论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0876-04

佛波酯等3种促癌物诱导BALB/c 3T3细胞骨桥素基因表达升高

敖 琳[1],刘晋祎[1],高利宏[1],刘胜学[1],杨梦苏[2],曾志雄[2],方志俊[2],曹 佳[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038;[2]香港城市大学基因组科技应用研究中心,香港)

提 要:目的 探讨促癌物佛波酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA),岗田酸(okadaic acid, OA)和氯化镉(cadmium chloride, $CdCl_2$)在促进BALB/c 3T3细胞转化过程中对骨桥素基因(OPN)转录表达的影响。**方法** 以N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)为启动剂,TPA, OA和$CdCl_2$分别为促癌剂,建立BALB/c 3T3细胞转化模型。采用小鼠毒理基因芯片分别检测促癌物处理过程中和转化细胞集落中的基因表达变化,同时采用实时RT-PCR验证部分细胞样本的OPN基因表达。**结果** 基因芯片检测结果显示,3种促癌物在作用过程中均能诱导OPN基因表达升高,其中TPA处理后4 h, 7 d和17 d,OA处理后3, 7 d和24 d,$CdCl_2$处理后3 d和7 d,OPN基因的表达较对照组增强;同时在促癌物诱导形成的9个转化细胞集落中,有8个转化集落检测到OPN基因表达升高。此外,实时RT-PCR检测也验证了OPN基因的表达升高。**结论** OPN基因与TPA, OA和$CdCl_2$的促癌作用存在密切联系。

关键词:骨桥素基因;促癌物;佛波酯;岗田酸;氯化镉

中图法分类号:R394-33; R730.231; R992 **文献标识码**:A

Up-regulation of osteopontin gene in BALB/c 3T3 cells induced by tumor promoters of TPA, okadaic acid and cadmium chloride

AO Lin[1], LIU Jin-yi[1], GAO Li-hong[1], LIU Sheng-xue[1], YANG Meng-su[2], ZENG Zhi-xiong[2], FANG Zhi-jun[2], CAO Jia[1] ([1]Department of Hygiene Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Applied Research Center for Genomic Technology, City University of Hongkong, Hongkong, China)

Abstract: Objective To explore the changes of osteopontin (OPN) gene expression induced by tumor promoter of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), okadaic acid (OA) or cadmium chloride ($CdCl_2$). **Methods** The two-stage transformation test of BALB/c 3T3 cells was established with MNNG as initiator, TPA, OA or $CdCl_2$ as promoter respectively. Mouse toxicology gene chip was used to detect the gene expression of BALB/c 3T3 cells transformed with TPA, OA or $CdCl_2$ respectively, and the expression of OPN gene was validated by real-time RT-PCR assay. **Results** TPA, OA or $CdCl_2$ could increase the transcriptional expression of OPN gene in BALB/c 3T3 cells. The expression of OPN gene was up-regulated in the eight transformed cell colonies induced by TPA, OA or $CdCl_2$ respectively. Moreover, the up-regulation of OPN gene expression was confirmed by real-time RT-PCR assay. **Conclusion** The up-regulation of OPN gene expression is closely related to cell transformation of BALB/c 3T3 cells induced by TPA, OA or $CdCl_2$.

Key words: osteopontin gene; tumor promoter; 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; okadaic acid; cadmium chloride

骨桥素(osteopontin, OPN)是一种具有多种功能的分泌性酸性糖蛋白,通过与细胞表面的整合素受体或CD44受体结合,介导细胞与基质间相互作用及细胞信号转导[1]。近年的研究表明,OPN基因的高表达与多种类型肿瘤的浸润生长、恶性变以及转移有密切联系[2],同时在一些转化细胞株,如:促癌物佛波酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)处理的小鼠JB6上皮细胞,癌基因H-ras转染的NIH3T3细胞中,也发现OPN基因表达的升高[3]。但是对该基因在多阶段化学致癌过程中的表达情况,尤其在不同促癌过程中的作用还不清楚。我们在促癌物TPA、岗田酸(okadaic acid, OA)和$CdCl_2$分别诱导的BALB/c 3T3细胞两阶段转化实验研究中,采用小鼠毒理基因芯片和实时RT-PCR检测技术,观察了OPN基因在促癌过程以及转化细胞集落中的表达情况,为深入研究OPN

