论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0852-04

DNA 损伤修复蛋白 XPF 影响肾癌细胞顺铂耐药

张 乔[1],袁 方[2],黄亚琴[1],陈志文[2],杨 劲[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部细胞生物学教研室[1],西南医院全军泌尿外科研究所[2])

[摘要] **目的** 探索 DNA 损伤修复蛋白 XPF 表达水平影响肾癌细胞顺铂耐药的作用与机制。**方法** Western blot 法检测不同肾癌细胞株的 XPF 蛋白水平;采用 shRNA 干扰技术,筛选稳定低表达 XPF 的细胞株;采用克隆形成实验及细胞凋亡检测实验,比较 XPF 低表达细胞株与 XPF 正常表达细胞株的顺铂敏感性;通过 β-半乳糖苷酶染色法,检测细胞的衰老程度。**结果** 在肾癌细胞 786-0、ACHN 和 Caki-1 中,ACHN 细胞的 XPF 表达水平最高,其顺铂耐药程度也最高。shRNA 干扰获得稳定低表达 XPF 的 ACHN 细胞,顺铂处理后,其克隆形成率低于对照($P<0.05$),细胞凋亡率高于对照,衰老细胞比例也显著高于对照($P<0.01$)。**结论** 肾癌化疗不敏感可能与其高表达 DNA 损伤修复蛋白 XPF 有关,干预并下调肾癌 ACHN 细胞 XPF 表达,可增强顺铂的凋亡诱导效应并加速衰老,从而提高其顺铂敏感性。

[关键词] 肾癌;顺铂;XPF;细胞衰老
[中图法分类号] R394-33; R73-362; R737.11 [文献标志码] A

DNA repair protein XPF affects cisplatin resistance of renal cancer cells

Zhang Qiao[1], Yuan Fang[2], Huang Yaqin[1], Chen Zhiwen[1], Yang Jin[1] ([1]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, [2]Department of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and the underlying mechanism of the expression of DNA damage repair protein XPF in cisplatin resistance of renal cancer cells. **Methods** XPF level in different renal cancer cell lines ACHN, 786-0 and Caki-1 was detected by Western blotting. After acquiring shXPF cells with XPF expression stably inhibited to a low level by shRNA technique, cisplatin resistance was detected in the shXPF cells and shNC cells (negative control) by colony formation assay and Annexin V-FITC/PI staining. β-galactosidase staining was used to detect cell senescence of shXPF cells. **Results** Among 786-0 cells, ACHN cells and Caki-1 cells, XPF was strongly expressed in ACHN cells, which showed highest resistance to cisplatin. After interfered by shRNA technique, ACHN-shXPF cells were acquired stably expressing lower level XPF, showing lower colony formation rate ($P<0.05$) and higher percentage of apoptosis after cisplatin treatment. Additionally, the percentage of senescent cells was significantly higher in ACHN-shXPF than ACHN-shNC cells ($P<0.01$). **Conclusion** The insensitivity of renal cancer cells to cisplatin might be related with the high expression of DNA damage repair protein XPF. Interfering the XPF expression in ACHN cells can promote cisplatin-induced apoptosis and cell aging, thus leading to higher sensitivity to cisplatin.

[**Key words**] renal cancer; cisplatin; XPF; cell aging

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272822) and the Major Special Program of Clinical Medicine Research Foundation of Third Military Medical University (2012XLC02). Corresponding author: Yang Jin, E-mail: zhiwen@hotmail.com

肿瘤的传统治疗手段可分为手术、放疗和化疗,其中化疗尤为重要。早期治疗中,化疗可以有效杀伤局部及转移癌细胞,减缓肿瘤生长速度。晚期治疗中,它可以有效减轻症状,延长患者生存期。但并非所有肿瘤对化疗敏感。在化疗药物应用过程中发现,多数肿瘤会出现化疗敏感性降低,即耐药。肿瘤耐药包括固有耐药和获得性耐药[1]。前者是指对特定肿瘤初次使用特定化疗药物即不敏感;后者指对特定肿瘤初次使用特定化疗药物时敏感,但随着使用时间的延长或治疗复发肿瘤时敏感性明显降低。

