

[文章编号] 1000-1182 2007 06-0540-04

表皮生长因子受体反义cDNA干预喉癌细胞 信号转导的实验研究

鲜均明, 周光耀, 梁传余, 刘世喜

(四川大学华西医院 耳鼻咽喉科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨表皮生长因子受体(EGFR)反义cDNA在体外对人喉癌Hep-2细胞信号转导的干预作用。方法以缺陷重组腺病毒为载体,构建EGFR正、反义cDNA的重组腺病毒,并在人胚肾母细胞(HEK293)中包装、纯化。将已纯化的EGFR cDNA重组腺病毒在体外转染人Hep-2喉癌细胞,采用MTT法检测重组腺病毒对Hep-2细胞的生长抑制作用、流式细胞术检测细胞周期DNA表达的变化、Western blot方法检测Hep-2细胞内EGFR蛋白的表达。结果成功地构建并制备了高滴度的EGFR cDNA 1 032 bp片段的正、反义重组腺病毒。同时,它们能被高效地转移到Hep-2细胞内,其中反义重组腺病毒能够抑制Hep-2细胞的增殖和EGFR蛋白的表达。结论 EGFR反义cDNA能有效地干预人喉癌Hep-2细胞的细胞周期信号转导机制,从而抑制肿瘤细胞的增殖。

[关键词] 表皮生长因子受体; 信号转导; 喉癌

[中图分类号] R782 [文献标识码] A

Study on interference therapy induced by epidermal growth factor receptor-antisense cDNA in signal transduction of laryngeal squamous cell carcinoma XIAN Jun-ming, ZHOU Guang-yao, LIANG Chuan-yu, LIU Shi-xi. (Dept. of Otolaryngology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate effect of interference therapy induced by epidermal growth factor receptor (EGFR)-antisense cDNA in signal transduction of Hep-2 laryngeal squamous cell carcinoma in vitro. Methods AdEasy Vector System was used to construct the recombinant adenovirus vector sense/antisense-pAdEasy-EGFR. The recombinant adenovirus vector introduced EGFR-sense/antisense cDNA fragment into HEK293 cell. The purified recombinant adenovirus sense/antisense-pAdEasy-EGFR transfected Hep-2 cells in vitro. The inhibition of EGFR protein expression and proliferation of Hep-2 cells, the changes of cell cycle and DNA content in Hep-2 cells were examined by MTT, Western blot analysis, flow cytometry assay, and immunocytochemistry respectively. Results The higher titre sense and antisense mRNA expression recombinant adenovirus containing 1 032 bp EGFR-cDNA was constructed and prepared successfully. When antisense-pAdEasy-EGFR was transferred into Hep-2 cells the inhibition of cell proliferation and EGFR protein expression in Hep-2 cells were investigated effectively. Conclusion The antisense-pAdEasy-EGFR effectively interfere the Hep-2 signal transduction pathway and induce apoptosis which results in inhibiting proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma.

[Key words] epidermal growth factor receptor; signal transduction; laryngeal squamous cell carcinoma

喉癌发生、进展和转归均有关键分子的遗传学变化及细胞信号转导障碍。然而在这众多分子变化中,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因的改变最为突出。目前发现EGFR在头颈鳞癌中存在过表达,特别是在喉癌中其过表达频率高达80%,并且与喉癌的发生发展密切相关。

因此,本研究通过构建EGFR部分cDNA反义序列重组腺病毒,从干预细胞信号转导和细胞周期调控的角度来研究在喉癌细胞中EGFR反义cDNA所参加的各种分子事件,为喉癌的个体化基因治疗研究开辟一个新的突破点。

1 材料和方法

1.1 主要材料

腺病毒载体AdEasy Vector System(Stratagen公司,美国),带有绿色荧光蛋白(green fluorescent

[收稿日期] 2006-11-21; [修回日期] 2007-05-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(0040205401078);四川省青年科技基金资助项目(04ZQ026-024)

[作者简介] 鲜均明(1968-),男,四川人,主治医师,博士

[通讯作者] 刘世喜, Tel: 13982063567

protein, GFP)基因的穿梭质粒pAdTrack-CMV(卡那霉素抗性)、大肠杆菌BJ5188(成都地奥制药集团有限公司药物研究所保存),限制性内切酶Bgl^Ⅱ、Hind^Ⅲ、Pme^Ⅰ、Pac(大连Takara生物工程有限公司),大量质粒纯化试剂盒Promega公司(美国),病毒纯化试剂盒BD-Clontech公司(美国);带人EGFR基因cDNA的重组质粒pEGFR-CXN(由澳大利亚Danmercola提供),人喉癌Hep-2细胞株(由中国科学院上海细胞生物研究所提供)。

