文章编号:1000-5404(2010)23-2527-03

论著

hMLH1基因对人卵巢癌耐药细胞株顺铂敏感性的研究

舒 丹,曾 飚,何 华,李渊渊,钟 玲 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科)

【摘要】 目的 探讨错配修复基因hMLH1对人卵巢癌耐药细胞株SKOV3/DDP顺铂耐药的逆转作用及其机制。方法 分别用重组质粒pcDNA3.1-hMLH1和空质粒pcDNA3.1转染SKOV3/DDP细胞。RT-PCR和Western blot检测hMLH1的表达。MTT检测转染前后SKOV3/DDP细胞对顺铂敏感性的变化。经顺铂DDP作用后,流式细胞术和Western blot法检测细胞凋亡情况。结果 与对照组相比,瞬时转染24 h后,SKOV3/DDP细胞中hMLH1 mRNA和蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$)。MTT结果显示,转染细胞的IC_{50}值(13.95±2.45)较未转染的细胞(94.16±5.18)明显减小。流式细胞仪和Western blot检测结果表明,顺铂作用24 h后,转染了重组质粒的耐药细胞的凋亡率提高到(33.33±2.31)%,同时凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达受到抑制(1.35±0.39),与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 hMLH1基因能增强卵巢癌耐药细胞对顺铂的敏感性,其机制可能与降低该耐药细胞内Bcl-2的表达水平,促进细胞凋亡有关。

【关键词】 错配修复;hMLH1;卵巢癌;SKOV3/DDP;耐药
【中图法分类号】 R394.2;R73-36;R737.31 【文献标志码】 A

Effect of hMLH1 gene on cisplatin sensitivity of drug-resistant human ovarian cancer cell line

Shu Dan, Zeng Biao, He Hua, Li Yuanyuan, Zhong Ling (Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 Objective To study the reversing effect of hMLH1 gene on cisplatin resistance in ovarian cancer cell line SKOV3/DDP and its underlying mechanism. Methods SKOV3/DDP cells were transfected with recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-hMLH1 and plasmid pcDNA3.1, respectively, by using lipofectamine 2000. Expression of hMLH1 mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. Chemosensitivity of SKOV3/DDP cells to cisplatin was assayed by MTT assay. KOV3/DDP cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM) and Western blotting, respectively, after treatment with cisplatin. Results MTT assay showed the expression level of hMLH1 mRNA and protein was significantly higher ($P<0.05$) and the IC_{50} value (13.95±2.45) for cisplatin was obviously lower in SKOV3/DDP cells 24 h after transient transfection with hMLH1 gene than in controls (94.16±5.18). FCM and Western blotting showed that the apoptotic rate of SKOV3/DDP cells transfected with the hMLH1 gene was higher (3.33%±2.31%) than that of controls and the expression level of Bcl-2 was lower in SKOV3/DDP cells transfected with the hMLH1 gene (1.35±0.39) than that in controls ($P<0.05$). Conclusion The hMLH1 gene can increase the chemosensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin, which may be related to the down-regulation of Bcl-2 expression and improvement of cell apoptosis.

【Key words】 mismatch repair; hMLH1; ovarian cancer; SKOV3/DDP; drug resistance

Corresponding author: Zeng Biao, Tel: 86-23-63784244, E-mail: cqzb1018@yahoo.com.cn

顺铂是目前卵巢癌治疗的一线化疗药物,但卵巢癌细胞对化疗药物的耐药性严重影响了疗效及预后,如何增加卵巢癌细胞对化疗药物的敏感性,已成为当前卵巢癌治疗亟待解决的难题之一。DNA错配修复(mismatch repair,MMR)基因hMLH1的缺失在耐药机制的产生中起着重要作用[1],目前认为其缺失与肿瘤发生、发展有关,并能导致肿瘤细胞对化疗药物的耐受,尤其是对以DNA为靶点的化疗药物如顺铂等[2]。本研究将hMLH1重组质粒转染进SKOV3/DDP耐药细胞,纠正hMLH1基因的缺失,观察其对耐药细胞顺铂敏感性的影响,并初步探讨其作用机制,为耐药卵巢癌的治疗提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组真核表达质粒pcDNA3.1-hMLH1由美国佛罗里达大学Kevin D. Brown博士惠赠[3],空质粒pcDNA3.1由本实验室保存。人卵巢癌耐顺铂细胞株SKOV3/DDP购自广西医科大学

