

GAP-43 对脊髓全横断损伤后的运动功能的影响

段艳萍¹⁾, 施志甜²⁾, 董俊杰²⁾, 侯定均²⁾, 谢剑喻²⁾, 战雅¹⁾

(1) 昆明医学院组胚教研室; 2) 昆明医学院 2005 级学生, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 通过制备完全性脊髓损伤成年 SD 大鼠模型, 观察脊髓全横断损伤后运动功能和断端脊髓的病理学改变, 探讨生长相关蛋白 GPA-43 对脊髓损伤后的修复作用, 为临床治疗提供实验依据. **方法** 咬除 T₇~T₈ 棘突及相应椎板, 用剪刀将脊髓完全横断, 制成脊髓损伤模型. 雌性 8 周龄 SD 大鼠 75 只, 随机分为三组: GPA-43 抗体组, GPA-43 抗原组, 对照组, 每组 25 只. 使用直接注射法将 GPA-43 抗原和 GPA-43 多克隆抗体分别注入抗原组和抗体组大鼠脊髓的断端, 观察各组大鼠的肢体功能恢复情况. 用 BBB 评分法评价不同的时段运动功能, HE 染色病理学检查脊髓组织形态学变化. **结果** 三组在运动功能上相比均具有显著差异, 对照组在不同时间运动功能评分最低, 抗原组评分最高, 脊髓损伤区出现明显的病理改变; 抗体组早期恢复出现明显的停滞状态, 但随后能很快恢复, 说明多克隆抗体对神经组织不产生不可逆改变. **结论** GAP-43 对脊髓损伤的恢复有一定的疗效.

[关键词] 脊髓损伤; GAP-43; 运动功能测试

[中图分类号] R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0039-04

Behavioral Score of GAP-43 in Rat Acute Complete Spinal Cord Injury

DUAN Yan - Ping¹⁾, SHI Zhi - Tian²⁾, DONG Jun - Jie²⁾, HOU Ding - Jun²⁾,
XIE Jian - Yu²⁾, ZHAN Ya¹⁾

(1) Dept.of Histology and Embryology, Kunming Medical College; 2) Junior Students, Dept.of Anatomy, Kunming 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study the behavioral changes of the spinal cord injury model to provide important data for neuroal factor therapy of the impaired spinal cord. **Methods** In SD rat, aged 8 weeks, (T₇~T₈ spinous processes as control), after the spinous process and corresponding lamina of vertebra were removed, the spinal cord was cut by using scissors to prepare the complete transversal abruptly spinal model. The behavioral score of the rat was recorded at different time. The evaluation was made in imageology and pathology. **Results** The score of SD rat in the experiment group was higher than the control group at different control time. The pathobiology and imageology alterations were very apparent in the damaged spinal area. **Conclusion** GAP-43 has neuroprotective effect on the recovery of spinal cord injury.

[Key words] Spinal cord injury; GAP-43; Behavioral score

[基金项目] 云南省教育厅青年教师科研基金项目 (13000035); 昆明医学院本科生科研立项基金

[作者简介] 段艳萍 (1971~), 女, 云南永平县人, 医学学士, 实验师, 主要从事组织胚胎学研究.

[通讯作者] 战雅. E-mail:wjckm609@163.com

当前因交通等事故造成的脊髓损伤日愈增多,有相当一部分人因脊髓损伤导致损伤部位以下的运动和感觉功能丧失,严重的影响着人类的生存质量.因此脊髓的损伤与修复成为当今医学科研工作者,共同探讨的热点课题.本研究旨在探讨GPA-43治疗大鼠全横断脊髓损伤后的运动功能和病理学改变,为临床治疗提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 大鼠脊髓全横断损伤模型复制

用水合氯醛配置成浓度为4%的麻醉剂20 mg/kg腹腔内注射麻醉.背部剪毛,常规消毒,按棘突确定椎体序数,取后正中切口长约2 cm逐层切开,钝性分离肌肉,暴露椎板,咬除T₇~T₈棘突及相应椎板并打开椎管,暴露脊髓,用弯镊挑起T₇~T₈间隙脊髓然后剪断,用剪刀可触及到椎体,造成SD大鼠脊髓全横断.此时大鼠下肢及尾部肌张力完全消失,同时足弓反张.3 cm长的PE-聚乙烯硬膜外麻醉导管插入脊髓的断端,逐层缝合肌层及皮肤时注意对其固定以防滑出,管末端暴露于皮肤外约0.5 cm.

1.2 实验动物分组与给药

健康8周龄雌性SD大鼠,体重180~200 g,购买于昆明医学院动物研究所.75只随机分为3组:抗体组、抗原组、对照组,每组25只.抗体组脊髓断端用直接注射法注入GPA-43多克隆抗体5 μg/次;抗原组脊髓断端用直接注射法注入GPA-43抗原5 μg/次,两组均2次/d连续3 d,后1次/d连续3天;对照组仅把脊髓全横断,不埋管也不注入任何试剂.抗原、抗体均购自北京博奥生物公司.

