

[文章编号 1000-1182(2005)06-0471-03]

脂质体介导 nm23-h1 质粒体内 转染腺样囊性癌可行性

李文¹, 温玉明², 彭文珍³

(1. 四川大学华西医院 耳鼻喉科; 2. 四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室;
3. 四川大学华西基础医学与法医学院 分子生物学实验室 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究阳离子脂质体介导 nm23-h1 质粒体内转染腺样囊性癌的可行性。方法 将腺样囊性癌细胞株体外培养后移植入 40 只裸鼠体内。ACC 瘤体长至直径 1 cm 左右时,用脂质体包裹 nm23-h1 质粒进行瘤体内注射,每次注入质粒-脂质体复合物 0.1 ml,其中 10 只裸鼠每只注射 2 次,10 只裸鼠注射 1 次,10 只作空白对照,10 只裸鼠多针道注射 0.2 ml 质粒及脂质体复合物。注射后 2、3、7 d 处死动物,获取肿瘤标本作常规组织学及免疫组化研究。结果 瘤体内注射质粒-脂质体复合物 3 d 后肿瘤细胞内均有 nm23-h1 表达,7 d 后表达增加,肿瘤细胞外间质增加,2 次注射较 1 次注射、多针道注射较单一针道注射有更多的细胞呈阳性表达。结论 脂质体介导 nm23-h1 质粒体内转染腺样囊性癌可获得小范围阳性表达,但还不具备临床实施的可能性。

[关键词] 基因治疗; nm23; 阳离子脂质体; 腺样囊性癌

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A

Feasibility of Cationic Lipid Mediated nm23-h1 Plasmid Transfecting Adnoid Cystic Carcinoma in vivo LI Wen¹, WEN Yu-ming², PENG Wen-zhen³. (1. Dept. of Otolaryngology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Molecular Biology Laboratory, Basical Medical and Forensic College of West China, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of plasmid nm23-h1 transfection on high metastatic potential adnoid cystic carcinoma (ACC-M) cell line mediated by cationic lipid. **Methods** ACC-M cell were implanted in the maxillofacial region in each of 40 BALB/c nude mice. After the tumor growth to 1 cm in diameter, 0.1 ml Lipofectamine-nm23-h1 plasmid complex were injected intratumorally in 10 mice, 3 days after the first injection, 10 mices injected for twice, 10 mice as plamid-blank control, another 10 mice were injected 0.2 ml complex, 2, 3, 7 days after the injection, the mice were killed and the specimen for HE and immunohistological chemistry study. **Results** nm23-h1 expression initiated in the tumor cells 3 days after the complex injection, 7 days later, the expression level increased accompanying with extracellular matrix increase, twice injection and multiple channel injection would gain better nm23-h1 expression than once injection and single-channel injection respectively. **Conclusion** Cationic lipid mediated nm23-h1 plamid transfecting adnoid cystic carcinoma can gain small range positive expression, but the results give little prospect for further clinical treatment in such a manner.

[Key words] gene therapy; nm23; cationic lipid; adnoid cystic carcinoma

nm23 是 1988 年由 Steeg 等¹ 通过差异杂交的方法从具有较高转移潜能的小鼠恶性黑色素瘤细胞株 k-1735 发现的, nm23 基因在多种人体肿瘤中均有表达,如恶性黑色素细胞瘤、乳腺癌、肝癌、胃癌、喉癌、口腔癌等²。体内外的多数研究表明, nm23 的表达与肿瘤的转移率呈负相关。nm23 阳性转染细胞的克隆形成能力、细胞迁移能力均较阴性转染细胞有所降低。国内已有 nm23 在口腔癌、喉癌和腺样囊性癌中

表达的免疫组化研究报道³。本课题组^{4,5} 已经在基础及动物实验中证实,以阳离子脂质体介导的 nm23-h1 基因转染腺样囊性癌 ACC-M 细胞可以明显降低其肺转移率,并使部分低分化癌细胞反向分化。在此基础上,本文报道阳离子脂质体介导 nm23 质粒体内转染口腔及鼻窦常见的腺样囊性癌细胞的研究结果,探讨瘤体内注射体内转染作为一种实体瘤基因治疗的可能性。

1 材料和方法

1.1 主要材料

BALB/C 裸小鼠(四川大学华西动物实验中心提

[收稿日期 2005-02-10; 修回日期 2005-07-12]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39870746)

[作者简介] 李文(1968-),男,四川人,主治医师,博士

[通讯作者] 李文, Tel: 13036664793

供动物),腺样囊性癌细胞株 ACC-M(上海第二医科大学口腔颌面外科学教研室提供),nm23-h1质粒(美国 Steeg PS 惠赠),Lipofectamine(GIBCO BRL 公司,美国),nm23-H1 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)。

1.2 质粒-脂质体复合物的制备

nm23-h1 质粒和无血清培养基按 1:2 的体积比混匀后,静置 5 min,成为混合液 1;Lipofectamine 与无血清培养基按 3:10 的体积比混匀成为混合液 2。将两种混合液再混合,轻微振荡,室温下静置 20 min,制成质粒-脂质体复合物。同时制备含相同脂质体浓度的脂质体无血清培养基混合物作空白质粒对照。

