

引用本文:侯丽娟,王文文,翟建军,等.宫颈癌病人切除修复交叉互补基因1基因多态性与铂类超敏反应关系[J].安徽医药,2022,26(3):549-553.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.03.030.

◇临床医学◇



宫颈癌病人切除修复交叉互补基因1基因多态性与铂类超敏反应关系

侯丽娟,王文文,翟建军,孙燕

作者单位:首都医科大学附属北京同仁医院妇产科,北京100176

摘要: **目的** 探究宫颈癌病人切除修复交叉互补基因1(excision repair cross complement 1, ERCC1)基因多态性与铂类超敏反应关系及其危险因素。**方法** 选取2012年1月至2017年9月首都医科大学附属北京同仁医院收治的103例宫颈癌病人作为研究对象,均接受以铂类为基础的联合化疗,21 d为1个化疗周期,化疗1~2周期后,统计化疗效果,以此分为敏感组($n=71$)和耐药组($n=32$),统计两组ERCC1 rs11615位点基因型分布及logistic回归分析宫颈癌铂类化疗敏感性 with 临床病理参数的关系,比较不同ERCC1 rs11615位点基因型分布中位无进展生存期(PFS)。**结果** (1)敏感组ERCC1 rs11615位点CT基因型(64.79%)高于耐药组(18.75%),且携带ERCC1 rs11615位点CT基因型的宫颈癌病人化疗耐药的风险低于CC基因型($P<0.05$);(2)临床分期IV期、ERCC1 rs11615 CC基因型、有淋巴结转移、深间质浸润、低分化程度与宫颈癌铂类化疗敏感性密切相关($P<0.05$);(3)临床分期IV期($OR=3.95$)、ERCC1 rs11615 CC基因型($OR=4.31$)、有淋巴结转移($OR=3.98$)、深间质浸润($OR=6.82$)、低分化程度($OR=4.85$)是影响宫颈癌铂类化疗敏感性危险因素($P<0.05$);(4)log-rank分析显示,ERCC1 rs11615位点CC基因型的中位PFS(9.8个月)和CT基因型(10.9个月)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 宫颈癌病人铂类超敏反应与ERCC1 rs11615基因型、临床分期、淋巴结转移、分化程度等因素有关,建议临床重点观察上述指标,为宫颈癌铂类化疗超敏反应鉴别诊断提供指导依据。

关键词: 宫颈肿瘤; 切除修复交叉互补基因1基因多态性; 铂类超敏反应; CT基因型; CC基因型; 淋巴结转移; 间质浸润

Relationship between excision repair cross-complementation group 1 gene polymorphism and platinum hypersensitivity in patients with cervical cancer

HOU Lijuan, WANG Wenwen, ZHAI Jianjun, SUN Yan

Author Affiliation: Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100176, China

Abstract: **Objective** To explore the relationship between excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) gene polymorphisms and platinum hypersensitivity reaction and its risk factors in patients with cervical cancer. **Methods** A total of 103 cervical cancer patients admitted to Beijing Tongren Hospital, CMU from January 2012-September 2017 were selected as the research subjects. All patients received platinum-based combination chemotherapy in a 21-day cycle. After one to two cycles of chemotherapy, the effects of chemotherapy were calculated, and the patients were divided into a sensitive group ($n=71$) and a resistant group ($n=32$). The genotype distribution of ERCC1 rs11615 in the two groups was calculated, the relationship between platinum chemotherapy sensitivity and the clinical pathological parameters of cervical cancer was analyzed by logistic regression, and the median progression-free survival (PFS) of ERCC1 rs11615 locus genotype distribution was compared. **Results** (1) The CT genotype of the ERCC1 rs11615 locus in the sensitive group was 64.79% higher than that in the drug-resistant group (18.75%), and the risk of chemotherapy resistance in cervical cancer patients with the CT genotype of the ERCC1 rs11615 loci was lower than that in the CC genotype ($P<0.05$). (2) Clinical stage IV, ERCC1 rs11615 CC genotype, lymph node metastasis, deep interstitial invasion, and low degree of differentiation were closely related to the sensitivity of platinum-based chemotherapy to cervical cancer ($P<0.05$). (3) Clinical stage IV ($OR=3.95$), ERCC1 rs11615 CC genotype ($OR=4.31$), lymph node metastasis ($OR=3.98$), deep interstitial invasion ($OR=6.82$), and low degree of differentiation ($OR=4.85$) are risk factors affecting platinum chemotherapy sensitivity of cervical cancer ($P<0.05$). (4) Log-rank analysis showed that there was no significant difference in the median PFS (9.8 months) and CT genotype (10.9 months) of the CC genotype at ERCC1 rs11615 ($P>0.05$). **Conclusions** Platinum hypersensitivity in cervical cancer patients is related to the ERCC1 rs11615 genotype, clinical stage, lymph node metastasis, and degree of differentiation. It is recommended to observe the above indicators in clinical practice to provide guidance for the differential diagnosis of cervical cancer platinum-chemotherapy hypersensitivity.

