

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0475-04

nm23-H1提高舌癌细胞Tca8113对 顺铂化疗敏感性可能机制的研究

鄧克謙¹, 任文豪¹, 溫玉明², 苗群愛³, 李 宏⁴

(1.西安交通大学口腔医院 口腔颌面外科, 陕西 西安 710004;

2.四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041;

3.西安交通大学口腔医院 牙周黏膜科, 陕西 西安 710004; 4.兰州军区解放军临潼疗养院 口腔科, 陕西 临潼 710600)

[摘要] 目的 研究nm23-H1提高顺铂化疗敏感性的可能机制。方法 实验分为nm23-H1转染组和未转染组, 用MTT法检测顺铂对舌癌细胞的杀伤率; 流式细胞仪检测细胞凋亡变化; 用流式细胞仪检测线粒体结合罗丹明荧光强度, 检测线粒体膜电位的变化; 等质谱仪检测细胞内铂离子浓度变化。结果 nm23-H1过表达可以明显提高顺铂对舌癌细胞的杀伤率, 使细胞凋亡增强, 线粒体膜电位降低, 提高细胞内铂离子浓度。这种作用可以被哇巴因(Na⁺/K⁺-ATP酶的抑制剂)抑制。结论 nm23-H1可提高顺铂对舌癌细胞化疗的敏感性, 其可能机制是nm23-H1降低线粒体膜电位, 铂离子进入细胞内增加, 导致细胞凋亡或坏死。

[关键词] 顺铂; 化疗; 舌癌

[中图分类号] R739.86 **[文献标识码]** A

Study of increased sensitivity on Tca8113 cell line to cisplatin by nm23-H1 in vitro ZHI Ke-qian¹, REN Wen-hao¹, WEN Yu-ming², MIAO Qun-ai³, LI Hong⁴. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Periodontics and Oral Medicine, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 4. Dept. of Stomatology, Lintong Sanatorium of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou Military District, Lintong 710600, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of sensitivity variation to cisplatin caused by nm23-H1. **Methods** The samples were divided into two groups: Tca8113 group and Tca8113/nm23-H1 group. Using MTT and flow cytometer, the changes of cell mortality rate, apoptosis and mitochondrial membrane potential were detected. By VG PQ Excell, the changes of the intracellular platinum were detected. **Results** *In vitro* the cell mortality rate and apoptosis were increased in Tca8113/nm23-H1 group, comparing with Tca8113 group. Mitochondrial membrane potential was decreased in Tca8113/nm23-H1 group. The intracellular platinum was increased significantly in Tca8113/nm23-H1 group. This effect could be inhibited by ouabain which was an inhibitor of Na⁺/K⁺-ATP. **Conclusion** nm23-H1 can increase the sensitivity of cisplatin on Tca8113 cell line. The mitochondrial membrane potential was decreased by nm23-H1 so that intracellular platinum was increased and finally increased the apoptosis or necrosis.

[Key words] cisplatin; chemotherapy; tongue cancer

1988年Steeg应用差异杂交法, 从鼠黑色素瘤细胞系克隆出nm23, 其中nm23-H1编码相对分子质量为1.7×10⁴的蛋白质。多数实验证实nm23-H1对肿瘤转移能起一定的抑制作用^[1-3]。本课题组^[4]已经成功

建立了nm23-H1稳定表达舌癌细胞株; 动物实验^[5]发现nm23-H1基因治疗和顺铂白蛋白联合可以明显抑制裸鼠移植瘤的生长。本研究将探讨nm23-H1提高顺铂化疗敏感性的可能机制。

[收稿日期] 2008-02-28; [修回日期] 2008-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39870746); 陕西省科技攻关资助项目[2005K11-G3(3)]; 西安市科技计划资助项目[SF08008-(4)]

