

nm23- H1 基因对 Tca8113 的转移能力及化疗敏感性影响的实验研究

陈绍维 黄洪章 潘 剑 温玉明 廖湘凌 王昌美 李 芃 杨 凯

【摘要】 目的 通过 nm23- H1 的转化及导入 Tca8113 细胞株,建立稳定、高效、低毒的转染方法,观察 nm23- H1 对 Tca8113 细胞株侵袭转移能力的影响。方法 利用基因转化技术,制备高纯度的 nm23- H1 真核表达质粒。利用阳离子脂质体介导的转染技术,完成转染方法的建立。利用免疫组化技术,检测转染前后的 nm23- H1 的蛋白产物核苷二磷酸激酶 A (NDPKA) 的表达。利用 transwell 小室和冲刷实验,观察转染前后细胞的侵袭、粘附、趋化运动能力的变化。MTT 法观察 nm23- H1 对 Tca8113 化疗敏感性影响。结果 使用重组的 pCMV-Neo-Bam 真核表达载体,将 nm23- H1 转染口腔癌细胞,并获得稳定表达。Tca8113 细胞株 nm23- H1 基因转染前后表达水平有明显差异,转染后 Tca8113 细胞侵袭、粘附、趋化运动能力均显著降低,转染前后 Tca8113 细胞株对阿霉素 (ADM)、5- 氟尿嘧啶 (5- FU)、甲氨喋呤 (MTX) 的化疗敏感性无显著差异,转染后 Tca8113 细胞株对顺铂 (CDDP) 明显增敏。结论 nm23- H1 对 Tca8113 细胞的侵袭转移能力具有显著抑制作用,nm23- H1 可能通过特异性地影响细胞内的能量交换过程来达到对 CDDP 化疗增敏的效果。

【关键词】 nm23- H1; Tca8113; 转移; 化疗敏感性

The Effects of nm23- H1 on Metastases Ability and Chemo-sensitivity in Tca8113 Cell Lines

CHEN Shaowei^{*}, HUANG Hongzhang, PAN Jian, et al. (^{*} Department of Oral Maxillofacial Surgery, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to establish a stable, high-efficient and low-toxic way of transfecting nm23-H1 into Tca8113 line cells, and then to find out whether nm23- H1 could affect the invasion and metastases ability of Tca8113 line cells. **Methods** nm23- H1 was transfected into Tca8113 line cells with Lipofect. The different expressions of nm23- H1 between transfected and non-transfected line cells were detected by the method of immunohistochemistry. The difference of the invasion and metastases ability between transfected and non-transfected line cells was detected by transwell-room and wash techniques. The change of chemo-sensitivity was evaluated by MTT. **Results** Using pCMV-NEO-BAM system to keep stable expression of nm23- H1, the significant difference of NDPKA expression between transfected and non-transfected Tca8113 line cells was discovered; The metastases ability of transfected Tca8113 line cells decreased significantly; The chemo-sensitivity of transfected Tca8113 line cells to CDDP increased significantly. **Conclusion** nm23- H1 can inhibit the metastases of Tca8113 line cells and increase the chemo-sensitivity to CDDP significantly.

【Key words】 nm23- H1; Tca8113 cell lines; metastasis; chemo-sensitivity

临床上因癌症而死亡的患者中,约有 78 % 以上合并不同器官的转移,其中淋巴道转移最常见。口腔癌颈淋巴结转移率高,而且一旦出现淋巴结转移,患者 3 年生存率将较无转移患者下降 40 % ~ 60 %。如果能利用肿瘤自身特性,采用有效方法来预防和治疗

转移,对延长患者生命将具有重要意义。同时口腔鳞癌在多数情况下对化疗敏感性低,有效率仅在 18 % ~ 61 % 之间。因此,针对口腔癌转移和耐药的相关因素及规律,提出新的有效的治疗方法,对改善预后具有重要意义。本研究的目的是利用基因转染技术,通过体外实验,研究 nm23- H1 基因对舌癌细胞株 Tca8113 转移能力的影响,观察其对口腔恶性肿瘤化疗的增敏作用及作用机制,初步评价 nm23- H1 对口腔癌的治疗价值,以期对口腔癌的基因治疗提供一定的参考依据。

本课题为国家自然科学基金(编号 39870746)和福建省自然科学基金重点项目(编号 C0220002)资助项目

作者单位:510120 中山大学附属二院口腔颌面外科(陈绍维,黄洪章),四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(潘 剑,温玉明,廖湘凌,王昌美,李 芃,杨 凯)

