

# 宫颈癌细胞系 Siha 和 C33a 中 RRM2 表达水平与细胞对吉西他滨敏感性的相关分析

李梦熊\*, 邓柳枝, 梁 琼(中山大学附属第三医院, 广州 510630)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4792-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.13

**摘要** 目的:研究宫颈癌细胞系 C33a 和 Siha 中核糖核苷酸还原酶小亚基 M2(RRM2)表达与细胞对吉西他滨(Gem)敏感性的相关性。方法:以 0.1~3.2  $\mu\text{mol/L}$  Gem 处理 C33a 细胞,以 0.5~512  $\mu\text{mol/L}$  Gem 处理 Siha 细胞,72 h 后用 MTT 法测定细胞活力,计算半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ );使用 Western blot 法和逆转录-聚合酶链反应检测各细胞中 RRM2 表达;采用浓度梯度倍增和大剂量冲击相结合的方法对 Siha 细胞进行 Gem 耐药诱导培养,构建 Siha/Gem 耐药细胞株;在 Siha/Gem 细胞中,使用 RNA 干扰技术敲低 RRM2 表达并检测敲低前后 Gem 对细胞的  $\text{IC}_{50}$ 。结果:Gem 对 C33a、Siha 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 0.63、16.8  $\mu\text{mol/L}$ 。与 C33a 细胞比较, Siha 细胞中 RRM2 的表达较高。与 Siha 细胞相比, Siha/Gem 耐药细胞(耐药指数为 16.26)中 RRM2 表达增强。Gem 对敲低 RRM2 表达的 Siha/Gem 耐药细胞的  $\text{IC}_{50}$  降低,其逆转耐药倍数为 4.24。结论:宫颈癌细胞系中 RRM2 表达可能与细胞对 Gem 的敏感性呈负相关,敲低 RRM2 表达可增加细胞对 Gem 的敏感性。

**关键词** 宫颈癌细胞; C33a; Siha; 吉西他滨; 核糖核苷酸还原酶小亚基 M2; RNA 干扰

## Correlation between RRM2 Expression Level of Cervical Cancer Cell Line Siha and C33a and Cell Sensitivity to Gemcitabine

LI Meng-xiong, DENG Liu-zhi, LIANG Qiong (The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the correlation between RRM2 expression of cervical cancer cell line C33a and Siha and cell sensitivity to gemcitabine (Gem). METHODS: C33a and Siha were treated with 0.1-3.2  $\mu\text{mol/L}$  and 0.5-512  $\mu\text{mol/L}$  of gemcitabine respectively for 72 h; cell viability was measured by MTT assay to calculate the value of  $\text{IC}_{50}$ . The expression of RRM2 was measured by Western blot and RT-PCR. Siha cell was treated with gradient concentration and large dose of Gem to establish Siha/Gem drug-resistant cell line. RNA interference technology knockdown the expression of RRM2 in Siha/Gem cell, and  $\text{IC}_{50}$  of Gem to cell was determined before and after knockdown. RESULTS: The  $\text{IC}_{50}$  values of Gem to Siha and C33a were 16.8  $\mu\text{mol/L}$  and 0.63  $\mu\text{mol/L}$ . Compared with C33a cells, the expression of RRM2 in Siha cell was higher. Compared with Siha cells, Siha/Gem drug-resistant cell (drug resistant index of 16.26) showed higher RRM2 expression. Siha/Gem drug-resistant cell knockdown RRM2,  $\text{IC}_{50}$  of Gem to it was decreased, and inverse drug resistant times was 4.24. CONCLUSIONS: There is an negative correlation between RRM2 expression and Gem sensitivity in cervical cancer cell lines. The knockdown of RRM2 in Siha/Gem increases the sensitivity to Gem.

