

C - Myc / Fas 基因转染对颊癌细胞移植瘤的影响

侯劲松¹, 黄洪章², 王建广², 潘朝斌², 唐海阔¹

(中山大学 1. 光华口腔医学院口腔颌面外科, 广东 广州 510055; 2. 附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探讨 C- Myc/Fas 基因 BcaCD885 细胞裸鼠移植瘤内转染的抑瘤效果, 了解分子机制。【方法】构建颊癌 BcaCD885 细胞裸鼠移植瘤模型, 实验动物分 3 组, 每组 16 只。分别瘤内注射脂质体、脂质体/ pBK- fas、以及脂质体/pBK- Fas/pcDNA3- C- Myc 共聚物, 观测移植瘤增殖, 绘制生长曲线。转染 72 h 后每组处死 6 只动物, RT- PCR 检测移植瘤细胞 Fas mRNA 表达。流式细胞术(Flow cytometry, FCM) 检测 Fas 蛋白表达和移植瘤细胞凋亡、增殖水平。【结果】Fas 转染、C- Myc/Fas 共转染抑制肿瘤增殖, 生长抑制率分别为 47.33% \pm 2.29% 和 49.93% \pm 5.15%, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。Fas 转染、C- Myc/Fas 共转染增强移植瘤细胞 Fas mRNA 表达, 提高 Fas 蛋白阳性表达率、阳性表达强度和凋亡指数。共转染组增殖指数为 65.45% \pm 7.11%, 高于对照组和 Fas 组 (53.26% \pm 6.37% 和 51.93% \pm 7.51%), 差异有显著性 ($P < 0.01$)。对照组和 Fas 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。【结论】Fas、C- Myc/Fas 转染抑制颊癌细胞裸鼠移植瘤增殖与增强 Fas 表达、促进细胞凋亡有关。

关键词: 癌, 鳞状细胞; C- Myc; Fas; 凋亡

中图分类号: R739.86

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0072-04

Effect on Transplanted Tumor of Human Buccal Carcinoma Cells by Transfection of C- myc and Fas Gene

HOU Jing-song¹, HUANG Hong-zhang², WANG Jian-guang², PAN Chao-bin², TANG Hai-kuo¹

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua School of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of c- myc and fas gene transfection on proliferation of transplanted tumor in nude mice of BcaCD885 cells and the possible mechanism.【Methods】 Model of transplanted tumor of BcaCD885 cell was built. Nude mice were divided into three groups (each of 16 animals). Lipofectamine, mixture of lipofectamine and plasmid pBK- fas, mixture of lipofectamine and plasmid pBK- fas and pcDNA3- c- myc were transfected into transplanted tumor respectively. Growth of neoplasm were observed and recorded regularly. Sacrificed 6 animals in each group and harvested tumor samples after 72 hours of transfection. Fas mRNA expression in neoplasm cells was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT- PCR). Expression of fas protein and apoptosis and proliferation of the tumor cells were measured by flow cytometry (FCM). 【Results】 Growth suppression of transplanted tumor was found in fas transfection group (47.33% \pm 2.29%) and in c- myc and fas cotransfection group (49.93% \pm 5.15%). But no significant difference of growth suppression rate between them was showed ($P > 0.05$). RT- PCR and FCM suggested that fas- transfection and c- myc/fas cotransfection enhanced expression of fas mRNA and protein and increased apoptosis index (AI), especially demonstrated in c- myc and fas cotransfection tumors. Proliferation index (PI) in cotransfection group was 65.45% \pm 7.11%. It was significantly higher than fas transfection group with the PI of 53.26% \pm 6.37% ($P > 0.05$) and control group with the PI of 51.93% \pm 7.51% ($P > 0.05$). But no difference was released significantly between control group and fas transfection group ($P > 0.05$). 【Conclusion】 Growth suppression in transplanted tumor in nude mice caused by fas- transfection or c- myc and fas cotransfection might be associated with increasing of expression of fas gene and enhancement of apoptosis in

收稿日期: 2005-06-16

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目 (5300823); 广东省医学科学技术研究基金资助项目 (A2005253)

作者简介: 侯劲松 (1969-), 男, 湖北荆门人, 博士, 讲师, 主治医师. E-mail: houjsgz@yahoo.com.cn

tumor cells.