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2002CB512901),国家杰出青年基金资助项目(30125037),国家自然科学基金资助项目(30271136)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2002CB512901), the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125037) and the National Natural Science Foundation of China (30271136)

作者简介:敖 琳(1971-),女,重庆市人,博士,讲师,主要从事分子毒理学方面的研究。电话:(023)68752589

通讯作者:曹 佳,电话:(023)68752271, E-mail:caojia@mail.tmmu.edu.cn

收稿日期:2005-11-08;**修回日期**:2006-02-23

基因在化学促癌过程中的作用及 TPA、OA 和 $CdCl_2$ 的促癌作用分子机制提供了线索。

1　材料与方法

1.1　实验材料

BALB/c 3T3 细胞，克隆 A31，购自上海细胞生物所，培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基（美国 GIBCO-BRL 公司产品），培养条件为 37 ℃，5% CO_2。MNNG（N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine）和 TPA 为 Sigma 公司产品，OA 为 Calbiochem 公司产品，$CdCl_2$ 为上海化学试剂公司产品，以上试剂采用二甲基亚砜（Dimethyl Sulphoxide，DMSO，Sigma 公司产品）溶解。ScanArray Express 激光共聚焦芯片扫描仪为 Pekin Elmer 公司产品。7700 荧光 PCR 定量仪为 ABI 公司产品。

1.2　两阶段细胞转化试验

参照 Dunkel 等[4]的方法。直径 60 mm 平皿中接种 1×10^4 个细胞，24 h 后加入启动剂 MNNG 1 mg/L，处理 4 h 后，PBS 洗细胞 3 次，换新鲜培养基继续培养 7 d。实验组细胞于接种 8 d 后加入促癌剂，剂量分别为：TPA（100 μg/L）、OA（7.8 μg/L），$CdCl_2$（324 μg/L），以后每周换液 2 次，换液同时补加促癌剂，共作用 2 周，促癌处理结束后观察 2 周；对照组细胞采用 MNNG 启动处理后，在促癌阶段加入相同体积的 DMSO，其余方法同实验组。促癌处理开始后，选择 4，24 h，3，7 和 17 d（OA 和 $CdCl_2$ 选择 24 d），共 5 个时间点收获促癌物处理组和对照组细胞样本，用于提取细胞总 RNA 和检测基因表达。

1.3　转化细胞集落的挑选和软琼脂锚着生长实验

转化实验结束时，采用胰蛋白酶消化法挑选典型的Ⅲ型转化细胞集落，每种促癌物各挑选 3 个所诱导形成的转化集落，与正常细胞平行传代 4 次以扩增细胞数量，最后收获正常细胞和转化细胞集落样本用于提取细胞总 RNA 和检测基因表达。同时采用双层软琼脂培养法，对挑选的集落细胞进行软琼脂锚着生长实验，每孔顶层琼脂中含 500 个细胞，于 37 ℃培养 2 周，观察细胞克隆形成情况，以 >50 个细胞为阳性克隆判断标准。

1.4　RNA 提取和探针标记

收获待测细胞样品，按 Gibco 公司 Tripure 试剂说明书提取细胞总 RNA，紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度，1% 变性胶电泳检测 RNA 完整性。取转化处理细胞及对照细胞的总 RNA 各 50 μg 作为模板，分别进行逆转录反应，合成 Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP 标记的 cDNA 探针。处理组和对照组探针混合后，采用 Millipore 柱纯化荧光标记探针。