Key words: Uterine cervical neoplasms; ERCC1 gene polymorphism; Platinum-based hypersensitivity; CT genotype; CC genotype; Lymph node metastasis; Interstitial invasion

多数宫颈癌病人确诊时病情已进展至晚期,单纯手术及放疗难以控制,需联合新辅助化疗^[1]。铂类是宫颈癌化疗中最基础药物,可结合癌细胞DNA碱基产生交联反应,干扰DNA复制,抑制肿瘤生长,然而仍有部分病人化疗不敏感,预后较差^[2-3]。近年研究发现,DNA损伤修复能力异常是铂类耐药重要分子基础^[4]。在人类细胞中,化疗药物及紫外线所致DNA损伤主要通过核苷酸剪切修复途径(nucleotide excision repair,NER)修复,而切除修复交叉互补基因1(excision repair cross complement 1,ERCC1)在NER途径中起着关键作用,如NER初期发挥DNA损伤识别功能,后期共同行使损害部位5'端切除功能^[5]。因此宫颈癌病人ERCC1基因多态性与铂类超敏反应关系的研究成为当前研究热点。本研究旨在宫颈癌病人分析ERCC1基因多态性与铂类超敏反应关系,明确铂类超敏反应危险因素,为临床确定合理化疗方案提供参考信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2012年1月至2017年9月首都医科大学附属北京同仁医院收治的103例宫颈癌病人作为研究对象,均经细胞病理学检查确诊。年龄(42.51±10.68)岁,范围为20~65岁。病人或其近亲属知晓并签署知情同意书,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法 所有病人化疗前后均接受肝肾功能、外周血细胞、心电图等常规检查。35例接受PBF方案,d1~d5,静脉滴注20 mg/m²顺铂,肌肉注射500 mg/m²5-氟尿嘧啶,d1、d5,肌肉注射博来霉素7 mg/m²;33例接受PMF方案:d1~d5,静脉滴注0.75~1.00 g/m²5-氟尿嘧啶,d1,静脉滴注6~8 mg/m²丝裂霉素,d1~d3,静脉滴注40 mg顺铂;38例接受PVB方案:d1、d2,静脉滴注40 mg顺铂,d1,静脉滴注30 mg长春新碱,d2,静脉滴注博来霉素30 mg;21 d为1个化疗周期,连续化疗1~2个周期后评估,化疗有效且分期较晚者,建议放疗;化疗有效且分期较早者行盆腔淋巴结及根治性子宫切除术,若术后病理结果显示切缘阳性、低分化癌、淋巴结转移等高危因素,给予以放疗为主的辅助治疗。

化疗后切除或活检肿瘤组织,-80℃超低温冰箱内保存待测。(1)DNA提取:取血液标本200 μL置于离心管,滴加蛋白酶K溶液20 μL、缓冲液20 μL,充分混合均匀,56℃放置15 min,直至溶液清亮;滴加无水乙醇200 μL,振荡混匀,倒入硅胶离心柱,离