[作者简介] 鄧克謙(1968-), 男, 新疆人, 副教授, 博士

[通讯作者] 鄧克謙, Tel: 029-81015479

1 材料和方法

1.1 质粒和主要试剂

nm23-H1真核表达质粒, 由美国国立卫生研究院Steeg惠赠。DL2000 DNA Marker购于大连宝生物

工程有限公司, *BamH* 限制性内切酶购于华美生物工程公司, Lipofect amine和G418购于美国Gibco公司。nm23-H1鼠抗人单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购于美国Santa Cruz公司。人舌鳞癌细胞株Tca8113由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供。顺铂为市售针剂(齐鲁制药有限公司)。罗丹明12、哇巴因和凋亡试剂盒购于美国Sigma公司。

1.2 Tca8113细胞杀伤率的测定

实验分组: 本组实验分为未转染组(Tca8113)、转染组(Tca8113/nm23-H1)和加哇巴因组(哇巴因和Tca8113/nm23-H1), 以不加顺铂的未转染组和转染组为对照组。MTT法检测对舌癌细胞的杀伤率。杀伤率=1-(给药孔光密度值/对照孔光密度值)×100%。

1.3 Tca8113细胞凋亡测定

分为未转染组和转染组, 分别加入哇巴因、顺铂、哇巴因和顺铂的混合物。分别将转染后稳定表达细胞和未转染细胞接种于6孔板, 加入完全培养基, 37℃下培养。分别在转染组和未转染组中加入浓度为200 nmol/L哇巴因10 μL, 2 h后, 在其中1组中和未加哇巴因的2孔中加入质量浓度为2.5 mg/L顺铂, 48 h后, 质量浓度为2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞, 收集全部上清和细胞, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4 Tca8113细胞线粒体膜电位测定

分为未转染组和转染组, 分别以不加顺铂为对照组。将转染和未转染细胞分别接种于6孔板, 加入完全培养基, 37℃下培养。已贴壁生长后, 加入质量浓度为2.5 mg/L顺铂48 h后, 离心(1 000~2 000次/min), 低温保存的PBS冲洗2次, 收集细胞, 质量浓度为5 mg/L罗丹明-123冲洗3次。用DMEM培养基冲洗3次, 流式细胞仪检测罗丹明荧光强度。

1.5 Tca8113细胞内铂离子浓度测定

实验分组: 本实验分为转染组和未转染组, 分别加顺铂、顺铂和哇巴因。在6孔板中贴壁生长达80%的细胞中, 加入含200 nmol/L哇巴因DMEM培养基; 37℃ 1 h后, 在每组中加入质量浓度为2.5 mg/L顺铂; 4 h后, 0.25%胰蛋白酶消化, 冰PBS洗浴2次, 收集500 μL PBS, 在冰上轻微声处理。离心1 000~2 000次/min, 收集各组细胞。在各组细胞中加入68%硝酸200 μL, 过氧化氢40 μL, 室温过夜。水浴30 min, 超声波振荡5 min。加入760 μL蒸馏水, 使总体积达到1 mL, 等离子质谱仪测定铂离子浓度。

1.6 统计学分析

测量数据以均数±标准差表示, 用SPSS 10.0软

件进行单因素方差分析, 两两比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.01$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 顺铂对转染前后Tca8113细胞杀伤率的影响

加入不同剂量顺铂, 转染组与未转染组比较杀伤率有差异(表1)。加入哇巴因后, 再加入不同剂量顺铂, 转染组与未转染组比较杀伤率没有差异, 说明哇巴因对顺铂的杀伤率有明显抑制作用, 提示顺铂对Tca8113细胞杀伤率的提高与 Na^+/K^+ -ATP酶活性有关。

表1 3组Tca8113细胞杀伤率的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Tca8113 cell viability by cisplatin between three groups($\bar{x} \pm s$)

分组	顺铂质量浓度(mg/L)		
	2.5	5.0	10.0
Tca8113	39.32±2.63	56.94±2.98	74.36±1.98
Tca8113/nm23-H1	54.86±2.32*	74.36±1.61*	95.23±2.35*
哇巴因+Tca8113/nm23-H1	42.34±2.32**	60.23±3.42**	81.23±2.13**

注: *示Tca8113组与Tca8113/nm23-H1组比较, $P < 0.01$; **示哇巴因+Tca8113/nm23-H1与Tca8113/nm23-H1比较, $P > 0.05$