1.2 EGFR正、反义cDNA重组腺病毒载体的构建、扩增及纯化

从质粒pEGFR-CXN提取、鉴定及定量1 032 bp的EGFR cDNA片段。按参考文献[1]提取载体质粒AdTrack-CMV、pAdEasy-1 DNA,经酶切鉴定、定量后,进行1 032 bp的EGFR cDNA片段去磷酸化、线性化、连接。按腺病毒载体说明方法^[2]进行EGFR cDNA片段同源重组以及PCR、酶切筛选。若Hind^Ⅲ酶切产生单一片段且大于空载体,则判断为重组质粒;若EcoR^Ⅰ酶切产生一大一小片段(3 047 bp与7 215 bp),则为反向插入(antisense);若产生片段为3 957 bp与6 295 bp,则为正向插入(sense)。

按参考文献[3]方法在大肠杆菌BJ5183中构建同源重组腺病毒质粒AdEasy-GFP-sense/antisense-EGFR,并转染HEK293细胞,荧光显微镜监测GFP表达,观察细胞病变情况。HEK293细胞中反复扩增病毒至所需滴度。另设未含sense/antisense-EGFR基因片段的重组腺病毒AdEasy-GFP作为阴性对照。同时,蛋白酶K处理重组腺病毒,PCR电泳鉴定。

采用荧光计数检测法检测重组腺病毒的滴度以确定包装是否成功。按不同稀释度稀释病毒液接种HEK293细胞,荧光显微镜下计数发绿色荧光的细胞,通过观察24 h后带绿色荧光细胞的数量以确定病毒滴度。用病毒纯化试剂盒从收获的病毒上清液及细胞培养上清液收集纯化的病毒颗粒,1个发光的细胞即为1个表达单位(expression-forming units, efu)。按下列:病毒滴度(efu/mL)=发绿色荧光的细胞数×病毒稀释倍数×0.25计算病毒滴度。

1.3 人喉癌细胞Hep-2的培养及分组

按参考文献[4]方法常规传代和培养人喉癌细胞Hep-2。将细胞分为EGFR正、反义cDNA重组腺病毒组、重组腺病毒空载体组、PBS阴性对照组4组进行下面实验的检测。

1.4 重组腺病毒转染Hep-2细胞的免疫化学检测

常规方法将Hep-2细胞消化成单细胞,将细胞以 3×10^5 个/孔接种至6孔板,培养24 h,待细胞完全贴壁后,吸去上清液。4组细胞分别加入EGFR正、

反义cDNA重组腺病毒上清液,重组腺病毒空载体上清液及PBS阴性对照,24 h后终止作用。固定盖玻片,对细胞进行免疫化学检测。

1.5 MTT法检测重组腺病毒转染Hep-2细胞的生长

具体方法参见参考文献[5]。用体积分数为0.25%的胰蛋白酶常规消化Hep-2喉癌单层培养细胞,配成单个细胞悬液,倒置显微镜下计数细胞。以每孔 1×10^3 个细胞,体积100 μ L的Hep-2单个细胞悬液接种于96孔培养板,常规培养细胞。吸去培养液,待细胞贴壁后,加入EGFR正、反义cDNA重组腺病毒上清液、重组腺病毒空载体上清液、PBS阴性对照,每一组按所需观察的时间分为4组,每天一组,每组3个副孔。转染培养24 h后,每隔24 h加入MTT 20 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育4 h,加二甲亚砜 200 μ L/孔,终止作用。避光过夜,置酶标仪测550 nm时的吸光度值,去除本底光吸收值后,以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长抑制曲线。

1.6 重组腺病毒转染Hep-2细胞的细胞周期测定

将重组腺病毒转染Hep-2并制成单细胞悬液,经体积分数为70%的乙醇-20 $^{\circ}$ C固定过夜。与PI染色液(质量浓度为33 mg/L PI,质量浓度为0.13 g/L RNaseA,浓度为10 mmol/L EDTA,体积分数为0.5% TritonX-2100)室温孵育30 min,采用流式细胞术对细胞周期各期细胞的百分比进行检测。

