

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)09-0784-05

Stathmin 基因表达与肿瘤化疗药物敏感性的关系

井晓荣 刘 丽 赵 辉 张惠中 (第四军医大学唐都医院临床实验科 陕西 西安 710038)

Relationship between expression of Stathmin gene in cancer cells and its sensitivity to chemotherapeutic drugs

JING Xiao-Rong, LIU Li, ZHAO Hui, ZHANG Hui-Zhong

Department of Clinical Diagnosis, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To investigate the sensitivity of eight kinds of cancer cells to two kinds of chemotherapeutic drugs: Vincristine and Docetaxel and to study the relationship between the sensitivity and the expression of Stathmin gene in these cells. METHODS: The chemosensitivity of the eight kinds of cancer cells to Vincristine (VCR) and Docetaxel (DOC) was detected by MTT colorimetric assay and morphological observation. Real time PCR technology was used to examine the expression of Stathmin gene in these cells. RESULTS: The inhibition rates of the eight kinds of cancer cells by VCR and DOC were respectively 58% and 48% for human osteosarcoma cells line Sosp-9607 (9607), 56% and 44% for human osteosarcoma cells line Sosp-9901 (9901), 37% and 46% for cervical cancer cells line Hela (Hela), 34% and 12% for human hepatocellular carcinoma cells line HHCC (HHCC), 31% and 31% for lung cancer cells line A549 (A549), 17% and 34% for laryngo-carcinoma cells line Hep-2 (Hep-2), 16% and 15% for gastric cancer cells line MKN45 (MKN45), and 15% and 3% for human hepatocellular carcinoma cells line 7721 (7721) cells. The intensity of the expression of Stathmin gene in the eight kinds of cells was different and was correlated with the sensitivity mentioned above. CONCLUSION: The expression of Stathmin gene in cancer cells is related to its sensitivity to the chemotherapeutic drugs. The detection of the expression of Stathmin gene in tumor cells may be of some clinical significance in choosing a chemotherapy agent.

【Keywords】 cancer cells; Vincristine; Docetaxel; MTT assay; inhibition; real time PCR

收稿日期 2004-12-30; 修回日期 2005-03-04

基金项目 国家自然科学基金(30371445)

通讯作者:张惠中. Tel. (029)83377470 Email. Huizhong@public.xa.sn.cn

作者简介:井晓荣(1974-),女(汉族),陕西省西安市人.硕士生(导师张惠中). Tel. (029)83377905 Email. Jing740301@126.com

【摘要】目的:探讨8种肿瘤细胞对长春新碱(vincristine, VCR)和泰索帝(docetaxel, DOC)两种化疗药物的敏感性以及该敏感性与肿瘤细胞内Stathmin基因表达之间的关系.方法:采用MTT法和形态学观察,根据两种药物对细胞的相对抑制率,分析8种肿瘤细胞对两种药物的敏感情况,应用实时荧光定量PCR技术分析比较上述细胞Stathmin基因表达情况.结果:8种肿瘤细胞对VCR的敏感程度(相对抑制率)依次为:骨肉瘤细胞9607,58%;9901,56%;宫颈癌细胞Hela,37%;肝癌细胞HHCC,34%;肺癌细胞A549,31%;喉癌细胞Hep-2,17%;胃癌细胞MKN45,16%;肝癌细胞7721,15%.对DOC敏感程度依次为:9607,48%;Hela,46%;9901,44%;Hep-2,34%;A549,31%;MKN45,15%;HHCC,12%;7721,3%.Stathmin基因在各种肿瘤细胞中具有不同程度的表达,其表达强度与各肿瘤细胞对两种药物的敏感性有关.结论:肿瘤细胞中Stathmin基因表达水平与其化疗药物敏感程度有关.检测Stathmin基因表达水平对临床化疗药物的选择有一定的指导意义.

