

# 染色体 2p22 的过度扩增及 hms2 基因的高表达与卵巢癌紫杉醇耐药相关性的研究

李红霞<sup>1</sup>, 关新元<sup>2</sup>, 张素梅<sup>1</sup>, 尹冬梅<sup>3</sup>

Study on the Relationship of Taxol-resistance of Ovarian Carcinoma with the Amplification of 2p22 on Chromosome and the Expression of hms2 Gene

LI Hong-xia<sup>1</sup>, GUAN Xin-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Su-mei<sup>1</sup>, YIN Dong-mei<sup>3</sup>

1. Department of Obstetric and Gynecology of Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China; 2. Department of Clinical Oncology of Hongkong University; 3. Beijing of Obstetric and Gynecology Hospital

**Abstract: Objective** To investigate the difference of DNA copy number and gene expression on chromosome and their correlation with taxol-resistance of ovarian carcinoma. **Methods** Comparative genomic hybridization and RT-PCR technique were performed on the taxol-resistant cell lines and ovarian cancer tissues to compare the genomic alteration of chromosome and the hms2 gene expression. **Results** CGH results showed that the most interesting finding was the amplification of 2p22 in OC3/ Tax300. Over-expression of hms2 gene in OC3/ Tax300 was detected. The positive expression rates of hms2 had significant difference between group 1 (93.9%, 31/33) and group 2 (47.6%, 10/21). The positive rate in poor differential cancer was 93.3%, higher than that of 54.2% in moderate and well differential cancers significantly. **Conclusion** Amplification of 2p22 on chromosome and over-expression of hms2 gene may be associated with taxol-resistance of ovarian carcinoma.

**Key words:** Ovarian carcinoma; Taxol-resistant cell lines; CGH; hms2 gene

**摘要:**目的 研究染色体特定区域 DNA 拷贝改变、基因差异表达及其与紫杉醇耐药的关系。方法 运用比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)及 RT-PCR 技术,分析卵巢癌紫杉醇耐药株染色体基因组变化和 hms2 基因在卵巢癌组织中的表达。结果 CGH 结果显示最有意义的变化是卵巢癌紫杉醇耐药株 OC3/ Tax300 细胞染色体 2p22 过度扩增。RT-PCR 检测发现 hms2 基因在 OC3/ Tax300 细胞高度表达。hms2 基因表达阳性率在组 1 和组 2 分别为 93.9% (31/33) 及 47.6% (10/21), 差异有显著性; 在低分化癌为 93.3%, 显著高于中、高分化癌的 54.2%。结论 2p22 拷贝数的过度扩增及 hms2 基因的高度表达可能与卵巢癌紫杉醇耐药相关。

**关键词:** 卵巢癌; 紫杉醇耐药细胞系; 比较基因组杂交; hms2 基因

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)08-0565-03

## 0 引言

卵巢癌是死亡率最高的妇科恶性肿瘤。目前, 在其治疗方面, 紫杉醇以其确切的疗效已成为应用最广泛的化疗药物之一, 且与顺铂、阿霉素之间无交叉耐药, 已成为治疗卵巢癌的一线药物。但随之而来的耐药问题成为临床治疗的障碍, 严重制约了卵巢癌病人的疗效。解决这一难题的关键在于揭示其

耐药机制, 为进一步进行临床逆转耐药及预防耐药的研究提供基础, 最终达到预防和逆转耐药的发生, 改善卵巢癌的治疗效果, 提高患者的生存率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株与细胞培养 紫杉醇耐药细胞株亲代细胞 OC3 由中国人民解放军军事医学科学院分子生物学实验室李春海教授惠赠, 本室传代培养保存; 两种紫杉醇耐药细胞株: OC3/ Tax300 及 OC3/ Tax50 由本室以不同剂量的紫杉醇诱导建立<sup>[1]</sup>。细胞生长于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中传代培养; 用 0.25% 胰酶消化传代, 12h 细胞即可贴壁, 约 24h 后进入指数生长期, 每 2~3 天传代一次。

收稿日期: 2005-08-01; 修回日期: 2005-11-24

基金项目: 首都医学发展科研基金(重点学科)资助项目(ZD199915)

作者单位: 1. 100038 北京世纪坛医院(北京大学第九临床医学院)妇产科; 2. 香港大学临床肿瘤学系; 3. 北京妇产医院

作者简介: 李红霞(1956-), 女, 博士, 教授, 主要从事妇科肿瘤研究

1.1.2 临床标本 选择 2000 年 3 月~2005 年 5 月间北京世纪坛医院妇科实验室所收集的卵巢癌标本 54 份(均冷冻保存于液氮中),其中分为 2 组:术前使用紫杉醇先期化疗者、或因复发而行二次手术者共 33 份(组 1);术前未经任何药物化疗者 21 份(组 2)。标本的组织学类型:浆液性卵巢癌 26 份,粘液性卵巢癌 21 份,子宫内膜样癌 7 份;组织学分级:低分化癌 30 份,中、高分化癌 24 份。

