

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0092-04

封闭 ERCC1 基因表达对卵巢癌细胞耐药的影响

李体远¹, Jing Jie Yu², Eddie Reed²(1. 暨南大学医学院附二院深圳市人民医院临床医学研究中心, 深圳 518020; 2. West Virginia University, Mary Babb Randolph Cancer Center, Morgantown, West Virginia 26506-9300)

[摘要] **目的:** 探讨通过封闭 ERCC1 基因表达干扰 DNA 损伤修复路径及其对卵巢癌细胞对铂类药物耐药性的影响。**方法:** 构建 ERCC1 基因反义表达载体, 转染人卵巢癌细胞 A2780 及 A2780/CP70, 采用 Northern 杂交及 Western Blot 分析人卵巢癌细胞内 ERCC1 基因 RNA 及蛋白表达水平变化; 利用荧光素酶报告基因系统观察宿主细胞对 DNA 损伤的修复作用; 采用 MTT 实验研究细胞对铂类药物耐药性的影响。**结果:** 卵巢癌细胞转染反义 ERCC1 基因后, ERCC1 基因转录水平、蛋白表达水平明显下降。荧光素酶报告基因系统结果证明, 宿主细胞的 DNA 修复活性下降。MTT 实验表明, 伴随 ERCC1 基因表达水平下降, 细胞对顺铂的耐药性降低。**结论:** 转染 ERCC1 反义基因显著影响宿主细胞的核苷酸切除修复, 影响细胞对顺铂的耐药性。

[关键词] ERCC1/DNA 损伤修复; 耐药/顺铂; 卵巢癌

[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A

Effect on Cytotoxicity by Blocking ERCC1 Gene Expression in Ovarian Cancer Cell Lines

LI Ti-yuan¹, YU Jing-Jie², Eddie Reed²(1. Medical College, Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, 518020, Guangdong, China; 2. Mary Babb Randolph Cancer Center, West Virginia University, Morgantown, West Virginia 26506-9300)

[Abstract] **Objective:** To study the effect on cytotoxicity and drug resistance by blocking ERCC1 gene expression in ovarian cancer cell lines. **Methods:** ERCC1 antisense expression vector was constructed and transfected into human ovarian cancer cell lines. Northern blotting and Western blotting were used to detect the RNA and protein expression level in the cells. Luciferase assay system was used to reveal the host cell reactivation function. MTT assay was used to study the effect on cytotoxicity and drug resistance in the cell lines. **Results:** After transfection of the antisense ERCC1, Northern and Western blotting indicated that the RNA and protein expression level of ERCC1 was obviously decreased. Luciferase assay showed reduced DNA-damage repair capacity as assessed by host cell reactivation. MTT assay also showed decreased drug resistance to cisplatin in the lines. **Conclusion:** Transfection of antisense ERCC1 may enhance the cisplatin cytotoxicity by disturbing the NER pathway in cisplatin-resistant cell lines.

[Key words] ERCC1/DNA damage repair; drug resistant/cisplatin; ovarian cancer

* DNA 损伤修复对于肿瘤的形成、治疗及耐药都起着非常重要的作用, 核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 是 DNA 损伤修复的重要途径。在人类细胞中, 由化学药物造成的 DNA 损伤主要通过 NER 途径修复, 而切除修复交叉互补基因 (excision repair cross complementation group 1, ERCC1) 在 NER 途径中起着关键作用^[1]。

卵巢癌是妇科肿瘤中仅次于乳腺癌、子宫颈癌的

[基金项目] 本课题受美国 "The National Center for Research on Minority Health and Health Disparity" 资助

[作者简介] 李体远 (1964-), 男, 医学博士, 博士后, 副研究员, 主要从事分子生物学、分子病毒、肿瘤学研究。本文工作作为作者 2002-2003 在美国 WVU 作博士后期间完成

[通讯作者] 李体远, E-mail: tiyuan@163.net

恶性癌变, 顺铂[cis-Diamminedichloroplatinum (II), cisplatin/CDDP]则是卵巢癌及其他肿瘤治疗中使用最为广泛的化疗药物。然而, 顺铂的疗效由于癌细胞内在或者后天获得的耐药性受到削弱。尽管到目前为止, 对顺铂的体内耐药机制并不十分清楚, NER 在铂类药物耐药过程中起着非常重要的作用。通过抑制 NER 关键基因 ERCC1 的表达将可能减少细胞对顺铂-DNA 加合物的修复^[2-3], 从而降低细胞的耐药性。