【通信作者】 曾 飚,电话:(023)63784244,E-mail:cqzb1018@yahoo.com.cn

附属肿瘤医院，脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司，去内毒素质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品，总 RNA 提取试剂 RNAiso™ Plus 购自 TaKaRa 公司，RT-PCR 试剂盒购自杭州博日科技有限公司，PCR 引物由赛百盛公司合成，DNA Marker 购自天根生化科技有限公司，一抗兔抗人 MLH1 单克隆抗体（sc-582）及鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体（sc7382）购自美国 Santa Cruz 公司。人卵巢癌顺铂敏感细胞株 SKOV3、碘化丙啶（PI）、Annexin V-FITC、MTT 等试剂均由重庆医科大学生命科学研究院提供。

1.2 方法

1.2.1 质粒的扩增与提取 将重组质粒 pcDNA3.1-hMLH1 及空质粒 pcDNA3.1 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，挑选阳性菌落进行扩增，用 Omega 试剂盒提取质粒。

1.2.2 转染 收集 SKOV3/DDP 细胞接种于培养板中（6 孔板的细胞数为 3×10^5/孔，96 孔板为 10^4/孔），待细胞长至 90%～95% 融合度时，分别用重组质粒 pcDNA3.1-hMLH1 和空质粒 pcDNA3.1 进行转染，同时以 SKOV3 细胞和未转染的 SKOV3/DDP 细胞作为对照。质粒与脂质体的比例为 1∶2.5，具体步骤按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行。

1.2.3 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞内 hMLH1 的表达

以 SKOV3 细胞和未转染的 SKOV3/DDP 细胞为对照，RT-PCR 法分析各组细胞中 hMLH1 mRNA 的表达，hMLH1 引物序列：上游 5′-TCCACAACAAGTCTGACCTC-3′，下游 5′-ATCTTC-CTCTGTCCAGCCAC-3′，扩增长度为 720 bp。GAPDH 内参引物：上游 5′-CTCTCTTCTCCTCCTTTTCGACAG-3′，下游 5′-GTG-GAATCATATTGGAACATGT-3′，扩增长度为 230 bp。扩增条件为：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30 个循环；最后 72 ℃ 5 min。提取各组细胞总蛋白，Western blot 检测 hMLH1 蛋白的表达。

1.2.4 MTT 法检测顺铂对转染前后细胞的生长抑制情况

将各组细胞接种于 96 孔板中，24 h 后加入不同浓度顺铂（3.0、6.0、12.0、24.0、48.0 μg/ml），各浓度组设 5 复孔。同时设不加药物的阴性对照组、只加培养基的空白对照组。培养 24 h 后取出培养板，加入 MTT 再孵育 3 h，弃上清加入 DMSO，振荡 10 min，酶标仪测定 490 nm 各孔光密度值[D(490)]。计算各组细胞 IC_{50} 值，得出耐药指数[耐药指数（resistance index，RI）=耐药细胞 IC_{50}/敏感细胞 IC_{50}]，并绘制生长抑制曲线。抑制率 = {1 -[实验组 D(490)值 - 空白组 D(490)值]/[阴性对照组 D(490)值 - 空白组 D(490)值]} ×100%。

1.2.5 流式细胞仪和 Western blot 法检测细胞凋亡情况 各组细胞经 DDP（6 μg/ml）处理 24 h 后，分别加入 500 μl Binding Buffer 重悬细胞，然后依次加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 碘化丙啶（PI），混匀，室温下避光 15 min，流式细胞仪检测细胞凋亡情况；收集经顺铂处理后的各组细胞总蛋白，Western blot 法检测凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达。

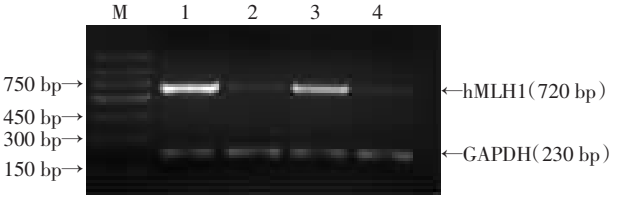
1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 转染前后细胞内 hMLH1 mRNA 的表达

pcDNA3.1-hMLH1 转染组中 hMLH1 mRNA 的表达增强，其相对表达水平（4.30 ± 0.49）与 SKOV3 敏感细胞组（5.23 ± 0.50）相比，差异无统计学意义（$P>0.05$），与 SKOV3/DDP 细胞组（0.45 ± 0.08）和 pcDNA3.1 空质粒组（0.29 ± 0.05）相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 1。

