

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0332-03

## 多肿瘤抑制基因对卵巢癌细胞超微结构及增殖力的影响

辛晓燕<sup>1</sup>, 刘淑娟<sup>1</sup>, 韩军涛<sup>2</sup>, 王德堂<sup>1</sup> (第四军医大学西京医院: <sup>1</sup> 妇产科, <sup>2</sup> 烧伤科, 陕西 西安 710033)

关键词: 卵巢肿瘤; 多肿瘤抑制基因; 超微结构

中图分类号: R737.31 文献标识码: A

**摘要:** 目的 探讨卵巢癌细胞在经多肿瘤抑制基因(MTS1)转染后其超微结构及单个细胞增殖力的变化。方法 采用软琼脂克隆形成法, 对比性观察卵巢癌细胞HO-8910在转染MTS1后单个细胞增殖力的改变, 并应用透射电镜观察其细胞超微结构的变化。结果 卵巢癌细胞HO-8910在转染MTS1后其单个细胞的增殖力明显下降, 而转染空载体未产生任何影响; 同时电镜结果显示细胞在转染MTS1后其超微结构亦出现趋向死亡的征象。结论 MTS1可通过影响卵巢癌细胞的超微结构降低细胞的增殖力从而抑制卵巢癌细胞过度生长。

### Effect of multiple tumor suppressor1(MTS1) on the ultrastructures and proliferation of human ovarian cancer cell line (HO-8910)

XIN Xiaoyan<sup>1</sup>, LIU Shujuan<sup>1</sup>, HAN Juntao<sup>2</sup>, WANG Detang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup>Department of Burns, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**Keywords:** ovarian cancer; multiple tumor suppressor 1; ultrastructure

**Abstract** **AM** To study the transformation of ultrastructures and proliferation of human ovarian cancer cell line (HO-8910) transfected by MTS1. **METHODS** By the assay of soft agar medium, the cloning efficiency and proliferation of a single cell were compared among the HO-8910, 8910-pDNA3 and 8910-p16 cells. The ultrastructures of them were also observed under transmission electron microscope. **RESULTS** The cloning efficiency and proliferation of a single

cell descended obviously after being transfected by MTS1. There was no difference between the HO-8910 and 8910-pDNA3 cells. The results observed under transmission electron microscope showed that following transfection the ultrastructures in 8910-p16 tended to show signs of death. **CONCLUSION** By affecting the ultrastructures of HO-8910, MTS1 can downregulate the cloning efficiency and inhibit the extragrowth of ovarian cancer cells.

## 0 引言

卵巢癌的发生率在女性生殖系统肿瘤中虽处于第三位, 但其死亡率却一直高居榜首。近年来在分子水平上探讨肿瘤的发生发展及调控机制已成为肿瘤防治研究的主要方向。MTS1是人类发现的第一个直接抑制肿瘤发生的细胞固有成分, 它的编码产物p16蛋白对细胞的增殖周期具有重要的调控作用, 它通过与细胞周期素竞争性结合细胞周期素依赖激酶并使之失活, 阻止细胞由G1期进入S期, 从而抑制细胞的异常分裂及恶变<sup>[1]</sup>, 但MTS1对肿瘤细胞超微结构的影响尚未有定论, 我们的实验初步探讨了MTS1对细胞超微结构及对单个细胞增殖力的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM和琼脂糖培养基购自Gibco公司; 胰蛋白酶购自Sigma公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 人源性卵巢癌细胞系HO-8910由本实验室保存, 经检测无p16基因表达; 8910-p16细胞为HO-8910经p16基因转染并筛选后所得, 经检测有p16基因表达; 8910-pDNA3细胞为HO-8910经pDNA3空载体转染并筛选后所得。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 以含100 mL · L<sup>-1</sup>胎牛血清的DMEM为培养基, 常规方法复苏细胞并于50 mL · L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, 37 °C 孵箱中培养。

**1.2.2 软琼脂克隆形成实验** 用去离子水配制7 g · L<sup>-1</sup>和12 g · L<sup>-1</sup>琼脂溶液, 高温高压灭菌后, 于45 °C水浴保温备用。配制2 × DMEM培养液, 高温高

收稿日期: 1999-12-23; 修回日期: 2000-02-05

基金项目: 陕西省自然科学基金课题(98K12-G19)

作者简介: 辛晓燕(1952-), 女(汉族), 江苏省无锡市人, 副教授, 主任医师, 硕士生导师。Tel: (029) 3375388(H)



