

[文章编号 1000-1182(2004)03-0189-03]

Fas 转染及抗体处理对舌鳞癌细胞 Tca8113 移植瘤形成和增殖的影响

侯劲松¹, 黄洪章², 王建广², 潘朝斌²

(1. 中山大学光华口腔医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510055;

2. 中山大学附属第二医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 研究 Fas 转染和抗 Fas 单克隆抗体对舌鳞癌细胞系 Tca8113 裸鼠体内移植瘤形成和增殖的影响, 探讨相关机制。方法 脂质体法以真核表达重组质粒 pBK-fas 转染舌鳞癌细胞系 Tca8113。部分转染细胞行抗 Fas 单克隆抗体处理。未转染细胞、Fas 转染细胞、Fas 转染抗体处理细胞分别接种裸鼠皮下。观测移植瘤生长, 绘制生长曲线。RT-PCR 检测肿瘤细胞 Fas mRNA 表达。流式细胞术 (FCM) 检测肿瘤细胞凋亡、增殖及 Fas 蛋白表达。结果 Fas 转染和抗体处理延迟肿瘤形成, 抑制肿瘤增殖。Fas 转染上调移植瘤 Fas mRNA 表达, 提高 Fas 蛋白表达强度和凋亡指数, 但不影响 Fas 蛋白阳性表达率和增殖指数。抗体处理不影响 Fas mRNA 和蛋白表达, 但可提高凋亡指数, 降低增殖指数。结论 Fas 转染抑瘤效应是上调 Fas 转录和表达、促进凋亡的结果。抗 Fas 单克隆抗体抑瘤效应则与激活凋亡和抑制增殖有关。

[关键词] Fas; 基因转染; 抗 Fas 单克隆抗体; 舌鳞状细胞癌; 基因治疗

[中图分类号] R 739.8 [文献标识码] A

Effect of Fas Gene Transfection on Tumorigenicity and Proliferation of Transplanted Tumor of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Tca8113 HOU Jin-song¹, HUANG Hong-zhang², WANG Jian-guang², PAN Chao-bin². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract Objective To investigate the effect of fas gene transfection and monoclonal anti-fas antibody on tumorigenicity and proliferation of transplanted tumor of Tca8113 cell. **Methods** Plasmid including fas gene was transfected into Tca8113 cell by lipofectamine kit. Some transfected cells were treated by monoclonal anti-fas antibody after 48 hours since transfection. Untransfected cell (control), fas-transfected cell and fas-transfected cell treated with antibody were transplanted to nude mice subcutaneously. Growth of transplanted tumor was observed and recorded regularly. Animals were sacrificed and tumor samples were harvested at the end of experiment. Fas expression in each neoplasm was assessed by RT-PCR. Apoptosis, proliferation and expression of fas protein in tumor tissue were measured by flow cytometry (FCM). **Results** Tumor occurred much later in fas-transfected group and fas-transfected plus antibody treated group. Growth arrest was found in them. RT-PCR and FCM suggested that fas-transfection up-regulated the expression of fas mRNA and protein, increased apoptosis index (AI). But no effect on proliferation index (PI) was observed. Monoclonal anti-fas antibody did not effect the expression of fas mRNA and protein, but increased AI and decreased PI. **Conclusion** Fas-transfection suppressing tumorigenesis of Tca8113 cell transplanted in nude mice might be caused by up-regulation of expression of fas gene and enhancement of apoptosis. However, anti-fas antibody suppressing tumorigenesis might be associated with activation of apoptosis and repression of proliferation.

Key words Fas; gene transfection; monoclonal anti-fas antibody; tongue squamous cell carcinoma; gene therapy

肿瘤发生不仅是细胞增殖、分化异常的结果,也与凋亡失衡有关。在参与凋亡调控的多种基因产物中,死亡分子受体 Fas 及其配体 FasL 构成的 Fas/FasL 凋亡系统最引人注目。研究表明,人体多种肿瘤存在

Fas/FasL 凋亡途径异常,口腔肿瘤也不例外^{1~3}。主要表现为,肿瘤细胞通过下调 Fas 表达、或使蛋白表达膜内化来阻断 Fas 凋亡信号,逃避 Fas 介导的凋亡,促进肿瘤增殖和侵袭转移。因此,提高肿瘤细胞 Fas 表达水平,激活 Fas 凋亡信号,对肿瘤治疗具有积极意义。本研究采用基因转染技术,将真核表达重组质粒 pBK-Fas 导入舌鳞癌细胞系 Tca8113,通过裸鼠体内实验,验证 Fas 转染抑瘤效果,并对 Fas 转染抑瘤机