1.3 术后护理

脊髓横断是一种严重的创伤,术后大鼠下肢瘫痪,行动不便,所以不能当靠其独立进食,所以要进行1 d 3次定时定量的人工喂养,当人不再的时候要将水和食物,放在大鼠活动可及的范围,以保证术后大鼠足够的营养,降低其自残率.术后大鼠的饲养环境应定时的通风,保持饲养环境的温度,防止大鼠冻死.实验中术后大鼠都存在大、小便潴留的情况,所以要用人工的方法来帮助大鼠排尿、排便.为预防和控制感染每天注射

青霉素1万U/只,2次/d,连续1周.

1.4 病理组织学观察

HE染色病理组织学检查脊髓组织;分别在手术3、5、9、15 d用水合氯醛配置成浓度为4%的麻醉剂20 mg/kg腹腔内注射麻醉,经左心室灌注生理盐水及内固定液充分冲洗固定后,完整取出距损伤处上下约1 cm的脊髓,再置于10%中性甲醛溶液固定24 h,然后常规石蜡切片制作HE染色.置于光镜下观察损伤区及临近部位脊髓组织结构.

1.5 BBB评分法评价动物运动功能

BBB评分法观察动物的髻、膝、踝关节行走、躯干运动及其协调情况.为保证实验结果的准确性,在观察时采取四人分别观察记录打分的方法,并对其进行了统计学处理.各组大鼠从手术第1天开始连续15 d进行运动功能运动评分.

1.6 统计学方法

运动功能评分以均数±标准差表示,用SPSS统计分析软件对实验数据进行统计分析,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准.

2 结果

2.1 大鼠脊髓全横断损伤后一般情况观察

在术后所有受试鼠均表现为活动较少、饮食少、腹部胀气大便困难伴硬结、尿潴留、双后肢拖行.所有小鼠手术切口均愈合良好,无感染,少数大鼠发生自残.整个实验过程中因各种原因(如麻醉意外、感染、衰竭等)而死亡的小鼠共19只,死亡率为25%.对照组在术后1~2周评分无明显差异,恢复不明显;抗体组术后第2周恢复较快;抗原组的恢复最快、最好.对照组与抗原组、抗体组比较有显著差异($P < 0.05$),而抗原组和抗体组比较也有显著差异($P < 0.05$).说明完全脊髓横断后自我恢复的功能较差,GAP-43具有促进脊髓恢复的功能,而且多克隆抗体对功能恢复的影响是可逆的,见表1.

2.2 大鼠脊髓损伤后不同时间的光镜病理形态学变化

对照组损伤部脊髓病理变化无明显好转;抗原组早期脊髓组织轻度水肿,无明显出血点,神经细胞肿胀不明显,3 d后伤部脊髓病理变化进行

表 1 大鼠脊髓全横断损伤后运动功能 BBB 评分
Tab.1 The behavioral score of the rat was recorded at different time

组 别	观察时间				
	1st d	3rd d	5th d	9th d	15th d
对照组	0 ± 0	0.167 ± 0.104	0.500 ± 0.151	1.500 ± 0.189	2.500 ± 0.333
抗原组	0 ± 0	0.933 ± 0.667*	1.900 ± 0.100*	4.667 ± 0.167*	7.25 ± 0.144*
抗体组	0 ± 0	0 ± 0	0.982 ± 0.174	2.851 ± 0.202*	5.500 ± 0.252*

与相同时间对照组比较, * $P < 0.05$.

性好转, 后期神经元、轴突改变亦较轻微, 胶质细胞增生明显, 2 周后灰白质界限清晰、细胞分布均匀、纤维排列有序; 而抗体组早期见脊髓组织中大量出血改变, 整个损伤区脊髓断端灰白质界限不清, 排列紊乱, 细胞变性、坏死、空泡变性, 灰质内神经元普遍肿胀, 卫星现象、噬神经元现象非常显著, 1 周时此现象仍较明显, 但随后迅速好转. 2 周后抗原、抗体组较对照组的水肿减轻, 坏死区范围减小, 病理改变较对照组有所减轻, 提示 GAP-43 可缓解继发性脊髓损伤, 进而发挥神经保护的作用, 而多克隆抗体对神经组织不产生不可逆改变, 见图 1.

3 讨论

脊髓损伤修复历来都是临床上的热点及难点, 近几年来伴随着医疗科学技术的发展, 人们逐渐发现了一些新的对神经损伤起修复作用的因子. 据研究表明 GAP-43 是一种神经系统特异生长相关蛋白, 它广泛存在于神经组织中, 尤其是在生长、分化和再生的轴突末端以及突触前膜含量极高, 它的表达与神经元轴突生长一致. 在发育成熟的中枢神经系统中, 成熟神经元轴突的生长和突触的可塑性处于抑制状态. 当轴突受到损伤后, 轴突的延长和重建可被重新诱导, 诱导与神经轴突向外生长依赖于有关蛋白的合成, 是评估轴突损伤和再生反应的重要指标, 在神经纤维的生长、发育、轴突再生以及突触功能的维持等方面起着重要作用, 并参与神经递质释放的调节, 被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子^[1]. 本实验通过对大鼠脊髓进行全横断模拟了一个脊髓损

