文章编号:1000-5404(2006)02-0093-04

论著

pSilence APE1 对骨肉瘤诱导血管内皮细胞迁徙抑制作用的实验研究

王 东[1,2],仲召阳[1,2],李增鹏[2],卿 毅[1],张沁宏[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042)

提 要:目的 观察 APE1 siRNA 表达载体 pSilence APE1 对骨肉瘤诱导血管内皮细胞迁徙的抑制作用及其与 ES 的协同作用。**方法** pSilence APE1 转染骨肉瘤细胞 9901 和 HOS;骨肉瘤和内皮细胞 Transwell 双室培养,计数迁移到内室膜背面的内皮细胞数,观察 pSilence APE1 及其联合 ES 对骨肉瘤细胞诱导内皮细胞迁徙的影响。**结果** ES 低剂量组(350 ng/ml)和高剂量组(700 ng/ml)与正常对照组有明显差异($P<0.01$)。2 μg pSilence APE1 和 3 μg pSilence APE1 较单独脂质体组有显著性差异($P<0.01$)。2 μg pSilence APE1 和 ES 低剂量(350 ng/ml)联合组抑制内皮细胞迁徙的作用显著高于单独对照组($P<0.01$)。**结论** pSilence APE1 可显著抑制骨肉瘤细胞诱导的血管内皮细胞迁徙,并且可能与 ES 具有协同抗血管生成的作用。

关键词:骨肿瘤;APE1;血管生成
中图法分类号:R394.3;R73-36;R738.1 **文献标识码**:A

pSilence APE1 inhibits migration of endothelial cell induced by osteosarcoma cell

WANG Dong[1,2], ZHONG Zhao-yang[1,2], LI Zeng-peng[2], QING Yi[1], ZHANG Qin-hong[2] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To determine the inhibitory effect of APE1 siRNA expression vector pSilence APE1, and the possible synergetic role of pSilence APE1 and endostatin on endothelial cell migration induced by osteosarcoma cell 9901 and HOS. **Methods** The osteosarcoma cells and endothelial cells were co-cultured with transwell model, and the cell number through the inner membrane was counted to evaluate the inhibitory effect of endothelial cell migration by pSilence APE1 and its combination with endostatin. **Results** Both low dose (350 ng/ml) and high dose (700 ng/ml) of endostatin showed significant inhibition to endothelial cell migration induced by osteosarcoma cell, while the high dose showed much stronger inhibition than the low dose ($P<0.01$), such as the 2 μg pSilence APE1 and 3 μg pSilence APE1 ($P<0.01$). Moreover, the combination of 2 μg pSilence APE1 with low dose endostatin (350 ng/ml) showed markedly stronger inhibition to endothelial migration than either of 2 μg pSilence APE1 or low dose endostatin ($P<0.01$). **Conclusion** pSilence APE1 can inhibit the endothelial cell migration induced by the osteosarcoma, and it may have a potential synergistic role with endostatin in antiangiogenesis.

Key words: bone tumor; APE1; angiogenesis

DNA 损伤修复基因脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, APE1),又称氧化还原因子(redox factor-1, Ref-1),是低氧诱导细胞凋亡的重要保护因子[1]。据此,我们首先提出 APE1 可能与肿瘤血管生成有关。本研究应用 APE1 siRNA 表达载体 pSilence APE1 敲低(knock down)骨肉瘤细胞 APE1 的表达,通过双室模型观察其对内皮细胞迁移的影响,以及与血管生成抑制剂内皮抑素(endostatin, ES)的协同作用,以期提高肿瘤对抗血管生成治疗的敏感性。

1 材料与方法

1.1 APE1 siRNA 表达载体 pSilence APE1 构建

参照 Wang 等[2]设计的 APE1 siRNA cDNA 序列,以 pSi-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30340044,30472004),第三军医大学校管课题(XG200357)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340044, 30472004) and the Scientific Research Foundation of the Third Military Medical University (XG200357)

作者简介:王 东(1964-),男,天津市人,博士,主任医师,教授,主要从事肿瘤化疗、放疗的分子机制及基因治疗方面的研究,发表论文50余篇。电话:(023)68757706,E-mail: dongwang64@hotmail.com

收稿日期:2005-07-21;**修回日期**:2005-11-04

lence 2.0-U6 为载体，合成双链 DNA（设计序列参照 Ambion 设计软件），构建 APE1 siRNA 表达载体 pSilence APE1，DNA 测序鉴定。同时试剂盒提供了与人类基因无同源性的无关序列作为阴性对照。

