维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0919-03

Mad1 对膀胱肿瘤作用的体内实验研究

胡宏波[1],罗春丽[1],唐 敏[1],蔡晓钟[1],赵 培[1],吴小候[2]

(1. 重庆医科大学医学检验系、临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室、重庆重点实验室;
2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:在原位建立膀胱肿瘤的大鼠模型,观察转染 Mad1 表达质粒后对膀胱肿瘤增殖的抑制作用。方法:MNU 对 SD 大鼠进行膀胱灌注诱发膀胱肿瘤,荷瘤动物随机分为 3 组:Mad1 转染组(A 组),空载体转染组(B 组)和生理盐水转染组(C 组)。通过大鼠重量(RBW)、膀胱绝对重量(BAW)、膀胱相对重量(BRW)、Mad1 和 TERT mRNA 表达水平等指标,用流式细胞仪等检测手段,比较转染前后 Mad1 和 TERT 的表达差异、观察 Mad1 对膀胱肿瘤增殖的抑制作用以及探讨相应的机理。结果:成功在原位建立膀胱肿瘤的大鼠模型。A 组与 B、C 两组相比 RBW 无显著性差异($P>0.05$),但 BAW 和 BRW 分别有非常显著差异性($P<0.01$)及显著差异性($P<0.05$);Mad1mRNA 相对表达量明显增加;TERT mRNA 相对表达量明显降低;流式细胞仪显示 G_0/G_1 期细胞显著增加($P<0.01$),S 期细胞显著减少($P<0.01$). 结论:高表达的 Mad1 能抑制膀胱肿瘤的增殖。

【关键词】膀胱肿瘤;动物模型;细胞周期;转染
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-15

Experimental study on the effects of Mad1 to bladder tumor in vivo

HU Hongbo, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the orthotopic model of bladder tumor in rats and to observe the inhibition effect on bladder tumor after transfected with expression plasmid pcDNA3.1 (+)/Mad1. *Methods*: Bladder tumors were induced in SD rats by intravascular instillation of MNU. The rats bearing tumor were randomly divided into 3 groups: transfected with pcDNA3.1(+)/Mad1 (group A), transfected with empty vector (group B) and transfected with saline (group C). Tumor-hearing rats were transfected using Lipofectamine. Rat body weight (RBW), Bladder absolute weight (BAW), bladder relative weight (BRW) and expression levels of mRNA of Mad1 and TERT were assayed and flow cytometer analysis were used to observe the inhibition effect of Mad1 to bladder tumor. *Results*: Compared with group B and group C, in group A, though there was no diference in RBW ($P>0.05$), BAW and BRW were significantly decreased ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). Mad1 mRNA expression levels were markedly improved, while TERT mRNA expression levels were markedly decreased. Flow cytometry showed an increase of G0/G1-phase cells and a decrease of S-phase cells after transfected with Mad1. *Conclusions*: Over expression of Mad1 can inhibit the proliferation of bladder tumor.

【Key words】 Bladder tumor; Animal model; Cell cycle; Transfection

膀胱肿瘤是泌尿生殖系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤,研究表明 95%以上的膀胱癌组织中能够检测到端粒酶及端粒酶逆转录酶 (Telomerase reverse transcriptase, TERT)基因 mRNA 表达,但在正常膀胱组织中则为阴性[1]。TERT 基因是膀胱肿瘤生物治疗的一个值得探索的靶点。Mad1 (Mitotic arrest deficiency -1) 基因是碱性区-螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链(bHLHZip)超家族的成员。包括人类在内的许多哺乳动物的 Mad1 蛋白是一种相对分子量为 35ku 的磷酸化的核蛋白, 其半衰期为 15~30min[2],是细胞生长的阴性调节因子,能抑制细胞周期进程和促进凋亡[3]。本课题组在应用 Mad1 转染膀胱癌细胞株及裸鼠皮下移植性肿瘤取得显著疗效[4]的基础上,进一步将其应用于原位诱发的膀胱肿瘤动物模型。现报告如下:

作者介绍: 胡宏波(1973-)男,硕士,
主要研究方向:膀胱肿瘤的诊治。

基金项目: 重庆医科大学创新基金项目资助(编号:CX200205)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