伤的模型, 并且在断端注入 GAP-43 抗原、多克隆抗体, 在术后的不同时间点, 对三组受试鼠进行运动能力 BBB 评分, 抗原组、抗体组评分较高、恢复较快, 而对照组评分很低, 在整个观察过程中运动功能变化不大, 恢复不明显. 对照组、抗原组、抗体组的 BBB 评分比较均有显著的差异性 ($P < 0.05$). 该模型在病理学表现为整个损伤区脊髓组织完全横断, 部分组织坏死崩解以及变性坏死. 对照组中伤部脊髓病理变化无明显好转, 抗原、抗体组较对照组的水肿减轻、坏死区范围减小、病理改变有所减轻、恢复较快, 提示 GAP-43 可缓解继发性脊髓损伤, 进而发挥神经保护的作用, 而多克隆抗体阻滞对神经组织不能产生不可逆的改变. 闫丽娟等对多克隆 CNTF 抗体对肉毒毒素引起肌麻痹超微结构的影响中也发现了同样的情况^[2]. 综上所述全横断的脊髓几乎没有自我恢复的能力, GAP-43 具有促进损伤脊髓早期恢复的功能. 本次实验仅从运动功能和病理改变的角度来研究探讨其对中枢神经系统特别是脊髓的损伤与修复, 关于 GAP-43 对脊髓损伤修复的确切机制还有待于进一步的研究. 从 GAP-43 的结构、功能及其与突触的关系上, 深入探讨脊髓损伤的治疗有着十分重要的意义. GAP-43 对神经系统的修复功能不容小视是一种值得探讨的神经修复因子, 临床上若能进一步把 GAP-43 表达增强, 或许能更好的体现出 GAP-43 对神经系统的修复作用, 可为下一步深入探讨脊髓损伤的机理及早期的干预治疗奠定了基础.

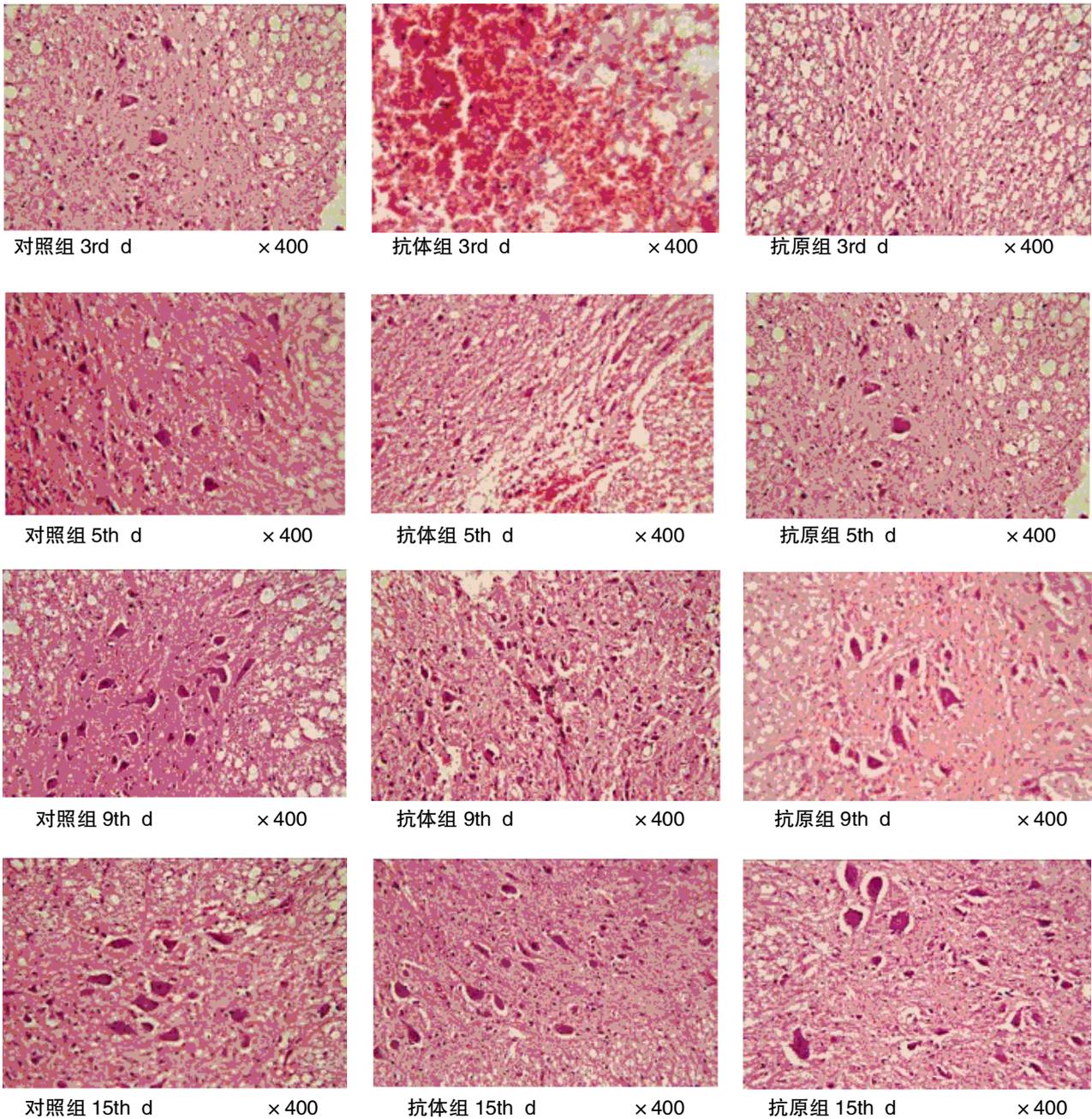


图 1 大鼠脊髓损伤后不同时间的光镜病理形态学变化
 Fig.1 The pathobiology and imageology alterations

[参考文献]

