

诱导型一氧化氮合酶和血管内皮生长因子 在舌癌细胞株中的表达

曾曙光¹, 陈伟良², 杨 岚², 邱钧琦¹, 张积仁³, 章锦才¹, 艾伟健¹, 郑俊发¹

(1. 广东省口腔医院·南方医科大学附属口腔医院, 广东 广州 510280; 2. 中山大学附属第二医院, 广东 广州 510120; 3. 南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广东 广州 510282)

摘要: 【目的】探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和血管内皮生长因子(VEGF)在舌鳞癌细胞株 Tca8113 中的表达, 为进一步研究 iNOS 和 VEGF 在舌鳞癌肿瘤血管生成中的作用提供实验基础。【方法】采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法和 SP 免疫组化方法, 对舌鳞癌细胞株 Tca8113 中 iNOS 和 VEGF mRNA 和蛋白表达情况进行检测。【结果】RT-PCR 检测到舌鳞癌 Tca8113 细胞株中 iNOS/VEGF mRNA 条带明显, SP 免疫组化检测到 iNOS/VEGF 蛋白在舌癌细胞胞浆中呈强阳性表达。【结论】iNOS/VEGF mRNA 和蛋白在舌鳞癌 Tca8113 细胞株中呈高水平表达。

关键词: 诱导型一氧化氮合酶; 血管内皮生长因子; 舌; 肿瘤

中图分类号: R739.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0520-04

Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Vascular Endothelial Growth Factor in Tca8113 Cells

ZENG Shu-guang¹, CHEN Wei-liang², YAN Lan², QIU Jun-qi¹, ZHANG Ji-ren³, ZHANG Jin-cai¹, AI Wei-jian¹, ZHENG Jun-fa¹

(1. Department of Maxillofacial Surgery, Guangdong Provincial Stomatological Hospital//The Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Center of Cancer, Southern Medical University Affiliated Zhujiang Hospital, Guangzhou 510282, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in Tca8113 and provide basement of experiment for further study on the role of iNOS and VEGF in tongue carcinoma angiogenesis. 【Methods】 iNOS and VEGF mRNA and protein were detected by RT-PCR and SP immunohistochemistry. 【Results】 The band of iNOS and VEGF mRNA were obvious and the expression of iNOS and VEGF protein were strongly positive by immunohistochemistry in Tca8113 cells.

【Conclusion】 There were overexpression of iNOS and VEGF mRNA and protein in Tca8113 cells.

Key words: inducible nitric oxide synthase; vascular endothelial growth factor; tongue; neoplasms

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):520-523]

一氧化氮(nitric oxide, NO)是生物体内一种小分子气体。近期的研究发现 NO 同时也参与包括肿瘤在内的许多病理过程。内源性 NO 是由一氧化氮酶(nitric oxide synthase, NOS)以 L-精氨酸为底物氧化合成的。生物体内的 NOS 至少有 3 种

类型, 其中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)主要由活化的巨噬细胞, 肿瘤细胞诱导产生, 作用缓慢而持久, 其产生的 NO 量也较多^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是由正常细胞或

收稿日期: 2006-05-07

基金项目: 广东省自然科学基金(032573); 广东省科技计划项目(2005B30901014); 广东省卫生厅科研基金(A2005113)

作者简介: 曾曙光(1969-), 男, 湖南衡山人, 博士研究生, 副主任医师, 硕士研究生导师, 课题负责人

肿瘤细胞产生的。近期的研究表明^[2]: iNOS和VEGF在头颈肿瘤中高水平表达,由iNOS诱导产生的NO在肿瘤血管的形成中起着关键的信号传导作用,并调控VEGF,共同促进肿瘤血管的生成。舌鳞癌是口腔最常见常见的恶性肿瘤,iNOS和VEGF是否共同促进舌癌肿瘤血管生成,尚不甚清楚。我们采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法和SP免疫组化法对舌癌细胞株Tca8113细胞株中iNOS/VEGF mRNA和蛋白表达情况进行检测,为探讨iNOS和VEGF在口腔癌肿瘤血管生成中的相互作用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞的来源及培养

将冻存的舌鳞癌Tca8113细胞株(由上海交通大学第九人民医院何荣根教授惠赠)复苏后,置于含10%胎牛血清(杭州四季青)的DMEM低糖培养基(美国Gibco公司),37℃,5%CO₂恒温细胞培养箱中培养。每隔3~4d传代一次。掌握Tca8113细胞株基本生长规律。

