

## 探索·发现

上调*hMLH1*基因表达对卵巢癌药物敏感性的影响

舒丹\* 毛世华 谭晓燕

(重庆三峡中心医院妇产科, 重庆 404000)

**摘要** 构建携带错配修复基因*hMLH1*编码序列全长的真核表达质粒pCAN-*hMLH1*, 并探讨其对卵巢癌细胞顺铂耐药的逆转作用。应用基因重组技术将pET28-*hMLH1*中的目的基因*hMLH1*定向克隆到真核表达载体pCAN, 经酶切及测序鉴定; 分别将pCAN-*hMLH1*和空质粒pCAN转染进卵巢癌耐药细胞SKOV3/DDP, 同时对顺铂敏感的SKOV3细胞和未转染的SKOV3/DDP细胞作为对照; 应用RT-PCR和Western blot检测转染前后细胞内*hMLH1* mRNA和蛋白的表达变化; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测转染前后SKOV3/DDP细胞对顺铂敏感性的变化; Hoechst染色检测转染前后细胞的凋亡。结果提示: pCAN-*hMLH1*重组质粒经酶切及测序鉴定, 表明真核表达质粒构建正确; 采用脂质体法转染SKOV3/DDP细胞后, RT-PCR和Western blot检测到耐药细胞内*hMLH1*的表达增强; MTT结果显示转染重组质粒后SKOV3/DDP细胞对顺铂的敏感性显著增加; Hoechst染色观察到转染后耐药细胞的凋亡明显增强。该研究成功构建了pCAN-*hMLH1*重组质粒, 在SKOV3/DDP细胞中进行表达, 并能增强耐药细胞对顺铂的敏感性, 促进耐药细胞的凋亡。

**关键词** *hMLH1*; 错配修复; 卵巢癌; 耐药

Up-regulation of *hMLH1* Gene Expression on Cisplatin Sensitivity of Drug-resistant Ovarian Cancer Cells

Shu Dan\*, Mao Shihua, Tan Xiaoyan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

**Abstract** We constructed the eukaryotic expression plasmid pCAN-*hMLH1* carrying the coding sequence and investigated its reversing effect on cisplatin-resistant ovarian cancer cells. With the recombinant DNA techniques, the *hMLH1* gene in pET28-*hMLH1* plasmid was subcloned into pCAN vector. The correctness of recombinant plasmid was evaluated by enzyme analysis and nucleotide sequencing. The SKOV3/DDP cells were transfected with the recombinant plasmid pCAN-*hMLH1* and pCAN vectors by lipofectamine 2000. The expressions of *hMLH1* were detected by RT-PCR and Western blot. Chemosensitivity of SKOV3/DDP cells to cisplatin was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Cell apoptosis was detected by Hoechst dyeing. The mRNA and protein levels of *hMLH1* of SKOV3/DDP cells transiently transfected with pCAN-*hMLH1* were increased significantly. The chemosensitivity to cisplatin was enhanced after the *hMLH1* gene being transfected into SKOV3/DDP cells. Hoechst dyeing showed that the apoptotic rate of *hMLH1* transfected cells was increased. The plasmid pCAN-*hM-*

收稿日期: 2013-08-07 接受日期: 2013-11-15

\*通讯作者。Tel: 023-58103570, E-mail: shu1123dan@163.com

Received: August 7, 2013 Accepted: November 15, 2013

\*Corresponding author. Tel: +86-23-58103570, E-mail: shu1123dan@163.com

网络出版时间: 2014-01-28 12:22 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0241.html>

LH1 has been successfully constructed and expressed in SKOV3/DDP cells effectively. *hMLH1* gene can increase the chemosensitivity to cisplatin and improve apoptosis.