1.2 方法

1.2.1 比较基因组杂交

常规酚-氯仿法提取耐药株、敏感株的 DNA 和健康女性外周血基因组 DNA。制备健康女性淋巴细胞中期染色体。以切口平移法,用荧光素-dUTP (绿色荧光)标记敏感株和耐药株 DNA,罗丹明-dUTP (红色荧光)标记配对的正常外周血 DNA。染色体玻片预处理后,分别与标记的待测 DNA 探针和参照 DNA 探针杂交。荧光显微镜下观察染色体上不同的荧光,荧光图像分析系统摄取并比较红绿两种荧光的强度,得出两组 DNA 的荧光比率和分析图。

1.2.2 RT-PCR 扩增

参照文献[2]设计 hms2 引物序列,由上海生物工程技术有限公司合成。上游:5' caa ttg aaa gga gtc tcc acg -3' (21bp) 下游:5' aaa ctc ctc aag ttc cag gg -3' (20bp),扩增片段长度为 411bp。细胞及组织 RNA 提取参照 TRIzol Reagent (life technologies) 试剂盒说明书进行。PCR 反应体系:10 ×缓冲液 2μl,10mmol/L 脱氧核苷三磷酸(dNTP) 1.5μl,25mmol/L MgCL<sub>2</sub> 2.4μl,上、下游引物各 2μl,cDNA 1μl,Taq 酶 0.1μl,加去离子水 9μl 至终体积 20μl。反应条件为:94 5min 预变性;然后 95 变性 50s,55 退火 1min,72 延伸 2min,共 35 个循环;最后 72 延伸 7min。PCR 产物以 2%琼脂糖凝胶电泳。

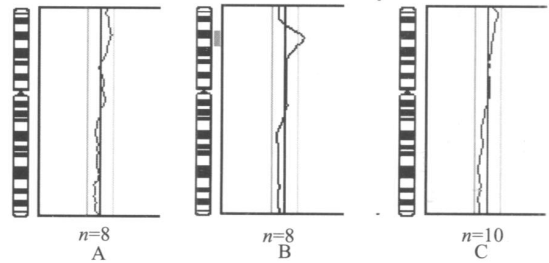
1.2.3 统计学分析

<sup>2</sup>检验及 Fisher 精确检验。

2 结果

CGH 结果显示紫杉醇敏感株细胞和两种耐药株细胞的遗传物质均有不同程度的改变,涉及 10 条染色体,见表 1。遗传物质表达丢失的有:1,3p,4,6,7q,8p 号染色体;表达增加的有:2p22,3q,5p,9,10 号染色体。仅在敏感株 OC3 中表达增强的是 10 号染色体;表达缺失的是 7q,8p。3p 缺失发生在 OC3 和耐药株 OC3/Tax300。敏感株和耐药株 OC3/Tax50 的 10q22 表现为高度扩增。2p22 仅在

耐药株 OC3/Tax300 中为高度扩增,见图 1。



A. OC3 细胞 CGH 分析结果 B. OC3/Tax300 细胞 CGH 分析结果 C. OC3/Tax50 细胞 CGH 分析结果

图 1 三种细胞株的 CGH 分析结果

表 1 三种细胞株的遗传物质表达

细胞株	缺失	增加	高度扩增
OC3	1,3p,4,6,7q,8p	2pter-p21,2p22,3q,5p,9,10	10q22
OC3/Tax50	1,4,6	2pter-p21,2p22,3q,5p,9	10q22
OC3/Tax300	1,3p,4,6	2pter-p21,2p22,3q,5p,9	2p22

RT-PCR 检测发现 hms2 基因在 OC3/Tax300 细胞高度表达,在 OC3/Tax50 细胞呈弱表达,而在 OC3 细胞未见表达。与 CGH 的结果 2p22 (hms2 基因位点)上的遗传物质呈显著扩增相吻合,见图 2。

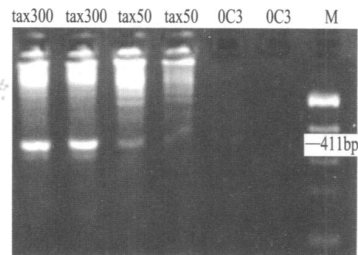


图 2 三种细胞株的 hms2 gene PCR 结果

hms2 基因表达阳性率在组 1 和组 2 分别为 93.9% (31/33) 及 47.6% (10/21), 差异有显著性 (P = 0.0001); 在浆液性腺癌和粘液性腺癌、子宫内膜样癌其阳性率分别为 76.9% (20/26)、66.7% (14/21) 和 42.9% (3/7), 无显著性差异。hms2 阳性表达率在低分化癌为 93.3%, 显著高于中、高分化癌的 54.2%, P = 0.0008, 见表 2。

表 2 hms2 基因 mRNA 在卵巢癌组织的表达

组别	例数	hms2 mRNA 阳性表达		
		例数	%	P
化疗组	33	31	93.9	
未化疗组	21	10	47.6	<sup>2</sup> = 15.06 = 0.0001
浆液性癌(1)	26	20	76.9	(1) vs (2) > 0.05
粘液性癌(2)	21	14	66.7	(1) vs (3) > 0.05
子宫内膜样癌(3)	7	3	42.9	(2) vs (3) > 0.05
低分化癌	30	28	93.3	
中、高分化癌	24	13	54.2	<sup>2</sup> = 11.19 = 0.0008

