文章编号:1000-5404(2011)16-1687-04

论著

高表达 OAZI-1 增加小鼠黑素瘤 B16-F1 细胞对多胺类似物 CPENSpm 的敏感性

何 玲,韩 钰,张 军,王艳林 (443002 湖北 宜昌,三峡大学分子生物学研究所)

[摘要] **目的** 检测高表达 OAZI-1 的小鼠黑素瘤 B16-F1 细胞对抗癌药物多胺类似物 CPENSpm 敏感性的影响并探讨其作用机制。**方法** 高表达 OAZI-1 的 B16-F1 细胞经 CPENSpm 处理后,MTT 法检测细胞增殖;QT-RT-PCR 检测细胞内 OAZI-1、ODC 和 OAZ 的 mRNA 表达水平;反相高效液相色谱法检测细胞内多胺含量;化学发光法分析细胞内 SMO 酶活性。**结果** 高表达 OAZI-1 显著增加 B16-F1 细胞对 CPENSpm 的敏感性,QT-RT-PCR 结果显示,OAZI -1 高表达增加 ODC mRNA 但降低 OAZ mRNA 水平,CPENSpm 处理对 ODC 和 OAZ 的 mRNA 水平无进一步影响。与对照细胞相比,CPENSpm 处理能更显著性地降低 OAZI-1 高表达细胞中的多胺含量,同时更强地诱导 SMO 酶的活性。**结论** CPENSpm 处理能在更大程度上耗竭 OAZI-1 高表达的 B16-F1 细胞中的多胺,由此对该肿瘤细胞显示出更大的细胞毒性。

[关键词] 抗酶抑制因子-1;多胺类似物 CPENSpm;多胺;黑素瘤细胞
[中图法分类号] R739.5;R73-36;R730.23 [文献标志码] A

OAZI-1 overexpression increases sensitivity of mouse melanoma B16-F1 cells to polyamine analog CPENSpm

He Ling, Han Yu, Zhang Jun, Wang Yanling (Institute of Molecular Biology, China Three Gorges University, Yichang, HuBei Province, 443002, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the influence of ornithine antizyme inhibitor-1 (OAZI-1) overexpression on the sensitivity of mouse melanoma B16-F1 cells to polyamine analog CPENSpm, and to study the underlying mechanism. **Methods** B16-F1 cells with OAZI-1 overexpression were treated with CPENSpm. MTT assay was used to detect cell proliferation. QT-RT-PCR was used to determine the mRNA expression levels of OAZI-1, ornithine decarboxylase (ODC) and ornithine decarboxylase antizyme (OAZ) in B16-F1 cells. RP-HPLC was used to determine the polyamine content in B16-F1 cells. Chemiluminescence assay was used to determine the activity of spermine oxidase (SMO) in B16-F1 cells. **Results** The MTT results showed that OAZI-1 overexpression increased the sensitivity of B16-F1 cells to CPENSpm significantly. The QT-RT-PCR results showed an increased mRNA expression level of ODC but a decreased mRNA expression level of OAZ in B16-F1 cells with OAZI-1 overexpression (B16/over). No further changes of the mRNA expression levels of ODC and OAZ were detected in both B16/over cells and control cells (B16/3.1) after being treated with CPENSpm for 24 h. Compared with those in B16/3.1 cells, the polyamine content was lowered significantly, and the SMO activity was increased in B16/over cells after 24-h CPENSpm treatment. **Conclusion** CPENSpm treatment can largely deplete intracellular polyamine in B16-F1 cells with OAZI-1 overexpression, resulting in increased cytotoxicity on those tumor cells.

[**Key words**] ornithine antizyme inhibitor-1; CPENSpm; polyamine; melanoma cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772590). Corresponding author: Wang Yanling, E-mail:fzswangyl@ctgu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30772590)
[通信作者] 王艳林, E-mail:fzswangyl@ctgu.edu.cn