Key words: carcinoma, squamous cell; C- myc; fas; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):72- 75]

凋亡不足和增殖过度是肿瘤发生发展的基本原因。在凋亡调控过程中, 跨膜蛋白 Fas 及其配体 FasL 构成的凋亡系统发挥重要作用。Fas 表达下调或缺失是肿瘤细胞逃避凋亡的主要方式^[1,2]。提高肿瘤细胞 Fas 表达水平可以抑制移植瘤形成^[3]。对于 C- myc 基因, 过去多着眼促增殖和转化研究。后来证实, 在营养不足或乏氧状态下, C- myc 也能介导肿瘤上皮细胞凋亡, 且 C- myc 介导凋亡与上调细胞 Fas 表达有关^[4]。我们的前期研究证实 C- myc 可以介导口腔鳞癌细胞凋亡^[5]。但 C- myc 和 Fas 转染对口腔实体瘤的治疗效果如何, 目前尚无报道。特别是考虑 C- myc 凋亡机制与 Fas 凋亡信号的联系, 本实验首次研究 C- myc 和 Fas 基因瘤内共转染是否具有协同抑瘤效应, 并对相关机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

含 Fas 基因的真核表达重组质粒 pBK- Fas 由日本 Iyon 教授惠赠; 含 C- myc 基因的真核表达重组质粒 pcDNA3- C- myc 由王建广博士构建; 培养液 RPMI - 1640 和胎牛血清为 Hyclone 产品; Lipofectamine™ Reagent、TRIZol Reagent 为 GIBCO BRL 产品; Access RT- PCR System 为 Promega 产品; BALB/c 裸鼠由中山大学动物实验中心提供; 引物由上海生工合成: -actin 上游引物 5 - CTCTTTGATGTACGCACGATTTTC - 3, 下游引物 5 - GTGGCCGCTCTAGG CACCAA - 3, 扩增产物 162 bp; Fas 上游引物 5 - AGCTCT TTCACTTC GGAGGATT - 3, 下游引物 5 - TGGCAAAGAA GAAGACAAAGC - 3, 扩增产物 581 bp。

1.2 细胞培养及移植瘤模型的建立

人类癌 BcaCD885 细胞(引自四川大学华西口腔医学院)置 37 ℃、体积分数 5 %CO₂ 孵箱, 用含 100 mL/L 胎牛血清、10⁵ U/L 青霉素和链霉素的 RPMI- 1640 培养。胰蛋白酶法收集细胞。皮下接种 6- 8 周龄裸鼠 48 只, 细胞量 6 × 10⁶ /每只。移植瘤直径约 8 mm 时开始干预实验。

1.3 Fas 和 C- myc 质粒瘤内转染

参照 Lipofectamine™ Reagent 说明进行。对照组、Fas 组、共转染组各 16 只, 分别瘤内注射脂质体、脂质体/pBK- Fas、脂质体/ pBK- Fas / pcDNA3- C- myc。每只裸鼠用 Fas 质粒 240 μg、c- myc 质粒 180 μg、脂质体 300 μL。首次注射后 8 d 和 16 d 同法同量重复一次。

1.4 移植瘤常规检测

转染后 4 d 一次记录肿瘤体积, 共 6 次。根据体积变化移植瘤绘制生长曲线, 体积差异计算生长抑制率。肿瘤体积 = $\pi \times \text{长径} \times \text{短径}^2 / 6$; 生长抑制率 = (对照组肿瘤体积增长量 - 实验组肿瘤体积增长量) / 对照组肿瘤体积增长量 × 100%。