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

nm23-H1 真核表达质粒(美国国立卫生研究院 Patricia S Steeg 教授提供);LipofectAMINE(GIBCO BRL,美国);G418(Gene 公司,美国);nm23-H1 鼠抗人单克隆抗体(中山生物技术有限公司);纤粘连蛋白(Promega 公司,美国);Shellab Model 2000 自控式 CO₂ 培养箱(Shellab 公司,美国);DNA-100 电泳仪(Amersham Pharmacia Biotech Inc 公司,美国);OLYMPUS 荧光相差显微镜(OLYMPUS 公司,日本);MTT(Genetimes Tech Inc,美国);Bio-Rad550 酶标仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 质粒的转化及鉴定

以大肠杆菌 JM109(四川大学分子生物学实验室提供)为宿主菌,对 nm23-H1 真核表达质粒进行转化,碱裂解法提取,聚乙二醇沉淀法纯化,采用限制性内切酶 *Bam*H1 酶切鉴定。

1.3 转染及阳性克隆的筛选

将 Tca8113 细胞(来源于人舌黏膜鳞癌,由卫生部口腔生物医学工程实验室提供)在 RPMI1640 培养基(卫生部口腔生物医学工程实验室提供)中,37℃,CO₂ 培养箱中培养。用阳离子脂质体(LipofectAMINE)完成 nm23-H1 对 Tca8113 细胞的转染,转染细胞生长接近融合时按 1:4 密度传代,继续培养至细胞密度达 50%~70%融合。

弃去培养液,更换质量浓度为 800 mg/L 的 G418 培养液筛选转染细胞,换液后浓度降至 250 mg/L,维持筛选作用。每天观察细胞生长情况,直到第 5 周。以转染的 Tca8113/nm23-H1 细胞为实验组,以未转染的 Tca8113 细胞为对照组进行后续实验。

1.4 免疫组织化学染色(SP 法)

将用 G418 筛选 5 周左右的实验组细胞和未转染的对照组细胞分别接种于无菌玻片上,细胞爬片后,SP 法洗涤固定,滴加 nm23-H1 鼠抗人单抗,孵育,PBS 洗涤,依次分别滴加二抗、三抗,DAB 显色,苏木素复染。

1.5 细胞侵袭分析

细胞侵袭重建基底膜实验在 transwell 小室中(Costar 公司,美国)进行。细胞用 EDTA/PBS 消化,约 2.5×10^5 细胞加入 transwell 小室中,细胞在上层培养,通过随机在上下层的基质胶(Matrigel)中选择 5 个 400 倍显微视野,统计视野中细胞数目,以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.6 细胞粘附分析

分别制备 5×10^4 /L 的实验组和对照组细胞悬液,取 12 孔细胞培养板,每孔加悬液 0.2 ml。培养 30、60、90、120 min 后弃去未粘附细胞。Hank's 液轻洗 2 遍后收集未粘附细胞计数。按公式:粘附率 = 粘附细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 细胞趋化运动分析

聚碳酸酯滤膜(Costar 公司,美国)(8 μ m 孔径)粘附于 transwell 小室后,在滤膜上下表面分别铺以 5 μ g 纤粘连蛋白。实验组和对照组细胞用 EDTA/PBS 消化,约 2.5×10^5 个细胞加入 transwell 小室中,统计视野中细胞数目,以细胞的相对数目

来表示肿瘤细胞的趋化运动能力。

1.8 MTT 法检测细胞活性

在实验组和对照组细胞的不同培养孔中加入配制的含不同剂量、不同种类化疗药物的 DMEM 全培养液 200 μ l,分别为:0.1、1.0、5.0、10.0 mg/L 的阿霉素(ADM);0.1、10.0、50.0、100.0 mg/L 的 5-氟尿嘧啶(5-FU);0.2、2.0、20.0、100.0 mg/L 的甲氨喋呤(MTX);0.1、1.0、5.0、10.0 mg/L 的顺铂(CDDP)。MTT 法检测细胞活性,置酶标仪测出 A 值。杀伤率 = $1 - \frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值}}$,同时统计半数致死量(LD₅₀)。

