文章编号:1000-5404(2007)23-2247-03

论著

DNA错配修复基因甲基化在H446细胞获得性耐药中的作用

郭芮伶,吴国明,戢福云,徐顺贵 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨DNA错配修复基因MLH1(human MutL homolog 1)、MSH2(human MutS homolog 2)甲基化在人小细胞肺癌H446细胞获得性耐药中的作用。**方法** RT-PCR及Western blot法检测H446细胞及其多药耐药细胞H446/DDP中MLH1、MSH2基因的mRNA表达和蛋白表达,甲基化特异性PCR(MSP)法检测MLH1、MSH2基因启动子CpG岛甲基化状态。**结果** H446/DDP细胞中MLH1、MSH2基因的mRNA及蛋白水平均较H446细胞显著降低($P<0.01$),且其启动子甲基化程度明显增强。**结论** DNA错配修复基因MLH1、MSH2启动子甲基化诱导其表达下调可能是人小细胞肺癌获得性耐药的重要机制之一。

关键词: DNA错配修复;MLH1;MSH2;小细胞肺癌;获得性耐药;启动子甲基化
中图法分类号: R394.3; R73-354; R730.23 **文献标识码:** A

Methylation of DNA mismatch repair gene MLH1 and MSH2 in acquired multidrug-resistance of human small cell lung cells H446

GUO Rui-ling, WU Guo-ming, JI Fu-yun, XU Shun-gui (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the role of methylated DNA mismatch repair gene MLH1 and MSH2 in the acquired multidrug-resistance of human small cell lung cancer cells H446. Methods The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were applied to measure MLH1 and MSH2 mRNA and protein expressions of the multidrug-resistant cells H446/DDP and its parental cells H446. The promoter methylation status of the genes was assessed by methylation-specific PCR (MSP). Results The expressions of MLH1 and MSH2 significantly decreased both in mRNA level and protein level. Promoter methylation of MLH1 was observed in H446/DDP cells but not in H446 cells. Promoter semi-methylation of MSH2 in H446 cells was transformed to methylation in H446/DDP cells. Conclusion The downregulation of DNA mismatch repair gene MLH1 and MSH2 induced by its promoter methylation may play an important role in the acquired multidrug resistance of human small cell lung cancer.

Key words: DNA mismatch repair; MLH1; MSH2; SCLC; acquired resistance; promoter methylation

化疗是肿瘤治疗的有效方法之一,但肿瘤细胞耐药性的产生导致化疗疗效的降低,是肿瘤药物治疗中的一大难点。有些肿瘤细胞对所用药物一开始就没有反应,称为天然耐药,而有些肿瘤如小细胞肺癌,对于原来敏感的药物,治疗一段时间后才产生耐药性,称之为获得性耐药[1]。肿瘤耐药性的形成机制非常复杂,目前尚未完全阐明。近年来研究表明,DNA错配修复(mismatch repair, MMR)可能在其中起着非常重要的作用。本研究以人小细胞肺癌多药耐药细胞H446/DDP及其亲代细胞H446为研究对象,初步探讨MMR在其耐药性获得中的作用及机制,希望为小细胞肺癌的临床治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 研究对象

人小细胞肺癌细胞株H446及其多药耐药株H446/DDP[1]由我所诱导、保存,常规接种于含10%小牛血清的RPMI1640培养基中,置于5% CO_2的培养箱,在37 ℃、饱和湿度条件下培养。H446/DDP细胞培养基中同时加入终浓度为0.5 μg/ml的顺铂。

1.2 DNA提取

用Omega公司基因组DNA提取试剂盒抽提亲代及耐药细

作者简介:郭芮伶(1978-),女,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事肺癌耐药机制方面的研究。电话:13608320932,E-mail:fairy780308@163.com
通讯作者:吴国明,电话:(023)68774603
收稿日期:2007-07-26;修回日期:2007-09-07