1.5　基因芯片杂交试验

根据毒理学检测的需要，本实验室与香港城市大学基因组科技应用研究中心自行设计和研制出含 1 796 个基因，涉及 8 种生物学功能的小鼠毒理基因芯片。探针于 100 ℃变性 2 min 后与芯片在湿盒内进行杂交反应，反应条件为 65 ℃，18 h。玻片洗涤后采用扫描仪进行扫描，Quantyarray 软件分析 Cy3、Cy5 荧光信号强度以获取原始数据，采用局部均值化方法对原始数据进行标准化处理。基因表达变化水平用处理组荧光信号与对照组荧光信号的比值，即 Ratio 值进行定量，经过荧光交换重复实验，以 Ratio 值小于 0.5 为表达降低的基因，大于 2.0 为表达升高的基因。

1.6　实时 RT-PCR 实验

分别取待检测的 RNA 样本 1 ~ 2 μg，利用 M-MLV 逆转录酶在 42 ℃进行逆转录反应，然后采用 SYBR Green 试剂进行定量 PCR 扩增反应。OPN 基因的上游引物：5′-TTTGCTTTTGCCT-GTTTGGC-3′；下游引物：5′-GGCGCAAGGAGATTCTGC T-3′。内参照基因 β-actin 的上游引物：5′-GCTCTGGCTCCTAGCACCAT-3′；下游引物：5′-GATCCACACAGAGTACTTGCGC-3′。反应成分为：引物 0.1 μmol/L，dNTPs 0.125 mmol/L，$MgCl_2$ 1.25 mmol/L，*Taq* 酶 1 U，1 × PCR 反应液，SYBR Green 0.5 倍。反应条件为：50 ℃，2 min；95 ℃，10 min；然后进行 50 次循环：95 ℃，30 s；60℃，30 s；72 ℃ 15 s。每个样本做 2 个平行复管，使用 SDS 1.7 软件对数据进行处理。根据标准曲线直接计算所检测基因的表达量，除以内参照基因的表达后就可以获得每个样本中 OPN 基因的表达水平。

2　结果

2.1　几种促癌物诱导 BALB/c 3T3 细胞转化和锚着独立性生长

MNNG 1 mg/L 单独处理后不能诱导细胞出现转化，但在 MNNG 启动细胞后，再分别给予促癌物 TPA、OA 或 $CdCl_2$ 反复处理，能观察到典型的形态转化细胞灶出现，转化灶数量较对照组显著升高，图 1 为两阶段转化实验中诱导形成的转化灶细胞的形态。转化实验结束时，挑选培养的 9 个转化细胞集落，均能在双层软琼脂中生长形成克隆，具有锚着独立性生长特性，而正常细胞在软琼脂中不能生长，图 2 为转化细胞在软琼脂中生长形成克隆的形态。