1.7 重组腺病毒转染Hep-2细胞的Western blot印迹分析

按照常规方法转染提取Hep-2细胞蛋白^[6]后进行Western blot印迹分析。一抗(兔抗人EGFR多克隆抗体)稀释为1 300,二抗稀释为1 200,辣根过氧化物酶标记二抗。

1.8 统计学分析

采用SPSS 10.05统计软件包,对MTT实验结果进行双侧正态性t检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。细胞周期分析采用Multicycle软件进行拟合处理。

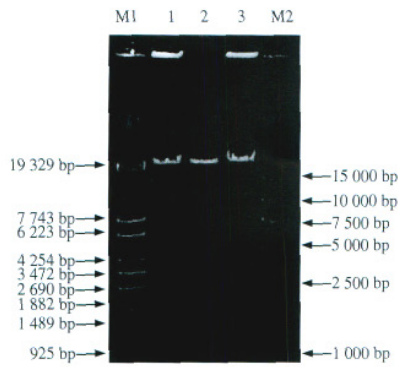
2 结果

2.1 pAdEasy-EGFR重组质粒鉴定

pAdEasy-EGFR重组质粒经Pac^Ⅰ酶切,可见重组质粒产生了相对分子质量约为 3.3×10^4 和 4.5×10^3 的两个片段,而空质粒载体仅一个大片段(图1),表明重组成功。

2.2 pAdEasy-EGFR重组质粒转染HEK293细胞

重组质粒Pac^Ⅰ酶切、纯化后转染HEK293细胞,4~5 d后可见明显的细胞病变,5 d后GFP表达明显(图2、3)。蛋白酶K处理重组质粒,PCR扩增片段大小为1 024 bp(图4)。



M1: λ -EcoT14 Digest DNA Marker; 1, 3: antisense-pAdEasy-EGFR; 2: sense-pAdEasy-EGFR; M2: DL15000 DNA Marker

图1 Pac I酶切鉴定pAdEasy-EGFR重组质粒结果

Fig 1 Identification of pAdEasy-EGFR plasmid with Pac I incision enzyme

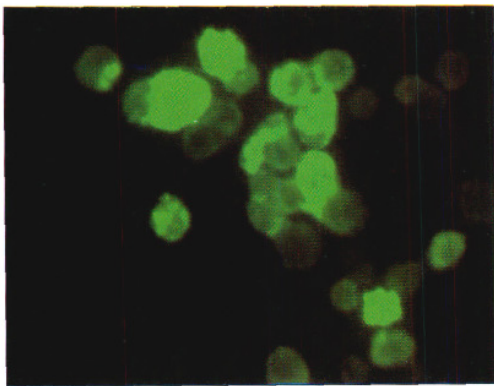


图2 反义pAdEasy-EGFR重组质粒转染HEK293细胞后, 细胞内GFP表达 荧光显微镜 $\times 400$

Fig 2 GFP expression in HEK293 after transfection with antisense-pAdEasy-EGFR fluorescence microscope $\times 400$

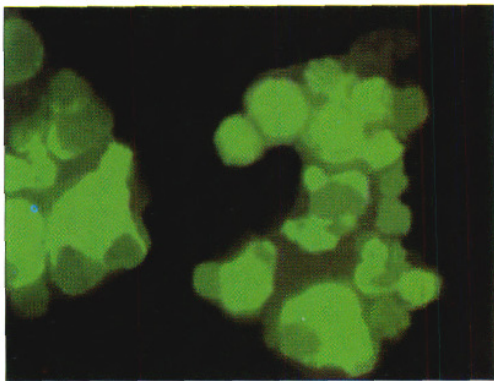


图3 正义pAdEasy-EGFR重组质粒转染HEK293细胞后, 细胞内GFP表达 荧光显微镜 $\times 400$

Fig 3 GFP expression in HEK293 after transfection with sense-pAdEasy-EGFR fluorescence microscope $\times 400$

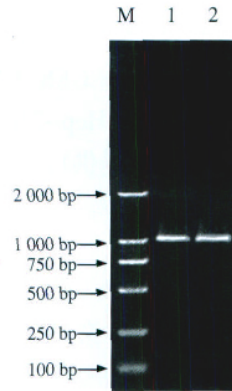
2.3 pAdEasy-EGFR重组质粒的滴度值

纯化前正义重组质粒的滴度为 1.8×10^8 , 反义为 1.6×10^8 。经腺病毒纯化试剂盒纯化浓缩后的正义、反义重组质粒的滴度分别为 2.2×10^9 和 2.5×10^9 。

