

卵巢癌细胞系 RMG- I Lewis(y)抗原含量变化 对其卡铂耐药性的影响*

赵 越^{1,2)} 林 蓓^{1)**} 郝莹莹¹⁾ 严丽梅¹⁾ 刘娟娟¹⁾ 朱连成¹⁾ 张淑兰¹⁾

(¹⁾中国医科大学附属盛京医院妇产科, 沈阳 110004; ²⁾大连医科大学附属二院妇产科, 大连 116021)

摘要 利用 Lewis(y)抗原稳定高表达细胞株 RMG- I -H, 研究细胞表面 Lewis(y)抗原含量变化与细胞对卡铂耐药性的关系。利用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定不同浓度卡铂作用后细胞系 RMG- I -H 及其对照组 RMG- I、RMG- I -C 的细胞生长抑制率(IR); 利用流式细胞仪(FCM)分析细胞凋亡, 同时检测药物作用后细胞的凋亡比率; 利用荧光染色法和透射电镜进一步观察细胞凋亡状态。结果表明, RMG- I -H 的半数抑制浓度(IC_{50})为(58.07 ± 2.42), 明显高于对照组 RMG- I (28.83 ± 3.57)和 RMG- I -C(25.71 ± 8.24)的 IC_{50} ($P < 0.01$), 后两者间无统计学差异($P > 0.05$), 流式细胞仪分析证实 3 组细胞均存在凋亡, 经 30 mg/L、60 mg/L 卡铂处理后细胞再进行流式细胞仪检测, RMG- I -H 的相对凋亡率分别为(20.43 ± 0.71)%和(38.11 ± 0.33)%, 为对照组的 49%~63%, 明显低于对照组($P < 0.05$), 2 个对照组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 荧光染色和透射电镜直接观察了细胞形态变化, 每个浓度组 RMG- I -H 的凋亡程度均低于 RMG- I 和 RMG- I -C。说明细胞表面 Lewis(y)抗原含量增加的同时, 卵巢癌细胞对卡铂的耐药性增强。

关键词 卵巢癌, Lewis(y)抗原, 卡铂, 耐药性

学科分类号 R737.31, R737.32

卵巢癌是目前死亡率最高的女性生殖器肿瘤, 化疗耐药性的产生是影响治疗效果的重要因素。我们在前期研究中发现, 卵巢癌细胞系 RMG- I 转染 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶($\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase, $\alpha 1, 2$ -FT)基因后, 细胞表面 Lewis(y)抗原含量增加, 细胞的恶性生物学行为增强, 同时对化疗药物 5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的耐药性明显增强^[1]。细胞表面 Lewis(y)抗原含量与卵巢癌细胞对铂类耐药性是否有关, 国内外尚未见文献报道, 而铂类又是目前卵巢癌化疗中应用最多的药物。本次实验, 以转染 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因后的 Lewis(y)抗原稳定高表达卵巢癌细胞株 RMG- I -H 及其对照组 RMG- I、RMG- I -C 作为体外实验模型, 检测其对卡铂耐药性, 为揭示卵巢癌耐药的原因提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂. 卡铂(山东齐鲁制药厂), DMEM、胎牛血清(Hyclone 公司), 胰蛋白酶、EDTA、MTT

(Amresco 公司), DMSO(Sigma 公司), Annexin-V-FITC/PI 试剂盒(晶美生物工程有限公司), G₄₁₈(GIBCO 公司)。

1.1.2 仪器. 流式细胞仪 FACSCalibur (Becton Dickinson 公司), 光吸收酶标仪 SUNRISE RC TS TC (TECAN 公司), 倒置荧光显微镜 IX71 (OLYMPUS 公司), 透射电镜 JEM-1200EX (JEOL 公司)。

1.1.3 细胞株及培养. RMG- I, RMG- I -C 和 RMG- I -H 由中国医科大学附属盛京医院妇产科教研室林蓓教授提供。RMG- I -H 和 RMG- I -C 分别为上皮性卵巢癌细胞株 RMG- I 稳定转染表达载体 pcDNA3.1(-)-HFUT-H(含 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因)

* 国家自然科学基金资助项目(30170980, 30571958), 辽宁省博士启动基金项目(001040), 辽宁省教育厅基金项目(05L492)和辽宁省自然科学基金项目(20052107)。

** 通讯联系人。

Tel: 024-83956387, E-mail: linbei88@hotmail.com

收稿日期: 2008-01-22, 接受日期: 2008-03-25

及空载体 pcDNA3.1 获得的细胞株. 设 RMG- I -H 为实验组, RMG- I 及 RMG- I -C 为对照组. 细胞在含 10%胎牛血清 DMEM 培养液中培养, 0.25% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 消化传代, 取指数生长期细胞用于实验.

1.2 方法

1.2.1 药物浓度设定. 实验药物浓度根据化疗药物血浆峰值和相关实验文献等比设定^[2,3]. 卡铂浓度定为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 mg/L.

