

[文章编号 1000-1182(2004)02-0109-03]

nm23-h1 转染腺样囊性癌细胞及其增殖能力的实验研究

李文¹, 温玉明², 王力红¹, 杨湛³, 张瑞林⁴

(1. 四川大学华西医院 耳鼻喉科, 四川 成都 610041;

2. 四川大学华西口腔医学院 颌面外科教研室, 四川 成都 610041;

3. 昆明医学院附一院 颌面外科, 云南 昆明 650031; 4. 成都市第二人民医院 耳鼻喉科, 四川 成都 610017)

[摘要] 目的 考察 nm23-h1 导入腺样囊性癌细胞(ACC-M)后对其体内、外增殖的影响。方法 以阳离子脂质体(lipofectamine)介导 nm23-h1 转染 ACC-M 细胞, 体外培养并用 G418 培养基筛选, 体外观察转染组生长情况, 并用细胞爬片免疫组化 ABC 法染色 Ki67 单克隆抗体; 将 nm23-h1 阳性表达的 ACC-M 植入 10 只裸鼠皮下, 同时以未转染的 ACC-M 作对照, 观察肿瘤大小。4 周后处死动物, 获取标本, 常规固定、包埋、切片后采用免疫组化 LsAB 法研究 Ki67 的表达并用流式细胞仪对转染组和非转染组的移植瘤进行细胞周期时相分析。结果 体外培养转染组细胞生长较未转染组慢, 这种趋势随着转染组传代次数的增加而更加明显, Ki67 呈阳性表达, 未转染组 Ki67 呈部分阳性表达; 转染组 ACC-M 体内移植瘤早期(2 周)生长缓慢, 2 周后生长无统计学差异($P > 0.05$), 细胞周期时相分析结果与之一致。组织切片显示瘤体 Ki67, nm23-h1 表达均为阴性。结论 nm23-h1 的导入可能对 ACC-M 细胞增殖具有短时间的抑制作用。

[关键词] nm23; 增殖; 基因治疗

[中图分类号] R 782 **[文献标识码]** A

In vitro and in vivo Study on Proliferation of Adnoid Cystic Carcinoma Cell Lines after nm23-h1 Introduction LI Wen¹, WEN Yu-ming², WANG Li-hong¹, YANG Zhan³, ZHANG Rui-lin⁴. (1. Dept. of Otolaryngology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Kunming Medical College, Kunming 650031, China; 4. Dept. of Otolaryngology, The Second Renmin Hospital of Chengdu City, Chengdu 610017, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of nm23-h1 transfection on proliferation characteristics of adnoid carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. **Methods** *In vitro* ACC-M cell lines were incubated after putative anti-metastatic gene nm23-h1 was introduced into the cells with the help of G418 selective incubation base. The ACC-M cells were transplanted into 10 BALB/C nude mice subcutaneously and non-transfected cell lines were taken as control. Immunohisto chemistry and Ki67 antibody were employed to study the proliferation character of cell crawling pieces and paraffin-bedded slice, meanwhile, the solid tumor of both groups were prepared for flow cytometry(FCM). **Results** Transfected cells grew slower than non-transfected cells and this trend became more obvious as passages passed on. *In vitro* the expression of Ki67 of transfected cells was little stronger than non-transfected cells, while the expression of Ki67 in solid slices was almost negative in both groups. Transfected cells presented slower growth than non-transfected cells in the early stage(2 weeks) and 2 weeks later there was no obvious difference in size($P > 0.05$). FCM value accorded well with the result. **Conclusion** Introduction of nm23-h1 into the ACC-M cell lines may have transient inhibitory effects on its proliferation.

