

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.01.008

MLL3 基因对宫颈癌细胞放射敏感性和 DNA 损伤修复能力的影响 *

李 佩¹ 唐阳芳² 高 雪³ 程 柳¹ 刘 玉¹ 马素叶¹ 张 玮¹ 王金声⁴ 康 媛^{1Δ}

(1 陕西省第二人民医院妇产科 陕西 西安 710005; 2 西安医学院第一附属医院妇科 陕西 西安 710005;

3 西安市第四医院妇产科 陕西 西安 710004; 4 西安新长安妇产医院妇科 陕西 西安 710001)

摘要 目的:探究髓系/淋巴系或混合谱系白血病 3 基因(myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3, MLL3)对宫颈癌细胞生长、转移、放射敏感性的影响。方法:选择 60 例宫颈鳞癌患者的癌组织及配对癌旁组织,采用实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 MLL3 mRNA 水平。体外培养 SiHa 细胞,将其分为以下 5 组:Control 组(不转染)、NC-sh 组(转染阴性对照慢病毒)、MLL3-sh 组(转染 MLL3 shRNA 慢病毒)、NC-OE 组(转染阴性对照过表达慢病毒)和 MLL3-OE 组(转染 MLL3 过表达慢病毒)。进一步采用 2300EX 直线加速器 9 MeV β 射线照射细胞建立放射抵抗 SiHa 细胞(SiHaR),然后将其分为:NC-sh 组、MLL3-sh 组、8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组。NC-sh 组和 MLL3-sh 组细胞不照射,8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组细胞用 9 MeV β 射线照射 8 Gy。采用 MTT 法检测细胞增殖情况;Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡;Transwell 检测细胞侵袭能力;qRT-PCR 检测 MLL3、共济失调毛细血管扩张征突变基因(ATM)、ATM-Rad3 相关基因(ATR)、乳腺癌易感基因(BRCA1)和 RAD50 双链断裂修复蛋白(RAD50)的 mRNA 水平;Western blot 检测 MLL3、Bcl-2 相关 X 蛋白基因(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)、cleaved caspase 3、基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 和 γ -H2AX 的表达;免疫荧光染色检测 γ -H2AX 的表达。结果:与癌旁组织相比,宫颈鳞癌组织中的 MLL3 mRNA 水平显著降低($P<0.001$)。与 NC-sh 组比较,MLL3-sh 组 SiHa 细胞的 MLL3 mRNA 和蛋白相对表达量降低,细胞活力升高,细胞凋亡率、Bax 和 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量降低,Bcl-2 蛋白相对表达量升高,侵袭细胞数量、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。与 NC-OE 组比较,MLL3-OE 组 SiHa 细胞的 MLL3 mRNA 和蛋白相对表达量升高,细胞活力降低,细胞凋亡率、Bax 和 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量升高,Bcl-2 蛋白相对表达量降低,侵袭细胞数量、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量降低($P<0.05$)。与 SiHa 细胞相比,SiHaR 细胞中的 MLL3 mRNA 和蛋白相对表达量均升高($P<0.001$)。与 8 Gy+NC-sh 组比较,8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的细胞活力降低, γ -H2AX 的蛋白相对表达量和 γ -H2AX foci 数目升高,ATM、ATR、BRCA1 和 RAD50 的 mRNA 水平降低($P<0.05$)。结论:宫颈癌细胞 MLL3 的表达下调促进了其生长和转移,但降低 DNA 损伤修复能力,提高宫颈癌细胞的放射敏感性。

关键词: 宫颈癌;髓系/淋巴系或混合谱系白血病 3;生长;转移;放射敏感性;DNA 损伤修复

中图分类号:R-33;R737.33 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)01-46-08

Effects of MLL3 Gene on Radiosensitivity and DNA Damage Repair of Cervical Cancer Cells*

LI Pei¹, TANG Yang-fang², GAO Xue³, CHENG Liu¹, LIU Yu¹, MA Su-ye¹, ZHANG Wei¹,
WANG Jin-sheng⁴, KANG Yuan^{1Δ}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, The Second People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi, 710005, China;

2 Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710005, China;

3 Department of Obstetrics and Gynecology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

4 Department of Gynecology, Xi'an New Chang'an Maternity Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3 (MLL3) gene on the growth, metastasis, radiosensitivity and DNA damage repair of cervical cancer cells. **Methods:** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the level of MLL3 mRNA in 60 patients with cervical squamous cell carcinoma and their adjacent tissues. SiHa cells were cultured in vitro and divided into the following 5 groups: Control group (no transfection), NC-sh group (transfection of negative control shRNA lentivirus), MLL3-sh group (transfection of MLL3shRNA lentivirus), NC-OE group (transfection of negative control overexpression lentivirus) and MLL3-OE group (transfection of MLL3 overexpression lentivirus). Radio-resistant SiHa cells (SiHaR) were further established by using 2300EX linear accelerator 9 MeV β irradiation, and then divided into NC-sh group, MLL3-sh group, 8Gy+NC-sh group and 8Gy+MLL3-sh group. The cells in NC-sh group and MLL3-sh group were not irradiated, while the cells in

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2022SF-553)

作者简介:李佩(1978-),女,本科,副主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤,E-mail: LiPei78fc@163.com

Δ 通讯作者:康媛,女,硕士,副主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤,E-mail: 54915532@qq.com

(收稿日期:2023-07-17 接受日期:2023-08-13)

8Gy+NC-sh group and 8Gy+MLL3-sh group were irradiated with 9 MeV β rays for 8 Gy. Cell proliferation was detected by MTT method. Apoptosis was detected by AnnexinV-FITC/PI double staining. Cell invasion was detected by Transwell. The levels of MLL3, ataxia-telangiectasia mutated gene (ATM), ATM -Rad3-Related (ATR), breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) and RAD50 double strand break repair protein (RAD50) mRNA were detected by qRT-PCR. The expression of MLL3, B-cell lymphoma -2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved caspase3, matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP9 and γ -H2AX was detected by Western blot. The expression level of γ -H2AX was detected by immunofluorescence staining. **Results:** Compared with the adjacent tissues, the level of MLL3 mRNA in cervical squamous cell carcinoma decreased significantly ($P<0.001$). Compared with NC-sh group, the relative expression of MLL3 mRNA and protein decreased, the cell viability increased, the apoptosis rate, the relative expression of Bax and cleaved caspase3 protein decreased, the relative expression of Bcl-2 protein increased, the number of invasive cells and the relative expression of MMP2 and MMP9 protein of SiHa cells increased in MLL3-sh group ($P<0.05$). Compared with NC-OE group, the relative expression of MLL3 mRNA and protein increased, the cell viability decreased, the apoptosis rate, the relative expression of Bax and cleaved caspase3 protein increased, the relative expression of Bcl-2 protein decreased, the number of invasive cells and the relative expression of MMP2 and MMP9 protein of SiHa cells decreased in MLL3-OE group ($P<0.05$). Compared with SiHa cells, the relative expression of MLL3 mRNA and protein in SiHaR cells increased ($t=18.476, P<0.001$; $t=29.126, P<0.001$). Compared with 8Gy+NC-sh group, the cell viability decreased, the relative expression of γ -H2AX protein and the number of γ -H2AX foci increased, and the levels of ATM, ATR, BRCA1 and RAD50 mRNA of SiHaR cells decreased in 8Gy+MLL3-sh group ($P<0.05$). **Conclusion:** The downregulation of MLL3 expression promotes the growth and metastasis of cervical cancer cells, but reduces the ability of DNA damage repair and improves the radiosensitivity of cervical cancer cells.