1.9 统计分析

采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 质粒转化及酶切鉴定的结果

活化后的含有重组质粒的 JM109 在有氨苄青霉素(ampicilin,AMP)的琼脂平板上生长良好。用碱裂解法提取和聚乙二醇沉淀法纯化的质粒 DNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 在 1.80~1.85 之间。采用限制性内切酶 *Bam*H1 酶切鉴定结果如图(图 1),结果证实质粒在 JM109 中的转化产物与酶切图谱相符,nm23-H1 片段长度为 732 bp,质粒片段长度为 6 550 bp,nm23-H1 的 cDNA 被插入在 pCMV-Neo-Bam 质粒中的 *Bam*H1 区域。

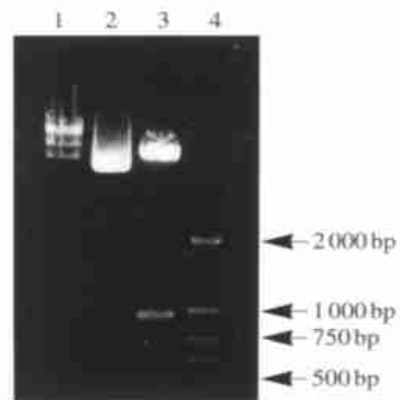


图 1 nm23-H1 质粒酶切图谱

Fig 1 Identification of pCMV-Neo-Bam by *Bam*H1

1: DNA, 2: Hind marker, 3: nm23-H1, 4: DL2000

2.2 质粒转染 Tca8113 细胞及阳性克隆的筛选

转染后 24 h,在 G418 筛选培养基中生长的细胞出现短暂抑制,接着实验组和对照组的细胞数量均减少,2 周后实验组出现阳性克隆,3 周后细胞开始集落生长。5 周后细胞长满,而 5 周后对照组未见细胞生长。

2.3 免疫组化观察

Tca8113 细胞实验组胞浆中出现了呈颗粒状及团块状分布的棕黄色物质,分布较为均匀,核膜周围稍

浓聚,细胞核变大且不甚规则,核浆比例有所增大。细胞可见轻度肿胀,个别细胞圆钝(图2),对照组:胞浆中则未见有明显的棕黄色蛋白质沉积,细胞及细胞核均较实验组小(图3)。

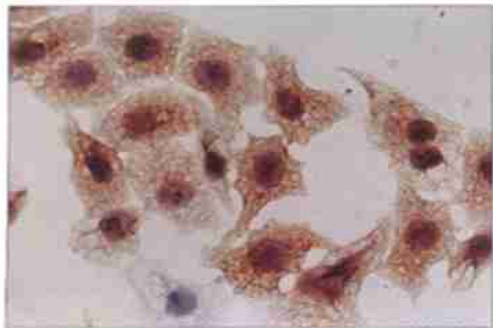


图2 Tca8113/nm23-H1 免疫组化染色 SP法 $\times 40$

Fig 2 The immunohistochemistry result of nm23-H1 transfected cell lines SP $\times 40$

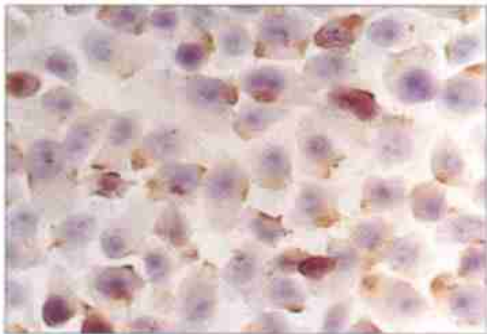


图3 Tca8113 免疫组化染色 SP法 $\times 40$

Fig 3 The immunohistochemistry result of nm23-H1 untransfected cell lines SP $\times 40$

2.4 转染后的细胞侵袭能力的变化

重建后的 Matrigel 能在聚碳酸滤膜表面形成类似天然基底膜的结构,细胞侵袭穿过重建 Matrigel 的能力反映出该细胞的侵袭能力。Tca8113 侵袭细胞相对数目为 $70.1\% \pm 6.2\%$, Tca8113/nm23-H1 为 $44.3\% \pm 2.5\%$, 结果发现转染后细胞较未转染细胞的侵袭能力明显下降。侵袭至滤膜下表面的细胞数均低于转染前的细胞数 ($P < 0.01$, t 检验), 表明通过转染 nm23-H1 明显降低了细胞的侵袭能力。