1.2 细胞培养

人骨肉瘤细胞株 9901，由第四军医大学西京医院骨科研究所范清宇教授馈赠，含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养[3]；HOS 购自北京协和细胞库，10% 胎牛血清 MEM 培养基培养；人脐静脉内皮细胞 ECV304 由昆明陆军总院郭瑞威硕士馈赠，含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液培养，37 ℃，5% CO_2 常规培养传代。

1.3 pSilence APE1 质粒转染

按 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒说明书进行：选处于对数生长期的 9901 和 HOS 细胞 2×10^5，接种于 6 孔培养板中培养过夜。10 mmol/L HEPES 缓冲液将 2 μg、3 μg 质粒 DNA 稀释至 100 μl，以 1∶2 比例加入 Lipofectamine 2000（总体积为 200 μl），室温放置 15 min。将待转染细胞 PBS 洗涤后，加入质粒 DNA/脂质体复合物 200 μl，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度培养 4～8 h，换新鲜培养液继续培养。实验同时设 pSilence 对照转染为阴性对照组。

1.4 Transwell 双室模型实验

Transwell 由 FALCON 细胞培养板及配套的内室组成。该内室直径为 6.4 mm，包括 8 μm 的 PET 微孔膜（多聚乙烯四苯二甲酸盐膜，上覆基质胶 100 μg/ cm^2。外室的底部接种骨肉瘤 HOS 和 9901 细胞，pSilence-APE1 质粒转染后 12 h，内室膜上接种内皮细胞 2×10^4，同时加入 350 ng/ml 和 700 ng/ml ES（YH-16，山东烟台荣昌制药有限公司惠赠）培养 48 h。取出内室膜，用棉签拭去表面内皮细胞，甲醇固定，HE 染色，400 倍光镜下取上、下、左、右和中心 5 个视野，计数迁移到膜背面的内皮细胞数，计算其平均值，每组重复 3 次。

1.5 Ki67 免疫组化染色

将骨肉瘤细胞分为空白组、脂质体组、pSilence 对照组和 pSilence APE1 组，分别收集处理后 24、48、72 h 细胞，按 S-P 方法行免疫组化染色。计数 1 000 个细胞，计算增殖指数（proliferation index，PI）：PI = 阳性细胞数/1 000 × 100%。

1.6 TUNEL 法检测凋亡细胞

实验的分组同前，TUNEL 染色按照试剂盒说明书进行。计数 1 000 个细胞，计算凋亡指数（apoptosis index，AI）。AI = 阳性细胞数/1 000 × 100%。

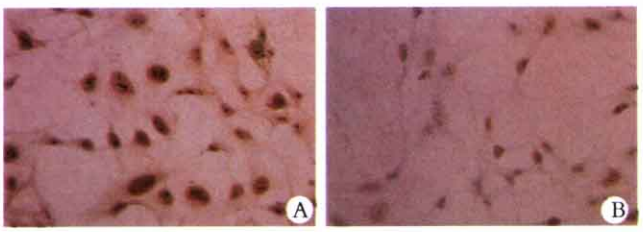
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 Ki67 免疫组化结果

空白组、单独脂质体组、pSilence 对照组多数细胞均出现明显的棕黄色颗粒状细胞核着色。pSilence APE1 组骨肉瘤细胞第 1 天开始，细胞着色较淡；阳性细胞数目较少，48 h 达到最低值（图 1），72 h 开始恢复。骨肉瘤细胞 9901 和 HOS 结果基本一致，其 PI 值明显低于对照组（表 1）。



A：转染前；B：转染后 48 h

图 1 pSilence APE1 转染骨肉瘤细胞 9901 Ki67 免疫组化染色（S-P × 400）

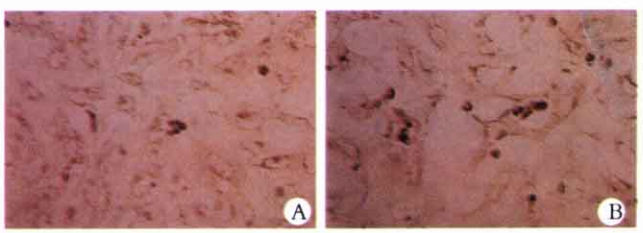
表 1 pSilence APE1 对骨肉瘤 9901 和 HOS 细胞 Ki67 蛋白表达的影响（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	处理后时间		
	24 h	48 h	72 h
对照组	88.52 ± 9.27	86.36 ± 9.86	84.56 ± 5.64
单独脂质体组	85.35 ± 12.65	83.32 ± 5.68	82.63 ± 6.52
pSilence 对照组	83.86 ± 9.27	80.36 ± 9.56	79.65 ± 8.36
9901/pSilence APE1	62.62 ± 8.69^{abc}	49.88 ± 7.56^{abc}	64.24 ± 5.68^{abc}
HOS/pSilence APE1	57.65 ± 7.23^{abc}	46.53 ± 8.34^{abc}	51.22 ± 6.85^{abc}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与单独脂质体组比较；c：$P<0.01$，与 pSilence 对照组比较