1.3 动物实验方法

将腺样囊性癌细胞株 ACC-M 体外培养至对数生长期后经 0.125% 胰酶消化,Hank's 液洗涤 3 次后,浓度调节为每毫升 5×10^6 个后,备用。随机选用 6 周龄 BALB/C 雌性裸鼠 40 只,每只裸鼠颌面部皮下注射备好的 ACC-M 细胞 0.2 ml。待裸鼠颌面部 ACC 瘤体长至 1 cm 左右时,每次采用质粒-脂质体复合物(其中含质粒约 20 mg/L)0.1 ml 进行瘤体内注射。其中 10 只裸鼠注射 2 次(第 1 次注射 3 d 后行第 2 次注射),10 只裸鼠注射 1 次,10 只作空白质粒对照,10 只裸鼠 0.2 ml 质粒-脂质体复合物多针道注射。注射完成后 2、3、7 d 处死动物,获取肿瘤标本,10% 福尔马林溶液固定,石蜡包埋,苏木精-伊红染色观察。

1.4 免疫组化方法

免疫组化采用 LsAB 法。所有标本切成 4 μ m 厚的石蜡切片,56^号 溶蜡,二甲苯脱蜡,逐级乙醇水化,高压锅热修复抗原。0.03% H_2O_2 甲醇 30 min 阻断内源性过氧化物酶,异种动物血清封闭 10 min,一抗浓度 1:50,二抗浓度 1:100,加一抗后 4^{小时} 过夜,再分别加二抗及 LsAB 试剂,DAB 显色 5 min,苏木素复染 3 min,常规脱水、透明、树胶封片,光镜观察。以口腔高分化鳞癌为阳性对照,低分化癌为阴性对照,同时设立空白对照。染色结果判断标准为癌细胞胞浆内呈棕褐色着色。

2 结果

2.1 一般情况

所有动物无 1 例死亡。两次注射的实验组有 1 只裸鼠由于注射过浅,出现局部坏死,坏死物从皮肤针道溢出后,针道处瘻口封闭,皮肤呈干性坏死。40 只动物均无明显活动及进食障碍。

2.2 苏木精-伊红染色

实验各组 3 d 后注射区域部分肿瘤细胞变性坏死,7 d 后部分肿瘤细胞周围间质增加。对照组注射 3、7 d 后除注射区域部分肿瘤细胞变性坏死外无其他

明显改变。

2.3 免疫组化染色

实验各组 3 d 后肿瘤细胞内即有 nm23-h1 表达,7 d 后 nm23-h1 表达的细胞以及表达强度增加,肿瘤细胞外间质增加,2 次注射较 1 次注射有更多的细胞呈阳性表达。单一针道注射阳性细胞的范围较小,多针道注射较单一针道注射有更多的细胞呈阳性表达(图 1,2)。对照组 2、3 和 7 d 均未见 nm23-h1 阳性表达。

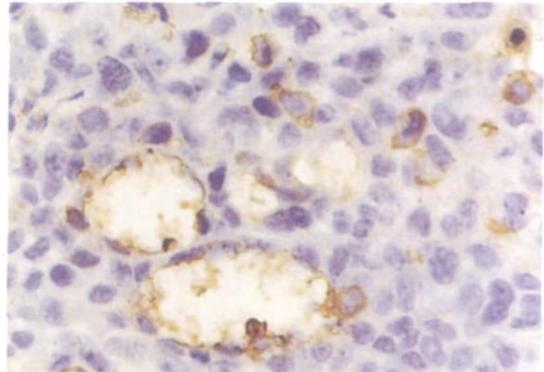


图 1 单一针道注射 nm23-h1 阳性细胞的范围较小 LsAB $\times 400$

Fig 1 Single channel injection gains narrower extent of positive expression LsAB $\times 400$

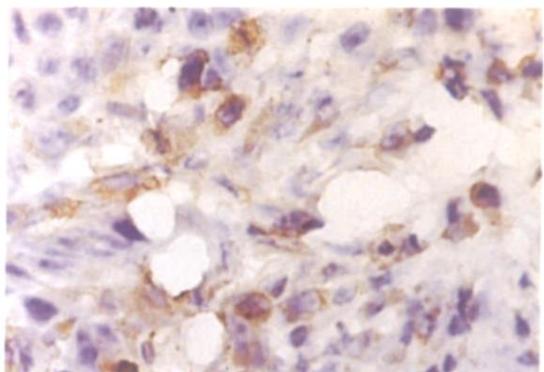


图 2 多针道注射时更多的 nm23-h1 细胞呈阳性表达,细胞外间质明显增加 LsAB $\times 400$

Fig 2 Multiple channel injection gains wider extent of positive expression accompanying with extracellular matrix increase LsAB $\times 400$