1.2 所用材料及设备

细胞培养所需1640购自Gibco公司,含0.2% EDTA的0.2%的胰酶购自sigma公司。提取总RNA的Trizol试剂购自Invitrogen公司。行RT实验的试剂盒购自捷克的Fermentas公司。PCR实验所需试剂购自Takaca公司的试剂盒。100 bp的Marker购自天为时代公司。PCR所需的iNOS、VEGF、以及内参GAPDH的引物经Primer 5软件设计,由上海生物工程公司合成。引物如下:

iNOS基因:上游引物,5'-GGA GCC AGC TCT GCA TTA TC-3';下游引物,5'-TTT TGT CTC CAA GGG ACC AG-3'。VEGF基因:上游引物,5'-GAT CCT GCC CTG TCT CTC TG-3';下游引物,5'-GAC TCG CCC TCA TCC TCT T-3'。SP超敏免疫组化试剂盒购自Santer Cruze公司,抗VEGF多克隆抗体、抗iNOS抗体购自Sigma公司。3,3'-Diaminobenzidine(DAB)显色剂购自武汉博士德公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞总RNA的提取 取两瓶对数生长期Tca8113细胞(约5×10⁶/瓶)原培养基,冰PBS洗两遍,在每瓶中加1 mL Trizol液,静置约15 min,待细

胞裂解后移入EP管中,加0.2 mL 氯仿,再静置10~15 min,然后4℃ 12 000 r/min离心15 min,吸取上层水相置一新的EP管中,加入等量的异丙醇,静置10 min左右,4℃ 12 000 r/min离心10 min,弃上清液,加入预冷等体积75%冰乙醇1 mL。再4℃ 10 000 r/min离心5 min。弃上清液,开管干燥5 min左右,将产物溶于约30 μL经DEPC处理过的无RNase水中。取约5 μL进行OD值检测。另取约3 μL,与上样buffer约2 μL,金染料1 μL混匀后上样于1%的琼脂糖凝胶电泳电泳。其余产物置于-20℃冰箱中保存。

1.3.2 RT-PCR扩增目的基因mRNA片段 按Fermen的RT试剂盒的说明进行单链cDNA的合成。RT反应体系20 μL:含总RNA产物3 μL, Oligo(dT)引物1 μL, 5×RT buffer 4 μL, 10MdNTPs 2 μL, Rnase抑制剂1 μL, AMV 1 μL, 无RNA酶水补足体积。42℃温育60 min, 70℃灭活AMV 10 min。PCR反应:取RT产物2 μL,依次加入10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP 4 μL,上下游引物各约1 μL(约25 pmol), Taq酶0.25 μL(约1 U),高压灭菌水补足体积,使终体积为25 μL。两个目的基因的反应条件分别为:iNOS基因,95℃ 5 min, 94℃变性30 s, 58℃退火45 s,72℃延伸45 s,共35个循环,4℃保持;VEGF基因,95℃ 5 min, 94℃变性30 s, 56℃退火40 s,72℃延伸40 s,共35个循环,4℃保持。分别取各自产物约3 μL,与上样buffer约2 μL,金染料1 μL混匀后上样于1.2%的琼脂糖凝胶电泳。同时设Marker对照。

1.3.3 SP免疫组化法检测Tca8113细胞iNOS/VEGF蛋白的表达步骤按试剂盒说明进行,DAB显色。每批次均以PBS代替一抗作阴性对照片一张,以已知iNOS/VEGF阳性片作阳性对照。

2 结果

RT-PCR检测到舌鳞癌Tca8113细胞株中iNOS/VEGF mRNA条带明显(图1,2),iNOS/VEGF蛋白在舌癌细胞胞浆中呈强阳性表达(图3,4)。

3 讨论

现已知iNOS在许多肿瘤细胞如乳腺癌、头颈癌等细胞中高表达。Reveneau等^[3]发现iNOS在

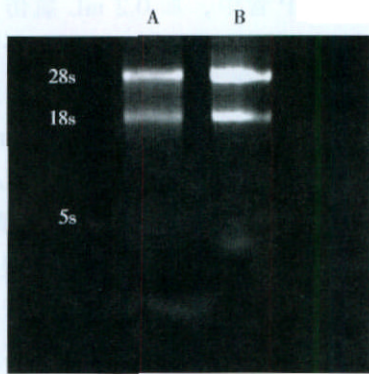


图 1 总 RNA 提取后电泳结果

Fig.1 Total RNA electrophoresis

The PCR outcome disclosing intact RNA in two samples(A,B)