1.2.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)检测. 取指数生长期细胞, 按每孔 3×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 常规培养 24 h. 实验组加入工作浓度卡铂, 每个浓度设 6 个平行孔, 同时设定阴性对照和空白对照, 培养 72 h. 于终止前 4 h, 每孔加入 20 μ l MTT (5 g/L), 继续培养. 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 水平震荡 10 min, 于 490 nm 波长处测各孔 A 值. 重复测量 3 次, 取平均值. 生长抑制率(IR) = $\{1 - [(实验孔 A 值 - 空白对照组平均 A 值) / 阴性对照组平均 A 值]\} \times 100\%$. 取 30 mg/L, 60 mg/L 两个浓度, 分别在 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 等 5 个时间点重复上述实验. 计算各时点 IR 值.

1.2.3 流式细胞仪(FCM)检测. 取指数生长期细胞接种于 25 cm^2 的培养瓶中, 接种浓度保证细胞在同一时间生长至约占底面积 1/3. 实验组加入卡铂, 使其终浓度分别为 30 mg/L、60 mg/L, 另设阴性对照组, 继续培养 72 h, 收集细胞. 按 Annexin-V-FICT/PI 试剂盒操作说明染色, 利用流式细胞仪进行检测. 细胞凋亡坏死率 = $(坏死细胞数 + 凋亡细胞数) / (总细胞数 - 机械坏死细胞数)$.

1.2.4 荧光染色法观察细胞凋亡形态. 取指数生长期细胞接种于 6 孔板, 其他操作同前, 培养 72 h. 弃上清, 4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入结合缓冲液 300 μ l, 避光加入 Annexin-V-FICT 5 μ l, 室温静置 15 min, 避光加入 PI 10 μ l, 轻摇, 荧光倒置显微镜($\times 400$)观察并照相.

1.2.5 透射电镜观察细胞凋亡形态. 取指数生长期细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中, 其他操作同前, 培养 72 h 收集细胞(每组约 1×10^6). 4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 吹打均匀后, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 4 $^{\circ}$ C 预冷 2.5%戊二醛 4 ml 固定 2 h, 4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 洗涤 3 次, 每次约 10 min, 1%四氧化锇在 4 $^{\circ}$ C 固定约 30 min, 4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 洗涤 3 次, 系列丙酮室温下脱水, 纯丙酮-EPON812 包埋, 修块, 制备超薄切片, 醋酸双氧铀及醋酸铅染色各 10 min, 水洗、晾

干后透射电镜($\times 6\ 000$)观察并照相.

1.2.6 数据分析和统计. 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析. 3 种细胞间的药物剂量与 IR 之间的关系用配对 *t* 检验分析; 同浓度药物剂量与 IR 之间的关系用两因素重复测定方差分析; 流式细胞术测得的相对凋亡比率用 χ^2 检验.

2 结 果

2.1 卡铂对 3 组细胞生长的影响

不同工作浓度的卡铂作用 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h, 3 组细胞的生长抑制率(IR)随着时间的延长和卡铂浓度的增加而升高. 但是 3 组细胞的 IR 有所不同, RMG- I -H 的半数抑制浓度(IC_{50})为 (58.07 ± 2.42) , 明显高于 RMG- I (28.83 ± 3.57) 和 RMG- I -C(25.71 ± 8.24)的 IC_{50} ($P < 0.01$), 而后两者间无统计学差异($P > 0.05$)(图 1). 选择与 IC_{50} 浓度相近的 30 mg/L、60 mg/L 两个浓度组检测不同时间点的 IR. IR 值随时间的变化趋势, RMG- I -H 与 RMG- I 和 RMG- I -C 均存在显著差异($P < 0.01$), 而后两组细胞间无统计学差异($P > 0.05$)(图 2 和表 1), 在半数抑制浓度范围内, 各时间点细胞耐药性的差别只与细胞种类有关.

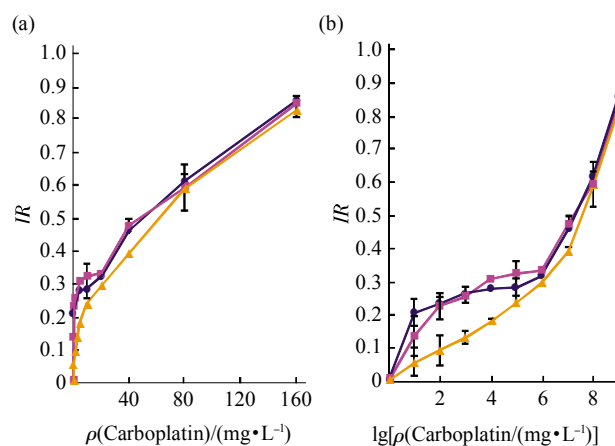


Fig. 1 Dose-effect relationship between carboplatin and three ovarian cancer cell lines

The IR of RMG- I -H was lower than that of RMG- I and RMG- I -C in the same carboplatin concentration (a) and log concentration (b). Δ — Δ : RMG- I -H; $\bullet$ — $\bullet$: RMG- I; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: RMG- I -C. The IC_{50} of the three cell lines were (58.07 ± 2.42) (RMG- I -H), (28.83 ± 3.57) (RMG- I) and (25.71 ± 8.24) (RMG- I -C). There was a significant statistical difference between RMG- I -H and the other two cell lines ($P < 0.01$). Respectively, *t* equals 18.301 and 9.224, *P* equals 5.102×10^{-9} and 3.314×10^{-6} . However, there was no statistical difference between the RMG- I and RMG- I -C ($P > 0.05$, *t* equals 1.300, *P* equals 0.223).