【关键词】肿瘤细胞;长春新碱;泰索帝;MTT试验;抑制率;实时定量PCR

【中图分类号】R73 **【文献标识码】**A

0 引言

化学药物治疗是目前临床恶性肿瘤治疗的主要手段之一,选择有效的化疗药物及提高肿瘤对化疗药物的敏感性是恶性肿瘤治疗的关键.我们采用MTT法^[1]体外药敏试验,对肺癌、骨肉瘤等8种肿瘤细胞对两类化疗药物:长春新碱(Vincristine, VCR)和新一代紫杉醇类药物泰索帝(Docetaxel, DOC)的敏感性进行检测,为临床用药提供依据;应用实时荧光定量PCR技术,分析了8种肿瘤细胞Stathmin基因的表达程度,为提高肿瘤细胞对上述两种化疗药物的敏感性提供分子生物学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 8种肿瘤细胞:骨肉瘤细胞(9607, 9901)喉癌细胞(Hep-2)和胃癌细胞(MKN 45)4种肿瘤细胞来自本实验室;宫颈癌细胞(Hela)来自第四军医大学口腔医院病理科;肺癌细胞(A549)来自第四军医大学实验动物中心;2种肝癌细胞(HHCC, 7721)来自第四军医大学细胞生物技术中心;二氧化

碳培养箱(德国 HERAEVS);倒置显微镜[日本奥林巴斯(CK31)];照相机(日本奥林巴斯);酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂 DG3022);台式低温离心机(提取 RNA 用);蛋白核酸分析仪(英国 JENWAY 公司);实时荧光定量 PCR 仪(北京东胜公司);四氮唑兰(MTT,华美公司);分析纯二甲基亚砷(DMSO,天津博迪化工有限公司);SYBR-Green I 染料(上海开放科技有限公司)。依据临床最大血液峰值浓度:VCR 0.5 mg/L,DOC 0.1 mg/L 设置体外用药剂量。VCR 设置 6 个浓度梯度(剂量组)单位(mg/L):0.05,0.5,5,50,100 和 500;DOC 设置 7 个浓度梯度(剂量组)单位(mg/L):0.001,0.01,0.1,1,10,100 和 500。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 用小号培养瓶培养细胞,待细胞长满后,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3 min,用 RPM2 1640 完全培养液终止消化,移入 10 mL 离心管离心,再重悬于完全培养液,用计数板计数,调整细胞悬液至细胞密度为 $5 \times 10^7/L$,每孔加细胞悬液 100 μL ,即 $0.5 \times 10^4/孔$,接种于 96 孔板。设实验孔(加药)、对照孔(只加细胞)和调零孔(只加培养液),每个浓度设 3 个复孔。将 96 孔板置于 $37^\circ C$,50 mL/L CO_2 饱和湿度的 CO_2 培养箱培养 24 h,实验孔分别加入不同浓度的两种化疗药物 50 μL ,继续培养 48 h 后取出 96 孔板,每孔加入 MTT(5 g/L PBS 缓冲液)20 μL 继续培养 4 h,小心吸除上清后加入 DMSO 150 $\mu L/孔$,振荡数分钟,使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长,使用酶联免疫检测仪检测每孔 A 值,按下列公式计算相对抑制率:抑制率 = $(1 - \frac{A_{实验孔}}{A_{对照孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 Stathmin 基因表达 细胞总 RNA 提取及逆转录:分别收集 8 种肿瘤细胞($>10^6$ 个细胞),Trizol 法提取细胞总 RNA(按说明书进行),常规方法分别进行反转录合成 cDNA,得到不同浓度的 cDNA,用蛋白核酸分析仪测定各 cDNA 的 A 值,用 ddH_2O 调整浓度均至 0.2 g/L。定量 PCR 根据 Genbank 报道的 Stathmin 基因序列合成 PCR 引物如下(上海博亚),上游引物 5'-CATATG GCTTCTTCTGATATCCAG-3';下游引物:5'-CTCGAG TTAGTCAGCTTCAGTCTCGTC-3'。PCR 反应体系为:模板 cDNA 1 μL ,10 \times PCR 缓冲液 2 μL ,10 mmol/L dNTP 1 μL ,10 $\mu mol/L$ 引物 1 μL ,Tag DNA 聚合酶 0.5 μL 及 SYBR Green I 染料 1 μL ,加水至 20 μL ,使用北京东胜公司的实时荧光定量 PCR 仪,于 $94^\circ C$

