

· 论著 ·

缺失错配修复基因 MLH1 的结直肠癌 HCT-116 细胞对氟尿嘧啶耐药机制的研究

王 婧¹, 方宏亮², 黄金路¹, 郭 澄¹ (1.上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233; 2.第二军医大学基础部免疫学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 研究缺失错配修复基因 MLH1 (MutL homolog 1) 的结直肠癌细胞 HCT-116 对氟尿嘧啶 (5-Fu) 耐药机制。**方法** 通过构建 MLH1 缺失的结直肠癌细胞 HCT-116 稳定表达 MLH1 细胞株, CCK-8 试剂检测细胞恢复 MLH1 表达后对化疗药物 5-Fu 耐药性的影响, 并通过流式细胞仪检测细胞表面干细胞标志 CD133 和分化标志 CK20 以及 CK8 的表达变化。**结果** HCT-116 稳定表达 MLH1 分子后, 其对 5-Fu 作用的化疗耐受性降低, 5-Fu 处理后细胞的活率显著降低 ($P < 0.01$); 流式细胞仪检测结果显示 CD133 表达显著降低, 并伴随细胞分化标志 CK8 和 CK20 表达上调。**结论** 结直肠癌细胞缺失错配修复基因 MLH1 引起 5-Fu 耐药性可能与其促进肿瘤干细胞样特性密切相关。

[关键词] 结直肠癌; 错配修复基因; 化疗耐受; CD133

[中图分类号] R735.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)02-0121-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.006

The mechanism of 5-Fu-based drug resistance in DNA mismatch repair deficient colorectal cancer HCT-116 cells

WANG Jing¹, FANG Hongliang², HUANG Jinlu¹, GUO Cheng¹ (1. Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of Immunology, Faculty of Basic Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanisms of the drug resistance of DNA mismatch repair (MMR) deficient colorectal cancer (CRC) HCT-116 to 5-fluorouracil (5-Fu). **Methods** MLH1 deficiency HCT-116 cells were transfected with pcDNA3.1-MLH1 Vector. The expression of MLH1 was detected by Western blot. The change of resistance against 5-Fu was examined by detecting the cell viability with CCK-8 kits. The expression of CD133 (cancer stem cell marker) and CK8 & CK20 (cell differentiation marker) were detected by flow cytometry. **Results** Comparing to HCT-116 control group, the viability of HCT-116 cells was markedly decreased ($P < 0.01$) after stable expressing MLH1, accompanied by the down-regulated expression of CD133 on the cell surface. Moreover, the up-regulation of cell differentiation marker CK8 and CK20 was observed in HCT-116 cells with stable expressing MLH1. **Conclusion** Our data indicated that the expression of MLH1 was associated with down-regulated CD133⁺ stem-like cells in colorectal cancer HCT-116 with MLH1 deficiency. Therefore, CD133⁺ stem-like cells may related to the drug resistance of MMR deficiency tumor. This study provides a possible theory to explain the 5-FU resistance in the colorectal cancer patients with MMR deficiency.

[Key words] colorectal cancers; DNA mismatch repair; drug resistance; CD133

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是最常见的消化道肿瘤之一, 其发病率一直呈上升趋势。我国

结直肠癌发病率已上升至恶性肿瘤的第 2 位, 病死率居第 5 位, 严重威胁人们的健康和生活质量^[1,2]。目前, 除了少部分符合手术条件可以局部切除再辅以放/化疗外, 化疗是这类患者的主要治疗手段。随着对化疗药物的深入研究, 新的药物以及不同机制药物的联合应用使肿瘤的化疗不断发展。但是, 仍有相当多种类的肿瘤对化疗药物不敏感, 尤其是近来不断出现肿瘤细胞原发、继发性耐药以及多药性耐药。研究肿瘤细胞的耐药机制, 以期更好地发挥化疗药物对肿瘤细胞的杀伤力, 成为肿瘤治疗领域

[基金项目] 上海交通大学医学院医院药学科科研基金青年项目 (JDYX2016QN008); 上海交通大学医工交叉研究基金项目 (YG2014QN08)