Key words: Cervical cancer; Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3; Growth; Metastasis; Radiosensitivity; DNA damage repair

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)01-46-08

前言

宫颈癌(Cervical cancer, CC)是全世界妇女中第四常见的癌症^[1-3]。人类乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)感染是宫颈癌的主要危险因素^[1]。HPV疫苗和筛查项目的应用大大降低了宫颈癌的发病率^[4,5]。然而,宫颈癌在发展中国家仍然是女性癌症相关死亡的第二大常见原因^[6]。尽管早期宫颈癌可以采用手术或放射治疗,但复发或转移的宫颈癌仍然无法治愈,迫切需要新的治疗方法^[7]。

髓系/淋巴系或混合谱系白血病3(Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3, MLL3)又称赖氨酸甲基转移酶2C(Lysine methyltransferase 2C, KMT2C),是MLL家族的成员^[8,9,11],参与调节组蛋白甲基化修饰并参与转录共激活,可将组蛋白H3第4位赖氨酸(Lysine4 of histone3, H3K4)末端甲基化^[10]。研究表明小细胞肺癌中MLL3发生缺失突变,MLL3缺陷型小细胞肺癌表现为组蛋白和DNA低甲基化,MLL3通过组蛋白甲基化调节DNA甲基转移酶3A(DNA methyltransferase3A, DNMT3A)的表达进而影响小细胞肺癌的进展,DNMT3A的过表达抑制了MLL3缺陷型小细胞肺癌的转移^[8]。MLL3与多种癌症的进展有关,MLL3基因突变的前列腺癌患者的无病生存率更低^[12]。MLL3是急性髓系白血病、尿路上皮癌等癌症中的肿瘤抑制因子^[13,14]。多项研究报道MLL3在宫颈癌样本中发生缺失突变^[15-18]。然而,目前尚不清楚MLL3对宫颈癌进展的影响。DNA损伤是肿瘤放射治疗的基本原理,有研究显示MLL3在调控DNA损伤修复方面具有重要作用^[19,20]。基于此,本研究从细胞功能、放射敏感性和DNA损伤修复等不同角度探讨了MLL3在宫颈癌发生发展中的具体作用,旨在为宫颈癌的治疗

提供新分子靶标。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 标本收集 收集2020年1月至2022年6月陕西省第二人民医院妇产科确诊的60例宫颈鳞癌患者的癌组织(设为CC组)及配对癌旁组织(设为Normal组)样本,患者均为原发宫颈鳞癌,未接受任何治疗,临床资料完整。本研究获得陕西省第二人民医院医学伦理委员会的批准(伦批2019-LC-046),入组患者样本采集前均签署知情同意书。

1.1.2 实验细胞 人宫颈鳞癌细胞系SiHa(货号:HTB-35)购自美国ATCC。将SiHa细胞在含有10% FBS、1%双抗的DMEM培养基中培养,培养条件为37℃、5% CO₂。

1.1.3 实验材料 阴性对照shRNA慢病毒(NC-sh)、MLL3 shRNA慢病毒(MLL3-sh)、阴性对照过表达慢病毒(NC-OE)、MLL3过表达慢病毒(MLL3-OE)购自吉玛基因。DMEM培养基(货号:31600)、MTT试剂盒(货号:M1020)、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(货号:CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司。Transwell(8 μ m孔径购自货号:3422)购自美国Corning公司。RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号:RR047Q)和TB Green Premix Ex Taq II(货号:RR820B)购自日本Takara公司。Bax(货号:ab32503)、Bcl-2(货号:ab32124)、cleaved caspase 3一抗(货号:ab32042)、基质金属蛋白酶(MMP)2一抗(ab92536)、MMP9一抗(ab76003)、 γ -H2AX(货号:ab26350)、GAPDH一抗(货号:ab8245)、IgG H&L (Alexa Fluor® 594)二抗(货号:ab150080)、购自英国Abcam公司。MLL3一抗(货号:53641)、HRP标记的IgG二抗(货号:7074)购自美国Cell Sig-

naling Technology 公司。

1.1.4 实验仪器 ELX800 酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司。FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。NanoDrop 2000 超微量分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司。7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。2300EX 直线加速器购自美国瓦里安公司。

1.2 方法

1.2.1 SiHa 细胞分组和转染 将 SiHa 细胞分为 Control 组、NC-sh 组、MLL3-sh 组、NC-OE 组和 MLL3-OE 组。将 SiHa 细胞按照 2×10^5 个细胞 / 孔的密度接种于 6 孔板, 培养至 60% 汇合。Control 组细胞不进行转染。NC-sh 组、MLL3-sh 组、NC-OE 组和 MLL3-OE 组细胞使用 Lipofectamine 2000 试剂分别转染 NC-sh、MLL3-sh、NC-OE 和 MLL3-OE, 转染时间为 48 h。RT-qPCR 验证转染效率。

1.2.2 放射抵抗 SiHa 细胞的建立 参考文献^[21] 方法采用 2300EX 直线加速器 9 MeV β 射线照射细胞建立放射抵抗 SiHa 细胞。将 SiHa 细胞按 3×10^4 细胞 / 培养皿的密度接种到 60 mm 培养皿中。照射条件如下: 源靶距: 100 cm, 剂量率: 4 Gy/min。将对数生长期的 SiHa 细胞用胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 按照 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种于 25 cm^2 培养瓶中, 贴壁后依次用 9 MeV β 射线照射 2、4、6、8、10 Gy。每次照射后常规培养 2~3 代, 稳定生长后进行后续照射, 总剂量 30 Gy。将存活的放射抵抗 SiHa 细胞命名为 SiHaR 细胞。SiHaR 细胞不再进行照射, 传代 5 代后用于转染和后续实验。

1.2.3 SiHaR 细胞转染和分组处理 将 SiHaR 细胞分为 NC-sh 组、MLL3-sh 组、8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组, 使用 Lipofectamine 2000 试剂分别转染 NC-sh 和 MLL3-sh 48 h。转染后的 NC-sh 组和 MLL3-sh 组细胞不照射, 8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组细胞用 9 MeV β 射线照射 8 Gy。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 细胞按 5×10^3 个细胞 / 孔的密度接种到 96 孔板中培养 48 h。然后加入 10 μL MTT 培养 4 h。弃上清, 加入 Formazan 溶解液振荡 10 min, 酶标仪检测 490 nm 处光密度值(OD)。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡 胰酶消化细胞, 1000 rpm 离心 5 min。沉淀的细胞用 PBS 重悬, 离心弃上清。然后用 $1 \times$ 结合缓冲液重悬, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液与 5 μL Annexin V-FITC 室温避光孵育 5 min。然后加入 400 μL PBS 和 5 μL PI, 流式细胞仪上机检测。