[1] 劳杰, 蒋良福, 顾玉东. 激活态雪旺细胞生长相关蛋白表达的研究 [J]. 中华骨科杂志, 2005(25) 6: 372-374

[2] 闫丽娟, 吴晓, 孙异临, 等多克隆 CNTF 抗体对肉毒毒素引起肌麻痹超微结构的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2006 (27) 6:781-784 (2007-08-28 收稿)

论 著

在鼻咽癌细胞中 EB 病毒 LMP1 调控 G1/S 检测点重要相关蛋白的转录

宋 鑫¹⁾, 李彩霞²⁾, 李永强³⁾, 张建华¹⁾, 刘志敏¹⁾, 隋 军¹⁾

(1) 昆明医学院第三附属医院肿瘤生物治疗中心, 云南昆明 650018;

2) 昆明医学院第一附属医院临床实验中心, 云南昆明 650032; 3) 中山大学肿瘤防治中心实验研究部, 广东广州 510060

[摘要] 目的 在 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞中探讨 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 调控 p16 和 cyclin D1 的转录. 方法 采用 Western blot 方法、荧光素酶报道系统和 RT-PCR 方法检测在 DOX 诱导下不同时间点 p16 和 cyclin D1 的启动子活性和转录. 结果 LMP1 可下调 p16 启动子活性和 mRNA 表达; 同时上调 cyclin D1 启动子活性和 mRNA 表达. 结论 在 Tet-on-HNE2 鼻咽癌细胞中 EB 病毒 LMP1 在转录水平调控 G1/S 检测点重要相关蛋白 p16 和 cyclin D1 的表达.

[关键词] 潜伏膜蛋白 1; p16; cyclin D1; G1/S; 检测点

[中图分类号] R737.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0043-06

EBV LMP Regulating G1/S Checkpoint Significantly-related Protein Transcription in the Tet-on-LMP1 HNE2 Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line

SONG Xin¹⁾, Li Chai-xia²⁾, Li Yong-qiang³⁾, ZHANG Jian-hua¹⁾, Liu Zhi-min¹⁾, SUI Jun¹⁾

(1) The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Tumor Bio-Therapy Center, Kunming 650018; 2) Clinical Experimental Center, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, 650032; 3) Experimental Research Section, Prevention and Treatment Center of Cancer, Sun Yatsen University, Guangzhou, 510060, China)

[Abstract] Objective To investigate on EB encoding latent membrane protein 1 (LMP1) regulating the transcription of p16

[基金项目] 国家自然科学基金 (30760014); 云南省教育厅科学研究基金项目 (06Y108C); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养基金项目 (2006PY01-12); 昆明医学院引进高层次人才科研启动基金项目 (2006); 云南省引进高层次人才政府工作经费资助项目 (60100122); 云南省应用基础研究面上项目 / 云南省科技厅 - 昆明医学院应用基础研究联合专项 (2007C0022R, 2007C0025R); 云南省一类省级肿瘤学重点学科建设项目基金 (子项目); 昆明医学院优先扶持肿瘤学重点学科建设项目基金资助 (子项目); 昆明市科技计划重点项目 (07S060202)

[作者简介] 宋鑫 (1969~), 男, 郑州市人, 副教授, 主要从事肿瘤信号转导和细胞周期、肿瘤分子遗传、肿瘤化疗和肿瘤生物治疗方面的基础和临床研究.

[通讯作者] 隋军. E-mail: suijun28@yahoo.com.cn

and cyclin D1 in the Tet-on-LMP1 HNE2 nasopharyngeal carcinoma cell line. **Methods** p16 and cyclin D1 promoter activity and transcription with DOX induction were detected by western blot assay, luciferase reporter system and RT-PCR at the different timepoint. **Results** LMP1 downregulated p16 promoter activity and mRNA expression and upregulated cyclin D1. **Conclusion** EB LMP1 can regulate G1/S checkpoint significantly-related p16 and cyclin D1 expression at the transcriptional level in the Tet-on-LMP1 HNE2 nasopharyngeal carcinoma cell line.