[作者简介] 王 婧, 硕士, 主管药师. 研究方向: 免疫药理学、临床药学. Tel: (021)24058445; E-mail: dearfriendwang@163.com

[通讯作者] 郭 澄, 教授, 博士生导师. 研究方向: 临床药学、抗肿瘤药物. Tel: (021)24058098; E-mail: gboss@126.com

的一个新热点。

错配修复基因(mismatch repair, MMR)是细胞内负责对碱基错配进行修复的基因,还能修复一些 DNA 复制过程中小于 4 nt 的核苷酸插入或缺失。目前已发现的 MMR 基因包括 MLH1、MSH2、MSH3、MSH4、MSH5、MSH6 等。MMR 缺失不仅导致了结直肠癌的发生和发展,而且与结直肠癌的临床疗效密切相关^[3-5]。MMR 具有识别 DNA 损伤并诱导细胞凋亡的功能,因此,该蛋白的表达情况影响着肿瘤细胞对一些化疗药物,尤其是致 DNA 损伤的化疗药物的敏感性。体外研究表明,与正常细胞相比,以 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)处理 MLH1 缺失结肠癌细胞系明显产生耐药性。其机制可能在于 5-Fu 能够直接作用于 DNA,造成细胞非致死性损伤时,MMR 正常者竭力修复损伤;当无法修复时,细胞周期就会停滞,导致凋亡。而 MLH1 缺失者识别 DNA 损伤的能力弱,无法产生触发细胞凋亡的信号。多数临床回顾性统计也表明,MMR 缺失的结直肠癌患者,无法从以 5-Fu 为基础的辅助治疗方案中获益。因此,自 2011 年起,每一版《NCCN 结直肠癌临床实践指南》对于 MMR 缺失的患者不建议使用 5-Fu 类药物,但目前转移性结直肠癌的一线化疗方案中,5-Fu 仍是主要的化疗药物之一^[6]。因此,研究 MMR 缺失的结直肠癌的化疗耐药性机制,并通过相关干预治疗,提高 MMR 缺失患者的临床疗效成为重要的研究方向。

1 材料与方 法

1.1 材 料 人结直肠癌细胞系 HCT-116 购自中国科学院细胞库;5-Fu、遗传霉素(G418,德国 Sigma 公司);转染试剂 JetPei(美国 Polyplus 公司);MLH1 过表达质粒 pcDNA3.1-MLH1(北京 OriGene 公司);一抗兔抗人 MLH1 单克隆抗体、小鼠抗人细胞角蛋白(CK8)单克隆抗体和小鼠抗人肌动蛋白(β -Actin)单克隆抗体(美国 Abcam 公司);抗兔或抗鼠二抗(美国 CST 公司);PE 标记的抗人 CD133 的流式抗体(德国 Miltenyi 公司);PE 标记抗人 CK8 流式抗体、CK20 流式抗体(美国 BD 公司);增强型化学发光(ECL)试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);细胞活性 CCK-8(Cell Counting Kit-8)检测试剂盒(日本 Dojindo 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 PCR 检测 MLH1 重组质粒 以商业化重组质粒 pcDNA3.1-MLH1 为模板,聚合酶链式反应(PCR)检测 MLH1 序列是否正确表达。上游引物

为: 5' TTCCTCGAGTTATGTCGTTCCGTGGCAGG 3',下游引物为: 5' ACAGGATCCTTAACACCTCTCAAAGACTT 3'。PCR 条件为: 94 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 循环数: 30 个。最后一轮循环结束后, 72 °C 反应 10 min, 使产物充分扩增。扩增后的 PCR 产物通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测片段的长度。