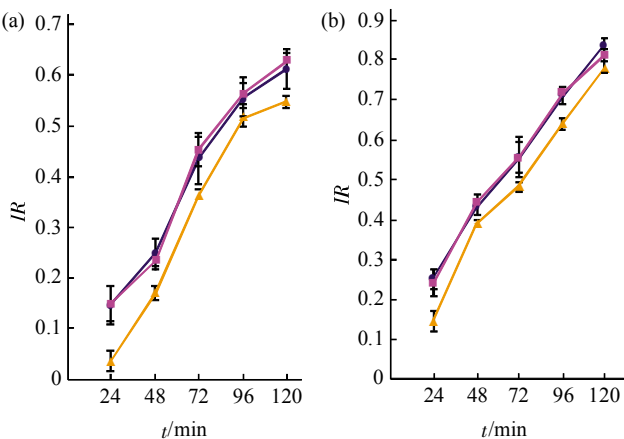


Fig. 2 Time-effect relationship between carboplatin and three ovarian cancer cell lines
The *IR* of RMG- I -H was lower than that of RMG- I and RMG- I -C in the same carboplatin concentration at the same time. The *IR* was higher while the cells were exposed longer in the same carboplatin concentration. (a) Carboplatin: 30 mg/L. (b) Carboplatin: 60 mg/L.
▲—▲: RMG- I -H; ●—●: RMG- I ; ■—■: RMG- I -C. The detailed statistical results were showed in Table 1.

Table 1 The <i>IR</i> at different time points					
$\rho(\text{Carboplatin})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Cell line	F^*	P^*	F^{**}	P^{**}
30	RMG- I -H	6.173	0.001	7.864	1.562×10^{-4}
	RMG- I -C	0.924	0.462		
	RMG- I				
60	RMG- I -H	4.932	0.001	10.301	1.778×10^{-5}
	RMG- I -C	2.452	0.066		
	RMG- I				

*Compared with RMG- I . **Compared with RMG- I -C. There was a significant statistical difference between RMG- I -H and the other two cell lines ($P < 0.01$) at the same carboplatin concentration. However, there was no statistical difference between the RMG- I and RMG- I -C ($P > 0.05$).

2.2 三组细胞凋亡率的变化

Annexin-V/PI 是流式细胞术常用的染色法，在流式细胞术双参数散点图中左下象限显示活细胞 (FITC-/PI-)，右上象限显示晚期凋亡和坏死细胞 (FITC+/PI+)，而右下象限显示早期凋亡细胞 (FITC+/PI-)，左上象限显示机械坏死细胞 (FITC-/PI+)(图 3)。

