

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0281-04

TRP-1 反义核酸抑制恶性黑素瘤细胞增殖的体外及体内研究

李春英, 高天文, 齐显龙, 王刚, 刘玉峰(第四军医大学西京医院皮肤科, 西安 710032)

[摘要] **目的:** 观察 TRP-1 反义核酸在体内、外对恶性黑素瘤细胞增殖的抑制作用, 探讨黑素瘤治疗的新途径。**方法:** 构建 TRP-1 反义核酸真核表达载体, 将其转染恶性黑素瘤细胞, 以测定的 MTT 结果绘制细胞生长曲线; 进行黑素瘤细胞体外克隆形成实验观察, 计算各组细胞的克隆形成率; 以 TRP-1 反义核酸转染的黑素瘤细胞及对照组细胞注射裸鼠, 观察肿瘤大小及增长速度。**结果:** 从生长曲线可以看出, TRP-1 反义核酸转染的黑素瘤细胞增殖速度明显低于对照细胞; 体外克隆形成实验结果显示: TRP-1 反义核酸转染的黑素瘤细胞克隆形成率为 52%, 而对照组为 68% ($P < 0.01$); 裸鼠成瘤试验表明, 转染 TRP-1 反义核酸的细胞成瘤性显著低于未转染细胞及转染载体对照细胞 ($P < 0.01$)。**结论:** TRP-1 反义核酸在体内、外均能明显抑制恶性黑素细胞的增殖, 在恶性黑素瘤的治疗中有一定的应用前景。

[关键词] 酪氨酸酶相关蛋白 1; 反义核酸; 黑素瘤; 增殖

[中图分类号] R739.5 **[文献标识码]** A

The Inhibition of Antisense TRP1 in the Proliferation of Malignant Melanoma Cells *in vivo* and *in vitro*

LI Chun-ying, GAO Tian-wen, QI Xian-long, WANG Gang, LIU Yu-feng (Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibition of antisense TRP 1 on cell growth of malignant melanoma (MM) and explore a new way for therapy of melanoma. **Methods:** Antisense TRP-1 recombinant vector was constructed and transfected into MM cells. According to the results of MTT, cell growth curves were drawn and then clonogenic assay was performed *in vitro*. At last, tumorigenesis assay was undertaken in nude mice *in vivo*. **Results:** Cell proliferations of TRP-1 transfected MM cells were inhibited compared with the control cells. The results of clonogenic assay displayed the difference of clonogenic percentage between TRP-1 transfected MM cells (52%, $P < 0.01$) and the control cells (68%, $P < 0.01$). Tumorigenesis assay *in vivo* 30 days after implantation showed that the growth of TRP-1 antisense vector transfected MM cells was significantly suppressed. **Conclusion:** Antisense TRP-1 could inhibit the proliferation of MM cells both *in vivo* and *in vitro*. It could be expected that antisense TRP-1 be used in the therapy of MM in the future.

[Key words] tyrosinase related protein 1, antisense; malignant melanoma; proliferation

* 恶性黑素瘤 (malignant melanoma, MM) 是一种高度恶性的皮肤肿瘤, 目前尚无满意的治疗办法。利用反义核酸进行基因治疗为 MM 的治疗带来了新的希望。酪氨酸酶相关蛋白 1 (tyrosinase related protein 1, TRP-1) 是重要的黑素细胞分化抗原, 是黑素细胞及黑素瘤细胞含量最丰富的糖蛋白^[1], 多年来人们对其功能的认识一直处于比较初步的阶段。最近一些研究^[2-4]发现黑素细胞中发生的某些分子事件与 TRP-1 有关, 提示 TRP-1 不仅参与黑素的合成代谢, 也参与黑素形成过程中系统毒性物质的清除, 影响黑素细胞的

增殖和功能。因此考虑可以将其作为黑素瘤治疗的一个靶点, 在基因及蛋白水平封闭该抗原, 观察黑素瘤细胞的变化。本研究应用反义核酸技术, 观察了 TRP-1 反义核酸在体内外对黑素瘤细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方法

[基金项目] 国家自然科学基金 (30300307)

