

端粒酶抑制剂对口腔肿瘤细胞生长的影响

杨志强 陈雯 张桥 陈广胜 雷毅雄 易菲

【摘要】目的 探讨端粒酶抑制剂作为肿瘤治疗药物的可行性。方法 选择人口腔鳞状细胞癌 KB 细胞株作为靶细胞,观察端粒酶抑制剂 3-叠氮-3-脱氧胸腺核苷(AZT)和人端粒酶模板区的硫代反义寡核苷酸片断(AS-ONS)对上述肿瘤细胞株的作用,用 MTT 试验测定细胞毒作用;³H-TdR 掺入试验测定细胞增殖速度;用端粒重复序列扩增法(TRAP)半定量方法测定细胞染毒后端粒酶活性的变化;流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。结果 AS-ONS和 AZT 在一定剂量范围内有抑制肿瘤细胞株繁殖的作用,在抑制细胞生长的同时,端粒酶活性降低。此外,AS-ONS 和 AZT 还有诱导细胞凋亡以及使细胞阻滞在 G₁ 期的作用。结论 AZT 和 AS-ONS 在体外有抑制端粒酶活性和抗肿瘤细胞增殖的作用,这种作用可能与细胞凋亡的诱导和细胞周期的阻滞有关。

【关键词】 口腔鳞状细胞癌; 端粒酶; 抗肿瘤药物; 细胞凋亡

The Effect of Telomerase Inhibitors on Oral Squamous Carcinoma Cells

YANG Zhiqiang*, CHEN Wen, ZHANG Qiao, et al. (* Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China)

【Abstract】 Objective To study the potential anti-tumor effect of telomerase inhibitors. **Methods** Human oral squamous carcinoma cell line KB was selected as target cell. The effects of 3-azido-3-deoxythymidine (AZT) and human antisense phosphorothioate (AS-ONS) for telomerase template on KB cell line were investigated. The cytotoxic effect of AZT and AS-ONS on tumor cells was quantified using MTT colorimetric assay. Assay of ³H-TdR incorporation was undertaken to measure the cell proliferation. The changes of telomerase activity after treatment was detected and quantified by telomeric repeat amplification protocol (TRAP) semi-quantitative analysis. The Flow Cytometry was used to detect apoptosis and measure cell cycle. **Results** Both AZT and AS-ONS inhibited the growth of KB cell line in a certain range of concentrations, and meanwhile the telomerase activity was reduced after treatment. In addition, both AZT and AS-ONS can induce apoptosis and arrest G₁ phase of cell cycle. **Conclusion** The results obtained above indicated that AZT and AS-ONS could be potentially used as an anti-oral carcinoma agent or an auxiliary treatment for cancer. Those inhibitory effects might be partially due to the induction of apoptosis and the prolongation of cell cycle.

【Key words】 telomerase; oral squamous carcinoma; anti-oral carcinoma agent; apoptosis

染色体的末端是由重复序列 TTAGGG 组成,称为端粒(telomere),正常体细胞的端粒随着细胞分裂,长度会逐渐缩短。当端粒缩短到一定程度,细胞染色体变得不稳定,最后细胞走向衰老、死亡。因此端粒的长度与细胞的寿命有关,端粒长度被认为是细胞的“有丝分裂钟”。端粒长度的维持需要端粒酶(telomerase)的激活,端粒酶激活不仅可以维持端粒的长度还可以使细胞获得无限增殖能力,从而逃避死亡。大量的研究¹发现肿瘤细胞株及肿瘤组织中端粒酶阳性

率达 70%~100%。端粒酶作为恶性肿瘤的标记物的观点已被人们普遍接受,目前人们最感兴趣的是端粒酶抑制剂是否可作为抗肿瘤的药物治疗。本实验用端粒酶抑制剂:端粒酶模板区硫代型反义寡核苷酸片段(antisense-oligonucleotides, AS-ONS)和 3-叠氮-3-脱氧胸腺核苷(3-azido-3-deoxythymidine, AZT)作用于口腔鳞状细胞癌(以下简称鳞癌)KB 肿瘤细胞株,观察它们对肿瘤细胞生长的影响及肿瘤细胞端粒酶活性的变化,为端粒酶抑制剂的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞来源

