白表达,结果显示PDCD5在肝癌组织中多呈阴性表

达, 促凋亡因子PDCD5与Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达增加, 肝癌及其癌旁肝硬化肝炎各组间PDCD5表达具有显著性差异Fas在肝癌组织及其癌旁肝硬化或慢性肝炎组织中的表达分布与PDCD5相似, 各组间Fas表达有显著性差异PDCD5与Fas的相关性分析结果显示, 两者呈正相关。

### PDCD5与妇科肿瘤

妇科肿瘤包括宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、绒毛膜癌。宫颈啊癌是妇女最常见的恶性肿瘤, 据统计, 全球每年有40万女性罹患宫颈癌, 我国每年约有13.1万宫颈癌新发病例, 是发达国家的6倍。刘朝晖等<sup>[35]</sup>应用免疫组化的方法, 研究了PDCD5在正常宫颈组织、CIN(宫颈上皮内瘤样病变)、宫颈癌组织的表达, 发现PDCD5在正常宫颈及CINI级组织中多呈强阳性表达, 在CINII级以上及宫颈癌组织表达较低, 在整体上, PDCD5的表达随宫颈病变的进展, 呈下降的趋势, 但CIN表达较正常升高, 这一实验结果说明, PDCD5可能在一定程度上参与了宫颈癌及癌前病变发生过程中的宫颈细胞凋亡的调控; 张岱等<sup>[36]</sup>通过重组人PDCD5对干扰素诱导宫颈癌细胞凋亡的增敏实验, 显示PDCD5蛋白对人宫颈癌SHa细胞的凋亡诱导有增敏作用, 故PDCD5作为一种新的促进凋亡分子, 有可能作为临床上联合药物治疗的手段之一, 通过不同的方式协同药物对肿瘤的杀伤作用, 促进肿瘤凋亡, 并增加肿瘤细胞对药物的敏感性, 提高治疗效果。卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 它的发病率虽然居女性生殖系统恶性肿瘤第二位, 死亡率却高居第一位, 甚至超过子宫颈癌和子宫体癌的总和<sup>[37]</sup>, 严重危害着妇女的健康。卵巢癌的发生、发展是一个多基因、多因素、多阶段的复杂过程。高丽等<sup>[38]</sup>采用免疫组织化学方法检测卵巢癌组织、卵巢良性组织、卵巢正常组织中PDCD5蛋白的表达, 显示正常卵巢组织, 卵巢良性肿瘤组织中PDCD5蛋白呈高表达; 卵巢癌组织中PDCD5蛋白呈低表达, 示三组间差异有统计学意义, PDCD5蛋白在不同FIGO分期和组织学分级的卵巢上皮性癌中表达有显著差异并且随着FIGO分期和组织学分级的升高, PDCD5蛋白的表达下降; PDCD5蛋白表达强弱与患者生存时间呈正相关, 这与冯静等<sup>[29]</sup>人的研究结果相符。王艳等<sup>[30]</sup>通过三氧化二砷诱导卵巢癌肿瘤细胞凋亡的实验, 显示PDCD5在卵巢癌细胞中处于低表达状态, 三氧化二砷可以上调PDCD5的表达, 且随着药物剂量的升高PDCD5的表达量增加。同时, 三氧化二砷诱导的凋亡细胞数量亦不断增加。因此, 推论PDCD5可能是三氧化二砷诱导卵巢癌细胞凋亡的效应因子之一。

### PDCD5与泌尿系肿瘤

泌尿系统的肿瘤包括肾、肾盂、输尿管、膀胱、尿道肿瘤。肾癌和膀胱癌是常见的泌尿系恶性肿瘤, 其形成及转归是一种多因素、多阶段的长期相互作用过程, 其中肾癌以透明细胞癌最为常见。目前, 对于PDCD5与泌尿系肿瘤的研究主要集中在谭万龙等人的研究。PDCD5在肾正常组织中的阳性表达率明显高于肾癌组织, PDCD5与肾癌的生物指标如分化程度及临床分期呈现负性相关, 并且PDCD5阳性表达组的生存率明显高于阴性组, PDCD5在肾透明细胞癌发病过程中起到负性调控的作用, 在防止肾癌进一步恶化等方面可能有重要的意义<sup>[17]</sup>。另外, 谭万龙等<sup>[41]</sup>以正常膀胱及膀胱癌组织为研究