1.2.6 Transwell 检测 SiHa 细胞侵袭 Transwell 上室底部首先用 50 μL Matrigel (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被。胰酶消化细胞, 无血清培养基重悬, 调整 SiHa 细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。然后在上室中加入 200 μL 细胞悬液。下室加入 800 μL 含 20% FBS 的培养液。孵育 48 h 后, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min。倒置显微镜下观察并计数细胞。

1.2.7 qRT-PCR 检测基因表达量 TRIzol 提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。然后使用 TB Green Premix Ex Taq II 在 PCR 仪上扩增, 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。引物序列见表 1。通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算基因相对表达量。GAPDH 作为内参基因。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Gene	Primer sequence
MLL3	F: 5'-CAGAACCGGGGTGTGTACAT-3'
	R: 5'-TTCAGCCACACAGTTAGGGG-3'
ATM	F: 5'-TGAAACCACTATCCAATGTGTG-3'
	R: 5'-CTTGAGCATCCCTTGTGTTCT-3'
ATR	F: 5'-TTCTGTGAGGGTGAAGATGATG-3'
	R: 5'-ATCCAGGCAGCGAACAAA-3'
BRCA1	F: 5'-AGTGTCCCATCTGTCTGGAGTT-3'
	R: 5'-GCCCTTTCTCTGGTTGAGA-3'
RAD50	F: 5'-AAAGTGCCAAAGTATGCCTGAC-3'
	R: 5'-TTCTCTTGTTCCTCCTGGTTGA-3'
GAPDH	F: 5'-GCCTGCTTACCACCTTCT-3'
	R: 5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3'

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达量 RIPA 裂解提取总蛋白, 将总蛋白在 10% SDS-PAGE 上电泳, 然后转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 将膜与 MLL3 (1:1000)、Bcl-2 相关 X 蛋白基因 (Bcl-2 associated X protein, Bax) (1:2000)、B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 基因 (B-cell lymphoma -2, Bcl-2) (1:2000)、cleaved caspase 3 (1:1000)、MMP2 (1:500)、MMP9 (1:500)、 γ -H2AX (1:1000) 和 GAPDH (1:1000) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后将膜与 HRP 标记的二抗 (1:1000) 室温孵育 2 h。ECL 显影。GAPDH 作为对照。ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.2.9 免疫荧光染色 将细胞接种于 24 孔板中的圆形盖玻片上, 根据分组情况用 9 MeV β 射线照射 8 Gy。处理后的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% Triton X-100 渗透 15 min。PBS 洗涤细胞, 用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 30 min。将抗 γ -H2AX 一抗 (1:500) 滴加到盖玻片上 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后将荧光二抗 (1:500) 滴加到盖玻片上在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。DAPI 染色 10 min, 共聚焦显微镜下计数 γ -H2AX foci 数目。

1.3 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件分析数据。宫颈鳞癌组织与配对的癌旁组织中的 MLL3 mRNA 水平比较采用配对 t 检验。SiHa 细胞和 SiHaR 细胞中的 MLL3 mRNA 和蛋白水平比较采用 t 检验。多组数据的整体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈鳞癌组织中 MLL3 mRNA 的水平

与癌旁组织相比, 宫颈鳞癌组织中的 MLL3 mRNA 水平降低 (P<0.001)。见图 1。

2.2 MLL3 对 SiHa 细胞增殖的影响

与 NC-sh 组比较, MLL3-sh 组 SiHa 细胞的 MLL3 mRNA 和蛋白相对表达量降低 (P<0.05); 与 NC-OE 组比较, MLL3-OE 组 SiHa 细胞的 MLL3 mRNA 和蛋白相对表达量升高 (P<0.05)。与 NC-sh 组比较, MLL3-sh 组 SiHa 细胞的相对细胞活力

升高($P<0.05$);与 NC-OE 组比较,MLL3-OE 组 SiHa 细胞的相对细胞活力降低($P<0.05$)。见图 2。

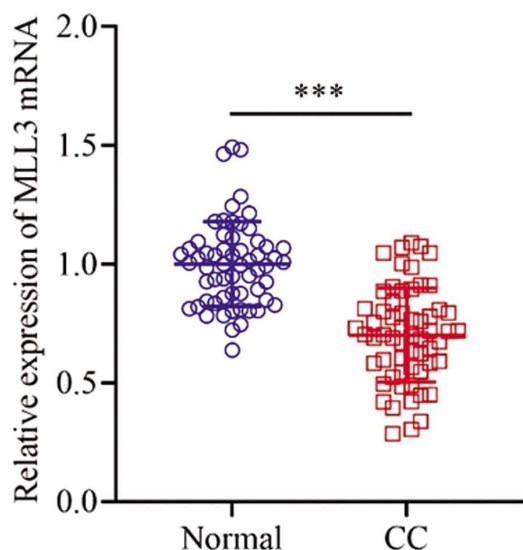


图 1 癌组织(CC 组)及癌旁组织(Normal 组)中 MLL3 mRNA 的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of MLL3 mRNA in cancer tissue (CC group) and paracancer tissue (Normal group)

Note: Compared with Normal group, *** $P<0.001$.

2.3 MLL3 对 SiHa 细胞凋亡的影响

与 NC-sh 组比较,MLL3-sh 组 SiHa 细胞的细胞凋亡率、Bax 和 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量降低,Bcl-2 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);与 NC-OE 组比较,MLL3-OE 组 SiHa 细胞的细胞凋亡率、Bax 和 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量升高,Bcl-2 蛋白相对表达量降低($P<0.05$)。见图 3 和图 4。

2.4 MLL3 对 SiHa 细胞侵袭的影响

与 NC-sh 组比较,MLL3-sh 组 SiHa 细胞的侵袭数量、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);与 NC-OE 组比较,MLL3-OE 组 SiHa 细胞的侵袭数量、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量降低($P<0.05$)。见图 5 和图 6。

2.5 MLL3 对 SiHaR 细胞放射敏感性的影响

与 SiHa 细胞相比,SiHaR 细胞中的 MLL3 mRNA 和蛋白相对表达量均升高($t=18.476, P<0.001$; $t=29.126, P<0.001$)。与 NC-sh 组比较,MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的相对细胞活力升高($P<0.05$);与 NC-sh 组和 MLL3-sh 组比较,8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的相对细胞活力降低($P<0.05$);与 8 Gy+NC-sh 组比较,8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的相对细胞活力降低($P<0.05$)。见图 7。

2.6 MLL3 对 SiHaR 细胞 DNA 损伤修复的影响

NC-sh 组和 MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的 γ -H2AX 的蛋白相对表达量和 γ -H2AX foci 数目差异无统计学意义($P>0.05$)。与 NC-sh 组和 MLL3-sh 组比较,8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的 γ -H2AX 的蛋白相对表达量和 γ -H2AX foci 数目升高($P<0.05$);与 8 Gy+NC-sh 组比较,8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的 γ -H2AX 的蛋白相对表达量和 γ -H2AX foci 数目升高($P<0.05$)。见图 8。