心30 s,倒掉废液,将硅胶离心柱放回收集管;于硅胶离心柱滴加缓冲液500 μL,离心30 s,倒掉废液,将硅胶离心柱放回收集管;于硅胶离心柱滴加漂洗液500 μL,离心30 s,倒掉废液,将硅胶离心柱放回收集管,离心2 min,倒掉废液,室温下放置数分钟,晾干吸附材料中残余漂洗液;将硅胶离心柱转入干净离心管,滴加洗脱缓冲液100 μL,室温放置15 min,离心2 min,离心管收集溶液。(2)聚合酶链式反应(PCR):反应体系为2×Taq MasterMix 12.5 μL,引物2 μL,DNA模板2 μL,双蒸水8.5 μL,总体积25 μL;引物序列:ERCC1 Asn118Asn(rs11615)正向引物5'-CGGGGACCCTTTAGGAAAG-3',反向引物5'-GGCTTCTCATAGAACAGTCC-3';PCR循环参数:ERCC1 rs11615:94℃预变性3 min,94℃30 s,62℃36 s,72℃50 s,共40个循环,72℃延伸5 min,扩增产物4℃保存;限制性内切酶消化体系为PCR产物10 μL,限制性内切酶1 μL,双蒸水7 μL,缓冲液2 μL,总体积20 μL,取含ERCC1 s11615的PCR产物10 μL与限制性核酸内切酶*BsrDI* 1 μL、双蒸水7 μL、1×反应缓冲液1.8 μL、乙酰胺0.2 μL,65℃消化16 h,4℃保存;(3)琼脂糖凝胶电泳:于烧瓶中加入0.75 g琼脂糖+25 mL 1×Tris 硼酸电泳缓冲液,微波炉中火加热至沸腾,倒入已置好梳子的胶膜中,37℃放置1 h;待胶凝固后,于电泳前后槽加入1×Tris 硼酸电泳缓冲液及玻璃板,缓慢拔出梳板,调节缓冲液面,即缓冲液面高于胶面,前槽水面略高于后槽,确保缓冲液进入所有加样孔;吸取酶切产物10 μL,保证吸管垂直加样孔,缓缓注入DNA样品;加样成功后,设定电压(120 mV)及时间(25 min),正确接通电泳槽及电源;(4)基因分型:酶切产物经3%琼脂糖凝胶电泳分型,野生纯合子型:两个碱基突变,无酶切位点,仅有最长片段,电泳图仅有一条条带;突变纯合子型:两个碱基无突变,有酶切位点,形成两条条带;杂合子型:一个碱基突变,无酶切位点,形成最长片段,另一个碱基无突变,有酶切位点,形成两个小片段,电泳图显示3条条带。

参照世界卫生组织(WHO)抗肿瘤药物客观疗效判定标准评估,包含完全缓解、部分缓解、稳定、进展等4个等级^[6],其中完全缓解与部分缓解属于治疗有效,归入敏感组,稳定和进展属于治疗无效,归入耐药组。

1.3 观察指标 (1)两组ERCC1 rs11615多态位点基因型分布。(2)影响宫颈癌铂类化疗敏感性的单

因素分析。(3)影响宫颈癌铂类化疗敏感性的多因素分析。(4)随访24个月,不同ERCC1 rs11615多态位点基因型分布中位无进展生存期(PFS)。

1.4 统计学方法 通过SPSS 22.0处理数据,计数资料以百分数表示,行 χ^2 检验;采用logistic回归模型分析宫颈癌铂类化疗敏感性的影响因素;采用Kaplan-Meier法计算中位PFS,比较采用log-rank分析。 $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 ERCC1 rs11615 多态位点基因型分布 103例宫颈癌病人经连续化疗1~2周期后,20例为完全缓解,51例部分缓解,23例稳定,9例进展,总有效率为68.93%(71/103),根据化疗效果分为敏感组($n=71$)和耐药组($n=32$)。敏感组ERCC1 rs11615位点CT基因型高于耐药组,且携带ERCC1 rs11615位点CT基因型的宫颈癌病人化疗耐药的风险低于CC基因型($P<0.05$)。见表1。