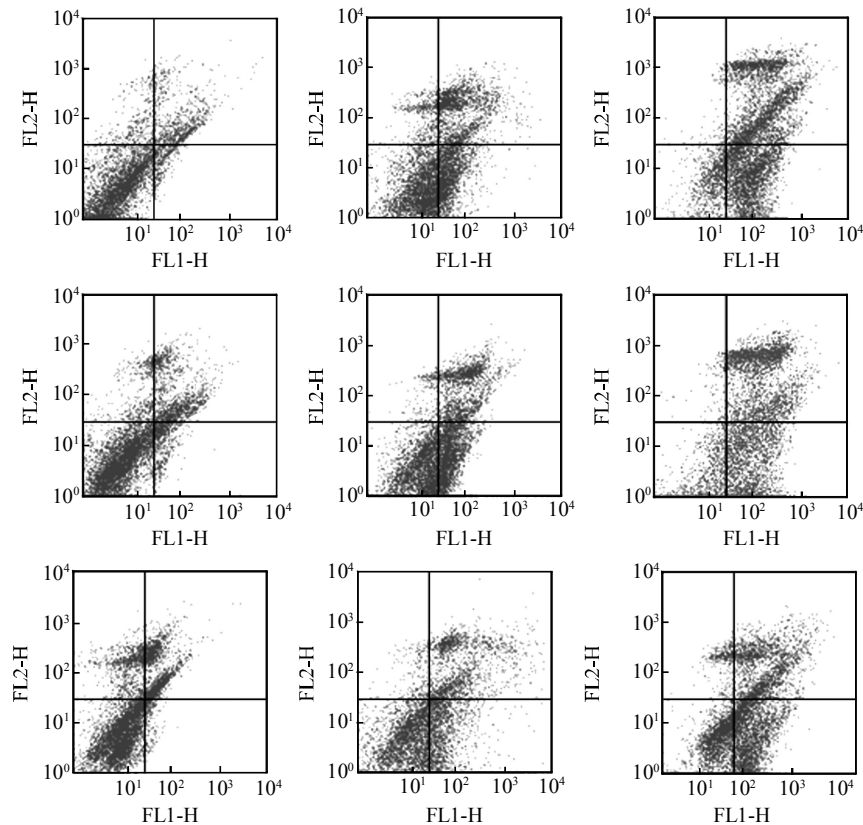


Fig. 3 Flow cytometric analysis of apoptosis
The diacylglyceryl-phosphorylserine (PS) could bind Annexin-V marked FICT on apoptotic and necrosis cell membrane, while mechanical necrosis cell membrane had not PS. As well as, PI could stain the degenerative caryotin when the cell membrane integrity was destroyed. In the spot map of the flow cytometry, the spots represented normal cells in left inferior quadrant (FITC-/PI-), the spots represented advanced apoptotic and necrosis cells in right superior quadrant (FITC+/PI+), the spots represented viable apoptotic cells in lower right quadrant (FITC+/PI-) and the spots represented mechanical necrosis cells in left superior quadrant (FITC-/PI+). The first line: RMG- I , the second line: RMG- I -C, the third line: RMG- I -H. The first array: control, the second array: 30 mg/L carboplatin, the third array: 60 mg/L carboplatin. The corr-apoptotic and necrosis ratio of RMG- I -H was lower than that of RMG- I and RMG- I -C in the same carboplatin concentration at the same time. There was a significant statistical difference ($P < 0.05$). However, there was no statistical difference between the RMG- I and RMG- I -C ($P > 0.05$). The detailed statistical results were showed in Table 2.

应用流式细胞仪检测 3 组细胞不同浓度卡铂处理后的细胞凋亡率, 每个样本计数 1×10^4 个细胞. 细胞相对凋亡坏死率 = 加药组细胞凋亡坏死率 - 阴性对照组细胞凋亡坏死率. 卡铂 30 mg/L, 60 mg/L 2 个浓度作用下, 实验组细胞 RMG- I -H 的相对凋

亡坏死率分别为 $(20.43 \pm 0.71)\%$ 及 $(38.11 \pm 0.33)\%$, 为对照组的 49%~63%, 明显低于对照组 ($P < 0.05$), 对照组 2 组 RMG- I 及 RMG- I -C 间的相对凋亡坏死率无明显差别 ($P > 0.05$) (表 2).

Table 2 The corr-apoptotic and necrosis ratios of three cell lines

$\rho(\text{Carboplatin})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Cell line	The ratio	t^*	P^*	t^{**}	P^{**}
30	RMG- I -H	20.43 ± 0.71	5.591	0.031	5.308	0.006
	RMG- I -C	34.80 ± 3.59	0.462	0.754		
	RMG- I	35.87 ± 3.84				
60	RMG- I -H	38.11 ± 0.33	4.734	0.018	4.428	0.011
	RMG- I -C	60.17 ± 6.64	0.494	0.648		
	RMG- I	63.37 ± 9.59				

*Compared with RMG- I. **Compared with RMG- I -C. There was a significant statistical difference between RMG- I -H and the other two cell lines ($P < 0.05$) at the same carboplatin concentration. However, there was no statistical difference between the RMG- I and RMG- I -C ($P > 0.05$).

2.3 凋亡细胞形态学观察结果

细胞未发生凋亡时, 呈椭圆形或多角形单层片状生长, 不着色. 当发生凋亡时, 细胞的细胞质浓缩, 体积变小, 细胞膜着绿色, 细胞核着红色, 细胞骨架解体, 可见细胞碎屑, 偶见凋亡小体. 相同浓度组 RMG- I -H 的凋亡和(或)坏死的细胞所占比

例低于 RMG- I 和 RMG- I -C; 且经 60 mg/L 卡铂作用后, RMG- I 和 RMG- I -C 的生长明显受到抑制. 由于绿色荧光呈色较弱, 大部分被反射光所掩盖, 图 4 中主要见凋亡细胞的细胞质回缩变圆, 与周围细胞间隙增宽.

