基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0519-03

Kai1 对人喉癌 Hep-2 细胞株增殖及生长周期的影响

王洪鹏[1],叶 琳[2],黄 闯[1],王 驰[3],谭 毅[4],陈鸿雁[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016;3.重庆医科大学药学院药物化学教研室,重庆 400016;4.重庆医科大学动物实验中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨肿瘤转移抑制基因 Kai1 对人喉癌 Hep-2 细胞株增殖能力及生长周期的影响。方法:本研究以喉癌 Hep-2 细胞株为研究对象,将携带有 Kai1 基因的重组腺病毒(rAd-Kai1)进行扩增、纯化并测定其滴度,用适量 rAd-Kai1 转染人喉癌 Hep-2 细胞株,利用 RT-PCR 技术对转染效果进行检测,以未转染 Kai1 的喉癌细胞株为对照组,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、流式细胞术测定转染组细胞株的增殖抑制率和细胞周期。结果:rAd-Kai1 经扩增、纯化后,滴度可达 10^{10} PFU/ml,当病毒量为 30MOI 时,对 Hep-2 细胞的转染率达 93%以上。MTT 实验显示转染 Kai1 的 Hep-2 细胞株体外增殖能力明显弱于对照组($P<0.01$),抑制率可达 29%。流式细胞术显示与对照组比较,转染组 G_0/G_1 期细胞数量增加,S 期细胞数量减少,差异有显著性($P<0.05$)。结论:通过重组腺病毒介导,成功地将 Kai1 基因转入喉癌 Hep-2 细胞株,Kai1 对喉癌细胞体外增殖能力具有抑制作用,其机制可能是将 Hep-2 细胞生长周期阻滞于 G_0/G_1 期,提示:Kai1 抑癌基因可能通过阻滞肿瘤细胞生长周期实现抑制肿瘤细胞增殖。

【关键词】Kai1/CD82;Hep-2;喉癌;腺病毒;转染;增殖;生长周期

【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-20

Effect of gene Kai1 on the proliferation and cell cycle of laryngeal carcinoma Hep-2 cell line

WANG Hong-peng, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of gene Kai1 on the proliferation and cell cycle of laryngeal carcinoma Hep-2 cell line. *Methods*: The Hep-2 cell line was used as the subject, the expansion purification and the concentration of the Kai1 gene was tested, and the gene was transferred into Hep-2 cell line by adenovirus. The non-transferred group was used as a control. By means of MTT the effect of Kai1 gene on the cell proliferation of Hep-2 cell line was tested and by means of RT-PCR the expression of Kai1 in transfected cell was tested; cell cycle of Hep-2 cells was assayed by flow cytometry. *Results*: The concentration of Kai1 gene can be 10^{10} PFU/ml after expansion and purification, when the concentration of the adenovirus was 30 MOI, the transfection rate of Hep-2 cell line can be above 93%. MTT shows the cell proliferation was slower and less of the Kai1-Hep-2 cell line compared to the control group ($P<0.01$). The inhibition rate can up to 29%. Flow cytometry showed the number of Kai1-Hep-2 cells in G_0/G_1 phase was elevated, and the number in S phase was decreased. *Conclusion*: The Kai1 gene had the effect of inhibiting the cell proliferation of Hep-2 cell line and the possible machanism would be the cycle pattern was changed after Hep-2 cells was transfected with Kai1 gene.

【Key words】Kai1/CD82; Hep-2; Laryngeal carcinoma; Adenovirus; Transfection; Proliferation; Cell cycle

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一,其发病率约占全身肿瘤的 1%~5%,术后易出现复发及转移,中晚期患者运用放化疗易产生耐药及对身体产生不良影响,故寻找新的治疗手段具有重要意义。Kai1 基因(Kang Ai 1),是 1995 年 Dong 等从转移到 AT6.1 细胞系中的人第 11 号染色体中分离到的能特异性抑制肿瘤转移的基因,命名为 Kai1 基因。DNA 序列分析证明 Kai1 与 CD82 基因是相同的,Kai1/CD82 属于四穿膜超家族(Transmembrane 4 Superfamily, TM4SF)成员之一,在细胞的聚集、粘附、迁移、增殖中均有调节作用[1]。研究发现[2,3] Kai1 在多数恶性肿瘤中表达降低,且与肿瘤的预后、恶性进展、治疗以及与其它肿瘤相关基因有着密切的联系。本研究采用重组腺病毒介导 Kai1 基因转染喉癌细胞 Hep-2 为研究材料,检测 Kai1 基因对喉癌细胞体外增殖的影响,并从细胞周期角度探讨其可能机制。

