

Ss-A/Ro 核蛋白 60 ku 亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达

韩全利, 丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明

韩全利, 空军总医院干部病房三区 北京市 100036
丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明, 第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032
通讯作者: 韩全利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院干部病房三区. hanquanli@21cn.com
电话: 010-66928132 传真: 010-66928132
收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-10-10

Expression of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit and its variants in drug-resistant gastric cancer cells

Quan-Li Han, Jie Ding, Chang-Cun Guo, Xin Wang, Tai-Dong Qiao, Xue-Yong Zhang, Dai-Ming Fan

Quan-Li Han, the Third Section of Gerontology Department, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing 100036, China
Jie Ding, Chang-Cun Guo, Xin Wang, Tai-Dong Qiao, Xue-Yong Zhang, Dai-Ming Fan, Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Quan-Li Han, the Third Section of Gerontology Department, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. hanquanli@21cn.com

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-10-10

Abstract

AIM: To clone the encoding gene of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit, and to detect the expression of Ss-A/Ro 60 ku subunit and its variants in the drug resistance gastric cancer cells.

METHODS: The encoding gene of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction. The expression of Ss-A/Ro 60 ku subunit and its variants in the gastric cancer cells were analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: The Ss-A/Ro 60 ku subunit was successfully cloned, and its two transcription variants, with a length of 52 and 41 bp, respectively, were found out. The expression of Ss-A/Ro 60 ku subunit and its two variants in the SGC7901/VCR cells was higher than that in the SGC7901 ones ($P = 0.0001$, $P = 0.001$).

CONCLUSION: The Ss-A/Ro 60 ku subunit and its

variants are multi-drug resistance-related molecules.

Key Words: Gastric cancer; Ss-A/Ro 60 ku subunit; Variant; Multi-drug resistance

Han QL, Ding J, Guo CC, Wang X, Qiao TD, Zhang XY, Fan DM. Expression of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit and its variants in drug-resistant gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2788-2790

摘要

目的: 克隆Ss-A/Ro 60 ku亚单位编码基因, 检测Ss-A/Ro 60 ku亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达情况。

方法: 应用RT-PCR克隆Ss-A/Ro 60 ku亚单位编码基因, 应用半定量RT-PCR检测Ss-A/Ro 60 ku亚单位及其变异体在胃癌细胞中的表达情况。

结果: 成功克隆了Ss-A/Ro 60 ku亚单位编码基因, 并发现了他的两种变异体, 长度分别为52 bp和41 bp。半定量RT-PCR结果显示, Ss-A/Ro 60 ku亚单位在SGC7901/VCR中的表达强度高于SGC7901细胞($P = 0.0001$), Ss-A/Ro 60 ku亚单位的两种变异体在SGC7901/VCR中的表达强度也高于SGC7901细胞($P = 0.001$)。

结论: Ss-A/Ro 60 ku亚单位及其两种变异体为胃癌多药耐药相关分子。

关键词: 胃癌; Ss-A/Ro 60 ku亚单位; 变异体; 多药耐药

韩全利, 丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明. Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(23):2788-2790

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2788.asp>

0 引言

肿瘤细胞的多药耐药^[1-2]严重影响了肿瘤化疗的效果, 虽然导致肿瘤多药耐药的众多机制被阐明, 但仍不能完全解释肿瘤的多药耐药, 鉴于此, 我们应用消减杂交及改良DDRT-PCR法对胃癌耐药细胞中的耐药相关分子进行了研究, 从耐药胃癌细胞中克隆了与耐药相关的多个已知分子和未知分子^[3], 其中Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit(Ro 60)是在耐长春新碱的胃癌细胞系SGC7901/VCR与SGC7901的差示比较中发现的在SGC7901/VCR中

高表达的基因,在克隆Ro 60编码基因的时候,我们发现了Ro 60编码基因的两种变异体Ro 60 V1及Ro 60 V2^[4],本课题对他们在胃癌耐药细胞中的表达情况进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞SGC7901:引自军事医学科学院,由第四军医大学消化病研究所保存;人胃癌长春新碱耐药亚系SGC7901/VCR:由第四军医大学消化病研究所建立、保存;Hela细胞:由第四军医大学消化病研究所保存。RPMI 1640及胰蛋白酶购自Hyclone公司;胎牛血清购自浙江金华公司;细胞总RNA提取试剂盒购自华舜公司;M-MuLV反转录酶、Taq酶及DNA分子量标准购自MBI公司。

