

[文章编号] 1000-1182(2006)02-0170-03

nm23-H1质粒和顺铂白蛋白联合治疗裸鼠移植瘤

邝克谦¹, 陈伟辉², 温玉明³

(1.西安交通大学口腔医院 颌面外科, 陕西 西安 710004; 2.福建医科大学附属协和医院 颌面外科, 福建 福州 350001; 3.四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究nm23-H1质粒和顺铂白蛋白联合应用对裸鼠移植瘤的影响。方法 将15只BALB/C雌性裸鼠随机等量分为3组, 即对照组、顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组。每只裸鼠均皮下注射浓度为每毫升 3.1×10^6 个的舌鳞癌Tca8113细胞, 2周后顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组移植瘤瘤体内注射质粒-脂质体复合物, 3 d后顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组和顺铂白蛋白组瘤体内注射顺铂白蛋白。观察裸鼠的重量、移植瘤体积和瘤体重量的变化。结果 对照组裸鼠重量最轻。nm23-H1质粒和顺铂白蛋白联合治疗组肿瘤体积最小, 瘤体重量最轻。结论 nm23-H1基因治疗和顺铂白蛋白联合可以明显抑制裸鼠移植瘤的生长。

[关键词] nm23-H1; 顺铂; 移植瘤

[中图分类号] R730.5 **[文献标识码]** A

Effect on Xenograft of Nude Mouse by Combination Therapy of nm23-H1 and Protein-cisplatin ZHI Ke-qian¹, CHEN Wei-hui², WEN Yu-ming³. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Xiehe Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of protein-cisplatin and nm23-H1 therapy on the tumor of nude mouse. **Methods** The 15 BALB/C female mice were divided into three groups, control group, protein-cisplatin group and protein-cisplatin+nm23-H1 plasmid group. Tca8113 were injected into the mice subcutaneously with the concentration of 3.1×10^6 cells/mL. After two weeks, the mixture of lipofectin and nm23-H1 was injected around xenograft of nude mouse. After three days, the protein-cisplatin was injected around xenograft. The weight of mouse, the volume and the weight of xenograft were measured. **Results** The weight of mouse was lightest in control group. The volume and weight of the transplanted tumor were lightest in nm23-H1+protein-cisplatin group. **Conclusion** The combination therapy of nm23-H1 and protein-cisplatin can effectively inhibites the growth of xenograft in nude mouse.

[Key words] nm23-H1; cisplatin; xenograft

1988年Steeg等^[1]用差异杂交法从高转移黑色素瘤细胞株中发现并分离出nm23-H1基因, 其具有抑制肿瘤转移的作用, 并部分参与肿瘤细胞增殖、分化的调控。最近研究发现, nm23-H1与化疗敏感性有密切关系, 膀胱癌患者nm23-H1的表达水平与顺铂等药物的敏感性有密切关系^[2]。体外研究乳腺癌和黑色素瘤细胞株对化疗药物的抗增殖活性时发现, 171种临床应用的化疗药物均对nm23-H1高表

达的转移侵袭性细胞株无优先的生长抑制作用, 但这些细胞株对顺铂明显增敏^[3-4], 这些结果表明nm23-H1高表达与肿瘤对顺铂的反应性有密切关系。本实验将nm23-H1真核表达质粒和顺铂白蛋白进行裸鼠移植瘤瘤体内注射, 观察裸鼠体重、瘤体体积和瘤体重量的变化, 为nm23-H1基因治疗和淋巴化疗联合应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和设备

Tca8113细胞株(四川大学华西口腔医院), nm23-H1质粒(美国国立卫生研究院Steeg PS博士惠赠), 脂质体(Gibco公司, 美国), 顺铂白蛋白微球(四川大学药学院), 透射电镜(Hitachi H公司, 日本)。

[收稿日期] 2005-10-25; [修回日期] 2006-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39870746); 福建省自然科学基金重点资助项目(C0220002)

[作者简介] 邝克谦(1968-), 男, 新疆人, 讲师, 博士

[通讯作者] 邝克谦, Tel: 029-81015479

1.2 方法

1.2.1 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,静置5 min,成为混合液1,将脂质体与无血清培养基按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,室温静置20 min,制成质粒-脂质体复合物。

1.2.2 建立裸鼠移植瘤 由四川大学实验动物中心提供15只BALB/C雌性裸鼠,鼠龄6周,鼠重22—24 g。动物均由实验动物中心饲养(SPF级)。随机分为对照组、顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组,每组5只。将人舌鳞癌细胞株Tca8113体外培养至对数生长期后,经0.25%胰蛋白酶消化,浓度调节为每毫升 3.1×10^6 个,每只裸鼠经前肢腋下皮下注射至颈部0.2 mL,第2天观察见注射的包块基本消失。

接种肿瘤细胞后,对照组不注射任何药物,任肿瘤继续生长;接种肿瘤细胞2周后,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组用质粒-脂质体复合物行瘤体内注射,每次注入复合物0.2 mL,多针道注射,注射质粒3 d后,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组和顺铂白蛋白组同时给予顺铂白蛋白0.2 mL(0.136 mg),间隔3 d再给顺铂白蛋白,最后一次给药后2周,3组动物称重后同时处死,处死后瘤体标本作HE染色。肿瘤体积(V)= $ab^2 \times \pi / 6$ (a 为肿瘤最大直径, b 为肿瘤最小直径)。