2.4 pAdEasy-EGFR重组质粒转染Hep-2细胞的免疫化学分析

EGFR正义cDNA重组腺病毒组转染Hep-2培养

细胞后, EGFR表达升高, 其表达呈现细胞特异性细胞质、细胞膜棕黄色染色(图5), 阳性表达高达87.32%。而EGFR反义cDNA重组腺病毒组、重组腺病毒空载体组、PBS阴性对照组载玻片细胞均为阴性(图6)。



M: DL2000 DNA Marker; 1: 反义pAdEasy-EGFR; 2: 正义pAdEasy-EGFR

图4 pAdEasy-EGFR重组质粒上清液PCR结果

Fig 4 Results of detection of pAdEasy-EGFR

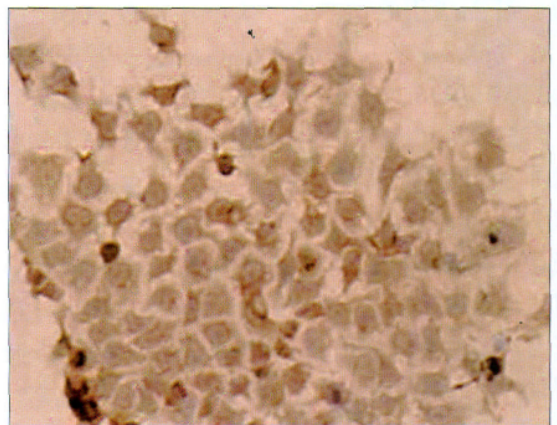


图5 EGFR正义cDNA重组腺病毒组转染Hep-2细胞后EGFR蛋白阳性表达 SP $\times 200$

Fig 5 EGFR positive expression in Hep-2 cell transfected by sense-pAdEasy-EGFR SP $\times 200$

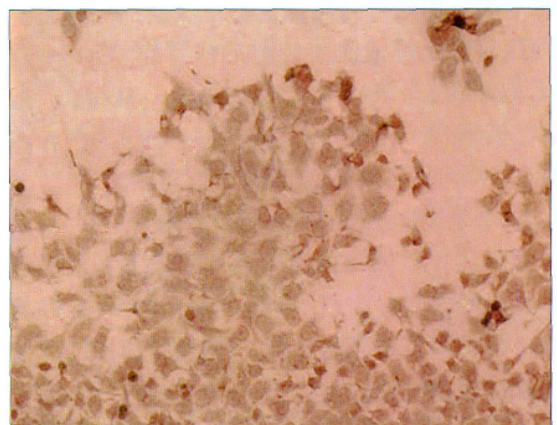


图6 EGFR反义cDNA重组腺病毒组转染Hep-2细胞后EGFR蛋白阴性表达 SP $\times 200$

Fig 6 EGFR negative expression in Hep-2 cell transfected by antisense-pAdEasy-EGFR SP $\times 200$

2.5 pAdEasy-EGFR重组质粒转染Hep-2细胞的生长抑制分析

与EGFR正义cDNA重组腺病毒组、重组腺病毒空载体组、PBS阴性对照组比较,EGFR反义cDNA重组腺病毒组对细胞生长抑制作用明显高于其他组(图7)。

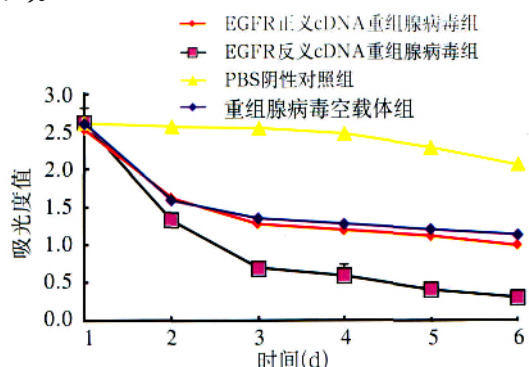


图7 pAdEasy-EGFR重组质粒转染Hep-2细胞的生长抑制变化
Fig 7 The inhibition of growth in Hep-2 cell transfected by pAdEasy-EGFR

2.6 pAdEasy-EGFR重组质粒转染Hep-2细胞的流式细胞术分析

重组质粒空载体处理细胞后,S期细胞百分比增加,最高达30.30%,G₂/M期细胞可高达24.60%,G₀/G₁期细胞不同程度下降。EGFR正义cDNA重组腺病毒组转染细胞后,G₁期细胞低达51.50%,S期细胞高达23.70%,G₂/M期细胞高达26.4%。EGFR反义cDNA重组腺病毒组转染细胞后,G₁期细胞高达80.30%,S期细胞低达13.90%,G₂/M期细胞低达5.30%。