NC-sh 组和 MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的 ATM、ATR、BRCA1 和 RAD50 的 mRNA 相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。与 NC-sh 组和 MLL3-sh 组比较,8 Gy+NC-sh 组和 8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的 ATM、ATR、BRCA1 和 RAD50 的 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$);与 8 Gy+NC-sh 组比较,8 Gy+MLL3-sh 组 SiHaR 细胞的 ATM、ATR、BRCA1 和 RAD50 的 mRNA 相对表达量降低($P<0.05$)。见图 9。

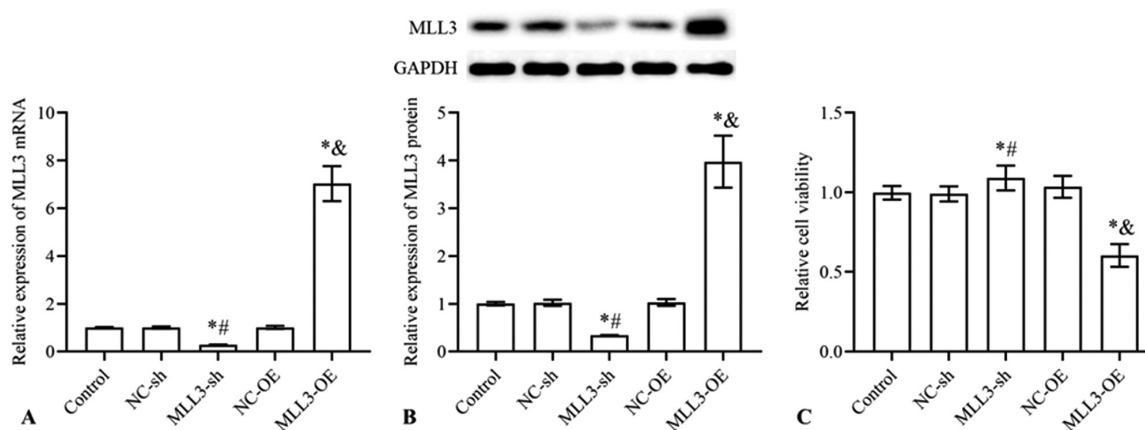


图 2 MLL3 对 SiHa 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of MLL3 on the cell viability of SiHa cells

Note: A and B: Relative expression levels of MLL3 mRNA and protein; C: Relative cell viability; Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with NC-sh group, # $P<0.05$; Compared with NC-OE group, & $P<0.05$.

3 讨论

染色质在转录、复制和 DNA 修复过程中通过组蛋白的翻译后修饰进行重塑。组蛋白甲基化与基因的转录活性以及癌症的发生发展密切相关^[22,23]。MLL3 可催化 H3K4 末端甲基化,主

要包括 H3K4 三甲基化(Trimethylation of lysine 4 on histone H3 protein subunit, H3K4me3)^[10]。H3K4me3 主要富集于活跃转录基因的启动子区域,为转录激活因子提供染色质结合位点,MLL3 表达水平降低与 H3K4me3 水平的降低有关^[24]。研究表明,MLL3 是宫颈鳞癌中的常见突变基因,MLL3 基因突变是高

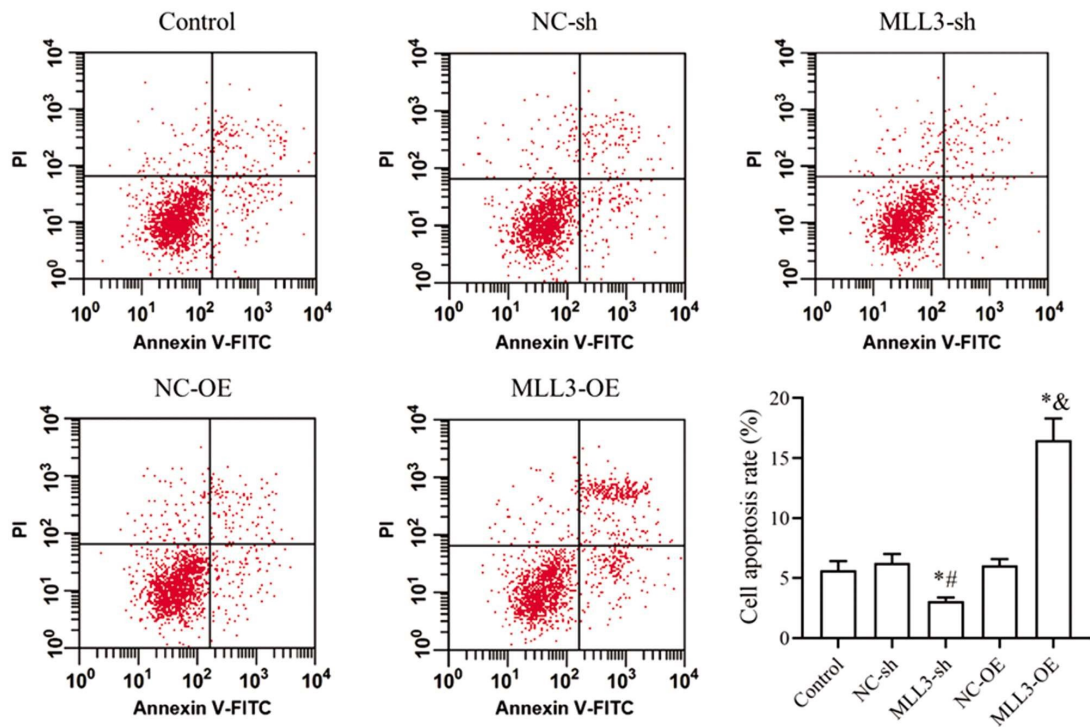


图3 MLL3 对 SiHa 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of MLL3 on the apoptosis of SiHa cells

Note: Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with NC-sh group, [#] $P < 0.05$; Compared with NC-OE group, [&] $P < 0.05$.

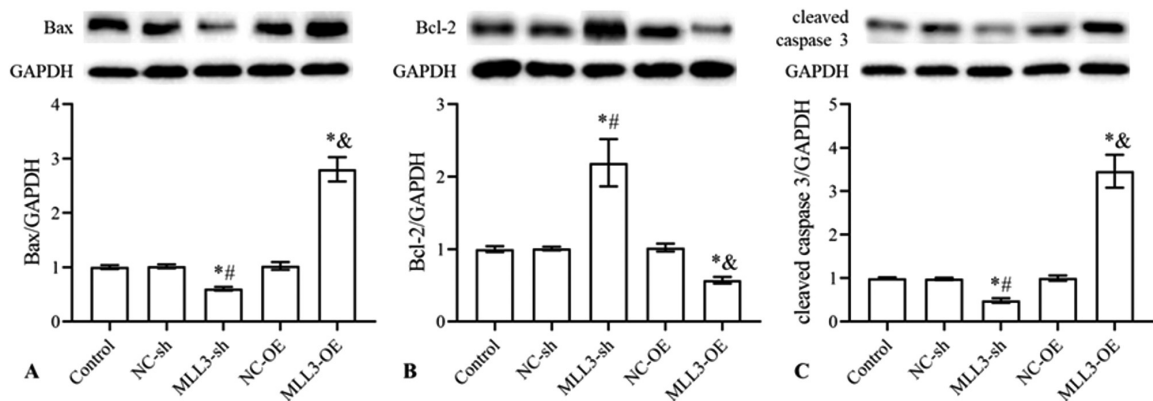


图4 MLL3 对 SiHa 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of MLL3 on apoptosis-related protein expression in SiHa cells