表1 两组宫颈癌病人切除修复交叉互补基因1(ERCC1) rs11615位点基因型分布/例(%)

组别	例数	CT	CC	OR(95%CI)
敏感组	71	46(64.79)	25(35.21)	7.97(2.90~21.95)
耐药组	32	6(18.75)	26(81.25)	

2.2 影响宫颈癌铂类化疗敏感性的单因素分析 临床分期IV期、ERCC1 rs11615位点CC基因型、有淋巴结转移、深间质浸润、低分化程度与宫颈癌铂类化疗敏感性密切相关($P<0.05$)。见表2。

2.3 影响宫颈癌铂类化疗敏感性的多因素分析 以宫颈癌铂类化疗敏感性为因变量,以临床分期IV期、ERCC1 rs11615位点基因型、淋巴结转移、间质浸润、分化程度为自变量,纳入logistic回归分析模型,结果显示,临床分期IV期、ERCC1 rs11615位点CC基因型、有淋巴结转移、深间质浸润、低分化程度是影响宫颈癌铂类化疗敏感性危险因素($P<0.05$)。见表3,4。

2.4 不同 ERCC1 rs11615 位点基因分布中位 PFS 随访24个月,ERCC1基因rs11615位点CC基因型病人中位PFS为9.8个月,CT基因型病人中位

表2 影响宫颈癌铂类化疗敏感性的单因素分析/例(%)

因素	例数	化疗敏感性	χ^2 值	P值
年龄			0.36	0.55
≤35岁	56	40(71.43)		
>35岁	47	31(65.96)		
病理类型			1.04	0.31
鳞癌	60	39(65.00)		
腺癌	43	32(74.42)		
临床分期			16.13	0.00
Ⅲ期	59	50(84.75)		
Ⅳ期	44	21(47.73)		
ERCC1 rs11615位点基因分布			18.70	0.00
CT	52	46(88.46)		
CC	51	25(49.02)		
化疗方案			4.33	0.12
PBF	35	23(65.71)		
PMF	30	25(83.33)		
PVB	38	23(60.53)		
分化程度			11.82	0.00
低分化	17	6(35.30)		
中分化	50	40(80.00)		
高分化	36	25(69.44)		
淋巴结转移			4.62	0.03
有	36	20(55.56)		
无	67	51(76.12)		
间质浸润			6.21	0.01
深	31	16(51.61)		
浅	72	55(76.39)		

注:ERCC1为切除修复交叉互补基因1,PBF为顺铂+5-氟尿嘧啶+博来霉素,PMF为5-氟尿嘧啶+丝裂霉素+顺铂,PVB为顺铂+长春新碱+博来霉素。

表3 宫颈癌铂类化疗敏感性影响因素赋值

因素	赋值说明
临床分期	Ⅳ期=0,Ⅲ期=1
ERCC1 rs11615位点	CC基因型=0,CT基因型=1
淋巴结转移	有=0,无=1
间质浸润	深=0,浅=1
分化程度	低分化=0,中/高分化=1

注:ERCC1为切除修复交叉互补基因1。

PFS为10.9个月,log-rank分析差异无统计学意义($P=0.76$)。见图1。

表4 影响宫颈癌铂类化疗敏感性的多因素分析

因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI
临床分期IV期	1.37	0.33	16.83	0.00	3.95	1.45~10.74
ERCC1 rs11615位点CC基因型	1.46	0.37	15.48	0.00	4.31	2.16~8.61
有淋巴结转移	1.38	0.29	22.80	0.00	3.98	1.33~11.96
深间质浸润	1.92	0.34	31.52	0.00	6.82	3.78~12.30
低分化程度	1.58	0.47	11.06	0.00	4.85	2.26~10.41

