

• 基础实验研究论著 •

脂质体介导 MAPK 反义寡核苷酸对人喉癌细胞 Hep-2 的生物学影响

陈向军¹, 刘筱琴^{2△}, 伍启刚¹

(1. 湖北医药学院附属太和医院耳鼻喉科, 湖北十堰 442000;

2. 重庆市急救医疗中心, 重庆 400014)

摘要:目的 探讨应用脂质体介导的 MAPK 反义寡核苷酸(ASO)对人喉癌细胞 Hep-2 的生物学的的影响。方法 用脂质体转染法将 MAPK ASO 导入 Hep-2 细胞中,通过 Western blot 检测 MAPK 蛋白质的表达量, γ -32PATP 渗入法检测 MAPK 活性的改变、MTT 比色法检测 Hep-2 增殖和 FCM 检测细胞凋亡的变化以及 Transwell 小室法检测对喉癌细胞侵袭能力的改变,检测 MAPK ASO 对 Hep-2 细胞的生物学作用。结果 MAPK ASO 可明显抑制 MAPK 蛋白的表达及其活性,反义组与正义组、随机组、对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);对 Hep-2 细胞增殖有抑制作用,反义组细胞增殖在第 3 天时明显下降;诱导 Hep-2 细胞发生凋亡,正义组的细胞凋亡率明显低于反义组($P < 0.01$);抑制 Hep-2 细胞的侵袭能力,反义组侵袭至 Transwell 小室滤膜下表面的细胞数明显低于正义组和对照组($P < 0.05$)。结论 脂质体介导的 MAPK ASO 可抑制人喉癌细胞的体外增殖,诱导凋亡,并抑制侵袭能力,为喉癌的基因治疗提供了新的思路。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶; 喉癌; 寡核苷酸类,反义; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2073-02

Biological effects of liposome-mediated MAPK ASO on human laryngeal cancer cell Hep-2

Chen Xiangjun¹, Liu Xiaojin^{2△}, Wu Qigang¹

(1. Department of ENT, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China;

2. Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the the biological effects of liposome-mediated mitogen-activated protein kinase(MAPK) antisense oligodeoxynucleotides(ASO) on human laryngeal cancer cell Hep-2. **Methods** After MAPK antisense oligodeoxynucleotide (ASO) was transferred into the Hep-2 cells, the expression of MAPK protein was detected by Western blot, the change of MAPK activity by γ -32PATP infiltration; The proliferation inhibition, invasiveness and apoptosis was studied with MTT, Transwell chamber and FCM. **Results** MAPK ASO reduced the expression of MAPK protein and its activity, compared with Sen, Lipo, Ran group ($P < 0.05$); inhibited the proliferation of HEP-2 cells significantly on third day; induced apoptosis in Hep-2 cells, the apoptosis ratio of Sen group was lower than Ant group ($P < 0.01$); the invasiveness of human Hep-2 glioma cells was inhibited significantly, the cell number under the membrane surface of Transwell chambers was lower in Ant group compared with Sen group and control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Liposome-mediated MAPK ASO cells in vitro inhibit proliferation, invasiveness, and induce apoptosis, which could provide a new way of gene therapy for laryngeal cancer.

Key words: mitogen-activated protein kinase; laryngeal cancer; oligonucleotides, antisense; cell proliferation; apoptosis

喉癌本质上是一种多基因异常疾病,因此探讨喉癌相关的基因信号转导通路中相关成员之间的关系有助于为喉癌的基因治疗研究提供新的思路。丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)能将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,作用于细胞的增殖、分化、转化及凋亡等过程^[1],喉癌的发生也可能与 MAPK 信号转导有关^[2]。笔者以反义寡核苷酸(ASO)技术为研究手段,研究了 MAPK ASO 对喉癌细胞 Hep-2 的生物学影响。

1 材料与与方法

1.1 细胞来源 Hep-2 喉癌细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 仪器与试剂 Transwell 小室购于 Corning Costar 公司; RPMI 1640 培养基、核小牛血清购自 Gibco 公司; LipofectAMINETM 转染试剂购自 Life Technology 公司;鼠抗人 MAPK 的 IgG1 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 方法