2.2 骨肉瘤细胞凋亡的检测结果

空白组、单独脂质体组、pSilence 对照组均出现少量棕黄色颗粒状细胞核着色，而 pSilence APE1 组着色细胞核数量增多（图 2）。骨肉瘤细胞 9901 和 HOS 结果基本一致，其 24 h AI 值明显高于对照组（表 2）。



A：转染前；B：转染后 48 h

图 2 pSilence APE1 转染骨肉瘤细胞 9901 凋亡染色（TUNEL × 400）

表 2 pSilence APE1 对骨肉瘤 9901 和 HOS 细胞凋亡的影响（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h AI 值	P 值
对照组	2.4 ± 1.6	
单独脂质体组	3.2 ± 2.0	>0.05
pSilence 对照组	3.1 ± 2.1	>0.05
9901/pSilence APE1	4.3 ± 1.8	<0.05
HOS/pSilence APE1	4.1 ± 1.8	<0.05

2.3 pSilence APE1 对血管内皮迁徙的影响

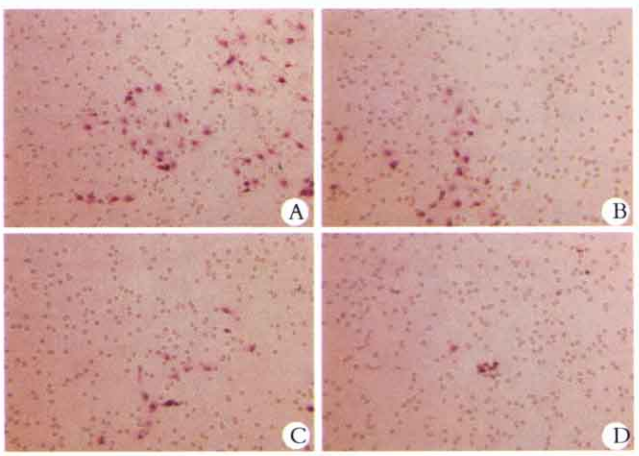
正常对照组与脂质体组对内皮细胞的迁徙没有明显的差

异（$P>0.05$），ES 低剂量组（350 ng/ml）和高剂量组（700 ng/ml）与正常对照组有明显差异（$P<0.01$），且高剂量组对内皮细胞迁徙抑制明显高于低剂量组。2 μg pSilence APE1 和 3 μg pSilence APE1 较单独脂质体组有显著性差异（$P<0.01$），且 3 μg pSilence APE1 组较 2 μg pSilence APE1 更能抑制内皮细胞迁徙。联合组对内皮迁移抑制显著高于单独 ES 低剂量组和单独 2 μg pSilence APE1 组（$P<0.01$）（表 3、图 3）。

表 3　pSilence APE1 和 ES 对内皮细胞迁徙作用的影响

组别	透过内膜细胞计数（个）
对照组	67.33 ± 2.08
脂质体组	62.33 ± 2.52
ES 低剂量组（350 ng/ml）	30.67 ± 1.53[ac]
ES 高剂量组（700 ng/ml）	12.67 ± 0.57[a]
2 μg pSilence APE1	25.67 ± 2.52[bc]
3 μg pSilence APE1	8.67 ± 1.15[b]
联合组（ES 350 ng/ml +2 μg pSilence APE1）	7.33 ± 0.57

a：$P<0.01$ 与对照组比较；b：$P<0.01$，与脂质体组比较；c：$P<0.01$，与联合组比较



A：脂质体组；B：ES 低剂量组（350 ng/ml）；C：2 μg pSilence APE1 组；D：联合组（ES 350 ng/ml 和 2 μg pSilence APE1）