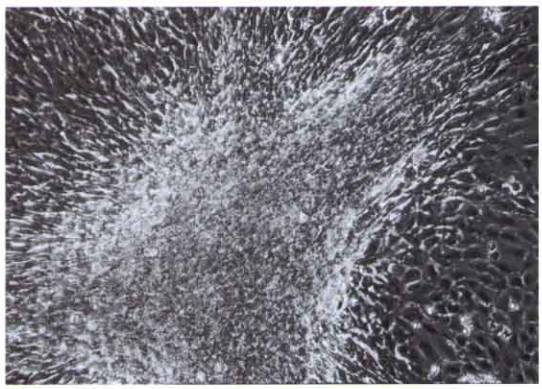


图 1　两阶段转化实验中诱导形成的转化灶细胞　（倒置显微镜 ×100）

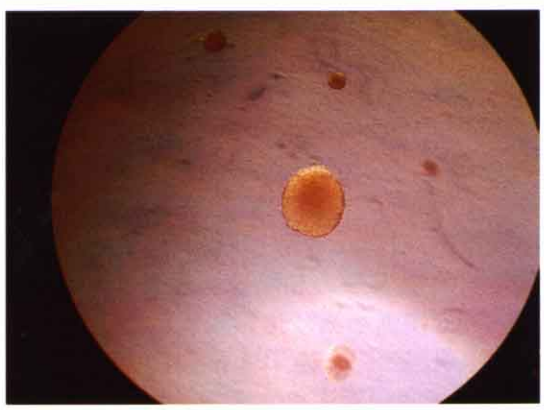


图 2　转化细胞在软琼脂中生长形成的克隆　（倒置显微镜 ×40）

2.2 促癌过程中 OPN 基因的表达变化

采用基因芯片检测促癌物处理后对基因表达的影响，荧光交换重复实验结果表明 TPA、OA 和 $CdCl_2$ 在促癌过程中均能诱导 OPN 基因转录表达的升高（Ratio≥2.0）。各个时间点 OPN 基因的表达比值变化见表1，其中，TPA 处理4 h 后 OPN 基因呈一过性表达升高，此后在促癌后期（7 d 和 17 d）再次出现高表达；OA 处理后3、7、24 d，$CdCl_2$ 处理后3 d 和7 d，OPN 基因的表达也较对照组增强。

表1 OPN 基因在促癌阶段不同时间点的表达比值

处理方法		4 h	24 h	3 d	7 d	17/24 d
启动剂（mg/L）	促癌剂（μg/L）					
MNNG 1	TPA 100	2.3	0.8	1.3	2.4	2.9
MNNG 1	OA 7.8	1.2	1.2	4.6	11.0	5.1
MNNG 1	$CdCl_2$ 324	1.0	1.1	2.2	3.4	1.0

2.3 转化细胞集落中 OPN 基因的表达变化

3 种促癌物分别诱导形成的9 个转化集落均具有锚着独立性生长特性，与正常对照细胞同时进行芯片杂交实验。基因表达分析表明，8 个集落中 OPN 基因的表达水平升高，其中 TPA、OA 诱导的转化集落中均表达升高，$CdCl_2$ 诱导的3 个转化集落中，有2 个集落的 OPN 基因表达升高（表2）。芯片检测结果也经过荧光交换重复实验的确认。

表2 OPN 基因在不同促癌物诱导的转化细胞集落中的表达比值

处理方法		转化集落（1）	转化集落（2）	转化集落（3）
启动剂（mg/L）	促癌剂（μg/L）			
MNNG 1	TPA 100	2.5	2.0	2.1
MNNG 1	OA 7.8	4.4	4.8	3.7
MNNG 1	$CdCl_2$ 324	2.6	3.6	1.1

2.4 实时 RT-PCR 检测 OPN 基因的表达

采用实时 RT-PCR 技术检测上述部分样本中 OPN 基因的表达情况，包括转化集落 MNNG/TPA（1），MNNG/OA（1），MNNG/$CdCl_2$（1）和相应的正常对照细胞，以及 OA 促癌处理3、7 d 的细胞样本和相应的对照细胞。结果显示转化集落和 OA 处理细胞中的 OPN 基因表达升高，与对照细胞相比基因表达比值在2.0 以上。实时 RT-PCR 与基因芯片结果的比较显示，两种实验方法检测的 OPN 基因表达比值的均呈升高趋势，Ratio 值均大于2.0，表明基因芯片检测结果较为可靠。

3 讨论

以往的研究表明，许多肿瘤组织中有 OPN 基因的表达升高，因此 OPN 可能是一种肿瘤相关蛋白[2]。由于 OPN 的高表达也出现在良性肿瘤和转化细胞中，提示其可能在肿瘤的发生过程中，包括在促癌过程中起作用。已经发现，抑制或封闭 OPN 基因的表达能有效降低转化细胞的致瘤能力和软琼脂生长能力，相反加入 OPN 蛋白则能增强细胞转化和致瘤能力[5]。在细胞转化实验中也观察到促癌物 TPA 能提高 JB6 小鼠上皮细胞 OPN 基因的转录表达和分泌[6]。但以往的研究大多以促癌物 TPA 为对象，还不清楚 OPN 基因在不同类型的促癌物作用下是否呈现相同或相似的表达变化。