**KEYWORDS** Cervical cancer cell; C33a; Siha; Gemcitabine; Ribonucleotide reductase small subunit M2; RNA interference

宫颈癌是严重威胁女性健康的疾病之一。近年来,全球每年有 53 万例新发病例,27.5 万例死亡病例,80% 以上的宫颈癌属于鳞状细胞癌<sup>[1]</sup>。目前,宫颈癌的治疗方法以手术和放疗为主,然而对于晚期及复发转移患者,治疗效果并不理想,其 5 年生存率低于 40%,复发患者存活率低于 30%<sup>[2-3]</sup>。作为应对宫颈癌的重要手段,化学治疗已逐步得到肯定<sup>[4]</sup>。吉西他滨(Gemcitabine, Gem)是 20 世纪末期研发的核酸代谢类药物,含有嘧啶结构,可以特异性抑制核糖核苷酸还原酶(Ribonucleotide reductase, RR)活性,造成细胞 S 期阻滞。RR 酶是核苷酸代谢通路中的唯一限速酶,其功能为催化二磷酸核苷酸生成二磷酸脱氧核苷酸。人 RR 全酶由两个同源的大亚基(RRM1)和两个同源的小亚基(RRM2 或 RRM2B)组成<sup>[5]</sup>。目前有少量报道证实,RRM2 在胰腺癌的 Gem 耐药过程中发挥了重要作用

用<sup>[6]</sup>,而在宫颈癌细胞中有关 RRM2 与 Gem 耐药关系的研究尚少见。本研究将从分子水平探讨宫颈癌细胞系 C33a 和 Siha 中 RRM2 的表达与细胞对 Gem 敏感性的相关性,为宫颈癌化学治疗提供依据和新的思路。

## 1 材料

### 1.1 仪器

DYY-5 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);MS-S 振荡器(美国 Scilogex 公司);Nanodrop 微量紫外分光光度计、450 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Option Monitor TM system 荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司);LX70-111 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 药品与试剂

Gem 注射液(法国 Eli Lilly 公司,批号:C288018A,规格:200 mg/支);RRM2-siRNA (si-RRM2)、羊抗人 RRM2 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);OptiMEM 培养基、RPMI1640 培养

\* 主治医师,硕士研究生。研究方向:妇科内镜与妇科肿瘤。电话:020-85253040。E-mail:lmx98006@sina.com

基及胎牛血清(美国Gibco公司);Trizol试剂、Lipofectamine RNAimax转染试剂(美国Invitrogen公司)。

### 1.3 细胞株

人宫颈癌细胞系Siha和C33a均购自上海中国科学院细胞库,人正常宫颈上皮细胞HCvEpC购自美国Cell Applications公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

冻存的C33a、Siha细胞及HCvEpC细胞复苏后,培养于含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养传代,然后用不同浓度的Gem处理C33a细胞(0.5、2、8、32、128、512 μmol/L)、Siha细胞(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μmol/L)<sup>[7]</sup>。

### 2.2 细胞活力的检测

采用MTT法测定细胞活力。细胞加药培养72 h,于孵育结束前3~4 h,每孔加入MTT液10 μl,继续培养3~4 h后,取上清液100 μl,加入二甲亚砜(DMSO)100 μl,振荡5 min后,用酶标仪检测光密度(OD)(测量波长570 nm,参考波长655 nm),绘制各细胞系的生存曲线,并计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 2.3 细胞中RRM2蛋白表达的检测

采用Western blot法测定细胞中RRM2蛋白的表达情况。细胞加药培养72 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,将细胞刮下,加入100 μl RIPA裂解液,冰浴20 min,16 000 r/min(离心半径为16 cm)离心10 min,取上清液,采用蛋白质定量试剂盒法定量蛋白质浓度,再加入上样缓冲液煮沸5 min,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入4℃一抗(1:1 000稀释)孵育过夜,TBST缓冲液洗膜后加入二抗(1:15 000稀释),室温孵育1 h,检测细胞中RRM2蛋白的表达水平。