图 3　pSilence APE1 联合 ES 抑制骨肉瘤诱导血管内皮细胞迁徙　（HE × 200）

3　讨论

研究表明，包括骨肉瘤在内的实体瘤的生长和转移过程中必须依赖肿瘤的新生血管，而促进血管形成因子和抑制血管形成因子的失衡是新生血管形成的重要因素。在众多血管形成抑制因子中，内皮抑制素的作用最强。该因子为胶原 XⅧ的 C 端片断，分子量约 20×10^3，主要在肝脏中合成。表面的肝磷脂硫酸结合位点可以和 VEGF 及 FGF-2 竞争性的结合内皮细胞表面的肝磷脂或乙酰肝素硫酸盐蛋白聚糖，从而竞争性的抑制细胞生长因子的作用。此外，ES 还具有 Zn 结合位点，这对保持内皮抑制素的结构和生物学特性是必不可少的[4]。O'Reilly 等[5]用 ES 治疗 Lewis 肺癌的小鼠时发现，低剂量时，其对肿瘤的抑制率为 53%，加大剂量后肿瘤抑制率超过 99%，可以退化到最初状态，如果继续治疗，可使肿瘤细胞处于休眠状态。此后，在多种实体瘤中研究表明，其对 S180 肉瘤细胞株、H22 肝癌细胞株、人胃癌 SGC7901 细胞系、人宫颈癌 Hela 细胞系及人肺腺癌等裸鼠移植瘤均有明显的抑制作用，并能阻止转移瘤的形成，而且在一定范围内显示出量效关系。

由于肿瘤细胞基因组的非稳定性，使得肿瘤对多数的癌症治疗都会快速地产生耐受性，这也是目前肿瘤治疗失败的主要原因。抗血管生成治疗是针对野生型的血管内皮细胞，因此，理论上能够逃避治疗耐受性的危险。但是，近来有证据表明，肿瘤细胞对抗血管生成药物同样可产生获得性抵抗，其中包括一些直接作用的血管生成抑制剂[6]。Yu 等[7]应用血管内皮生长因子受体-2（VEGFR-2）的单克隆抗体 DC101 治疗异基因型的 $p53^{+/+}$ 和 $p53^{-/-}$ 结肠癌 HCT116 裸鼠荷瘤时发现，尽管所有肿瘤的生长都受到抑制，但 $p53^{+/+}$ 和 $p53^{-/-}$ 两组对治疗的反应却显著不同。在开始治疗后 42 d，$p53^{-/-}$ 组肿瘤体积增大了 7 倍，而 $p53^{+/+}$ 组只增大了 2 倍。该结果表明肿瘤的基因背景可能是决定其对抗血管生成治疗反应的重要因素。很显然，肿瘤细胞远比人们现在所认识的复杂得多，有关其获得性抵抗抗血管生成的机制则知之更少，而 p53 基因的改变也肯定只是决定肿瘤细胞血管依赖或低氧敏感性基因中的一个例子。

APE1 是一个多功能的 DNA 碱基切除修复途径（base excision repair，BER）的限速酶，是细胞 DNA 放射性损伤和烷化剂致伤重要的修复因子[1]。当 DNA 碱基受到损伤时，首先是特异的糖基化酶切除被修饰的碱基，形成脱嘌呤/脱嘧啶位点（AP 位点），后者阻断 DNA 的复制，具有细胞毒及致突变作用。APE1 则与 AP 位点结合，通过 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶作用，水解 AP 位点 5′端，形成 3′－OH 端和 5′－脱氧核苷，为下一步 BER 修复途径创造了必要条件。此外，APE1 还具有氧化还原功能，通过维持细胞内多种转录因子的激活还原态，而参与多种关键的细胞反应，如氧化应激，转录因子调节，细胞周期控制与凋亡。已报道受 APE1 调控的转录因子包括 p53、HIF-a、NF-kB、

Fos/Jun(AP-1)、ATF/CREB 家族、PAX-8 等[8,9]，其中 p53、HIF-a、NF-kB、Fos/Jun(AP-1)是血管生成的重要调节因子。最近的研究表明 APE1 还可通过降低和 ROS 相关联的 GTP 酶 Rac 的活性，调控细胞内 ROS 的产生[10]。APE1 基因敲除小鼠在胚胎期即死亡，表明 APE1 是决定细胞存活的关键基因。缺血性神经组织，APE1 表达降低与细胞凋亡密切相关，抑制 APE1 表达能显著提高细胞对低氧的敏感性。抗血管生成治疗的作用是抑制肿瘤新生血管生成，使肿瘤细胞缺血缺氧。缺血阻断了肿瘤细胞生长所需的营养，而缺氧产生活性氧自由基 ROS 又会直接损伤 DNA，致使肿瘤细胞死亡或凋亡。因此，APE1 可通过 DNA 损伤修复酶，和氧化还原调节细胞转录因子双功能保护低氧诱导的细胞凋亡，进而影响肿瘤细胞对抗血管生成的敏感性。