在3 种促癌物 TPA，OA 和 $CdCl_2$ 诱导 BALB/c 3T3 细胞转化过程中，我们采用基因芯片和实时 RT-PCR 检测技术均观察到 OPN 基因表达的增强。以往的研究未明确 TPA 诱导 OPN 基因表达的时间效应，有的观察到其早期一过性表达[7]，有的则显示其表达为早期持续性升高[3]，我们发现 TPA 促癌作用后期 OPN 基因会再次出现高表达，呈双相表达的特点。有报道显示 OA 诱导的 OPN 基因表达出现在12～24 h[8]，我们则发现 OPN 基因在 OA 促癌作用的中、后期表达升高，与上述报道有所不同，原因可能在于细胞背景的差异，或者由于时间点的选择遗漏了可能出现的一过性表达。总之，通过对促癌过程中基因表达的多时间点长期观察，我们发现3 种促癌物诱导的 OPN 基因表达升高一般出现在促癌作用的中期（3 d，7 d）以及促癌处理结束后的观察期内（17 d 或24 d），并且在绝大部分已形成的转化细胞集落中也检测到 OPN 基因表达的升高，提示其可能主要在促癌过程的中、后期发挥作用。此外，文献检索少见有镉化合物影响 OPN 基因表达的报道，我们首次观察到 $CdCl_2$ 在促进 BALB/c 3T3 细胞转化过程中能诱导 OPN 基因表达的升高，这为阐明镉化合物的促癌作用机制提供了新的研究线索。

目前对 OPN 基因的功能研究大多集中于介导肿瘤的转移、浸润方面[2]，而对 OPN 基因在细胞转化早期，包括促癌阶段的作用机制还并不明确。研究显示，围绕 OPN 基因存在复杂的网络调控体系，其功能可能与影响细胞周期调节、抑制凋亡和促进存活信号的传递有关[2]。研究表明 OPN 基因可通过激活 PI3K/Akt 途径，介导 IL-3 存活信号的传递和抑制小鼠 B 细胞的凋亡[9]；在小鼠内皮细胞，可通过 NF-κB 途径发挥抗凋亡的作用[10]。本研究表明 OPN 基因的表达升高，提示 TPA、OA 和 $CdCl_2$ 在促癌作用中、后期可能通过诱导 BALB/c 3T3 细胞的 OPN 基因表达，而影响细胞的增殖-凋亡平衡，最终导致转化克隆的形成和转化细胞的异常增殖，当然上述推测还需要进一步实验，如选择性抑制或阻断 OPN 基因的表达后观察细胞增殖和凋亡情况，从而确定其是否在促癌过程中发挥关键作用。我们在两阶段化学致癌研究中，观察到促癌物 TPA、OA 和 $CdCl_2$ 影响的共同效应分子 OPN 基因，提示在促癌过程中可能存在共同的作用机制或信号通路，进一步对其功能进行深入研究，就有可能提出新的或更全面的促癌作用分子机制。

参考文献：

[1] GUO H, CAI C Q, SCHROEDER R A, *et al*. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages [J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1079－1086.

[2] WAI PY, KUO P C. The role of Osteopontin in tumor metastasis[J]. J

Surg Res, 2004, 121(2): 228 - 241.
[3] CHANG P L, CAO M, HICKS P. Osteopontin induction is required for tumor promoter-induced transformation of preneoplastic mouse cells [J]. Carcinogenesis, 2003, 24(11): 1749 - 1758.
[4] DUNKEL V C, ROGERS C, SWIERENGA S H, *et al*. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: III. Cell transformation in C3H/10T1/2 mouse embryo cell, BALB/c 3T3 mouse fibroblast and Syrian hamster embryo cell cultures[J]. Mutat Res, 1991, 246(2): 285 - 300.
[5] CRAIG A M, BOWDEN G T, CHAMBERS A F, *et al*. Secreted phosphoprotein mRNA is induced during multi-stage carcinogenesis in mouse skin and correlates with the metastatic potential of murine fibroblasts[J]. Int J Cancer, 1990, 46(1): 133 - 137.
[6] CHANG P L, TUCKER M A, HICKS P H, *et al*. Novel protein kinase C isoforms and mitogen-activated kinase kinase mediate phorbol ester-induced osteopontin expression[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(9): 1142 - 1151.
[7] CRAIG A M, SMITH J H, DENHARDT D T. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis[J]. J Biol Chem, 1989, 264(16): 9682 - 9689.
[8] KIM H J, LEE M H, KIM H J, *et al*. Okadaic acid stimulates osteopontin expression through de novo induction of AP-1[J]. J Cell Biochem, 2002, 87(1): 93 - 102.
[9] LIN Y H, YANG YEN H F. The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276(49): 46024 - 46030.
[10] MALYANKAR U M, SCATENA M, SUCHLAND K L, *et al*. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(28): 20959 - 20962.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2006)09-0879-01