Sprague-Dawley (SD)大鼠,5~6 周龄,健康雌性,体重(150±10)g,共 56 只,由第三军医大学实验动物中心提供。模型建立参照文献[5]并加以改进:SD 大鼠行 N- 甲基亚硝基脲(MNU)(sigma,USA)膀胱灌注, 每次 2.5mg/只,每 3 周 1 次×4 次,总量 10mg。首次 MNU 膀胱灌注后,每 3 周随机处死 3 只大鼠,取膀胱组织作病理检查,观察肿瘤发生情况。

1.2 尿脱落细胞学检查进行实验分组

在实验的第 12 周, 随机收集大鼠尿液,1500r/min 离心 15 min, 沉渣涂片置 37℃温箱烘干,95%乙醇固定 10 min, 然后用 0.1mol/L PBS (pH6.0)滴洗,0.01% 吖啶橙磷酸盐缓冲液(pH6.0)染 3min,0.1mol/L 氯化钙滴片分色 30s,PBS 清洗 3 次,每次数秒。将尿脱落细胞染色具备典型肿瘤细胞特征的大鼠作上标记,若在以后连续两日内染色仍能发现有阳性细胞出现,则将该大鼠纳入下一步实验。将上述符合标准的大鼠(共 33 只)按照膀胱内灌注成分的不同随机分成 A、B、C 共 3 组,每组 11 只。A 组:pcDNA3.1(+)/Mad1+ 脂质体;B 组:pcDNA3.1(+)+ 脂质体;C 组:生理盐水 + 脂质体。

1.3 质粒转染

pcDNA3.1 (+)/Mad1 由本室保存。小量提取 pcDNA3.1(+)/Mad1 质粒和空载体质粒 pcDNA3.1(+),经限制性内切酶 *Hind*Ⅲ和 Xba Ⅰ酶切鉴定正确后,进一步采用超纯质粒提取试剂盒(杭州维特洁公司)大量提取质粒,严格按照说明书进行操作。纯化的质粒经紫外分光光度计测定质粒浓度后,保存于 -20℃冰箱备用。参照 Lipofectamine 试剂盒(Invitrogen, USA)进行。质粒用量为 20μg,,脂质体用量为 60μg。膀胱灌注方法与 MNU 灌注相同。第 3 天、第 5 天按同样的方法重复灌注一次。

1.4 组织标本的处理

在首次脂质体混合物灌注后的第 7 天,对各组大鼠称重后麻醉,在近耻骨联合处剖腹显露膀胱,将其完整切除,用冷 PBS 液冲洗 2 次,用滤纸拭干后进行称重,记录好各实验组的大鼠体重(RBW)和膀胱绝对重量(BAW),用以计算膀胱相对重量(BRW)。纵行切开膀胱,观察其大体变化。

1.5 RT-PCR 检测大鼠膀胱肿瘤组织 Mad1、TERT 的表达

每组随机取 5 只大鼠的等量膀胱肿瘤组织, 制备匀浆,总 RNA 的提取和 RT-PCR 参照试剂盒说明书 (上海华舜公司和大连宝生物公司)进行。Mad1 引物根据 Genbank 中报告序列设计:

sense:5'-TGTGAGCGACTCTGACGA-3'

antisense:5'-GTGGGACACTGAAGTTTACG-3'

TERT 引物设计参照文献[6]设计:

sense:5'-AG GTCATTCTTTTACATCAC-3'

antisense:5'-TCATAGGCCCCGGTCACATC -3'.

以 β-actin 为内参照。2.0%琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD 凝胶成像系统分析。

1.6 流式细胞仪分析大鼠膀胱肿瘤组织细胞周期变化

每组随机取 5 只大鼠的部分膀胱肿瘤组织,制备单细胞悬液并调整细胞的浓度为 1×10^6/ml,70%冷乙醇固定 24h,检测前离心去乙醇,1mg/ml RNase 37℃水浴 30min,加 50mg/l 的碘化丙啶(PI)0.5ml,4℃避光 30min,上机分析细胞周期,每一样品的检测重复 3 次,结果取平均值。

1.7 统计学分析

采用 SAS 软件对实验数据进行统计分析,进行单因素方差分析,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 表示存在显著性差异,以 $P<0.01$ 表示存在非常显著性差异。