3 讨论

临床回顾性研究表明,nm23-h1 与恶性肿瘤的转移密切相关。但能否作为一个独立的预后指标,在不同作者和对不同肿瘤的研究结果中并不一致⁶。MacDonald 等⁶、Leone 等⁷ 将野生型 nm23 体外转染高转移乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 发现肿瘤细胞的克隆形成能力、迁移能力均明显降低,将 nm23-h1 阳性表达细胞移植于裸鼠体内,转移率及转移灶数量均明显减少,NDPK 酶活性与 nm23-h1 的表达或细胞株

转移潜能的抑制无直接关系。Lee等⁸对人前列腺癌细胞系的研究也提示其抑制转移的活性与NDPK酶无关。因而有关该基因抑制肿瘤转移的确切机制目前尚不清楚。

阳离子脂质体是目前广泛使用的基因治疗的非病毒载体,包裹nm23-h1质粒后具有易于与肿瘤细胞膜融合或被细胞吞噬从而使nm23-h1进入细胞内的作用。脂质体介导的质粒瘤体内直接注射,避免了对脂质体的大小及靶向性要求,是提高基因转染特异性的措施之一,由于头颈部位置表浅,适于注射及疗效观察,理论上讲瘤体内直接注射的方法适用于头颈部肿瘤的基因治疗。然而,基因治疗的载体一直是基因治疗的瓶颈,是基因转染效率低的原因之一。改变nm23与阳离子脂质体的比率以达到最大包封率,寻求达到最大转染效率的最适比例,在脂质体膜上加入适当的配体以提高其与靶细胞膜结合的能力等均有待于进一步研究。

本实验结果表明,阳离子脂质体介导nm23-h1质粒能够在体内转染ACC-M细胞,nm23-h1开始表达的时间与体外培养时基本一致,7d后nm23-h1表达的细胞以及表达强度增加,肿瘤细胞外间质增加,提示细胞外基质可能影响细胞间的粘附以及细胞的运动迁移特性,这可能是nm23-h1具有抑制癌细胞转移潜能的机制之一。2次注射较1次注射有更多的细胞呈阳性表达,多针道注射较单一针道注射有更多的细胞呈阳性表达,但总的来看,转染的效率极低。虽然有学者研究表明细针穿刺活检并不增加转移的概率,但一般认为应避免反复穿刺。本实验表明,瘤体内注射nm23-h1基因转染不适合作为临床使用nm23-h1

靶基因进行实体瘤转移抑制治疗的方式。

[参考文献]

- 1] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastasis potential J. J Nat Cancer Inst, 1988,80(2):200-204.
- 2] Freiji JM, MacDonald NJ, Steeg PS. nm23 and tumor metastasis: Basic and translational advances J. Biochem Soc Symp, 1998,63 (1): 261-271.
- 3] 史宏男,何荣根,邱蔚六,等.nm23基因在涎腺腺样囊性癌中的表达及其与肺转移的关系J. 中华口腔医学杂志,1997,32(1):4-6. (Shi HN, He RG, Qiu WL, et al. nm23 gene expression in adnoid cystic carcinoma and its relationship to pulmonary metastasis J. Chin J Stomatol, 1997,32(1):4-6.)
- 4] Li W, Wen YM, Wang CM, et al. Experimental study of antimetastatic function of nm23-h1 gene on high metastatic pulmonary cell line ACC-MJ. J Chinese Dent Res, 2003,3 (1):35-36.
- 5] 温玉明,李文,王昌美.nm23-h1基因的导入对腺样囊性癌分化的影响J. 临床口腔医学杂志,2001,17(3):163-165. (Wen YM, Li W, Wang CM. Intrduction of nm23-h1 gene on the differentiation of adnoid cystic carcinoma J. Clin Med J Stomatol, 2001,17(3):163-165.)
- 6] MacDonald NJ, dela Rosa A, Steeg PS. The potential role of nm23 in cancer metastasis and cellular differentiation J. Eur J Cancer, 1995, 31A(7-8):1096-1100.
- 7] Leone A, Flatow U, van Hutte K, et al. Transfection of human nm23-h1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: Effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity J. Oncogene, 1993,8 (9):2325-2333.
- 8] Lee HY, Lee H. Inhibitory activity of nm23-h1 on invasion and colonization of human prostate carcinoma cells is not mediaed by its NDPK activity J. Cancer Lett, 1999,145 (1-2):93-99.

(本文编辑 汤亚玲)

《国外医学口腔医学分册》征订启事

本刊系专业性医学情报刊物,由中华人民共和国教育部主管,四川大学主办,1974年5月创刊。其主要任务是根据我国医学科学发展的需要,及时、准确地报道国外口腔医学最新研究成果及临床经验(包括新理论、新技术、新方法及发展动态等),供我国口腔医学及相关学科工作者在防病治病、科学研究、教学等工作中参考。主要报道形式为综述、文摘等。文摘选自英、日、俄、德、法5种文种,200余种国外医学期刊的文献。每期16万余字,A4开本。

全国各地邮局公开发行。邮发代号:62-19, CN51-1135/R, ISSN1001-1188,每册国内定价8.00元人民币。

编辑部地址:四川省成都市人民南路三段十四号,邮政编码:610041,电话:028-85502414,传真:028-85503479, E-mail: gwxykqyxfc@vip. 163. com。