1.2 方法

1.2.1 Ro 60编码基因的克隆 利用RNA提取试剂盒提取胃癌细胞SGC7901/VCR的总RNA,以RT-PCR法克隆Ro 60编码基因,上游引物为:5'ATA ACG AGG GAG AGG AGA AAG G 3';下游引物为:5'GTG TCC ACC TGC ACT CCA TGT C 3',将PCR产物与pUCm-T载体连接后进行DNA序列测定。

1.2.2 Ro 60及其变异体在胃癌细胞中的表达分析 培养及收集SGC7901、SGC7901/VCR及Hela细胞,利用试剂盒提取的总RNA,用紫外分光光度计对提取的RNA进行定量,逆转录法制备cDNA,根据Ro 60编码基因及其变异体的序列,应用Premier Primer 5软件设计序列特异性引物,引物序列如下:Ro 60上游引物:5'-AAA CAC ACC TGC TGA TGT CTT C-3';下游引物:5'-GGG TAT TTT GCA AGG CTC TAT CAT C-3'。Ro 60 V1上游引物:5'-AAA CAC ACC TGC TGA TGT CTT C-3';下游引物:5'-GGG TAT TTT GCA AGG CTC TTT TAG G-3'。Ro 60 V2上游引物:5'-AAA CAC ACC TGC TGA TGT CTT C-3';下游引物:5'-GGT ATT TTG CAA GGA TCC AGA G-3'。GAPDH上游引物:5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3';下游引物:5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。进行PCR反应,以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,比较各扩增产物在各细胞间表达水平的强弱,应用图像分析仪对扩增条带做了扫描半定量。

统计学处理 应用SPSS 11.0统计软件,对各扩增条带的灰度值进行t检验。

2 结果

2.1 Ro 60编码基因的克隆及DNA测序分析 本研究成功地扩增了Ro 60编码基因。通过DNA序列测定,发现了Ro 60的三种cDNA克隆,其中一种克隆与Ro 60 cDNA序列完全一致,另外两种cDNA克隆分别于Ro 60 cDNA序列的第1 727和1 728核苷酸之间插入了长度为52 bp和41 bp的核苷酸序列,遂将其命名为Ro 60 V1、Ro 60 V2, Ro 60 V1插入的核苷酸序列为:ACACTGTAAAATAGTTTTCG

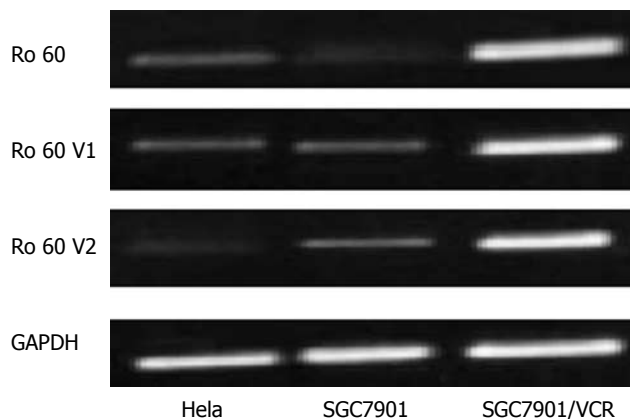


图1 Ro 60、Ro 60 V1及Ro 60 V2的半定量RT-PCR结果。

表1 Ro 60、V1及V2的半定量RT-PCR灰度扫描结果 (n = 4)

	Ro 60	Ro 60 V1	Ro 60 V2	GAPDH
SGC7901/VCR	174.7 ± 7.11	178.3 ± 6.73	171.2 ± 7.96	177.4 ± 8.36
SGC7901	75.3 ± 4.92 ^a	90.1 ± 4.39 ^a	91.2 ± 5.94 ^a	168.2 ± 7.69
Hela	96.5 ± 5.09 ^a	89.4 ± 4.96 ^a	74.2 ± 5.39 ^a	167.7 ± 7.98

^aP<0.01 vs SGC7901/VCR.

TTTGTGAATAATACGTGTGTACCTAAAAGAG; Ro 60 V2插入的核苷酸序列为:GCATGTTGGATATGTGCGGC TTTGATACTGGAGCTCTGGAT.