1.5 Fas mRNA 表达检测

首次转染 72 d 后, 每组处死 6 只裸鼠, 采集移植瘤标本, TRIzol™ Reagent 提取移植瘤细胞总 RNA。Access RT- PCR System 检测移植瘤细胞 Fas mRNA 表达: 反应体系含 1 μg RNA 模板, 10 μL AMV/Tfl 5 × 反应缓冲液, 1 μL dNTP 混合物, 上游和下游引物各 1 μL (50 pmol), 25 mmol/L MgSO₄ 2 μL, AMV 逆转录酶和 Tfl DNA 聚合酶各 1 μL, 加水至 50 μL。48 ℃ 60 min 合成第一条 cDNA 链, 94 ℃ 2 min 失活 AMV 逆转录酶。随后 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 70 ℃ 延伸 2 min, 40 个循环, 最后延伸 7 min。扩增产物 4 ℃ 保存。取 10 μL PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳, 观察目的 DNA 和内参照 DNA 条带, 图像分析系统分析灰度值。以 Fas 和 -actin 条带灰度值比值代表 Fas 基因表达水平。

1.6 移植瘤细胞 Fas 蛋白表达和凋亡、增殖的流式细胞检测

制备移植瘤细胞悬液, 400 目筛网过滤, 离心纯化。预冷体积分数 70%乙醇固定过夜, 细胞经荧光素标记的抗 Fas 单克隆抗体冰上处理 4 h, 流式细胞仪检测移植瘤细胞 Fas 蛋白阳性表达率和表达强度。PI 染色, 流式细胞仪检测移植瘤细胞的凋亡指数和增殖指数 (增殖指数 = $[S+G_2] / [G_0/G_1+S+G_2]$)。

1.7 统计分析

采用统计软件 SPSS 11.0, 行单因素方差分析或 t 检验。

2 结果

2.1 移植瘤增殖状况和生长曲线

生长曲线显示(图 1), 对照组移植瘤生长快, Fas 组和共转染组增殖状态相似, 生长较慢。统计检验表明, 转染 4 d, Fas 组、共转染组与对照组体积差异无显著性 ($F=0.44, P>0.05$)。转染第 8 天开始, Fas 组、共转染组移植瘤体积始终小于对照组 ($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。但整个观察期内 Fas 组和共转染组移植瘤体积差异不明显 ($P>0.05$)。实验期间, 各组均见少量移植瘤出现局部缺血坏死现象, 坏死瘤体直径均超过 12 mm。

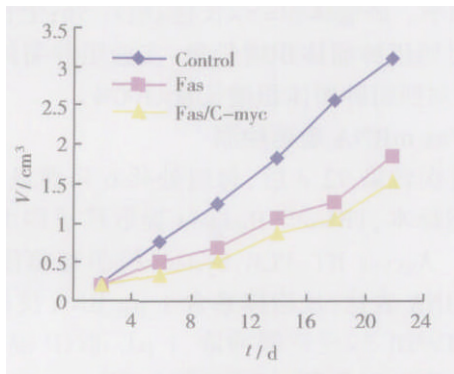


图 1 移植瘤生长曲线

Fig.1 Growth curve of transplanted neoplasm

2.2 移植瘤生长抑制率

Fas 组肿瘤生长抑制率 $47.33\% \pm 2.29\%$, 共转染组生长抑制率 $49.93\% \pm 5.15\%$, 差异无统计学意义 ($t=1.13, P>0.05$)。

2.3 移植瘤细胞 Fas mRNA 表达检测

分析凝胶电泳条带灰度值(图 2), 对照组、Fas 组、共转染组灰度值分别是 0.201 ± 0.013 、 0.245 ± 0.014 和 0.287 ± 0.028 , 组间差异有统计学意义 ($F=42.705, P<0.01$)。表明 Fas 转染增强移植瘤 Fas mRNA 表达, Fas/C-Myc 共转染增强作用最明显。

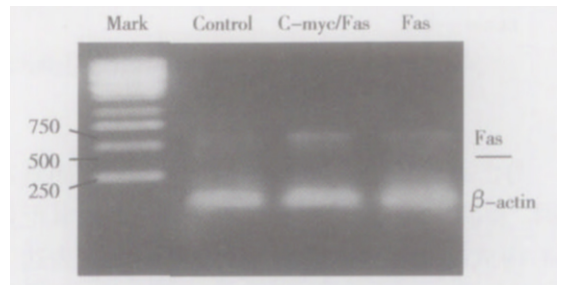


图 2 各移植瘤 Fas mRNA 表达的 RT-PCR 检测
Fig.2 RT-PCR detection for Fas mRNA expression in transplanted tumors

