

醋酸棉酚对人舌鳞癌 Tca8113 细胞 hMLH1 蛋白及 mRNA 表达的影响

陈文飞, 付 帅, 岳万远, 吴 勇

(昆明医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 研究醋酸棉酚 (gossypol acetic acid, GAA) 对人舌鳞癌 Tca8113 细胞 hMLH1 蛋白及 mRNA 表达的影响, 探讨 GAA 的抗肿瘤作用机制. **方法** (1) 应用 Western-blot 法检测 Tca8113 细胞在 GAA 作用 48 h 后 hMLH1 基因的蛋白表达变化; (2) 应用实时荧光定量 (RFQ-PCR) 法检测 Tca8113 细胞在 GAA 作用 48 h 后 hMLH1 基因 mRNA 的表达变化. **结果** (1) Western-blot 检测显示: 分别用终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 的 GAA 作用人舌鳞癌 Tca8113 细胞 48 h 后, hMLH1 基因的蛋白表达比对照组明显增高 ($P < 0.05$); (2) RFQ-PCR 检测显示: 以终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 的 GAA 作用于 Tca8113 细胞 48 h 后 hMLH1 基因的 mRNA 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$). **结论** 一定浓度的 GAA 能够使人舌鳞癌 Tca8113 细胞系 hMLH1 基因蛋白及 mRNA 表达上调, 这可能是 GAA 抗肿瘤作用机制之一.

[关键词] 舌癌; Tca8113; 醋酸棉酚; hMLH1

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 01-0008-04

Effects of Gossypol Acetic Acid on Protein and mRNA Expressions of hMLH1 Gene in Human Tongue Carcinoma Cell Line Tca8113

CHEN Wen-fei, FU Shuai, YUE Wan-yuan, WU Yong

(Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to investigate the effects of gossypol acetic acid (GAA) on protein and mRNA expressions of hMLH1 gene in human tongue carcinoma cell line Tca8113 in vitro in order to discuss the mechanism of tumor suppression of GAA. **Methods** (1) Western-blot was used to study the effects of GAA on protein expressions of hMLH1 gene in Tca8113 cell line treated by different concentrations of GAA for 48 h. (2) Real-time fluorescence quantitative PCR (RFQ-PCR) was used to investigate the effects on the mRNA expressions of hMLH1 gene in Tca8113 cell line treated by GAA for 48 h. **Results** (1) Compared with the control group, the results of Western-blot showed that the protein expression of hMLH1 gene was increased after treatment by GAA for 48 h ($P < 0.05$). (2) The results of RFQ-PCR indicated that the mRNA expression of hMLH1 gene was increased after GAA treatment for 48 h ($P < 0.05$). **Conclusion** GAA could up-regulate protein and mRNA expression of hMLH1 in Tca8113 cell line, which indicated that it may be one of the mechanisms of tumor suppression effect of GAA.

[Key words] Tongue neoplasms; Tca8113; Gossypol acetic acid; hMLH1

棉酚 (Gossypol) 是从棉籽油里提取的一种成分, 过去曾作为一种男性避孕药应用于临床. 目前有学者研究^[1-3], 棉酚对多种肿瘤细胞均有明显

的抗肿瘤作用, 如前列腺癌、白血病、乳腺癌和结肠癌等. Wolter 等^[4]通过建立头颈部鳞癌的裸鼠模型, 结果显示应用棉酚组的肿瘤体积明显小于对

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81160326); 云南省科技计划项目 (2009CD207)

[作者简介] 陈文飞 (1985~), 女, 云南宣威市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事口腔颌面外科临床及研究工作.