30 s, $58^\circ C$ 30 s, $72^\circ C$ 40 s,反应 35 个循环。琼脂糖电泳观察 PCR 产物。

统计学处理:用 SPSS 软件,计算不同药物浓度 3 个复孔相对抑制率,计算结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同肿瘤细胞 Stathmin 基因定量 PCR 四个重复样品的 C_t 值,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同肿瘤细胞间比较用方差分析,两两比较用 LSD-t 检验。

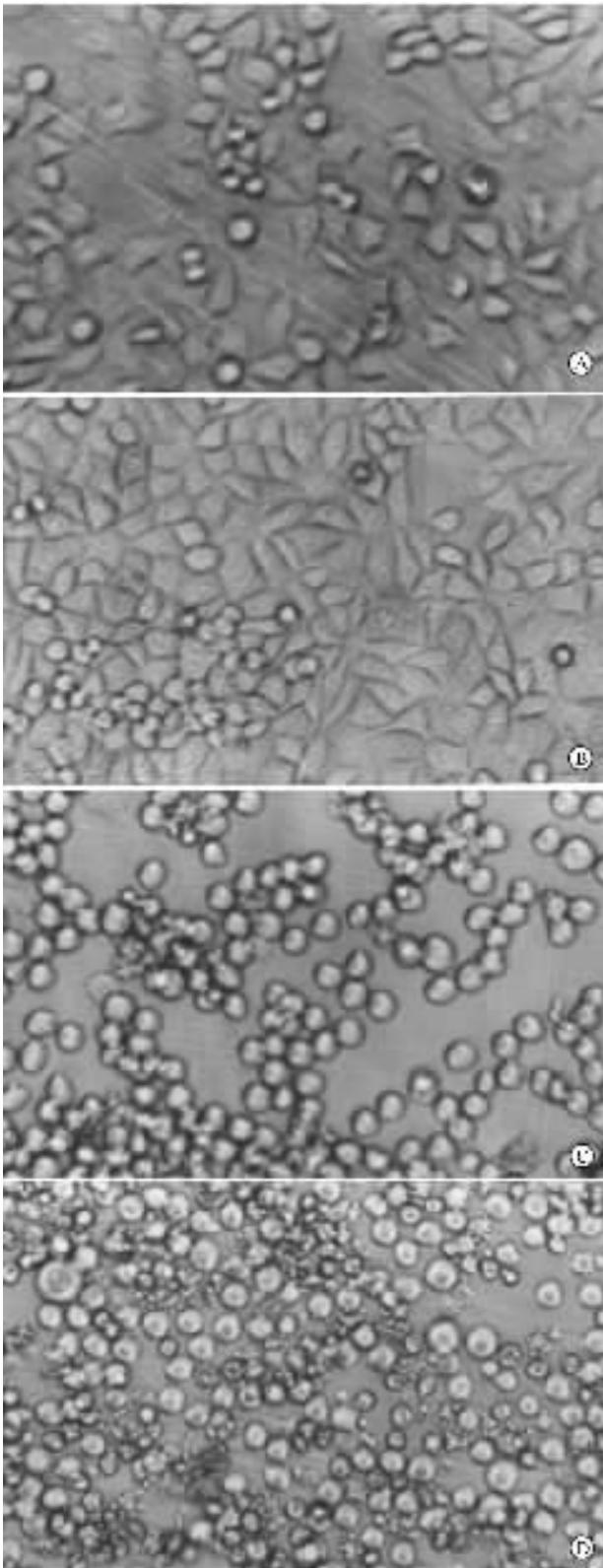
2 结果

2.1 倒置显微镜下观察 两类化疗药物对肿瘤细胞生长和形态的影响:对照孔细胞正常贴壁生长增殖;加药孔细胞生长缓慢,分裂相减少或消失,胞质粗糙,内有颗粒堆积,可见细胞明显回缩,并有一定数量细胞破裂解体(Fig 1)。

2.2 两类化疗药物对 8 种细胞的 MTT 药敏结果

血浆峰值浓度抑制率 $\geq 50\%$ 为高度敏感(++) , $>30\%$ 为中度敏感(+), $<30\%$ 为耐药(不敏感)(-)。如 Tab 1 结果为 9607,9901,HeLa,A549 四种细胞对两种药物均敏感,其中 9607,9901 对 VCR 高度敏感,对 DOC 中度敏感,HeLa,A549 两种细胞对两种药物均中度敏感,HHCC 对 VCR 中度敏感而对 DOC 不敏感,Hep-2 对 DOC 中度敏感而对 VCR 不敏感,MKN45 和 7721 两种细胞对两种药物均不敏感。随药物浓度的增加每种细胞的抑制率有升高趋势(Fig 2)。

