

反义 PKC 对 CNE-2Z 细胞端粒酶活性的影响

鲍波,黄培春,陈锦

摘要:目的 观察反义 PKC 对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞生长及端粒酶活性的影响。方法 脂质体转染反义 PKC,MTT 法检测细胞生长,TRAP-ELISA 法检测细胞端粒酶活性。结果 CNE-2Z 细胞端粒酶活性为阳性,转染反义 PKC 可使细胞生长指数($P < 0.01$)及端粒酶活性($P < 0.05$)降低。结论 反义 PKC 可以抑制 CNE-2Z 细胞的生长及端粒酶活性,PKC 可能通过调控端粒酶活性影响 CNE-2Z 细胞的生长。

关键词:蛋白激酶 C;反义寡核苷酸;鼻咽癌;端粒酶;CNE-2Z 细胞

中图分类号:R739.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2002)04-0273-03

Effect of protein kinase C - antisense oligonucleotide on telomerase activity of CNE-2Z cells

BAO Bo, HUANG Pei -chun, CHEN Jin

Department of Pathophysiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Abstract: Objective To observe the effect of protein kinase C (PKC) antisense oligonucleotide on cell growth and telomerase activity in human poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE-2Z. **Methods** Antisense PKC was transfected by cationic liposomes in CNE-2Z cells to analyze the cell growth and telomerase activity by MTT colorimetric assay and TRAP-ELISA, respectively. **Results** The telomerase activity was positive in CNE-2Z. After treated with antisense PKC, the relative cell growth index ($P < 0.01$) and the telomerase activity ($P < 0.05$) decreased in CNE-2Z cells. **Conclusion** The results indicated that antisense PKC may inhibit cell growth and telomerase activity in CNE-2Z, and PKC might regulate the cell growth by modulating telomerase activity in CNE-2Z cells.

Keywords: Protein kinase C; Antisense oligonucleotide; Nasopharyngeal carcinoma; Telomerase; CNE-2Z cells

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在人低分化鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞 CNE-2Z 的生长中起着重要的调控作用^[1,2],但其机制尚不清楚。研究发现,细胞恶性增殖、肿瘤的发生发展与端粒酶 (telomerase) 的活化密切相关^[3];在 NPC-076 细胞,PKC 的抑制剂或反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON) 可以影响端粒酶活性^[4,5]。在 CNE-2Z,PKC 对端粒酶活性的影响如何尚不清楚。本研究用脂质体转染 PKC 亚型的 ASON,通过 MTT 法检测 CNE-2Z 生长、端粒重复扩增-酶联免疫吸附法 (telomeric repeat amplification protocol enzyme linked immunosorbent assay, TRAP-ELISA) 检测细胞端粒酶活性,探讨 PKC 对 CNE-2Z 生长调控的机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

PKC 的特异 ASON 序列 5'-GTTCTCGCTGGT-

GAGTTTCA3',非特异序列 5'-GCCGAGGTCCATGTCGTACGG3'^[6],由上海生工公司合成。

端粒酶 TRAP-ELISA 检测试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals 公司),脂质体 lipofectin (美国 Life Technologies 公司),噻唑蓝 (MTT,Fluka 公司),500 mg·mL⁻¹十二烷基硫酸钠 (SDS,日本进口分装)和 20% (体积分数)N,N-二甲基甲酰胺 (DMF,湖北大学化工厂)混合液,RPMI1640 (Gibco 公司),96 孔细胞培养板 (Corning),450 型酶标免疫测定仪 (Bio Rad 公司),PCR-9600 型热循环仪 (Perkin Elmer 公司)。

1.2 细胞生长的测定^[7]

1.2.1 细胞接种 CNE-2Z 细胞由广东医学院肿瘤研究所提供,常规培养、传代至对数生长期。消化后用含 5% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液 (无青、链霉素双抗)吹打、调节细胞浓度,按每孔 6000 个接种于 96 孔细胞培养板,调零孔加无细胞的 5% 培养液。

1.2.2 生长指数的测定 参照文献^[6]及脂质体使用说明,配制不同浓度的 ASON 溶液,加入 96 孔细胞培养板。每个浓度均重复 4 孔,并设浓度为零的空白对照组、脂质体-非特异序列的对照组。置 96 孔板于 CO₂ 培养箱 37 培养,19h 后加 MTT 液;加