[通讯作者] 吴勇. E-mail: wy72205@gmail.com

对照组. hMLH1 基因是一种 DNA 错配修复基因, 其编码的蛋白是细胞内错配修复系统的重要组成部分, 能够纠正 DNA 复制过程中出现的异常碱基插入、缺失及错配, 增强 DNA 复制准确性, 维持基因组稳定性, 降低自发性突变的功能. 它的突变或表达降低会增加受损伤细胞中 DNA 的突变频率, 并可导致一些肿瘤的发生. 本课题已有研究结果表明: 棉酚能抑制人舌鳞癌 Tca8113 细胞的生长并诱导细胞凋亡^[5]. 本实验应用棉酚最常用的药用形式醋酸棉酚 (gossypol acetic acid, GAA) 作用于人舌鳞癌 Tca8113 细胞, 观察 GAA 对 Tca8113 细胞 hMLH1 的蛋白表达及 mRNA 表达水平的影响, 初步探讨棉酚对舌癌细胞作用的机制.

1 材料与方 法

1.1 主要材料

人舌鳞癌 Tca8113 细胞株由昆明医科大学何永文教授课题组惠赠. 醋酸棉酚 (相对分子质量为 578.61, 纯度 95%) 购自美国 Sigma 公司. RPMI 1640 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; DAPI、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术公司; A/G agarose beads 和 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司; TRIzol 试剂和 SYBR Green PCR Master Mix 购自日本 Takara 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Tca8113 细胞用含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3 d 传代 1 次.

1.2.2 Western-blot 检测 GAA 对 Tca8113 细胞 hMLH1 蛋白表达的影响 (1) 细胞总蛋白的提取 取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 个/mL, 接种于三块 96 孔培养板, 每孔加入细胞混悬液 100 μ L, 每组分别设 3 个平行复孔. 置于培养箱中培养 12 h 后, 至细胞单层铺满孔底, 吸弃孔内旧培养基, 分别加入含 GAA (终浓度为 0, 5, 10, 15 μ mol/L) 的 10% 的 RPMI 1640 培养液 100 μ L (对照组为含 0.5% DMSO 的 RPMI 1640 培养液细胞组). 培养 48 h 后取出 96 孔板, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 液漂洗细胞 2 次, 加入现配的 100 μ L IP 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 用细胞刮将细胞碎片及液体刮到一侧, 并将该液体转移至 1.5 mL EP 管中. 13 000 r/min 离心 10 min, 留取上清液, 99 °C 变性 8 min 后分装多管 -70 °C 保存待用; (2) 电泳进行 14.7% 分离胶溶液和 5%

浓缩胶溶液的制备和灌注. 每个蛋白样品取 1×10^{-5} L, 加入 3×10^{-6} L 6 \times SDS 样品缓冲液, 2×10^{-6} L β -巯基乙醇, 总量为 1.5×10^{-5} L, 混和后 100 °C 煮沸 5 min. 加样、电泳分离蛋白, 然后转到适当大小的 PVDF 膜. 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入相应的一抗 (hMLH1, 以 β -actin 作内参照) 1:1 000 稀释, 4 °C 与 PVDF 膜共同孵育过夜. 过夜后取出膜, 用冷 PBS 洗涤 5 次, 加入相应二抗为羊抗兔 IgG-HRP:1:1 000 稀释, 37 °C 孵育 1 h. 用冷 PBS 洗膜 5 次; (3) 显影和分析 按试剂盒说明操作, 取出 X 胶片并显影定影. 实验所得 Western-Blot 条带, 用 Adobe Photoshop CS4 分析系统读取条带的灰度扫描值, 将 hMLH1 蛋白条带与内参蛋白 β -actin 条带的灰度扫描值比值作为 hMLH1 蛋白的表达相对水平. 相对灰度比值越大说明蛋白表达升高, 比值越小说明蛋白表达越低.