近年来肾癌发病率逐年上升,已经进入男性肿瘤发

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272822);第三军医大学临床医学研究重大专项基金项目(2012XLC02)
[通信作者] 杨 劲,E-mail: zhiwen@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140116.1057.008.html(2014-01-16)

病率前十名,成为泌尿系统第二大肿瘤。肾癌对多种化疗药物均表现固有耐药,临床治疗中无法应用有效的化疗方案。因此,深入探讨肾癌化疗耐药的机制,为临床治疗提供理论指导,具有重要的社会价值。目前临床化疗药物中,DNA 损伤药物占有重要地位,如顺铂、博莱霉素及依托泊苷等。其中,顺铂作为常规化疗药物,可通过引起 DNA 损伤,进而诱发肿瘤细胞死亡[2-3]。而肿瘤细胞可通过核苷酸切除修复途径进行 DNA 修复,降低顺铂的杀伤效应。其中,DNA 修复蛋白 XPF 在修复顺铂造成的 DNA 损伤过程中发挥关键的作用[4]。

鉴于 DNA 修复能力的异常增强是肿瘤耐药的重要机制之一,本研究着力探讨 DNA 修复蛋白 XPF 对肾癌细胞顺铂耐药的影响。前期研究初步发现 XPF 的表达异常可能与肾癌化疗耐药有密切关系[5],本研究进一步通过 shRNA 干扰技术获取稳定低表达 XPF 的细胞模型,通过克隆形成、凋亡检测及衰老检测技术,探讨 XPF 影响肾癌顺铂耐药的作用与机制,为指导临床肾癌化疗提供重要的实验数据。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒及培养基

ACHN、786-0 及 Caki-1 细胞均购于美国模式生物库(ATCC),稳定转染 ACHN 细胞得到 ACHN-shNC 细胞和 ACHN-shXFP 细胞。EMEM 培养基和 Mccoy's 5a 培养基购于吉诺生物公司,RPMI1640 培养基购于 Thermo 公司,胎牛血清购于 Gibco 公司,0.25% 胰蛋白酶购于 HyClone 公司。干扰 XPF 蛋白表达的 shRNA 模板正义链序列为 5′-CACCGGAGCCAAGATACGTGGT-TCTTTCAAGAGAAGAACCACGTATCTTGGCTCCTTTTTTG-3′,反义链序列为 5′-GATCCAAAAAAGGAGCCAAGATACGTGGTTCT-TCTCTTGAAAGAACCACGTATCTTGGCTCC-3′,载体为 pGPU6/GFP/Neo,购于上海吉玛公司。

1.2 抗体与试剂

一抗均为鼠源单克隆抗体,anti-XPF(美国 Santa Cruz 公司),anti-GAPDH(中杉金桥公司),二抗为山羊抗小鼠 IgG 抗体(中杉金桥公司)。主要试剂:蛋白裂解液 RIPA、PMSF、细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天公司),二甲亚砜(美国 Sigma 公司),化学发光试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.3 仪器与软件

离心机、紫外分光光度仪(Beckman 公司),倒置显微镜(Nikon eclipse Ti),荧光显微镜(Nikon eclipse E600)等。软件:DU800#Spectrophotometer、Image J、SPSS 18.0 等。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 ACHN、786-0 和 Caki-1 细胞分别用 EMEM、RPMI1640 和 Mccoy's 5a 完全培养基培养(含 10% 胎牛血清及青链霉素),温度 37 ℃,二氧化碳浓度为 5%。

1.4.2 蛋白裂解 用 0.25% 胰酶消化收集对数生长期细胞,加入适量含蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA(强),冰上放置 20 min;4 ℃,14 000 r/min,离心 10 min,取上清,存于 -70 ℃备用。

1.4.3 Western blot 检测 配制 10% SDSS-PAGE 胶,每个泳道上样 50 μg,恒压 80 V,电泳 3 h。电泳结束后,恒流 250 mA,电转 2.5 h,将蛋白转至 PVDF 膜上。用 PBST 配制 5%(质量体积比)脱脂牛奶,封闭 PVDF 膜 1 h。孵育鼠源 GAPDH(1∶10 000)及 XPF(1∶200)抗体,4 ℃过夜。PBST 洗 3 次,每次 10 min。孵育二抗,GAPDH 二抗稀释比例为 1∶10 000,XPF 二抗稀释比例为 1∶5 000,37 ℃,2 h。PBST 洗 3 次,每次 10 min。化学发光法发光并显影。