[Key words] Latent membrane protein 1; p16; Cyclin D1; G1/S; Checkpoint

潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 为 EB 病毒编码的重要癌蛋白, 包括亲水性氨基端胞浆区、6 个不同的疏水性跨膜区和亲水性羧基端胞浆区 3 个不同的结构域, 通过激活相关信号传导通路介导细胞异常增殖, 与鼻咽癌形成密切相关。

我们已初步证实 cyclin D1 在人体鼻咽癌组织异常过表达, 表明可能与鼻咽癌的发病有关^[1]; 在由鼻咽柱状上皮单纯性增生/化生、异型增生/化生和鼻咽癌癌变多阶段过程 cyclin D1 表达呈增高趋势; 其中在异型增生/化生中呈“一过性增高”^[2]。另一方面, 在鼻咽癌中, p16 很少发生点突变^[3], 但多为失活^[4]、缺失^[5]以及启动子甲基化^[6]; 但是, 在 p16 阴性的鼻咽癌细胞系中导入野生型 p16 表达质粒则明显抑制细胞增殖^[7]。上述重要的研究进展为我们研究 EB 病毒 LMP1 对 cyclin D1 和 p16 的调节提供了重要的实验依据。

肿瘤作为一类细胞周期病, G1/S 检测点经常在癌变多阶段, 甚至在癌前阶段就已失调。这一点体现在与 G1/S 调控相关的正性调节因子 cyclin D1 和负性调节因子 p16 等关键基因上, cyclin D1 通过与 CDK4/6 结合成复合物, 激活 CDK4/6 的激酶活性, 通过一系列级联反应促使细胞完成细胞周期^[8]。同时, p16 作为 CDK 的抑制因子, 其编码产物是细胞周期 G1/S 期调控网络中的负性调节因子, 其氨基末端具有与 cyclin D1 编码区同源区域, 可竞争性结合 CDK, 阻止 cyclin D1 过度激活 CDK 以协同调节 CDK 的活性, 从而避免 G1/S 检测点调节紊乱、细胞增殖失常甚至癌变^[9]。

因此, 我们力求进一步验证在 Tet-on-HNE2 鼻咽癌细胞中 EB 病毒 LMP1 调控 G1/S 检测点重要相关蛋白的转录表达, 为外界致病因子 EB 病毒 LMP1 介导转录因子对细胞周期直接的调控机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养条件

Tet-on-HNE2 鼻咽癌细胞系^[10]为湖南医科大学肿瘤研究所馈赠。在该细胞系中, LMP1 能被很好地诱导表达, 随着四环素及衍生物强力霉素 (doxycycline, Dox) 浓度的增加, LMP1 呈现相应的表达增加。该细胞培养液为 15 % 小牛血清的 RPMI 1640, 37 °C, 5 % CO₂, 并维持 200 mg/L G418 和 50 mg/L 潮霉素药物筛选浓度下进行培养。

1.2 细胞总蛋白

取对数生长期的 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞, 用含 0.02 % EDTA 和 0.25 % 胰酶消化, 计数, 105/mL 细胞接种于培养瓶中, 贴壁生长后, 按实验所需分别加入不同浓度 Dox 进行处理。总蛋白的抽提: 细胞经细胞裂解液 (50 mmol/L Tris·Cl pH 7.6400 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 % NP40, 0.5 μg/mL leupeptin, 0.5 μg/mL aprotinin, 0.5 μg/mL pepstatin, 1 mmol/L PMSF) 处理后裂解细胞, 沸水浴中变性 5 min 后, 10 000 r/min 离心, 取上清于 -70 °C 贮存。用 BCA 检测试剂测定蛋白质浓度。

1.3 Western Blot 分析

取各组细胞 50 μg 蛋白在不连续 SDS-PAGE 胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜上, 再相应地加入一抗、二抗, ECL 试剂 (Pierce) 显示蛋白带, X 光片曝光, 显影, 定影。抗体使用如下: LMP1 抗体购自 DAKO 公司 (CS1-4); p16 (sc-759, SC-1037)、cyclin D1 (H-295) 和 α-tubulin 抗体 (sc-5286) 购自 Santa Cruz 公司。

1.4 质粒抽提和瞬间转染

按照质粒抽提试剂盒说明 (QIAGEN, Cat.No. 12163) 抽提质粒; 按照 SuperFect 转染试剂说明 (QIAGEN) 在 6 孔培养板 (Costar) 中进行质粒瞬间

转染; 通过荧光酶试剂盒(Promega, Cat:E4531)分析 LMP1 对 cyclin D1 和 p16 启动子的调节活性; 采用统计软件 SPSS 11.0 one-way ANOVA 对荧光素酶活性检测结果进行单因素方差统计分析; 采用 β -galactosidase 活性检测试剂盒 (Promega, Cat:E2000) 校正转染效率. 有关质粒的使用: cyclin D1 荧光酶报道质粒由 Strauss M 博士惠赠^[11]; p16 启动子荧光酶报道基因质粒由 Peters G 博士惠赠^[12]; β -galactosidase 表达质粒(pRSV β -gal)由 Perkins ND 博士惠赠^[13].