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 GAA 对 Tca8113 细胞 hMLH1 基因 mRNA 表达的影响 取对数生长期的 Tca8113 细胞, 调整细胞密度为 $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 个/mL, 接种于 3 块 96 孔培养板中, 100 μ L/孔, 细胞培养 12 h 后吸弃孔内培养液, 分别加入含终浓度为 0、5、10、和 15 μ mol/L GAA 和 10% RPMI 1640 培养液 (100 μ L/孔), 对照组加入含 0.5% DMSO 的 RPMI 1640 培养液, 每组分别设 3 个重复孔; 收集培养 48 h 后的细胞, TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA, 按反转录试剂盒说明书提供的方法将其进行反转录. 以此反转录产物为模板, 加入 SYBR Green PCR Master Mix, 在 7900HT qPCR system thermal cycler 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应及荧光信号检测. 引物由南京钟鼎生物有限公司设计合成, hMLH1 上游引物序列为 5'-TGTTCTCAGGTTATCGGAGC-3', 下游引物序列为 5'-CATCAATTTCCAAAGAGAAATAGTCT-3'; GAPDH (内参照) 上游引物序列为 5'-GCCGGTGCTGAGTATGTC-3', 下游引物序列为 5'-CTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'. PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 35 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 35 s, 共 44 个循环; 72 °C 复性 8 min. 熔解曲线从 70 °C ~ 90 °C, 每 0.3 °C 读取荧光信号 1 次, 持续 0.1 s. 取 hMLH1 及 GAPDH 的平均 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 hMLH1 mRNA 表达的差异倍数, $2^{-\Delta\Delta Ct} = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}} = (Ct_{\text{实验组 hMLH1}} - Ct_{\text{实验组 GAPDH}}) - (Ct_{\text{对照组 hMLH1}} - Ct_{\text{对照组 GAPDH}})$. $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 表示目的基因表达上调, $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ 表示目的基因表达下调. 实验重复 3 次.

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件包对数据进行处理。计量数据以表示。多个样本数据间的比较进行 One-Way ANOVA 分析, 利用 Games-Howell 法进行两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GAA 作用后 Tca8113 细胞 hMLH1 蛋白表达增高

经 Western-blot 检测, 与对照组比较, GAA 作用 Tca8113 细胞 48 h 后, 5、10、15 mol/L GAA 组 hMLH1 蛋白表达均增高 (图 1)。将 hMLH1/ β -actin 蛋白表达相对灰度比值进行统计分析表明, 各实验组与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见表 1。

2.2 GAA 作用后 Tca8113 细胞 hMLH1 mRNA 的表达水平上调

经 RFQ-PCR 检测计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 数值显示: 与对照组相比, GAA 作用 Tca8113 细胞 48 h 后, 5、10、15 μ mol/L 组 Tca8113 细胞的 hMLH1 mRNA 表

达水平均上调, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见表 2。

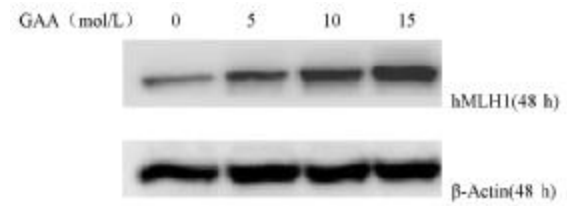


图 1 不同浓度的 GAA 作用 48 h 后 hMLH1 蛋白表达
Fig. 1 The protein expression of hMLH1 gene treated by different concentrations of GAA for 48 h

表 1 不同浓度的 GAA 作用 48 h 后各组细胞 hMLH1/ β -actin 蛋白表达相对灰度比值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The ratio of hMLH1/ β -actin protein expression in Tca8113 cells treated by different concentrations of GAA for 48 h ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hMLH1/ β -actin
对照组	3	0.62 \pm 0.19
5 μ mol/L 组	3	0.82 \pm 0.28 $^{\Delta}$
10 μ mol/L 组	3	0.86 \pm 0.13 $^{\Delta}$
15 μ mol/L 组	3	0.88 \pm 0.10 $^{\Delta}$

与对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度 GAA 作用 48 h 后各组细胞 hMLH1 基因相对表达 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value of hMLH1 mRNA expression in Tca8113 cells treated by different concentrations of GAA for 48 h ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hMLH1 Ct 值	GAPDH Ct 值	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
对照组	3	23.27 \pm 0.34	16.19 \pm 0.19	1
5 μ mol/L	3	23.09 \pm 0.33	16.65 \pm 0.35	1.55 \pm 0.01 $^{\Delta}$
10 μ mol/L	3	22.62 \pm 0.32	16.26 \pm 0.46	1.64 \pm 0.04 $^{\Delta}$
15 μ mol/L	3	21.75 \pm 0.26	16.86 \pm 0.20	4.56 \pm 0.02 $^{\Delta\Delta}$