我们构建了 ERCC1 基因的反义表达载体, 并将其转染卵巢癌细胞, 对 ERCC1 基因的表达水平及其对卵巢癌细胞耐药的影响进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞系及细胞培养条件

人卵巢癌细胞系 A2780, A2780/CP70, 购至 ATCC, 所有细胞均使用 RPMI-1640 培养基, 添加 10% FBS, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.2 U/ml 人胰岛素, 50 U/ml 青霉素, 50 mg/ml 链霉素(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)单层培养。

1.2 载体构建、瞬时转染及蛋白质提取

ERCC1 基因由本实验室克隆, 并测序分析。将 ERCC1 基因酶切后以反义的方向插入载体 pcDNA3.1, 酶切鉴定。将质粒纯化后用于转染。

使用 Fugene-6 将重组质粒转染卵巢癌细胞, 转染 36 h 后收获细胞。蛋白质的提取参考文献[6]的方法进行, 首先用冷 PBS 刮取细胞, 离心后加入细胞裂解液, 冰浴 30 min。15 000 r/min 离心, 收获上清, 使用 BCA 试剂盒定量蛋白含量, -80℃ 保存备用。

1.3 Western blot 分析

制备 10% SDS-PAGE 胶, 每泳道上样 25 μg 总蛋白, 100 V 恒压分离后转 PVDF 膜。封闭膜, 然后与 ERCC1 抗体(1:500)室温结合 1 h (abcam)。洗膜, 与二抗结合后, 化学发光法检测, 曝光于 X 光片。

1.4 RNA 分离及 Northern 印记分析

1.4.1 探针的制备及标记

ERCC1 反义 RNA 的检测使用互补正义 RNA 为探针, 探针长 25 mer, 以生物素标记的 UTP 标记探针。ERCC1 RNA 水平的检测使用互补的 cDNA 为检测探针, 探针长 25 mer, 同样以生物素标记探针(NEL624, NEN Life Science Products)。杂交前均检测标记效率。

1.4.2 RNA 分离及 Northern 印记

使用 RNA 分离试剂盒(Qiagen)按照说明书分离纯化细胞总 RNA。RNA 定量后, 上样 20 μg 进行 1.2% 琼脂糖变性胶电泳分离(Life Technologies, Inc.)。然后用 Turboblotter (Schleicher & Schuell Bio-

Science GmbH)将 RNA 转移至尼龙膜(Zeta-Probe GT; Bio-Rad)。UV 交联(Stratagene)后, 使用 Quik-Hyb (Stratagene)将膜预杂交, 接着加入生物素标记的 25 bp ERCC1 cDNA 探针杂交过夜。洗膜、封闭, 与抗体孵育。将膜与核酸化学发光检测试剂 CDP-Star 作用后(NEN Life Science)曝光于 X 光片。

1.5 宿主细胞 DNA 损伤修复活性分析

使用 Promega 公司的 pGL3-promoter 作为报告系统载体用于研究宿主细胞对 DNA 损伤的修复能力。将载体质粒与顺铂在 37℃ 孵育后, 无水乙醇沉淀质粒。使用 75% 乙醇清洗去掉未结合的铂。使用未经处理的质粒作为对照, 将 5 μg 顺铂处理过的质粒和对照质粒分别转染卵巢癌细胞, 转染后 48 h 收获细胞, 将细胞裂解。以对照质粒的活性为 100%, 使用化学发光分析仪(TD-20/20 Luminometer, Turner Designs)测量受损伤质粒的荧光素酶相对活性。

1.6 MTT 分析

将细胞种植于 96 孔板, 种植密度每孔 2 000 个。次日转染质粒, 24 h 后加顺铂(IC₅₀ = 0.75 μmol/L)处理。加药 24 h 后进行 MTT 分析。每孔加 MTT(3 mg/ml)100 μl, 37℃ 作用 4 h 后弃 MTT, 每孔加 50 μl DMSO, 使用分光光度计测定 OD₅₇₀ 光度值, 观测转染质粒后 CDDP 对卵巢癌细胞毒性的变化。

2 结果

2.1 ERCC1 反义表达载体的构建策略

为证实封闭 ERCC1 基因表达对卵巢癌细胞耐药的影响, 我们首先构建了 ERCC1 反义表达载体。将 ERCC1 基因以反义的方向亚克隆到载体 pcDNA3.1。酶切鉴定证明载体构建正确。