1.5 RT-PCR

按 TRIZOLTM 试剂盒 (Invitrogen 公司) 操作程序提取细胞总 RNA, 取 1.5 μ g 总 RNA 进行 cDNA 合成. 逆转录反应参照 ThermoScript RT-PCR System 说明进行 (QIAGEN 公司). 逆转录引物使用 Oligo (dT) 20, 在 10 μ L 反应体系中, 由 ThermoScript RT 逆转录酶逆转录 mRNA 为 cDNA; 最后加 1 μ L Rnase H, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min. 取 2 μ L cDNA 进行 PCR 扩增. 根据文献^[14,15]合成 p16 引物和 cyclin D1 引物, 用 GAPDH 基因作内对照. p16 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min 变性, 24 个循环 94 $^{\circ}$ C 1min, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 40s; GAPDH PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 1min 变性, 20 个循环 94 $^{\circ}$ C 1m, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s; cyclin D1 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 4m 变性, 35 个循环 94 $^{\circ}$ C 60s, 65 $^{\circ}$ C 90s, 72 $^{\circ}$ C 90s. p16 antisense, 5'-CTG CCC ATC ATC ATG ACC TGG-3'; GAPDH antisense, 5'-TGA GGC TGT TGT CAT ACT TCT C-3'; cyclin D1 antisense, 5'-GGA TGC TGG AGG TCT GCG AGG AAC-3' 各取 10 μ L 分别于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 μ g/ml 溴化乙锭染色, 照相.

2 结果

2.1 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞 EB 病毒 LMP1 的时间和剂量效应

首先利用 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 加入不同浓度的 Dox(0, 0.006, 0.06, 0.6, 6.0 μ g/mL) 诱导 LMP1 表达, Western Blot 结果表明 LMP1 表达在 0.6 μ g/mL 剂量诱导下达到高峰; 6 μ g/mL 剂量诱导下 LMP1 表达维持在几乎同样水平 (图 1), 因此, 我们采用 0.6 μ g/mL 的 DOX 诱导剂量, 检测

不同时间的 LMP1 表达水平. 结果表明, 随着 DOX 诱导时间的延长, EB 病毒 LMP1 蛋白表达呈时间依赖性增强 (图 2). 从图 1 中可以看出, 该体系 LMP1 能被很好诱导表达.

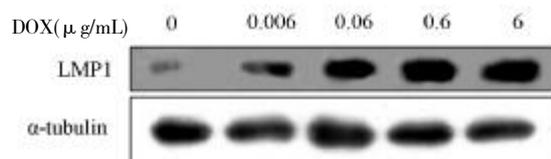


图 1 Western blot 分析 Tet-on LMP1 HNE2 细胞中 LMP1 剂量表达变化.

Fig.1 Dose course of DOX induction of LMP1 expression.

Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.006-6 μ g/ml Dox 处理 24 小时, 抽提总蛋白用于 Western Blot, 以 α -tubulin 作为内对照, 结果显示随着 Dox 剂量的增加, LMP1 表达也相应地增加.

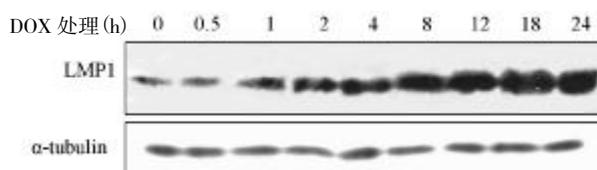


图 2 Western blot 分析 Tet-on LMP1 HNE2 细胞中 LMP1 时间表达变化.

Fig.2 Time course of 0.6 μ g/mL of DOX induction of LMP1 expression.

Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.6 μ g/mL Dox 处理不同时间, 抽提总蛋白用于 Western Blot, 以 α -tubulin 作为内对照, 结果显示随着时间的延长, LMP1 表达也相应地增加.

2.2 EB 病毒 LMP1 激活 cyclin D1 启动子, 上调其转录表达

我们将 cyclin D1 荧光酶报道质粒和 β -gal 校正质粒共转染 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞. 结果显示, 不同剂量 Dox 诱导 24 h 后, 与未诱导相比, cyclin D1 荧光素酶活性逐渐增加, 在 6 μ g/mL Dox 诱导浓度, cyclin D1 荧光素酶活性增加到 6 倍以上 (* P < 0.05) (图 3).

在确定 EB 病毒 LMP1 激活 cyclin D1 启动子的实验基础上, 进一步研究其对 cyclin D1 mRNA

表达水平的调节.结果显示: cyclin D1 转录表达呈剂量依赖性增加 (图 4), 表明 LMP1 调节 cyclin D1 转录上调呈剂量依赖效应.

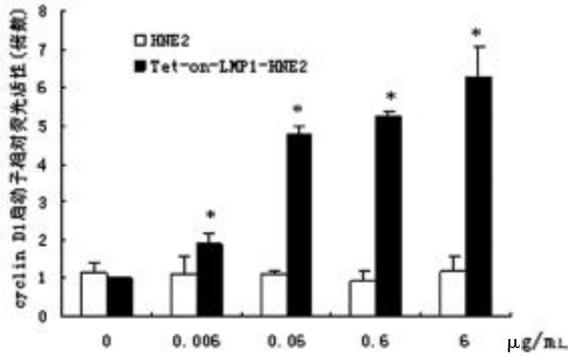


图 3 不同浓度 LMP1 对 cyclin D1 启动子相对活性 (倍数) 的改变

Fig.3 Dose course of cyclin D1 luciferase activity

Tet-on LMP1 HNE2 细胞共转染 cyclin D1 启动子报道质粒和 β -gal 校正质粒后, 经不同剂量 DOX 诱导 LMP1 表达 24 小时后采用荧光酶检测试剂盒分析 cyclin D1 启动子活性. 图为相对活性 (倍数) 的改变 (与未诱导相比 $P < 0.05$)