2.2 顺铂对转染前后Tca8113细胞凋亡的影响

质量浓度为2.5 mg/L顺铂作用于细胞48 h后, 在哇巴因组, 转染前后细胞凋亡比例差异没有统计学意义($P > 0.05$); 在顺铂组, 转染后的Tca8113细胞诱导的凋亡比率较未转染组增加($P < 0.01$); 在顺铂和哇巴因组, 转染组细胞凋亡明显降低($P < 0.01$, 表2)。说明转染后顺铂可以明显诱导Tca8113细胞凋亡, 加入哇巴因后细胞凋亡被抑制。提示顺铂诱导Tca8113细胞凋亡可能与 Na^+/K^+ -ATP酶活性有关。

表2 转染前后Tca8113细胞凋亡的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The apoptosis in three groups before and after transfection($\bar{x} \pm s$)

分组	细胞凋亡		
	哇巴因	顺铂+哇巴因	顺铂
Tca8113	7.2±1.3	61.1±5.6	66.8±6.7
Tca8113/nm23-H1	11.3±2.9	58.2±7.2	83.9±8.2

2.3 顺铂对转染前后Tca8113细胞线粒体膜电位的影响

2.5 mg/L顺铂作用于细胞48 h后, 转染组细胞罗丹明荧光强度较未转染组明显降低(表3), 表明转染组细胞线粒体膜电位在顺铂作用下明显降低。

2.4 顺铂对转染前后Tca8113细胞内铂离子浓度的影响

转染前后Tca8113细胞内铂离子浓度的变化见

表4。质量浓度为2.5 mg/L顺铂作用细胞4 h后, Tca8113/nm23-H1和Tca8113细胞内铂离子浓度比较有明显差异($P<0.01$); 哇巴因作用1 h后, 再加入2.5 mg/L顺铂作用4 h, Tca8113/nm23-H1和Tca8113细胞内铂离子浓度比较没有差异($P>0.05$)。说明顺铂化疗效果提高是通过细胞内铂离子浓度提高实现的。

表 3 转染前后Tca8113细胞罗丹明荧光强度的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The fluorescence of rhodamine-123 before and after transfection($\bar{x}\pm s$)

分组	罗丹明荧光强度	
	顺铂(-)	顺铂(+)
Tca8113	87.8±13.6*	68.24±15.61**
Tca8113/nm23-H1	96.3±18.4*	43.64±14.56**

注: *示未加顺铂时, $P>0.05$; **示加入顺铂时, $P<0.01$

表 4 转染前后Tca8113细胞内铂离子浓度的变化 ($\text{ng}/10^6$)

Tab 4 Platinum-ion concentration before and after transfection($\text{ng}/10^6$)

分组	顺铂	
	哇巴因(+)	哇巴因(-)
Tca8113	5.60±0.42	9.61±0.05
Tca8113/nm23-H1	7.11±0.66	13.60±0.28

3 讨论

nm23-H1是Steeg在1988年用差异杂交法, 从高转移黑色素瘤细胞株中发现并分离出来, 具有抑制肿瘤转移的作用, 并部分参与肿瘤细胞增殖、分化的调控。近来nm23-H1与化疗药物的敏感性受到人们的密切关注。应用免疫组化及DNA分析技术在卵巢癌、口腔鳞癌的标本研究中发现nm23-H1高表达者生存时间明显延长^[5-6]。有学者^[6]以56例卵巢癌为研究对象, 对比临床对铂类化疗药物敏感和不敏感患者, 发现对铂类化疗药物敏感患者其nm23-H1表达明显高于化疗不敏感患者。本课题组^[4]动物实验发现, nm23-H1基因治疗和顺铂白蛋白联合可以明显抑制裸鼠移植瘤的生长。这些结果表明nm23-H1高表达与肿瘤对顺铂的反应性有密切关系。

本研究发现, nm23-H1转染后顺铂的杀伤率明显增加, 提示nm23-H1可能与提高顺铂的化疗敏感性有关系。给nm23-H1过表达组加入 Na^+/K^+ -ATP酶抑制剂哇巴因后, 再给同样剂量顺铂, 发现过表达组与对照组对Tca8113细胞杀伤率的影响没有明显差异。由此表明nm23-H1提高顺铂的化疗敏感性可