1.3.1 MAPK ASO 的制备及脂质体介导瞬时转染 寡核脱氧核苷酸由上海生工公司合成,序列参照文献[3]。正义寡核苷酸序列与靶序列一致,随机寡核苷酸其序列所含碱基的种类和数量与 ASO 相同,但顺序随机排列。将含 Hep-2 细胞($1 \times$

10^5 个/毫升)的 RPMI 1640 完全培养基细胞悬液 2 mL 接种于 6 孔板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱培养,细胞达 80% 覆盖率时按说明书进行脂质体介导的转染。FITC 标记的 ASO 和正义、随机寡核苷酸按上述方法转染 Hep-2 喉癌细胞后,采用流式细胞仪检测转染率,每种寡核苷酸重复 3 次。

1.3.2 实验分组 根据不同的处理方式将 Hep-2 细胞分为 4 组:(1)MAPK ASO 转染的细胞(Ant 组);(2)MAPK 正义寡核苷酸转染的细胞(Sen 组);(3)MAPK 随机寡核苷酸转染的细胞(Ran 组);(4)仅加入脂质体的细胞(Lipo 组)。

1.3.3 Western blot 检测 MAPK 的表达 收集的细胞经裂解液处理后,离心取上清液,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。然后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至硝酸纤维素膜上,与 MAPK 一抗结合,之后与连接有辣根过氧化物酶的二抗结合,ECL 法显色、照相。

1.3.4 MAPK 活性测定 Hep-2 细胞与寡核苷酸作用 24 h 后用 PBS 冲洗,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞,超声处理后离心并取上清液,即细胞裂解液。将细胞裂解液与含小鼠髓磷脂碱性蛋白(MBP)和 γ -32PATP 的缓冲液于 30°C 反应 20 min 后,取 $40 \mu\text{L}$ 点样于滤纸上,红外烘干后测定其放

射活性。另取 20 μL 细胞测定蛋白含量。MAPK 活性单位以 pmol · min⁻¹ · mg⁻¹ 表示。

1.3.5 细胞增殖测定 将 1×10⁵ 个/毫升 Hep-2 喉癌细胞株接种于细胞培养板,按上述分组处理细胞 3 d 后,PBS 洗去坏死悬浮细胞,加入 MTT(5 mg/mL)100 μL,于 37 °C,振荡 30 min 后静置 2 min,用紫外分光光度计测各孔吸光度(A)值(波长 570 nm)。肿瘤细胞抑制率=(Lipo 组平均 A570 nm-处理组平均 A570 nm)/Lipo 组平均 A570 nm。

1.3.6 凋亡细胞计数及细胞周期分析 将细胞浓度调至 1×10⁷~2×10⁷/mL。往 100 μL 细胞悬液中加入新鲜配制 4%多聚甲醛 100 μL,固定 30 min。PBS 漂洗 1 次后用 RNase(50 mg/L)作用 30 min,以碘化丙啶(60 mg/L)综合染液染色 30 min 后,使用流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)记数,每组重复 3 次上样。

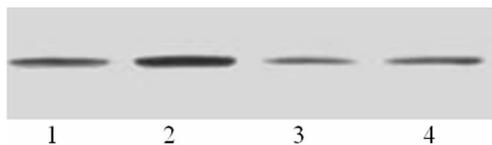
1.3.7 细胞体外侵袭能力测定 在 Transwell 小室中进行,以 50 μL 含 5 μg 纤维连接蛋白(FN)的 PBS 处理 Transwell 小室的聚碳酸酯膜下表面。Matrigel 胶用含 0.1%小牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释成 100 μg/mL,加入到滤膜上表面。细胞经消化,重悬于含 0.1%牛血清清蛋白(BSA)的 RPMI 1640 培养基中,取 2×10⁶ 个/毫升细胞 100 μL 加入至上室,600 μL 0.1%小牛血清培养基加入下室。常规培养 24 h 后,行 HE 染色。去除滤膜上层细胞,镜下计数滤膜下表面细胞数,随机计数 5 个视野中的细胞数目,每个标本重复 2 次,以侵袭细胞的相对数量来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多重比较采用方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ASO 的转染效率 流式细胞仪检测显示转染效率为 (86.7±4.1)%,见图 1(结果图见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 MAPK ASO 转染对 Hep-2 细胞 MAPK 蛋白表达的影响 与 Ran 组相比较,其他各组的蛋白含量比率分别为 Sen:96.5%,Lipo:91.2%,Ant:54.3%。Ant 组 MAPK 表达明显低于 Lipo 组与 Sen 组(*P* < 0.01),Lipo 组和 Sen 组 MAPK 蛋白的表达差异无统计学意义(*P* > 0.05),见图 2。