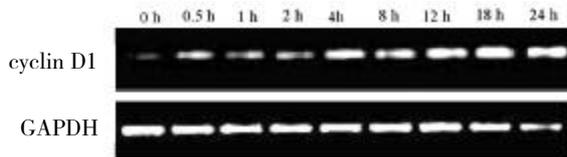


图 4 RT-PCR 检测 Tet-on-LMP1-HNE2 细胞时 cyclin D1 mRNA 表达的时间效应

Fig.4 Time course of cyclin D1 mRNA expression Tet-on-LMP1-HNE2

2.3 EB 病毒 LMP1 下调 p16 启动子活性和转录表达

我们将 p16 荧光酶报道质粒和 β -gal 校正质粒共转染 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞.结果显示,不同剂量 DOX 诱导 24 h 后, 与未诱导相比, p16 荧光素酶活性则呈逐渐下降的趋势, 在 6 μ g/mL DOX 诱导浓度, p16 荧光素酶活性减少到 5 倍左右. ($P < 0.05$) (图 5) .

在确定 EB 病毒 LMP1 下调 p16 启动子的实验基础上, 进一步研究其对 p16 mRNA 表达水平的

调节.结果显示: p16 转录表达呈剂量依赖性减弱 (图 6), 表明 LMP1 调节 p16 转录下调呈剂量依赖效应.

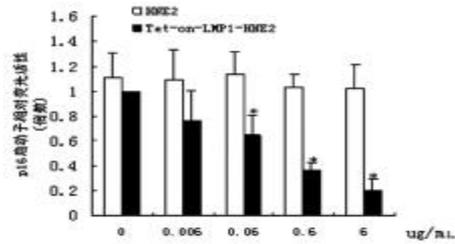


图 5 不同浓度 LMP1 对 p16 启动子相对活性 (倍数) 的改变

Fig.5 Dose course of p16 luciferase activity

Tet-on LMP1 HNE2 细胞共转染 p16 启动子报道质粒和 β -gal 校正质粒后, 经不同剂量 DOX 诱导 LMP1 表达 24 h 后采用荧光酶检测试剂盒分析 p16 启动子活性.图为相对活性 (倍数) 的改变 (与未诱导相比 $P < 0.05$)

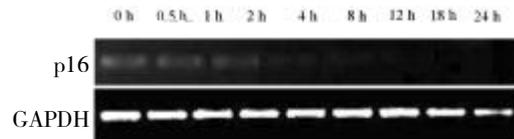


图 6 RT-PCR 检测 Tet-on-LMP1-HNE2 细胞时 p16 mRNA 表达的时间效应

Fig. 6 Time course of p16 mRNA expression Tet-on-LMP1-HNE2

3 讨论

细胞周期不同时间相间存在着 G1/S、G2/M 等一系列类似“开关”式的关键检测点, 具有监视和调控细胞周期时相的作用, 使其正常转换, 以保证各个细胞周期事件的启动、完成与忠实地按序进行, 其中 G1/S 检测点至关重要.G1/S 检测点经常在癌变多阶段, 甚至在癌前阶段就已失调.这一点体现在与 G1/S 调控相关的正性调节因子 cyclin D1 和负性调节因子 p16 等关键基因上, cyclin D1 通过与 CDK4/6 结合成复合物, 激活 CDK4/6 的激酶活性, 通过一系列级联反应促使细胞完成细胞周期^[6]; 同时, p16 作为 CDK 的抑制因子, 其编码产物是细胞周期 G1/S 期调控网络中

的负性调节因子,其氨基末端具有与 cyclin D1 编码区同源区域,可与 CDK 竞争性结合,阻止 cyclin D1 过度激活 CDK 以协同调节 CDK 的活性,从而避免 G1/S 检测点调节紊乱、细胞 G1 期延长以及细胞增殖失常甚至癌变。p16 和 cyclin D1 之间的稳态平衡,是用以维持细胞周期 G1/S 正常进展的关键因素;一旦失调则引起细胞周期紊乱,诱发癌变和/或加速肿瘤的演进^[17]。

肿瘤是一类细胞周期疾病,常常存在 cyclin D1 和 p16 表达失调。诸多研究表明: cyclin D1 与头颈部肿瘤癌变多阶段有密切的关系^[18];在支气管粘膜的轻度、中度和重度不典型增生的癌前病变中 cyclin D1 呈渐进性升高,因此, cyclin D1 的表达是一早期事件,值得关注的是,新近的研究表明, cyclin D1 瞬时表达足以促进在体肝细胞的复制和肝的生长;过度表达则促使细胞异常增生,导致基因组不稳定而诱发肿瘤发生^[19]。cyclin D1 是 G1/S 检测点调节的主要周期素,表达异常可导致细胞 G1/S 检测点失调而过度增殖^[20];用 cyclin D1/CDK4 选择性抑制剂 indolocarbazoles 则可以使肿瘤细胞停止生长,阻滞于 G1 期^[21]。同时, p16 具有抑制鼻咽癌细胞增殖作用机制是使细胞停滞于 G0/G1 期; p16 缺失则使细胞失去了对 CDK 的负相调控作用,促使过多细胞越过 G1 检测点加速增殖^[22]。