人口腔鳞癌 KB 细胞株由中山医科大学肿瘤研究所提供,在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中培养。AZT (Sigma 公

本课题为广州医学院科研基金资助项目(编号 303005118)

作者单位: 510260 广州医学院第二附属医院口腔科(杨志强,陈广胜),广州中山医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室(陈雯,张桥),广州医学院化学致癌研究所(雷毅雄,易菲)

司,美国); ^3H -dCTP (NENTM Life Science Products 公司,美国); AS-ONS 序列为 5-GTTAGGGTTAG-3, 硫代修饰, 由上海中科院细胞生物研究所合成。四甲基偶氮唑盐 (MTT, Sigma 公司, 美国); ^3H -TdR (中国原子能科学研究所)。MB-型酶标仪 (北京市新技术应用研究所), 流式细胞仪 (Epics Elite, 美国)。

1.2 细胞毒性试验

采用 MTT 法测定 AZT 和 AS-ONS 对细胞的毒性, MTT 法实验分组如下: AZT 组: 培养液中分别加入浓度为 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、4.0 mmol/L 的 AZT, 另加入同体积的二甲基亚砷做对照; AS-ONS 组: 培养液中分别加入浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS-ONS, 另加入同体积的不含血清的培养基做对照。细胞处理 48 h 后, 吸去培养液, 加入 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 4 h 后, 去掉培养液, 加入 0.5 ml 二甲基亚砷, 在摇床上缓慢显色至出现蓝紫色, 用 MB-型酶标仪在波长 570 nm 下测定各组 OD 值。

1.3 细胞生长增殖的改变

^3H -TdR 掺入试验测定细胞染毒后的生长增殖情况, ^3H -TdR 掺入试验分组和染毒剂量与细胞毒性实验相同。肿瘤细胞分别接种在 24 孔培养板中, 每孔接种 1×10^5 个/ml, 每组设 3 个平行孔, 实验重复 3 次。细胞处理 48 h 后, 在收集细胞的前 3 h, 向各组细胞的培养液中加入 ^3H -TdR (37 kBq/ml), 孵育 3 h 后用常规方法将细胞消化下来, 离心收集细胞, 再用 100 μl 蒸馏水溶解, 取 20 μl 滴在玻璃滤纸上, 分别用蒸馏水、5% 三氯醋酸及无水乙醇洗玻璃滤纸数次, 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 2 h 后放入闪烁液中测定同位素标记量。

1.4 端粒酶活性半定量测定

实验分组: AZT 组: 培养液中分别加入浓度为 1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、4.0 mmol/L 的 AZT, 另加入同体积的二甲基亚砷做对照; AS-ONS 组: 培养液中分别加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS-ONS, 另加入同体积的不含血清的培养基做对照; 联合 A 组: 1.0 mmol/L AZT 加 10 $\mu\text{mol/L}$ AS-ONS; 联合 B 组: 2.0 mmol/L AZT 加 20 $\mu\text{mol/L}$ AS-ONS。

采用 Kim 等³ 改进了的 TRAP 法进行端粒酶活性的测定, 在 PCR 反应中每个样本加入 148 kBq 的 ^3H -dCTP, 两条引物序列为 5-AATCCGTCGACGAGGTT-3 及 5-GCCCGG CTTAC C₃CTAAC-3。PCR 的扩增产物用 12.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用硝酸银染色后, 把各样本对应的条带剪下, 放入液闪瓶中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 2 h 后加入闪烁液并测定同位素标记量, 每次 PCR 反应均设阳性对照 (鼻咽癌细胞株 CNE₂ 蛋白提取液) 和空白阴性对照 (裂解液)。

1.5 细胞周期分析和细胞凋亡测定

AZT 和 AS-ONS 染毒剂量与细胞毒性实验相同。在细胞染毒后的 72 h 和 96 h 常规收集细胞, 然后固定在 50% 的乙醇中, 再经过 0.1% 的 Triton X-100 和 5 $\mu\text{g/ml}$ RNase A 处理后, 用 50 $\mu\text{g/ml}$ 的碘化丙啶染色 60 min (4 $^{\circ}\text{C}$) 后上机分析, 碘化丙啶的发射波长为 675 nm, 测定细胞周期和细胞凋亡百分比。

