文章编号:1000-5404(2010)23-2533-03

论著

人小细胞肺癌多药耐药细胞H446/CDDP基因组DNA甲基化状态的变化

郭芮伶[1],吴国明[2],李海东[1],潘 峰[1],李文碧[1],戢福云[2],钱桂生[2] (400020 重庆,解放军第324医院呼吸内科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所[2])

【摘要】 目的 探讨基因组DNA甲基化状态与人小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)H446/CDDP细胞获得性多药耐药的关系。方法 分别提取人SCLC多药耐药细胞H446/CDDP及其亲代细胞H446的基因组DNA,应用甲基化敏感性随机引物PCR(MS-AP-PCR)方法检测其甲基化状态。结果 H446/CDDP细胞经酶解后的扩增谱带较H446细胞明显增多,且荧光强度较强,表明其基因组DNA甲基化水平较亲代细胞明显增高。结论 H446/CDDP细胞多药耐药性的获得可能与其基因组DNA甲基化水平增高有关。

【关键词】 人小细胞肺癌;多药耐药;DNA甲基化;甲基化敏感性随机引物PCR法
【中图法分类号】 R394.2;R73-354;R734.2 【文献标志码】 A

Genomic DNA methylation in multidrug-resistant cell line H446/CDDP of human small-cell lung cancer

Guo Ruiling[1], Wu Guoming[2], Li Haidong[1], Pan Feng[1], Li Wenbi[1], Ji Fuyun[2], Qian Guisheng[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020; [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 Objective To study the correlation between genomic DNA methylation and acquired multidrug-resistance of human small cell lung cancer (SCLC) cell line H446/CDDP. Methods Genomic DNA was extracted from H446/CDDP cells and their parental cells H446. Genomic DNA methylation was detected by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR (MS-AP-PCR). Results The amplified bands of H446/CDDP cells were significantly more than those of H446 cells and their fluorescence intensity was higher than that of H446 cells after enzymolysis, indicating that the genomic DNA methylation level is higher in H446/CDDP cells than in H446 cells. Conclusion The acquired multidrug-resistance of H446/CDDP cells is correlated with the high genomic DNA methylation level.

【Key words】 human small cell lung cancer; multidrug-resistance; DNA methylation; methylation-sensitive arbitrarily primed PCR

Supported by the Foundation of the Medical Science of Chengdu Military Command (MB09010). Corresponding author: Wu Guoming, Tel: 86-23-68774603, E-mail: guomingwu@mail.tmmu.com.cn

小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)是恶性程度最高的肺部肿瘤,通常对初始化疗表现出较好的疗效,随之出现多药耐药性造成化疗失败,因此一直是临床肺癌治疗的难点。其耐药性的产生机制目前尚不完全清楚,可能涉及DNA修复异常、ABC转运蛋白造成的药物泵出、凋亡抵抗、细胞外基质功能异常等多个方面,但恒定的基因组基因突变似乎并不能产生该类型的细胞多样性,表观遗传学改变引起的基因表达失调或许能更好地解释耐药表型的形成过程[1]。本研究拟从基因组DNA甲基化状态入手,研究人SCLC多药耐药性的获得与基因组DNA甲基化水平之间的关系,为逆转其耐药寻求新的途径。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

人SCLC株H446及其多药耐药株H446/CDDP[2]由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所诱导保存,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/CDDP细胞培养基中同时加入终浓度为0.5 μg/ml的顺铂。*Rsa* Ⅰ为TOYOTA公司产品,*Msp* Ⅰ和*Hap* Ⅱ为TaKaRa公司产品。

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胞株高纯度基因组DNA。紫外分光光度计测定核酸光密度*D*(260)/*D*(280)值,并稀释DNA浓度为5 μg/100 μl。

【基金项目】 成都军区医学科研计划课题(MB09010)
【通信作者】 吴国明,电话:(023)68774603,E-mail:guomingwu@mail.tmmu.com.cn

