

错配修复蛋白表达与胃肠道癌对化疗药物耐药性的关系

李梅, 赵宝霞, 于志红, 刘敏, 范凯, 吕申

The Relationship of Mismatch Repair Proteins Expression to Drug Resistance of Gastrointestinal Tract

LI Mei, ZHAO Bao-xia, YU Zhi-hong, LIU Min, FAN Kai, LV Shen

The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Liaoning 116023, China

Corresponding Author: LV Shen

Abstract :Objective To investigate the relationship of mismatch repair (MMR) proteins expression to drug resistance of gastrointestinal tract. **Methods** Immunohistochemistry and immunocytochemistry were used to detect the expressions of hMSH2 and hMLH1 in 5 gastric carcinomas, 18 intestinal carcinomas and BGC823, BGC823/cDDP; MTT assay was used to detect the resistance of carcinoma tissues and the cell lines above to cDDP, 5-Fu, VCR, MMC. **Results** The rates of hMSH2 in carcinoma tissues and their surrounding tissues were 74 % and 59 % respectively. There was no significant difference between them, and it was significantly coincidence between them. The rates of hMLH1 in carcinoma tissues and their surrounding tissues were 57 % and 23 % respectively. There was significantly difference between them. The rate of MMR protein expression in carcinomas high resistant to 5-Fu was significantly lower than that in carcinomas middle and low resistance to 5-Fu. hMSH2 expression of BGC823/cDDP was weaker than that of BGC823, and the former was more resistant to cDDP, 5-Fu, VCR than the latter.

Conclusion The situation of MMR function may be related to individual genetic background and decreasing of MMR protein expression may take part in intrinsic resistance to 5-Fu and multidrug resistance of gastrointestinal carcinomas.

Key words: Mismatch repair protein; Intrinsic drug resistance; Gastrointestinal carcinoma

摘 要:目的 探讨胃肠道癌组织错配修复蛋白表达与其对化疗药物耐药性产生的关系。方法 免疫组织(细胞)化学方法检测 5 例胃癌、18 例大肠癌及相应癌旁组织和胃癌细胞株 BGC823 及其耐药株 BGC823/cDDP 错配修复蛋白表达情况;MTT 法检测癌组织及上述 2 种细胞株对顺铂、5-Fu、长春新碱、丝裂霉素的耐受性。结果 癌组织 hMSH2 蛋白阳性表达率(74 %)与癌旁组织(59 %)无显著差别,且在两组表达有显著相关性;癌组织 hMLH1 蛋白阳性表达率(57 %)显著高于癌旁组织(23 %)。对 5-Fu 高度耐药的癌组织错配修复蛋白表达率显著低于中度耐药和不耐药组;癌组织对其他药物耐受程度与错配修复蛋白表达间未见显著相关关系。耐药株 hMSH2 蛋白表达强度明显弱于亲本株(BGC823), hMLH1 蛋白表达强度在 2 种细胞株无明显差异。耐药株较亲本株对 cDDP、5-Fu 和 VCR 耐药性均有增加,耐药指数分别为 3.93、1.87 和 2.03。结论 错配修复系统功能状态可能与个体遗传背景有关;其蛋白表达下调参与胃肠道癌对 5-Fu 的原发耐药机制和胃肠道癌细胞多药耐药性的产生。

关键词: 错配修复蛋白;原发耐药性;胃肠道癌

中图分类号:R735;R735.3⁺4 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)07-0496-03

0 引言

错配修复蛋白是 20 世纪 90 年代初发现的,在保证 DNA 复制准确性和维护基因组稳定性中起关键作用,其异常表达与胃肠道癌的发生、发展密切相关。

关^[1]。近年来,一些学者认为错配修复蛋白表达异常还与肿瘤细胞耐药性的产生有关,但其机制仍不清楚。本实验通过研究胃肠道癌组织及胃癌细胞株错配修复蛋白 hMSH2 和 hMLH1 的表达与其对常用化疗药物敏感程度的关系,探讨胃肠道癌对化疗药物耐药性产生的机制。

1 资料和方法

1.1 研究对象

取自 2000 ~ 2003 年在大连医科大学附属二院

收稿日期:2005-07-25;修回日期:2005-12-26

作者单位:116023 辽宁,大连医科大学附属二院实验中心

通讯作者:吕申

作者简介:李梅(1977-),女,硕士,医师,主要从事肿瘤分子病理学研究

接受手术治疗的肿瘤标本 23 例,其中胃癌 5 例,大肠癌 18 例。患者男 14 例,女 9 例,平均年龄 (58.6 ± 13.2) 岁,术前均未接受过放射和化学药物治疗。取手术切除的癌及癌旁组织标本。将癌组织分为两部分,一部分(癌组)同癌旁组织(癌旁组),经 10 % 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续切片,用于 HE 染色的组织病理学诊断和免疫组织化学染色的蛋白表达检测;另一部分在离体 2h 内用于体外药物耐受性检测(MTT 法)。