### 2.4 细胞中RRM2 mRNA表达的检测

采用逆转录-PCR检测细胞中RRM2 mRNA的表达水平。细胞加药培养72 h,使用RNAiso提取细胞内总RNA,逆转录生成第一链cDNA,荧光定量PCR(反应体系为:95℃预变性10 min,95℃30 s,56℃20 s,72℃30 s,共39个循环),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因,校正cDNA模板的细胞拷贝数,荧光定量PCR引物包括RRM2上游引物:5'-TGCCCTGGCCTCACATTTTCT-3',下游引物:5'-TCCCAA-TGAGCTTCACAGGC-3',扩增产物为359 bp;GAPDH上游引物:5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3',下游引物:5'-TGACAAGCTTCCCGTTCAGCC-3',扩增产物为200 bp。引物由英捷捷基(上海)贸易有限公司合成(iPAGE纯化)。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算细胞中RRM2 mRNA的相对量。

### 2.5 耐药细胞的诱导与检测

使用MTT法检测Gem对Siha细胞活力的IC<sub>50</sub>,即亲本细胞的IC<sub>50</sub>。随后用300 μmol/L Gem处理细胞1 d,更换含亲本细胞IC<sub>50</sub> Gem的培养基继续培养4~8 d,之后使用不含药物的培养基培养细胞至稳定生长,再次检测IC<sub>50</sub>。然后用300 μmol/L Gem再次处理1 d,根据已检测的IC<sub>50</sub>,采用浓度梯度倍增法处理Siha细胞,直至细胞可在含300 μmol/L Gem的培养基中稳定生长并且连续传代3代以上,得到Siha/Gem耐药细胞。采用MTT法测定0.5、2、8、32、128、512 μmol/L Gem对Siha/Gem

耐药细胞活力的影响,计算IC<sub>50</sub>与Siha/Gem耐药细胞的耐药指数(Resistant index, RI) [RI=耐药细胞的IC<sub>50</sub>/亲本细胞的IC<sub>50</sub>]。采用Western blot法和逆转录-PCR法检测Siha细胞和Siha/Gem耐药细胞中RRM2的表达水平。

### 2.6 siRNA干扰对Siha/Gem耐药细胞中RRM2表达的影响

转染前1天,接种2×10<sup>5</sup>个Siha/Gem耐药细胞于6孔板上,培养24 h。转染时取适量si-RRM2与OptiMEM培养基混匀,室温放置5 min,加入相应Lipofectamine RNAimax转染试剂,室温孵育15 min。将转染复合物加到培养板中,轻轻混匀,培养24 h后换液,加入新鲜的RPMI 1640培养基,培养24 h后用Western blot法和逆转录-PCR法检测细胞中RRM2表达水平。

### 2.7 敲低RRM2表达的Siha/Gem耐药细胞与Gem的敏感性变化

将Siha/Gem耐药细胞接种于96孔板,24 h后进行转染。设置空白对照组、阴性对照组(si-ctrl)和试验组(si-RRM2),4 h后用不同浓度(0.5、2、8、32、128、512 μmol/L)的Gem培养72 h。采用MTT法测定细胞活力,并绘制细胞生存曲线,计算各组细胞的IC<sub>50</sub>及逆转倍数(逆转倍数=RRM2敲低前细胞的IC<sub>50</sub>/RRM2敲低后细胞的IC<sub>50</sub>)。

### 2.8 统计学方法

采用Graphpad prism 5.0软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异分析使用独立样本完全随机设计双尾t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同宫颈癌细胞系对Gem的敏感性比较

Gem对C33a细胞、Siha细胞的IC<sub>50</sub>分别为(0.63 ± 0.21) μmol/L和(16.8 ± 1.34) μmol/L。结果表明,相较于C33a细胞, Siha细胞对Gem相对耐受。因此本研究采用Siha细胞作为下一步研究Gem耐药机制的工具细胞。不同浓度Gem作用72 h下C33a与Siha细胞的生存曲线见图1。

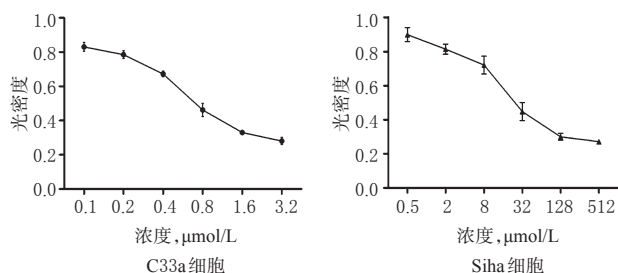


图1 不同浓度Gem作用72 h下C33a与Siha细胞的生存曲线  
Fig 1 Survival curves of Siha and C33a Cells treated with different concentrations of Gem for 72 h