1.3 限制性酶切

分为 *Rsa* Ⅰ组、*Rsa* Ⅰ + *Hpa* Ⅱ组和 *Rsa* Ⅰ + *Msp* Ⅰ组，以1 μg DNA为模板，分别加入限制性内切酶，用相应缓冲液定容至20 μl，37 ℃酶切16 h，65 ℃ 20 min灭活。

1.4 AP-PCR反应

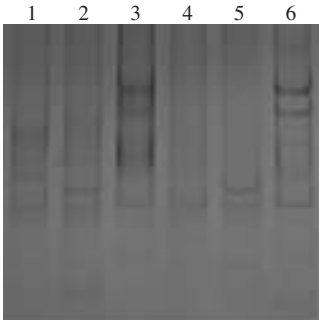
随机引物序列 MGF2：5′-AACCCTCACCCTAACCCGCG-3′；MGC0：5′-AACCCTCACCCTAACCGCGC-3′；MLG2：5′-AACCCTCACCCTAACCCCGG-3′，由华大基因公司合成。25 μl反应体系含10 × Buffer 2.5 μl，2.5 mmol/L Mg^{2+}，100 μmol/L dNTP，Hotstar *Taq* 聚合酶1 U，基因组DNA 4 μl。扩增条件：低严谨条件下，94 ℃变性30 s，40 ℃退火60 s，72 ℃延伸90 s，共5个循环；严谨条件下，94 ℃变性15 s，55 ℃退火15 s，72 ℃延伸60 s，共30个循环；最后1个循环后72 ℃延伸5 min。各组取5 μl扩增产物，1 μl上样缓冲液混匀后上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，按鼎国公司核酸银染试剂盒说明书进行银染。

1.5 结果判定

本实验的基本原理：限制性内切酶 *Hpa* Ⅱ和 *Msp* Ⅰ是同裂酶，其基因组切割序列均为CCGG，但只要CCGG中2个胞嘧啶之一甲基化都会使 *Hpa* Ⅱ的切割受到抑制，而CCGG中第1个胞嘧啶甲基化限制 *Msp* Ⅰ的切割，而第2个胞嘧啶甲基化与否却不影响其切割作用。因此，利用随机引物在PCR严谨度较低的情况下，对不同酶切后的DNA片段进行扩增，若酶解后的DNA片段经PCR扩增无扩增产物出现，说明酶解片段中包含的CCGG位点没有发生甲基化，因为 *Msp* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ可以切割它所识别的位点，从而阻止DNA扩增。反之，则说明相应位点发生了甲基化。检测发生在基因组DNA中随机而特异的多个位点甲基化改变，反映出基因甲基化水平的改变。比较扩增谱带的位置和荧光强度，条带增加、荧光强度增强为甲基化水平增高，反之为甲基化水平降低。

2 结果

H446/CDDP细胞及H446细胞基因组DNA经 *Rsa* Ⅰ、*Msp* Ⅰ和 *Hap* Ⅱ酶切后AP-PCR产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图1。H446/CDDP细胞经 *Rsa* Ⅰ/*Hap* Ⅱ酶解后的扩增谱带较H446细胞明显增多，经 *Rsa* Ⅰ/*Msp* Ⅰ酶解后的扩增谱带的荧光强度较H446细胞明显增强，表明H446/CDDP细胞的基因组DNA甲基化水平显著高于亲代细胞。



1～3：H446/DDP；4～6：H446；1、4：*Rsa* Ⅰ酶切；2、5：*Rsa* Ⅰ + *Hap* Ⅱ双酶切；3、6：*Rsa* Ⅰ + *Msp* Ⅰ双酶切

图1 H446/CDDP和H446细胞基因组DNA经MS-AP-PCR扩增结果

3 讨论

化疗是目前肺癌治疗的重要手段，在SCLC治疗中的作用更是举足轻重。SCLC初治时对化疗多较敏感，但由于获得性耐药的普遍发生，其5年生存率仅为5%～10%，广泛期患者甚至低至2%。尽管新的化疗药物不断被研发出来、化疗方案不断完善，其总生存率仍无明显改善。因此，如何逆转获得性耐药成为改善SCLC预后的关键所在。