1:Lipo 组;2:Sen 组;3:Ant 组;4:Ran 组。

图 2 不同处理方式对 Hep-2 细胞株 MAPK 蛋白表达的影响

2.3 MAPK ASO 对细胞 MAPK 活性的影响 γ-32P ATP 掺入法测得不同处理组的 MAPK 活性,Sen、Lipo、Ran、Ant 组分别为 (59.3±2.7)、(63.2±3.9)、(52.1±1.5)、(19.4±5.3) pmol · min⁻¹ · mg⁻¹。Ant 组与其他 3 组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05);其他 3 组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.4 MTT 比色法比值及不同处理对细胞增殖的影响 MTT 比色法比值:Ant、Ran、Lipo、Sen 组分别为 0.18±0.08、0.38±0.12、0.36±0.04、0.35±0.03,Ant 组与各组间差异均有统计学意义(*P* < 0.05),其余各组间比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。第 3 天时,Ant 组的细胞增殖明显下降,Sen 组为 (60.3±3.7)%,Ant 组为 (42.8±1.77)%,两者比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),Ant 组细胞抑制率在 29.51%~59.41%之间。

2.5 流式细胞仪方法计数凋亡细胞及周期分析 细胞转染 48 h 后,细胞凋亡发生率在 Sen 和 Ant 组分别为 (4.5±0.78)%和 (29.5±2.61)%,两者间差异有统计学意义(*P* < 0.01)。细胞周期分析显示,MAPK ASO 处理的细胞,其 S 期细胞比率由对照组的 (42.12±2.35)%降至 (25.16±3.15)%,两者间差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.6 体外侵袭能力测定 MAPK ASO 转染使 Hep-2 细胞侵袭基底膜的能力受到的抑制,侵袭至 Transwell 小室滤膜下表面的细胞数,Ant 组为 13.5±2.3,低于 Sen 组的 18.1±2.2 和 Lipo 组的 19.2±1.5(*P* < 0.05)。

3 讨 论

信号转导是生物界的普遍现象^[4],在喉癌细胞中也存在多种信号转导途径,有促进细胞增殖并调节基因转录的 Ras-MAPK 途径和调节效应基因转录的 JAK-STAT 途径,MAPK 级联反应是这两条信号转导途径的最后共同通路,与喉癌发病有密切联系^[5]。在肿瘤侵袭转移中,MAPK 高度表达或持续处于激活状态时,能增强细胞侵袭能力^[6]。阻断 MAPK 信号转导有可能抑制喉癌的发生。针对某些癌基因设计的 ASO 可以特异性地封闭该基因的表达,对细胞增殖和(或)凋亡具有调节作用^[7]。本研究中,MAPK ASO 可有效地抑制 Hep-2 细胞增殖,诱导 Hep-2 细胞发生凋亡。

Transwell 体外细胞侵袭模型是测定肿瘤细胞体外侵袭能力最理想的实验模型^[8-10],该模型中的 Matrigel 胶是模拟人体基底膜的基本成分,含有 IV 胶原、层粘连蛋白等成分,而肿瘤细胞要穿透该基底膜必须靠自身的形态改变和分泌蛋白酶降解细胞外的基质以促进细胞的移动^[11-12]。MAPK 可以通过下调细胞的基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 表达及活性,降低肿瘤细胞侵袭能力^[13-14]。本研究中,MAPK ASO 使 Hep-2 细胞侵袭能力降低。

MAPK 基因是与人喉癌发生、发展密切相关的一种基因,将其 ASO 转染 Hep-2 喉癌细胞,能明显地抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞的凋亡,并降低其侵袭能力,为喉癌的基因治疗提供了新的思路。