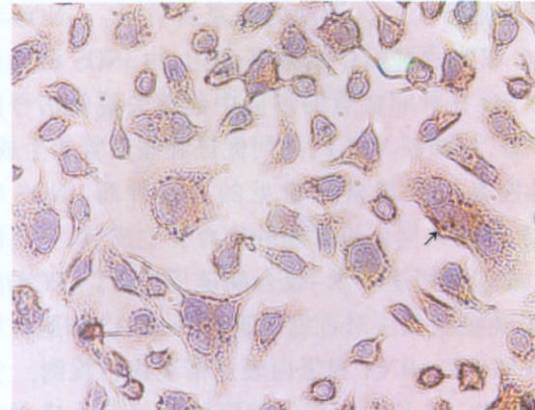


图 4 SP 免疫组化检测 VEGF 蛋白结果

Fig.4 The expression of VEGF protein by SP immunohistochemistry

VEGF protein positive express strongly in TeCa8113 cells cytoplasm (DAB staining x200 arrow)

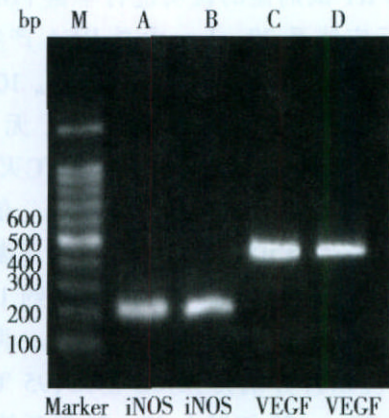


图 2 iNOS 基因和 VEGF 基因 PCR 后电泳结果

Fig.2 The iNOS/VEGF mRNA apparent band in two samples PCR outcome

The band of iNOS(A,B) and VEGF(C,D) are 200 bp and 500 bp

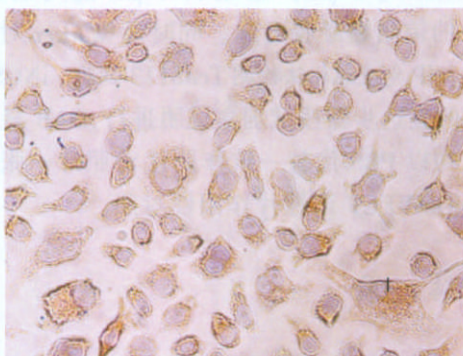


图 3 SP 免疫组化检测 iNOS 蛋白结果

Fig.3 The expression of iNOS protein by SP immunohistochemistry

iNOS protein strong positive express in the cytoplasm of TeCa8113 cells (DAB staining x200 arrow)

67.5%的乳腺癌中高表达, 而正常组织中无 iNOS 表达。Fujimoto 等^[4]发现 iNOS 的活性在原发性肺

癌中正常组织要高, 尤其是肺腺癌中的 iNOS 的活性比其它类型的肺癌都要高。Abms 等^[5]发现 iNOS 在正常结肠组织中几乎不表达, 但在肿瘤组织中表达明显上升, 近 60%的人结肠癌中有 iNOS 表达。Gallo 等^[2]发现在头颈部肿瘤组织中总 NOS、iNOS 的表达比正常粘膜中的表达要高; 并且在有淋巴结转移的肿瘤标本中总 NOS 的活性比无淋巴结转移的肿瘤标本要高得多。他们在测定 27 例头颈肿瘤标本及正常组织中 NOS 活性、cGMP 水平中发现: 总的 NOS、iNOS 和 cGMP 水平在肿瘤标本中显著高于正常组织水平。Kristina 等^[6]对 10 例头颈部鳞癌 5 例正常口腔粘膜 NOS 活性进行免疫组化研究, 发现头颈部鳞癌组织中 iNOS 的活性有明显增高, 这与本实验结果相符合。