胞株高纯度基因组 DNA。紫外分光光度计测定核酸吸光度值 $D(260)/D(280)$，并稀释 DNA 浓度为 5 μg/100 μl。

1.3　DNA 亚硫酸化修饰

用 ZYMO 公司的 DNA methylation 试剂盒进行，步骤按说明书。

1.4　甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR，MSP)

引物序列、反应条件见表 1。MSP 反应体系为 25 μl，94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，退火温度(55 ℃)30 s，72 ℃ 45 s，共 40 个循环，72 ℃ 5 min。2.5% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统拍照分析。若基因启动子发生了甲基化，则用甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带，用“M”表示；若未发生甲基化，则用非甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带，用“U”表示。

表 1　MSP 引物序列和反应条件

引物		上游引物(5′-3′)	下游引物(5′-3′)
MSP	MLH1	M:TTTTTTTTAGGAGTGAAGGAGGTTAC	M:CTAAACACGAATACTACGAACGAT
		U:TTTTTTTTAGGAGTGAAGGAGGTTAT	U:ACTAAACACAAATACTACAAACAAT
	MSH2	M:TCGTGGTCGGACGTCGTTC	M:CAACGTCTCCTTCGACTACACCG
		U:GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT	U:CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA
RT-PCR	MLH1	TCAAGTGATTGTTAAAGAGGGAG	CTGAGGTACAGGAATGGGTGT
	MSH2	CAGGTTGGAGTTGGGTATGTG	AACTTCTTGGCAAGTCGGTTA
β-actin		GTCCTGTGGCATCCACGAAAC	GCTCCAACCGACTGCTGTCA

M：甲基化；U：未甲基化；退火温度均为 55℃

1.5　RNA 提取

取对数生长期细胞，按 Trizol 试剂盒说明书的步骤提取总 RNA，紫外分光光度计测定 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 为 1.8～2.0，琼脂糖甲醛变性凝胶电泳示 28S 和 18S 清晰的 RNA 条带。

1.6　RT-PCR 检测 MLH1、MSH2 mRNA 表达

采用美国 Promega 公司 Access RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 检测。行 2% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像分析仪进行半定量分析。以 MLH1、MSH2 与 β-actin 的相对亮度表示 MLH1、MSH2 mRNA 表达的相对水平。

1.7　蛋白质提取及 Western blot 检测 MLH1、MSH2 基因蛋白表达

参照《分子克隆指南》提取蛋白质。各标本均取等量蛋白用于 Western 印迹分析，β-actin 作为内参照。兔抗人 MLH1 多克隆抗体购自 Santa Cruz(sc-582)公司，鼠抗人 MSH2 单克隆抗体购自 Oncogene(FE-11)公司。DAB 显色后扫描测定条带灰度值，计算 MLH1、MSH2 蛋白表达水平。

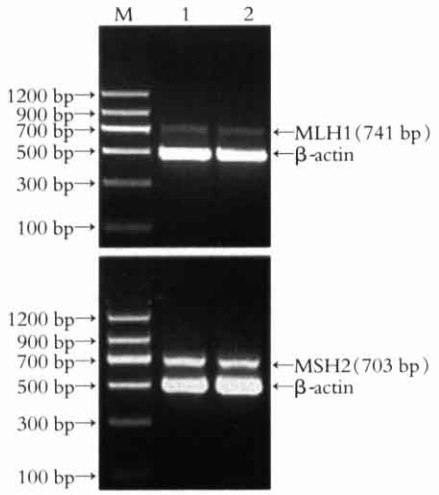
1.8　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　MLH1、MSH2 mRNA 水平的表达

RT-PCR 结果显示，亲代 H446 及耐药细胞 H446/DDP 中均可检测到 MLH1、MSH2 基因的表达，但表达水平均较低，以 MLH1 为著。同时，亲代细胞 MLH1、MSH2 mRNA 相对表达水平均明显高于耐药细胞，亲代细胞分别为(0.16 ± 0.08)和(0.59 ± 0.05)，而对应的耐药细胞分别为(0.13 ± 0.09)和(0.43 ± 0.11)，差异非常显著($P<0.01$)(图 1)。