2 结 果

2.1 细胞毒性试验

把对照组细胞的 OD₅₇₀ 值作为 100%, 其它剂量组的 OD₅₇₀ 值与之相比, 得到各剂量组细胞相对存活率见表 1。表 1 显示不同浓度 AZT 和 AS-ONS 作用于 KB 细胞 48 h 后细胞的相对存活率, 说明 AZT 对 KB 细胞具有一定的毒性作用, 而 AS-ONS 的细胞毒性作用很弱。

表 1 AZT 和 AS-ONS 对 KB 细胞的毒性作用

Tab 1 The cytotoxic effect of AZT and AS-ONS on KB cell line

组别	OD ₅₇₀	细胞相对存活率 (%)
AZT (mmol/L)		
0	1.87 \pm 0.22	100.0
0.5	1.58 \pm 0.13	84.3
1.0	1.46 \pm 0.08	78.31
2.0	1.23 \pm 0.11	66.2
4.0	1.05 \pm 0.09	55.9
AS-ONS ($\mu\text{mol/L}$)		
0	1.99 \pm 0.25	100.0
5	2.03 \pm 0.20	100.0
10	1.88 \pm 0.19	94.6
20	1.78 \pm 0.14	89.4
30	1.71 \pm 0.23	85.8

2.2 细胞生长增殖的改变

AZT 和 AS-ONS 影响细胞生长增殖的结果见图 1、2。从图 1 可看出加试剂 48 h 后, 不同浓度的 AZT 对细胞的生长增殖都有很强的抑制作用, 且存在剂量—效应关系。在浓度为 2.0 mmol/L 时, 细胞增殖率是对照组的 49.6%, 随着浓度的增加, 抑制作用也增加。同样, AS-ONS 对细胞增殖也有很强的抑制作用, AS-ONS 在浓度为 10~20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 KB 细胞的增殖抑制率为 53% 左右。

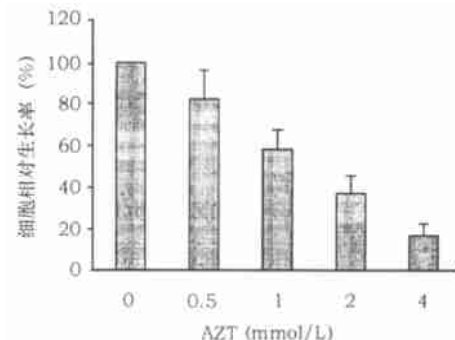


图 1 AZT 对 KB 细胞生长的抑制作用

Fig 1 The inhibitory effects of AZT on KB cell line

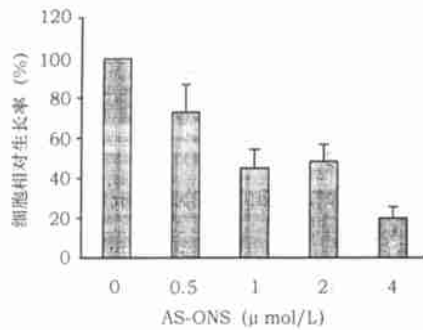


图2 AS-ONS对KB细胞生长的抑制作用

Fig 2 The inhibitory effects of AS-ONS on KB cell line

2.3 端粒酶活性的改变

AZT和AS-ONS处理KB细胞48h后端粒酶活性的变化见表2。从表2可见AZT在浓度为4.0mmol/L时,可使KB细胞株的端粒酶活性降低50%左右;AS-ONS在浓度为20μmol/L时,KB细胞株端粒酶活性降低51%,浓度增加到30μmol/L时,端粒酶活性降低了近70%。AZT和AS-ONS联合作用比单独作用更强,呈相加作用。

表2 AZT和AS-ONS抑制KB细胞端粒酶活性的作用

Tab 2 The effects of AZT and AS-ONS on telomerase activity of KB cell line

组别	端粒酶活性 (cpm/μg 蛋白)	%
AZT (mmol/L)		
0	6 670 ±599	100.0
1.0	5 523 ±324	82.8
2.0	4 052 ±521 *	60.7
4.0	3 376 ±477 *	50.6
AS-ONS (μmol/L)		
0	6 289 ±666	100.0
10	4 428 ±454 *	70.4
20	3 083 ±419 *	49.0
30	2 088 ±337 **	33.2
联合A组	3 754 ±463 *	60.0
联合B组	2 055 ±349 **	32.7