APE1 在胚胎性横纹肌肉瘤、前列腺癌等[11]多种肿瘤都表现 APE1 过高表达，而人体骨肉瘤的研究结果亦表明72%患者存在 APE1 蛋白高表达，而且 APE1 表达与肿瘤微血管密度显著正相关，提示 APE1 可能是影响肿瘤血管生成的重要因素[2]。本研究应用 Transwell 模型观察 APE1 蛋白敲低前后的骨肉瘤细胞对血管内皮细胞迁徙能力的影响，计数内皮细胞穿过滤膜的数目，定量反映 APE1 对内皮细胞定向移动的关系。结果表明，ES 能明显抑制内皮细胞的迁徙，且其对内皮细胞迁徙力的抑制具有明显的量效关系。实验同时检测 pSilence APE1 对 ES 抑制血管迁徙的协同作用，结果表明，pSilence APE1 能明显抑制内皮细胞的迁徙，而且其与 ES 具有协同效应。结果提示 APE1 可能具有促进骨肉瘤细胞对血管内皮细胞的趋化作用，敲低骨肉瘤细胞的 APE1 基因可抑制血管内皮细胞的迁徙，从而对抗血管生成药物 ES 的功效具有明显的协同作用。

Fung 等[12]应用 RNAi 抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 和结肠癌细胞株 HCT116 中 APE1 蛋白表达时发现，APE1 的抑制能阻止细胞的增殖，激发细胞凋亡，提出 APE1 沉默和细胞增殖之间存在着短暂的联系，进一步研究表明，APE1 敲低的细胞的核酸内切酶活性下降比较明显，用具有核酸内切酶活性而无氧化还原活性的 APN1 替代 APE1，细胞的增殖逐渐恢复，认为核酸内切酶对细胞存活是必须的，当细胞 APE1 缺乏时，其介导的修复机制障碍，AP 位点不能及时修复，导致细胞毒性增加，内源性 DNA 损伤累积，结果导致细胞增殖抑制并触发细胞的死亡。我们先前的研究发现，APE1 基因的沉默与核酸内切酶的活性缺失成正相关[2]。本研究进一步表明，骨肉瘤细胞 APE1 蛋白的下调伴随着细胞增殖的降低，凋亡的增加，随着 APE1 蛋白水平的恢复，其增殖亦逐渐恢复。但 APE1 在骨肉瘤增殖和凋亡中的具体调控机制仍有待今后进一步研究。

参考文献：

[1] EVANS A R, LIMP-FOSTER M, KELLEY M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83-108.

[2] WANG D, LUO M, KELLEY M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[3] 廖 博, 马保安, 张惠中, 等. 人骨肉瘤9901细胞cDNA表达文库的构建和鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(6): 598-600.

[4] TJIN THAM SJIN R M, SATCHI-FAINARO R, BIRSNER A E, *et al*. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH_2-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3656-3663.

[5] O'REILLY M S, BOEHM T, SHING Y, *et al*. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.

[6] KERBEL R S, YU J, TRAN J, *et al*. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches[J]. Cancer Metastasis Rev, 2001, 201(1-2): 79-86.

[7] YU J L, RAK J W, COOMBER B L, *et al*. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy[J]. Science, 2002, 295(5559): 1526-1528.

[8] GAIDDON C, MOORTHY N C, PRIVES C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 *in vivo*[J]. EMBOJ, 1999, 18(20): 5609-5621.

[9] HUANG L E, ARANY Z, LIVINGSTON D M, *et al*. Activation of hypoxia-inducible transcription factor (HIF) depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit[J]. J Biol Chem, 1996, 271(50): 32253-32259.

[10] TELL G, DAMANTE G, CALDWELL D, *et al*. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon[J]? Antioxid Redox Signal, 2005, 7(3-4): 367-384.

[11] THOMSON B, TRITT R, DAVIS M, *et al*. Histology-specific expression of a DNA repair protein in pediatric rhabdomyosarcomas[J]. J Pediatr Hematol/Oncol, 2001, 23(4): 234-239.

[12] FUNG H, DEMPLE B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells[J]. Mol Cell, 2005, 17(3): 463-470.

（编辑 薛国文）