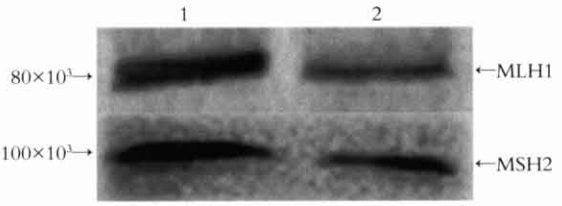


M：标准；1：H446；2：H446/DDP

图 1　亲代 H446 细胞及其耐药细胞中 MLH1、MSH2 mRNA 的表达

2.2　MLH1、MSH2 基因蛋白水平的表达

Western blot 结果显示，亲代 H446 细胞及耐药细胞 H446/DDP 中均可检测到 MLH1、MSH2 蛋白，但亲代细胞 MLH1、MSH2 蛋白表达水平均显著高于耐药细胞($P<0.05$)，亲代细胞分别为(16 240.0 ± 1 474.8)和(10 150.0 ± 2 555.8)，而耐药细胞分别为(12 431.7 ± 168.2)和(4 801.0 ± 1 302.4)(图 2)。

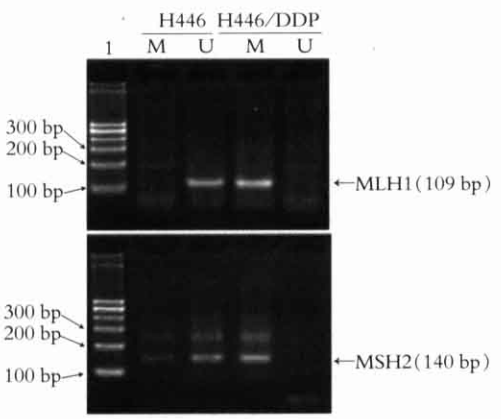


1：H446；2：H446/DDP

图 2　亲代 H446 细胞及其耐药细胞中 MLH1、MSH2 蛋白的表达

2.3　MLH1、MSH2 基因启动子 CpG 岛甲基化状态

MSP 结果表明，亲代 H446 细胞中 MLH1 基因启动子无甲基化发生，MSH2 基因启动子部分甲基化，耐药细胞 H446/DDP 中 MLH1 及 MSH2 基因启动子均发生完全甲基化(图 3)。



1：标准；M：甲基化；U：未甲基化

图 3　亲代 H446 细胞及其耐药细胞中 MLH1、MSH2 基因启动子甲基化状态

3　讨论

虽然不同的化疗药物对肿瘤细胞具有不同的作用机制[2]，但大多数化疗药物都作用于 DNA 进而杀伤肿瘤细胞，故 DNA 损伤反应和 DNA 修复同时影响着化疗的效果[3,4]。许多研究表明，DNA MMR 缺陷是导致各种直接或间接引起耐药性产生的重要原因之一[5]，其机制可能为：①MMR 系统缺陷使细胞识别 DNA 损伤的能力减弱，而不能产生触发细胞凋亡的信号；②MMR 功能丧失导致基因组不稳定性增加，产生对抗癌药耐受的突变体。有研究将 MMR 功能正常和缺陷的细胞共同培养，发现后者表现为选择性富集，并在化疗药物打击中更具有增殖优势[6]。因此，有学者认为 MMR 缺陷疾病的发生可被看作多药耐药类型的发展。

已有研究在小剂量烷化剂长期处理诱导的耐烷化剂的细胞中发现有 MMR 功能缺陷及 G:T 错配结合能力缺陷，顺铂耐药细胞中也可观察到 MMR 基因 MSH2 或 MutSX 的下调或突变。此外，MSH1 或 MSH6 缺失的细胞可允许存在高水平的 DNA 加合物而不死亡，也进一步说明了 MMR 缺陷在顺铂耐药中的作用[7]。本研究通过对比小细胞肺癌细胞 H446 及其多药耐药细胞 H446/DDP 中 MLH1 和 MSH2 基因的表达发现，MLH1、MSH2 基因在亲代细胞中均有表达，而在耐药细胞中其 mRNA 水平和蛋白水平的表达均显著下调，表明 MMR 基因 MLH1 和 MSH2 的表达下调可能在小细胞肺癌的发生及其多药耐药性的获得中也具有非常重要的作用。但也有研究表明，MMR 基因的过度表达能产生高突变率和 DNA 损伤耐受性[8]，这可能是一种应激反应或者是 MMR 基因发生了失活突变而造成的无义蛋白堆积。MMR 是一个非常复杂的系统，其中任何一个基因表达失衡都可能造成 MMR 功能缺陷，MMR 与肿瘤耐药性之间可能存在更为复杂的关系，有待进一步研究。