[Key words] nm23; proliferation; gene therapy

目前, nm23 基因在恶性肿瘤细胞增殖、分化和转移中的作用已受到广泛重视。研究发现¹, 人类基因组中有 8 个不同亚型的 nm23 基因, 其中以 nm23-h1

和 nm23-h2 发现最早, 研究最多。目前的研究使多数学者认为 nm23-h1 基因主要发挥抑制肿瘤转移的作用, 并部分参与了肿瘤细胞增殖、分化的调控。在涎腺腺样囊性癌 nm23-h1 表达与肺转移的研究中也发现², 有肺转移患者原发灶肿瘤中 nm23 的阳性表达率为 12.5%, 而无转移患者的阳性表达率为 88.2%, 二者有显著性差异。本实验采用阳离子脂质体介导 nm23-h1 质粒转染 ACC-M 细胞, 初步研究 ACC-M 细

[收稿日期 2003-06-19; 修回日期 2003-11-26]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39870746)

[作者简介] 李文(1968-), 男, 四川人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 李文, Tel: 028-85422436

胞在体内、外的增殖情况。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/C 裸小鼠(四川大学华西医学动物实验中心提供动物及饲养条件),腺样囊性癌细胞株 ACC-M(上海第二医科大学口腔颌面外科教研室提供),nm23 质粒(Steeg PS 惠赠),Lipofectamine(GIBCO BRL Cationic Lipid 公司,德国),Ki67,nm23-h1 单克隆抗体(SANTA CRUZ 公司,美国)。

1.2 体外细胞转染及培养方法

ACC-M 细胞转染方法参照 Lipofectamine 说明书进行,G418 筛选维持浓度为 300 mg/L。

1.3 动物实验方法

选用 6 周龄 BALB/C 雌性裸鼠 20 只,随机分为甲、乙 2 组,每组 10 只。将转染及未转染的腺样囊性癌细胞株 ACC-M 体外培养至对数生长期后经 0.125%胰酶消化,Hank's 液洗 3 次后,浓度调节为每毫升 1×10^6 ,甲组每只裸鼠颌面部皮下注射 0.5 ml 未转染的 ACC-M,乙组每只裸鼠颌面部皮下注射 0.5 ml 已由阳离子脂质体介导 nm23-h1 质粒转染经免疫组化证实呈 nm23-h1 阳性表达的腺样囊性癌细胞株 ACC-M。每天观察肿瘤生长情况,游标卡尺测量瘤体大小(平均直径),30 d 后处死动物,获取肿瘤标本,部分 10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋后作苏木精-伊红及 Ki67 及 nm23-h1 免疫组化染色。

1.4 免疫组化染色

细胞爬片及瘤体组织切片采用 LsAB 法进行免疫组化染色,所有实体瘤石蜡包埋标本切成 4 μ m 厚的切片,56 溶蜡,二甲苯脱蜡,逐级酒精水化,高压锅热修复抗原。0.03% H_2O_2 甲醇 30 min 阻断内源性过氧化物酶,异种动物血清封闭 10 min,一抗浓度 1:50,二抗浓度 1:100,加一抗后 4 过夜,再加二抗及 LsAB 试剂,DAB 显色 5 min,苏木素复染 3 min,常规脱水、透明、树胶封片,光镜观察。细胞爬片标本经风干、丙酮固定后,其余操作与石蜡切片过程相同。

1.5 细胞周期时相分布测定

转染组及非转染组皮下移植瘤经 150 目金属网研磨滤过,0.125%胰酶消化 3 min,再经 150 目金属网滤过,制成单细胞悬液。离心 5 min(1 500 r/min),弃上清,PBS 洗 1 次;1% Triton-100 2 ml 洗 10 min,加入 0.1% Rnase 2 ml,37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min,加入 0.05% Propidium Iodide 2 ml,4 $^{\circ}$ C 静置 20 min,上机测试。

2 结果

2.1 体外细胞培养大体观察及 Ki67 免疫组化染色

在 nm23-h1 转染早期,转染组 ACC-M 细胞生长

速度、细胞形态与未转染的原代细胞对照组无明显差异,随着转染组传代次数的增加,转染组细胞生长较未转染组慢。免疫组化转染组 Ki67 呈阳性表达(图 1),未转染组 Ki67 呈部分阳性表达,部分阴性表达。



图 1 nm23-h1 转染组 Ki67 呈强阳性表达 LsAB $\times 400$

Fig 1 Strongly positive expression of Ki67 of nm23-h1 transfected group LsAB $\times 400$