Note: A-C: Relative expression levels of Bax, Bcl-2 and cleaved caspase 3; Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$;

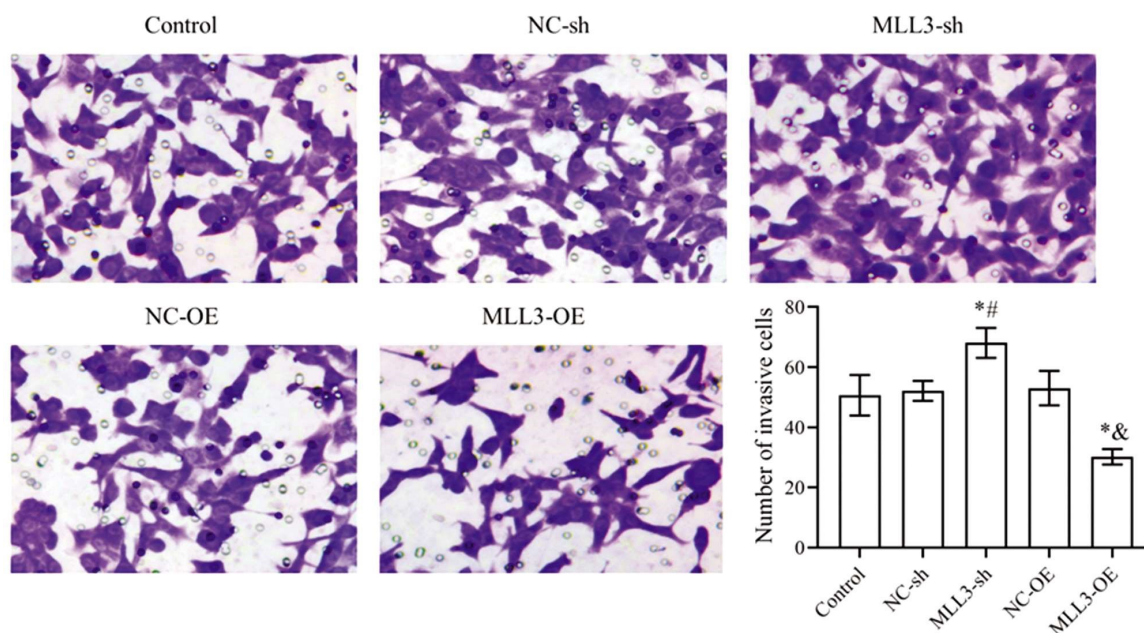
Compared with NC-sh group, [#] $P < 0.05$; Compared with NC-OE group, [&] $P < 0.05$.

肿瘤突变负荷的独立预测因素^[16]。编码 MLL3 的基因在 77.8% (7/9) 的宫颈癌样本中存在基因功能缺失突变^[15]。Femi 等人发现 309 例宫颈癌标本中 194 例有基因突变, 其中 23 例 (11.9%) 发生 MLL3 突变^[17]。Xu 等发现 284 例宫颈癌患者中 MLL3 突变率为 20%^[25]。Wen 等利用下一代测序技术分析了 618 个选定的基因在 129 例宫颈癌患者样本中的基因组变化, 并将中国患者与癌症基因组图谱 (The cancer genome atlas, TCGA) 数据库下载的西方患者的突变数据进行了比较, 结果显示 MLL3 是最常见的突变基因之一, 中国患者和 TCGA 患者中 MLL3 的突变率存在显著差异 (3.88% vs 18.56%)^[18]。目前, MLL3 在宫颈癌进展中的具体作用尚无文献报道。本研究结果显示宫颈鳞癌组织和细胞系中的 MLL3 转录水平显著降低, 提示 MLL3 参与了

宫颈癌的发生发展。

既往研究表明 MLL3 的缺失不仅可促进前列腺癌小鼠的肿瘤生长和转移^[12], 也可通过 DNMT3A 介导的表观遗传重编程促进小细胞肺癌癌症转移^[8]及乳腺癌细胞的 EMT^[26]。本研究结果显示 MLL3 表达下调减少 SiHa 细胞促凋亡蛋白 Bax 的表达和 caspase 3 的剪切, 并增加抗凋亡蛋白 Bcl-2、侵袭相关蛋白 MMP2 和 MMP9 的表达, 最终促进细胞增殖和侵袭。因此, 宫颈癌细胞中 MLL3 的表达缺失可能抑制了细胞凋亡途径, 促进了癌细胞的侵袭, 从而促进的宫颈癌的进展。

放疗的基本原理是通过破坏 DNA 杀伤肿瘤细胞, 而肿瘤细胞的放射抵抗性与 DNA 损伤修复能力增强有关。DNA 损伤可触发细胞内的一系列级联反应, 根据损伤程度决定细胞命

图5 MLL3 对 SiHa 细胞侵袭的影响($\times 400$)Fig.5 Effect of MLL3 on the invasion of SiHa cells($\times 400$)

Note: Compared with Control group, $^*P<0.05$; Compared with NC-sh group, $^{\#}P<0.05$; Compared with NC-OE group, $^{\&}P<0.05$.

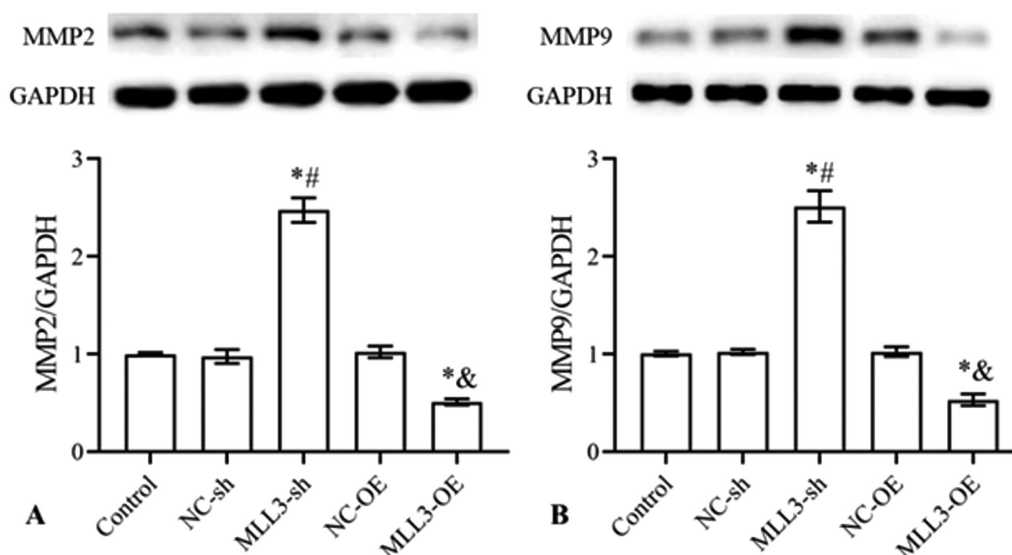


图6 MLL3 对 SiHa 细胞侵袭相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of MLL3 on the expression of invasion-related proteins in SiHa cells

Note: A and B: Relative expression levels of MMP2 and MMP9 proteins; Compared with Control group, $^*P<0.05$;

Compared with NC-sh group, $^{\#}P<0.05$; Compared with NC-OE group, $^{\&}P<0.05$.