至于 MMR 基因表达下调的具体机制目前尚不清楚，可能与组蛋白去乙酰化、磷酸化或启动子超甲基化[9,10]造成的 MMR 基因沉默有关。另外，与氧化应激相关的 ROS 可能也是使 MMR 系统失活的一个原因。本研究中甲基化特异性 PCR 结果显示，耐药细胞中 MLH1 及 MSH2 基因启动子均为完全甲基化状态，而亲代细胞 H446 中 MLH1 及 MSH2 启动子为非甲基化或部分甲基化状态，这表明 MLH1 和 MSH2 表达下调与其启动子甲基化程度有密切关系，并可能因此影响了其耐药性的形成。而 Plumb 等[11]通过抑制 MLH1 启动子甲基化恢复其表达并逆转了移植瘤的耐药性也证实了这一观点。同时，由于过度甲基化是一个可逆的调控过程，故其有望成为肿瘤干预新的切入点，甲基化分析也可以帮助我们在筛选耐药相关基因的基础上了解其 MMR 基因的功能状态及表达失调的可能机制[12]，作为评价小细胞肺癌临床疗效的新指标。

参考文献：

[1] 钱　频，戢福云，钱桂生，等. 顺铂诱导人小细胞肺癌多药耐药细胞系 NCI-H446/CDDP 的建立及其生物学特征分析[J]. 解放军医学杂志，2004，29(12)：1052－1054.

[2] 郭芮伶，吴国明，戢福云，等. 多西紫彬醇对肺腺癌多药耐药细胞 A549/CDDP 及其亲代细胞作用机制的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：610－613.

[3] 高福莲，岳保红，马开颜，等. 胃上皮永生细胞、胃腺癌细胞和胃腺癌淋巴结转移细胞多耐药基因 1 和 P-糖蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(3)：514－517.

[4] 田　芳，田卫红，许培荣，等. siRNA 阻断 NF-κB 信号通路对食管鳞癌细胞增殖、耐药的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2007，42(1)：41－44.

[5] Bignamia M，Casorellia I，Karran P. Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies[J]. Eur J Cancer，2003，39(15)：2142－2149.

[6] Fink D，Nebel S，Norris P S，*et al*. Enrichment for DNA mismatch repair-deficient cells during treatment with cisplatin[J]. Int J Cancer，1998，77(5)：741－746.

[7] Vaisman A，Varchenko M，Umar A，*et al*. The role of hMLH1，hMSH3，and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance：correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts[J]. Cancer Res，1998，58(16)：3579－3585.

[8] Gibson S L，Narayanan L，Hegan D C，*et al*. Overexpression of the DNA mismatch repair factor，PMS2，confers hypermutability and DNA damage tolerance[J]. Cancer Lett，2006，244(2)：195－202.

[9] Mihaylova V T，Bindra R S，Yuan J，*et al*. Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells[J]. Mol Cell Biol，2003，23(9)：3265－3273.

[10] Morimoto H，Tsukada J，Kominato Y，*et al*. Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia[J]. Am J Hematol，2005，78(2)：100－107.

[11] Plumb J A，Strathdee G，Sludden J，*et al*. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter[J]. Cancer Res，2000，60(21)：6039－6044.

[12] 李昆霖，吴国明，戢福云，等. 人小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达基因的克隆研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(24)：2403－2405.

（编辑　王　红）