注:ERCC1为切除修复交叉互补基因1。

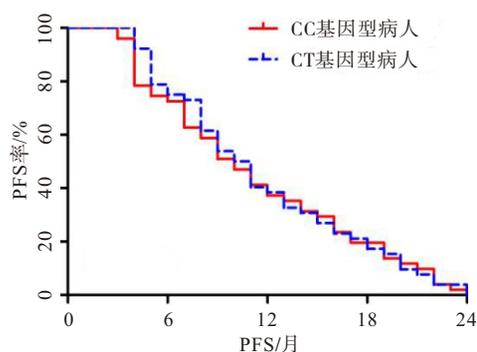


图1 不同切除修复交叉互补基因1(ERCC1)基因分布中位无进展生存期(PFS)

3 讨论

在中国,宫颈癌每年新发病例14万,约占全球宫颈癌新发病例28.8%,且呈年轻化趋势进展,因此治疗方面已由经典手术、放疗演变为以放化疗、手术为主的综合治疗^[7-9]。新辅助化疗已被证实是行之有效手段,其中铂类药物为广谱抗癌药物,可通过形成DNA加合物,抑制肿瘤细胞RNA及蛋白质合成,诱导肿瘤细胞凋亡,减少宫旁浸润,增加手术彻底性机会,然而铂类化疗会引起DNA损伤,产生化疗耐药^[10-11]。

目前临床认为,机体对铂类药物耐受与DNA损伤修复、药物失活、药物蓄积等多种因素有关,DNA损伤修复可能是其中最重要因素^[12-13]。亦有学者指出,DNA修复基因过表达可改变DNA修复能力,导致肿瘤发生及化疗药物耐药^[14]。ERCC1基因是DNA损伤识别及修复重要组成部分,其单核苷酸多态性可能对宫颈癌病人铂类耐药及预后产生影响,虽然当前已有ERCC1基因rs11615位点C/T多态性与宫颈癌病人铂类超敏反应相关研究,但研究结果尚不统一,张龙等^[15]认为,ERCC1基因rs11615位点TT基因型能增加患宫颈癌患病风险,而CC、CT基因型与宫颈癌发生无明显关系。有研究指出,RCC1基因rs11615位点C/T基因型化疗敏感率高于C/C基因型,且携带C/T基因型化疗敏感性比C/C基因型增加4.48倍^[16]。分析两者产生差异原因可能与遗传背景、地区不同有关。本研究显示,敏感组ERCC1 rs11615位点CT基因型高于耐药组,且携带ERCC1 rs11615位点CT基因型的宫颈癌病人化疗耐药的的风险低于CC基因型($P<0.05$),故推测ERCC1基因可能作为评估宫颈癌病人铂类超敏反应指标,为宫颈癌新辅助化疗提供新思路。同时本研究中并未发现ERCC1 rs11615位点TT基因型,考虑为样本量偏少所致,仍需在扩大样本量基础上继续研究。

本研究还发现,临床分期Ⅳ期、ERCC1 rs11615 CC基因型、有淋巴结转移、深间质浸润、低分化程度

是影响宫颈癌铂类化疗敏感性危险因素($P<0.05$)。既往研究指出,淋巴结转移是影响乳腺癌、宫颈癌等恶性肿瘤预后重要因素,淋巴结转移数目越多,预后相对愈差,转移数目越少,预后相对愈好^[17]。分化程度越低,提示淋巴结转移发生率越高,病情越严重,治疗效果越差,越容易产生耐药。而临床分期越低提示病情尚处于较早阶段,接受以铂类为基础的联合化疗方案治疗后效果更加明显,预后越好。同时ERCC1 rs11615 CC基因型是影响宫颈癌铂类化疗敏感性的又一危险因素,亦从侧面说明鉴别诊断ERCC1基因型分布是临床评估宫颈癌铂类化疗敏感性的重要指标。此外,梁军等^[18]研究发现,ERCC1及XRCC1基因多态性与中国晚期大肠癌病人接受奥沙利铂一线化疗后生存期有关。有学者指出,晚期非小细胞肺癌病人ERCC1基因型与中位PFS无显著相关性^[19-20]。在此基础上,本研究比较宫颈癌病人不同ERCC1 rs11615位点基因分布中位PFS,结果发现,ERCC1 rs11615多态位点CC、CT基因型的中位PFS比较,差异无统计学意义,与上述研究结果存在一定差异,分析原因可能与肿瘤类型、ERCC1基因位点及随访时间有关。同时受研究性质局限,铂类药物出现耐药后处理方案并不统一,且病例数较少,无法进行系统评估,尚需严格长期随访,以便更好了解铂类药物超敏反应对宫颈癌病人预后的影响。