对象,应用免疫组化发现PDCD5 在正常膀胱组织及膀胱癌组织未见显著表达,这可能与PDCD5的mRNA在膀胱组织中的表达程度很低有关。

### PDCD5与软骨肿瘤、骨肉瘤及胶质瘤

软骨肉瘤是常见的恶性骨肿瘤之一,发生于髓腔者为中心型,发生于骨膜者为骨膜型,另有少数可发生于软组织。Chen 等研究发现,PDCD5 蛋白及 mRNA 水平在软骨肉瘤中的表达较相对应的正常组织均呈现低表达,且与肿瘤的解剖学位置及病理学分级相关,PDCD5 低表达的患者存活率也较高表达的存活率降低,提示 PDCD5 是预测软骨肉瘤患者存活率的一个独立因素<sup>[42]</sup>。骨肉瘤是高度恶性的骨肿瘤,并且是儿童和青少年最常见的恶性骨肿瘤。它通过新生骨组织的形成影响远端长骨。虽然化疗策略不断形成,但是骨肉瘤患者的预后仍然很差,五年的生存率仅为 65%。Han 等<sup>[43]</sup>将截断的 PDCD5 基因转染到骨肉瘤 MG-63 细胞,发现转染 PDCD5 的基因可以通过抑制 RAS / RAF / MEK / ERK 信号传导途径,进而激活 Caspase-3 和 Caspase-9 诱导细胞凋亡。脑胶质瘤是起源于脑部神经胶质细胞,是最常见的颅内肿瘤,约占所有颅内肿瘤的 45%左右。在儿童恶性肿瘤中排第二位,近 30 年来,原发性恶性脑肿瘤发生率逐年递增,年增长率约为 1.2%,中老年人群尤为明显。LIH 等在应用免疫印迹、免疫组化和 RT-PCR 的方法研究 PDCD5 的蛋白和 mRNA 水平在人脑胶质瘤组织细胞中的表达,发现 PDCD5 在人脑胶质瘤标本中的表达较正常脑组织明显减低,还发现 PDCD5 与人脑胶质瘤的临床病理分级和患者的生存期具有相关性<sup>[44]</sup>。

### 小结与展望

PDCD5基因作为凋亡新基因,参与多种肿瘤的发生、发展与转归,随着相关实验技术的发展,通过检测 PDCD5 基因的表达可促进对肿瘤的进展程度的判断,具有很好的临床诊断价值。PDCD5 蛋白已证实与多种药物联用有明显的促凋亡作用,具有很广泛的应用前景。重组PDCD5蛋白可以使分离的小鼠肝线粒体膜通透性转运孔开放,线粒体跨膜电位下降,以及细胞色素C等凋亡因子释放,从而形成正反馈放大环路,放大凋亡信号,进一步激活Caspase-3,促进细胞凋亡的发生,进一步研究PDCD5与Caspase-3的关系有可能为肺癌等恶性肿瘤的辅助诊断及治疗开辟新的途径,有望成为一个具有重要治疗价值的肿瘤治疗靶点。

### 参考文献:

- [1]Keer JFR,Wyllie AH, Curric AR.Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue genetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26: 239-257.
- [2]Maher S, Toomey D, Condrón C, et al. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack[J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80: 131-137.
- [3]Hug H. Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defense[J]. Biol Chem, 1997, 378: 1405-1412.
- [4]Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, et al. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand

expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape[J]. *Cancer*, 2002, 94: 2552-2560.

[5]Yin F, Liu X, Li D, et al. Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30: 3-10.

[6]Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 28.

[7]马大龙. 新细胞因子及细胞凋亡基因的发现与功能研究[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, 34(4): 488-492.

[8]Lee EW, Seo J, Jeong M, et al. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis[J]. *BMB Rep*, 2012, 45: 496-508 .