[作者简介] 李春英 (1975-), 女, 黑龙江集贤人, 讲师, 主治医师, 主要从事黑素瘤的生物治疗研究

[通讯作者] 高天文, Email: gaotw@fmmu.edu.cn

1.1 材料

DMEM 培养基、小牛血清、G418, 脂质体(Lipo-fectamine2000), 购自 Gibco 公司; 质粒纯化试剂盒购于 Promega 公司, 人恶性黑素瘤细胞系 Libr 由第四军医大学免疫教研室金伯泉教授惠赠。

1.2 细胞培养、TRP-1 反义重组质粒载体构建、细胞转染及转染细胞的鉴定参照文献[5]进行。

1.3 绘制细胞生长曲线

黑素瘤细胞按照文献[5]方法转染后, 分别命名 MM、MM-AS(MM TRP-1 antisense, MM-AS)、空载体转染的黑素瘤细胞(MM-pcDNA3.1, MM-P)。消化单层培养的细胞, 制备单细胞悬液, 计数并调整细胞密度。以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板。分别在接种后第 1 ~ 8 天取细胞进行 MTT 比色试验: 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ l 继续孵育 4 h, 终止培养。弃上清后加入 150 μ l DMSO, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测分析仪测定 A_{490} 值。以只加培养液, 不加细胞的空白对照孔调零。以时间为横坐标, 光吸收值为纵坐标, 绘制 3 种细胞的生长曲线。

1.4 克隆形成实验

取对数生长期的单层培养细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞。将细胞进行稀释, 计数后将 1 000 个细胞接种于 10 ml 预温的培养液中, 然后以水平十字方向晃动培养皿, 使细胞分散均匀。将平皿置于 CO₂ 培养箱, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃去培养液, 用 PBS 小心浸洗 2 次, 固定 10 min 以后以伊红染色, 清洗后空气中干燥。将平皿倒置, 用肉眼直接计数克隆数

$$\text{克隆形成率}(\%) = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

1.5 裸鼠成瘤试验

共设 3 组, 每组 3 只裸鼠。取对数生长期的转染组、对照组及未转染的 Libr 细胞, 消化、制备单细胞悬液, 用无血清培养基离心洗涤 2 次, 计数细胞。用 PBS 重悬细胞并调整细胞密度为 2×10^7 /ml。用 1 ml 注射器抽取瘤细胞悬液接种于裸鼠背部皮下, 每个接种部位注射 0.2 ml, 含活细胞数 4×10^6 。每组裸鼠接种一种细胞。定期观察裸鼠精神、饮食及体重变化情况。从接种之日起, 每隔 7 天测量肿瘤结节的长度(L) 和宽度(W)。肿瘤体积计算公式为: $V = 0.5 \times L \times W^2$ 。以肿瘤体积变化对时间绘制生长曲线。30 d 后处死小鼠, 取出瘤体称重, 并固定瘤体, 切片, 进行 HE 染色, 观察显微结构改变。

2 结果

2.1 细胞转染及鉴定

转染的黑素瘤细胞经 G418 筛选, RT-PCR 测定, 结果提示与空载体转染对照组(MM-P) 和亲本细胞 MC 相比, TRP-1 反义核酸转染的黑素细胞(MM-AS) TRP-1 mRNA 水平亦显著下降, 而空载体转染对照组(MM-P) 和亲本细胞 MM 的 TRP-1 mRNA 水平基本一致。免疫印迹结果显示, 与对照组相比, TRP-1 反义转染组黑素细胞(MM-AS) TRP-1 蛋白表达水平降低(图 1)。

图 1 TRP-1 反义核酸转染黑素细胞的 RT-PCR 及 Western-blot 鉴定

Fig. 1 Identification of antisense TRP-1 transfection
A: TRP-1 mRNA; B: β -actin mRNA; C: TRP-1 protein;
D: β -actin protein; 1: MM-AS; 2: MM -P; 3: MM