能与 Na^+/K^+ -ATP酶的活性改变有关^[7]。

罗丹明-123既能溶于水, 又能溶于有机溶剂中。罗丹明-123在活体细胞中可作为线粒体的特异荧光染料探针, 以研究线粒体的形态和功能。本实验表明, 加入顺铂后, 转染组罗丹明的荧光强度明显降低, 表明线粒体膜电位降低明显, 提示nm23-H1对线粒体的损伤, 与顺铂的细胞毒性作用有密切关系。

本实验发现, 顺铂可以明显诱导转染组细胞凋亡, 加入 Na^+/K^+ -ATP酶抑制剂哇巴因后, 转染组和未转染组细胞凋亡没有明显变化, 表明nm23-H1提高顺铂诱导细胞凋亡, 可能与提高 Na^+/K^+ -ATP酶活性有关; 加入哇巴因后, 未转染组细胞凋亡没有明显改变, 推测可能顺铂杀死肿瘤细胞, 有诱导细胞凋亡和导致细胞坏死2条途径。

本实验表明, 加入顺铂后, 转染组细胞内铂离子浓度明显高于未转染组; 在加入顺铂前, 给予哇巴因预处理, 转染组和未转染组细胞内铂离子浓度没有差异, 表明 Na^+/K^+ -ATP酶在细胞内外铂离子转运中具有重要意义^[8-9], nm23-H1可能通过 Na^+/K^+ -ATP酶的活性, 调节细胞内铂离子的浓度, 提高顺铂的细胞毒性作用。

nm23-H1的表达产物是核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK), 它是一种在人体内广泛存在的酶, 可催化产生三磷酸核苷。 Na^+/K^+ -ATP酶可以调节nm23在体内的磷酸化^[10], 因此这些酶与细胞内铂离子浓度的变化有密切关系。nm23-H1提高顺铂化疗敏感性的可能机制为: nm23-H1的过表达提高顺铂-DNA链内交联的形成, 由于线粒体损害是细胞凋亡的早期事件, 线粒体中顺铂-DNA复合物清除率降低, 使顺铂对线粒体DNA的损害强于细胞核DNA的损害^[11-14]。 Na^+/K^+ -ATP酶活性增加, 线粒体膜电位明显降低, 引起线粒体通透性转变孔的开启(线粒体膜上的巨型通道开放)^[13-14], 进入细胞内的铂离子浓度增加; 这个结果又使线粒体膜电位进一步降低, 细胞内铂离子浓度再次增加, 导致细胞凋亡或死亡, 其不同时期信号传导详细机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Sgouros J, Galani E, Gonos E, et al. Correlation of nm23-H1 gene expression with clinical outcome in patients with advanced breast cancer[J]. In Vivo, 2007, 21(3): 519-522.
- [2] 鄧克謙, 陈伟辉, 温玉明. nm23-H1转染Tca8113细胞后稳定表达细胞株的建立[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(6): 762-766. ZHI Ke-qian, CHEN Wei-hui, WEN Yu-ming. Establishment of a cell line of Tca8113 with stable expression of nm23-H1 by