与阴性对照组比较 * P<0.05, ** P<0.001

2.4 细胞周期与细胞凋亡

AZT和AS-ONS处理KB细胞72h后,与阴性对照组比较,染毒组G₁期的细胞比例升高,S期细胞则减少,而G₂/M期细胞比例无明显变化,表3显示细胞染毒后96h细胞周期的分布情况和细胞凋亡百分数,从表中可见AZT和AS-ONS有使细胞阻滞在G₁期并降低细胞增殖的作用。与阴性对照组相比,最高浓度组的AZT和AS-ONS使G₁期细胞分别增加了

16.7%和22.5%。此外AZT和AS-ONS都具有诱导细胞凋亡的作用,高浓度组的AZT和AS-ONS与阴性对照组细胞相比,凋亡细胞百分比分别增加了10.7%和16.8%。

表3 AZT和AS-ONS对KB细胞周期和细胞凋亡的影响(%)

Tab 3 The effects of AZT and AS-ONS on apoptosis and distribution cell cycle of KB cell line(%)

组别	细胞周期分布			凋亡细胞
	G ₁	S	G ₂ /M	
AZT (mmol/L)				
0	61.2	27.8	11.0	4.5
0.5	62.4	27.4	10.2	5.2
1.0	66.3	24.3	9.4	10.4
2.0	67.5	21.8	10.7	11.2
4.0	77.9	11.5	10.6	15.2
AS-ONS (μmol/L)				
0	58.8	31.3	9.9	5.5
5	61.6	29.8	8.6	8.2
10	66.9	23.4	9.7	10.3
20	70.5	20.1	9.4	18.2
30	81.3	10.2	8.5	22.3

3 讨论

以端粒酶作为靶向,筛选新的抗肿瘤药物是近年来抗肿瘤研究的一个方向。AZT是核苷酸衍生物,在DNA复制时可以掺入链中而使复制终止;另外,AZT对DNA多聚酶有弱的亲和力,而对HIV-1反转录酶有很强的亲和力⁴。本实验结果表明AZT在体外有抑制KB肿瘤细胞端粒酶活性和抗细胞增殖的作用,与国外的实验报道相符⁵,说明AZT很可能是一种有效的抗癌药物。由于端粒酶在正常的人体组织中不表达,因此抑制端粒酶活性对正常组织细胞影响不大,本实验应用AS-ONS在理论上应具有特异性强,副作用小的特点,这些特点在本次实验中得到证实,AS-ONS对KB细胞株的毒性作用较小;而对端粒酶活性的抑制率高达67%,与AZT相似,它对KB细胞也具有很强的增殖抑制作用。AS-ONS经过硫代修饰,有抗核酸酶分解的作用,当它结合于端粒酶的RNA模板区形成RNA与寡核苷酸二聚体后,可以激活细胞内切酶RNaseH并切割二聚体⁶,相信这是AS-ONS抗肿瘤作用最重要的机理。类似的研究报道如Mata等⁷用硫代六核苷酸“TTAGGG”作用于淋巴瘤细胞株OMA-BL1,发现“TTAGGG”有抑制裸鼠移植

瘤生长并降低瘤转移的作用,本课题组的另外一项动物实验发现 AS-ONS 能有效地降低由二甲胂诱导的大鼠大肠癌的发生率⁸。本研究 and 国外的实验结果都表明 AS-ONS 在细胞水平以及动物实验中都具有抗肿瘤细胞生长的作用。

为了探讨端粒酶抑制剂抗肿瘤细胞的机理,本实验测定了 KB 细胞中的细胞凋亡和细胞周期分布。结果显示两种端粒酶抑制剂有诱导细胞凋亡的作用,高浓度组与对照组细胞相比,凋亡细胞百分比增加了 2~3 倍,同时 AZT 和 AS-ONS 还可降低 S 期细胞比率和增加 G₁ 期细胞的百分率,说明它们抑制细胞增殖的作用可能与细胞凋亡的诱导和细胞周期的阻滞有关。以上结果提示端粒酶抑制剂可能是一类有效的抗癌药物,值得进一步深入地研究。