2 结 果

2.1 实验动物及标本的大体观察

模型建立的过程中有 3 只大鼠死亡。脂质体转染后各组大鼠毛色、食量、营养状况等一般情况无明显差别,转染后 3 组大鼠均无 1 例死亡。对转染前处死大鼠的观察显示,9 周时膀胱表面可见小肿块;12 周时均有肿瘤形成且大多呈多发性, 病理证实为膀胱癌。转染后 A 组大鼠膀胱肿瘤的平均体积小于 B、C 两组。

2.2 尿脱落细胞学检查

在荧光显微镜下观察, 发现尿 AO 染色涂片的细胞的细胞核为黄绿色或黄色荧光,而胞质和核仁为桔红色荧光,同时具有核大、畸形、异常分裂相以及核浆比失调等特点,即为肿瘤细胞,以后连续两天内检测仍有该类细胞出现,可判断具备该特征的大鼠成功诱发肿瘤。

2.3 RBW、BAW 和 BRW 的变化

3 组标本的 RBW 差异在统计学无显著意义($P>0.05$); 比较 BAW 和 BRW,B、C 两组之间差异均无显著意义($P>0.05$),而 A 组与 B、C 两组比较差异分别具有均有非常显著性($P<0.01$)和显著性($P<0.05$)(见表 1)。实验表明:Mad1 转染组的膀胱肿瘤生长和增殖受到了抑制。

表 1 不同实验组 RBW、BAW 和 BRW 的变化(n=11, $\bar{x}\pm s$)

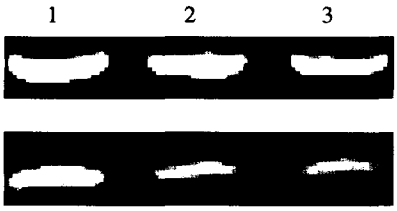
group	RBW(g)	BAW(mg)	BRW(mg/g)
A	309±14*	302±17**	0.98±0.07***
B	307±16#	27±15#	1.07±0.08#
C	306±14	3323±16	1.06±0.08

注:*$P>0.05$ vs group B and group C,**$P<0.01$ vs group B and group C,***$P<0.05$ vs group B and group C,#$P>0.05$ vs group C, BRW(mg/g)=BAW(mg)/ RBW(g)

维普资讯 http://www.cqvip.com

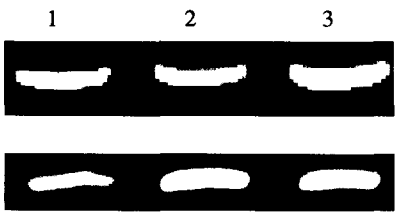
2.4 Mad1 和 TERT mRNA 表达水平的检测

3 组标本均经 PCR 扩增出 230bp (Mad1)和 482bp (TERT)的产物,其大小与设计片段大小一致(图 1a~1b)。在 Mad1 mRNA 相对表达水平上,A 组为(83.1±10.1)%,而 B、C 两组依次为(30.4±8.1)%,(33.6±7.0)%,A 组与 B、C 两组的该指标在统计学上均存在非常显著的差异(P<0.01);在 TERT mRNA 相对表达水平上,A 组为 (56.1±4.1)%, 而 B、C 两组依次为(72.4±4.8)%,(69.6±2.7)%, A 组与 B、C 两组的该指标在统计学上均存在非常显著的差异(P<0.01)。实验表明:外源 Mad1 表达质粒成功转染到膀胱肿瘤组织中,并且有效地下调 TERT 的表达。