运,即 DNA 损伤反应(DNA-damage respons,DDR)^[27-29]。DDR 涉及检查点激活和 DNA 损伤修复,这依赖于将 DDR 因子组装到受损位点^[30]。文献报道 MLL3 参与调节 DNA 损伤修复过程,MLL3 失活可降低同源重组诱导的 DNA 修复活性^[19,20]。本研究通过建立放射抵抗 SiHa 细胞(SiHaR 细胞),发现 SiHaR 细胞中的 MLL3 表达水平较 SiHa 细胞上调,且具有更高的内源性 DNA 损伤和基因组不稳定性^[20]。本研究对 SiHaR 细胞转染 MLL3-shRNA 慢病毒下调了 MLL3 的表达,结果显示下调 MLL3 进一步降低了 SiHaR 细胞的相对细胞活力,升高了 γ -H2AX 的表达水平,抑制了 ATM、ATR、BRCA1 和 RAD50 的转录。 γ -H2AX 是 DNA 双链断裂的标志,DNA 双链断裂迅

速启动 H2AX 的丝氨酸 139 处的磷酸化,从而形成 γ -H2AX^[31]。ATM 和 ATR 是 DDR 关键成分,BRCA1 和 RAD50 是 HR DNA 修复途径成分^[20]。本研究结果说明下调 MLL3 提高了 SiHaR 细胞的放射敏感性,降低了 DNA 损伤修复能力。分析其原因,MLL3 被 DNA 损伤反应 RNA 和 Argonaute 2 直接募集到 DNA 损伤位点,MLL3 与 Argonaute 2 形成复合体,进一步介导 H3K4 一甲基化和染色质松弛,允许募集 DDR 因子并放大检查点激活和 DNA 损伤修复所需的 DDR 信号^[19]。MLL3 沉默与 ATM、ATR、BRCA1、RAD50 的表达减少有关^[20]。在 MLL3 表达水平降低后,参与 DNA 损伤修复的上述基因下调,其原因可能是由于 MLL3 与这些基因的远端启动子上失去了结合^[20]。

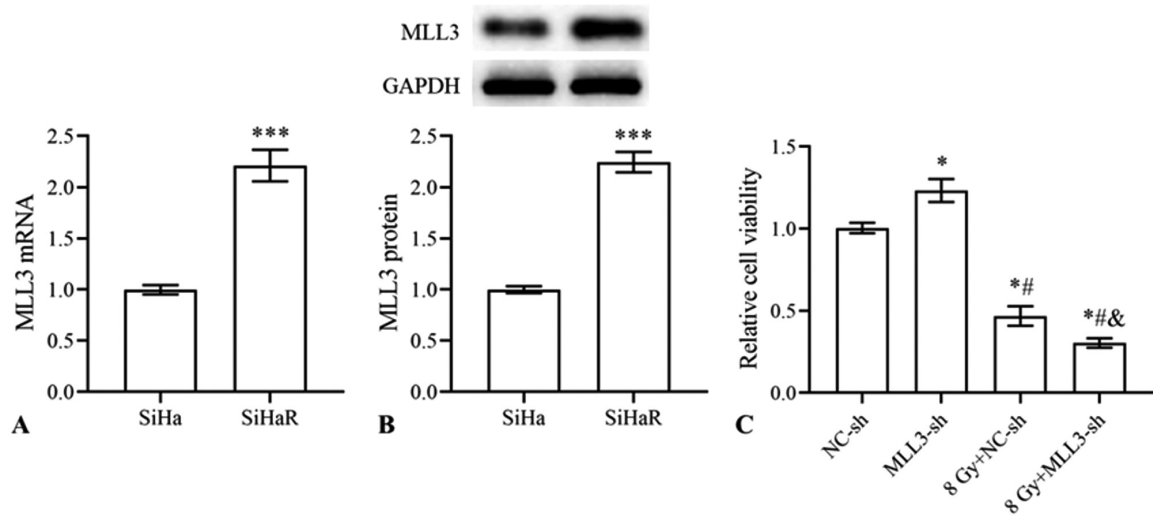


图 7 MLL3 对 SiHaR 细胞放射敏感性的影响

Fig.7 Effect of MLL3 on radiosensitivity of SiHaR cells

Note: A and B: Relative expression levels of MLL3 mRNA and protein in SiHa and SiHaR cells, compared with SiHa cell, *** $P < 0.001$; C: Relative cell viability; Compared with NC-sh group, * $P < 0.05$; Compared with MLL3-sh group, # $P < 0.05$; Compared with 8 Gy+NC-sh group, & $P < 0.05$.