SCLC的耐药机制目前尚不清楚，既往研究表明可能与DNA修复、ABC转运蛋白、凋亡抵抗等多个相关基因的表达异常有关。因此，因遗传性改变造成的选择性克隆细胞并不能解释耐药表型的产生，既往众多针对“单基因”的尝试失败也证实了这一点。相反，表观遗传学改变却可以很好的解释这一过程。因为表观遗传学机制可以同时影响多个基因的表达，而且这种改变可以在极短的时间内完成，所以获得性耐药的产生可以在化疗后迅速出现[3,4]。已有证据表明，使用化疗药物后肿瘤细胞的DNA甲基化及染色体修饰状态迅速发生变化[5]，而多个耐药相关基因的表达失调更与其甲基化异常状态密切相关[6-9]。本研究采用经典的甲基化敏感性随机引物PCR法初步检测了人小细胞肺癌多药耐药株细胞H446/CDDP及其亲代细胞H446的基因组DNA甲基化状态，结果发现多药耐药细胞株的DNA甲基化水平较亲代细胞显著增高。表明较高的DNA甲基化水平可能正是造成耐药细胞对化疗药物毒性反应较差的重要原因。

甲基化状态异常在肺癌耐药中的作用仍有待更深入的研究和证实，但相对于遗传学缺陷，表遗传机制的调控具有可逆性，这无疑使其在肺癌治疗中被赋予了更多的期望。临床研究证实，DNA甲基化抑制剂和组蛋白脱乙酰化抑制剂单独或联合运用具有良好的抗肿瘤作用[10]，甚至可能逆转耐药表型或使放化疗增敏[11-14]。深入研究表遗传机制在肺癌耐药中的作用将给临床SCLC治疗带来新的曙光。

参考文献：

[1] Brown R, Glasspool R. Epigenetic modulation of resistance to chemotherapy?[J]. Ann Oncol, 2007, 18(9): 1429-1430.

[2] 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): 1502-1504.

[3] Di-Nicolantonio F, Mercer S J, Knight L A, *et al*. Cancer cell adaptation to chemotherapy[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 78.

[4] Glasspool R M, Teodoridis J M, Brown R. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance[J]. Br J Cancer, 2006, 94(8): 1087-1092.

[5] Tian K, Jurukovski V, Wang X P, *et al*. Epigenetic regulation of WTH3 in primary and cultured drug-resistant breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(21): 10024 - 10031.
[6] 郭芮伶,吴国明,耿福云,等. DNA 错配修复基因甲基化在 H446 细胞获得性耐药中的作用[J]. 第三军医大学学报,2007, 29(23): 2247 - 2249.
[7] 柳瑞军,钟竑. Relationship between methylation status of multi-drug resistance protein (MRP) and multi-drug resistance in lung cancer cell lines[J]. 中国癌症研究:英文版,2007, 19(4): 277 - 282.
[8] Ibanez-de-Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, *et al*. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(11): 1681 - 1690.
[9] Chang X, Monitto C L, Demokan S, *et al*. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers[J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2870 - 2879.
[10] Chavez-Blanco A, Perez-Plasencia C, Perez-Cardenas E, *et al*. Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines[J]. Cancer Cell Int, 2006, 6: 2.
[11] Bram E E, Stark M, Raz S, *et al*. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance[J]. Neoplasia, 2009, 11(12): 1359 - 1370.
[12] Sonnemann J, Kumar K S, Heesch S, *et al*. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells[J]. Int J Oncol, 2006, 28(3): 755 - 766.
[13] Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, *et al*. Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine[J]. J Transl Med, 2006, 4: 32.
[14] Candelaria M, Gallardo-Rincon D, Arce C, *et al*. A phase Ⅱ study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors[J]. Ann Oncol, 2007, 18(9): 1529 - 1538.