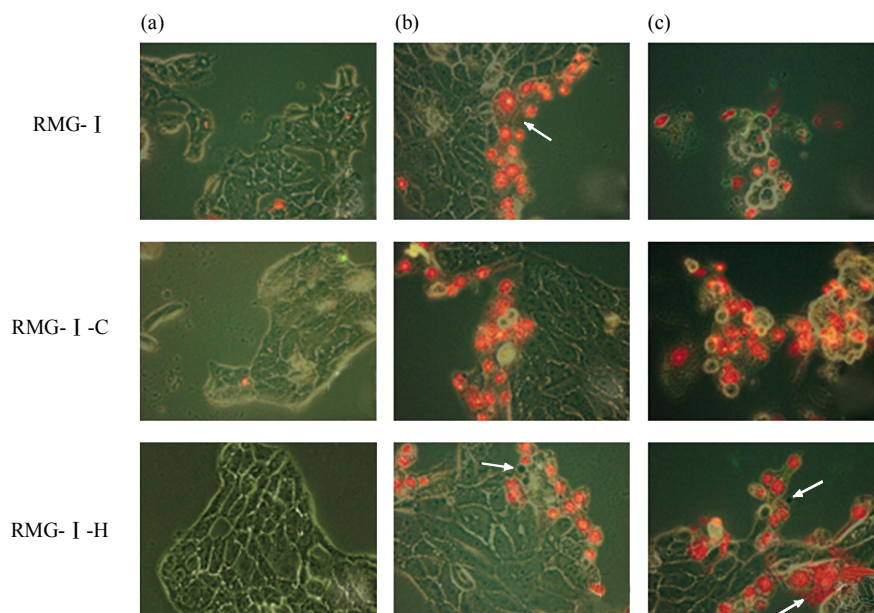


Fig. 4 Cell condition stained with Annexin-V-FICT/PI

The diacylglycerol-phosphorylserine (PS) could bind Annexin-V marked FICT on apoptotic and necrosis cell membrane, then the cell membrane was stained with green. PI could stain the degenerative caryotin when the cell membrane integrity was destroyed, then the cell nucleus was stained red. The corr-apoptotic and necrosis degree of RMG- I -H was lower than that of RMG- I and RMG- I -C in the same carboplatin concentration. However, there was no difference between the RMG- I and RMG- I -C. (a) Negative control group. (b) 30 mg/L carboplatin. (c) 60 mg/L carboplatin. The arrowhead represented apoptotic bodies. $\times 400$.

2.4 透射电镜观察细胞的形态

相同浓度组 RMG- I -H 的凋亡和(或)坏死的细胞明显少于 RMG- I 和 RMG- I -C, 且凋亡程度较低. 正常细胞边缘可见微绒毛, 细胞器结构完整, 细胞核形规整, 核膜清晰, 染色质分布均匀; 凋亡细胞体积变小皱缩, 边缘起泡出芽、膨出, 形成凋

亡小体. 凋亡程度较轻的细胞, 主要表现为细胞表面微绒毛消失; 随着凋亡程度的增加, 细胞器肿胀程度增加, 胞质中有空泡形成, 核内染色质浓缩程度增加, 呈团块状逐渐边集或中集, 形成境界分明的新月体形或团块状, 核膜间隙宽窄不一, 表面凹凸不平(图 5).

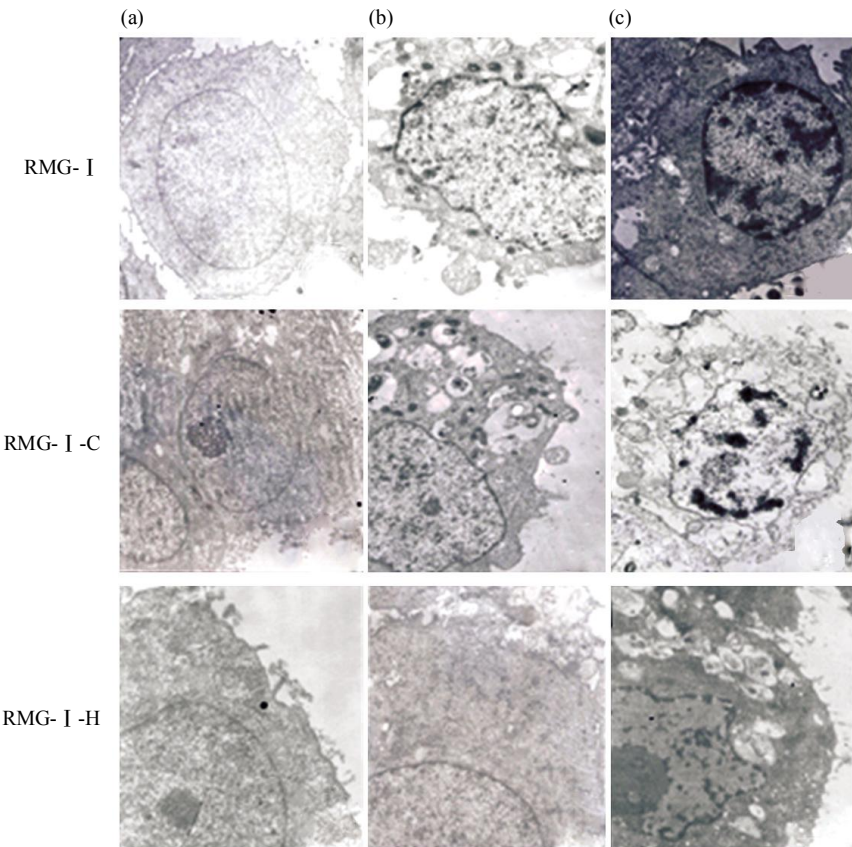


Fig. 5 The ultrastructural changes in three ovarian cell lines treated by carboplatin for 72 h
The apoptotic degree of RMG- I -H was lower than that of RMG- I and RMG- I -C in the same carboplatin concentration. However, there was no difference between the RMG- I and RMG- I -C. (a) Negative control group. (b) 30 mg/L carboplatin. (c) 60 mg/L carboplatin. (×6 000).

3 讨 论

卵巢癌为妇科常见恶性肿瘤之一, 死亡率居妇科恶性肿瘤首位. 主要原因之一是术后复发. 70% 患者在术后 2 年内复发, 5 年生存率仅为 20%~30%. 肿瘤对化疗药物的敏感性及耐药性是决定术后复发的主要因素, 并与患者的预后显著相关. 所以明确耐药的原因将为卵巢癌化疗方案的选择提供理论依据, 最终提高患者的 5 年生存率.