**Key words** *hMLH1*; mismatch repair; ovarian cancer; drug resistance

*hMLH1*是一种重要的错配修复基因,能参与体内细胞DNA损伤的修复<sup>[1]</sup>。*hMLH1*的表达缺失将严重影响细胞内的DNA错配修复,研究发现其与肿瘤的发生发展密切相关,并且能使肿瘤细胞产生对化疗药物如顺铂的耐受<sup>[2]</sup>。卵巢癌是女性生殖系统中常见的恶性肿瘤,以顺铂为代表的铂类药物在卵巢癌的化疗中起着重要作用,而卵巢癌的耐药严重影响了预后。本研究构建携带有*hMLH1*编码序列的真核表达质粒,并将其转染进卵巢癌耐药细胞,使之过表达,探讨其对卵巢癌细胞耐药的影响,为进一步研究耐药卵巢癌的治疗打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pCAN真核表达质粒由意大利Laura Belvederesi教授<sup>[3]</sup>惠赠。pET28-hMLH1购自美国Addgene公司,该质粒含有约2.2 Kb *hMLH1*编码序列全长。人卵巢癌对顺铂耐药细胞株SKOV3/DDP购自广西医科大学附属肿瘤医院,SKOV3敏感细胞株由重庆医科大学生命科学研究院提供。脂质体转染试剂Lipofectamine™ 2000购自上海Invitrogen公司,质粒抽提试剂盒购自Omega公司。RT-PCR试剂购自宝生物公司,PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。一抗兔抗人MLH1单克隆抗体(sc-582)购自美国Santa Cruz公司,二抗羊抗兔抗体购自北京中杉金桥公司。顺铂由山东德州制药厂生产。噻唑蓝(MTT)、Hoechst 33342溶液购自碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 PCR的扩增** 根据*hMLH1*编码序列及质粒pCAN上的酶切位点,利用primer 5.0设计引物,引物扩增长度为*hMLH1*编码序列,约2.2 Kb,两端分别添加了*Bam*H I和*Xho* I酶切位点,引物序列:5'-GGC CCT CGA GGC CAA AAT GTC GTT CGT G-3',5'-GGC CCC GCG GAC ACC TCT CAA AGA CTT T-3'。以pET28-hMLH1上的目的基因片段进行PCR扩增,条件为:95 °C预变性5 min;94 °C变性40 s,54 °C 45 s,72 °C 60 s,共进行30个循环;最后72 °C 5 min。

**1.2.2 真核表达质粒** pCAN-hMLH1的构建与鉴定

将PCR扩增产物及空载体pCAN进行*Bam*H I和*Xho* I双酶切,然后回收。以T<sub>4</sub>连接酶在16 °C条件下进行连接,将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞DH5 $\alpha$ 。取转化菌液涂布氨苄青霉素琼脂平板,筛选阳性菌落后提取质粒,对重组质粒pCAN-hMLH1进行双酶切鉴定,并送上海生工生物工程有限公司测序。

**1.2.3 细胞培养及转染** 将处于对数生长期的SKOV3/DDP细胞常规消化、离心,重悬后接种于培养板(6孔板的细胞数为3 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔,96孔板为1 $\times$ 10<sup>4</sup>/孔),待细胞长至90%~95%融合度时,采用Lipofectamine™ 2000的方法,以1:2.5的质粒与脂质体比例,分别用重组质粒pCAN-hMLH1和空质粒pCAN转染SKOV3/DDP细胞,以SKOV3细胞和未转染的SKOV3/DDP细胞作为对照。

**1.2.4 RT-PCR检测细胞内*hMLH1* mRNA的表达变化** 收集转染后24 h的各组细胞,用RNA提取试剂RNAiso™ Plus提取细胞的总RNA,按照RT-PCR试剂盒的说明进行逆转录。取逆转录产物进行PCR扩增,*hMLH1*引物序列:上游5'-AGT GGC TGG ACA GAG GAA GA-3',下游5'-CAA AGG GGG CAC ATA GTT GT-3',扩增长度为168 bp。 $\beta$ -actin内参引物:上游5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3',下游5'-AGG GGC CGG ACT CAT CGT ACT-3',扩增长度为678 bp。扩增条件为:95 °C预变性5 min;94 °C变性40 s,54 °C 30 s,72 °C 40 s,30个循环;最后72 °C 5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察并拍照,Quantity One软件分析。

**1.2.5 Western blot检测细胞内hMLH1蛋白的表达变化** 收集转染后48 h的各组细胞,RIPA裂解液裂解细胞,提取总蛋白,经SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,室温封闭后,加MLH1一抗(1:200),4 °C孵育过夜,PBST洗膜,加相应的HRP标记的二抗(1:2 500),室温孵育1 h,ECL显影,成像仪成像,以 $\beta$ -actin作为内参。

**1.2.6 MTT法检测细胞对顺铂的敏感性** 将各组细胞制成单细胞悬液,接种于96孔板中,生长至90%~95%时行转染。24 h后加入不同浓度的用1640培养基稀释的顺铂,浓度梯度为:3.0,6.0,12.0,24,48  $\mu$ g/mL,每一浓度设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,每孔加入5 mg/mL MTT 20  $\mu$ L, 孵育3 h后弃上清, 每孔加入二甲亚砜(DMSO) 100  $\mu$ L, 震荡10 min充分溶解后, 酶标仪上测定490 nm各孔的吸光度值(D值), 按公式算出药物对各组细胞的抑制率, 用SPSS软件计算各组细胞的IC50值。