1.4.4 稳定转染 消化对数生长期细胞铺 6 孔板,细胞密度 80% ~90%,以备次日转染。脂质体 2000 每孔加 6 μL,与无血清培养基混匀静置 5 min。shRNA 表达质粒(阴性对照质粒及干扰组质粒)用量均为每孔 3 μg,与无血清培养基混匀后再与预先混好的脂质体混匀,静置 20 min。6 孔板内换为无血清培养基后加入转染液。培养 48 h 后将细胞消化传代,开始使用合适浓度的 G418 筛选。每 2 ~3 天更换含特定浓度 G418 的新鲜培养基。待细胞克隆长至合适大小,则可将单个克隆消化传代并鉴定干扰效果。

1.4.5 克隆形成实验 接种细胞于 6 孔板,每孔 500 个,待细胞贴壁后,用含相应浓度顺铂的无血清培养基培养细胞 4 h,换正常培养基继续培养,待细胞单克隆达到 50 个细胞以上时终止培养(2 周左右),固定染色并统计相对克隆形成率。

1.4.6 细胞凋亡检测 接种细胞于培养瓶中,待其贴壁后,给予顺铂处理,处理终浓度为 20 μmol/L,处理 4 h 后更换正常培养基继续培养至 48 h,消化收集细胞,使用 Annex V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测。

1.4.7 细胞衰老检测 细胞接种于 6 孔板,贴壁后弃去培养基,PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 15 min。弃去固定液,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。弃去 PBS,每孔加工作液 1 mL(10 μL 染色液 A,10 μL 染色液 B,930 μL 染色液 C,50 μL X-Gal)。封口膜密封后,置于 37 ℃温箱过夜,普通光镜观察并拍照。

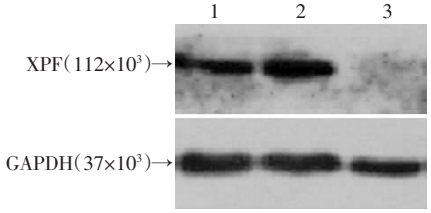
1.5 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均值比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 不同肾癌细胞 XPF 表达水平不同

Western blot 检测 786-0、ACHN 及 Caki-1 3 种肾癌细胞的 XPF 表达水平。如图 1 所示,在所检测肾癌细胞株中,肾癌细胞 ACHN 的 XPF 相对表达量最高(1.61 ±0.02),786-0 次之(1.15 ±0.04),Caki-1 的 XPF 相对表达量最低(0.21 ±0.05)。



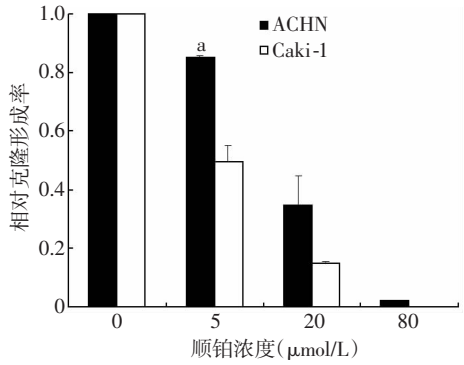
1:786-0 细胞;2:ACHN 细胞;3:Caki-1 细胞

图 1 Western blot 检测不同肿瘤细胞 XPF 蛋白的表达

2.2 XPF 表达水平与肾癌细胞顺铂耐药程度相关

通过克隆形成实验检测 XPF 表达水平最高的 ACHN 细胞及表达水平最低的 Caki-1 细胞的顺铂耐药程度。如图 2 所示,

顺铂处理浓度为5 μmol/L时，ACHN细胞相对克隆形成率明显高于Caki-1细胞，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。说明ACHN细胞对顺铂耐药程度高于Caki-1细胞。提示在肾癌细胞系中，XPF表达水平高的细胞对顺铂耐受更强。