2.3 定量 PCR 结果 将荧光信号对扩增循环数作图 Fig 3 显示 8 种肿瘤细胞 Stathmin 基因 PCR 荧光扩增曲线,表明每一个样品中双链 DNA 的浓度都升高到了背景荧光水平之上,并且都进入了指数扩增期,阈值线设定为最初的 3~10 个循环荧光值标准偏差的 10 倍。 C_t 值(荧光曲线与阈值线交叉的点)随着初始模板浓度的增加而成比例地减少。每种细胞 cDNA 均进行了四个重复,通过计算 C_t 值的差异来验证检测的准确性,Tab 2 所示重复样品间 C_t 的标准差小于 0.3。Fig 4 为肝癌细胞(HHCC)cDNA 四个重复样品的荧光扩增曲线,显示出极好的重复性。Fig 5 显示了各细胞 cDNA PCR 熔解曲线,随着温度的升高,与双链结合的 SYBR-Green I 染料的释放,荧光信号也随之平滑的下降,荧光强度随温度变化的负一次倒数也被显示。荧光强度变化的拐点(熔点, T_m)处清晰地看到了一个单一的峰,这个峰对应着扩增产物的熔解温度($86^\circ C$)表明扩增产物为目的产物,荧光强度随温度变化的负一次倒数图中没有杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染,引物二聚体和假阳性现象。



A: Control group, 24 h; B: Control group, 48 h; C: Drug treatment group, 24 h; D: Drug treatment group, 48 h.

Fig 1 Growth condition of the osteosarcoma cell 9607 in control group and drug treatment group at different time points

图1 对照组与加药组骨肉瘤9607细胞不同时间的生长情况

表1 MTT法检测8种细胞对两种药物于临床最大血浆峰浓度(0.5 mg/L, 0.1 mg/L)的抑制率(%)和敏感度

Tab 1 Inhibition rate and sensitivity of eight kinds of cancer cells treated by two drugs with the maximal concentration in plasm (0.5 mg/L, 0.1 mg/L) ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Cell	Inhibition rate		Inhibition rate	
	Vincristine	Se	Docetaxel	Se
9607	58.3 ± 2.5	(++)	47.9 ± 0.8	(+)
9901	55.4 ± 2.9	(++)	44.2 ± 2.5	(+)
Hela	36.7 ± 1.6	(+)	46.3 ± 2.0	(+)
A549	30.9 ± 2.2	(+)	31.1 ± 1.0	(+)
MKN45	15.6 ± 3.8	(-)	15.3 ± 2.4	(-)
Hep-2	17.2 ± 2.6	(-)	33.6 ± 3.3	(+)
HHCC	34.0 ± 3.5	(+)	12.0 ± 2.1	(-)
7721	15.4 ± 2.3	(-)	3.4 ± 4.6	(-)

Se: sensitivity.

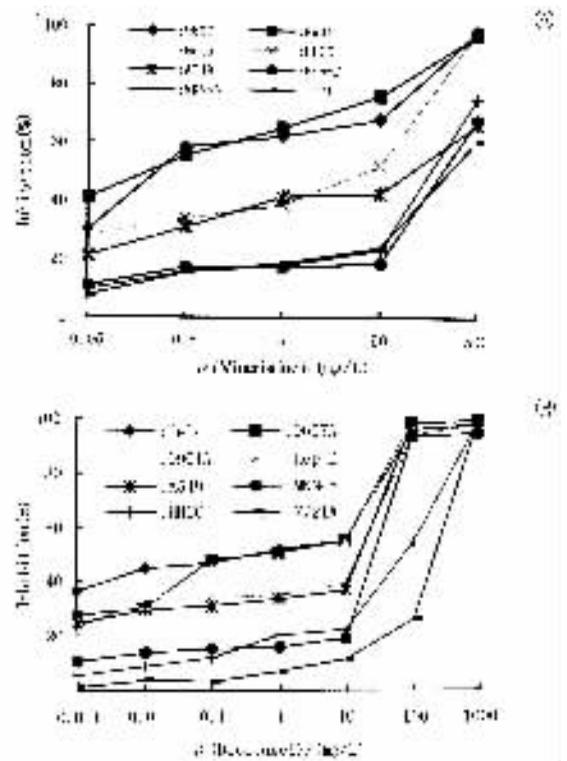


Fig 2 Dosage-effect curves for eight kinds of cancer cells to Vincristine (A) and Docetaxel (B)