与对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 5 μ mol/LGAA 比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来, 棉酚的抗肿瘤作用日益受到人们的重视, 其对肿瘤细胞的显著杀伤作用主要集中在生殖系统肿瘤, 对其他系统的肿瘤如结肠癌、肝癌、喉癌、肺癌、头颈部肿瘤及胶质瘤等也有不同程度的抗肿瘤活性^[6-8]。目前已有研究证实^[9], 棉酚可通过直接损伤线粒体抑制细胞能量代谢、下调细胞周期调节蛋白的表达、抑制蛋白激酶 C 的活性、抑制端粒酶的活性、干预信号传导通路以及抑制 Bcl-2 蛋白的过度表达等途径来抑制肿瘤细胞的生长和诱导肿瘤细胞的凋亡, 从而达到抗肿瘤的效果。笔者课题已有的实验结果表明^[9]: GAA 可以抑制人舌鳞癌 Tca8113 细胞的生长, 诱导其凋亡, 且在一定剂

量范围内具有浓度及时间依赖性。本研究将 hMLH1 作为目的基因, 检测 GAA 作用前后 hMLH1 蛋白表达以及基因 mRNA 表达水平的变化, 初步探讨 GAA 可能的抗肿瘤作用机制。

hMLH1 基因是一种 DNA 错配修复基因, 其编码的蛋白是细胞内错配修复系统的重要组成部分, 能够纠正 DNA 复制过程中出现的异常碱基插入、缺失及错配, 增强 DNA 复制准确性, 维持基因组稳定性, 降低自发性突变的功能。它的突变或表达降低会增加受损伤细胞中 DNA 的突变频率, 并可导致一些肿瘤的发生。有文献报道^[10-12]认为 hMLH1 蛋白在癌组织中的表达下调或缺失, hMLH1 基因在高甲基化的恶性肿瘤中处于低表达状态。Strathdee^[13]等研究也发现, 90% 顺铂耐药细

胞株无 hMLH1 蛋白表达。

本实验以 Western-blot 检测 GAA 作用后 hMLH1 基因的蛋白水平变化, 结果显示经 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 48 h 后, 各实验组细胞 hMLH1 蛋白表达均较对照组均增高。对 hMLH1、 β -actin 蛋白表达相对灰度比值进行统计分析表明, 各实验组与对照组比较均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 GAA 作用后能上调 hMLH1 蛋白的表达。笔者还通过 RFQ-PCR 法检测 GAA 作用 48 h 后 hMLH1 基因 mRNA 的表达水平的变化。结果表明: 实验组 hMLH1 的 mRNA 相对表达量与对照组相比均上调, 差异亦具有统计学意义 ($P < 0.05$)。由于 hMLH1 基因表达降低与肿瘤的发生发展关系密切, 因此, 可推测 hMLH1 基因可以作为 GAA 抗肿瘤治疗的一个潜在靶点。

有研究报道, 棉酚对肿瘤细胞作用具有特异性, 而对正常细胞的毒性很小。Wolter 研究中^[4]除肿瘤细胞组外, 还设了正常口腔角化细胞组。结果表明: 正常口腔角化细胞对棉酚作用不敏感, 肿瘤细胞组 IC_{50} 值仅为 4 μM , 而正常口腔角化细胞 IC_{50} 值为 12.5 μM 。Oliver 的研究中^[1]设了正常成纤维细胞组和口腔角化细胞组。结果表明: 正常成纤维细胞组 IC_{50} 值是肿瘤细胞组的 2~10 倍, 口腔角化细胞组 IC_{50} 值是肿瘤细胞组的 2~3 倍。证明棉酚抗肿瘤作用的相对特异性, 对正常细胞的毒性较小。也有研究报道棉酚的副作用较小, 具有应用安全性高、毒性小等特点, 过去在用于节育用途长期服用时, 发现其副作用主要表现为低钾血症、个别治疗人群睾丸生精上皮的严重损伤等, 但发生率仅为 1% 左右^[4]。而且长期口服治疗剂量的棉酚不会引起骨髓抑制^[15]。另有报道棉酚可引起谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的升高, 但对肾脏、心脏、血细胞无明显影响^[6]。