### 3 讨论

体外培养的细胞系以其清晰的遗传背景,丰富的来源,成为研究某些类型癌基因及其功能改变的必要工具,并且这些细胞系具备与原发肿瘤相同的遗传学特点和分子生物学性状<sup>[3]</sup>。本研究所用的两种紫杉醇耐药细胞系 OC3/Tax300、OC3/Tax50 是参照临床化疗的剂量和给药方式设计诱导而建成。OC3/Tax300 细胞株耐药性稳定,耐药指数为 6.70,对拓朴替康有明显的交叉耐药。之前曾有学者分别用长春新碱、紫杉醇及阿霉素对亲代细胞进行体外诱导建立耐药细胞系,并利用 CGH、FISH 等技术将亲代细胞和子代细胞的染色体变化进行检测,发现一些染色体的异常变化与耐药有关。如 6q21-25 拷贝数的增加,7q21-36 和 10q12-15 拷贝数的减少参与铂类耐药;7q11.2-21 的拷贝数增加与紫杉醇耐药相关<sup>[4-6]</sup>。CGH 是一种全方位检测法,一次杂交试验即可在整个基因组水平对不同基因组间 DNA 序列拷贝数差异进行检测并定位。利用这项技术可以对不同类型的肿瘤、同一肿瘤的不同发展阶段的遗传物质的改变进行检测。本研究发现三种细胞株均存在遗传物质的不平衡变化。通过对比分析发现耐药细胞 OC3/Tax300 的 2p22 呈现特异性高水平扩增。

染色体 2p22 上存在肿瘤耐药相关基因,如错配修复(MMR)家族中的 hms2 基因<sup>[7,8]</sup>。正常情况下,DNA 双螺旋结构是靠 A-T、C-G 间的氢键互补配对来维持,如果因各种原因使得 DNA 之间的碱基互补配对发生错误形成了 DNA 错配时,机体会对错配了的碱基进行修复以保证 DNA 复制的忠实性和维持基因组的稳定性。具备这种作用的基因就是错配修复基因。进一步 RT-PCR 检测发现 hms2 基因在 OC3/Tax300 细胞高度表达,在 OC3/Tax50 细胞呈弱表达,而在 OC3 细胞未见表达;在临床紫杉醇化疗后标本中 hms2 基因表达率显著高于未经化疗组,均表明该基因的过度表达与紫杉醇耐药有关。推测其机制可能是:化疗药物导致肿瘤细胞的 DNA 损伤,此时由某种途径激活 hms2 基因,使其修复作用增强,不断地修复由药物造成的

碱基错配、片段插入/缺失,以保证 DNA 复制的忠实性来对抗药物对细胞的损伤杀灭作用。hms2 基因在卵巢癌不同的组织学类型之间的表达差异,则表明低分化癌之所以预后较差,其原因之一可能是该类肿瘤易发生化疗耐药。

尽管 hms2 的异常表达可能与卵巢癌的紫杉醇化疗具有相关性,但 2p22 上除了 hms2 基因与耐药相关外,尚存在许多候选基因,如:黄嘌呤脱氢酶基因(XDH),钙调节蛋白 2 基因(CALM-2)可能也和耐药有关,因此 hms2 基因与紫杉醇耐药之间的关系及其确切机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李红霞,刘冠媛,周友珍,等. 卵巢癌紫杉醇耐药细胞株 OC3/PIX<sub>3</sub>及 OC<sub>3</sub>/PIX<sub>5</sub>的建立及其生物学特性[J]. 中华现代医学研究杂志,2004,2(3):1-5.
- [2] Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, et al. Expression of the human mismatch repair gene hms2: a potential marker for urothelial malignancy[J]. Cancer, 2000, 88(10):2333-2341.
- [3] Dabholkar M, Thornton K, Vionnet J, et al. Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human ovarian cancer tissues[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60:1611-1619.
- [4] Takano M, Kudo K, Goto T, et al. Analysis by comparative genomic hybridization of genes relating with cisplatin-resistance in ovarian cancer[J]. Hum Cell, 2001, 14(4):267-271.
- [5] Sonoda G, Palazzo J, du Manoir S, et al. Comparative Genomic Hybridization Detects Frequent Overrepresentation of Chromosomal Material From 3q26, 8q24, and 20q13 in Human Ovarian Carcinomas[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1997, 20(4):320-328.
- [6] 姜润德,胡亮,关新元,等. 人鼻咽癌顺铂耐药细胞系(CNE2/DDP)及其亲代细胞(CNE2)的比较基因组杂交研究[J]. 癌症, 2004, 23(4):386-390.
- [7] Jacob S, Aguado M, Fallik D, et al. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(17):6555-6562.
- [8] Marcellis CL, van der Putten HW, Tops C, et al. Chemotherapy resistant ovarian cancer in carriers of an hMSH2 mutation? [J]. Fam Cancer, 2001, 1(2):107-109.

[编辑:刘红武]