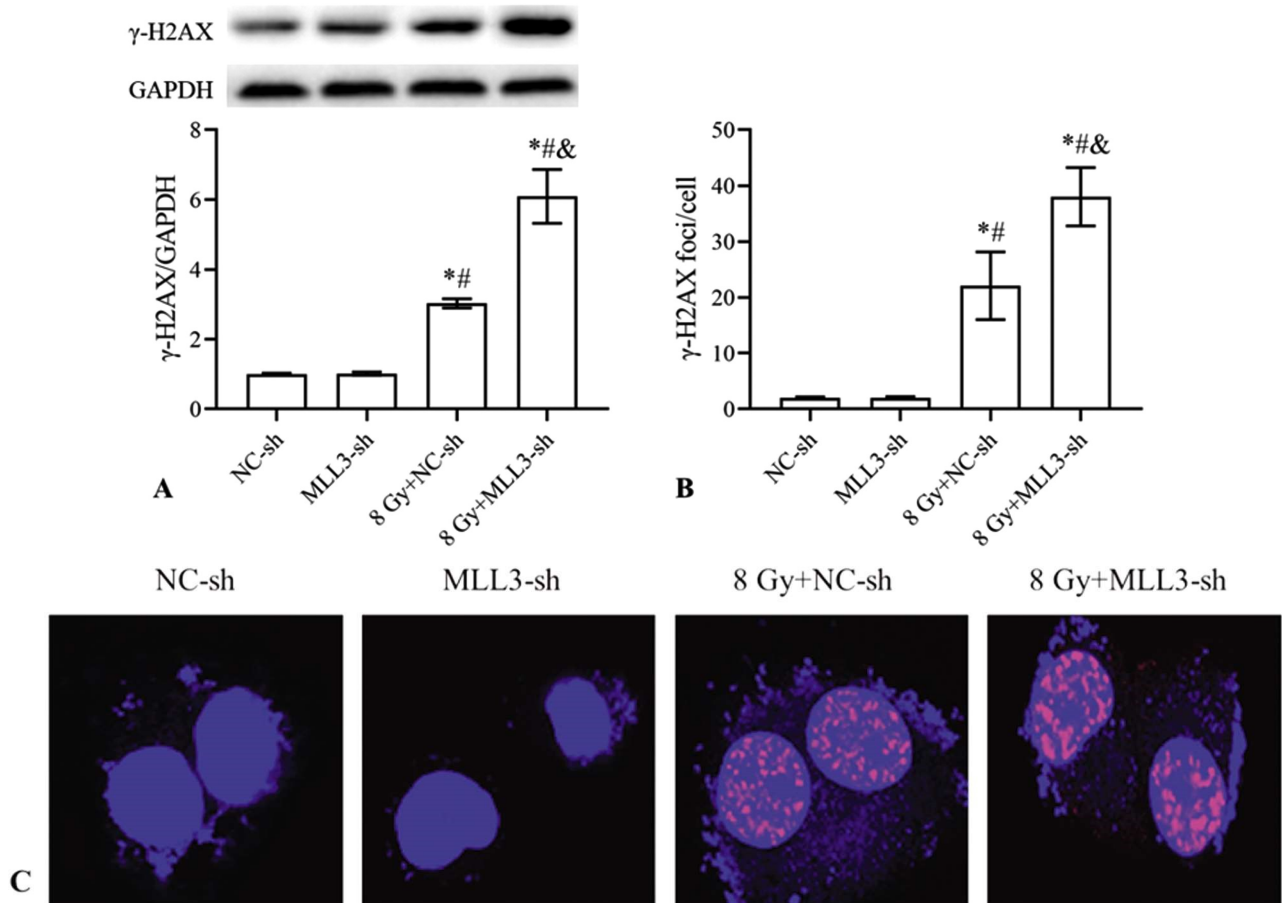


图 8 MLL3 对 SiHaR 细胞 γ -H2AX 表达的影响

Fig.8 Effect of MLL3 on γ -H2AX expression in SiHaR cells

Note: A: The relative expression of γ -H2AX protein; B: γ -H2AX foci number; C: Immunofluorescence staining images of γ -H2AX ($\times 1000$); Compared with NC-sh group, * $P < 0.05$; Compared with MLL3-sh group, # $P < 0.05$; Compared with 8 Gy+NC-sh group, & $P < 0.05$.

本研究结果表明 MLL3 一方面发挥抗癌基因作用,另一方面发挥放疗抵抗基因作用,分析其原因,可能是 MLL3 影响宫颈癌存活和放疗敏感性的机制不同。一方面,MLL3 的缺失导致细胞凋亡途径被抑制而侵袭相关基因被上调,从而增强了宫

颈癌细胞的存活和侵袭。另一方面,放疗是通过破坏 DNA 杀伤肿瘤细胞,放疗敏感性与肿瘤细胞的 DNA 修复活性密切相关,而 MLL3 是一种 DNA 损伤修复相关基因,MLL3 的缺失导致同源重组介导的 DNA 修复活性降低,从而提高了宫颈癌细胞

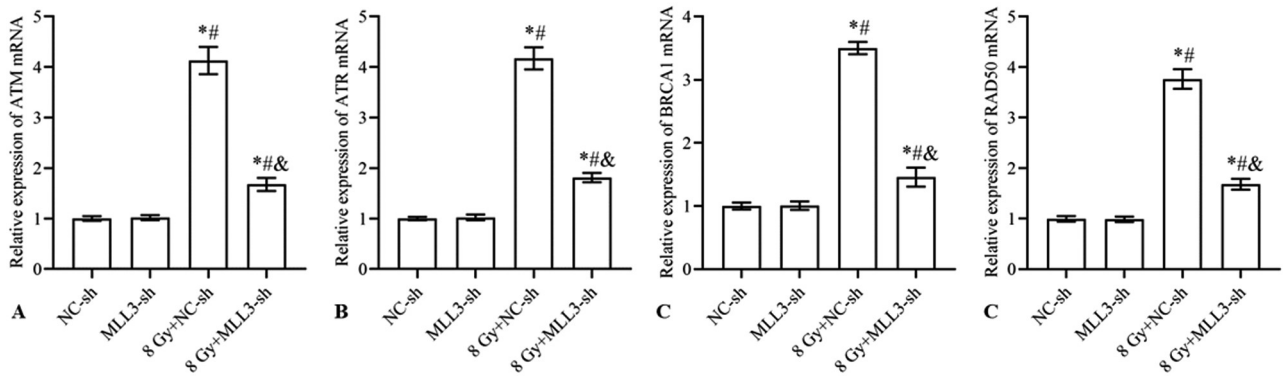


图9 MLL3 对 SiHaR 细胞 DNA 损伤修复相关基因转录的影响

Fig.9 Effect of MLL3 on transcription of DNA damage repair related genes in SiHaR cells

Note: A-D: Relative mRNA expression levels of ATM, ATR, BRCA1 and RAD50, respectively; Compared with NC-sh group, * $P < 0.05$;Compared with MLL3-sh group, # $P < 0.05$; Compared with 8 Gy+NC-sh group, & $P < 0.05$.

的放射敏感性。

综上所述,本研究表明宫颈癌细胞 MLL3 的表达下调促进了其生长和转移,但降低 DNA 损伤修复能力,提高宫颈癌细胞的放射敏感性。因此,MLL3 可能是宫颈癌治疗的潜在靶标。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Chargari C, Peignaux K, Escande A, et al. Radiotherapy of cervical cancer[J]. *Cancer Radiother*, 2022, 26(1-2): 298-308.
- [3] Gopu P, Antony F, Cyriac S, et al. Updates on systemic therapy for cervical cancer[J]. *Indian J Med Res*, 2021, 154(2): 293-302.
- [4] Yuan Y, Cai X, Shen F, et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 243-254.
- [5] Rajaram S, Gupta B. Screening for cervical cancer: Choices & dilemmas[J]. *Indian J Med Res*, 2021, 154(2): 210-220.
- [6] Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer [J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 169-182.
- [7] Weyers S, Garland SM, Cruickshank M, et al. Cervical cancer prevention in transgender men: a review [J]. *Bjog*, 2021, 128(5): 822-826.
- [8] Na F, Pan X, Chen J, et al. KMT2C deficiency promotes small cell lung cancer metastasis through DNMT3A-mediated epigenetic reprogramming[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(6): 753-767.
- [9] Zhu C, Soto-Feliciano YM, Morris JP, et al. MLL3 regulates the CDKN2A tumor suppressor locus in liver cancer [J]. *Elife*, 2023, 12: e80854.
- [10] Wang LH, Aberin MAE, Wu S, et al. The MLL3/4 H3K4 methyltransferase complex in establishing an active enhancer landscape[J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49(3): 1041-1054.
- [11] Fagan RJ, Dingwall AK. COMPASS Ascending: Emerging clues regarding the roles of MLL3/KMT2C and MLL2/KMT2D proteins in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2019, 458: 56-65.
- [12] Limberger T, Schleder M, Trachtová K, et al. KMT2C methyltransferase domain regulated INK4A expression suppresses prostate cancer metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 89.
- [13] Chen C, Liu Y, Rappaport AR, et al. MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(5): 652-665.
- [14] Lee J, Kim DH, Lee S, et al. A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(21): 8513-8518.
- [15] Huang J, Qian Z, Gong Y, et al. Comprehensive genomic variation profiling of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer identifies potential targets for cervical cancer early warning[J]. *J Med Genet*, 2019, 56(3): 186-194.
- [16] Liu J, Li Z, Lu T, et al. Genomic landscape, immune characteristics and prognostic mutation signature of cervical cancer in China [J]. *BMC Med Genomics*, 2022, 15(1): 231.
- [17] Femi OF. Genetic alterations and PIK3CA gene mutations and amplifications analysis in cervical cancer by racial groups in the United States[J]. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2018, 12(1): 28-32.
- [18] Wen H, Guo QH, Zhou XL, et al. Genomic Profiling of chinese cervical cancer patients reveals prevalence of DNA damage repair gene alterations and related hypoxia feature[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 792003.
- [19] Chang A, Liu L, Ashby JM, et al. Recruitment of KMT2C/MLL3 to DNA damage sites mediates DNA damage responses and regulates PARP inhibitor sensitivity in cancer [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(12): 3358-3373.
- [20] Rampias T, Karagiannis D, Avgeris M, et al. The lysine-specific methyltransferase KMT2C/MLL3 regulates DNA repair components in cancer[J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(3): e46821.
- [21] 王中卫, 王亚利, 金迎迎, 等. 辐射耐受性宫颈癌细胞系的建立及 DNA 损伤修复相关基因的差异表达[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2013, 34(5): 572-576.
- [22] Mangelinck A, Mann C. DNA methylation and histone variants in aging and cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2021, 364: 1-110.
- [23] Yadav P, Subbarayalu P, Medina D, et al. M6A RNA methylation regulates histone ubiquitination to support cancer growth and progression[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(10): 1872-1889.
- [24] Callen E, Faryabi RB, Luckey M, et al. The DNA damage- and transcription-associated protein pax1 controls thymocyte development and emigration [J]. *Immunity*, 2012, 37(6): 971-985.
- [25] Xu Y, Luo H, Hu Q, et al. Identification of potential driver genes based on multi-genomic data in cervical cancer[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 598304.