作者介绍:王洪鹏(1982-),男,硕士,

研究方向:头颈肿瘤的基础与临床。

通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。

基金项目:重庆市科委资助课题(编号:渝科发计字[2006]29 号)。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒与细胞 喉癌细胞株 Hep-2 及 Kail 基因表达型腺病毒由本室保存。

1.1.2 试剂 RPMI1640 培养基购于美国 GIBCO 公司,新生小牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司,DMEM、

胰蛋白酶、MTT、DMSO 购于美国 Sigma 公司，PBS 购于北京中杉生物技术有限公司，-20℃保存。DNA 提取试剂盒、Kai1 基因 PCR 引物及 PCR 通用试剂盒购于上海生工公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Hep-2 细胞培养于含 10%新生小牛血清的 RPMI1640 培养基中，于 37℃、5%CO_2 孵箱孵育，倒显微镜观察生长情况，1:3 比例传代，收集对数生长期细胞，0.25%胰酶消化，新鲜培养液制备细胞悬液，加入台盼兰进行活细胞计数。

1.2.2 rAd- Kai1 的扩增[4] HEK293 细胞接种于培养瓶，培养至细胞接近饱和时加入 10 MOI 的病毒上清，3 d 后待细胞全部病变、死亡时，收集细胞及上清 4℃冰浴，超声破碎每次 15 s，间隔 5 s，共 3 次。4 000 r/min 离心，去除细胞碎片，收集上清，4℃、35 000×g 高速离心 6 h，浓缩病毒，重悬于 PBS 中，再以 1.34 g/ml CsCl 100 000×g、4℃超速离心 12 h，收集病毒带，除菌待用。

1.2.3 rAd- Kai1 的滴度测定[4] HEK293 细胞 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中，48 h 后当细胞铺满孔底约 80%时，加入不同稀释度（从 10^{-3}~10^{-8}）的病毒上清 0.5 ml，每组 6 孔，24 h 后加入 42 ℃预温的染色琼脂（成分为 2×DMEM 10 ml，小牛血清 1 ml，0.1%中性红 1 ml 混合后 37℃保温，再与 10 ml 50℃ 2%琼脂混合）2 ml/ 孔，2 d 后再补加营养琼脂（2×DMEM 10 ml，小牛血清 1 ml，0.1%中性红 2 ml，3 %琼脂 10 ml）2 ml/ 孔，置 37 ℃培养箱继续培养，直至空斑出现，且数量不再变化。计数空斑数，按下式计算滴度（PFU/ml）：病毒滴度 = 平均空斑数/孔×1/ 稀释度×1/ 每孔病毒上清体积。

1.2.4 rAd- Kai1 对肿瘤细胞的转染及转染率测定[5] Hep-2 细胞接种于 24 孔板，约 80 %饱和时分别加入 10、20、30 MOI rAd- Kai1，6 h 后弃上清，换含 10%新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养 42 h，用免疫荧光显微镜观察结果，估算转染率。转染率 = 荧光细胞数/全部细胞数×100%。

1.2.5 rAd- Kai1 感染喉癌细胞的 PCR 检测 对照组于培养 48 h 收集细胞，实验组于转染后 48 h 收集细胞，分别提取细胞总 RNA。Kai1 上游引物：5'-AGCCTGTATCAAAGTCACCAA-3'，下游引物：5'-GCAGAAGCCCTTCCTCACA-3'，产物大小 571 bp。β-actin 上游引物：5'-TCGTGCGTGACATTAGGAG-3'，下游引物：5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT-3'，产物大小 247 bp。扩增条件 94℃变性 30 s，61℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，30 个循环。

1.2.6 Kai1 基因对 Hep-2 细胞增殖的影响 实验设转染组、细胞对照组，每组 6 复孔。取对数生长期细胞，胰蛋白酶消化后，用含 10%小牛血清的完全培养基配制成的单细胞悬液，调整细胞密度为 2.5×10^4 个/ml 接种于 96 孔板，每孔 200 μl，在 37℃、5%CO_2 及饱合湿度环境下常规培养 24 h。弃上清，加入 30 MOI rAd- Kai1，6 h 后弃上清，换含 10%新生小牛血清的 RPMI1640 培养基继续培养。分别于转染后 24、48、72 h，每孔加入 20 μl MTT（5 mg/ml），孵箱内常规培养 4 h，吸尽上清，每孔加入 DMSO200 μl，振荡 10 min 结晶物充分溶解。由空白孔调零后，以酶标仪检测 570 nm 处的光吸收值 A_{570nm}。计算细胞增殖抑制率：细胞增殖抑制率%=（1-$A_{处理组}$/$A_{细胞对照组}$）×100%。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期的分布 对照组于培养 48 h 收集细胞，实验组于转染后 48 h 收集细胞进行检测。收集以 PBS 洗涤 3 次后的细胞，制成单细胞悬液，调整细胞密度为 2×10^6 个 /ml，快速加入到 4℃预冷的 95%乙醇中固定（终浓度为 70%）24 h，送检。