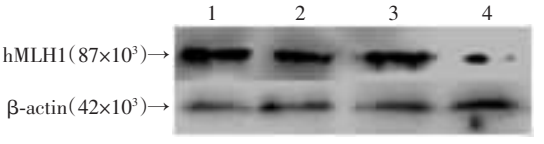


M：DNA 标准；1：SKOV3 敏感细胞组；2：SKOV3/DDP 细胞组；3：pcDNA3.1-hMLH1 组；4：pcDNA3.1 组

图 1 RT-PCR 检测转染前后 hMLH1 mRNA 的表达

2.2 转染前后细胞内 hMLH1 蛋白的表达

hMLH1 蛋白在 pcDNA3.1-hMLH1 转染组中的相对表达强度为（4.26 ± 0.66），而在 pcDNA3.1 空质粒组和 SKOV3/DDP 组中分别为（1.76 ± 0.34）和（2.30 ± 0.50）。pcDNA3.1-hMLH1 组与空质粒组及 SKOV3/DDP 组比较，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。而 pcDNA3.1-hMLH1 组与 SKOV3 敏感细胞组（5.02 ± 0.78）比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 2。

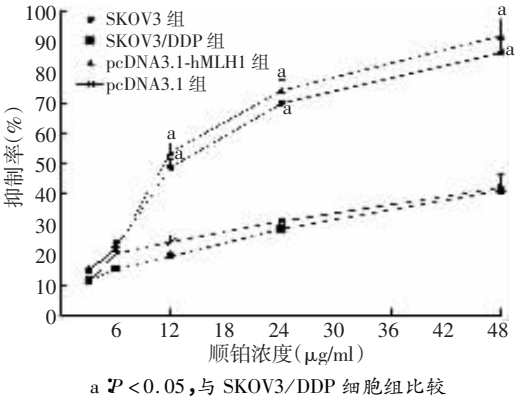


1：SKOV3 敏感细胞组；2：SKOV3/DDP 细胞组；3：pcDNA3.1-hMLH1 组；4：pcDNA3.1 组

图 2 Western blot 检测转染前后 hMLH1 蛋白的表达

2.3 MTT 法检测顺铂对转染前后细胞的生长抑制作用

根据 MTT 结果绘制生长抑制曲线（图 3），SKOV3 敏感细胞组的 IC_{50} 值与 SKOV3/DDP 细胞组对顺铂的 IC_{50} 值比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），SKOV3/DDP 细胞的耐药指数（RI）约为 6。转染重组质粒 pcDNA3.1-hMLH1 后，耐药细胞的 IC_{50} 值明显降低，与 SKOV3/DDP 细胞组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。pcDNA3.1 组的 IC_{50} 值与 SKOV3/DDP 细胞组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。



a：$P<0.05$，与 SKOV3/DDP 细胞组比较

图 3 不同浓度顺铂作用下各组细胞的生长抑制曲线

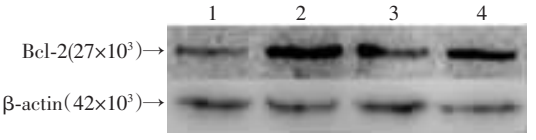
2.4 流式细胞仪对凋亡的检测

6 μg/ml 的顺铂作用 24 h 后，SKOV3 敏感细胞组、pcDNA3.1-hMLH1 转染组、pcDNA3.1 组、SKOV3/DDP 细胞组的凋亡率分别为（38.59 ± 2.23）%、（33.33 ± 2.31）%、（11.34 ±

1.23)%、(8.99±1.12)%,可见转染 hMLH1 基因后耐药细胞的凋亡率显著增加($P<0.05$)。

2.5 顺铂作用后 Bcl-2 蛋白的表达

6 μg/ml 顺铂作用 24 h,转染重组质粒后,pcDNA3.1-hMLH1 转染组中 Bcl-2 蛋白表达(1.35±0.39)较 SKOV3/DDP 组(3.08±0.51)及 pcDNA3.1 组(2.60±0.49)明显下降($P<0.05$),而与 SKOV3 敏感细胞组(1.45±0.41)接近($P>0.05$)。见图 4。



1:SKOV3 敏感细胞组;2:SKOV3/DDP 细胞组;3:pcDNA3.1-hMLH1 组;4:pcDNA3.1 组

图 4　Western blot 检测 6 μg/ml 顺铂处理后各组细胞中 Bcl-2 蛋白的表达

3　讨论

以顺铂为代表的铂类是目前卵巢癌化疗的一线药物,然而卵巢癌细胞对铂类药物的耐药性极大地影响了卵巢癌患者对化疗的敏感程度,制约了临床治疗的效果[4]。如何提高对化疗药物的敏感性是目前卵巢癌治疗的关键。错配修复基因能够识别并修复 DNA 复制、基因重组以及外源性损伤时产生的错配碱基[5],起着防止基因突变、维持 DNA 复制保真度和基因组稳定性的作用。其基本修复过程包括:识别并结合、剪切与合成[6]。hMLH1 在已发现的 9 种错配修复基因中处于核心地位[7],为识别 DNA 错配位点并启动错配修复途径的关键基因,被视为 DNA 损伤的传感器[8]。Martin 等[9]报道 hMLH1 基因缺失的卵巢癌细胞可以产生铂类药物耐受。