参考文献

[1] Kohmura K, Miyakawa Y, Kawai Y, et al. Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells[J]. J Cell Physiol, 2004, 198(3): 370-376.
 [2] Westermark J, Li S, Jaakkola P, et al. Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2[J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 7156-7162.
 [3] Huang SL, Ding B, Shan B, et al. Prevention of intima hyperplasia by mitogen-activated protein kinase antisense oligodeoxynucleotide[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(4): 313-317.
 [4] Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate[J]. Development, 2004, 131(5): 965-973.
 [5] Garavello W, Nicolini G, Aguzzi A, et al. Selective reduction of extracellular signal-regulated protein kinase(ERK) phosphorylation in squamous cell carcinoma of the larynx[J]. Oncol Rep, 2006, 16(3): 479-484.
 [6] Fujisawa T, Ide K, Holtzman MJ, et al. Involvement of the p38 MAPK pathway in IL-13-induced mucous cell metaplasia in mouse tracheal epithelial cells[J]. Respirology, 2008, 13(2): 191-202.
 [7] Chu S, Yuan X, Li Z, et al. C-Met antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of glioma cells[J]. Surg Neurol, 2006, 65(6): 533-538.

水平以及蛋白质合成、折叠和运输具有重要调节作用。当新合成的蛋白质 N 末端糖基化、二硫键形成以及蛋白质由内质网向高尔基体转运等过程受阻时,非折叠或非正确折叠的新合成蛋白质在内质网中大量堆积而导致非折叠蛋白质反应(UPR)。同时,内质网调节细胞内 Ca^{2+} 的存贮、摄取和释放,在细胞内 Ca^{2+} 稳态、细胞功能维持和细胞内信号传导等过程中发挥重要作用。内质网 UPR 和 Ca^{2+} 稳态的破坏均可导致内质网应激,进一步发展可引起细胞凋亡,即内质网应激反应性凋亡^[9-10]。

白血病细胞对 As_2O_3 和常规抗肿瘤药物不会产生交叉耐药性,对化疗药物耐药的肿瘤细胞对 As_2O_3 仍保持其敏感性,并促使肿瘤细胞凋亡,这些优点使砷剂作为一种独特的抗肿瘤药物而备受瞩目。 As_2O_3 的抗肿瘤(白血病)机制比较复杂,包括抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,诱导肿瘤细胞分化,抑制肿瘤新生血管的形成,下调端粒酶活性和调控凋亡相关基因等^[1-4]。目前普遍认为 As_2O_3 主要通过线粒体途径诱导肿瘤(白血病)细胞凋亡,也有研究发现 As_2O_3 可上调 Fas 的表达而通过 Fas/FasL 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。本课题组前期研究已经证实 As_2O_3 可以抑制化疗敏感及对常规化疗药物耐药的白血病细胞的增殖并诱导其凋亡,能上调 Fas 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 和 Survivin 的表达^[2,4]。本研究中 $2 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 能诱导化疗敏感及对常规化疗药物耐药的白血病细胞发生明显的凋亡现象,细胞出现典型的凋亡形态学改变,证实 As_2O_3 主要通过诱导细胞凋亡的方式发挥作用。

白血病细胞发生多药耐药后生物学特性发生了很大变化,凋亡抵抗现象是其重要特征。 As_2O_3 诱导对常规化疗药物耐药的白血病细胞凋亡的分子机制是否有异于化疗敏感的白血病细胞,目前研究报道不多。本研究发现, K562 和 K562/ADM 细胞经 As_2O_3 诱导发生凋亡时,内质网明显扩张、且有脱颗粒现象,线粒体内外膜融合,嵴紊乱,肿胀,内膜扩张呈空泡样变。胞质 Ca^{2+} 水平明显升高, Caspase-3 活性明显增强,提示内质网和线粒体参与了白血病细胞凋亡过程。内质网应激反应性凋亡是一种新的细胞凋亡通路^[10-11], GRP78/Bip 是内质网应激反应的主要标志分子之一^[9-10]。 As_2O_3 诱导 24 h 后,对常规化疗药物耐药白血病细胞的 GRP78 表达增高约 1.5~4.0 倍,表明 As_2O_3 诱导 K562/ADM 细胞发生了内质网应激反应,而化疗敏感白血病细胞的 GRP78 表达并无明显变化。已有研究证实内质网和线粒体在结构和功能上紧密联系, Ca^{2+} 是二者发生联系的主要信号分子,也是内质网-线粒体共同作用引发细胞凋亡的分子基础。 As_2O_3 可能与内质网膜上的含巯基酶(如 Ca^{2+} -ATP 酶)等作用诱发内质网应激,促使其 Ca^{2+} 大量释放入胞质,线粒体由于其膜电势梯度摄取 Ca^{2+} 而