Lewis(y)抗原存在于上皮组织中, 包括卵巢、胸腺、肺、胃及结肠等, 当这些组织发生癌变时, 60%~90%细胞表面 Lewis(y)抗原表达明显增高,

且增高的患者愈后不佳^[4~6]. 国外亦有研究证实正常卵巢组织中无 Lewis(y)抗原, 而 80%卵巢癌细胞表面却出现 Lewis(y)抗原, 且恶性程度越高, Lewis(y)抗原含量越高, 原发灶和转移灶中的含量无差别^[5,7]. 这在我们已完成的研究中也得到了证实(结果待发表). Lewis(y)抗原是一种卵巢癌相关抗原, 卵巢癌相关肿瘤标记物 CA-125 结构中也包含 Lewis(y)^[8]. 由于传统手术治疗和化疗无法明显提高卵巢癌患者的长期生存率, 以 Lewis(y)抗原为作用“靶点”研究新的治疗方法也已成为卵巢癌治疗研究中的热点^[9].

Lewis(y)抗原对肿瘤恶性生物学行为和耐药性

的影响及其机制, 目前国内外研究甚少. 2002 年, Yazawa 等^[10]利用人结肠癌 5-FU 耐药细胞系研究发现其 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖基化抗原 Lewis(y), Lewis(b) 和 H_2 含量的增加会提高其致癌性和抗肿瘤治疗的耐受性. 我们在前期研究中将 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因转染入卵巢癌细胞系 RMG- I 后, 细胞中 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖基转移酶活性增加了 20~30 倍^[1]. 转染后细胞株 RMG- I -H 的恶性生物学行为较转染前明显增强. 同时, 癌细胞对化疗药物 5-FU 的耐药性也增强. 然而, 细胞表面仅 Lewis(y) 抗原含量增加了约 10 倍, 且表达稳定; H_2 含量无明显变化, Lewis(b) 含量反而下降. 因此, Lewis(y) 抗原可能是转染后卵巢癌细胞株 RMG- I -H 对 5-FU 耐药性增强的原因. 目前卵巢癌化疗中最常使用的药物是铂类, 因此, 本实验同时引入转染空质粒的细胞株 RMG- I -C 作为阴性对照组, 检测 3 组细胞株对卡铂耐药性, 为揭示卵巢癌耐药的原因寻求理论依据. 结果表明: 转染后细胞株 RMG- I -H 对卡铂的耐药性明显高于 RMG- I 和 RMG- I -C ($P < 0.05$), 且卡铂主要引起卵巢癌细胞发生凋亡. 经卡铂 30 mg/L, 60 mg/L 两个浓度作用后, 实验组细胞株 RMG- I -H 的相对凋亡坏死率分别为 $(20.43 \pm 0.71)\%$ 及 $(38.11 \pm 0.33)\%$, 是对照组的 49%~63%, 明显低于对照组 ($P < 0.05$), 对照组 2 组细胞株 RMG- I 及 RMG- I -C 间的相对凋亡坏死率无明显差别 ($P > 0.05$). 3 组细胞株对卡铂耐药性的差别可能与细胞表面 Lewis(y) 抗原的含量不同有关, 卵巢癌细胞表面 Lewis(y) 抗原增加的同时对卡铂的耐药性增强.

卵巢癌对铂类耐药性的产生机制较复杂. 细胞膜上相关转运蛋白含量和(或)活性的改变可能是重要原因之一. 如 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)和肺耐药相关蛋白(LRP)等的过度表达及活性增强, 会导致癌细胞的耐药性增强. P-gp 是 N-连接聚糖糖蛋白, 由 MDR-1 基因编码, 聚糖成分是由各种糖基转移酶通过糖基化作用而形成, 具有多态性, 其主要功能是作为细胞膜的药物排出泵, 把进入细胞内的药物向细胞膜外转运, 降低细胞内的药物浓度, 从而导致肿瘤细胞的耐药性^[11]. 研究表明, 肿瘤细胞 P-gp 表达的改变与多种因素有关, 其中包括肿瘤细胞异常的糖基化作用所造成聚糖的变化. 这种异常的糖基化作用包括 P-gp 本身糖基化作用的改变以及细胞中其他物质糖基化作用的改变^[12, 13].