人低分化胃腺癌细胞株 BGC823 购自上海细胞生物所,由本实验室保存;顺铂耐药株 BGC823/cDDP 采用逐步递增顺铂浓度、间歇作用体外诱导法获得,由本室构建。

1.2 试剂和方法

1.2.1 免疫组织化学法检测癌组织错配修复蛋白表达

鼠抗人 hMSH2 单克隆抗体购自美国 CALBI-OCHEM 公司(工作浓度 1:50);鼠抗人 hMLH1 单克隆抗体购自美国 PHARMINGEN 公司(工作浓度 1:50),SP 试剂盒及 DAB 显色系统购自福州迈新生物技术开发有限公司。免疫组化染色流程按试剂盒说明书进行。以已知染色阳性切片为阳性对照,PBS 代替一抗为阴性对照。结果判断:以细胞核内出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,计数 5 个高倍视野,阳性细胞数与肿瘤细胞总数之比 ≥ 10 %,判为表达阳性,否则为阴性。同一病例 hMSH2 和 hMLH1 均为阳性表达或其中任意一种蛋白为阳性表达判为错配修复蛋白阳性表达,否则为阴性表达。

1.2.2 MTT 法检测癌组织对常用化疗药物的耐受性

检测胃肠道癌细胞对顺铂(cDDP)、5-Fu、长春新碱(VCR)、丝裂霉素(MMC)等 4 种作用机制不同化疗药物的耐受性。所选药物终浓度为常规临床应用时患者血浆高峰浓度的 10 倍。取肿瘤组织 2 ~ 3 mm³,制成单细胞悬液,调整最终细胞浓度为 3 × 10⁵ 个/ml,接种于 96 孔板。设实验组(肿瘤细胞悬液 100 μl/孔,化疗药物 10 μl/孔,培养液 90 μl/孔)、对照组(肿瘤细胞悬液 100 μl/孔,培养液 100 μl/孔)和空白组(培养液 200 μl/孔),每组复孔 3 个。加药后充分混匀,置于培养箱在 5 % CO₂, 37 °C 条件下培养 48h,加入 MTT 试剂(20 μl/孔),继续培养 4h,再加入 DMSO(100 μl/孔),充分溶解,用酶标仪(λ = 570 nm)测定每孔吸光度(A 值)。根据公式计算抑制率,抑制率 = (1 - A 实验组/A 对照组) × 100 %。药物耐受性判定标准如下,高度耐药:抑制率 < 30 %;中度耐药:抑制率 30 % ~ 50 %;不耐

药:抑制率 ≥ 50 %。

1.2.3 免疫细胞化学方法检测两种细胞株错配修复蛋白表达

取对数生长期 BGC823 和 BGC823/cDDP 细胞,PBS 洗 2 次,取少量细胞涂片,丙酮 4 °C 固定 30 min,室温风干。常规免疫细胞化学 SP 法染色,无需抗原修复,其他操作步骤同 1.2.1。

1.2.4 MTT 法检测两种细胞株对 cDDP、5-Fu、VCR 的耐药性

取对数生长期的培养细胞 BGC823 及 BGC823/cDDP,调整细胞浓度至 3 × 10⁵ 个/ml。实验组分别加入不同倍比稀释浓度梯度的 cDDP、5-Fu、VCR 抗癌药 10 μl/孔,其他操作方法及步骤同 1.2.2。通过半数抑制浓度(IC₅₀)计算 BGC823/cDDP 对 5-Fu 的耐药指数,耐药指数 = IC₅₀(BGC823)/IC₅₀(BGC823/cDDP)。

1.2.5 统计学分析

采用四格表^[2]检验及秩和检验法,在 SPSS 10.0 统计软件上计算分析。

2 结果

2.1 癌及癌旁组织错配修复蛋白 hMSH2、hMLH1 的表达

癌组织 hMSH2 蛋白的阳性表达率 74 % (17/23) 与癌旁组织阳性表达率 59 % (13/22) 无显著差别(P > 0.05),两组表达有显著相关性(P < 0.05),见表 1;癌组织 hMLH1 蛋白的阳性表达率 57 % (13/23) 显著高于癌旁组织阳性表达率 23 % (5/22) (P < 0.05)。

表 1 错配修复蛋白 hMSH2 在癌组织与癌旁组织表达的关系

		癌旁组织		合计
		+	-	
癌组织	+	13	3	16
	-	0	6	6
合计		13	9	22

注: $\chi^2 = 11.917, P = 0.001$

2.2 癌组织对化疗药物耐受性与错配修复蛋白表达的关系

癌 23 例中对顺铂、5-Fu、长春新碱、丝裂霉素高度耐药的分别有 1、3、9、1 例;中度耐药的分别有 8、3、7、8 例;不耐药的分别有 13、17、6、14 例。