2.2 卵巢癌细胞表达 ERCC1 反义 RNA 的检测

将重组质粒转染细胞后, 提取总 RNA, 设计反义 ERCC1 探针, 使用 Northern blot 对人卵巢癌细胞总 RNA 中反义 ERCC1 的表达进行分析。20 μg 总 RNA, 使用 1.2% 琼脂糖电泳分离, 生物素标记检测探针。结果表明(图 1), 人卵巢癌细胞和组织样品在 1.1 kb 处均出现特异条带。卵巢癌细胞表达的 ERCC1 在加工之前大小约 3.4 kb, 加工成熟后大小约 1.1 kb。本实验检测条带为 ERCC1 基因转录后加工形成的反义活性 RNA, 大小与理论值相符, 表明转染后的卵巢癌细胞表达了 ERCC1 反义 RNA。空质粒对照及未转染细胞未检测到 ERCC1 反义 RNA 的表达。

2.3 转染反义 ERCC1 对卵巢癌细胞 ERCC1 表达的作用

使用 Northern blot 观察了转染前后卵巢癌细胞

ERCC1 RNA 转录水平的变化。转染后,与转染空白质粒及对照细胞相比,细胞 ERCC1 RNA 表达水平明显下降,表明转染的反义 ERCC1 封闭了 ERCC1 的表达(图 2)。

图 1 Northern blot 分析卵巢癌细胞 ERCC1 反义 RNA 表达水平

Fig. 1 Northern blot analysis ERCC1 antisense RNA expression level in ovarian cancer cell line

- 1. A2780 + antisense RNA; 2. A2780/CP70 + antisense RNA;
- 3. A2780 + blank plasmid; 4. A2780/CP70 + blank plasmid
- 5. A2780; 6. A2780/CP70

图 2 转染反义 ERCC1 前后,卵巢癌细胞 ERCC1 RNA 水平变化

Fig. 2 Northern blot analysis ERCC1 RNA expression level in ovarian cancer cell line

- 1: A2780 + blank plasmid; 2: A2780;
- 3: A2780 + antisense ERCC1

2.4 转染反义 ERCC1 基因对 ERCC1 蛋白表达水平的影响

转染细胞收获后,提取蛋白。定量后进行 Western blot 分析。结果表明,转染后细胞 ERCC1 蛋白表达水平明显下降,表明转染的反义 ERCC1 封闭了 ERCC1 的表达(图 3)。

2.5 转染反义 ERCC1 基因对细胞 DNA 损伤修复能力的影响

为评价 ERCC1 在 DNA 损伤修复中的作用,将荧光素酶报告系统质粒使用顺铂处理造成 DNA 损伤后,转染卵巢癌细胞,48 h 收获细胞。以未转染反义 ERCC1 的细胞荧光素酶的活性为 100%,检测转染反义 ERCC1 后,经不同浓度 CDDP 处理后,卵巢癌细胞的荧光素酶活性以评价宿主细胞对 DNA 损伤的修复能力。结果表明,转染反义 ERCC1 基因后,细胞对 CDDP 造成的 DNA 损伤的修复能力显著下降(图 4)。

图 3 Western blot 转染反义 ERCC1 前后 ERCC1 蛋白表达水平变化

Fig. 3 ERCC1 protein expression level of ovarian cancer cell line before and after transfection with antisense ERCC1 using Western blot

- 1: A2780; 2: A2780 + antisense ERCC1

图 4 转染反义 ERCC1 对卵巢癌细胞 DNA 损伤修复能力的影响

Fig. 4 Influence on DNA damage repair ability of ovarian cancer cell line after transfection with antisense ERCC1 using luciferase assay

2.6 转染反义 ERCC1 基因对细胞耐药的影响

使用 MTT 实验分析了转染 ERCC1 反义基因后细胞对 CDDP 耐药的变化。MTT 实验结果表明,与转染空质粒的对照组相比,转染 ERCC1 反义基因后细胞的

耐药性明显降低(图5)。

图5 转染反义 ERCC1 对卵巢癌细胞耐药性的影响

Fig. 5 Influence on CDDP resistance of ovarian cancer cell line after transfection with antisense ERCC1 using MTT assay