图2 8种肿瘤细胞对长春新碱(A)和泰索帝(B)的剂量-效应曲线

2.4 琼脂糖电泳 PCR 产物结果 如 Fig 6 显示, 在 DL2000 标准分子质量的 450 bp 处可见一特异性条带, 与 Stathmin 基因大小一致, 无其他杂带, 与熔解曲线所得结果相一致。

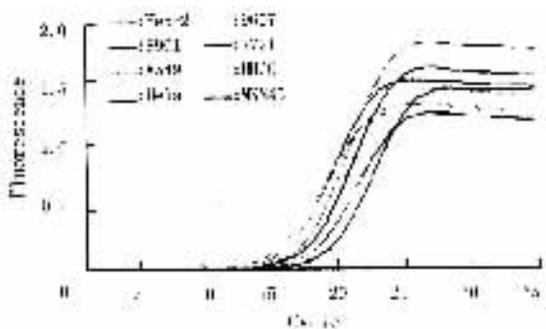


Fig 3 Fluorescence-cycle curves of Stathmin gene for eight kinds of cancer cells

图3 8种肿瘤细胞 Stathmin 基因 PCR 荧光扩增曲线

表2 8种肿瘤细胞同一浓度 cDNA 四个重复样品的平均 Ct 值及标准差

Tab 2 Mean and standard deviation in Ct values for the four replicate samples of cDNA from eight kinds of cells at the same concentration (n=4, $\bar{x} \pm s$)

Cell	$\bar{x} \pm s$
Hep-2	2.41 ± 0.18 ^{bd}
9901	2.52 ± 0.17 ^{bd}
A549	3.60 ± 0.24 ^{bdf}
HeLa	3.68 ± 0.19 ^{bdf}
9607	4.51 ± 0.20 ^{bd}
7721	10.36 ± 0.19
HHCC	11.22 ± 0.11
MKN45	12.23 ± 0.11

^bP < 0.01 vs 7721 ; ^dP < 0.01 vs MKN45 ; ^fP < 0.01 vs 9607.

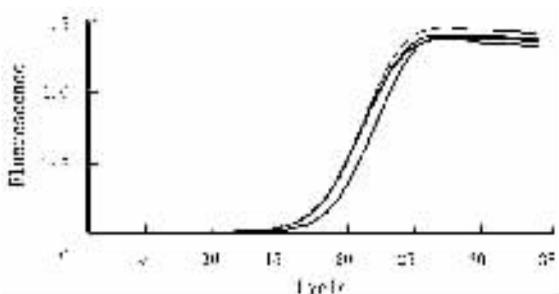


Fig 4 Fluorescence-cycle curves of Stathmin gene for the four replicate samples of HHCC cell cDNA

图4 HHCC 细胞 cDNA 四个重复孔的 Stathmin 基因荧光扩增曲线

3 讨论

VCR 和紫杉醇 (TAX) 两类化疗药物为广谱化疗药物, DOC 是一种较新型紫杉醇类抗肿瘤药物, 目前在临床有一定应用. 两类化疗药物均为作用于微管蛋白破坏微管系统的细胞周期特异性药物. VCR 主

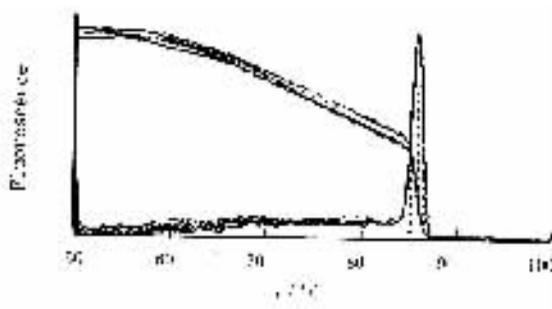
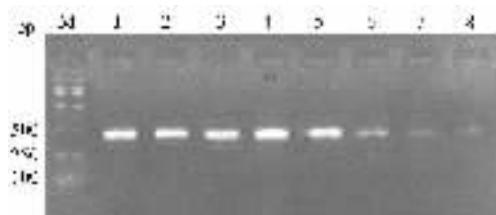