收稿日期:2001-12-31;修回日期:2002-04-23

基金项目:广东医学院重点学科课题(XZ9402)

作者单位:524023 湛江,广东医学院病理生理学教研室

SDS-DMF 混合液,酶标仪测吸光度 OD 值(检测波长 570 nm,参考波长 655nm),计算细胞相对生长指数 (cell growth index, GI) = (处理组 OD 值均数/空白对照组 OD 值均数) × 100%。GI > 100% 为刺激生长,GI < 100% 为抑制生长。

1.3 端粒酶活性的检测

1.3.1 制备抽提液 消化细胞,调节浓度,接种于培养瓶。选择可抑制细胞生长的反义 PKC 的剂量配制转染液,加入培养瓶转染 19h(设反义 PKC 浓度为 $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的细胞组作空白对照)。参考文献^[3]及试剂盒使用说明书,收集细胞离心,PBS 洗 3 次,裂解缓冲液重悬细胞沉淀,移入 DEPC 处理过的灭菌 Eppendorf 管冰浴 30min。4、14000r·min⁻¹离心 20 min。取部分上清液做考马斯亮蓝蛋白定量分析,绘制校正曲线;其余上清液用于 TRAP 反应。

1.3.2 TRAP 反应 据蛋白定量结果取上清液 5~8 μl 加入反应管,阳性对照为 2 μl 人肾 293 细胞抽提物(试剂盒提供),阴性对照为经 65 10min 水浴灭活的 2 μl 此抽提物;加反应混合物 25 μl ,用 DEPC 处理的灭菌双蒸水补足总体积至 50 μl ,在 PCR 仪上反应如下:延伸 25 10min;灭活 94 5min;变性 94 30s,退火 50 30s,延伸 72 90s,共 30 个循环;72 延伸 10min。

1.3.3 ELISA 法测吸光度 取扩增产物 5 μl ,加变性剂 20 μl ,常温 10min,其余按试剂盒使用说明书操作。加入 TMB 底物后 15min 加终止液终止反应。酶标仪测各孔吸光度 OD 值(检测波长 450nm,参考波长 690nm),OD 值的大小代表端粒酶活性的高低。

1.4 统计学处理 采用方差分析和 *t* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 反义 PKC 对 CNE-2Z 生长的影响 用脂质体转染 ASON 后,细胞生长指数随反义 PKC 的增加而逐渐降低,非特异 ASON 对细胞生长未见明显抑制作用,结果见表 1。

表 1 ASON 对 CNE-2Z 细胞 GI 的影响(%, $\bar{x} \pm s, n=4$)

剂量 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	反义 PKC 组	非特异 ASON 组
(1) 0.0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
(2) 4.0	98.92 \pm 3.03	99.24 \pm 2.12
(3) 8.0	79.97 \pm 6.97 **	97.71 \pm 5.95
(4) 16.0	64.21 \pm 8.45 **	95.56 \pm 3.05
(5) 32.0	53.34 \pm 4.26 **	93.98 \pm 1.86
(6) 64.0	54.71 \pm 6.80 **	90.84 \pm 3.27 ##

** $P < 0.01$ vs (1); ## $P < 0.01$ vs (1)

2.2 反义 PKC 对 CNE-2Z 端粒酶活性的影响

用 TRAP-ELISA 法检测发现 CNE-2Z 端粒酶活性为阳性,使用抑制细胞生长的反义 PKC 剂量 ($16.0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 转染细胞后,处理组 OD 值降低 ($P < 0.05$),表明反义 PKC 抑制了 CNE-2Z 的端粒酶活性,见表 2。

表 2 反义 PKC 对 CNE-2Z 细胞端粒酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

分组	OD 值
(1) 空白对照组	1.506 \pm 0.393
(2) 反义 PKC 组	0.855 \pm 0.247

* $P < 0.05$ vs (1)

3 讨论

用脂质体转染特异的 ASON 高选择性封闭细胞特异基因的表达,有助于了解亚型的功能。Dean 用脂质体转染 ASON 的研究表明反义 PKC 可抑制人膀胱癌等瘤细胞的生长^[6],但反义 PKC 能否抑制 CNE-2Z 的生长则未见报道。本研究发现转染反义 PKC 同样可以抑制 CNE-2Z 的生长,提示 PKC 参与了鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的生长调控,这也进一步证实 PKC() 在 CNE-2Z 的生长中起着重要作用^[1,2]。