1.3 统计学处理

使用SPSS 10.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 3组荷瘤裸鼠体重变化

裸鼠接种Tca8113细胞株后,约10 d后肿瘤生长明显加快,对照组、顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组荷瘤裸鼠处死后的体重分别为(14.90±0.90) g、(17.90±0.83) g、(17.70±0.86) g。顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组之间比较无统计学差异($P>0.05$),但两组与对照组比较有统计学差异($P<0.05$),说明Tca8113细胞对裸鼠发育有明显影响。

2.2 3组荷瘤裸鼠平均肿瘤体积和重量变化

3组荷瘤裸鼠处死后,肿瘤的组织标本作HE染色证实为鳞癌。透射电镜可见细胞凋亡,染色体浓缩边聚。对照组、顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组荷瘤裸鼠治疗前肿瘤体积分别为(240.35±89.21) mm³、(237.27±87.42) mm³和(235.17±80.76) mm³;治疗后肿瘤体积分别为(876.01±1603) mm³、(535.13±142.34) mm³和(291.88±99.53) mm³。对照组和顺铂白蛋白组裸鼠处死前肿瘤体积明显增大,顺

铂白蛋白+nm23-H1质粒组肿瘤没有明显增大。3组肿瘤体积比较,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组肿瘤体积最小。治疗前3组裸鼠肿瘤体积比较没有统计学差异($P>0.05$);治疗后顺铂白蛋白组裸鼠肿瘤体积小于对照组,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组裸鼠肿瘤体积小于对照组和顺铂白蛋白组,其差异有统计学意义($P<0.01$)。

对照组、顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组荷瘤裸鼠肿瘤湿重分别为(1.01±0.10) g、(0.85±0.04) g、(0.51±0.06) g,对照组肿瘤最重,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组肿瘤湿重最小。3组比较,对照组与顺铂白蛋白组肿瘤重量没有明显差异;对照组和顺铂白蛋白组与顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组比较,肿瘤重量有明显差异。

肿瘤抑制率=(1-治疗组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%

按这个公式计算肿瘤抑制率,顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组肿瘤抑制率分别为15.8%和49.5%。

3 讨论

研究表明nm23-H1与肿瘤区域淋巴结转移率和远处转移率成负相关^[9]。但是关于nm23-H1与肿瘤转移和复发的关系目前观点不一致,Suzuki等^[6]将nm23-H1转染人结肠癌细胞株HT-29,接种裸鼠,发现nm23-H1可以明显抑制HT-29的肝转移,同时抑制内皮生长因子,可能机制是nm23-H1导致肌球蛋白磷酸化,肌球蛋白在肿瘤细胞转移中具有重要作用。与正常组织相比,人乳腺癌、肾癌、结肠癌、肺癌等常发生等位基因缺失,结肠癌淋巴结转移中有nm23-H1的纯合子缺失,提示在恶性肿瘤的发展过程中,nm23-H1可能被隐形失活^[7]。Dusonchet等^[8]研究160例结直肠癌患者,发现患者生存率与nm23-H1表达无关,认为nm23-H1的生物学特性与组织特异性有关;研究10例复发和13例未复发的巨细胞瘤患者,发现肿瘤复发与nm23-H1表达无关。随着对nm23-H1在不同肿瘤类型中表达和作用机制的深入研究,发现nm23-H1对于肿瘤转移潜能的抑制可能具有组织特异性,nm23-H1的作用机制可能与鸟苷二磷酸的磷酸化有关^[9-10]。

nm23-H1与化疗药物的敏感性受到人们的密切关注。Bookman等^[11]用免疫组化和RNA表达分析检测106例卵巢癌标本,研究nm23-H1表达与患者的组织病理学分级和临床预后的关系,发现nm23-H1高表达者生存时间明显延长。有学者研究56例卵巢癌,对比铂类化疗药物敏感和不敏感患者,发现对

铂类化疗药物敏感患者,其nm23-H1表达明显高于化疗不敏感患者^[2]。这些结果表明nm23-H1高表达与肿瘤对顺铂的反应性有密切关系。在本研究的体外实验中已证实nm23-H1可提高顺铂对Tca8113细胞化疗敏感性,这可能与Na(+)/K(+)-ATP酶有关。

顺铂自70年代以来广泛用于头颈部鳞癌的化疗,是头颈部鳞癌的首选药物之一,但其对肾、听力及胃肠道等有剂量相关毒性,使得在临床应用中受到一定限制。顺铂白蛋白微球可减小顺铂对全身正常细胞非选择性的杀伤,改变顺铂在全身分布,进入体内后逐步降解,缓慢释放包裹的顺铂,保持局部高浓度,使化疗药物与肿瘤细胞作用时间延长,从而有效地发挥抗肿瘤效果。顺铂白蛋白微球剂量小且停留在局部区域,避免了毒效出现^[13-14]。