Fig 5 Melting curves depicting the fluorescence intensity and negative first derivative plots for eight kinds of cell cDNA samples
图5 8种肿瘤细胞 cDNA Stathmin 基因 PCR 熔解曲线



M : DL2000 1 : Hep-2 ; 2 : 9901 ; 3 : A549 ; 4 : HeLa ; 5 : 9607 ; 6 : 7721 ; 7 : HHCC ; 8 : MKN45.

Fig 6 Analysis of PCR products of Stathmin gene from eight kinds of cells by agarose gel electrophoresis

图6 琼脂糖电泳 8种肿瘤细胞 Stathmin 基因 PCR 产物结果

要作用是抑制微管聚合, 使分裂期细胞不能形成纺锤体, 使核分裂停止于 M 期而导致细胞死亡, TAX 主要作用于细胞 G2 晚期和 M 期末, 它虽可促进微管蛋白装配成微管, 然而却抑制微管的裂解, 导致微管排列异常, 使纺锤体失去正常功能而引起细胞死亡^[2]. 不同类型的肿瘤细胞对 VCR 和 DOC 的敏感性不同, MTT 法是快速敏感的药敏检测方法, 临床相关性好, 尤其在肿瘤治疗方面, 有较高的临床参考价值.

本实验结果表明骨肉瘤细胞系 9607, 9901 对两种药物都具有好的较敏感性, HeLa, A549 对两者的敏感性次之, 喉癌细胞 HEP-2 及肝癌细胞 HHCC 则选择性地对其中一种药物中等程度敏感而对另外一种耐药, 胃癌细胞 MKN45 和肝癌细胞 7721 对两者都不敏感. 有研究报道, 胃癌细胞对于其他多种包括 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、丝裂霉素 (MTT) 等化疗药物化疗效果也不理想^[2], 研究表明多药耐药 (MDR) 的产生是导致胃癌细胞 MKN45 产生耐药和治疗失败的原因之一^[3].

国内外还有研究结果表明肿瘤基因 Stathmin 的表达程度与肿瘤对化疗药物的敏感性有一定关系^[4,5]. Stathmin (又称 OP18) 是一种高度保守的细胞内磷蛋白, 在多种恶性肿瘤中高度表达, 是恶性肿瘤治疗的新靶点. 与上述两种化疗药物相同, Stathmin

蛋白的下游作用靶点也是微管系统,只是作用路径不同,在细胞分裂间期(G₀期)该蛋白N末端部分具有抑制微管蛋白聚集的作用^[6-8],因此,研究8种肿瘤细胞Stathmin基因表达与它们对两种化疗药物的敏感性具有一定意义。

实时定量PCR原理是利用荧光信号的变化实时检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化,通过Ct值和标准曲线实现对起始模板的定量和定性分析,Ct值是PCR扩增过程中,扩增产物(荧光信号)到达一定的荧光强度(阈值)时所经过的扩增循环数。Ct值与起始模板的关系研究表明,每个模板的循环数(Ct值)与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系,即初始模板量越多,扩增产物达到某一值(域值)时所需要的循环数越少即Ct值越小^[9]。我们的实验实际是利用荧光染料SYBR Green I以各细胞同一浓度cDNA中同一基因(Stathmin基因)cDNA的不同拷贝数为模板,因此比较Ct值即可比较各细胞之间同一浓度cDNA中Stathmin基因cDNA的拷贝数,实际间接地比较了不同肿瘤细胞之间Stathmin基因的mRNA含量差异,从而得到Stathmin基因表达差异。

根据每个模板的循环数(Ct值)与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系,有:

$$\log(X_A/X_B) = \Delta Ct \log(1 + E_X)$$

即 $\frac{X_A}{X_B} = (1 + E_X)^{\Delta Ct}$ X_A, X_B —— A, B 两样品的浓度(模板起始拷贝数)