2.2 Ro 60及其变异体在胃癌细胞中表达的半定量RT-PCR结果 半定量RT-PCR结果显示, Ro 60在SGC7901/VCR中的表达强度高于SGC7901细胞及Hela细胞(P<0.01), Ro 60的两种变异体在SGC7901/VCR中的表达强度也高于SGC7901细胞及Hela细胞(P<0.01)(图1,表1)。

3 讨论

胃癌细胞的多药耐药性是胃癌化疗失败的主要原因,我们以前的研究发现,在胃癌细胞的多药耐药中,除了有P-gp、MRP、GST等经典的耐药分子参与外,凋亡基因的改变、蛋白激酶C以及某些离子通道也参与了胃癌细胞多药耐药性的形成^[5-7]。为了深入研究胃癌细胞MDR的发生机制,我们应用改良差示PCR技术比较了胃癌长春新碱耐药细胞SGC7901/VCR与药敏细胞SGC7901基因表达的差异,结果表明,与药敏细胞SGC7901相比, Ro 60在耐药细胞SGC7901/VCR中的表达明显上调,在研究Ro 60基因的同时,我们又发现了Ro 60基因的两种转录变异体。

Ro 60是从人T淋巴瘤母细胞白血病细胞cDNA文库中首次克隆得到的^[8],人Ro 60基因定位于第一号染色体1q31区,全长cDNA为1 890 bp,编码525个氨基酸残基,分子量为60 ku^[9]。Ro 60是多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、干燥综合征等疾病的自身抗原^[10]。Ro 60是一种RNA结合蛋白,目前Ro 60的功能一直不是很清楚^[11-13]。

为了解Ro 60及其转录变异体在耐药胃癌细胞中的表达情况,我们应用半定量RT-PCR对他们在胃癌细胞

中的表达进行了研究, 结果表明, Ro 60及其变异体Ro 60 V1、Ro 60 V2在SGC7901/VCR中的表达明显高于SGC7901细胞和Hela细胞. SGC7901细胞和Hela细胞一样, 他们都是对化疗药物敏感的肿瘤细胞, 而SGC7901/VCR细胞是SGC7901细胞在长春新碱(VCR)的诱导下培养出的耐药胃癌细胞, 经耐药谱检测, 其不但对长春新碱耐药, 而且对其他化学结构及作用机制不同的化疗药物也呈高度的耐药性, 这就表明, SGC7901/VCR细胞是一株多药耐药的胃癌细胞^[14,15]. Ro 60及其变异体Ro 60 V1、Ro 60 V2在SGC7901/VCR细胞中高表达表明, 他们在胃癌多药耐药的机制中可能起着一定的作用, 是胃癌细胞多药耐药相关分子, 为进一步研究Ro 60及其两种转录变异体在肿瘤多药耐药中的功能提供了一定的实验基础.

4 参考文献

- Roepe PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 385-405
- Deng L, Tatebe S, Lin-Lee YC, Ishikawa T, Kuo MT. MDR and MRP gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents. *Cancer Treat Res* 2002; 112: 49-66
- Zhao Y, You H, Liu F, An H, Shi Y, Yu Q, Fan D. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 211-218
- Wang X, Lan M, Shi YQ, Lu J, Zhong YX, Wu HP, Zai HH, Ding J, Wu KC, Pan BR, Jin JP, Fan DM. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 54-59
- Zhao Y, Xiao B, Chen B, Qiao T, Fan D. Upregulation of drug sensitivity of multidrug-resistant SGC7901/VCR human gastric cancer cells by bax gene transduction. *Chin Med J* 2000; 113: 977-980
- 韩英, 时永全, 曹云新, 樊代明. 蛋白激酶C的激活剂及抑制剂对胃癌糖耐药细胞系P-糖蛋白功能及表达的影响. *中华消化杂志* 2001; 21: 349-352
- 时永全, 肖冰, 苗继延, 赵燕秋, 尤涵, 樊代明. 构建fas基因真核表达载体逆转胃癌耐药细胞MDR表型. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 309-312
- Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1989; 83: 1284-1292
- Chan EK, Tan EM, Ward DC, Matera AG. Human 60-kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen gene (SSA2) localized to 1q31 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 23: 298-300
- von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358
- O'Brien CA, Wolin SL. A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev* 1994; 8: 2891-2903
- Chen X, Quinn AM, Wolin SL. Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2000; 14: 777-782
- Shi H, O'Brien CA, Van Horn DJ, Wolin SL. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA* 1996; 2: 769-784
- 蔡学君, 张学庸, 樊代明. 胃癌耐药细胞株耐药谱的体外实验. *第四军医大学学报* 1994; 15: 86-88
- Shi Y, Han Y, Wang X, Zhao Y, Ning X, Xiao B, Fan D. MGr1-Ag is associated with multidrug-resistant phenotype of gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 2002; 5: 154-159

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

本刊讯《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录.

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章.

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 页码160, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.