Folkman^[7]认为肿瘤的生长分为两个阶段: 第一阶段为血管前期, 在此阶段肿瘤组织中无血管的存在, 肿瘤组织的营养主要来源于周围组织营养的渗透, 肿瘤生长相对较慢; 第二阶段为血管期, 此期新生血管开始形成, 肿瘤组织有了新生血管持续不断地为其提供营养和排除代谢废物, 增长迅速, 因此肿瘤的生长和侵袭转移的基础是新生血管的形成。肿瘤组织必须不断的产生新生血管, 才能维持其继续生长, 而肿瘤的血管的形成是正负因子之间平衡调节的结果。VEGF 是目前已知的促血管生成的主要细胞因子之一, 对血管内皮细胞的增殖、水解基底膜、迁移和血管构建的调控

作用较强且特异性高。人 VEGF 基因位于染色体 6p21.3, 由 8 个外显子和 7 个内含子构成, 具有以下功能^[8]: 可增加微血管的通透性, 诱导血管内大分子物质的漏出, 有利于血管外基质的形成, 为血管内皮细胞增生、血管的形成提供支架, 辅助血管生长; VEGF 可通过内皮细胞特异性受体刺激血管内皮细胞增生和毛细血管形成, 诱导血管内有丝分裂, 直接刺激血管生成并产生纤维蛋白原激活物和胶原酶, 促使癌细胞脱落进入血管或向邻近结缔组织扩散, 为肿瘤浸润转移创造条件。

有研究表明: NO 参与 VEGF 促肿瘤血管生成每一步骤^[9]。我们的前期研究也表明^[10,11], 在舌鳞癌组织 iNOS mRNA 表达阳性组中, iNOS mRNA 表达水平与 VEGF 阳性表达水平呈正相关关系且与舌鳞癌颈淋巴结转移正相关。Jenkins 等^[12]的研究认为 NO 与肿瘤新生血管密切相关。此外, 还有研究表明 VEGF 在促进恶性黑色素瘤 A375 细胞增殖过程中伴随着 iNOS 高水平表达^[13], 在头颈鳞癌中, iNOS 与 VEGF-C 的表达正相关并共同促进淋巴管的生成和肿瘤的淋巴结转移^[14]。在本实验中, 我们检测到在舌癌 Tca8113 细胞株中 iNOS/VEGF mRNA 及蛋白均呈现高水平表达, 但 iNOS 与 VEGF 在促进肿瘤的发生发展中存在何种联系, 其作用机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社出版, 1997:1- 18.
- [2] GALLO O, MASINI E, MORBIDELLI L, et al. Roles of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(8): 541- 549.
- [3] REVENEAU S, AMOULD L, JOLIMOY G, et al. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors [J]. Lab Invest, 1999, 79(10): 1215- 1225.
- [4] FUJIMOTO H, ANDO Y, YAMASHITA T, et al. Nitric oxide synthase Activity in human lung cancer [J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(12): 1190- 1198.
- [5] AMBS S, MERRIAM W G, BENNETT W P, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression [J]. Cancer Res, 1998, 58(2): 334- 341.
- [6] KISTINA R, JIRI P, PETER P, et al. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Otolaryngology head and neck surgery, 1995, 1139(5): 541- 590.
- [7] FOLKMAN J. What is the evidence that tumor are angiogenesis dependent [J]? J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1):4- 6.
- [8] GERSHENWALD J E, FIDLER I J. Cancer targeting lymphatic metastasis [J]. Science, 2002, 296(5574): 1811- 1812.
- [9] 杨朝晖, 陈伟良, 李海刚, 等. 诱导型一氧化氮酶抑制剂对地鼠颊囊癌变的干预作用 [J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(5) 357- 361.
- [10] 曾曙光, 陈伟良. 一氧化氮在舌鳞癌血管生成中的作用 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(5): 375- 376.
- [11] 陈伟良, 李海刚, 潘朝斌, 等. 一氧化氮合酶在舌癌组织中的表达及其与预后的关系 [J]. 中华口腔医学杂志, 1998, 339(2): 152- 154.
- [12] JENKINS D C, CHARLES I G, THOMSEN L L, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10): 4392- 4399.
- [13] TAO J, TU YT, LI JW, et al. Endogenous production of nitric oxide contributes to proliferation effect of vascular endothelial growth factor-induced malignant melanoma cell [J]. Clin Exp Dermatol, 2006, 31(1):94- 99.
- [14] FRANCHI A, MASSI D, SANTUCCI M, et al. Inducible nitric oxide synthase activity correlates with lymphangiogenesis and vascular endothelial growth factor-C expression in head and neck squamous cell carcinoma [J]. J Pathol, 2006, 208(3): 439- 445.

(编辑 王晓鹰)