多胺(包括腐胺、精脒和精胺)为肿瘤细胞快速生长所必需,因此多胺代谢途径成为抗肿瘤治疗的新靶点[1-2]。鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase,ODC)是多胺合成代谢途径中关键的限速酶。ODC的酶活性与多胺的含量密切相关,故ODC的酶活性受到严紧调节。细胞内ODC以同源二聚体和ODC单体2种形式存在,它们之间存在着动态平衡,但仅ODC二聚体具有酶的活性[3-4]。在细胞内存在一种ODC的天然抑制蛋白鸟氨酸脱羧酶抗酶(ornithine decarboxylase antizyme, OAZ)。OAZ能特异性的与ODC的单体结合,促使ODC被26S蛋白酶体以非泛素化途径降解,从而降低ODC酶活性。此外,OAZ与多胺的转运有关,能调节多胺的转运途径并抑制细胞对多胺的摄取[5-6]。研究发现细胞内还存在一种抑制OAZ活性的蛋白抗酶抑制因子(ornithine antizmy inhibitor, OAZI),OAZI与OAZ结合的亲和力高于OAZ与ODC结合的亲和力,故OAZI能与OAZ/ODC复合体中的OAZ结合,从而释放出ODC,升高ODC的酶活性[7-10]。多胺类似物是一类与天然多胺在结构和功能上类似的化合物,其与多胺一样,能通过细胞膜上的多胺转运系统进入细胞,并在多个水平上影响细胞内多胺的代谢,降低细胞内天然多胺的水平。CPENSpm[N^1-(cyclopropylmethyl)-N^{11}-ethyl-4,8-diazaundecane, CPENSpm)]是与精胺在结构和功能上类似的一种化合物,能诱导细胞内多胺分解途径中精脒/精胺乙酰转移酶(spermidine/spermine N1-acetyltransferase, SSAT)和精胺氧化酶(spermine oxidase, SMO)的酶活性,使细胞内多胺水平下降,具有抗肿瘤的作用[11]。但CPENSpm的抗癌活性是否受OAZI表达水平的影响,目前尚不清楚。本研究建立OAZI高表达的小鼠黑素瘤B16-F1细胞株,在此基础上分析高表达OAZI对CPENSpm细胞毒性的影响并探讨相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol细胞总RNA提取试剂,QT-RT-PCR试剂盒为Invitrogen公司产品。细胞增殖分析试剂3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二甲苯基四氮唑溴盐(MTT)和培养液RPMI1640由Sigma公司提供。多胺类似物CPENSpm由美国Johns Hopkins大学医学院Casero教授惠赠,其他化学试剂来自Invitrogen公司和华美公司。B16-F1细胞株购买于中国典型培养物保藏中心。引物合成由上海生工公司完成。GelLogic-200凝胶图像分析仪为Kodak公司产品,多元定量PCR仪为美国MJ RESEARCH公司产品,全波长酶标仪为Thermo公司产品,高效液相色谱仪Waters2690型,美国Waters公司生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞及其培养 B16-F1细胞在含10%小牛血清及100 U/ml青霉素/链霉素的RPMI1640培养液中传代培养,培养条件为5% CO_2,湿度80%,温度37 ℃。传代方法为PBS洗涤后,Trypsin消化,加培养液终止消化反应后转入15 ml离心管中,53.7×*g*离心,弃上清,细胞用培养液重悬后,以1∶3的比例进行细胞传代。

1.2.2 Trizol试剂法提取RNA 培养细胞用1 ml Trizol试剂裂解,氯仿抽提,异丙醇沉淀RNA,75% 乙醇(DEPC水配制)洗涤沉淀后,用适量去RNase水溶解。

1.2.3 获得高表达OAZI-1的B16-F1细胞株 高表达OAZI-1的B16-F1细胞株在本研究的前期工作中获得[12],主要方法为:PCR法扩增获得OAZI的编码序列并克隆入真核表达质粒载体pcDNA3.1(+)中。将此质粒转染B16-F1细胞后,G418筛选成功转染的单克隆细胞株,然后用Western blot和QT-RT-PCR技术筛选获得OAZI-1高表达的阳性细胞株。

1.2.4 QT-RT-PCR检测CPENSpm对细胞内OAZI-1、ODC、OAZ mRNA的表达 收集细胞,Trizol试剂法提取RNA并经M-MLV逆转录酶逆转录为cDNA。以此cDNA为模板,扩增OAZI-1、ODC、OAZ基因。每个样品设3个复孔,Ct取其均值,实验以β-actin作为内参照。基因表达水平变化的计算方法为:ΔCt = Ct 目的基因 − Ct β-actin,,ΔΔCt = ΔCt 处理组 − ΔCt 对照组。基因表达的相对差异量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$。