本研究应用脂质体转染技术成功地将 hMLH1 基因转染入卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 中,并经 RT-PCR 和 Western blot 实验证实,在 SKOV3/DDP 细胞中,hMLH1 基因的表达水平明显低于 SKOV3 细胞,这与以往的研究报道一致[10],而在转染后,SKOV3/DDP 细胞中 hMLH1 mRNA 和蛋白的表达水平明显上调,证明 hMLH1 基因通过转染在耐药细胞中得到了有效的表达,纠正了耐药细胞中 hMLH1 的缺失。进一步通过 MTT 法检测顺铂对转染后细胞的生长抑制作用,结果发现转染重组质粒后,SKOV3/DDP 细胞的 IC_{50} 值明显降低,对顺铂的敏感性增强,而转染空质粒的 SKOV3/DDP 细胞与未转染细胞相比,无明显差异。表明 hMLH1 基因能够增强耐药细胞对顺铂的敏感性,同时也排除了空载体转染对耐药细胞的影响。通过流式细胞仪检测顺铂作用下转染细胞的凋亡情况,发现转染目的基因后,SKOV3/DDP 细胞的凋亡率明显增加,说明 hMLH1 基因能够促进耐药细胞的凋亡,逆转耐药。Bcl-2 是目前研究得最深入的凋亡抑制基因。Adams 等[11]发现 Bcl-2 高表达可以使肿瘤细胞产生明显的耐药性,而下调该基因的表达可以促进细胞的凋亡。因此我们推测 hMLH1 基因促进耐药细胞的凋亡可能与 Bcl-2 有关。我们将顺铂作用于转染前后的耐药细胞 24 h 后,用 Western blot 法检测 Bcl-2 蛋白的表达情况,结果显示,Bcl-2 基因在 SKOV3/DDP 细胞中的表达明显强于 SKOV3 细胞,与文献[12]报道相符。而在转染 hMLH1 的 SKOV3/DDP 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达明显降低,表明 hMLH1 基因可抑制 Bcl-2 的表达,通过下调 Bcl-2 的表达水平来促进耐药细胞的凋亡。但 hMLH1 基因是否与其他凋亡相关基因有关及 hMLH1 通过何种途径下调 Bcl-2 的表达还需要进一步研究。

综上所述,本研究通过 hMLH1 基因的成功转染,纠正了耐药细胞中 hMLH1 的缺失,使耐药的卵巢癌细胞对顺铂的敏感性显著增加,促进耐药细胞的凋亡,在一定程度上逆转了顺铂耐药,为进一步的体内实验提供了重要依据。

参考文献:

[1] Li G M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair[J]. Cell Res, 2008, 18(1):85-98.

[2] Swisher E M, Gonzalez R M, Taniguchi T, *et al*. Methylation and protein expression of DNA repair genes:association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas[J]. Mol Cancer, 2009, 8:48.

[3] Kim W J, Rajasekaran B, Brown K D. MLH1- and ATM-dependent MAPK signaling is activated through c-Abl in response to the alkylator N-methyl-N′-nitro-N′-nitrosoguanidine[J]. J Biol Chem, 2007, 282(44):32021-32031.

[4] Kamat A A, Kim T J, Landen C N Jr, *et al*. Metronomic chemotherapy enhances the efficacy of antivascular therapy in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(1):281-288.

[5] Iyer R R, Pluciennik A, Burdett V, *et al*. DNA mismatch repair:functions and mechanisms[J]. Chem Rev, 2006, 106(2):302-323.

[6] Helleman J, van-Staveren I L, Dinjens W N, *et al*. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2006, 6:201.

[7] 谷建琦,张英怀,杨威,等. 脆性组氨酸三聚体基因及错配修复基因 hMLH1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2):151-153.

[8] Yamane K, Schupp J E, Kinsella T J. BRCA1 activates a G2-M cell cycle checkpoint following 6-thioguanine-induced DNA mismatch damage[J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6286-6292.

[9] Martin L P, Hamilton T C, Schilder R J. Platinum resistance:the role of DNA repair pathways[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5):1291-1295.

[10] O'Brien P M, Davies M J, Scurry J P, *et al*. The E3 ubiquitin ligase EDD is an adverse prognostic factor for serous epithelial ovarian cancer and modulates cisplatin resistance in vitro[J]. Br J Cancer, 2008, 98(6):1085-1093.

[11] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. Oncogene, 2007, 26(9):1324-1337.

[12] 杨晓葵,邢辉,郑芳,等. 凋亡相关基因和半胱天冬氨酸蛋白酶-3 在卵巢癌顺铂耐药细胞株中的表达[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(3):158-161.

(收稿:2010-06-24 修回:2010-07-13)
(编辑　龙　亮)