### 3.2 细胞中RRM2的表达水平

相较于C33a细胞和Siha细胞,HCvEpC细胞中RRM2蛋白表达降低;相较于C33a细胞, Siha细胞中RRM2蛋白表达增强。C33a、Siha和HcvEpC细胞中RRM2 mRNA表达分别为0.94 ± 0.08、2.18 ± 0.15、0.12 ± 0.01,各细胞间差异有统计学意义( $P = 0.0089, n = 5$ )。以上结果说明,相对于HCvEpC细胞, RRM2在宫颈癌细胞中高表达,且宫颈癌细胞对Gem的敏感性可能与RRM2表达呈负相关。各细胞中RRM2蛋白表达的电泳图见图2A。



图2 各细胞中RRM2蛋白表达的电泳图

A. C33a, Siha 及 HCvEpC 细胞; B. Siha 与 Siha/Gem 细胞

Fig 2 Electrophoretogram of RRM2 in each group

A. C33a, Siha and HCvEpC cell; B. Siha and Siha/Gem cell

### 3.3 Siha/Gem 耐药细胞的鉴定及其对 RRM2 表达的影响

成功制得 Siha/Gem 耐药细胞, Gem 对其的  $IC_{50}$  为  $(273.14 \pm 24.67) \mu\text{mol/L}$ , RI 为 16.26。与 Siha 细胞比较, Siha/Gem 耐药细胞中 RRM2 蛋白表达增强。Siha 细胞和 Siha/Gem 耐药细胞中 RRM2 mRNA 表达分别为  $2.06 \pm 0.11$ 、 $6.98 \pm 0.43$ , 二者差异有统计学意义 ( $P < 0.0001$ ,  $n = 5$ )。以上结果提示, 宫颈癌细胞对 Gem 的继发耐药可能与 RRM2 基因的表达相关。Siha 与 Siha/Gem 耐药细胞中 RRM2 蛋白表达见图 2B。

### 3.4 RRM2 在 Siha/Gem 耐药细胞中的敲低效果

si-RRM2 处理后 Siha/Gem 耐药细胞中 RRM2 蛋白表达降低。si-RRM2 处理前、后 Siha/Gem 耐药细胞中 RRM2 mRNA 表达分别为  $6.76 \pm 0.48$ 、 $1.41 \pm 0.13$ , 二者差异有统计学意义 ( $P = 0.0005$ ,  $n = 5$ )。以上结果说明, 成功敲低了 Siha/Gem 耐药细胞中 RRM2 表达。

### 3.5 敲低 RRM2 表达前后 Siha/Gem 耐药细胞与 Gem 敏感性的变化

与空白对照组和阴性对照组比较, 试验组 Siha/Gem 耐药细胞与 Gem 的敏感性增强。试验组 Siha/Gem 耐药细胞对 Gem 敏感性的逆转倍数为 4.84, 表明敲低 RRM2 表达可以增加宫颈癌细胞对吉西他滨的敏感性, 从而逆转 Siha/Gem 耐药细胞对 Gem 的耐药。Gem 作用下各组细胞的生长曲线见图 3, Gem 对各组细胞的  $IC_{50}$  和逆转倍数见表 1。

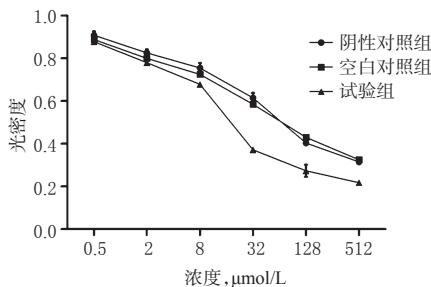


图3 Gem 作用下各组细胞的生长曲线

Fig 3 Survival curves of Siha/Gem cells treated with Gem in each group

表1 Gem 对各组细胞的  $IC_{50}$  和逆转倍数

Tab 1  $IC_{50}$  and reversal index of Siha/Gem cells treated with Gem in each group