2.7 pAdEasy-EGFR重组质粒转染Hep-2细胞的Western blot印迹分析

EGFR正义cDNA重组腺病毒组Hep-2细胞可见EGFR蛋白强表达,而EGFR反义cDNA重组腺病毒组Hep-2细胞EGFR表达明显减弱(图8)。



1, 2: EGFR正义cDNA重组腺病毒组; 3: EGFR反义cDNA重组腺病毒组

图8 Western blot检测Hep-2细胞EGFR蛋白表达

Fig 8 EGFR protein expression in Hep-2 cell assayed by Western blot

3 讨论

细胞周期的调控模式显示,不同周期时相之间的转换存在若干个关卡,它们的调控具有特殊的生物学意义^[7-8],它们通过检测细胞分子事件的程序来确保细胞周期转换的正确性^[9]。其中以G₁/S期和G₂/M期期相转换间的关卡调控最为重要。研究发现,细胞周期由G₁期进入S期存在一个特殊限制点,如果G₁/S限制点调控功能丧失,此时细胞不发生G₁期阻滞,细胞基因组DNA变异而不能被修复或清除,进而导致细胞增殖失控,导致肿瘤的发生。

细胞的功能活动受信号转导通路的调控,精细调节的信号转导是正常生命活动的前提,而信号转导的异常可以导致病理过程。大量证据^[10-13]显示,许多肿瘤(包括喉癌)的发生与控制细胞生长、增殖和死亡的信号转导通路发生障碍有关。EGFR与酶联受体介导的信号转导有关,信号分子通过与相应的受体结合传递信号。针对信号转导通路中发生异常的环节来干预这种不正常的信号转导,以逆转肿瘤细胞恶性表型,可以达到抑制肿瘤生长的目的。

EGFR主要通过Ras/MAPK系统、PI3K/AKT系统和PLC/PKC系统实现信号传导的级联放大效应,将有丝分裂信号从细胞外传递到细胞内,调节正常细胞的生长、分化,调控细胞周期,促进损伤修复。用单克隆抗体阻止EGFR配体结合,可抑制G₁期细胞周期蛋白依赖激酶的活化,引起细胞阻滞于G₁期^[14]。阻断EGFR活性的另一途径是用反义寡核苷酸阻断EGFR mRNA翻译,本实验基于细胞信号转导理论,利用EGFR反义寡核苷酸使喉癌细胞阻滞于G₁期,抑制或控制肿瘤细胞的增殖。即该腺病毒将EGFR反义cDNA基因片段导入人喉癌细胞株后,使其互补结合EGFR基因的第二个内含子与外显子的连接区域,降低EGFR蛋白的产生,干预EGFR信号转导途径,抑制肿瘤细胞生长。

研究发现,转染24 h后细胞生长逐渐被抑制,并随时间的延长抑制作用明显增强,且随着转染复数的提高细胞被抑制的程度升高。利用Western blot技术检测转染细胞内EGFR蛋白表达被明显抑制。采用流式细胞术检测到转染Hep-2细胞大部分被阻滞于G₁期,同时诱导Hep-2细胞的凋亡,从而抑制或控制肿瘤细胞的增殖,这在单克隆抗体阻断结肠癌细胞EGFR信号转导通路的实验中得到了证实^[15]。未转染EGFR反义cDNA则出现异倍体Hep-2细胞,且具有G₂/M峰,S期DNA表达增加。

子被GIC中的聚丙烯酸溶解出来,极大地提高了缺损区局部的钙、磷离子浓度;同时牙体组织自身的HAP也能被聚丙烯酸溶解,残缺的晶体可以重新再矿化;另外,纳米羟磷灰石还可直接封闭牙本质小管,达到较好的矿化效果。因此,复合nano-HAP的GIC可以有效地封闭和修复缺损的牙体组织,可用作牙齿洞衬、垫底或预防性充填材料。

[参考文献]