2.2 体内移植瘤的生长情况及 Ki67 免疫组化染色

肿瘤在裸鼠皮下移植后第 5 天,可扪及瘤结节形成,转染组 ACC-M 体内移植瘤早期(2 周)生长缓慢,与未转染组之间有显著性差异($P < 0.05$),2 周后两组生长无统计学差异($P > 0.05$)(表 1)。组织切片显示瘤体 Ki67 表达均为阴性(图 2)。

表 1 ACC-M 转染组及非转染组体内移植瘤大小比较($n = 10, mm, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the size of transplanted tumor between transfected and nontransfected ACC-M($n = 10, mm, \bar{x} \pm s$)

分 组	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天
转染组	3.20 \pm 0.63	6.40 \pm 0.79	9.60 \pm 1.23	12.20 \pm 0.78	17.60 \pm 1.72
非转染组	5.60 \pm 0.34	8.50 \pm 0.58	13.30 \pm 0.80	15.20 \pm 0.96	18.00 \pm 0.69

2.3 细胞周期时相分析

两组细胞的 G_0/G_1 期比例最高达 60.4%,各期细胞分布差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

尽管大多数研究表明,nm23-h1 与乳腺癌、胰腺癌、胃癌、宫颈腺癌的转移呈负相关,但在前列腺癌、非小细胞肺癌、宫颈鳞状细胞癌的研究结果表明¹,nm23-h1 与转移无关。同样,nm23-h1 对细胞增殖及分化的研究结果也不尽一致,甚至在同一种细胞的不同阶段,细胞的生长、增殖水平与 nm23-h1 的表达也不呈平行关系。

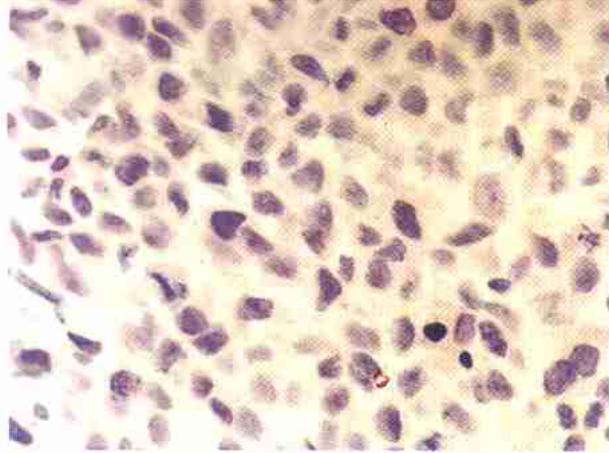


图2 体内移植瘤组织切片显示瘤体 Ki67 表达为阴性 LsAB ×400

Fig 2 Negative expression of Ki67 of solid tumor slice in transplanted tumor LsAB ×400

表2 ACC-M 转染组及非转染组体内移植瘤细胞周期时相分布 (n = 10, %)

Tab 2 Distribution of cell cycle phase between transfected and nontransfected ACC-M of transplanted tumor (n = 10, %)

分 组	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
转 染 组	45.3 ±4.3	42.8 ±2.1	12.7 ±1.9
非转染组	54.6 ±7.2	46.7 ±0.7	15.3 ±1.5