1.2.8 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件包对数据进行统计分析，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，Kai1 对细胞生长影响的组间比较采用重复测量资料方差分析，其余指标行两独立样本 t 检验，显著性水平 $\alpha=0.05$，$P\leq0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 rAd-Kai1 的扩增及滴度测定

rAd- Kai1 经 HEK293 细胞扩增及纯化后，滴度可达到 6×10^{10} PFU/ml。

2.2 rAd-Kai1 对肿瘤细胞的感染率测定

10、20 MOI 及 30 MOI 的 rAd- Kai1 病毒对 Hep-2 细胞的感染率分别为 20%、62 %及 93 %以上。据此，确定 30 MOI 为以下实验的感染剂量（图 1）。

2.3 转染后 Hep-2 细胞 Kai1 mRNA 的表达

Hep-2 细胞株经转染 48 h 后，实验组的 Kai1 mRNA 表达水平较阴性对照组明显升高（$P<0.05$）（见图 2）。

2.4 MTT 测定细胞的增殖情况

MTT 法结果显示，转染后 24、48、72 h，转染组的增殖抑制率在分别为 16%、23%、29%，与对照组相比，差异有显著性。（见表 1）

2.5 转染后细胞周期分布的变化

rAd- Kai1 作用后 48 h，细胞周期分布情况（见表 2），可见 Kai1 转染组 G_0~G_1 期比率为（82.37±1.24），而对照组其比率为（69.32±1.41），差异有统计学意义。

3 讨 论

喉癌是来源于喉黏膜上皮组织的恶性肿瘤，近年来发病率呈逐渐上升趋势，且中晚期患者手术及放化疗疗效欠佳，易出现复发和转移。因此，寻找新的治疗手段具有重大意义。基因治疗作为一种新的治疗手段，近年来已成为医学研究领域的热点。

Kai1 基因是新近研究发现的一种肿瘤抑制基因，分布广泛，机体大多数组织均有表达，通过对前列腺癌、肺癌、食管癌、乳腺癌等的研究，发现 Kail 的表达和肿瘤的生物学效应密切相关。Kai1 基因的启动子区没有 TATA 盒或 CAAT 盒。在启动子区上游（-892、-868）处发现有 2 个串联重复的 CAAG（5'-AGGCAAGCTGGCGCAGCTCAAGCCT-3'）[6]。研究提示，p53 通过与该区域结合，可激活 Kai1 基因的表达[7]。由于 p53 在许多肿瘤中失活，因此常出现 p53 的转录目的基因 Kai1 的表达下降，从而使肿瘤恶性转化。有学者通过基因转染的方法将 Kai1 基因转入肿瘤细胞，使 Kai1 重新表达，研究结果显示 Kai1 对各肿瘤细胞的增殖有明显抑制作用。欧阳运薇等[9]用体外实验得出，转染 Kai1 后宫颈癌细胞的生长速度明显减慢，说明 Kai1 可以抑制肿瘤细胞的体外增殖能力。徐建华[3]等研究发现，转染重组质粒 pCMV-Kai1 使人胰腺癌细胞增殖受到明显抑制。机制方面，路丹[10]等用流氏细胞术对脂质体转染 Kai1 的人乳腺癌细胞与未转染组进行检



A. 10 MOI 感染率为 20%　　B. 20 MOI 感染率为 62%　　C. 30 MOI 感染率为 93%

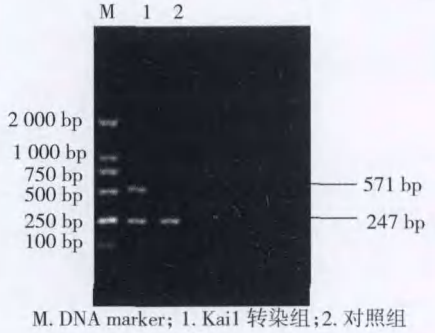
图 1　不同 MOI 值腺病毒对 Hep-2 细胞的感染率

表 1　MTT 法检测 Kai1 对 Hep-2 细胞增殖抑制的影响

	24 h	48 h	72 h
对照组	1.131 ± 0.019	1.347 ± 0.036	1.583 ± 0.015
转染组	0.944 ± 0.016	1.036 ± 0.023	1.123 ± 0.016
F 值	335.246	310.289	2639.702
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