[收稿日期 2002-10-10; 修回日期 2003-11-11]

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (A000099013)

[作者简介] 侯劲松 (1969-), 男, 湖北人, 讲师, 博士

[通讯作者] 黄洪章, Tel: 020-81332425

制和抗 Fas 单克隆抗体在肿瘤形成和增殖中的作用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

舌鳞癌细胞系 Tca8113(上海第二医科大学口腔医学院何荣根教授惠赠);含 Fas 基因片段的真核表达重组质粒 pBK Fas(日本 Iyon 教授惠赠);培养液 RPMI 1640、胎牛血清(Hyclone 公司);LipofectamineTM Reagent、TRIZol Reagent(GIBCO BRL 公司);Access RT-PCR System(Promega 公司);抗 Fas 单克隆抗体(DAKO 公司);BALB/c 裸鼠(中山大学动物实验中心);引物由上海生工合成,其中:内参照 -actin 上游 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3',下游 5'-GTGGCCGCTCTAGGCACCAA-3';Fas 上游 5'-AGCTCTTCACTTCGGAGGATT-3',下游 5'-TGGCAAAAGAAGAA GACAAAGC-3',扩增产物 581 bp。

1.2 细胞培养

舌鳞癌细胞 Tca8113 置 37℃、5%CO₂ 孵箱,用含 10%胎牛血清、10⁵ U/L 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养。

1.3 细胞转染和抗 Fas 单克隆抗体处理

按 LipofectamineTM Reagent 说明书用 pBK Fas 转染 Tca8113。转染 48 h 后,部分细胞去旧液,用含抗 Fas 单克隆抗体(终浓度 5 μg/ml)的 RPMI 1640 继续培养 24 h。

1.4 细胞收集

转染 72 h,抗体处理 24 h 后,胰蛋白酶法收集未转染细胞(对照组)、Fas 转染细胞和 Fas 转染抗体处理细胞。

1.5 动物实验

3 组细胞分别接种 6~8 周龄 BALB/c 裸鼠皮下。每组 10 只,每只接种细胞 6×10⁶。定期观察。抗体处理组肿瘤形成后,每 4 d 瘤内注射抗 Fas 单克隆抗体 1 次(终浓度 20 μg/ml,总量 0.5 ml),共 4 次。其它各组注射等量溶剂。

1.6 移植瘤指标检测

1.6.1 移植瘤形成情况 移植瘤形成当天开始,每 2 d 记录 1 次各组移植瘤形成数量,计算移植瘤形成率和平均成瘤时间。

1.6.2 移植瘤生长曲线和生长抑制率 移植瘤形成当天开始,每 4 d 测量移植瘤体积 1 次,共 6 次。根据移植瘤体积均值绘制生长曲线,体积差异计算生长抑制率。其中:肿瘤体积 = $\frac{1}{6} \times \text{长径} \times \text{短径}^2$;肿瘤生长抑瘤率 = (对照组肿瘤体积增长量 - 实验组肿瘤体积增长量) / 对照组肿瘤体积增长量 × 100%。

1.6.3 移植瘤总 RNA 提取 实验结束采集移植瘤

标本。按 TRIZolTM Reagent 说明书提取移植瘤总 RNA,分光光度仪检测 RNA 浓度和纯度,1%琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 完整性。

1.6.4 Fas mRNA 表达检测 采用 Access RT-PCR System 一步法。在 50 μl 反应体系中加入 1 μg RNA 模板,10 μl AMV/RT 5×反应缓冲液,1 μl dNTP 混合物,上游和下游引物各 1 μl (50 pmol),25 mmol/L MgSO₄ 2 μl,AMV 逆转录酶和 RT DNA 聚合酶各 1 μl,加水至 50 μl。48~60 min 合成第一条 cDNA 链,94~2 min 失活 AMV 逆转录酶。随后 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 1 min,70℃ 延伸 2 min,40 个循环,最后延伸 7 min。扩增产物 4℃ 保存。取 10 μl PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,紫外线下观察目的 DNA 和内参照 DNA 条带。图像分析系统分析灰度值。以 Fas 和 -actin 条带灰度值比值代表 Fas 基因表达水平。