细胞增殖的抑制是完成细胞分化的重要步骤^{3,4}。Cipollini 等⁵用反义寡核苷酸短暂抑制 nm23-h1 的表达,观察到对细胞生长的轻微抑制,将表达 nm23-h1 mRNA 的反义基因转染 MCF10A 细胞,发现转染组的细胞增殖活性持续低于未转染的对照组。nm23-h1 在 S 期表达达到峰值,而在 G₀/G₁ 期表达水平较低,提示 nm23-h1 的表达与细胞生长状态密切相关,其表达水平与嘧啶合成的 S 期分数呈平行关系。Caligo 等⁶发现 nm23-h1 mRNA 的量与乳腺癌细胞生长速度呈正相关,但在淋巴结转移灶或其他转移灶中,癌细胞的生长速度与 nm23-h1 的表达无此关系。此外,相对于原发灶,转移灶细胞亚群的 nm23-h1 的表达更低,增殖活性更高。Igawa 等⁷研究 nm23-h1 与 PCNA 基因在人前列腺癌中的关系,结果表明 nm23-h1 的表达与 PCNA 基因表达呈显著正相关 ($P < 0.01$),就 nm23-h1 的表达与 PCNA 的表达方面与 Cipollini 以及 Caligo 等的结果类似。但其研究中前列腺癌的转移灶 nm23-h1 呈强阳性,在正常前列腺及临界瘤中, nm23-h1 的表达明显低于原发灶癌细胞 ($P < 0.01$),而且临床研究表明, nm23-h1 在乳腺癌和前列腺癌中与转移抑制的关系迥异,因而这种单方面的一致性并不能说明 nm23-h1 的表达增加,肿瘤细胞

的增殖潜能增加。有学者的研究结果证实这一推测。Huijzer 等⁸在小鼠 B16-BL6 高转移和低转移两株细胞研究中发现, nm23-h1 基因表达与细胞增殖活性有密切关系,细胞增殖活性的提高导致 nm23-h1 基因表达下降 2 倍。

Ki67 抗原存在于人类所有增殖细胞的整个细胞周期中(G₀, S, G₂, M 期),只在 G₀ 期缺乏,有作者发现 Ki67 抗原的数量随细胞周期的时相而改变。本研究提示 Ki67 表达增加, ACC-M 的增殖能力反而下降;而当两组移植瘤中 Ki67 及 nm23-h1 表达阴性时,其增殖活性没有统计学意义,这可能意味着随着 nm23-h1 表达降低,其对 ACC-M 的生长抑制减弱。

nm23-h1 基因调控增殖机制估计与 NDPK 特殊活性和信号传导系统的调节有关¹。也有学者认为, nm23-h 基因通过 p53 部分参与肿瘤细胞增殖的调节。本实验前期研究表明⁹, nm23-h1 在 ACC-M 体外培养的表达增加抑制了细胞增殖;而在体内早期的生长抑制则促进了分化。nm23-h1 对细胞增殖的影响除了在不同肿瘤中存在较大差异外,细胞生长的微环境可能是 nm23-h1 在体内外作用差异的重要因素。

[参考文献]

- 1] 杨 湛,温玉明,王昌美. nm23 基因调控机理的研究进展 J. 国外医学口腔医学分册,1998,25(6):323-326.
- 2] 史宏男,何荣根,邱蔚六,等. nm23 基因在腺样囊性癌中的表达及其与肺转移的关系 J. 中华口腔医学杂志,1997,32(1):4-6.
- 3] Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. nm23: Unraveling its biological function in cell differentiation J. J Cell Physiol, 2000, 182 (2):144-149.
- 4] 罗深秋主编. 医用细胞生物学 M. 北京:军事医学科学出版社,1998:60-126.
- 5] Cipollini G, Berti A, Feore L, et al. Down-regulation of the nm23-H1 gene inhibits cell proliferation J. Int J Cancer, 1997, 73 (2):297-302.
- 6] Caligo MA, Cipollini G, Berti A, et al. nm23 gene expression in human breast carcinomas: Loss of correlation with cell proliferation in the advanced phase of tumor progression J. Int J Cancer, 1997, 74 (1):102-111.
- 7] Igawa M, Urakami S, Shiina H, et al. Association of nm23 protein levels in human prostates with proliferation cell nuclear antigen expression at autopsy J. Eur Urol, 1996, 30 (3):383-387.
- 8] Huijzer JC, McFarland M, Niles RM, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate enhances nm23 gene expression in murine melanocytes but not in syngeneic B16-BL6 melanoma variants J. J Cell Physiol, 1996, 166(3):487-494.
- 9] 温玉明,李 文,王昌美. NM23-H1 基因导入对腺样囊性癌分化的影响 J. 临床口腔医学杂志,2001,17(3):363-365.

(本文编辑 汤亚玲)