[9]Guzzo MF, Carvalho LR, Bronstein MD. Apoptosis: its role in pituitary development and neoplastic pituitary tissue[J]. *Pituitary*. 2014 , 7(2):157-162.

[10] Yingyu Chen, Ronghua Sun, Wenling Han, et al. Uclear translocation ofPDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? [ J]. *FEBS Letter*, 2001, 509(27): 1961-1964.

[11]赵瑞杰,李引乾,王会,等.Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(17).73-78.

[12] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414(1): 13-21.

[13]Xu L, Chen Y, Song Q, et al. PDCD5 interacts with Tip60 and functions as a cooperator in acetyltransferase activity and DNA damage-induced apoptosis[J]. *Neoplasia*, 2009, 11(4): 345-354.

[14]Wang L, Wang C, Su B, et al. Recombinant human PDCD5 protein enhances chemosensitivity of breast cancer in vitro and in vivo[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2013,91: 526-31.

[15]Xu L, Hu J, Zhao Y, et al. PDCD5 interacts with p53 and functions as a positive regulator in the p53 pathway[J]. *Apoptosis*, 2012,17(11): 1235-1245.

[16]焦建峰,陈冠英,管增伟,等.rhTFAR19 蛋白质对  $\gamma$  射线诱导 MCF-7 细胞周期阻滞的影响[J], *中华肿瘤杂志*, 2000,2(2):14-16.

[17]谭万龙,熊 林,郑少斌,等.肾透明细胞癌PDCD5表达及与预后的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(9): 1316-1318.

[18] Xi Ma, Guorui Ruan, Ying Wang, et al. Two single-nucleotide polymorphisms with linkage disequilibrium in the human PDCD5 gene 5 'regulatory region affect promoter activity and the susceptibility of CML in Chinese population. *Clin. [ J]. Cancer. Res.* 2005, 11: 8592-8599.

[19]阮国瑞,陈珊珊,常艳,等.凋亡促进分子TFAR19在成人慢性髓性白血病骨髓细胞的异常表达[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, 34(6): 676-679.

[20]Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics[J], 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014, 9(1):9-29.

[21]Chen WQ, Zheng RS, Zeng HM, et al. Annual report on status of cancer in China[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015,27(1):2-12.

- [22] Spiola M, Meyer P, Kammerer S, et al. Association of the PDCD5 Locus with Lung cancer risk and prognosis in smokers [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (11):1672-1678.
- [23] 赵青,张明川,梅同华,等.促凋亡基因程序化死亡因子5在非小细胞肺癌中的表达及意义[J].*重庆医科大学学报*. 2013, 38(8): 868-871.
- [24] 张婧雯,蒋军广,翟展艺,等.凋亡相关基因PDCD5在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J].*中国老年学杂志*. 2013, 5(33):2006-2008.
- [25] 赵青.PDCD5在非小细胞癌中表达及对顺铂敏感性的影响[C].*南昌大学硕士学位论文论文集*,2013.
- [26] 张雪梅,刘启明,霍荣昌,等.PDCD5与Caspase-3在人非小细胞肺癌中的表达.*现代肿瘤医学*[J]. 2010, 08(18):1533-1536.
- [27] 马曦,阮国瑞,陈姗姗,等.PDCD5在成人急性髓性白血病骨髓细胞的异常表达[J].*中国实验血液学杂志*. 2007, 15(3):462-465.
- [28] 马大龙,宋泉声,张颖妹,等.重组人PDCD5蛋白对U937细胞化疗的增敏作用及机制[J].*中国实验血液学杂志*. 2010, 18(2): 277-281.
- [29] Shi.L, Song.QS,Zhang.Y, et al.Potent antitumor activities of recombinant human PDCD5 protein in combination with chemotherapy drugs in K562 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010,396(2): 224-230.
- [30] 鲍晓雷.凋亡相关基因PDCD5、Survivin在胃癌组织的表达及临床意义[C].*吉林大学硕士学位论文论文集*,2007.
- [31] Yang YH, Zhao M, Li WM, et al. Expreeion of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cell[J]. *Apoptosis*.2006, 11(6):993-1001.
- [32] 白艳,郑晓永,郭长青,等.PDCD5和Livin在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义[J].*中国现代医学杂志*.2011, 21(31): 3890-3893.
- [33] 王士勇,曾雪,梁春艳,等.PDCD5和Bcl-2蛋白在大肠癌和癌前病变组织中的表达及其临床意义[J].*实用肿瘤杂志*.2012, 27(01): 59-63.
- [34] 余康康,刘顺爱,李文凡等.促凋亡因子PDCD5与Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达.*世界华人消化杂志*.2008,16(16):1820-2824.
- [35] 刘朝晖,张岱,李克敏,等.PDCD5蛋白在正常宫颈、宫颈上皮内瘤样病变和宫颈癌中的表达[J].*北京大学学报(医学版)*, 2004, 36(4): 407-410.
- [36] 张岱,刘朝晖,李克敏,等.重组人PDCD5蛋白对干扰素C诱导人宫颈癌SHa细胞凋亡的增敏作用的初步探讨[J].*中国妇产科临床杂志*, 2004, 5(4): 186-189.
- [37] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. CA:a cancer journal for clinicians, *Cancer statistics*, 2010, 60:277-300.
- [38] 高丽,叶雪,昌晓红,等.促凋亡蛋白PDCD5在卵巢上皮性癌中的表达及其与生存关系的研究[J].*中国妇产科临床杂志*.2012, 13(1): 46-49.
- [39] 冯静,崔恒,魏丽惠,等.TFAR19蛋白在卵巢上皮性癌的表达[J].*中国妇产科临床杂志*, 2002, 3: 164-167.