2.5 转染后的细胞粘附能力的变化

通过不同时间的粘附率来判断粘附能力, 图4表明转染后 60 min 肿瘤细胞的粘附能力明显下降 ($P < 0.01$, t 检验)。

2.6 转染后的细胞趋化能力的变化

转染后的细胞趋化运动的变化如图5所示, 转染后的细胞趋化运动能力明显下降 ($P < 0.01$, t 检验)。

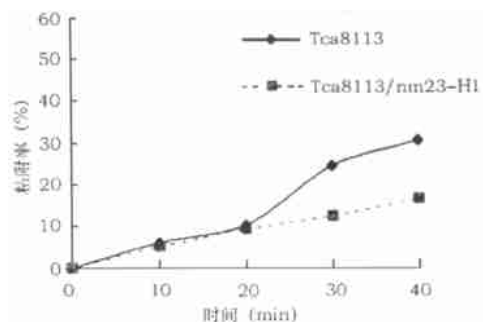


图4 Tca8113 转染前后粘附能力变化

Fig 4 The ability of adhesion of transfected and untransfected cells

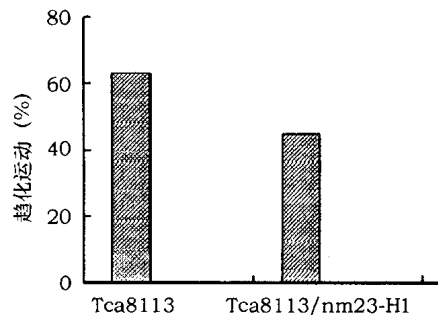


图5 Tca8113 转染前后趋化运动能力变化

Fig 5 Chemical-trend moving ability of transfected and untransfected cells

2.7 转染前后化疗敏感性的变化

不同剂量 ADM、5-FU、MTX、CDDP 对转染和未转染 Tca8113 细胞株体外杀伤率和半数致死量 (LD_{50}) 的检测结果见表1。从表中可以看出, ADM、5-FU、MTX 对转染和未转染 Tca8113 细胞株半数致死量 (LD_{50}) 无显著差异 ($P > 0.05$)。但 CDDP 对 Tca8113 细胞株半数致死量 (LD_{50}) 则有显著差异 ($P < 0.01$, 方差分析)。

表1 药物对转染前后 Tca8113 的杀伤率及 LD_{50}

药物浓度 (mg/L)	Tca8113		Tca8113/nm23-H1	
	$\bar{x} \pm s$	LD_{50}	$\bar{x} \pm s$	LD_{50}
ADM 0.1	2.12 \pm 0.47	2.23 \pm 0.15	2.06 \pm 0.19	2.64 \pm 0.19
	1.0	31.27 \pm 2.10	30.06 \pm 0.08	
	5.0	80.15 \pm 0.64	79.60 \pm 0.34	
	10.0	82.31 \pm 0.61	81.46 \pm 0.75	
5-FU 0.1	34.26 \pm 0.39	26.36 \pm 0.25	34.54 \pm 0.56	27.14 \pm 0.43
	10.0	40.78 \pm 0.16	38.36 \pm 0.34	
	50.0	58.36 \pm 0.89	56.01 \pm 0.25	
	100.0	60.12 \pm 0.49	61.89 \pm 0.84	
MTX 0.2	6.93 \pm 0.62	6.25 \pm 0.36	7.23 \pm 0.17	6.09 \pm 0.54
	2.0	17.14 \pm 0.34	16.77 \pm 0.36	
	20.0	61.63 \pm 0.49	62.44 \pm 0.64	
	100.0	71.65 \pm 0.18	71.36 \pm 0.58	
CDDP 0.1	17.64 \pm 3.95	2.01 \pm 0.69	19.98 \pm 1.34	1.84 \pm 0.21
	1.0	28.64 \pm 0.98	38.06 \pm 0.98	
	5.0	60.94 \pm 2.98	74.36 \pm 0.61	
	10.0	79.36 \pm 0.96	94.23 \pm 0.35	

3 讨 论

实验中发现,当脂质体—质粒复合体导入的第一个 24 h,细胞的实验组和对照组均出现短暂生长抑制后逐渐缓解,两组间无明显差异,这种变化可能与脂质体导入后的短暂抑制作用以及培养液中小牛血清浓度变化、培养液的更换有关。24 h 后,由于 G418 的筛选作用,对照组和实验组的增殖活性均明显下降,细胞数目均明显减少。2 周后实验组细胞开始逐渐出现克隆,3 周后集落生长,而对照组无此变化,说明阳性克隆株已初步出现。3 周后,实验组细胞生长活跃,而对照组已无明显细胞生长。