表 2　转染 48 h 后 Hep-2 细胞周期的分布

组别	G_0~G_1(%)	G_2~M(%)	S(%)	PI(%)
对照组	69.32 ± 1.41	10.26 ± 1.18	20.42 ± 1.37	30.68
转染组	82.37 ± 1.24	6.22 ± 2.33	11.41 ± 1.48	17.63



M. DNA marker; 1. Kai1 转染组；2. 对照组

图 2　RT-PCR 检测 Kai1 的表达水平

测和比较，结果显示转染组 G_0 ~ G_1 期细胞数量明显升高，S 期细胞数量明显降低。徐建华[3]等在对 Kai1 与胰腺癌转移的研究中得出，胰腺癌细胞在转染后 G_0 ~ G_1 期的细胞数量明显增加，并认为 Kai1 基因可能通过改变胰腺癌细胞的生长周期，抑制癌细胞的增殖及分裂功能来实现对胰腺癌细胞转移的控制。目前，Kai1 对喉癌的作用鲜有报道，本课题组前期研究采用免疫组织化学法半定量检测喉癌组织中 Kai1 基因的表达水平，并与癌旁组织的表达水平进行了对比分析，发现喉癌组织中 Kai1 基因的表达水平明显低于癌旁组织，提示 Kai1 基因缺失可能是喉癌基因治疗的一个理想靶点[8]。

重组腺病毒是介导基因治疗的主要载体之一，具有宿主范围广、感染性强、病毒繁殖滴度高、稳定性好等优点，是研究转染较为常用的载体。

因此，本实验选用重组腺病毒作为转染目的基因 Kai1 的载体，通过对病毒进行扩增、纯化，成功将 Kai1 基因转入人喉癌 Hep-2 细胞中，转染率可高达 90%以上。通过 RT-PCR 进一步从 mRNA 水平确认 Kai1 基因可成功转染人喉癌细胞中。通过 MTT 法检测转染 rAd-Kai1 与未转染的 Hep-2 细胞的增殖抑制率，转染组细胞增殖受到明显抑制，增殖抑制率可高达 29%，与文献报道一致[3,9]，差异有统计学意义，这将为 Kai1 运用于喉癌的基因治疗奠定了基础。本实验还通过流式细胞术测定了 rAd-Kai1 与未转染的 Hep-2 细胞生长周期，进一步探讨 Kai1 基因在体外抑制喉癌 Hep-2 细胞增殖的机制。结果显示，转染 Kai1 基因后 G_0 ~ G_1 期细胞数量由 69.32%升高到 82.37%，而 S 期细胞数量由 21.42%降低到 11.41%，差异有显著性，与文献报道一致[3,10]，Kai1 可将喉癌 Hep-2 细胞生长周期阻滞于 G_0/G_1 期，提示 Kai1 影响喉癌细胞增殖能力的机制可能与其调节细胞周期功能存在密切联系。目前，Kai1 调节细胞周期的作用机制尚无文献报道，有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Murphy P M.Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis[J].N Engl J Med,2001,345(4):833-835.

[2] 徐建华,郭晓钟,任丽楠,等.Kai1 基因抗胰腺癌细胞转移的研究[J].中华消化杂志,2004,24(9):541-543.

[3] 杨光之,丁彦青,刘　莉,等.Kai1/CD82 基因转染对结肠癌细胞株 LoVo 生物学特性的影响[J].中华病理学杂志,2004,33(1):49-52.

[4] Working P K,Lin A,Borellini F.Meeting product development challenges in manufacturing clinical grade oncolytic adenoviruses[J].Oncogene,2005,(24):7792-7801.

[5] Ghosh S S,Gopinath P,Ramesh A. Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy[J].Appl Biochem Biotechnol,2006,133(8):9-29.

[6] Dong J T,Issacs W B,Barrett J C,et al.Genomic organization of the human KAI1 metastasis suppressor gene[J].Genomics,1997,41(3):25-32.

[7] Bari R,Zhang Y H,Zhang F. Transmembrane interactions are needed for Kai1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis[J].Am J Pathol,2009,174(2):647-660.

[8] 舒　艳,陈鸿雁,谭　毅,等.KAI1/CD82 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(23):1065-1067.

[9] 欧阳运薇,潘小玲,屈　艺,等.KAI1 基因对宫颈癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J].四川大学学报(医学版),2008,39(5):753-756.

[10] 路　丹,王文秀,徐玉清,等. Kai1 基因转染人乳腺癌细胞系的建立及初步研究[J].现代生物医学进展,2007,7(3):335-337.

（责任编辑：冉明会）