绝大多数的上皮性肿瘤细胞存在 Lewis(y) 抗原的过度表达, 而这可能会导致 Lewis(y) 抗原修饰细胞表面的受体结构, 国外有研究表明, Lewis 抗原高表达的肿瘤细胞表面的表皮生长因子受体(EGFR)中确实含有 Lewis(y) 抗原结构^[14]. EGFR 是细胞表面受体酪氨酸激酶, 在卵巢癌有高表达, 通过激活 PI3K 和 MAPK 途径导致蛋白激酶 B(PKB-Akt)和 MAPK 磷酸化, 进而磷酸化 BAD 和 Bcl-2, 抑制凋亡. 且多项研究表明, PI3K/Akt 和 ERK1/2/MAPK 途径的激活可诱导 MDR-1 基因扩增, 进而导致 P-gp 高表达, LY294002(PI3K 的特异性抑制剂)和 PD98059(p42/44MAPK 的特异性抑制剂)均可显著抑制 P-gp 高表达, 从而使癌细胞对抗癌药的敏感性增强^[15, 16]. 2004 年 Klinger 等^[17]发现, 抗 Lewis(y) 抗体 IGN311 和 ABL364 是通过抑制 EGFR 介导的信号转导通路中 Ras 的激活和 MAPK 的磷酸化, 促进肿瘤细胞的凋亡. 2005 年, Zhu 等^[18]通过体外实验研究证明, Lewis y/H 具有刺激血管生成的作用, LY294002(PI3K 的特异性抑制剂)和 AG490(JAK2 的特异性抑制剂)分别显著抑制了 Lewis y/H 介导的促进内皮细胞的生成, 推测 Lewis y/H 可能通过 PI3K 途径和 JAK2 途径上调 VEGF 的表达从而促进血管生成. 因此, 我们推测: a. 转染后的 RMG- I -H 细胞表面 Lewis(y) 抗原含量增加对其活性产生影响, 致使 RMG- I -H 细胞中的药物浓度下降, 从而增强细胞的耐药性. 当然, Lewis(y) 抗原含量的增加也可能影响到其他转运蛋白的功能, 从而影响细胞的耐药性. b. Lewis(y) 可能作为 EGFR 上的结构, 通过 Ras 和 MAPK 的途径促进细胞的增殖, 抑制细胞凋亡, 促进 P-gp 表达增加, 同时 Lewis(y) 还可能与细胞表面的其他某种受体在结构或功能上有联系, 通过 PI3K/JAK2 途径促进 VEGF 表达的同时, 直接或间接通过复杂的信号网络诱导 MDR-1 基因扩增, 使卵巢癌 RMG- I -H 细胞的耐药性增强.

CD₄₄ 是细胞表面含有 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖抗原结构的重要蛋白质之一, Goupille 等^[19]认为, CD₄₄ 中糖链的 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖基化可防止其被蛋白水解酶分解, 加强细胞间黏附, 抑制细胞凋亡进程. 从而, 有利于抗肿瘤药的清除和 DNA 修复. 我们的研究结果也表明, 转染后细胞株 RMG- I -H 的相对凋亡坏死率分别为对照组的 49%~63%, 明显低于对照组 ($P < 0.05$), 这与 Lewis(y) 抗原及 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶高表达可能相关.

Azuma 等^[20]的研究显示, 应用粒酶 B 引导人 T 细胞株凋亡的过程中, 在凋亡效应蛋白 Caspase-3 的作用下 $\alpha 1, 3$ - 岩藻糖转移酶和 $\alpha 1, 2$ - 岩藻糖转移酶含量增高, 致使细胞表面 Lewis(x)和 Lewis(y)抗原含量增加, Azuma 等推测 Lewis(x)和 Lewis(y)在细胞凋亡过程中可能有着重要的生物学意义. 其中, Lewis(x)正是 Lewis(y)合成的前体结构^[4]. 综合已有的研究和我们的实验结果, 我们大胆推测, 卵巢癌细胞在外界凋亡诱导因子的作用下启动凋亡程序的同时也激活了自身的抗凋亡机制, 而 Lewis(y)抗原含量增加上调了相关途径, 增强了卵巢癌细胞的抗凋亡活性, 这有可能是卵巢癌细胞产生耐药性的重要原因之一.

综上所述, 本实验结果表明, $\alpha 1, 2$ - 岩藻糖转移酶基因转染后卵巢癌细胞株对卡铂的耐药性明显增强, Lewis(y)抗原的增加可能是卵巢癌耐药性增强主要原因之一, 但其机制还有待于进一步研究.