1.2.5 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期的B16-F1细胞,调整细胞浓度至1×10^4/ml后接种于96孔板中,每孔100 μl。检测波长570 nm。检测细胞培养0、24、48、72、96 h的光密度值[*D*(570)],以各时间点与0 h光密度值的比值(比生长率)反映细胞的增殖情况。

1.2.6 反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定细胞内多胺含量 细胞生长至90%融合后收集细胞,PBS洗涤2次后,加入细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5,150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100)1.0 ml,246.5×*g*离心后收集上清备用。取处理好的细胞裂解液800 μl,加入1.0 mmol/L内标己二胺(DAH)20 μl,2 mol/L NaOH 500 μl,苯甲酰氯10 μl,混匀后于40 ℃水浴保温20 min,2.0 ml饱和氯化钠终止反应,用乙醚提取每次2 ml,提取3次,合并乙醚提取液,空气干燥,沉淀用1 ml甲醇溶解,微孔滤膜(0.5 μm)过滤后经Waters2690高效液相色谱仪检测,流动相:乙腈-水(38∶62);检测波长238.3 nm。

1.2.7 精胺氧化酶(spermine oxidase, SMO)活性分析[13] 6孔板中培养的细胞经PBS缓冲液洗涤后,用含0.25% Triton X-100的83 mmol/L甘氨酸缓冲液(pH 8.0)裂解细胞,收集细胞裂解液备用。SMO活性采用化学发光法分析,酶活性单位定义为:RLU/(mg·min)。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 2.0统计软件进行组间 t 检验。

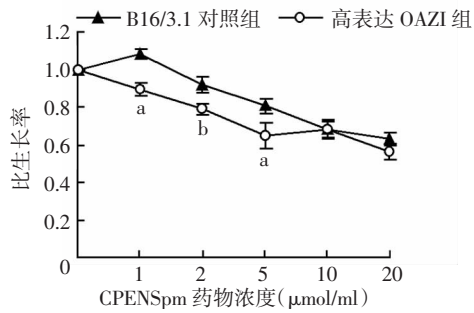
2 结果

2.1 高表达OAZI-1增加B16-F1细胞对CPENSpm的敏感性

MTT法检测高表达OAZI-1的B16-F1细胞对多胺类似物CPENSpm敏感性的影响。使用的CPENSpm药物浓度梯度为1、2、5、10、20 μmol/L，处理时间为48 h。结果显示，在低浓度CPENSpm(1、2、5 μmol/L)时，高表达OAZI-1的细胞B16/over的生长率显著性低于对照细胞B16/3.1（$P<0.05$），提示在一定药物浓度范围内，高表达OAZI-1增加B16细胞对CPENSpm的敏感性。见图1。

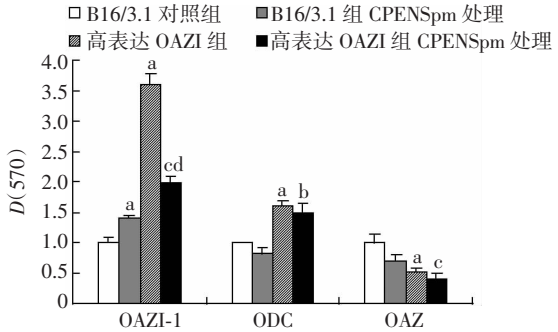
2.2 CPENSpm对细胞内OAZI-1、OAZ和ODC mRNA水平的影响

B16/over和B16/3.1细胞经5 μmol/L CPENSpm处理24 h后收集细胞提取RNA，QT-RT-PCR法检测细胞中OAZI-1，OAZ和ODC的mRNA表达水平。结果显示，对照细胞B16/3.1经CPENSpm处理后，细胞内OAZI-1的mRNA水平显著性升高（升高40%），但CPENSpm对ODC和OAZ的mRNA表达水平无明显影响。不同的是，在高表达OAZI-1的B16/over细胞中，CPENSpm处理使OAZI-1的表达明显下降（降至处理前的54.9%），但ODC和OAZ的表达也均未发生变化。见图2。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图1 高表达OAZI-1增加B16-F1细胞对CPENSpm的敏感性