[40]王艳,黄明莉,王立.凋亡相关基因PDCD5与三氧化二砷诱导卵巢癌细胞凋亡的相关性研究[J].中华妇幼临床医学杂志, 2006, 2(6): 318-320.

[41]熊林,谭万龙,郁兆存,等.TFAR19(PDCD5)蛋白在正常肾、肾透明细胞癌组织及正常膀胱、膀胱癌组织中的表达.南方医科大学学报,2006,(06):805-809.

[42]Chen C, Zhou. H, Xu L, et al. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcom as to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo[J]. Apoptosis 2010. 15(7):805-813.

[43]Han XR, Sun Y, Bai XZ. The anti-tumor role and mechanism of integrated and truncated PDCD5 proteins in osteosarcoma cells[J]. Cellular Signalling, 2012, 24: 1713-1721.

[44]Li HS, Zhang X, Song X, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cancer Biology & Therapy, 2014,13: 822-830.

## 致 谢

### (Acknowledgment)

首先感谢我的导师——巩平教授，从论文选题、实验设计到论文的实施及写作都是在她的细心指导下完成的。她对事业的执着追求、严谨的治学态度、务实的工作作风、诚信的处事原则以及勇于开拓的创新精神等优良品质，深深地激励和感知着我，她的言传身教是我今生最宝贵的财富，更是我人生路上永远的航标，真挚的感谢导师的知遇之恩，在漫长而艰辛的三年求学之路上，是她给予我精心的指导和帮助，在思想、生活上给我无微不至的关怀，同时还为我今后的人生道路指明了方向，同时使我明白看很多做人及为人处事的道理。在此，向我的导师巩平教授致以最崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢石河子大学医学院第一附属医院肿瘤内科全体医护人员对我的关心和帮助。感谢杨建设老师、刘清华老师、李娜师姐、王于理师兄、费晶师兄、黄伟师兄、马晓平师兄、韩虎师兄、姜玲护士长及全科护士在科里工作学习的这段时间给予莫大的帮助和支持，在生活中也给予无微不至的关怀。跟你们在一起的日子很充实快乐！