- gene transfection[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(6) :762-766.
- [3] 李文, 温玉明, 王力红, 等. nm23-h1转染腺样囊性癌细胞及其增殖能力的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(2) : 109-111.
- LI Wen, WEN Yu-ming, WANG Li-hong, et al. *In vitro* and *in vivo* study on proliferation of adnoid cystic carcinoma cell lines after nm23-h1 introduction[J]. West China J Stomatol, 2004, 22 (2) :109-111.
- [4] 鄧克謙, 陈伟辉, 温玉明. nm23-H1质粒和顺铂白蛋白联合治疗裸鼠移植瘤[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(2) :170-172.
- ZHI Ke-qian, CHEN Wei-hui, WEN Yu-ming. Effect on xenograft of nude mouse by combination therapy of nm23-H1 and protein-cisplatin[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(2) :170-172.
- [5] Bookman MA, Ozols RF. Factoring outcomes in ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2) 325-327.
- [6] Wang YF, Chow KC, Chang SY, et al. Prognostic significance of nm23-H1 expression in oral squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2004, 90(11) 2186-2193.
- [7] Scambia G, Ferrandina G, Marone M, et al. nm23 in ovarian cancer: Correlation with clinical outcome and other clinicopathologic and biochemical prognostic parameters[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2) 334-342.
- [8] Ferguson AW, Flatow U, MacDonald NJ, et al. Increased sensitivity to cisplatin by nm23-transfected tumor cell lines [J]. Cancer Res, 1996, 56(13) 2931-2935.
- [9] Lizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, et al. Downregulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: Possible association with Na⁺, K⁺-ATPase[J]. Br J Cancer, 2000, 83(9) :1209-1215.
- [10] Marshall LJ, Muimo R, Riemen CE, et al. Na⁺ and K⁺ regulate the phosphorylation state of nucleoside diphosphate kinase in human airway epithelium[J]. Am J Physiol, 1999, 276(1 Pt 1) : C109-C119.
- [11] Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance[J]. Eur J Cancer, 1998, 34(10) :1535-1542.
- [12] Johnsson A, Olsson C, Anderson H, et al. Evaluation of a method for quantitative immunohistochemical analysis of cisplatin-DNA adducts in tissues from nude mice[J]. Cytometry, 1994, 17(2) : 142-150.
- [13] Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis[J]. Annu Rev Physiol, 1998, 60(1) 619-642.
- [14] Eguchi Y, Srinivasan A, Tomaselli KJ, et al. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction[J]. Cancer Res, 1999, 59 (9) 2174-2181.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第474页)

反而出现下降趋势。

IL-1、TNF α 是调节结缔组织基质降解和牙槽骨吸收活性最强的细胞因子，也是参与调节中性粒细胞聚集、释放溶酶体酶和超氧离子的重要因子。研究也证实，IL-1 β 的活性与牙周炎的病变程度、临床症状密切相关^[6-7]。IL-6是促进骨吸收的重要因子，成骨细胞和破骨细胞膜上均存在IL-6受体，成骨细胞产生的IL-6以自分泌和旁分泌的方式调节破骨细胞的形成，龈沟液中的IL-6高于正常水平，与牙周病的严重程度呈正相关关系^[8]。本实验按照提纯LTA的方法提取细胞壁成分，虽然没有做进一步的鉴定，但认为提取的成分中含有大量的LTA。根据实验结果可以认为内氏放线菌细胞壁的LTA样成分可以诱导炎症细胞因子，通过这些细胞因子，引进局部炎症反应和牙槽骨破坏，导致牙周病加剧。

[参考文献]

- [1] Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. Modeling shifts in microbial populations associated with health or disease[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5) 3678-3684.
- [2] Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, et al. Differential cytokine in-

duction by two types of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(2) :121-123.

- [3] Takada H, Kimura S, Hamada S. Induction of inflammatory cytokines by a soluble moiety prepared from an enzyme lysate of *Actinomyces viscosus* cell walls[J]. J Med Microbiol, 1993, 38 (6) 395-400.
- [4] Josephson SL, Stinson MW, Millar SJ, et al. Purification of lipoteichoic acid by chromatography in water-organic solvent systems[J]. Infect Immun, 1986, 51(2) 378-384.
- [5] Zhou Q, Amar S. Identification of proteins differentially expressed in human monocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and its purified components by high-throughput immunoblotting[J]. Infect Immun, 2006, 74(2) :1204-1214.
- [6] Zini N, Lisignoli G, Solimando L, et al. IL1-beta and TNF-alpha induce changes in the nuclear polyphosphoinositide signalling system in osteoblasts similar to that occurring in patients with rheumatoid arthritis: An immunochemical and immunocytochemical study[J]. Histochem Cell Biol, 2003, 120(3) 243-250.
- [7] Galbraith GM, Hagan C, Steed RB, et al. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis[J]. J Periodontol, 1997, 68(9) 832-838.
- [8] Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level[J]. J Clin Periodontol, 2003, 30(2) :145-153.

(本文编辑 王 晴)