致钙超载,增加线粒体对凋亡的敏感性而使其膜通透性改变和去极化,随后大量 Cyt C 释放入胞质,参与形成 cyt C/Apaf-1/caspase-9 凋亡体,引发 caspases 级联反应,最终活化细胞凋亡的执行人 caspase-3 而诱发细胞凋亡。

综上所述, As_2O_3 可诱导 K562/ADM 细胞经内质网应激反应途径凋亡,而对于 K562 细胞而言,可以引起 Ca^{2+} 释放入胞质,但并未引起 GRP78 表达增高,未诱发内质网应激反应。K562 细胞是通过典型线粒体途径发生细胞凋亡。

参考文献

- [1] Asou N. Arsenic trioxide in the treatment of relapsed and refractory acute promyelocytic leukemia[J]. Intern Med, 2005, 44(8): 818-824.
- [2] Wang DH, Wei HL, Zhao HS, et al. Arsenic trioxide overcomes apoptosis inhibition in K562/ADM cells by regulating vital components in apoptotic pathway[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(5): 376-385.
- [3] Wei H, Su H, Bai D, et al. Arsenic trioxide inhibits p-glycoprotein expression in multidrug-resistant human leukemia cells that overexpress the MDR1 gene[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(11): 1644-1648.
- [4] 郭璐,魏虎来,张亚莉,维生素 E 琥珀酸酯诱导 K562/ADM 细胞凋亡过程中线粒体结构和功能的改变[J]. 肿瘤, 2006, 26(11): 997-1001.
- [5] 刘仁则,秦仁义. 用 Fluo3Am 荧光探针和流式细胞术检测活性腺腺泡细胞内游离钙离子[J]. 世界华人消化杂志, 1998, 6(4): 279.
- [6] 彭心昭,陈英. 长春新碱诱导的自噬性凋亡与细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的相关性研究[J]. 解剖学研究, 2000, 22(1): 15-18.
- [7] 曹云新,李豫容,杨安钢. 流式细胞仪实时监测细胞内 Ca^{2+} 浓度变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24): 4481-4483.
- [8] Fu Y, Li J, Lee AS. GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast Cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3734-3740.
- [9] Lee AS. GRP78 induction in Cancer; therapeutic and prognostic implications[J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3496-3499.
- [10] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.
- [11] Zhu J, Okumura H, Ohtake S, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system[J]. Oncol Rep, 2003, 10(3): 705-709.

(收稿日期: 2013-02-25)

(上接第 2074 页)

- [8] 田秀芬,汤建芬. β -catenin 在喉癌中的表达及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 23(9): 416-418.
- [9] 任刚,赵德安,周毅,等. β -catenin 拮抗因子 Chibby 对人喉癌细胞 Hep-2 增殖凋亡的影响[J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(4): 276-282.
- [10] 赵岩,胡俊兰,王占龙,等. β -连环蛋白、上皮钙黏蛋白及 Wnt 1 在喉癌中的表达及意义[J]. 河北医药, 2009, 31(7): 775-778.
- [11] 桑建中,刘丽,田芳,等. 人喉鳞癌组织中 c-myc 蛋白的表达及 c-myc siRNA 下调喉癌 Hep-2 细胞中 c-myc 的表达对细胞增殖的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25(15): 695-700.
- [12] 郭慧,杜波,李晓明,等. 携 EGFP 的 STAT3 载体构建、表达及其对 HEP-2 细胞的增殖抑制作用[J]. 山东医药, 2008, 48(3): 18-

- 20.
- [13] Holvoet S, Vincent C, Schmitt D, et al. The inhibition of MAPK pathway is correlated with down-regulation of MMP-9 secretion induced by TNF-alpha in human keratinocytes[J]. Exp Cell Res, 2003, 290(1): 108-119.
- [14] Sanceau J, Truchet S, Bauvois B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36537-36546.

(收稿日期: 2013-04-25)