1.6.5 Fas 蛋白表达的流式细胞检测 机械法制备细胞悬液,400 目滤网过滤,离心纯化。70%预冷乙醇固定,荧光素标记的抗 Fas 单克隆抗体处理,流式细胞仪检测 Fas 蛋白阳性表达率和表达强度。

1.6.6 细胞凋亡和增殖的流式细胞检测 同法制备细胞悬液,70%预冷乙醇固定,PI 染色,流式细胞仪检测凋亡和增殖指数。

1.7 统计分析

实验数据采用统计软件 SPSS10.0 行 *t* 检验或方差分析。

2 结果

实验中 Fas 转染组 1 只裸鼠意外死亡,样本按 9 只计。其余两组以 10 只计。

2.1 移植瘤形成情况

裸鼠移植瘤形成情况见表 1。统计分析表明,Fas 转染延迟肿瘤形成,抗体处理延迟尤为明显。3 组移植瘤平均成瘤时间差异有统计学意义(*P* < 0.01)。分析还表明,接种 8、10、12 d,各组动物移植瘤形成率差异显著(*P* < 0.01)。16 d 后,除 Fas 转染抗体处理组仍低于其它两组外,对照组和 Fas 转染组移植瘤形成率差异已无显著性(*P* > 0.05)。实验中,Fas 转染抗体处理组有 2 只裸鼠始终无移植瘤形成。

表 1 裸鼠移植瘤形成情况

Tab 1 Neoplasm formation in nude mice							
组别	样本量	接种时间(d)					
		8	10	12	16	18	20
对照组	10	4	8	9	10	10	10
Fas 组	9	2	5	7	9	9	9
Fas + Ab 组	10	2	3	4	7	8	8

2.2 移植瘤增殖状况和肿瘤生长曲线

移植瘤体积均值统计分析表明,接种 16 d 开始,不同时期各组移植瘤体积均值差异均有显著性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),Fas 转染抗体处理组体积最小,对照组最大。移植瘤标本大体观测结果与此一致。生长曲线显示,Fas 转染抑制肿瘤生长。抗 Fas 抗体处理后抑制作用更为明显(图 1)。

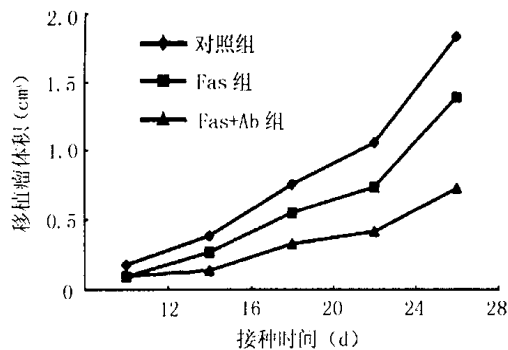


图 1 各组移植瘤生长曲线
Fig 1 Growth curve of transplanted tumor

2.3 移植瘤生长抑制率

Fas 转染组生长抑制率 23.73%,Fas 转染抗体处理组生长抑制率 44.59%。差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 Fas mRNA 表达的检测

各移植瘤 RT-PCR 产物凝胶电泳均见 581 bp 的 Fas 基因片段(图 2)。检测对照组、Fas 转染组、Fas 转染抗体处理组电泳图谱灰度值,Fas mRNA 表达量分别为 0.201 ± 0.040 、 0.298 ± 0.079 、 0.293 ± 0.065 。统计表明,Fas 转染组和 Fas 转染抗体处理组 Fas mRNA 表达上调(均为 $P < 0.01$),但两组 Fas mRNA 表达差异无显著性 ($P > 0.05$),提示抗 Fas 抗体不影响 Fas mRNA 表达水平。