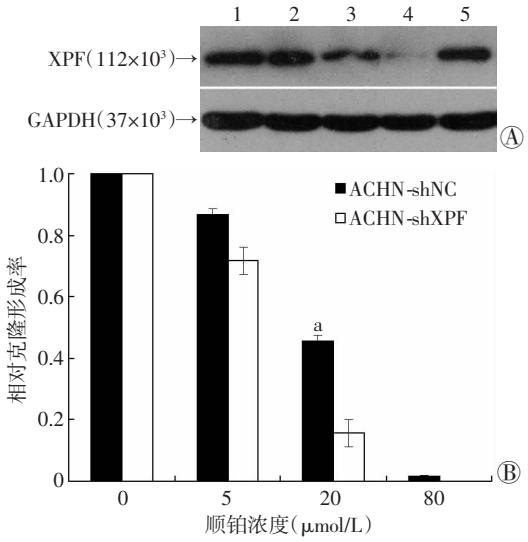


a：$P<0.05$，与同浓度Caki-1细胞比较

图2 不同肾癌细胞株顺铂耐药情况

2.3 成功构建稳定低表达XPF的肾癌细胞株ACHN-shXPF且顺铂敏感性显著增强

运用特异干扰XPF表达的shRNA重组质粒稳定转染ACHN细胞，经G418筛选，成功获得约10个具有G418抗性的单克隆细胞株；Western blot检测结果见图3A，与正常ACHN细胞及对照无关乱序RNA干扰细胞（ACHN-shNC）对比，4号泳道的细胞XPF干扰效果最好，XPF表达量降低90%以上，证实稳定低表达XPF肾癌细胞株ACHN-shXPF构建成功，后续实验均以此细胞株为模型。通过克隆形成实验对比两细胞株的顺铂敏感性，顺铂处理浓度为20 μmol/L时，ACHN-shNC细胞相对克隆形成率高于ACHN-shXPF细胞，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图3B）。说明ACHN-shNC细胞顺铂耐药程度显著高于ACHN-shXPF细胞。该结果印证了XPF表达量与顺铂耐药程度正相关，XPF在顺铂耐药过程中起重要作用，通过干扰XPF表达可以提高肿瘤细胞的顺铂敏感性。

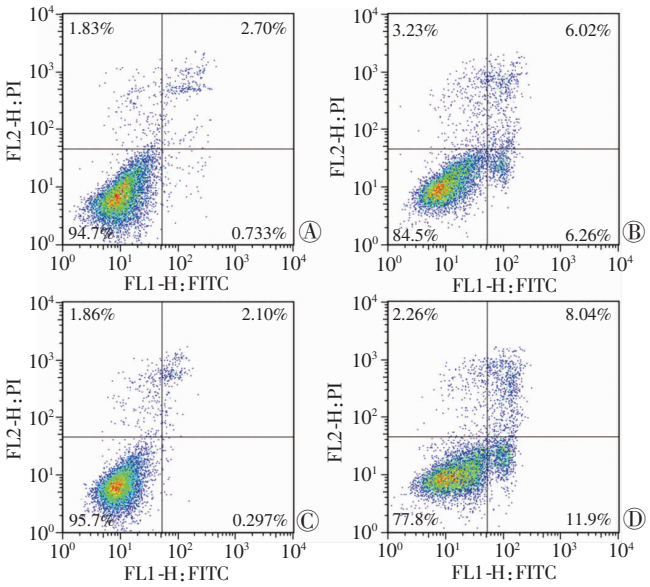


A：Western blot检测结果 1：正常ACHN细胞；2：ACHN-shNC细胞；3～5：3株稳定转染shRNA的ACHN细胞株；B：克隆形成实验结果 a：$P<0.05$，与同浓度ACHN-shXPF细胞比较

图3 稳定低表达XPF的ACHN细胞的XPF表达水平及顺铂敏感性

2.4 干扰XPF导致肾癌ACHN细胞凋亡增加

Annexin V-FITC/PI凋亡检测显示（图4），对照细胞ACHN-shNC凋亡比例为6.26%，而低表达XPF细胞ACHN-shXPF凋亡比例则高达11.90%。说明干扰XPF使顺铂诱导的ACHN细胞凋亡比例增加，这正是其顺铂敏感性增加的原因之一。