端粒酶是一种特殊的逆转录酶,在正常组织较少表达阳性,而在永生细胞及肿瘤组织常异常活化,被认为与细胞永生及肿瘤发生发展密切相关^[3]。文献曾报道 CNE-2Z 细胞的端粒酶活性为阳性^[8],本研究结果也与此相符。已发现 NPC-076 细胞的端粒酶受 PKC 调控而与 PKC 无关^[4],但在 CNE-2Z 则未见有关报道。本研究结果显示经反义 PKC 转染后,细胞端粒酶活性降低,提示 CNE-2Z 的端粒酶活性在一定程度上受 PKC 调控,活化的端粒酶在维持人低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 的恶性生长中可能起着重要作用。CNE-2Z 这种不同于 NPC-076 的特性或许与来源不同的细胞株生物学特性不同有关。而 CNE-2Z 的端粒酶活性与 PKC 关系如何尚待研究核实。

有关研究表明 PKC() 可能通过直接或间接作用调控端粒酶,例如 PKC 可通过磷酸化作用激活细胞端粒酶等^[9]。而 PKC 如何调控 CNE-2Z 的端粒酶活性还有待进一步研究。

综上所述,在鼻咽癌 CNE-2Z 细胞,反义 PKC 可以抑制细胞端粒酶活性,提示 PKC 可能通过调控端粒酶影响 CNE-2Z 的生长。这一结果对反义 PKC 的进一步临床研究无疑是一个重要的实验依据。

参考文献:

- [1] 陈南岳,赵明伦,鲍波. 蛋白激酶 C 亚型在鼻咽癌细胞中的分布及在增殖中的作用[J]. 中国病理生理杂志,1994,10 (6):566-570.
- [2] 陈南岳,鲍波,赵明伦. 蛋白激酶 C 在鼻咽癌细胞生长中的作用

[J]. 广东医学院学报,1995,13 (2) :93-96.

[3] KimNW,Piat yszekMA,ProwseKR,etal.S pecificassociationof humantelomeraseactivit ywithimmortalcellsandcancer[J].Science,1994,266 (5193) :2011-2015.

[4] YuCC,LoSC,Wan gTC.Telomeraseisre gulatedb y proteinkinase C inhumannaso pharyngealcancercells[J].Biochem.J,2001,355 (2) :459-464.

[5] KuWC,Chen gAJ,Wan gTC.Inhibitionoftelomeraseactivit yb yPKC inhibitorsinhumannaso pharyngealcancercellsinculture[J].Biochem - Biophys Res Commun,1997,241 (3) :730-736.

[6] DeanN,McKa yR,Mira glialL,etal.Inhibitionof growthofhumantu - morcellinesinnudemiceb yantisansenseoli gonucleotideInhibitorof proteinkinaseC - expression[J].CancerRes,1996,56 (15) :3499-3507.

[7] 郑永唐,袁昆龙.测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J].免疫学杂志,1992,8 (4) :266-269.

[8] 陈小君,陈巧伦,黄奕俊,等.鼻咽癌组织端粒酶活性的研究[J].癌症,1998,17 (5) :328-330.

[9] LiH,ZhaoL,Yan gZ,etal.Telomeraseiscontrolledb y proteinkinaseC alphainhumanbreastcancercells[J].J - Biot Chem,1998,273 (50) :3343-33442.

(刘红武校对)

肺癌患者血清 CEA、CA125 水平分析及其临床意义

郭大文,孟冬娅,于笑难,高洪福,薛文成,罗军,胡晓芳

关键词:肺癌;癌抗原 125;癌胚抗原
中图分类号:R734.2 文献标识码:D
文章编号:1000-8578(2002)04-0275-01

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,迄今仍缺乏有效的评价肺癌诊断及疗效的血清学指标。我们联合检测了 CA125 和 CEA 的血清水平,并对其在肺癌诊治中的意义进行探讨。

1 材料和方法

1.1 研究对象 分为两组,肺癌组:101 例(原发性肺癌 98 例,肺转移癌 3 例)均为我院接受放、化疗的住院患者,其中男 67 例,女 34 例,平均年龄 62.6 ±11.2 岁。对照组:40 例肺良性疾病患者,其中男 24 例,女 16 例,平均年龄 60.0 ±8.4 岁。