抑制率(%)=[1-(实验组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)] $\times$ 100%。

**1.2.7 Hochest染色法观察细胞凋亡** 将转染后24 h的各组细胞分别用6  $\mu$ g/mL的顺铂溶液处理24 h, 吸弃上清, 加入用1640培养基以1:50稀释的Hoechst 33342溶液避光染色30 min, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.3 统计学方法

以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析,  $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒pCAN-hMLH1的双酶切鉴定

将重组质粒pCAN-hMLH1及空质粒pCAN分别经BamH I单酶切及BamH I和Xho I双酶切。酶切结果如图1所示, pcDNA3.1-hMLH1重组质粒经双酶切后可见约2.2 Kb大小片段, 与预期相符。

### 2.2 测序鉴定结果

将经酶切鉴定的重组质粒送上海生工生物技术有限公司进行测序鉴定, 证实pCAN上的目的基因序列与NCBI上查得的hMLH1编码序列完全一致, 没有突变。

### 2.3 检测hMLH1 mRNA在转染前后细胞内的表达

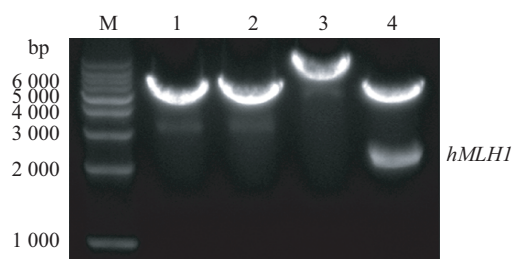
pCAN-hMLH1转染组中hMLH1 mRNA的表达水平为(5.30 $\pm$ 0.50), 与SKOV3细胞组(4.40 $\pm$ 0.43)相比, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 与pCAN空质粒组(0.30 $\pm$ 0.05)和SKOV3/DDP细胞组(0.41 $\pm$ 0.07)相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )(图3)。

### 2.4 检测hMLH1蛋白在转染前后细胞内的表达

hMLH1蛋白在pCAN空质粒组和SKOV3/DDP组中的表达强度分别为(1.36 $\pm$ 0.20)和(1.94 $\pm$ 0.42)。而在pCAN-hMLH1转染组中为(4.25 $\pm$ 0.65), 其与前二者比较, 差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。而pCAN-hMLH1转染组与SKOV3细胞组(4.89 $\pm$ 0.75)比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )(图4)。

### 2.5 顺铂对转染前后细胞的生长抑制情况

根据MTT结果绘制柱状图(图5), 转染重组质粒pCAN-hMLH1后, SKOV3/DDP细胞的IC50值明显降低, 其与SKOV3/DDP细胞组比较, 差异有统计学意



M: DNA标准; 1: 空质粒单酶切; 2: 空质粒双酶切; 3: 重组质粒单酶切; 4: 重组质粒双酶切。

M: 1 Kb DNA marker; 1: pCAN digested by BamH I; 2: pCAN digested by BamH I and Xho I; 3: pCAN-hMLH1 digested by BamH I; 4: pCAN-hMLH1 digested by BamH I and Xho I.

图1 重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

C A G T C A G C C C C A G G C C A T T G T C

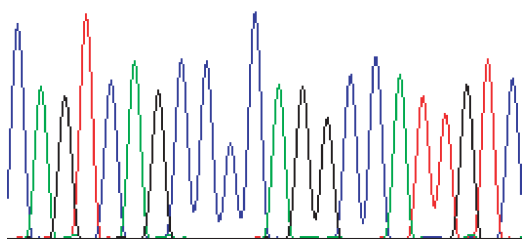
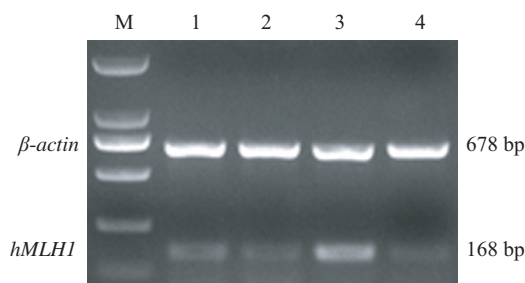


图2 重组质粒的测序鉴定

Fig.2 Nucleotide sequencing of the recombinant plasmid pCAN-hMLH1



M: DNA标准; 1: SKOV3细胞组; 2: SKOV3/DDP细胞组; 3: 重组质粒组; 4: 空质粒组。

M: DNA marker; 1: SKOV3; 2: SKOV3/DDP; 3: pCAN-hMLH1-SKOV3/DDP; 4: pCAN-SKOV3/DDP.