2.4 Fas 蛋白的流式细胞检测

Fas 蛋白阳性表达率和阳性强度检测见表 1。单因素方差分析显示, 阳性表达率组间差异有显著性 ($F=84.97, P<0.01$), Fas 组和共转染组高于对照组, 但 Fas 组和共转染组阳性率差异不显著 ($P>0.05$)。三组移植瘤细胞 Fas 阳性表达强度差异显著 ($F=351.42, P<0.01$)。说明 Fas 转染和 C-myc/Fas 共转染均提高 Fas 蛋白阳性强度, 共转染组提高最明显。

表 1 移植瘤 Fas 蛋白阳性表达率和阳性强度

Table 1 Positive expression rate and intensity of Fas protein in transplanted tumors

Groups	Positive expression rate	Positive expression intensity
Control	$83.25\% \pm 4.38\%$	41.26 ± 3.33
Fas	$95.88\% \pm 5.12\%$	61.58 ± 6.01
Fas/C-myc	$96.46\% \pm 6.36\%$	77.95 ± 4.82

2.5 细胞凋亡和增殖的流式细胞检测

见图 3。对照组、Fas 组和共转染组凋亡指数分别为 $6.25\% \pm 0.87\%$ 、 $11.59\% \pm 1.07\%$ 和 $19.51\% \pm 2.39\%$, 统计表明, 组间差异有统计学意义 ($F=352.07, P<0.01$), 共转染组凋亡指数最高。细胞周期分析显示, 3 组增殖指数依次为 $53.26\% \pm 6.37\%$ 、 $51.93\% \pm 7.51\%$ 和 $65.45\% \pm 7.11\%$, 组间差

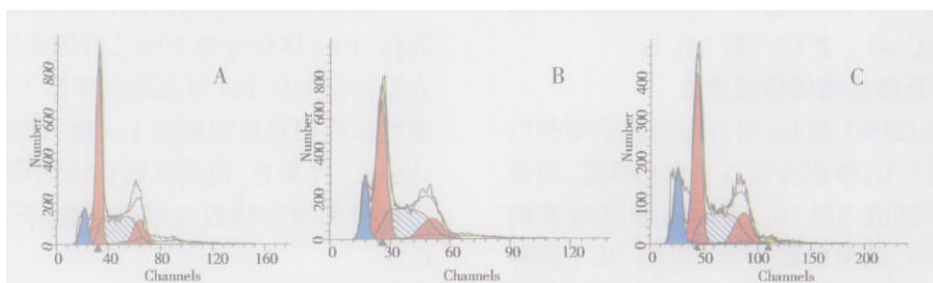


图 3 移植瘤细胞凋亡和增殖的流式细胞检测

Fig.3 FCM analysis for apoptosis and proliferation in transplanted tumors

A: Control group; B: Fas group; C: Co-transfection group

异有统计学意义 ($F=54.34, P < 0.01$), 共转染组高于其它两组。但对照组和 Fas 组增殖指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明单一 Fas 转染不影响增殖指数。

3 讨 论

C-myc 的促增殖和转化功能已有广泛的研究。上世纪 90 年代后期, C-myc 的凋亡诱导功能开始受到重视。目前认为, 促进增殖转化和介导凋亡都是 C-myc 的基本功能, 在正常条件下, C-myc 发挥促增殖功能, 若细胞环境生长因子缺乏、营养不足或处于乏氧状态, C-myc 则诱导细胞向凋亡发展^[4]。由于人体肿瘤普遍存在 C-myc 扩增和过表达, 设法利用其固有的凋亡诱导潜能, 激活肿瘤细胞凋亡, 是值得探讨的方向。我们前期研究证实, C-myc 转染可以介导口腔癌细胞凋亡^[5]。但 C-myc 转染对实体瘤的抑制作用如何, 尚未得到实验验证。由于范围较大的晚期肿瘤瘤体中部多处于缺血乏氧状态, 这种细胞环境为 C-myc 介导的凋亡基因治疗提供了可能。另一方面, 虽然前期研究显示 Fas 转染可以抑制口腔癌移植瘤形成, 但实体瘤治疗效果同样有待证实。本研究的另一个目的, 是想探讨 C-myc/Fas 共转染, 是否能够通过 C-myc 上调 Fas 表达, 进一步提高单纯 Fas 转染的抑瘤效应。