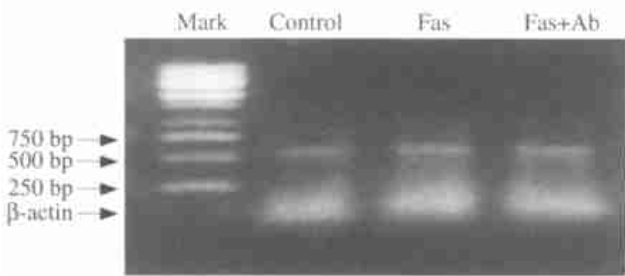


图 2 各移植瘤 Fas mRNA 表达的 RT-PCR 检测
Fig 2 RT-PCR detection for fas mRNA expression

2.5 Fas 蛋白表达的流式细胞检测

统计表明,3 组移植瘤 Fas 阳性率差异无显著性 ($P > 0.05$)。提示 Fas 转染和抗体处理不改变 Tca8113 细胞 Fas 阳性率。Fas 蛋白阳性强度分析表明,Fas 转染显著提高 Fas 蛋白表达强度 ($P < 0.01$)。而 Fas 转染和 Fas 转染抗体处理组强度差异无显著性 ($P > 0.05$),说明抗 Fas 单克隆抗体处理也不影响蛋白表达强度。见表 2。

表 2 Fas 蛋白表达水平的流式细胞检测

Tab 2 Flow cytometry detection for the expression of fas protein		
组别	Fas 蛋白阳性率 (%)	Fas 蛋白阳性强度
对照组	90.73 \pm 5.86	35.01 \pm 5.26
Fas 组	94.88 \pm 9.24	55.40 \pm 7.31
Fas + Ab 组	92.51 \pm 6.33	58.79 \pm 8.65

2.6 细胞凋亡和增殖的流式细胞检测

3 组细胞凋亡/增殖指数分别是 5.30% \pm 0.79%/60.51% \pm 4.99%、10.21% \pm 1.46%/60.81% \pm 5.03%和 16.05% \pm 2.35%/42.36% \pm 3.72%。统计表明,三者凋亡指数差异有显著性 ($P < 0.01$),Fas 转染,特别是转染前后抗体处理可以有效促进细胞凋亡。实验同时发现,Fas 转染不影响肿瘤细胞增殖指数 ($P > 0.05$)。抗体处理使增殖指数明显下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论

在正常口腔粘膜向上皮异常增生和癌转化过程中,Fas 表达逐渐下调⁴。口腔粘膜 Fas 阳性率为 80.0%~84.5%,异常增生下降到 37.5%^{3,5}。口腔鳞癌中,除高分化鳞癌 Fas 阳性率仍维持较高水平外,中分化鳞癌 Fas 阳性率约为 35%,低分化鳞癌则降至 0~25.0%⁶。在 Fas 信号传导途径中,Fas 通过结合 FasL 或抗 Fas 抗体激活 Fas 阳性细胞凋亡。资料显示,细胞恶性转化过程中,细胞 FasL 表达呈上升趋势^{2,6}。因此 Fas/FasL 凋亡信号的阻断主要是 Fas 表达下调或缺失的结果。Fas 表达下调不仅阻断 Fas 凋亡信号的活化和传导,还能促进肿瘤复发转移,降低患者 5 年生存率^{5,6}。因此,上调肿瘤细胞 Fas 表达,激活凋亡,对控制肿瘤生长、改善预后具有意义。

本实验以含 Fas 基因的重组质粒转染舌鳞癌细胞系 Tca8113,同时以抗 Fas 抗体部分替代 FasL 功能。结果发现:Fas 转染、抗体处理延迟肿瘤形成、抑制肿瘤生长。Fas 转染上调 Fas mRNA 和蛋白强度,提高凋亡指数,但不影响 Fas 阳性率和增殖指数;抗 Fas 单克隆抗体不影响 Fas mRNA、Fas 蛋白阳性率和表达强度,但提高凋亡指数、降低增殖指数。由此可见,Fas 转染抑瘤效应与上调 Fas 转录和表达、促进凋亡有关;抗 Fas 抗体抑瘤效应则是促进凋亡、抑制增殖的结果。分析相关分子事件,作者发现: Fas 介导细胞凋亡与 Fas 蛋白阳性率无关,与 Fas 蛋白阳性强度有关。Fas 蛋白激活凋亡可能存在阈值。只有 Fas 表达达到一定强度,凋亡才被激活。实验中,尽管对照组、Fas 转染组、Fas 转染抗体处理组 Fas 蛋白阳性

(下转第 197 页)