综上,宫颈癌病人铂类超敏反应与ERCC1 rs11615基因型、临床分期、淋巴结转移、分化程度等因素有关,建议临床重点观察上述指标,为宫颈癌铂类化疗超敏反应鉴别诊断提供指导依据。

参考文献

- [1] 王慧,耿玲,刘慧源,等.微RNA5565p通过靶基因EDN3调控宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(3):286-292.
- [2] MASADAH R, RAUF S, PRATAMA MY, et al. The Role of microRNAs in the cisplatin- and radio-resistance of cervical cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(5):1168.
- [3] 黄肖肖,李燕华.铂类敏感型复发性卵巢癌治疗的研究进展[J].安徽医药,2019,23(6):1069-1073.
- [4] 关露露,赵青芳,陈小兵.胃癌多药耐药研究进展[J].肿瘤研究与临床,2017,29(6):422-425.
- [5] BAO Y, YANG B, ZHAO J, et al. Role of common ERCC1 polymorphisms in cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer patients: a study in chinese cohort [J]. *Int J Immunogenet*, 2020, 47(5):443-453.
- [6] 宋丹,孔为民,韩超,等.ATP-TCA,常见耐药蛋白表达与I B3-II B期宫颈癌新辅助化疗疗效的关系[J].临床肿瘤学杂志,2020,25(7):619-624.
- [7] 蓝家富.防城港市2292例女性宫颈HPV感染与基因分型分析

- [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 204-208.
- [8] BENSON R, PATHY S, KUMAR L, et al. Locally advanced cervical cancer - neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemoradiation and targeted therapy as maintenance: a phase II study[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(6): 1359-1364.
- [9] 胡敏. 宫颈病变382例高危人乳头瘤病毒亚型分布及其与宫颈癌的相关性分析[J]. 安徽医药, 2020, 24(12): 2439-2442.
- [10] GE Y, ZHENG N, CHEN X, et al. Gmdtc chelating agent attenuates cisplatin-induced systemic toxicity without affecting antitumor efficacy[J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32(8): 1572-1582.
- [11] 彭敏, 王锡恩, 王幼辉. miR-3142在宫颈癌HeLa细胞生长及顺铂耐药中的作用机制[J]. 中华内分泌外科杂志, 2020, 14(6): 476-481.
- [12] LIU YC, CHANG PY, CHAO CC. CITED2 silencing sensitizes cancer cells to cisplatin by inhibiting p53 trans-activation and chromatin relaxation on the ERCC1 DNA repair gene[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(22): 10760-10781.
- [13] 叶鑫鑫, 王亚军. P-糖蛋白与宫颈癌顺铂化疗耐药关系及相关机制的研究进展[J]. 海南医学, 2021, 32(10): 1305-1309.
- [14] 刘孝荣, 马东礼, 文飞球. DNA修复系统与肿瘤发生和治疗关系的进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(3): 469-474.
- [15] 张龙, 宋建东, 刘丽学, 等. ERCC1和ERCC2基因多态性与宫颈癌易感性的相关性研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(8): 807-810.
- [16] 祁丽芳, 吕杰强, 朱雪琼, 等. ERCC1、XPD、XPC单核苷酸多态性与局部晚期宫颈癌新辅助化疗敏感性的相关性[J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(10): 724-729.
- [17] ZHANG W, OU J, LEI F, et al. C14ORF166 overexpression is associated with pelvic lymph node metastasis and poor prognosis in uterine cervical cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 369-379.
- [18] 梁军, 吕红英, 张克, 等. ERCC1和XRCC1基因多态性与接受奥沙利铂化疗晚期大肠癌患者生存期的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(18): 1068-1072.
- [19] 徐向勇, 许平, 王旭, 等. ERCC1基因多态性和蛋白表达与晚期非小细胞肺癌的TP化疗疗效关系的研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(9): 1233-1235.
- [20] 田丹, 李新, 尚学琴, 等. 长链非编码RNA UC001kfo表达水平与宫颈癌病人预后的相关性研究[J]. 安徽医药, 2019, 23(10): 1971-1974.