癌组织对 5-Fu 的耐受程度与错配修复蛋白表达密切相关(P < 0.05),高度耐药组其表达率显著低于中度耐药组和不耐药组。但癌组织错配修复蛋白表达与对其他药物耐受程度未见显著相关关系

($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 癌组织对化疗药物的耐受程度与错配修复蛋白表达的关系

耐药程度	顺铂		5-Fu		长春新碱		丝裂霉素	
	例数	阳性例数	例数	阳性例数	例数	阳性例数	例数	阳性例数
高度耐药	1	1	3	1	9	8	1	1
中度耐药	8	5	3	3	7	5	8	7
不耐药	13	12	17	16	6	6	14	11
<i>P</i>	0.218		0.015		0.330		0.786	

2.3 两种细胞株错配修复蛋白的表达及耐药性变化

错配修复蛋白 hMSH2、hMLH1 在细胞株 BGC823/cDDP 和 BGC823 均有表达, hMSH2 蛋白在细胞株 BGC823/cDDP 表达强度明显弱于细胞株 BGC823, hMLH1 蛋白表达强度在 2 种细胞株无明显差异。

细胞株 BGC823/cDDP 对 cDDP、5-Fu 和 VCR 耐药指数分别为 3.93、1.87 和 2.03, 其耐药性较 BGC823 均有增加。

3 讨论

错配修复系统由一系列能特异性识别、结合错配碱基和完成剪切修复的酶分子组成。hMSH2 是组成异源二聚体 hMutS 或 hMutS 的核心蛋白, 参与识别错配碱基和插入缺失环; hMLH1 是组成异源二聚体 hMutL 或 hMutL 的核心蛋白, 参与切除错配碱基和插入缺失环。它们共同参与完成错配修复反应, 以保证基因组复制稳定性^[2,3]。许多研究表明这两种蛋白编码基因的突变和异常表达常在胃癌、大肠癌细胞中出现。错配修复基因功能缺失已被视为遗传非息肉性结肠癌 (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer, HNPCC) 的重要发病原因^[4]。本研究检测了 hMSH2 和 hMLH1 蛋白在 5 例胃癌、18 例大肠癌的癌组织及相应癌旁组织的表达发现, hMSH2 的阳性表达率在癌与癌旁组织却无显著差异, 且该蛋白在癌与癌旁组织常同步表达, 表明 hMSH2 蛋白表达程度可能与个体遗传背景有关, 也提示错配修复系统功能状态的不同可能由个体遗传特点决定; 然而癌组织 hMLH1 的阳性表达率显著高于癌旁组织, 究其原因可能是癌细胞存在较多需要切除的错配碱基。

一些学者认为肿瘤细胞错配修复功能的丧失与

其对烷化剂、铂类等耐药性产生有关^[5,6], 但研究的多是与肿瘤细胞继发耐药性产生的关系。本研究选取的病例均未接受过术前放射和化学治疗, MTT 法检测的耐药性为原发耐药性。因 hMSH2 和 hMLH1 任意一种蛋白表达缺失都会导致错配修复功能缺失, 故本实验将任意一种蛋白表达缺失记为错配修复功能缺失。我们发现: 胃肠道癌组织对 5-Fu 的耐受程度与错配修复蛋白表达密切相关, 其表达率在高度耐药组显著低于中度耐药组和不耐药组; 癌组织对其他药物耐受程度与错配修复蛋白表达未见显著相关关系。提示胃肠道癌组织对 5-Fu 的原发耐药性可能与错配修复蛋白表达降低有关。而 5-Fu 是胃肠道癌常用的化疗药物之一, 这一结果可能为临床化疗药物的选用提供帮助。

顺铂诱导构建的耐药株 BGC823/cDDP 不但对 cDDP 耐药, 同时还出现了对 5-Fu 和 VCR 的耐药, 即多药耐药。此时耐药细胞错配修复蛋白 hMSH2 表达较亲本细胞株 BGC823 明显降低。提示错配修复蛋白表达降低可能与胃肠道癌细胞多药耐药性的产生有关。

总之, 错配修复蛋白的表达状态是个体遗传背景的反映, 其表达降低可能是胃肠道癌细胞对化疗药物产生耐受的原因, 通过对错配修复蛋白表达的检测对临床抗癌药物的选用将会有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function[J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 579-608.
- [2] Genschel J, Bazemore LR, Modrich P. Human exonuclease I is required for 50 and 30 mismatch repair[J]. J Biol Chem, 2002, 277(15): 13302-13311.
- [3] Raschle M, Marra G, Nystrom-Lahti M, et al. Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45): 32368-32375.
- [4] Bignami M, Casorelli I, Karran P. Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies[J]. Eur J cancer, 2003, 39(15): 2142-2149.
- [5] Fedier A, Fink D. Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity[J]. Int J Oncol, 2004, 24(4): 1039-1047.
- [6] Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin[J]. Cancer Res, 1996, 56(13): 3087-3090.

[编辑: 安 凤]