参考文献

- 1 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5):787-791
- 2 陈雯,张桥,万德森,等.端粒酶抑制剂对肿瘤细胞及

其端粒酶的活性的影响. *肿瘤*, 2000, 20(6):415-418

- 3 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 66(5193):2011-2015
- 4 Stella MM, Holland JF, Pogo BGT. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro* by 3-azido-3-deoxythymidine. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2):693-696
- 5 Daniel EG, Tejera AM, Olive OA. Irreversible telomere shortening by 3-azido-2,3-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246(1):107-110
- 6 Counter CM, Gupta J, Harley CB, et al. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*, 1995, 85(9):2315-2320
- 7 Mata JE, Joshi SS, Palen B, et al. A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 144(1):189-197
- 8 吴成秋,陈雯,张桥,等.端粒酶反义寡核苷酸对二甲胂诱导大鼠肠癌的预防作用. *癌症*, 1999, 18(6):639-643

(2001-03-19 收稿,2003-02-19 修回)

(本文编辑 刘怡)

口腔正畸 MEAW 技术学习班招生通知

多曲方丝弓矫正技术(Multiloop Edgewise Arch Wire, MEAW)是由 Dr. Kim 创造的一种矫正技术,它的矫治效果有时简直是堪称神奇,对于骨性开骀和反骀的治疗特别有效。MEAW 矫正技术在国际上不断得到发展,在日本、韩国和欧洲等地先后成立了 MEAW 研究会。为把这一先进技术介绍给国内正畸界的同仁,特邀请日本 MEAW 研究会的日本专家来成都作为期 5 d 的学术讲座。本次学习班将在着重分析错骀畸形的机理和错骀诊断的基础上,进一步探讨现代正畸治疗的方法。同时,学员们还可以通过具体病例的 X 线头影测量及分析,MEAW 弓丝的弯制等实际操作,亲身体验神奇的 MEAW 技术的治疗方法和治疗程序。

本学习班招生对象为在职口腔专业人员,时间 2003 年 10 月 10 日~10 月 14 日,培训费 1 500 元(含材料消耗费用),使用器械自备,食宿费用自理。

第八届全国正畸临床提高班招生通知

随着我国国民经济的发展,人们对美的追求不断增加,口腔正畸的社会需求量也随之增加。目前全国经过正规培训的正畸医师较少,而要求矫治的错骀畸形儿童及成人众多,为了解决这一矛盾,我院决定挖掘办学潜力,定于 2003 年 10 月在全国范围内再次举办“口腔正畸临床提高班”。前几届学习班的大部分学员已成为该单位开展正畸临床工作的骨干。

本班拟通过讲课,各种专题讲座及临床见习等方式,培养一批熟悉正畸基础理论,掌握 Edgewise, Begg 固定矫治技术及治疗程序,熟悉功能矫治器的制作,以及牙周病、颞下颌关节紊乱症的治疗、外科正畸治疗等技术的人员。同时介绍当今国内外正畸发展新动态。

为了确保教学质量,我院将派出以罗颂椒、赵美英、陈扬熙、赵志河教授为主的具有丰富教学和临床经验的专家,组成强大教学阵容。

本班着重动手能力及规范化操作技术的训练,通过系统学习后,基本能独立开展正畸工作,为解决基层对正畸临床医师的需求起到一定作用。

本班招生对象为在职口腔正畸专业人员,培训时间 2003 年 10 月 15 日~31 日。培训结束后经考核合格将颁发口腔医学院短期培训证书并记录学分。培训费 3 500 元/人(含材料消耗、教材费),食宿费用自理。

欲参加以上两个学习班者,请事先与我院联系,我们将根据学员来函来电情况,发录取通知书。联系地址:四川省成都市人民南路三段 14 号,四川大学华西口腔医学院教学办公室。

邮编 610041 电话 028-85501436 Fax:028-85502570 Email: kqjxk@wcums.edu.cn