压灭菌后 45℃ 水浴保温。将 2 × DMEM 与 12 g · L<sup>-1</sup> 琼脂溶液等体积混匀后, 按 1 mL/孔加入 24 孔培养板, 4℃ 放置 30 min 使之凝固。再将 2 × DMEM 与 7 g · L<sup>-1</sup> 琼脂溶液等体积混匀, 之后加入单细胞悬液并调整细胞终浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个 · L<sup>-1</sup>, 此混悬液按每孔 0.5 mL 加入上述 24 孔板, 铺平后室温放置使琼脂凝固, 之后置于 37℃, 50 mL · L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 2 wk, 观察细胞克隆形成情况并计算克隆形成率。同时设 HO-8910 为空白对照和 8910-pDNA3 为空白载体对照。

$$\text{克隆形成率} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

1.2.3 透射电镜观察细胞超微结构 将培养的 8910-p16 细胞常规消化分离收集后, 10 mmol · L<sup>-1</sup> PBS 洗涤 2 次, 经 30 g · L<sup>-1</sup> 戊二醛固定及四氧化锇固定, PBS 洗 2 次, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 制备超薄切片, 透射电镜下观察细胞超微结构的改变, 同时设 HO-8910 为空白对照和 8910-pDNA3 为空白载体对照。

统计学处理: 实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 并用 Origin 软件进行 Student 检验。

## 2 结果

### 2.1 软琼脂克隆形成实验 Fig 1 示 HO-8910 细胞

和 8910-pDNA3 细胞均有较高的克隆形成率, 在转染 MTS1 后细胞的克隆形成率明显降低, 说明 MTS1 对单个细胞的增殖力有明显的抑制作用。

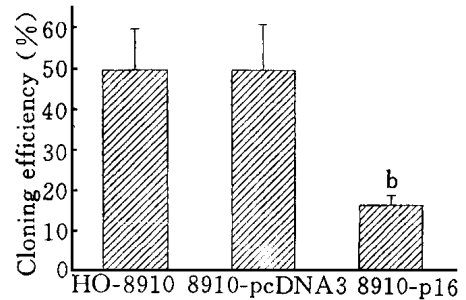


图 1 3 种细胞的克隆形成率

Fig 1 Cloning efficiency of three kinds of ovarian cancer cells

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs HO-8910 and 8910-pDNA3

2.2 MTS1 对细胞超微结构的影响 HO-8910 细胞在转染 MTS1 后其超微结构的变化表现为胞质中可见细胞器明显减少, 内质网扩张, 有较多脂滴及空泡形成, 胞质内溶酶体的数量明显增多, 并可见溶酶体释放后形成的空泡。而 HO-8910 细胞及 8910-pDNA3 细胞胞质内可见少量溶酶体, 线粒体、内质网均无扩张 (Fig 2~4)。



图 2 HO-8910 转染前细胞的超微结构

Fig 2 Normal ultrastructure of HO-8910 before transfected × 5000

图 3 HO-8910 转染空载体后细胞器未见明显异常

Fig 3 Ultrastructure of HO-8910 has not changed obviously after being transfected by pcDNA3 × 7500

图 4 HO-8910 转染 MTS1 后溶酶体明显增多, 线粒体及内质网扩张, 并可见溶酶体释放后形成的空泡

Fig 4 Increasing of lysosome and swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum in HO-8910 after being transfected by MTS1 × 7500

## 3 讨论

MTS1 又称 p16 基因或 CDKN2 基因, 它位于染

色体 9p21, 其编码蛋白 p16 可抑制细胞 CDK4 功能<sup>[1]</sup>。细胞周期蛋白 cyclinD1 与 CDK 结合后能使

Rb 蛋白磷酸化,从而解除其对 DNA 合成所必需的一些酶的抑制作用,这一过程是启动细胞由 G1 期进入 S 期的核心步骤<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3,4]</sup>表明在 G1 期末,当 Rb 受到 cyclinD-CDK4 复合物的磷酸化而失活时 p16 水平就相应增高,于是 p16-CDK4 复合物形成逐渐增多,从而干扰了 CDK4 对 Rb 的磷酸化,这种由 p16, Rb, cyclinD, CDK4 等构成的调节系统不仅在细胞从 G1 期进入 S 期的机制中起一定作用,而且参与了细胞增殖与分化的调控。MTS1 的突变缺失及功能丧失,可能与 Rb 突变一样,破坏了细胞周期的调节平衡,从而导致肿瘤发生,若向肿瘤细胞中转入人正常野生型 MTS1 基因,则可校正这种失衡,抑制肿瘤生长。Hama 等<sup>[5]</sup>将 MTS1 基因转染神经胶质瘤细胞系 U251MG,发现细胞 G1 增殖周期受到抑制。Grigorian 等<sup>[6]</sup>在人乳腺癌细胞中导入 MTS1 基因,结果细胞的恶性表型受到逆转,肿瘤生长受到抑制。在将 MTS1 基因转染到头颈部鳞癌、膀胱癌等的实验研究<sup>[7,8]</sup>中,也均证实了其肿瘤抑制作用,然而目前关于 MTS1 转染卵巢癌方面的研究鲜有报道。