更进一步的研究表明, p16 和 cyclin D1 协同作用对于处于怀孕和哺乳期个体的细胞生长调节起着至关重要的作用^[23]; p16 和 cyclin D1 蛋白表达比例失调在膀胱癌的发生发展中起着重要的作用^[24]; p16 失活和 cyclin D1 过表达与口腔、上消化道肿瘤和肺的神经内分泌肿瘤的发生密切相关。因此, p16 和 cyclin D1 异常表达与 G1/S 检测点功能失调密切相关^[25]。

本文研究结果显示,在 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞中, LMP1 引发 cyclin D1 与 p16 表达失调(图2,图3),从而可能引发 G1/S 检测点失调,细胞异常增殖,并进一步加剧肿瘤细胞的恶性演进。该研究在外界致病因子 EB 病毒 LMP1 和细胞周期之间建立了新的直接联系,为肿瘤发病机制研究提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] 肖绘,曹亚.鼻咽癌中D型周期素的差异性表达及cyclinD1基因扩增的研究[J].中华耳鼻喉科杂志,2000;35:2
- [2] 宋鑫,曹亚.用组织微阵列技术分析鼻咽癌变多阶段组织cyclinD1过表达[J].生物化学与生物物理进展2002,29:385-389
- [3] SUN Y, HILDESHEIM A, LANIER A E, et al. No point mutation but decreased expression of the p16/MTS1 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinomas [J]. *Oncogene*, 1995, 10: 785-788
- [4] HUANGG W, MoW N, KUANGG Q, et al. Expression of p16, nm23-H1, E-cadherin, and CD44 gene productions and their significance in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Laryngoscope*, 2001, 111: 1465-1471
- [5] MAKITIE A A, MACMILAN C, HO J, et al. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 2177-2184
- [6] CHANGH W, CHAN A, KWONGD L, et al. Evaluation of hypermethylated tumor suppressor genes as tumor markers in mouth and throat rinsing fluid, nasopharyngeal swab and peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patient [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105: 851-855
- [7] LEE A W, LI J H, SHI W, et al. p16 gene therapy: a potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2: 961-969
- [8] DONJERKOVIC D, SCOTT D W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle [J]. *Cell Res*, 2000, 10: 1-16
- [9] 宋鑫,唐敏,曹亚,等. G1/S检测点调控与癌变多阶段的关系 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24: 73-76
- [10] 廖伟,唐敏,曹亚,等.一株受四环素及其衍生物调控的Tet-on鼻咽癌细胞株 [J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 1999, 15: 132-136
- [11] HINZ M, KRAPPMANN D, EICHTEN A, et al. NF- κ B function in growth control: regulation of cyclinD1 expression and G0/G1-to-S-phase transition [J]. *MCB*, 1999, 19: 2690-2698
- [12] HARA E, SMITH R, PARRY D, et al. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence [J]. *Mol Cell Biol*,

- 1996, 16: 859-867
- [13] CHAPMAN N R, PERKINS N D. Inhibition of the RelA (p65) NF- κ B subunit by Egr-1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 4719-4725
- [14] GONZALEZ-ZULUETA M, Bender C M, Yang A S, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 4531-4535
- [15] SHUAI X M, HAN G X, WANG G B, et al. Cyclin D1 antisense oligodeoxynucleotides inhibits growth and enhances chemosensitivity in gastric carcinoma cells [J]. *World Gastroenterol*, 2006, 21, 12: 1766-1769
- [16] DONJERKOVIC D, SCOTT D W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle [J]. *Cell Res*, 2000, 10: 1-16
- [17] MOLINARIM. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer [J]. *cell prolifer*, 2000, 33: 261-274
- [18] IZZO J G, PAPADIMITRAKOPOULOU V A, LI X Q, et al. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification [J]. *Oncogene*, 1998, 17: 2313-2322
- [19] NELSEN C J, RICKHEIN D G, TIMCHENKO N A, et al. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 8564-8568
- [20] LUKAS J, BARTKOVA J, ROHDE M, et al. Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity [J]. *Mol Cell Biol*. 1995, 15: 2600-2611
- [21] PETTYW J, DRAGNEVK H, DMITROVSKY E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention [J]. *Lung Cancer*, 2003, 1: 155-161
- [22] CHOW L S, WANG X, KWONG D L, et al. Effect of p16INK4a on chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17: 135-140
- [23] GADD M, PISC C, BRANDA J, et al. Regulation of cyclin D1 and p16 is critical for growth arrest during mammary involution [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 8811-8819
- [24] YANG C C, CHU K C, CHEN H Y, et al. Expression of p16 and cyclin D1 in bladder cancer and correlation in cancer progression [J]. *Urol Int*, 2002, 69: 190-194
- [25] BEASLEY M B, LANTUEJOUL S, ABBONDANZO S, et al. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung [J]. *Hum Pathol*, 2003, 34: 136-142

(2007-04-11 收稿)