1:group A; 2:group B; 3:group C

图 1a 转染后各实验组 Mad1 mRNA 表达变化



1:group A; 2:group B; 3:group C

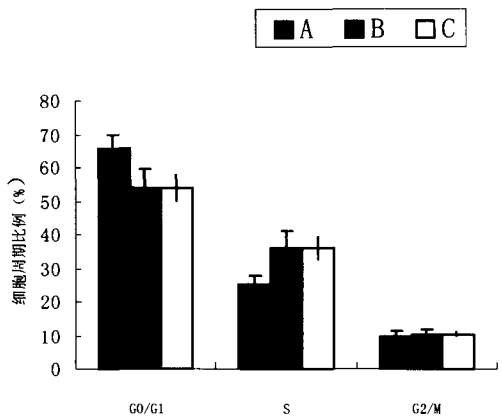
图 1b 转染后各实验组 TERT mRNA 表达变化

2.5 流式细胞仪分析不同组别的细胞周期变化

A 组肿瘤细胞的细胞周期发生了明显的改变,与 B、C 两组相比,表现为 G_0/G_1 期细胞明显增多,而 S 期细胞明显减少, 且均存在非常显著的统计学差异(P < 0.01)(见图 2)。实验表明:A 组细胞阻滞于 G_0/G_1 期,提示 A 组膀胱肿瘤细胞的增殖能力减弱。

3 讨 论

近年来有关端粒、端粒酶及其与人类肿瘤关系问题成为学科研究的热点。TERT 是端粒酶活性的主要调控亚单位,与端粒酶活性具有直接的相关性。TERT mRNA 分布随膀胱肿瘤的病理分级、临床分期的增加有增加趋势,且有显著性差异(P<0.01)[7]。这说明在膀胱肿瘤的早期及进展期均存在着 TERT 基因异常表达,其表达的强弱与肿瘤细胞分化及进展程度有关。因此,抑制端粒酶和 TERT 活性可能成为膀胱肿瘤基因治疗的潜在的靶点。



注:*P < 0.01 vs group B and group C,**P > 0.05 vs group B and group C,***P > 0.05 vs group C

图 2 不同组别的细胞周期变化 (%,$\bar{x}\pm s$)

Mad/Max/Myc 网络在细胞的增殖、生长和分化中起着最基本的作用。Max 蛋白因其丰度高以及能与 Mad1 和 c-Myc 形成二聚体而在网络中处于核心地位,这些不同的二聚体均能与 TERT 启动子的 E-BOX (5'-CACGTG-3')结合从而对 TERT 和端粒酶的表达进行调节[8]。Mad1 与 Max 形成二聚体后通过使组蛋白去乙酰化而下调 TERT 的表达。本研究中 Mad1 转染组膀胱肿瘤的增殖受到抑制的同时伴有 TERT mRNA 表达量显著降低, 表明 Mad1 可能是通过下调 TERT 来调控细胞抑制肿瘤细胞的增殖。

在细胞周期进程中,Mad1 主要作用是使细胞停滞在 G_1 期,阻止其向 S 期进展,逃离正常的细胞周期[9];并且和 Max,mSin3 相互作用形成一种功能性的复合物,抑制细胞的增殖,促进分化。Mad1 的表达下调或缺乏往往导致细胞正常分化受到遏制和肿瘤的形成。在本实验中,A 组肿瘤细胞 G_0/G_1 细胞百分数为 65.6±4.1,较 B 组的 53.7±5.8 和 C 组的 53.9±4.0 明显升高(P<0.01),而其 S 期细胞百分数为 24.9±2.8, 较 B 组的 36.0±4.8 和 C 组的 35.7±3.6 均显著降低 (P<0.01),提示 Mad1 是一个细胞周期调控蛋白, 通过转染 Mad1 调控细胞周期抑制肿瘤细胞的增殖。

总之, 我们的研究证实了 Mad1 基因的转染能够抑制膀胱肿瘤的增殖, 表明 Mad1 在膀胱肿瘤的

(下转第 958 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

减少并缩小，比Ⅰ型纤维适应性更大[7, 8]。

研究表明，个体内不同骨骼肌的肌纤维型构成比例不同，肌纤维构成与肌的功能密切相关。本研究表明，2 种肌纤维在大鼠腓肠肌内呈棋盘样均匀分布，并以Ⅱ型肌纤维占优势，其比例达到 72.2%，这表明，大鼠腓肠肌为速度力量型肌。我们曾经报道的家兔腓肠肌肌纤维型组成也以Ⅱ型纤维占绝对优势，达 91%[3]，而以往我们对人腓肠肌的肌纤维型分布研究表明，其Ⅱ型纤维仅占 40%[1]，远不及家兔和大鼠的比例，这或许是四足动物后肢适应其速度力量要求而选择的必然结果。与大鼠比较，家兔的后肢明显比其前肢粗壮，运动时后肢必然要分担更多的力量和速度，家兔腓肠肌有比大鼠更高的Ⅱ型纤维比例的特点恰好可以满足这种功能上的要求。