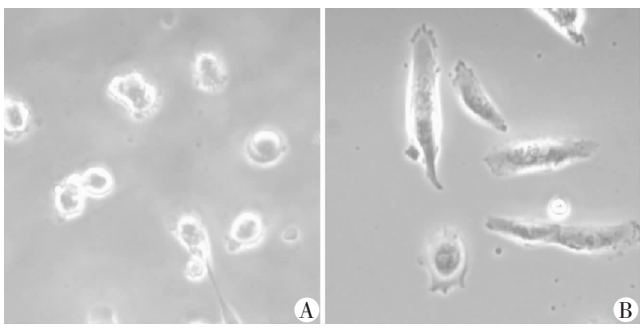


A、B：分别为未处理和20 μmol/L顺铂处理的ACHN-shNC细胞；C、D：分别为未处理和20 μmol/L顺铂处理的ACHN-shXPF细胞

图4 流式细胞仪检测细胞凋亡

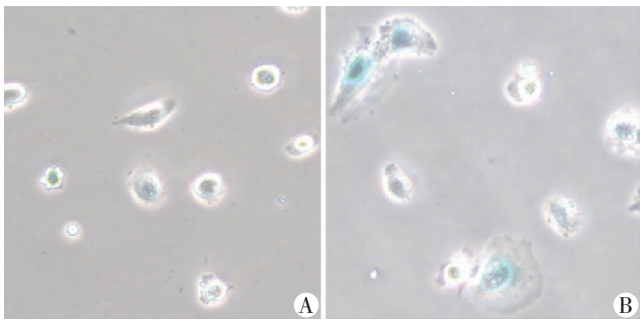
2.5 干扰XPF增加肾癌ACHN细胞衰老比例

在细胞培养过程中发现ACHN-shXPF细胞形态发生变化（图5），具体表现为细胞体积增大且不规则、细胞内空泡形成、细胞核增大等，提示shXPF细胞可能有衰老倾向。如图6所示，ACHN-shNC细胞的衰老比例为（4.8±2.1）%，ACHN-shXPF细胞的衰老比例为（9.5±1.7）%，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。提示XPF在细胞衰老过程中可能起到重要作用，低表达XPF细胞更易衰老。衰老细胞代谢水平低于正常细胞，采用饥饿处理法可突显这种差异。饥饿处理后，2组细胞均大量死亡，所剩贴壁细胞严重空泡化。如图7所示，两细胞株均有残余贴壁细胞，ACHN-shNC细胞均为死细胞，而ACHN-shXPF细胞部分仍贴壁良好。经Image J软件分析，ACHN-shXPF细胞直径为（3.28±0.74）cm，正常对照细胞为（0.64±0.13）cm，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。



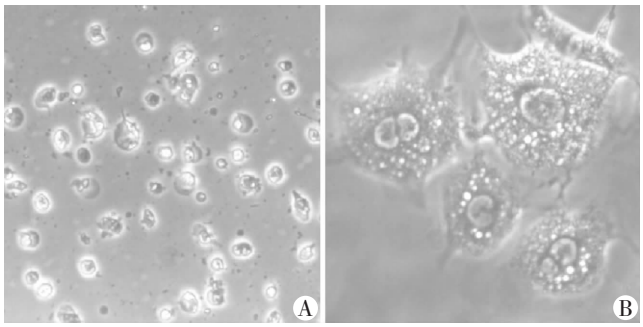
A：对照细胞ACHN-shNC形态；B：稳定低表达细胞ACHN-shXPF形态

图5 干扰XPF表达后细胞形态改变（倒置显微镜 ×100）



A:对照细胞 ACHN-shNC;B:稳定低表达细胞 ACHN-shXPF

图 6 β-半乳糖苷酶检测细胞衰老 (倒置显微镜 ×100)



A:对照细胞 ACHN-shNC;B:稳定低表达细胞 ACHN-shXPF

图 7 饥饿处理后 2 组细胞形态差异 (倒置显微镜 ×100)

3 讨论

随着肿瘤耐药研究的不断深入,众多耐药机制得以揭示。其中,DNA 损伤修复能力异常导致的肿瘤耐药越来越引人注目。因为多种抗肿瘤药物以 DNA 为作用靶点,通过损伤 DNA 进而诱发细胞死亡,而肿瘤 DNA 损伤修复能力的增强恰恰削弱了这类抗肿瘤药物的效用,最终导致肿瘤耐药。