1.2 CA125、CEA 测定 采用 AXSYM 微粒子酶免疫分析(MEIA)系统(美国,Abbott)。

1.3 统计学分析 本组资料数据呈正偏态分布,故所有数据取对数 lg(A+1) 后再做统计学分析。用成组资料 *t* 检验,两个或多个率的卡方检验。

2 结果

2.1 CEA、CA125 血清水平及阳性率 按本室自行建立的临界值,CA125 水平高于 35U/ml 为阳性,CEA 水平高于 10ng/ml 为阳性。结果表明,肺癌组 CA125、CEA 水平

(1.156 ±0.635,0.907 ±0.653)均高于肺良性疾病对照组(1.035 ±0.263,0.620 ±0.281),差异有非常显著意义(*t* =5.053, *P* <0.01 和 *t* =2.677, *P* <0.01);肺癌组 CA125 的阳性率明显高于 CEA,差异有非常显著意义(χ^2 =9.352, *P* <0.01);腺癌、小细胞肺癌的 CA125 和 CEA 的阳性率明显高于鳞癌(χ^2 =16.454, *P* <0.01 和 χ^2 =15.438, *P* <0.01);腺癌、小细胞肺癌的 CA125 和 CEA 的血清水平也比鳞癌高(*t* =4.824, *P* <0.01 和 *t* =4.679, *P* <0.01)。CEA、CA125 联合检测肺癌的阳性率为 54.5%。

2.2 CEA、CA125 与疗效 放、化疗疗效按 WHO 对实体瘤的近期疗效评价标准,分为缓解组和无效组。按 CEA/CA125 共表达、单一表达和双阴性表达各组比较,缓解率差异无显著意义(χ^2 =0.203, *P* >0.05)。对 30 例 CA125 阳性的肺癌患者随访 1 年。CA125 下降的 15 例中缓解 11 例(73.3%),无效 4 例(26.7%),而升高的 15 例中缓解 5 例(33.3%),无效 10 例(66.7%)。

2.3 CA125、CEA 对肺癌的敏感性、特异性 CA125 的灵敏度为 47.5%,特异性为 82.5%,有效性为 65.6%;而 CEA 分别为 26.7%,47.2%和 50.8%。

3 讨论

人体细胞向恶性转化过程中,细胞表面糖蛋白和脂类发生某些异常改变,表现出肿瘤细胞的抗原性,利用单克隆抗体可检出这些肿瘤相关抗原,可作为肿瘤标志物。迄今尚未发现肺癌的特异性标志物。CEA 作为广谱的肿瘤标志物,由于其低特异性和低灵敏度,在临床应用中有很大局限性。CA125 是重要的卵巢癌相关抗原,主要用于恶性卵巢癌的辅助诊断及疗效观察。后来发现,CA125 水平升高也可见于非卵巢癌的恶性疾病中。

本文结果显示,肺癌患者 CEA 和 CA125 阳性率明显高于良性肺疾患组(*P* <0.01),二者联合检测的阳性率为 54.5%,提示 CEA 和 CA125 联合检测可提高肺癌诊断率。肺癌组 CA125 的阳性率高于 CEA (*P* <0.01),表明 CA125 诊断肺癌的敏感性优于 CEA。CA125、CEA 在腺癌中的阳性率和表达水平高于鳞癌(*P* <0.01),表明 CEA 和 CA125 的表达与肺癌的病理分型相关,二者在腺癌中均为优势表达。治疗前 CEA/CA125 表达模式与缓解率无关,即仅考虑 CEA 和 CA125 的阳性与否不能预见疗效的好坏。随访发现,CA125 下降者中 73.3% 缓解,而 CA125 升高者中 66.7% 无效。因而 CA125 对于监测病情、评价疗效具有重要参考价值。CA125 对肺癌的阳性预测值和阴性预测值分别为 70.7% 和 64.9%,敏感性、特异性和总有效性均优于 CEA,因而 CA125 可作为肺癌的标志物用于肺癌尤其是腺癌的辅助诊断、疗效监测和预后评价。

(刘红武校对)

收稿日期:2001-06-18;修回日期:2002-03-27
作者单位:110015 沈阳军区总医院检验科