1.2.2 重组质粒转染 HCT-116 细胞建立稳定表达细胞株 采用 Polyplus 公司的 JetPei 转染试剂将 pcDNA3.1-MLH1 转染至 HCT-116 细胞内,取转染 24 h 后稀释至单细胞传代。同时向 McCOY's 5A 培养基中加入终浓度为 600 ng/ml 的 G418 筛选液,每 3 d 更换一次新鲜的含 G418 培养基,1 周之后观察有无单克隆细胞团形成。挑出每个单克隆细胞团,再分别逐渐扩大培养,4 周后检测经过 600 ng/ml 的 G418 筛选后的 HCT-116 细胞 MLH1 表达情况。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达 取对数生长长期的细胞,进行蛋白提取,BCA 法测定细胞裂解物的蛋白含量,取等量蛋白质以 12% SDS-PAGE 法分离,并转移至 PVDF 膜上,加单克隆抗体于 4 °C 下过夜孵育,以检测目标蛋白。洗去一抗,以 HRP 连接的二抗于室温孵育 2 h,洗涤后以 ECL 试剂盒显示免疫印迹条带,以 β -actin 作为内参。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞 CD133、CK8、CK20 的表达 收取待测细胞,离心去上清液。混匀细胞,加入荧光标记的抗体,4 °C 孵育 30 min。PBS 洗 2 次,用 300 μ l PBS 重悬,再用流式细胞仪(FACS caliber, BD 公司)检测,实验数据采用 FlowJo 软件分析。

1.2.5 CCK8 检测化疗药物处理后的细胞活性 96 孔板每孔加入 5×10^4 /100 μ l,于 37 °C 浮箱培养过夜使细胞贴壁后,加入 0、10、20、50、100 μ g/ml 5-Fu 作用 24 h,再向孔中加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂,在细胞培养箱中继续孵育 4 h,再用酶标仪检测,设置检测波长 450 nm,参考波长 630 nm(A)。每组设 3 个复孔为实验组,同时设空白溶剂组以及阴性对照组。

细胞存活率(%)=(实验组 A 值)/(阴性对照组 A 值) \times 100%。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件处理分析实验数据。数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,再以 LSD 法进行统计。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pcDNA3.1-MLH1 的 PCR 鉴定 我们以商业化的重组质粒 pcDNA3.1-MLH1 为模板,PCR 检测 MLH1 序列是否正确表达。凝胶电泳的结果显示,在分子量 2 000 000 上方能明显看到 MLH1 的条带,测序结果也显示 MLH1 正确插入至表达载体中(图 1)。

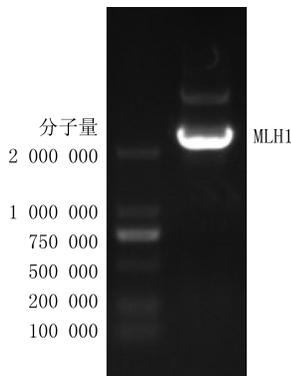


图 1 重组表达质粒 pcDNA3.1-MLH1 的 PCR 鉴定

2.2 HCT-116MLH1 稳定表达细胞株的验证 G418 药物筛选 4 周后,选取状态好的克隆株,采用 Western-blot 检测细胞中的 MLH1 表达情况。结果如图 2 所示,我们在对照组 HCT-116CTR 中,没有检测到 MLH1 的表达,表明 HCT-116 是 MLH1 缺失的结直肠癌细胞株;而在筛选的克隆株 HCT-116MLH1 组中,明显可以看到 MLH1 的表达条带,表明 HCT-116 稳定表达 MLH1 的细胞株构建成功。

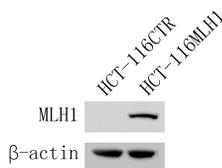


图 2 Western-blot 检测 HCT-116MLH1 细胞 MLH1 表达

2.3 HCT-116MLH1 稳定表达株对化疗药物 5-Fu 作用的影响 筛选出稳定表达 MLH1 的 HCT-116MLH1 细胞株后,进一步检测 MLH1 的表达对 5-Fu 作用的影响。HCT-116MLH1 细胞和 HCT-116CTR 细胞(对照)分别给予不同浓度 5-Fu 作用 48 h 后,CCK-8 试剂盒检测细胞的活率。结果如图 3 所示,经过 10、20、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-Fu 处理 24 h 后,各组 HCT-116MLH1 细胞的活率都显著低于对照组 HCT-116CTR 细胞($P < 0.05$, $P < 0.01$),提