- [1] 李雪, 胡德渝, 万呼春, 等. 非创伤性充填龋坏乳牙效果观察[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(2):125-128.
LI Xue, HU De-yu, WAN Hu-chun, et al. A two-year clinical trial of atraumatic restorative treatment in primary teeth[J]. West China J Stomatol, 2002, 20(2):125-128.
- [2] Ersin NK, Candan U, Aykut A, et al. A clinical evaluation of resin-based composite and glass ionomer cement restorations placed in primary teeth using the ART approach: Results at 24 months[J]. J Am Dent Assoc, 2006, 137(11):1529-1536.
- [3] Schek RM, Tabcas JM, Hollister SJ, et al. Tissue engineering osteochondral implants for temporomandibular joint repair[J]. Orthod Craniofac Res, 2005, 8(4):313-319.
- [4] Dorfer CE, Staehle HJ, Wurst MW, et al. The nandleakage phe-

- nomenon: Influence of different dentin bonding agents, thermocycling and etching time[J]. Eur J Oral Sci, 2000, 108(4):346-351.
- [5] Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers[J]. J Dent Res, 1998, 77(12):2012-2019.
 - [6] Tjandrawinata R, Irie M, Yoshida Y, et al. Effect of adding spherical silica filler on physico-mechanical properties of resin modified glass-ionomer cement[J]. Dent Mater J, 2004, 28(2):146-154.
 - [7] Guida A, Hill RG, Towler MR, et al. Fluoride release from model glass ionomer cements[J]. J Mater Sci Mater Med, 2002, 18(7):645-649.
 - [8] Exterkate RA, Damen JJ, Cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro[J]. Caries Res, 2005, 39(6):509-513.
 - [9] Lucas ME, Arita K, Nishino M. Toughness, bonding and fluoride-release properties of hydroxyapatite-added glass ionomer cement[J]. Biomaterials, 2003, 24(21):3787-3794.
 - [10] Ploch T, Staehle HJ, Duschner H, et al. Nandleakage at the composite-dentin interface: A review[J]. Am J Dent, 2001, 14(4):252-258.

(本文编辑 李 彩)

(上接第 543 页)

综上所述,重组腺病毒EGFR反义cDNA可以高效地转染人喉癌Hep-2细胞,从而有效地抑制细胞EGFR的表达,诱导细胞凋亡,将更多的细胞阻滞在G₀-G₁期,抑制细胞增殖。因此笔者认为EGFR反义cDNA引入Hep-2细胞后,能从细胞信号转导的角度来阻断肿瘤细胞的无限增殖,实现细胞信号转导的干预治疗,为肿瘤的基因治疗提供新思路。

[参考文献]

- [1] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line[J]. Science, 1992, 258(5088):1650-1654.
- [2] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenovirus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5):2509-2514.
- [3] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids[J]. Gene, 1990, 96(1):23-28.
- [4] Ma CH, Hui J, Tang JT, et al. Antibodies to guanosine triphosphate misidentified as anti-double-stranded DNA antibodies in a patient with antinuclear antibody-negative lupus, due to buckling of insolubilized assay DNA[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(5):1533-1538.
- [5] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(4):1456-1462.
- [6] Wiedeman JA, Kaul R, Heuer LS, et al. Tobacco smoke induces persistent infection of Chlamydia pneumoniae in HEP-2 cells[J]. Microb Pathog, 2004, 37(3):141-148.

- [7] Kamb A. Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1998, 227(7):139-148.
- [8] Nasmyth K, Hunt T. Cell cycle. Dams and sluices[J]. Nature, 1993, 366(6456):634-635.
- [9] Capodici P, Donovan M, Buchinsky H, et al. Gene expression profiling in single cells within tissue[J]. Nat Methods, 2005, 2(9):663-665.
- [10] Takeyama K, Jung B, Shim JJ, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 280(1):L165-L172.
- [11] Leikauf GD, Borchers MT, Prows DR, et al. Mucin apoprotein expression in COPD[J]. Chest, 2002, 121(5 Suppl):166S-182S.
- [12] Wang B, Lim DJ, Han J, et al. Novel cytoplasmic proteins of nontypeable Haemophilus influenzae up-regulate human an MUC5-AC mucin transcription via a positive p38 mitogen activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway[J]. J Biol Chem, 2002, 277(2):949-957.
- [13] Hunter T. Braking the cycle[J]. Cell, 1993, 76(5):839-841.
- [14] Nagy P, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Small interfering RNA suppresses the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells[J]. Exp Cell Res, 2003, 286(1):39-49.
- [15] Hirata A, Ogawa S, Komatani T, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase[J]. Cancer Res, 2002, 62(9):2554-2560.

(本文编辑 汤亚玲)