于 2 mm。超填:根充物超出 X 线片的根尖。

1.5 完成牙体修复

X 线片显示根管充填完好后,行暂时或永久性牙体修复。视患牙状况建议进行全冠或桩冠修复。

1.6 术后回访

为了充分评估治疗效果,建议建立根管治疗回访制度。回访周期可为 3 个月、半年、1 年、两年或更长。

2 根管治疗疗效评价标准

根管治疗的疗效评定有利于根管治疗技术的提高和完善。建议无根尖周病变病例观察时间为 1~2 年;有根尖周病变病例观察时间为 2~5 年。

通过患者感受、临床检查以及 X 线检查 3 个指标,分为成功和失败两个级别来评价。

2.1 根管治疗成功

患者感受:无不适症状,咀嚼功能正常,对医疗过程和结果满意,对患牙功能及外形满意。临床检查:无叩痛,无窦道或窦道在治疗后 1~2 周内闭合。X 线片:牙周膜间隙正常或轻度增厚;原有根尖病变缩小或消失;根尖未发育完全者术后 3~6 月逐渐形成;根管腔隙致密的三维充填,根充物距 X 线片的根尖 0.5~2.0 mm。

2.2 根管治疗失败

患者感受:有持续的不适症状,患牙不能承受咀嚼,对医疗过程和结果不满意,对患牙功能及外形不满意。临床表现:窦道或肿胀反复发作,有叩痛或触痛,有不可修复的牙折裂。X 线片:牙周膜间隙增宽;原有根尖病变无缩小或增大;无新骨质形成,根尖未继续发育;根充后有明显的根管腔隙,不吸收充填材料的超填。

(上接第 191 页)

率差异无显著性,但三者凋亡指数差异明显。因此认为,Tca8113 细胞 Fas 阳性率并不反映凋亡水平。这一观点与 Koga 等⁷的研究一致。进一步分析发现,移植瘤凋亡指数与 Fas 阳性强度具有明显趋同性。强度越高,凋亡指数越高。由此得出结论:舌鳞癌细胞并非有 Fas 表达就发生凋亡,只有 Fas 表达达到一定强度,凋亡才会大量发生。此即阈值。Fas 转染具有即刻杀伤效应和延期杀伤效应。即刻杀伤抑制移植瘤形成,延期杀伤抑制移植瘤增殖。实验初期,部分细胞获得 pBK-Fas 高拷贝转染,Fas 表达强度迅速增高,达到阈值,这些细胞移植体内后迅速凋亡,此即即刻杀伤。结果使移植的可增殖细胞减少,成瘤时间延长。而实验初期获得低拷贝转染的细胞,因为 Fas 表达未达到阈值而暂时存活。但真核表达质粒可在体内自主复制,舌鳞癌细胞内 pBK-Fas 通过自主复制重新获得高拷贝,使细胞内 Fas 表达达到阈值从而再次激发凋亡,此即延期杀伤。这一推论,为实验结束时 Fas 转染组凋亡指数仍高于对照组提供了较合理的解释。

本实验 Fas 转染抗体处理组 2 只裸鼠始终未出现移植瘤,一个可能的理解是:Fas 转染和抗体处理均可促进细胞凋亡,根据相关资料,接种口腔鳞癌细胞低于一定数量级时,移植瘤将不能在裸鼠体内形

成。本实验细胞接种量为 6×10^6 。一旦凋亡后细胞总量接近某个极限,移植瘤无法形成即成为现实。

[参考文献]

- 1] Koomagi R, Volm M. Expression of Fas(CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance J. Int J Cancer, 1999, 84(3):239-243.
- 2] Nagao M, Nakajima Y, Hisanga M, et al. The relation of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance *in vivo*? J. Hepatology, 1999, 30(2):413-421.
- 3] Muraki Y, Yoshika C, Tateishi A, et al. Localization of fas antigen in oral squamous cell carcinoma J. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999, 37(1):37-41.
- 4] 曾 昕,陈谦明,聂敏海,等. 口腔黏膜癌变过程中 Fas 与 FasL 表达的关系 J. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(4):259-262.
- 5] Muraki Y, Yoshika C, Fukudal J, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia J. J Oral Pathol Med, 1997, 26(7):57-62.
- 6] Loro LL, Vintemylr OK, Johnnessen AC, et al. Suppression of Fas receptor and negtive correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma J. J Oral Pathol Med, 1999, 28(2):82-87.
- 7] Koga F, Arai K, Kamai T, et al. Fas labeling status does not correlate with apoptosis of renal cell carcinoma *in vivo* J. Anticancer Res, 2001, 21(5):3193-3197.

(本文编辑 王 晴)