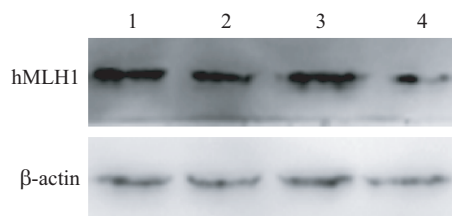
图3 转染前后hMLH1 mRNA的RT-PCR检测

Fig.3 Expression of hMLH1 mRNA detected by RT-PCR

义( $P<0.05$ ), 而pCAN空质粒组的IC50值与SKOV3/DDP细胞组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 2.6 Hoechst染色法对细胞凋亡的形态学观察

Hoechst染色后, 在荧光显微镜下观察, 不发生凋亡细胞的细胞核呈均匀的蓝色荧光, 而凋亡的细胞其染色质发生固缩, 细胞核致密深染, 呈亮蓝色。结果显示, 各组细胞经顺铂( $6\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )处理24 h后, 细胞核均可见蓝色荧光, 但转染重组质粒的耐药细胞及敏感细胞中有较多核染成亮蓝色的细胞, 而其他各组中核染成亮蓝色荧光的细胞较少(图6)。



1: SKOV3细胞组; 2: SKOV3/DDP细胞组; 3: 重组质粒组; 4: 空质粒组。  
1: SKOV3; 2: SKOV3/DDP; 3: pCAN-hMLH1-SKOV3/DDP; 4: pCAN-SKOV3/DDP.

图4 转染前后hMLH1蛋白表达的检测  
Fig.4 Expression of hMLH1 protein detected by Western blot

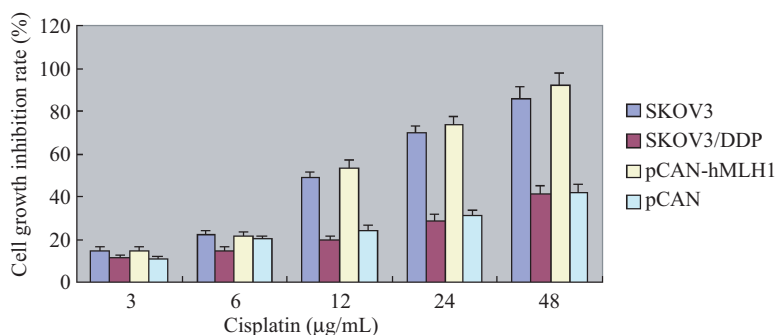
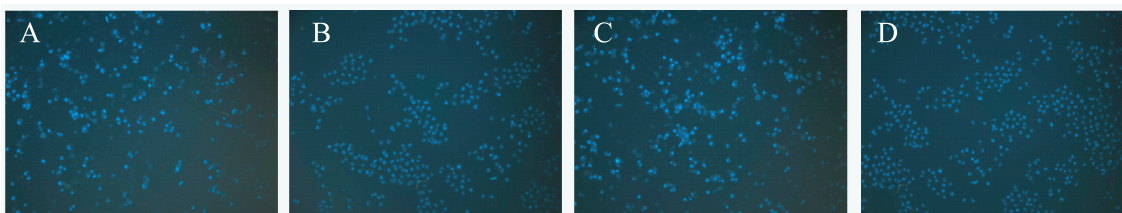


图5 不同浓度顺铂作用下各组细胞的生长抑制情况

Fig.5 Inhibition of cells growth caused by cisplatin



A: SKOV3细胞组; B: SKOV3/DDP细胞组; C: 重组质粒组; D: 空质粒组。

A: SKOV3; B: SKOV3/DDP; C: pCAN-hMLH1-SKOV3/DDP; D: pCAN-SKOV3/DDP.

图6 Hoechst染色法对细胞凋亡的检测(100×)

Fig.6 Cell apoptosis detected by Hoechst dyeing (100×)

## 3 结论

目前, 卵巢癌的死亡率在妇科恶性肿瘤中居首位<sup>[4]</sup>, 其治疗采用手术与化疗相结合的手段。在卵巢癌的化疗中, 以顺铂为代表的铂类药物发挥着重要作用, 然而顺铂耐药性的产生使得卵巢癌对化疗变得不敏感, 制约了临床疗效和预后<sup>[5]</sup>, 是患者五年生存率较低的主要原因。如何有效地逆转耐药, 提高对化疗药物的敏感性是卵巢癌治疗的关键, 亦是当前研究的热点及难点。