当然，仅凭肌纤维型组成和分布尚不能揭示骨骼肌功能的全部信息，在全面阐明大鼠腓肠肌功能之前，还需对其肌构筑、肌纤维横切面积、亚部化等加以研究，这对全面阐明该肌功能具有重要意义。

（通讯作者：张 潜，遵义医学院解剖学教研室，zmczq@163.com.cn）

参 考 文 献

[1] 李名扬，薛 黔，朱道立，等.人类腓肠肌外侧头的肌纤维型分布[J]. 解剖学杂志，1986；9(1)：20-24.

[2] Houmard JA，Weidner ML，Gavigan KE，et al. Fiber type and citrate synthase activity in the human gastrocnemius and vastus lateralis with aging[J]. J Appl Physiol，1998；85(4)：1337-1341.

[3] 张 潜，薛 黔.家兔小腿三头肌亚部化研究[J]. 解剖学杂志，2003；26(4)：377-380.

[4] Guth L，Samaha FJ. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase[J]. Exp Neurol，1970；28(2)：365-367.

[5] Gollnick PD，Parsons D，Oakley CR.Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation[J]. Histochemistry，1983；77(4)：543-555.

[6] Korfage JA，Van Wessel T，Langenbach GE，et al. Heterogeneous postnatal transitions in myosin heavy chain isoforms within the rabbit temporalis muscle[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol，2006；288(10)：1095-1104.

[7] 王 煜，周 里，叶 鸣，等.不同强度的跳跃训练对大鼠骨骼肌纤维类型影响的实验研究[J]. 西安体育学院学报，2005；22(5)：47-49.

[8] Vikne H，Refsnes PE，Ekmark M，et al. Muscular performance after concentric and eccentric exercise in trained men[J]. Med Sci Sports Exerc，2006；38(10)：1770-1781.

（上接第 921 页）

基因治疗中可能是一种较佳的侯选基因。研究表明，抑制端粒和 TERT 的表达能增强化疗药物的抗癌效果[10]。因此，即使不能完全有效逆转膀胱肿瘤的恶性表型，Mad1 的转染也可能是一种改变 TERT 基因的表达的有效方法，为膀胱肿瘤的基因治疗开辟了一条新的途径。

参 考 文 献

[1] De Kok JB，Schalken JA，Aalders TW，et al.Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas[J]. Int-J-Cancer，2000；87(2)：217-220.

[2] yer DE，Eisenman RN. A switch from Myc：Max to Mad：Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation [J]. Genes Dev，1993；7(11)：2110-2119.

[3] Gunes C，Lichtsteiner S，Vasserot AP，et al. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1[J]. Cancer Res，2000；60(8)：2116-2121.

[4] Zou L，Zhang PH，Luo CL，et al.Transcript regulation of human telomerase reverse transcriptase by c-myc and mad1[J]. Acta Biochim Biophys Sin，2005；37(1)：32-38.

[5] 佟 锦，米振国，李春华，等.N-甲基亚硝基脲诱发大白鼠膀胱肿瘤病理学动态观察[J]. 山西医药杂志，2000；29(1)：28-30.

[6] Wong SC，Ong LL，Er CP，et al. Cloning of rat telomerase catalytic subunit functional domains，reconstitution of telomerase activity and enzymatic profile of pig and chicken tissues[J]. Life Sci，2003；73(21)：2749-2760.

[7] 邹 琳，罗春丽，吴小侯，等.膀胱肿瘤组织中端粒酶催化亚基和 c-myc 的表达[J]. 中华实验外科杂志，2003；20(12)：1073-1074.

[8] Luscher B. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network[J]. Gene，2001；277(1-2)：1-14.

[9] Foley KP，McArthur GA，Queva C，et al. Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation[J]. EMBO J，1998；17(3)：774-785.

[10] Sumi M，Tauchi T，Sashida G，Nakajima A，et al. A G-quadruplex-interactive agent，telomestatin (SOT-095)，induces telomer shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia[J]. Int J Oncol，2004；24(6)：1481-1487.