个案与短篇

国产奥沙利铂联合氟尿嘧啶及亚叶酸钙治疗晚期大肠癌疗效观察

韩 萍,秦 红 (重庆市中山医院肿瘤科,重庆 400013)

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。近年来,我国大肠癌发病率呈上升趋势,病死率也不断上升[1]。晚期大肠癌预后差,复发转移和化疗不理想,我们应用奥沙利铂(L-OHP,商品名艾恒,江苏恒瑞制药有限公司生产),联合氟尿嘧啶(5-Fu)、亚叶酸钙(CF)治疗复发转移大肠癌取得较好疗效,现报告如下。

1 资料与方法

1998 - 2004年本科收治32例大肠癌均经病理学诊断证实,分为2组,治疗组12例,应用奥沙利铂(L-OHP) + 氟尿嘧啶(5-Fu) + 亚叶酸钙(CF)方案,对照组20例,应用5-Fu + CF方案,所有病例均为手术后大肠癌。全部病例均CT证实有局部复发或远处转移,其中局部复发20例,肝转移8例,肝肺转移4例,全部患者KPS评分大于70分,预计生存时间大于3个月。

治疗方法:治疗组(L-OHP)130 mg/m^2,静脉滴入2 h,第1天,CF 100 mg/m^{2}静脉滴入,第1、2、15、16天,5-Fu 500 mg/m^2,第1、2、15、16天(接CF后),加入便携式静脉化疗泵中,持续22 h泵入,每4周重复。对照组CF + 5-Fu,剂量及用法同治疗组,每4周重复,两组均治疗3周期评价疗效,用L-OHP当日及其后2 d内忌冷食、冷饮、接触冷物体。

疗效评定标准及毒性反应评价:按照WHO制定的实体癌客观疗效评价标准分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD),不良反应按WHO标准分为0 ~ Ⅳ度。

统计学处理:进行χ^2检验。

作者简介:韩 萍(1972 -),女,四川省内江市人,主治医师,主要从事肿瘤内科方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)60908213

收稿日期:2005-09-16;修回日期:2006-03-14

2 结果

近期疗效:12例治疗组中CR 1例,PR 3例,SD 6例,PD 2例,总有效率33.3%。对照组CR 1例,PR 3例,SD 10例,PD 6例,总有效率20.0%,两组有显著性差异($P<0.05$)。

毒副反应:奥沙利铂主要毒性反应为消化道反应,其次是神经毒性即外周感觉神经异常,表现为冷刺激敏感和握力降低,停药后恢复,口服维生素B_{12}可减轻。

3 讨论

孙燕等[2]应用奥沙利铂单药治疗36例晚期大肠癌有效率为13.9%,联合治疗64例,有效率为34.4%。本组32例患者治疗组12例,有效率33.3%,对照组20例,有效率20%,治疗率高于对照组,与国内资料报道相似,奥沙利铂最主要的副反应为外周感觉神经异常,均可逆转,寒冷可诱发或加重,口服维生素B_{12}可缓解,无肝肾损害。综上所述奥沙利铂联合5-Fu、CF治疗晚期大肠癌近期疗效肯定,毒性反应低,患者耐受性好,与进口药物相比具价格优势,患者乐于接受。

关键词:结肠直肠肿瘤;铂/治疗;草酸盐类/治疗;药物联合疗法
中图法分类号:R730.53 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999: 482.
[2] 孙 燕,管忠震,金懋林,等. 奥沙利铂单药或与氟尿嘧啶-甲酰四氢叶酸联合应用治疗晚期大肠癌Ⅱ期临床试用报告[J]. 癌症, 1999, 18(3): 237 - 240,249.

(编辑 龙 亮)