组别	$IC_{50}$ , $\mu\text{mol/L}$	逆转倍数
空白对照组	$273.14 \pm 24.67$	4.84
阴性对照组	$253.85 \pm 20.89$	
试验组	$56.48 \pm 6.26$	

## 4 讨论

Gem 作为一种强力的 RR 抑制剂, 被广泛用于治疗非小细胞肺癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌及头颈癌等实体瘤。

Gem 化合物在体内代谢产生 5'-二磷酸 (dFdCDP) 及 5'-三磷酸 (dFdCTP) 核苷。dFdCDP 通过与 RRM1 结合, 从而抑制 RR 酶的活性; 同时代谢生成的 dFdCTP 与正常的 dCTP 竞争性渗入正在复制的 DNA 中, 导致 DNA 合成终止<sup>[8]</sup>。

本研究先采用 Western blot 法和逆转录-PCR 技术检测了宫颈癌细胞系 C33a、Siha 细胞中 RRM2 蛋白和 mRNA 表达, 并比较其与 Gem 的敏感性。结果发现 Siha 对 Gem 相对耐受, 同时 RRM2 表达相对较高, 因此笔者推测宫颈癌细胞系 RRM2 表达与细胞对 Gem 的敏感性呈负相关。为了进一步探讨其关系, 笔者选取了对 Gem 相对耐受的 Siha 细胞进行下一步试验。采用药物大剂量冲击和逐渐增加剂量相结合的方法构建 Siha/Gem 耐药细胞, 随后通过检查耐药细胞与亲本细胞中 RRM2 蛋白和 mRNA 表达, 同时检测细胞与 Gem 的敏感性。结果发现, Siha/Gem 耐药细胞的 RRM2 蛋白和 mRNA 表达增强, 提示宫颈癌细胞系的 RRM2 表达增强可能是导致宫颈癌细胞对 Gem 继发耐药的因素。

为了验证这一猜想, 在 Siha/Gem 耐药细胞中通过 RNA 干扰技术敲低 RRM2 表达, 并检测细胞对 Gem 的敏感性。结果发现, RNA 干扰后 Siha/Gem 细胞的 RRM2 基因表达水平明显受到抑制, 同时 Siha/Gem 细胞对 Gem 的敏感性增加, 说明敲低 RRM2 表达可以逆转细胞对吉西他滨的耐药性, 这也进一步证实了 RRM2 基因表达与细胞对 Gem 的耐药性相关。未来笔者将继续探讨 RRM2 在宫颈癌 Gem 化疗中的作用机制, 在更多宫颈癌细胞系中进行验证, 为临床应用提供依据。

## 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2015, 65(1):5.
- [2] 邓雅静, 胡杰, 杜琳. 应用阴道镜筛查宫颈癌前病变的临床分析[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(12):116.
- [3] Potter J, Peitzmeier SM, Bernstein I, et al. Cervical cancer screening for patients on the female-to-male spectrum: a narrative review and guide for clinicians[J]. *J Gen Intern Med*, 2015, doi:10.1007/S11606-015-3462-8.
- [4] 彭葺, 赵纯全. 化疗药物在宫颈癌治疗中的应用及研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(12):1143.
- [5] Shao J, Liu X, Zhu L, et al. Targeting ribonucleotide reductase for cancer therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(12):1423.
- [6] Lai IL, Chou CC, Lai PT, et al. Targeting the Warburg effect with a novel glucose transporter inhibitor to overcome gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(10):2203.
- [7] Jin G, Zhao J, Qi H, et al. Gemcitabine and carboplatin demonstrate synergistic cytotoxicity in cervical cancer cells by inhibiting DNA synthesis and increasing cell apoptosis[J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6(4):1707.
- [8] Huang P, Chubb S, Hertel LW, et al. Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(22):6110.

(收稿日期: 2015-04-03 修回日期: 2015-08-31)

(编辑: 邹丽娟)