本实验中,比较荷瘤裸鼠的体重时发现,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组裸鼠体重没有明显变化,对照组裸鼠体重明显减轻,有1例肿瘤侵及颌骨,说明Tca8113裸鼠移植瘤的恶性程度较高,对裸鼠全身产生影响,使裸鼠出现恶病质。nm23-H1与顺铂白蛋白微球联合治疗,顺铂作用于肿瘤局部,对裸鼠全身状况影响不明显,顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组裸鼠体重没有明显变化。比较肿瘤体积发现,治疗前3组裸鼠肿瘤体积基本相同,治疗后对照组肿瘤明显增大,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组裸鼠肿瘤体积增长最少。3组之间比较,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组与对照组和顺铂白蛋白组肿瘤体积均有差异。荷瘤裸鼠湿重比较,对照组肿瘤最重,顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组肿瘤最轻,两者比较有明显差异,顺铂白蛋白组和顺铂白蛋白+nm23-H1质粒组肿瘤抑制率分别为15.8%和49.5%。这说明nm23-H1基因治疗和顺铂白蛋白联合治疗可以明显抑制裸鼠移植瘤的生长,可能与nm23-H1可以提高顺铂的化疗效果有关。

nm23-H1提高顺铂化疗敏感性的机制可能是nm23-H1的表达产物核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK),它是一种在人体内广泛存在的酶,可催化产生三磷酸核苷。Na(+)/K(+)可以调节nm23在体内的磷酸化^[5],nm23-H1可能通过Na(+)/K(+)-ATP酶的活性,调节细胞内铂离子的浓度,提高顺铂的细胞毒性作用。这两种酶在mRNA和蛋白水平与nm23-H1提高顺铂化疗敏感性的关系有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential[J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(3):200-204.

- [2] Kauffman EC, Robinson VL, Stadler WM, et al. Metastasis suppression: The evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site[J]. J Urol, 2003, 169(3):1122-1133.
- [3] Iizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, et al. Downregulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: Possible association with Na(+), K(+)-ATPase[J]. Br J Cancer, 2000, 83(9):1209-1215.
- [4] Freije JM, Lawrence JA, Hollingshead MG, et al. Identification of compounds with preferential inhibitory activity against low-nm23-expressing human breast carcinoma and melanoma cell lines[J]. Nat Med, 1997, 3(4):395-401.
- [5] Leone A, Flatow U, King CR, et al. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells[J]. Cell, 1991, 65(1):25-35.
- [6] Suzuki E, Ota T, Tsukuda K, et al. Nm23-H1 reduces *in vitro* cell migration and the liver metastatic potential of colon cancer cells by regulating myosin light chain phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2004, 108(2):207-211.
- [7] Leone A, McBride OW, Weston A, et al. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer[J]. Cancer Res, 1991, 51(9):2490-2493.
- [8] Dusonchet L, Corsale S, Migliavacca M, et al. Nm23-H1 expression does not predict clinical survival in colorectal cancer patients[J]. Oncol Rep, 2003, 10(5):1257-1263.
- [9] Luo W, Matsuo K, Nagayama Y, et al. Immunohistochemical analysis of expression of nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase in human thyroid carcinoma: Lack of correlation between its expression and lymph node metastasis[J]. Thyroid, 1993, 3(2):105-109.
- [10] Holm R, Hoie J, Kaalhus O, et al. Immunohistochemical detection of nm23/NDP kinase and cathepsin D in medullary carcinoma of the thyroid gland[J]. Virchows Arch, 1995, 427(3):289-294.
- [11] Bookman MA, Ozols RF. Factoring outcomes in ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2):325-327.
- [12] Scambia G, Ferrandina G, Marone M, et al. Nm23 in ovarian cancer: Correlation with clinical outcome and other clinicopathological prognostic markers[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2):334-342.
- [13] 温玉明, 郑根建, 付风华, 等. 顺铂-白蛋白微球舌动脉灌注后的药物释放特性研究[J]. 临床口腔医学杂志, 1999, 15(2):69-71.
(WEN Yu-ming, ZHENG Gen-jian, FU Feng-hua, et al. Study on pharmacokinetics *in vivo* after lingual arterial embolization of cisplatin albumin microspheres[J]. J Clinical Stomatology, 1999, 15(2):69-71.)
- [14] 王昌美, 李宏卫, 温玉明, 等. 顺铂-白蛋白微球舌动脉导向治疗舌癌的临床病理研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1998, 16(2):234-237.
(WANG Chang-mei, LI Hong-wei, WEN Yu-ming, et al. Clinical pathology study of lingual carcinoma treatment with CDDP AMS microcapsules through lingual artery[J]. West China J Stomatology, 1998, 16(2):234-237.)
- [15] Marshall LJ, Muimo R, Riemen CE, et al. Na⁺ and K⁺ regulate the phosphorylation state of nucleoside diphosphate kinase in human airway epithelium[J]. Am J Physiol, 1999, 276(1 Pt 1):C109-C119.

(本文编辑 王 晴)