本研究结果表明, 一定浓度的 GAA 能够使人舌鳞癌 Tca8113 细胞 hMLH1 蛋白表达增高, 同时能上调 mRNA 表达水平, 这可能是 GAA 抗肿瘤作用的机制之一。本课题对 GAA 其他相关抑癌基因的蛋白及 mRNA 表达水平影响的研究结果将陆续报道发表。笔者推测棉酚可能成为一种新型抗肿瘤药物, 其抗肿瘤作用机制仍需要进一步研究。

[参考文献]

[1] OLIVER C L, BAUER J A, WOLTER K G. In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(22):7 757 - 7 763.

[2] ZHANG M, LIU H, GUO R. Molecular mechanism of gos-

sypol-induced cell growth inhibition and cell death of HT-29 human colon carcinoma cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66(1):93 - 103.

[3] ZHANG M, LIU H, TIAN Z, et al. Gossypol induces apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by modulating caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways [J]. *Life Sci*, 2007, 80(8):767 - 774.

[4] WOLTER K G, WANG S J, HENSON B S, et al. (-)-gossypol inhibits growth and promotes apoptosis of human head and neck squamous cell carcinoma in vivo [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(3):163 - 172.

[5] 付帅, 彭庆芳, 陈文飞, 等. 醋酸棉酚对人舌鳞癌 Tca8113 细胞增殖的影响 [J]. *口腔医学研究*, 2013, 29(3):283 - 286.

[6] BALAKRISHNAN K, BURGER J A, WIERDA W G. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance [J]. *Blood*, 2009, 113(1):149 - 153.

[7] BALAKRISHNAN K, WIERDA W G, KEATING M J. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Blood*, 2008, 112(5):1 971 - 1 980.

[8] ALIBAZONERLI F, YURDAKUL S, ONER E. Evaluation of the effect of L-thyroxin therapy on endothelial functions in patients with subclinical hypothyroidism [J]. *Endocrine*, 2011, 40(2):280 - 284.

[9] KO C H, SHEN S C, YANG L Y. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(8):1 670 - 1 679.

[10] 度新兰, 白明. 错配修复基因 hMLH1, hMSH2 及 PCNA 在肺癌组织中的表达及意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31(7):390 - 392.

[11] 史恩溢, 杨雄华, 谭云山. 散发性结直肠癌中 hMLH1 及 hMSH2 基因与 p53, PCNA 表达关系的研究 [J]. *中国临床医学*, 2005, 12(3):475 - 477.

[12] DENG G, PENG E, GUM J. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer [J]. *British Journal of Cancer*, 2002, 86(4):574 - 579.

[13] STRATHDEE G, MACKEAN M, ILLAND M. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 1999, 18(14):2 335.

[14] SHELEY M D, HARTLEY L, FISH R G, et al. Stereospecific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines [J]. *Cancer Letters*, 1999, 135(2):171 - 180.

[15] OLIVER C L, MIRANDA M B, SHANGARY S, et al. Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl2 and BclX (L) mediated apoptosis resistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(1):23 - 31.

[16] KIADA S, KTRSS C L, KRAJEWSKA M, et al. Bcl-2 antagonist apogossypol (NSC736630) displays single-agent activity in Bcl-2 transgenic mice and has superior efficacy with less toxicity compared with gossypol (NSC19048) [J]. *Blood*, 2008, 111(6):3 211 - 3 219.

(2013 - 12 - 17 收稿)