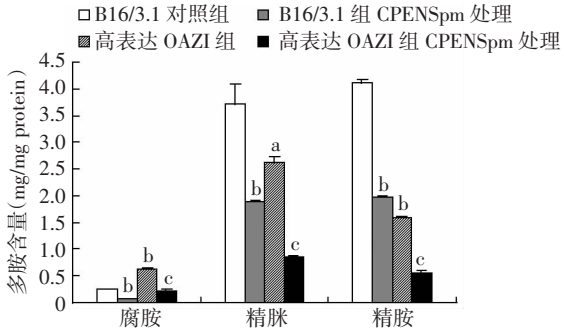


a：$P<0.01$，与B16/3.1对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与B16/3.1组CPENSpm处理比较；d：$P<0.01$，与高表达OAZI组比较

图2 QT-RT-PCR检测细胞中OAZI-1、OAZ、ODC mRNA的表达

2.3 高表达OAZI-1对B16-F1细胞内多胺水平的影响

为分析CPENSpm处理细胞后细胞内多胺水平的变化，我们将生长状态良好的B16/over细胞及B16/3.1阴性对照细胞经5μmol/L CPENSpm处理24 h后利用反相高效液相色谱法检测细胞内多胺水平含量。结果发现，OAZI-1高表达使对照细胞中腐胺(Putrescine)含量增加，但精脒和精胺的含量却不升反降。虽然CPENSpm处理使两种细胞内3种多胺成分的含量均显著性下降，但与B16/over细胞相比，药物处理后B16/3.1细胞中腐胺含量仍明显低于B16/over细胞，而精脒和精胺含量则显著性高于B16/over细胞。见图3。

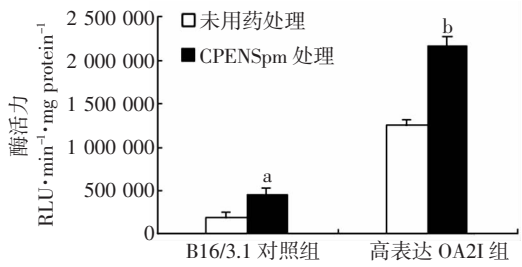


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与B16/3.1对照组比较；c：$P<0.01$，与高表达OAZI组比较

图3 反相高效液相色谱法检测细胞内多胺含量

2.4 OAZI-1高表达对细胞内SMO酶活性的影响

用5 μmol/L CPENSpm处理B16/over和B16/3.1细胞24 h后收集细胞，采用化学发光法分析细胞裂解液中的SMO酶活性变化，结果发现，OAZI-1高表达能显著性增加B16-F1细胞中SMO的基础性表达活性。CPENSpm处理细胞后，B16/over和B16/3.1两种细胞内的SMO酶活性均能被进一步升高（图4）。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与未用药处理比较

图4 OAZI-1高表达对细胞内SMO酶活性的影响

3 讨论

作为多胺合成代谢途径中的限速酶，ODC活性极大影响细胞内的多胺含量，而ODC活性又受ODC抗酶和抗酶抑制因子系统的调节。在我们前期的研究[12]和本实验均发现OAZI-1高表达能使ODC mRNA的基础性表达水平显著性升高，而使OAZ的基础性表

达水平显著性下降。OAZI-1 高表达细胞中 ODC 表达水平升高和 OAZ 表达水平下降的协同作用使细胞内 ODC 酶活性升高,腐胺含量增加。但同时我们也观察到,处于合成代谢途径中腐胺下游的精脒和精胺含量不升反降,提示 OAZI-1 高表达可能对多胺降解代谢有活化作用。为此,我们分析了细胞多胺降解途径中关键酶精胺氧化酶(spermine oxidase, SMO)的活性变化。结果证实了我们的推测,在 B16/over 细胞中,OAZI-1 高表达显著性升高 SMO 的酶活性。本实验中,我们利用高表达 OAZI-1 的 B16-F1 细胞作为实验模型,研究 OAZI-1 高表达是否影响肿瘤细胞对抗肿瘤药物多胺类似物 CPENSpm 的敏感性。结果发现,在一定浓度范围内高表达OAZI-1 的 B16-F1 细胞对 CPENSpm 的敏感性显著性增加。