本研究发现,当 Tca8113 细胞转染后,其侵袭能力明显下降,一方面可能与其运动能力的下降有关,另一方面,可能其降解细胞外基质能力也有明显降低。在侵袭早期发生的肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用可分为粘附和铺展两个过程,前者指细胞表面分子与细胞外基质蛋白的被动结合作用,而后者则包括细胞在细胞外基质表面伸展和由此引起的细胞内信号转导¹。实验的结果已证明转染后细胞的亲合力下降,而趋化运动能力的降低则影响了铺展过程,从而改变了细胞的信号传导过程。

MTT 法分析显示随着 nm23-H1 表达量的增加,Tca8113 细胞株表现出对顺铂的耐药性的降低,而对 ADM、5-Fu、MTX 的敏感性无明显变化,这些结果与 Freije 等² 报告的结果相一致。Caligo 等³ 证实在 S 期 nm23-H1 表达水平升高,而顺铂的强细胞毒性作用表现在 S 期到 G₂ 期,因此推测 nm23-H1 通过调整细胞周期参与了顺铂的细胞毒性诱导。但是也有人经过流式细胞仪检测后,未发现转染前后细胞周期分布有异常。

最近研究显示线粒体在顺铂诱导的细胞毒作用及细胞凋亡中起到重要作用,而其他化疗药物的作用过程中则没有表现出这种特性。Lizuka 等⁴ 分别采

用 nm23-H1 反义和正义转染食道癌细胞株 (YES-2) 后,分别形成 YES-2/AS-12 和 YES-2/Neo,发现反义转染的 YES-2/AS-12 细胞对顺铂的敏感性下降,DNA 破坏的 PCR 分析表明 YES-2/AS-12 细胞核及线粒体 DNA 对顺铂的耐受性增强,线粒体膜电位及 DNA 碎片分析也证明了这一点。然而,YES-2/AS-12 对一种常用的 Na⁺/K⁺ ATP 酶选择性抑制剂——箭毒苷 (ouabain) 敏感性增强。YES-2/AS-12、YES-2/Neo、YES-2 经 ouabain 预处理后,对顺铂的敏感性无差异。在顺铂环境下孵育的 YES-2/AS-12 胞内铂浓度明显低于另两株细胞。因此认为这种与 nm23-H1 有关的特异的顺铂耐药性可能与 Na⁺/K⁺ ATP 酶活性有关。

笔者推测 nm23-H1 可能通过特异性地影响细胞内的能量交换过程,控制 Na⁺/K⁺ ATP 酶来达到顺铂化疗增敏的效果。其增敏作用过程可能为:核苷二磷酸激酶 A (nucleoside diphosphate kinase-A,NDPKA) 引起线粒体功能下降,导致合成 ATP 的量减少,进而引起 Na⁺/K⁺ ATP 酶活性下降,导致细胞内铂浓度升高而促进细胞凋亡。

参考文献

- 1 Parhar RS, Shi Y, Zou M, et al. Effects of cytokine-mediated modulation of nm23 expression on the invasion and metastatic behavior of B16F10 melanoma cells. *Int J Cancer*, 1995, 60(2):204-210
- 2 Freije JM, Lawrence JA, Hollingshead MG, et al. Identification of compounds with preferential inhibitory activity against low-Nm23-expressing human breast carcinoma and melanoma cell lines. *Nat Med*, 1997, 3(4):395-401
- 3 Caligo MA, Cipollini G, Fiore L, et al. NM23 gene expression correlates with cell growth rate and S-phase. *Int J Cancer*, 1995, 60(6):837-842
- 4 Iizuka N, Hirose K, Noma T, et al. The nm23-H1 gene as a predictor of sensitivity to chemotherapeutic agents in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 1999, 81(3):469-475

(2001-09-28 收稿)

(本文编辑 刘 怡)

招聘口腔科医师

福建省福鼎市药械管理站门诊部口腔科创办数年,享有很高的盛誉,并在浙江温州、苍南等地设立连锁口腔专科门诊。因业务拓展,现急需一批技术精湛、高效的工作作风、较好的人际关系沟通能力和优秀的团队合作精神,且向往成功、勇于接受挑战的口腔医师。要求具备执业医师资格,有修复、正畸特长,主治医师以上者优先,同时招收 2 名口腔专业应届毕业生、中西医结合医师各 2 名。有意者请将相关材料寄于福建省福鼎市龙山中路 11 号,邮编:355200,福鼎市药械管理站门诊部张小红收。联系电话:0593-7810888,0593-7888109。