感谢病原生物学与免疫学教研室张万江老师、陈雪玲老师、王远志老师、曹旭东老师、袁俐老师在实验过程及实验设计方面给予的指导。

感谢我的同学李一鑫、徐芳洁、申爱平、曹帅丽、王婵、杜景云等在实验方面给予的无私帮助和支持。

感谢我的同窗李焕焕、林芷伊、董益明、赵丹宁在生活以及学习中给予的帮助和鼓励，感谢李晶师姐、刘文师姐在实验设计及操作方面给予的支持与帮助。

感谢师弟、师妹在学习、生活中给予的帮助。

感谢我的亲人对我学习的支持及鼓励。

最后，在论文完成之际，向所有指导、关心和帮助我的各位老师、同学、朋友以及我的家人表示最真挚的谢意！

研究生：苏帆

2015年6月

## 作者简介

苏帆，女，汉族。生于1988年1月，籍贯山东。2007年10月考入潍坊医学院，就读于临床医学专业，获医学学士学位。2012年毕业后，就读于石河子大学医学院2012级研究生--免疫学专业，研究方向为分子免疫，导师巩平教授。

### 在学期间主要参与的研究项目

兵团卫生科技计划项目“PDCD5、Caspase-3 在晚期 NSCLC 中的表达意义及其对铂类化疗敏感性的研究”

新疆自治区研究生教育创新计划项目“塞来昔布联合厄罗替尼治疗非小细胞肺癌的疗效与 EGFR 基因状态的相关性研究”

### 在学期间发表的文章

[1] 苏帆,李焕焕,赵丹宁,王于理,李晶,李娜,巩平. PDCD5蛋白联合顺铂对A549细胞凋亡影响研究[J].中华肿瘤防治杂志,2015,08:595-598.

[2] 李焕焕,苏帆,李晶,马晓平,巩平. 塞来昔布联合吉非替尼对HCC827细胞凋亡影响机制探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2015,06:432-435+441.

[3] 李焕焕,巩平,苏帆,李晶,林芷伊,董益明,赵丹宁.血清环氧化酶-2在靶向治疗晚期非小细胞肺癌中的预测价值.实用医学杂志, 2014,30(23),75-78。


[4] 赵丹宁,李焕焕,林芷伊,李晶,苏帆,巩平. PDCD5在晚期非小细胞肺癌患者血清中的表达及与化疗药物敏感性的相关性研究.安徽医科大学学报, 已录用。

### 获奖情况:

无

# 研究生学位论文

## 导师评阅表

研究生姓名	苏帆	学制	三年
专业	免疫学	研究方向	分子免疫
学术评语:			
<p>肺癌的发病率和病死率均居全球各类恶性肿瘤首位，已成为一个严重的公共健康问题。近几年来，尽管肺癌标准化治疗取得巨大进步，但是由于药物的细胞毒性及不良反应及耐药等因素，传统化疗药物的疗效目前已处于平台期，很难进一步延长患者的总体生存期。因此如何在不增加非特异性细胞毒性的前提下有效杀灭肿瘤细胞就成为提高化疗药物疗效、延长患者的生存期、提高其生活质量成为一个关键问题。</p> <p>PDCD5基因是由白血病TF-1细胞株中克隆得到的于1999年由北京大学人类疾病基因中心在国际上首先报道是一个人类新基因，是我国拥有自主知识产权的新功能基因。有研究表明PDCD5的mRNA在多种人类正常组织中高表达，同时，PDCD5与肿瘤关系密切，在人类多种肿瘤中表达均下调。另有关于PDCD5在抗肿瘤作用的研究发现，PDCD5与化疗药物具有协同抗肿瘤的作用，它可以通过促进凋亡、影响细胞周期等来增强化疗药物的抗肿瘤效果PDCD5作为我国首先发现的一个新基因，其表达下调可能与肿瘤发生、发展密切相关，是国内外研究的热点。在肺癌与PDCD5之间的相关研究，国内外相关报道很少。rhPDCD5蛋白对肺癌化疗敏感性的研究更是鲜有报道。本研究以肺腺癌A549细胞为研究对象，体外观察rhPDCD5蛋白联合顺铂对A549细胞增殖、凋亡与周期的影响，并探讨其促进凋亡的可能机制，为提高顺铂的抗肿瘤效果提供实验依据。</p> <p>本课题研究目的明确，设计合理，研究方法科学。该生对本学科前沿知识掌握比较全面深刻，论文撰写规范、结构清晰、结果可靠、结论明确。该论文达到硕士学位研究生培养目标的要求，同意参加毕业论文答辩。</p>			
指导教师签字:  2015年6月9日			