为探讨这一现象的机制,我们首先分析了 CPENSpm 对 2 种细胞内 OAZI-1、ODC 和 OAZ mRNA 表达水平的影响,结果发现 CPENSpm 处理对照细胞 B16-F1 后,使细胞内 OAZI-1 的表达显著性升高,ODC 和 OAZ 的表达无明显进一步变化,但高表达 OAZI 的细胞经 CPENSpm 处理后,细胞内 OAZI-1 的表达却显著性降低,ODC 和 OAZ 的表达也无明显进一步变化。进一步我们检测细胞内的多胺水平发现经 CPENSpm 处理使对照细胞 B16-F1 细胞内腐胺,精脒和精胺含量均降低,高表达 OAZI-1 的细胞内腐胺,精脒和精胺含量均进一步降低。CPENSpm 能诱导细胞内 SMO 酶活性的升高。本结果也证实了 CPENSpm 处理后 B16-F1 细胞内 SMO 酶活性升高,在高表达 OAZI-1 的 B16 细胞中 CPENSpm 处理能进一步诱导 SMO,使其达到远高于对照细胞的水平。上述实验表明,OAZI-1 高表达的细胞内 CPENSpm 的作用进一步增强,加快了细胞内多胺的耗竭。多胺成分为肿瘤细胞快速生长所必须,而 CPENSpm 能在更大程度上耗竭 OAZI-1 高表达细胞中的多胺,这可能是 OAZI-1 高表达细胞对药物 CPENSpm 更为敏感的原因。

但本实验中也发现 CPENSpm 处理后使 B16-F1 细胞内 OAZI-1 的表达升高,高表达 OAZI-1 的细胞内 OAZI 的表达显著性下降。对于 B16-F1 细胞 OAZI-1 的升高可能原因是 CPENSpm 能抑制 ODC 的活性,OAZI-1 表达的升高是 ODC 活性降低的反馈调节。虽然在本实验中我们未观察到 CPENSpm 对 ODC mRNA 水平的影响,但在本课题组既往的实验中,我们发现在人 A549 肺癌细胞中,CPENSpm 能显著性抑制 ODC 的酶活性[14-15]。但高表达 OAZI-1 的细胞内 OAZI-1 的表达下降这一现象目前还不清楚,有待于后续实验进一步研究。

参考文献:

[1] Agostinelli E, Marques M P, Calheiros R, *et al*. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology[J]. Amino Acids, 2010, 38(2): 393-403.

[2] Casero R A Jr, Marton L J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(5): 373-390.

[3] Pegg A E. Regulation of ornithine decarboxylase[J]. J Biol Chem, 2006, 281(21): 14529-14532.

[4] Persson L. Polyamine homoeostasis[J]. Essays Biochem, 2009, 46: 11-24.

[5] Kahana C. Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(15): 2479-2488.

[6] Kahana C. Regulation of cellular polyamine levels and cellular proliferation by antizyme and antizyme inhibitor[J]. Essays Biochem, 2009, 46: 47-61.

[7] Lopez-Contreras A J, Ramos-Molina B, Cremades A, *et al*. Antizyme inhibitor 2: molecular, cellular and physiological aspects[J]. Amino Acids, 2010, 38(2): 603-611.

[8] Kim S W, Mangold U, Waghorne C, *et al*. Regulation of cell proliferation by the antizyme inhibitor: evidence for an antizyme-independent mechanism[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 12): 2583-2591.

[9] Keren-Paz A, Bercovich Z, Kahana C. Antizyme inhibitor: a defective ornithine decarboxylase or a physiological regulator of polyamine biosynthesis and cellular proliferation[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 2): 311-313.

[10] Murakami Y, Suzuki J, Samejima K, *et al*. The change of antizyme inhibitor expression and its possible role during mammalian cell cycle [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(13): 2301-2311.

[11] Huang Y, Pledgie A, Casero R A Jr, *et al*. Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16 (3): 229-241.

[12] 何玲, 韩钰, 刘梦瑶, 等. 鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制因子-1 高表达对小鼠黑素瘤 B16-F1 细胞增殖的影响[J]. 肿瘤, 2011, 31(3): 185-191.

[13] Wang Y, Devereux W, Woster P M, *et al*. Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure[J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5370-5373.

[14] 王艳林, 韩钰, 袁太宁, 等. 多胺类似物 CPENSpm 通过干扰多胺代谢抑制肺癌细胞的增殖[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 132-135.

[15] 任玉珊, 韩钰, 曹春雨, 等. 二氟甲基鸟氨酸对 T 淋巴瘤 Jurkat 细胞生长的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 593-596

(**收稿**:2011-02-15;**修回**:2011-03-09)

(编辑 汪勤俭)