(下转第 135 页)

- [7] Wang Y, Luo S, Tang W, et al. Efficacy and safety of mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomy for caries-exposed permanent teeth in children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Transl Pediatr*, 2022, 11(4): 537-546.
- [8] Kiranmayi T, Vemagiri CT, Rayala C, et al. In vivo comparison of bioceramic putty and mineral trioxide aggregate as pulpotomy medicament in primary molars. A 12-month follow-up randomized clinical trial[J]. *Dent Res J*, 2022, 19: 84.
- [9] Silva LLCE, Cosme-Silva L, Sakai VT, et al. Comparison between calcium hydroxide mixtures and mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy: a randomized controlled trial [J]. *J Appl Oral Sci*, 2019, 27: e20180030.
- [10] Zeng Q, Zhou C, Li M, et al. Concentrated growth factor combined with iRoot BP Plus promotes inflamed pulp repair: an in vitro and in vivo study[J]. *BMC Oral Health*, 2023, 23(1): 225.
- [11] Mahgoub N, Alqadasi B, Aldhorae K, et al. Comparison between iRoot BP Plus (EndoSequence Root Repair Material) and Mineral Trioxide Aggregate as Pulp-capping Agents: A Systematic Review [J]. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2019, 9(6): 542-552.
- [12] Donnelly A, Foschi F, McCabe P, et al. Pulpotomy for treatment of complicated crown fractures in permanent teeth: A systematic review [J]. *Int Endod J*, 2022, 55(4): 290-311.
- [13] Wikström A, Brundin M, Lopes MF, et al. What is the best long-term treatment modality for immature permanent teeth with pulp necrosis and apical periodontitis? [J]. *Eur Arch Paediatr Dent*, 2021, 22(3): 311-340.
- [14] Yu L, Kahler B, Nanayakkara S, et al. Retrospective analysis of the outcomes of pulpotomies in traumatised permanent anterior teeth[J]. *Dent Traumatol*, 2022, 38(6): 505-511.
- [15] Souza RA, Gomes SC, Dantas Jda C, et al. Importance of the diagnosis in the pulpotomy of immature permanent teeth [J]. *Braz Dent J*, 2021, 18(3): 244-247.
- [16] 梁秋娟, 肖朋, 古力巴哈·买买提力. iRoot BP Plus 和 MTA 两种材料用于年轻恒牙活髓切断术的临床比较[J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2018, 5(18): 8-9.
- [17] Lu J, Li Z, Wu X, et al. iRoot BP Plus promotes osteo/odontogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via MAPK pathways and autophagy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 222.
- [18] Wang Y, Luo S, Tang W, et al. Efficacy and safety of mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomy for caries-exposed permanent teeth in children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Transl Pediatr*, 2022, 11(4): 537-546.
- [19] Hilton TJ, Ferracane JL, Mancl L. Northwest Practice-based Research Collaborative in Evidence-based Dentistry (NWP). Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(7 Suppl): 16S-22S.
- [20] 雷金霞, 吕碧波, 张亚婷. iROOT BP Plus 在年轻恒牙活髓切断术中的临床疗效[J]. *临床口腔医学杂志*, 2019, 35(7): 409-411.
- [21] Sáez MDM, López GL, Atlas D, et al. Evaluation of pH and calcium ion diffusion from calcium hydroxide pastes and MTA. Evaluación del pH y la difusión de iones calcio de pastas de hidróxido de calcio y MTA[J]. *Acta Odontol Latinoam*, 2017, 30(1): 26-32.
- [22] Dastorani M, Shourvarzi B, Nojoumi F, et al. Comparison of Bacterial Microleakage of Endoseal MTA Sealer and Pro-Root MTA in Root Perforation[J]. *J Dent*, 2021, 22(2): 96-101.
- [23] Panda P, Govind S, Sahoo SK, et al. Analysis of Pulp Tissue Viability and Cytotoxicity of Pulp Capping Agents[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(2): 539.
- [24] Albaiti SS, Albishri RF, Alhowig MT, et al. Partial Pulpotomy as an Applicable Treatment Option for Cariously Exposed Posterior Permanent Teeth: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials[J]. *Cureus*, 2022, 14(7): e26573.
- [25] 刘鹏, 李轶杰, 殷悦. MTA, CH 和 iRoot BP Plus 材料用于乳磨牙活髓切断术的远期疗效观察[J]. *解放军医药杂志*, 2022(007): 80-84.
- [26] Abuelniel GM, Duggal MS, Duggal S, et al. Evaluation of Mineral Trioxide Aggregate and Biodentine as pulpotomy agents in immature first permanent molars with carious pulp exposure: A randomised clinical trial[J]. *Eur J Paediatr Dent*, 2021, 22(1): 19-25.

(上接第 53 页)

- [26] Cui J, Zhang C, Lee JE, et al. MLL3 loss drives metastasis by promoting a hybrid epithelial-mesenchymal transition state [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(1): 145-158.
- [27] Cheng B, Pan W, Xing Y, et al. Recent advances in DDR (DNA damage response) inhibitors for cancer therapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 230: 114109.
- [28] Groelly FJ, Fawkes M, Dagg RA, et al. Targeting DNA damage response pathways in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(2): 78-94.
- [29] Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 60.
- [30] Ciccica A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179-204.
- [31] Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(17): 5678-5694.