由于脂质体介导的基因转染在细胞内表达有一定的时限性, 为克服瞬时表达对实验结果的影响, 本研究采用了瘤内多次注射的方法, 以企获得更高的转染效率和更长的表达时间。本研究发现, Fas 转染、C-myc/Fas 共转染抑制入颊癌 BcaCD885 细胞移植瘤生长, 增强瘤体细胞 Fas mRNA 表达, 提高 Fas 蛋白阳性表达强度和凋亡指数。三者间共转染组各项指标最高, 说明 C-myc 基因移植瘤内转染有增强 Fas 表达、促进细胞凋亡的作用, 结果与体外实验一致^[6]。本研究还发现, Fas 组和 C-myc/Fas 共转染组移植瘤 Fas 蛋白阳性表达率差异不明显, 可能与 Fas 转染后细胞 Fas 阳性表达率已达较高水平有关。

有趣的是, 尽管实验中 C-myc/Fas 共转染组瘤体细胞 Fas mRNA 表达水平、蛋白表达水平和凋亡指数均高于单纯 Fas 转染组, 但两组移植瘤生长抑制率差异却无统计学意义。分析各组移植瘤细胞增殖状态, 我们发现, 单纯 Fas 转染后移植瘤细胞增殖水平没有改变, 但 C-myc/Fas 共转染组瘤体细胞

增殖水平上升, 增殖指数显著高于 Fas 转染组和对对照组。由于肿瘤生长是细胞增殖和凋亡共同作用的结果, C-myc/Fas 转染后, 虽然移植瘤细胞凋亡水平高于 Fas 组, 但由于增殖水平提高, 肿瘤抑制作用必然受到一定程度的削弱^[7]。上述检测为两组移植瘤体积差异不明显提供了可能的解释。关于共转染提高移植瘤细胞增殖指数的原因, 初步推断可能与部分营养状态良好的外层肿瘤细胞单纯转染 C-myc 基因有关。

本研究结果提示, 尽管 C-myc/Fas 共转染有一定的抑制肿瘤作用, 但疗效与理论期望仍有差距, 其抑瘤效应并没有较单纯 Fas 转染显著提高, 提示有两方面的工作要做。一方面, 尽管本研究已采用多次注射来提高转染效率, 但转染时间间隔和转染方法本身仍可能对结果造成影响, 改变转染手段或给药时间是否能达到预期效果有待深入。另一方面, 根据以上实验结果, 如何避免 C-myc 基因对外层实体瘤细胞的单一转染, 也是后续工作的重点。作为改进, 构建 C-myc/Fas 融合基因值得探讨。

参考文献:

- [1] Loro L L, Vintermyr O K, Johannessen A C, et al. Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 1999, 28(2): 82-87.
- [2] Ghose A, Fleming J, El-Bayoumy K, et al. Enhanced sensitivity of human oral carcinomas to induction of apoptosis by selenium compounds: involvement of mitogen-activated protein kinase and fas pathway [J]. Cancer Res, 2001, 61(20):7479-7487.
- [3] 侯劲松, 黄洪章, 王建广, 等. Fas 转染及抗体处理对舌鳞癌细胞 Tca8113 移植瘤形成和增殖的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(3): 215-218
- [4] Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-myc [J]. Oncogene, 1999, 18(19): 2967-2987.
- [5] 侯劲松, 黄洪章, 王建广, 等. C-myc 转染对舌鳞癌细胞系 Tca8113 fas 表达和凋亡的影响[J]. 癌症, 2002, 21(6): 60160-60164.
- [6] Hou JS, Huang HZ, Wang JG, et al. Growth suppression in transplanted tumor of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 by cotransfection of C-myc and Fas gene[J]. Chinese J. Dent. Res. 2004, 7(2): 10-14.
- [7] 李劲松, 李海刚, 蔡华雄, 等. 明胶酶在舌鳞癌发生、演进中的表达和意义[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1): 109-115.

(编辑 刘清海)