DNA 损伤修复能力强弱是多种修复途径的综合表现。DNA 损伤修复途径包括碱基切除修复途径、核苷酸切除修复途径、错配修复途径、双链断裂修途径复、交联修复途径等,但修复顺铂引起的 DNA 损伤最重要的途径是核苷酸切除修复(nucleotide excision repair,NER)途径[6]。近年较多研究指出,在 NER 途径众多蛋白因子中,复合体 ERCC1-XPF 与顺铂的耐药紧密相关[7]。在这一复合体中,XPF 起到关键作用,XPF 表达水平高低影响着顺铂耐药的程度。也有研究称切除修复交叉互补基因 1(excision repair cross-completion gene 1, ERCC1)才是影响顺铂耐药的关键因子,耐药程度与 XPF 表达水平无关[8]。由于在复合体 ERCC1-XPF 在 NER 途径中主要起核酸内切酶的作用,而其中的内切酶活性结构域在 XPF 上,ERCC1 仅起到稳定和辅助 XPF 的功能,所以本实验以 XPF 为切入点,探讨 XPF 在顺铂耐药中是否起关键作用。本研究结果显示,XPF 表达水平高低与顺铂耐药密切相关。高表达 XPF 细胞株比其他细胞株对顺铂耐药程度更高。鉴于 XPF 表达水平与顺铂耐药的这种关系,我们进一步稳定干扰 XPF 表达,发现稳定低表达 XPF 细胞的克隆形成能力降低、凋亡诱导率增加。印证了 XPF 对顺铂耐药的重要影响,提示 XPF 低表达导致 DNA 损伤修复能力降低,最终通过增加凋亡来降低顺铂耐药。

另外,XPF 低表达细胞 ACHN-shXPF 出现了典型的衰老表型。可能是由于 XPF 缺陷导致细胞内 DNA 损伤修复缺陷,进而使细胞内 DNA 损伤累积而引发衰老[9]。其内在机制有待进一步深入研究。研究发现 ERCC1 的异常会使小鼠出现衰老表现[10-11]。由于 XPF 与 ERCC1 以异二聚体的形式发挥其生物学功能,所以任何一个异常都将导致该复合体功能缺陷,从而引起相同的效应。XPF 低表达导致该复合体功能缺陷,一方面使细胞的 DNA 损伤修复能力降低,另一方面使细胞衰老加速,最终导致顺铂诱导的细胞凋亡增加。

综上所述,本研究提示通过降低肿瘤中 XPF 的表达水平可以提高肿瘤细胞的顺铂敏感性。通过研制干扰 XPF 表达的小分子药物,辅助顺铂化疗,可提高其抗肿瘤效果,为治疗多种顺铂耐药肿瘤带来新希望。

参考文献:

[1] Breier A, Gibalova L, Seres M, *et al*. New insight into p-glycoprotein as a drug target[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(1): 159-170.

[2] 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.

[3] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, *et al*. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1869-1883.

[4] Wood D P. Re: Cisplatin Sensitivity of Testis Tumour Cells is Due to Deficiency in Interstrand-Crosslink Repair and Low ERCC1-XPF Expression Editorial Comment[J]. J of Urol, 2011, 186(2): 457.

[5] Usanova S, Piee-Staffa A, Sied U, *et al*. Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 248.

[6] Enoiu M, Jiricny J, Scharer O D. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(18): 8953-8964.

[7] McNeil E M, Melton D W. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(20): 9990-10004.

[8] Arora S, Kothandapani A, Tillison K, *et al*. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells[J]. DNA Repair (Amst), 2010, 9(7): 745-753.

[9] Signer R A, Morrison S J. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(2): 152-465.

[10] Weeda G, Donker I, de-Wit J, *et al*. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence[J]. Curr Biol, 1997, 7(6): 427-439.

[11] Prasher J M, Lalai A S, Heijmans-Antonissen C, *et al*. Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1$^{-/-}$ mice[J]. EMBO J, 2005, 24(4): 861-871.

(**收稿**:2013-11-08;**修回**:2013-12-12)

(编辑 龙 亮)