参 考 文 献

- Iwamori M, Tanoka K, Kubushiro K, *et al.* Alterations in the glycolipid composition and cellular properties of ovarian carcinoma-derived RMG-1 cells on transfection of the $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase gene. *Cancer Sci*, 2005, **96**(1): 26~30
- 张琳, 孔维佳. 喉癌体外药物敏感实验对化疗指导性的研究. *临床耳鼻喉科杂志*, 2006, **20**(15): 711~713
Zhang L, Kong W J. *J Clin Otorhinolaryngol (China)*, 2006, **20**(15): 711~713
- 张建锋, 虞和君, 范顺武, 等. 顺铂联合卡铂对骨肉瘤细胞株毒性的实验研究. *浙江医学*, 2004, **26**(1): 3~8
Zhang J F, Yu H J, Fan S W, *et al.* *Zhejiang Medicine*, 2004, **26**(1): 3~8
- Madjd Z, Parsons T, Watson N F, *et al.* High expression of Lewis y/b antigens is associated with decreased survival in lymph node negative breast carcinomas. *Breast Cancer Res*, 2005, **7**(5): R780~787
- David C C, Cristina R B, Lynya I T, *et al.* Expression of CEA, Tag-72, and Lewis-Y antigen in primary and metastatic lesions of ovarian carcinoma. *Hum Pathol*, 2003, **34**(10): 1016~1021
- Xie X, Boysen M, Clausen O P, *et al.* Prognostic value of Le(y) and H antigens in oral tongue carcinomas. *Laryngoscope*, 1999, **109**(9): 1474~1480
- Zhu K, Zha Y Y. Mechanism by which H-2g, a glucose analog of blood group H antigen, mediates angiogenesis. *Blood*, 2005, **105**(6): 2343~2349
- Lloyd K O, Yin B W, Kudryashov Y V, *et al.* Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *Int J Cancer*, 1997, **71**(5): 842~850
- Sabbatini P J, Ragupathi G, Hood C, *et al.* Pilot study of a heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(14): 4170~4177
- Yazawa S, Nishimura T, Ide M, *et al.* Tumor-related expression of $\alpha 1, 2$ fucosylated antigens on colorectal carcinoma cells and its suppression by cell-mediated priming using sugar acceptors for $\alpha 1, 2$ fucosyltransferase. *Glycobiology*, 2002, **12**(9): 545~553
- Nakaichi M, Takeshita Y, Okuda M, *et al.* Expression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines. *J Vet Med Sci*, 2007, **69**(2): 111~115
- Kudo T, Naroaki H, Takahashi M, *et al.* N-glycan alteration are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 2007, **6**(32): 1~9
- Gouazé V, Yu J Y, Bleicher R J, *et al.* Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(5): 633~639
- Bsai A, Murthy U, Rodecd U, *et al.* Presence of tumor-associated antigens in epidermal growth factor receptors from different human carcinomas. *Cancer Res*, 1987, **47**(10): 2531~2536
- Fujita T, Washio K, Takabatake D, *et al.* Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Int J Cancer*, 2005, **117**(4): 670~682
- Chen B, Jin F, Lu P, *et al.* Effect of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway on multidrug resistance induced by vincristine in gastric cancer cell line MGC803. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(6): 795~799
- Klinger M, Farhan H, Just H, *et al.* Antibodies directed against Lewis-Y antigen inhibit signaling of Lewis-Y modified ErbB receptors. *Cancer Res*, 2004, **64**(3): 1087~1093
- Zhu K, Amin M A, Zha Y. Mechanism by which H-2g, a glucose analog of blood group H antigen, mediates angiogenesis. *Blood*, 2005, **105**(6): 2343~2349
- Goupille C, Marionneau S, *et al.* $\alpha 1, 2$ Fucosyltransferase increases resistance to apoptosis of rat colon carcinoma cells. *Glycobiology*, 2000, **10**(4): 375~382
- Azuma Y, Kurusu Y, Sato H, *et al.* Increased expression of Lewis X and Y antigens on the cell surface and FUT 4 mRNA during granzyme B-induced Jurkat cell apoptosis. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(4): 655~660

The Effects of Lewis(y) Antigenic Content on Drug Resistance to Carboplatin in Ovarian Cancer Line RMG- I *

ZHAO Yue^{1,2)}, LIN Bei^{1)**}, HAO Ying-Ying¹⁾, YAN Li-Mei¹⁾,
LIU Juan-Juan¹⁾, ZHU Lian-Cheng¹⁾, ZHANG Shu-Lan¹⁾

¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China;

²⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116021, China)

Abstract To investigate the relationship between the changes of Lewis (y) antigenic content and the drug resistance of the cells to carboplatin in ovarian cancer lines with RMG- I -H which expressed higher Lewis(y) antigen on cell surface stably. RMG- I was one kind of epithelial ovarian cancer cell lines. Cell lines RMG- I -C and RMG- I -H were obtained from RMG- I which were transfected with keno-plasmid and $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase gene, respectively. The method of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to determine the fractional inhibition ratio (*IR*) of the three cell lines which were affected by carboplatin in different concentrations. Accordingly, the *IC*₅₀ of the three cell lines could be calculated. Carboplatin induced apoptosis of three cell lines was observed by flow cytometry (FCM). In addition, the apoptotic ratios of the three lines that were treated by 30 mg/L and 60 mg/L carboplatin were measured by the FCM at the same time. And then, the apoptosis conditions of the three lines were observed by the methods of fluorescent staining and transmission electron microscope (TEM). The *IC*₅₀ of RMG- I -H was (58.07±2.42), which was obviously higher than that of RMG- I (28.83±3.57) and RMG- I -C(25.71±8.24), all showed a significant statistical difference ($P < 0.01$) and there was no statistical difference between the latter two ones($P > 0.05$). FCM analysis confirmed the cell apoptosis in the three lines. The corr-apoptotic ratios of RMG- I -H treated with 30 mg/L and 60 mg/L carboplatin were (20.43±0.71)% and (38.11±0.33)%, respectively, which were about 49%~63% of the RMG- I (35.87±3.84)%, (63.37±9.59)% and RMG- I -C(34.80±3.59)%, (60.17±6.64)%, both presented a statistical difference ($P < 0.05$). But there was no significant statistical difference between the latter two ones ($P > 0.05$). The apoptotic degree of RMG- I -H was lower than that of the other cell lines in the same carboplatin concentration with the method of inv-fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM). The drug resistance of ovarian cancer cells to carboplatin was stronger when the Lewis(y) antigenic contents on cell surface increased.

Key words ovarian cancer, Lewis(y) antigen, carboplatin, drug resistance

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30170980, 30571958), Liaoning Province Doctor Startup Fund (001040), The Educational Department Science foundation of Liaoning Province (05L492) and Liaoning Natural Science Foundation (20052107).

**Corresponding author.

Tel: 86-24-83956387, E-mail: linbei88@hotmail.com

Received: January 22, 2008 Accepted: March 25, 2008