(收稿:2010-06-22 修回:2010-08-17)
(编辑　龙　亮)

文章编号:1000-5404(2010)23-2535-01

个案与短篇

大脑中动脉支架术后造影剂外渗 1 例

刘　锋,吕　伟,陈康宁,史树贵,胡　俊　(400038 重庆,第三军医大学西南医院神经内科)

【关键词】 脑动脉;支架;造影剂
【中图法分类号】 R743　【文献标志码】 B

目前脑动脉支架成形术已广泛开展,其疗效已得到肯定,术后即刻头颅 CT 检查可以早期发现出血性病变,但其 CT 表现是多种多样的。我科收治 1 例大脑中动脉支架术后的患者,其术后即刻头颅 CT 表现非常特殊,现报告如下。

1　临床资料

患者,男性,55 岁,于 2009 年 12 月 7 日突发言语不流利,伴右侧肢体轻度无力,来我院行头颅 CT 显示左侧基底节区脑梗死,以"脑梗死"收入我科。患者既往有高血压病史 31 年余。既往有吸烟史 5 年,约 10 支/d,有少量饮酒史。

查体:患者言语欠流利,颈软,双侧鼻唇沟对称,伸舌不偏,无吞咽困难及饮水呛咳,右侧上下肢肌力 5$^-$ 级,左侧上下肢肌力 5 级,双侧肌张力正常,双侧病理反射未引出。NIHSS 评分 1 分。为明确患者脑血管情况,行全脑血管造影检查术:右侧大脑中动脉 M1 段局限性狭窄约 80%,于 2009 年 12 月 24 日在全麻下行右侧大脑中动脉支架置入术,将球扩式支架 2.5 mm × 8 mm(Apollo Microport)置于狭窄处,支架释放后见狭窄解除。支架置入后复查造影未见成形血管及其分支有对比剂外溢或局部异常染色表现。术中造影剂为碘海醇(300 mgI/ml),用量在 250 ml。

手术完毕后,患者意识为嗜睡状态,言语不清,较术前稍加重,左侧肢体可见自主活动,左侧病理反射未引出,NIHSS 评分 2 分。即刻查头颅 CT 显示右侧基底节区大片高密度影(图 1)。术后 7 h,复查头颅 CT 显示:高密度影范围较前明显减小(图 2)。术后第 2 天,再次复查头颅 CT,显示右侧基底节区高密度影已基本消失。术后第 5 天,患者言语较前清晰,左侧肢体肌力 4$^+$ 级,病理反射未引出,NIHSS 评分 1 分,复查 CT 示右侧基底节区高密度影已完全消失(图 3)。2 周后患者出院,复查神经系统查体未见异常,NIHSS 评分为 0 分。

2　讨论

该患者以"言语不清伴右侧肢体轻度无力"为主要症状,DSA 提示右侧大脑中动脉 M1 段严重局限性狭窄(约 80%),予以右侧大脑中动脉支架植入术,术后出现意识障碍,即刻行头颅 CT 示右侧基底节区高密度影,高密度影没有位于梗死灶内,而是位于术前正常脑组织中。

脑动脉支架术后即刻头颅 CT 的正常影像表现可分为 2 型[1,2]:Ⅰ型:表现为颅内较大血管和大脑镰,小脑幕,上、下矢状窦的强化。Ⅱ型:除有Ⅰ型的表现外,近期形成的梗死灶内有高密度影,但无占位效应。4 ~ 8 h 内复查头颅 CT,高密度影可明显吸收,可能与造影剂通过梗死灶内开放的血脑屏障有关。如果在术前梗死灶以外的脑实质内可见片状高密度影,并进行性增大,提示患者发生了颅内出血,需要予以立即处理。该患者无明显偏瘫迹象,无神经定位体征,所以临床体征不支持出血;另一方面,数小时内高密度影范围已明显减少,而出血

(下转 2540 页)

【通信作者】 胡　俊,E-mail:hujuncq@163.com