若 E_X = 1, 就有 E_X —— 扩增效率

$$\frac{X_A}{X_B} = 2^{\Delta Ct} \quad \Delta Ct \text{ —— A, B 两样品 Ct 值之差}$$

本实验显示,对两种药物均敏感的4种细胞Stathmin基因表达明显高于对两种药物均不敏感的2种细胞(P < 0.01),例如骨肉瘤细胞9901 Stathmin基因的表达是胃癌细胞MKN45的2^{12.23-2.56}倍约1024倍,即低表达的2种细胞(MKN45和7721)对两种药物的敏感性较差,Stathmin基因高度表达的9901细胞对两类化疗药物具有较好的敏感性;Hep-2细胞Stathmin基因高度表达,对VCR不敏感而显示出对DOC敏感;Stathmin基因低表达的HHCC细胞对VCR敏感而对DOC不敏感;A549, Hela和9607 3种细胞随Stathmin基因表达的递减对两种药物的敏感性递增,它们的Stathmin基因表达较高,但A549与

Hela之间无统计差异(P > 0.05),而9607与A549, Hela之间有统计差异(P < 0.01)。

通过本实验,显示了8种肿瘤细胞对VCR和DOC两种化疗药物的敏感性,同时初步探讨了这几种肿瘤细胞Stathmin基因表达的高低与它们对化疗药物敏感性之间的关系。本实验结果对临床肿瘤治疗用药具有一定参考价值,同时为从分子生物学角度提高肿瘤化疗效果提供了一定的实验依据。

【参考文献】

- [1] 杨宗华, 金逸, 李晓诗, 等. MTT法研究肿瘤细胞对化疗药物敏感性的临床意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2002; 17(2): 131-133.
Yang ZH, Jin Y, Li XS, et al. To research clinical significance for the sensitivity of cancer cell to chemotherapeutic drugs using MTT assay[J]. J Pract Oncol, 2002; 17(2): 131-133.
- [2] 丁勇, 范清宇, 张殿忠, 等. 紫杉醇诱导骨肉瘤细胞凋亡[J]. 中国现代医学杂志, 2002; 12(13): 1-3.
Ding Y, Fan QY, Zhang DZ, et al. Paclitaxel induced apoptosis in human osteosarcoma cell line[J]. Chin J Mod Med, 2002; 12(13): 1-3.
- [3] 陈亚军, 叶吉祥, 孙国娣. MTT法体外测定胃癌化疗药物敏感性[J]. 中国普通外科杂志, 2003; 12(1): 47-49.
Chen YJ, Ye JX, Sun GD. The sensitivity of tummy bug to chemotherapeutic drugs was examined with MTT assay[J]. Chin J Gen Surg, 2003; 12(1): 47-49.
- [4] 俞丽芬, 吴云林, 章永平, 等. 人胃腺癌长春新碱耐药细胞系耐药机制的研究[J]. 中华消化杂志, 2001; 21(3): 179-180.
Yu LF, Wu YL, Zhang YP, et al. The study of the mechanism for resistance of human tummy bug resistant cell line to Vincristine[J]. Chin Soci Gastr, 2001; 21(3): 179-180.
- [5] 张惠中. Stathmin基因在人骨肉瘤细胞中表达及意义[J]. 第四军医大学学报, 2003; 15(3): 345-348.
Zhang HZ. The expression and significance of Stathmin gene in human osteosarcoma[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003; 15(3): 345-348.
- [6] Holmfeldt P, Brattsand G, Gullberg M. MAP4 counteracts microtubule catastrophe promotion but not tubulin-sequestering activity in intact cells[J]. Curr Biol, 2002; 12(12): 1034-1039.
- [7] Walczak CE. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins[J]. Curr Opin Cell Biol, 2000; 12(1): 52-56.
- [8] Steinmetz MO, Jahnke W, Towbin H, et al. Phosphorylation disrupts the central helix in Op18/stathmin and suppresses binding to tubulin[J]. EMBO Rep, 2001; 2(6): 505-510.
- [9] Budde PP, Kumagai A, Dunphy WG, et al. Regulation of Op18 during spindle assembly in Xenopus egg extracts[J]. J Cell Biol, 2001; 153(1): 149-158.