DNA错配修复(mismatch repair, MMR)是细胞复制后的一种修复机制, 广泛存在于各种生物体中,

修复在DNA复制及基因重组中产生的错配碱基, 能够防止基因突变, 维持DNA复制保真度和基因组稳定性<sup>[6]</sup>。错配修复基因hMLH1是参与DNA错配修复过程的遗传易感基因, 是目前已发现的9种错配修复基因中最重要的一种, 在识别DNA错配位点并启动错配修复途径过程中发挥着关键作用<sup>[7]</sup>。近年来有研究发现, hMLH1基因缺失的卵巢癌细胞可以产生对铂类药物的耐受<sup>[8]</sup>。

本研究以体外培养的人卵巢癌耐药细胞株SKOV3/DDP和敏感细胞株SKOV3作为研究对象, 利用基因克隆技术成功构建hMLH1真核表达载体,

并采用脂质体转染技术,用重组质粒pCAN-hMLH1转染卵巢癌耐药细胞SKOV3/DDP,然后通过RT-PCR及Western blot技术对转染前后hMLH1基因的表达进行检测,结果表明,hMLH1表达水平在SKOV3细胞中显著高于SKOV3/DDP细胞,与文献报道一致<sup>[9]</sup>。转染了重组质粒pCAN-hMLH1后SKOV3/DDP细胞中hMLH1的表达水平明显上调,显著高于空质粒组和未转染组细胞,证实转染是成功的,hMLH1基因在耐药细胞中得到了有效的表达,从而纠正了hMLH1的缺失。

MTT结果显示,转染重组质粒后,SKOV3/DDP细胞的IC50值明显降低,与敏感细胞接近,而顺铂对未转染组与空质粒组的增值抑制作用并无明显差异,从而排除了转染空载体对耐药细胞的影响。Hoechst染色法是一种细胞凋亡的形态学检测方法,Hoechst染料能透过胞膜完整的细胞,与细胞核DNA特异性结合,荧光显微镜下可见蓝色荧光,而凋亡细胞的细胞核由于浓集而染色增强,荧光更亮<sup>[10]</sup>。本实验将顺铂作用于转染前后的细胞,可见在顺铂的诱导下,转染了重组质粒pCAN-hMLH1后的SKOV3/DDP细胞相对于未转染的SKOV3/DDP细胞出现了明显的凋亡现象,而转染空载体的耐药细胞与未转染组比较,凋亡无明显改变,可排除空载体转染对耐药性的影响。结果表明,hMLH1基因的转染可以增强卵巢癌耐药细胞对顺铂的敏感性,促进细胞的凋亡。

综上所述,本研究构建hMLH1真核表达质粒,并成功进行耐药细胞的转染,纠正了hMLH1在耐药细胞中的缺失,显著增强卵巢癌细胞对顺铂的敏感性,促进耐药细胞在顺铂作用下的凋亡,为耐药卵巢癌的实验室治疗提供了新的途径,但其具体机制有

待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA Mismatch Repair: Functions and mechanisms. *Chem Rev* 2006; 106(2): 302-23.
- 2 Swisher EM, Gonzalez RM, Taniguchi T, Garcia RL, Walsh T, Goff BA, *et al.* Methylation and protein expression of DNA repair genes: Association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas. *Mol Cancer* 2009; 8: 48.
- 3 Belvederesi L, Bianchi F, Loretelli C, Gagliardini D, Galizia E, Bracci R, *et al.* Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(7): 853-9.
- 4 Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, Filippetti F, Raspaglio G, Prislei S, *et al.* Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11(1): 298-305.
- 5 Kamat AA, Kim TJ, Landen CN Jr, Lu C, Han LY, Lin YG, *et al.* Metronomic chemotherapy enhances the efficacy of antivascular therapy in ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67(1): 281-8.
- 6 Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008; 18(1):85-98.
- 7 Yamane K, Schupp JE, Kinsella TJ. BRCA1 activates a G2-M cell cycle checkpoint following 6-thioguanine-induced DNA mismatch damage. *Cancer Res* 2007; 67(13): 6286-92.
- 8 Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): 1291-5.
- 9 O'Brien PM, Davies MJ, Scurry JP, Smith AN, Barton CA, Henderson MJ, *et al.* The E3 ubiquitin ligase EDD is an adverse prognostic factor for serous epithelial ovarian cancer and modulates cisplatin resistance *in vitro*. *Br J Cancer* 2008; 98(6): 1085-93.
- 10 Stankiewicz TR, Loucks FA, Schroeder EK, Nevalainen MT, Tyler KL, Aktories K, *et al.* Signal transducer and activator of transcription-5 mediates neuronal apoptosis induced by inhibition of Rac GTPase activity. *J Biol Chem* 2012; 287(20): 16835-48.