(收稿日期: 2020-02-02, 修回日期: 2022-01-06)

引用本文: 闫凡, 黄彩虹. 下调微小RNA-183表达对肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖凋亡的影响及机制[J]. 安徽医药, 2022, 26(3): 553-557. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.03.031.

◇ 临床医学 ◇



下调微小RNA-183表达对肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖凋亡的影响及机制

闫凡, 黄彩虹

作者单位: 榆林市第一医院小儿二科, 陕西 榆林 718000

通信作者: 黄彩虹, 女, 副主任医师, 研究方向为儿内科(哮喘、呼吸), Email: 501353198@qq.com

摘要: 目的 探讨下调微小RNA(miR)-183表达对肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖凋亡的影响及机制。方法 2018年12月至2019年7月, 体外培养SK-NEP-1细胞, 分为对照组(细胞正常培养)、抑制剂阴性对照组(Anti-NC组)(转染Anti-NC至SK-NEP-1细胞)、miR-183抑制剂组(Anti-miR-183组)(转染Anti-miR-183至SK-NEP-1细胞)、Anti-miR-183+小干扰RNA阴性序列(si-NC)组(共转染Anti-miR-183和si-NC至SK-NEP-1细胞)和Anti-miR-183+程序性细胞死亡4小干扰RNA(si-PDCD4)组(共转染Anti-miR-183和si-PDCD4至SK-NEP-1细胞), 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)测定miR-183, MTT法检测细胞增殖变化, 平板克隆实验检测细胞克隆能力, 流式细胞术测定细胞凋亡变化, 蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞中活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)和PDCD4蛋白水平。双荧光素酶报告基因实验验证miR-183与PDCD4的靶向关系。结果 Anti-miR-183组miR-183表达水平为(0.32±0.04), 显著低于Anti-NC组(0.98±0.11)($P<0.05$)。Anti-miR-183组细胞增殖活性为(0.20±0.02)、克隆形成数为(213.69±20.94)个, 均低于Anti-NC组[(0.40±0.03)、(312.87±22.28)个]($P<0.05$); Anti-miR-183组细胞凋亡率为(16.47±1.58)%、cleaved-caspase-3蛋白水平为(0.69±0.09), 均高于Anti-NC组[(2.36±0.32)%、(0.27±0.04)]($P<0.05$)。对照组与Anti-NC组各检测指标比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。PDCD4是miR-183的靶基因, 且Anti-miR-183组细胞中PDCD4蛋白水平为(0.89±0.07), 显著高于Anti-NC组(0.37±0.06)($P<0.05$)。Anti-miR-183+si-PDCD4组细胞增殖活性为(0.32±0.04), 克隆形成数为(286.47±20.65)个, PDCD4蛋白水平为(0.45±0.05), 均高于Anti-miR-183+si-NC组[(0.21±0.03)、(216.20±13.68)个, (0.86±0.09)]($P<0.05$); Anti-miR-183组细胞凋亡率为(10.79±1.28)%、cleaved-caspase-3蛋白水平为(0.30±0.03), 均低于Anti-miR-183+si-NC组[(17.93±1.64)%、(0.72±0.08)]($P<0.05$)。结论 下调miR-183通过靶向调控PDCD4抑制肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖并诱导凋亡。

关键词: 肾母细胞瘤; 微小RNA-183; 凋亡; 胱天蛋白酶-3; PDCD4