示 HCT-116 细胞稳定表达 MLH1 后,细胞对 5-Fu 的耐药性显著降低。

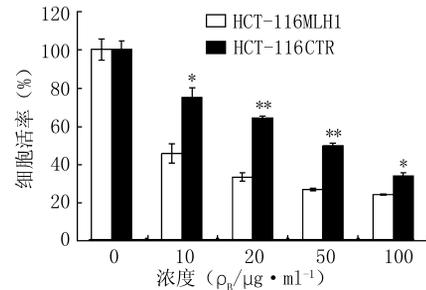


图 3 CCK-8 检测 5-Fu 对细胞活性的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
与 HCT-116CTR 细胞比较

2.4 HCT-116MLH1 细胞中肿瘤干细胞标志 CD133 表达的检测 HCT-116 细胞高表达肿瘤干细胞标志 CD133 已有报道^[7],但 MLH1 缺失的 HCT-116 细胞稳定表达 MLH1 分子后,通过恢复其基因错配修复的功能,发现其对 5-Fu 耐受受到明显抑制,故进一步通过流式细胞仪(FACS)检测细胞表面 CD133 的表达。结果如图 4 所示,对照组 HCT-116CTR 细胞表面的 CD133 的表达率为 96.1%,而 HCT-116MLH1 组细胞表面的 CD133 的表达率为 37.2%,CD133 的表达下调。

2.5 HCT-116MLH1 细胞中分化标志 CK8 和 CK20 表达的检测 CD133 的表达与细胞的肿瘤干细胞特性密切相关,发现 HCT-116 稳定表达 MLH1 细胞的 CD133 表达显著降低后,进一步检测 HCT-116MLH1 细胞表面分化标志 CK8 和 CK20 的表达情况。结果如图 5 所示,对照组 HCT-116CTR 细胞的 CK8 的表达率为 3.0%,CK20 的表达率为 0.8%;HCT-116MLH1 细胞表面的 CK8 的表达率为 5.9%,CK20 的表达率为 2.6%,细胞表面 CK8 与 CK20 的表达出现上调,提示 HCT-116 细胞稳定表达 MLH1 恢复其 MMR 的功能后,分化程度增强。

3 讨论

据现有的临床统计结果估计,有 15%~20% 的结直肠癌患者存在着 MMR 的表达缺失。在散发性结直肠癌中,MMR 缺失的发生主要与 MLH1 (MutL homolog 1)的启动子的高甲基化而不表达相关,MLH1 缺失患者占 MMR 缺失患者的 95% 以上^[4,5]。Taverna 等筛查了 60 余种肿瘤细胞中 MMR 基因的表达情况,发现 HCT-116 细胞完全缺失 MLH1 的表达,且和化疗药物的耐受密切相关。