3 讨论

对铂类药物的耐药是目前卵巢癌化疗中急需解决的问题。要解决这个问题,必须深入理解耐药的原因。以往的研究表明,卵巢癌对铂类药物的耐药主要有以下几个原因:胞内铂的积累;药物活性;细胞对 DNA 损伤形成的加合物的修复及细胞对铂类药物的耐受性。多个实验室的研究结果表明,细胞的 DNA 损伤修复能力可能是卵巢癌对铂类耐药的重要原因甚至决定原因。人类细胞中, DNA 损伤的切除修复由许多高度协调的步骤组成,包括 DNA 损伤的识别,损伤部位的切割, DNA 再合成及切割部位的连接^[4,5]。人类 ERCC1 基因的表达产物与 XPF 形成杂合二聚体 ERCC1-XPF, 该二聚体参与 DNA 损伤加合物 5' 端的切割。因此, 细胞内 ERCC1 的活性高低可能直接影响细胞的耐药性。基于该推测, 我们设计了 ERCC1 基因的反义表达载体, 以期通过封闭 ERCC1 基因的表达, 探讨 ERCC1 在卵巢癌耐药中的作用。

我们首先使用 Northern 印记对人卵巢癌细胞转染 ERCC1 反义基因后 ERCC1 反义 RNA 表达水平进行分析。Northern blot 结果提示, 所有样品在 1.1 kb 出现特异条带, 表明转染的反义基因在卵巢癌细胞内获得顺利表达。我们接着比较了转染前后, 卵巢癌细胞 ERCC1 基因的表达水平变化。Northern blot 和 Western blot 结果均证明, 转染 ERCC1 反义基因后, 和对照细胞比较, ERCC1 基因的 RNA 和蛋白质表达水平都明显降低, 表明 ERCC1 基因的转录和翻译都被抑制。

ERCC1 基因是核苷酸切除修复路径(NER)中的关键基因。研究表明, 在多种肿瘤中, 如肺癌、乳腺癌、宫颈癌等^[6-8], DNA 损伤修复活性明显升高。我们利用

荧光素酶报告基因系统评价了封闭 ERCC1 基因表达对细胞修复 DNA 损伤能力的影响。首先将荧光素酶报告基因质粒使用顺铂处理, 造成载体的 DNA 损伤, 之后与 ERCC1 反义基因载体共转染卵巢癌细胞。与转染未经顺铂处理的报告基因质粒相比, 荧光素酶报告基因的表达水平明显下降, 说明封闭 ERCC1 基因表达以后, 卵巢癌细胞对顺铂造成的 DNA 损伤的修复能力明显下降。本实验同时说明, 对于铂类造成的 DNA 损伤, NER 起着重要作用。与正常细胞相比, NER 缺陷的细胞对铂类药物有较高的敏感性, 本实验结果和以前报道的结果一致^[9]。

胃癌患者对顺铂的药敏性与 ERCC1 表达水平明显相关^[10]。本实验 MTT 结果表明, 转染反义 ERCC1 后, 卵巢癌细胞对顺铂的耐药性明显降低。说明抑制 NER 途径对铂-DNA 加合物的修复, 是提高卵巢癌铂类药物化疗效果的有效途径。如何选择性抑制肿瘤细胞的 DNA 损伤修复, 而不影响正常细胞染色体损伤的修复, 维护细胞的生理功能, 是提高肿瘤化疗, 特别是铂类药物化疗药敏性的有待解决的课题。

[参考文献]

- [1] Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ERCC1-XPF [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(9): 1305-1313.
- [2] Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 1998, 24(5): 331-344.
- [3] Damia G, Guidi G, D'Incalci M. Expression of genes involved in nucleotide excision repair and sensitivity to cisplatin and melphalan in human cancer cell lines [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(11): 1783-1788.
- [4] Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: From *E. coli* to man [J]. *Biochimie*, 1999, 81(1-2): 15-25.
- [5] Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, et al. Human DNA repair genes [J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1284-1289.
- [6] Zeng-Rong N, Paterson J, Alpert L, et al. Elevated DNA repair capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(5): 4760-4764.
- [7] Yen L, Woo A, Christopoulos G, et al. Enhanced host cell reactivation capacity and expression of DNA repair genes in human breast cancer cells resistant to bi-functional alkylating agents [J]. *Mutat Res*, 1995, 337(3): 179-189.
- [8] Britten RA, Liu D, Tessier A, et al. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(5): 453-457.
- [9] Dunkern TR, Fritz G, Kaina B. Cisplatin-induced apoptosis in 43-3B and 27-1 cells defective in nucleotide excision repair [J]. *Mutat Res*, 2001, 486(4): 249-258.
- [10] Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(1): 309-316.