我们在以前研究<sup>[9,10]</sup>的基础上分别用不同方法研究了经 MTS1 转染后人卵巢癌细胞系 HO-8910 的单个细胞增殖力及细胞超微结构的变化。我们发现 8910-p16 的克隆形成率明显低于 8910-pcDNA3 和 HO-8910,说明 MTS1 的转染对卵巢癌细胞的增殖能力有明显影响,而这种影响与空载体无关;此外透射电镜的观察结果也从细胞的超微结构证实了经 MTS1 转染后,HO-8910 细胞的内部结构出现多种变化,胞质内溶酶体的超载预示着细胞死亡的加速,这为 MTS1 在卵巢癌基因治疗方面的应用提供了新

的实验依据

### 参考文献:

- [1] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. *Science*, 1994; 264(3): 436-440
- [2] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age [J]. *Cell*, 1994; 79(4): 573-582
- [3] Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L *et al*. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancer and cell lines [J]. *Cancer Res*, 1995; 55(3): 505-509
- [4] Li Y, Nichols MA, Shay JW *et al*. Transcription repression of the D-type cyclin-dependent kinase p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb [J]. *Cancer Res*, 1994; 54(23): 6078-6082
- [5] Hama S, Sadatomo T, Yoshioka H *et al*. Transformation of human glioma cell lines with the p16 gene inhibits cell proliferation [J]. *Anticancer Res*, 1997; 17(3c): 1933-1938
- [6] Grigorian M, Ambartsumian N, Lykkesfeldt AE *et al*. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 1996; 67(6): 831-841
- [7] Liggett WH Jr, Sewell DA, Rocco J *et al*. p16 and p16 beta are potent growth suppressors of head and squamous carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1996; 56(18): 4119-4123
- [8] Wu Q, Possati L, Montesi M *et al*. Growth arrest and suppression of tumorigenicity of bladder carcinoma cell lines induced by the p16/CDKN2(p16INK4A, MTS1) gene and other loci on human chromosome 9 [J]. *Int J Cancer*, 1996; 65(6): 840-846
- [9] 刘淑娟, 辛晓燕, 胡大海 *et al*. 抑癌基因 MTS1 真核表达载体的构建及其在卵巢癌细胞系 HO-8910 中的表达 [J]. 第四军医大学学报, 1999; 20(4): 348-350
- [10] 刘淑娟, 辛晓燕, 韩军涛 *et al*. 抑癌基因 MTS1 对卵巢癌细胞增殖的影响 [J]. 第四军医大学学报, 1999; 20(4): 351-353

编辑 王 睿

### · 文 摘 · 表皮生长因子受体单克隆抗体抗肺癌作用的研究

[任新玲, 沈丽英, 金伯泉 *et al*. 肿瘤, 2000; 20(1): 35-37]

为观察表皮生长因子受体单克隆抗体(EGFR M cAb) egf/r3 对肺癌的治疗作用, 采用 MTT 法进行体外细胞增殖抑制实验, 裸鼠体内移植瘤采用同时治疗(T1组)与延后治疗(T2组)两种方案。结果 egf/r3 M cAb 对高表达 EGFR 的 SPC-A1 和 A549 肺癌细胞体外均具有增殖抑制作用, 并呈剂量依赖性; 以 SPC-A1 进行裸鼠皮下移植瘤体内实验, 至治疗结束, T1 组 50% 成瘤(3/6), 对照组 100% 成瘤(6/6); 至实验结束, T1 组与 T2 组瘤体抑制率分别为 75% 与 67%, 瘤重抑制率分别为 65% 与 47%。病理切片显示治疗组肿瘤组织局部坏死, 电镜示线粒体凝缩、峭断裂、溶解。认为 egf/r3 M cAb 部分抑制肺癌细胞成瘤, 明显延缓已成瘤肺癌生长, 具有一定的抗肺癌作用。其体内抗肿瘤效果强于体外, 可能与宿主免疫系统参与瘤细胞溶解有关。

(井晓梅 王 睿)