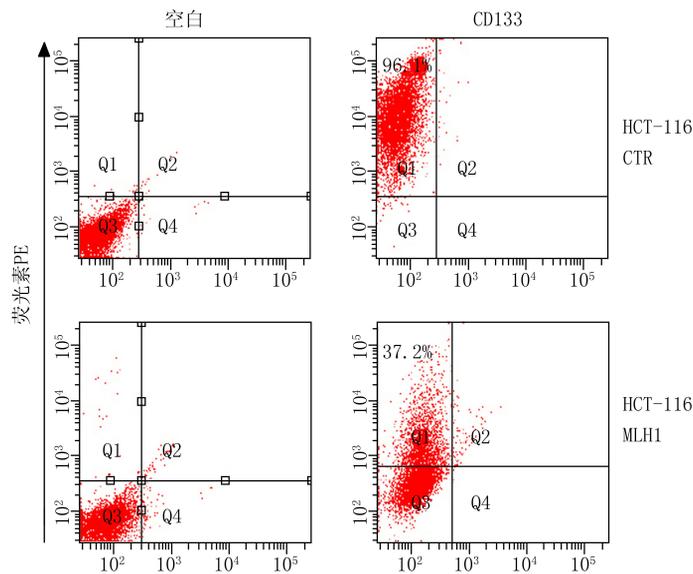


图4 流式细胞仪检测 HCT-116MLH1 细胞 CD133 的表达

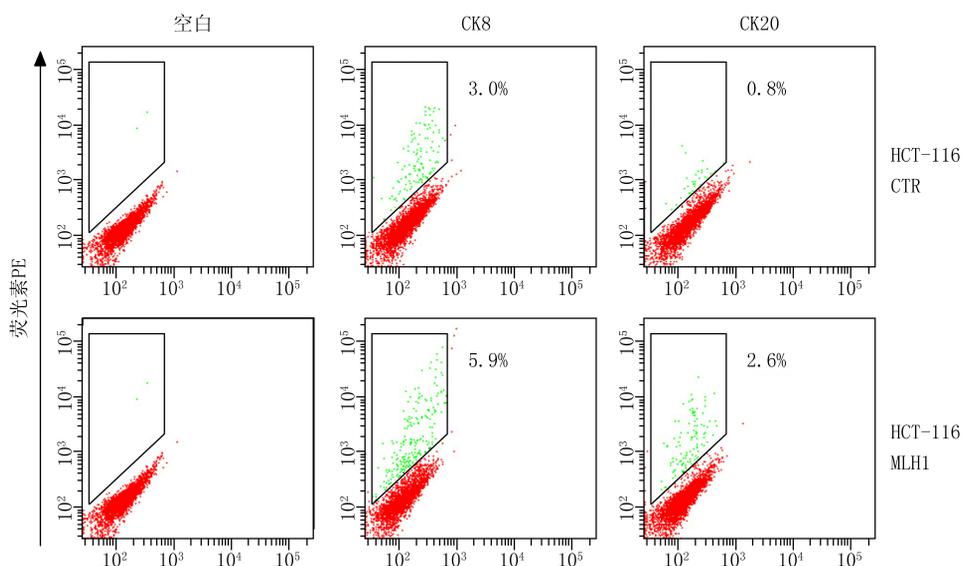


图5 流式细胞仪检测 HCT-116MLH1 细胞 CK8 和 CK20 的表达

我们的研究发现, HCT-116 细胞缺失错配修复基因 MLH1 的表达, 这与文献报道的结果一致^[8]。本研究选择该细胞作为研究对象, 细胞转染了重组质粒 pcDNA3.1-MLH1 后, 通过筛选构建了稳定表达 MLH1 细胞系, 比较研究 5-Fu 抑制稳定表达 MLH1 的 HCT-116 细胞和对照组 HCT-116 细胞的差别。结果发现, 经过不同浓度 5-Fu 作用后, 稳定表达 MLH1 的 HCT-116 细胞的活率显著低于对照 HCT-116 细胞, 说明错配修复基因 MLH1 表达缺失与细胞对化疗药物 5-Fu 的耐药性之间密切相关。

肿瘤干细胞是指肿瘤细胞中存在的一小部分亚群, 这种细胞具有类似干细胞的特征。例如, 肿瘤干细胞具有分化程度低、无限增殖和高致瘤性等特

点^[9,10]。CD133 是肿瘤干细胞重要的表面分子标志物之一, 2007 年 Nature 同时报道了两篇在结直肠癌中发现 CD133⁺ 肿瘤干细胞的文章, 引起广泛关注^[11,12]。CD133 肿瘤干细胞由于具有低分化和自我更新干细胞的特性, 其对化疗或放疗都具有抵抗性。Dallas 等^[13]通过高剂量的 5-Fu 处理结直肠癌细胞 HCT-116 筛选出化疗耐受的细胞, 发现这些细胞表面的 CD133 表达量增加了约 16 倍。Ma 等^[14]从人肝癌细胞中分离出 CD133⁺ 细胞, 发现在相同浓度的 5-Fu 作用下, 其细胞活性要显著高于 CD133⁻ 细胞。Yasuda 等^[15]研究了直肠癌患者放/化疗后残存肿瘤细胞中 CD133 的表达水平, 发现残存肿瘤细胞中 CD133 表达水平明显高于癌旁的间

质细胞,并且放/化疗后 CD133 表达水平增高的患者无进展生存期 (progression-free-survival, PFS) 明显缩短。

目前多数临床回顾性统计结果表明,错配修复基因缺失的这部分结直肠癌患者,对以 5-Fu 为基础的化疗产生耐药性,但具体机制尚不明确^[16,17]。本研究发现,HCT-116 细胞稳定表达 MLH1 后,肿瘤干细胞特异性表达标志物 CD133 的表达显著降低,并伴随细胞分化标志物 CK8 和 CK20 表达上调,说明 MLH1 表达降低了 HCT-116 细胞的“肿瘤干细胞样”特性,并抑制了 HCT-116 细胞对 5-Fu 产生的化疗耐受。该结果提示结直肠癌细胞缺失错配修复基因 MLH1 引起 5-Fu 的耐药性可能与其促进肿瘤干细胞样特性密切相关。本研究为阐释错配修复基因缺失结直肠癌患者对化疗药物 5-Fu 的耐药机制提供了理论基础。

【参考文献】

[1] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2014, 383(9927):1490-1502.
[2] Chen Q, Liu Z, Cheng L, et al. An analysis of incidence and mortality of colorectal cancer in China, 2003~2007 [J]. China Cancer, 2012, 21(3): 179-182.
[3] Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing [J]. Mech Ageing Dev, 2008, 129(7-8):391-407.
[4] Hewish M, Lord CJ, Martin SA, et al. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(4):197-208.
[5] Sinicrope FA. DNA mismatch repair and adjuvant chemotherapy in sporadic colon cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(3):174-177.
[6] Boland GM, Chang GJ, Haynes AB, et al. Association between adherence to National Comprehensive Cancer Network treatment guidelines and improved survival in patients with colon cancer [J]. Cancer, 2013, 119(8):1593-1601.
[7] 祝利民,沈克平,周浩,等.胃肠安及四藤方对人结肠癌细胞

株干细胞 CD133⁺ 的影响 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2016, 36(2):161-165.

[8] Taverna P, Liu L, Hanson AJ, et al. Characterization of MLH1 and MSH2 DNA mismatch repair proteins in cell lines of the NCI anticancer drug screen [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2000, 46(6):507-516.
[9] Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm [J]. Science, 2009, 324(5935):1670-1673.
[10] Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(2):90-100.
[11] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. Nature, 2007, 445(7123):106-110.
[12] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2006, 445(7123):111-115.
[13] Dallas NA, Xia L, Fan F, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition [J]. Cancer Res, 2009, 69(5):1951-1957.
[14] Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al. CD133⁺ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway [J]. Oncogene, 2008, 27(12):1749-1758.
[15] Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer [J]. Oncol Rep, 2009, 22(4):709-717.
[16] Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(29):3664-3672.
[17] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20):3219-3226.

[收稿日期] 2016-10-28 [修回日期] 2017-01-09

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 120 页)

[10] Netzer N, Strohl K, Faulhaber M, et al. Hypoxia-related altitude illnesses [J]. J Travel Med, 2013, 20(4):247-255.
[11] Imray C, Wright A, Subudhi A, et al. Acute mountain sickness: pathophysiology, prevention, and treatment [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2010, 52(6):467-484.
[12] Collier DJ, Wolff CB, Hedges AM, et al. Benzolamide improves oxygenation and reduces acute mountain sickness during a high-altitude trek and has fewer side effects than acetazolamide at sea level [J]. Pharmacol Res Perspect, 2016, 4(3):1-12.

[13] Mirtschink P, Krek W. Hypoxia-driven glycolytic and fructolytic metabolic programs: Pivotal to hypertrophic heart disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 2(11):1822-1828.
[14] 马慧萍,何蕾,王昕,等.藏紫菀总黄酮对模拟高原缺氧小鼠的保护作用 [J].解放军医药杂志, 2016, 28(6):1-4.
[15] 景临林,马慧萍,樊鹏程.矮垂头菊乙醇提取物的体外自由基清除活性及其对高原缺氧小鼠的保护作用研究 [J].天然产物研究与开发, 2015, 27:1815-1820.

[收稿日期] 2016-11-14 [修回日期] 2016-12-07

[本文编辑] 李睿旻