2.2 细胞生长曲线

3 组黑素瘤细胞分别以相同数量接种于 96 孔板, 培养 8 d 后, 根据 MTT 结果绘制细胞生长曲线。3 组黑素瘤细胞的生长曲线均近似为 S 形, 接种后 3 d 左右为潜伏期, 然后进入对数生长期, 细胞生长速度明显增快, 于第 7 天左右达到平台期, 以各组细胞第 7 天 MTT 值进行 *t* 检验统计分析, MM-AS 组 MTT 值显著低于 MM-P 及 MM 组($P < 0.05$)。从 3 组黑素瘤细胞的生长曲线的形态亦可以看出, 反义核酸转染黑素瘤细胞生长速度慢于未转染的亲本细胞及空载体转染的黑素瘤细胞, 进入对数生长期时间延长且平台降低, 而转染空载体的对照组细胞生长未受明显影响(图 2)。

2.3 克隆形成试验

MM-P 及 MM-AS 分别培养 10 d 后有肉眼可见的克隆形成。以伊红染色后, 肉眼观察、计数克隆数并计算克隆形成率, MM-P 及 MM-AS 克隆形成率分别为: 52% 和 68%。经 X^2 检验, $P < 0.01$, 两组间有显著性差异。TRP-1 反义核酸转染的恶性黑素瘤细胞的体外克

隆形成能力明显低于空载体转染的对照组黑素瘤细胞。

2.4 鼠成瘤试验

未转染及空载体转染组细胞接种裸鼠后第9天肉眼可见肿瘤,TRP-1反义核酸转染的黑素瘤细胞于接种后第8天肉眼可见肿瘤。第9天开始测量肿瘤体积,以后每7天测量1次,接种30d后,3组裸鼠移植瘤平均体积为1167.67±338.16(MM细胞)、1108.29±284.65(MM-P细胞)、830.78±196.93(MM-AS细胞)(表1、图3)。

接种30d后,3组裸鼠移植瘤平均重量(mg)分别为($\bar{x} \pm s$):504.8±57.67(MM细胞);578.67±100.06(MM-P细胞);286.67±35.28(MM-AS细胞),方差分析表明,转染TRP-1反义核酸的细胞成瘤性显著低于未转染细胞及转染载体对照细胞($P < 0.01$),各组裸

鼠移植瘤的HE染色未见明显差异,未转染细胞及转染载体对照细胞成瘤性没有显著差异($P > 0.5$)。

图2 3种恶性黑素瘤细胞的生长曲线

Fig.2 Growth curves of MM, MM-P and MM-AS

表1 TRP-1反义核酸对黑素瘤细胞体内成瘤性的影响
Tab.1 Influence of antisense TRP-1 to the neoplasia of MM

Groups	Volume of the tumors($M \pm SD, mm^3$)			
	9 d	16 d	23 d	30 d
MM	69.17 ± 25.63	340.67 ± 127.99	880.33 ± 257.63	1167.67 ± 338.16
MM-P	81.31 ± 23.45	402.67 ± 181.26	850.38 ± 136.99	1108.29 ± 284.65
MM-AS	31.00 ± 8.20	128.21 ± 86.41	515.58 ± 165.56	830.78 ± 196.93

图3 TRP-1反义核酸对裸鼠体内黑素瘤生成的抑制影响
Fig.3 The inhibition of the melanoma genesis in the nude mice *in vivo* after the antisense TRP-1 transfection

3 讨论

恶性黑素瘤是一种恶性程度很高的肿瘤,手术、化疗及放疗效果均不满意,且容易出现多种并发症而使临床治疗受限。近年来很多学者致力于研究恶性黑素

瘤的基因治疗,其中,反义核酸技术在恶性黑素瘤治疗中的应用颇受重视^[6-7]。已经有研究表明^[8-10],针对TRP-1的体液免疫和细胞免疫在机体抗黑素瘤的过程中发挥了重要的作用,此外,在一些实验中有学者观察到黑素细胞抵抗氧化压力下降、早死的同时伴有TRP-1基因表达的降低。因此推测TRP-1参与黑素形成过程中系统毒性物质的清除,在黑素细胞维持自身稳定中发挥作用^[2]。TRP-1作为黑素瘤免疫的重要靶点,在黑素瘤的治疗中有很大的潜在价值,然而,至今尚没有直接针对TRP-1基因进行的基因封闭治疗研究。在先前的工作中,我们成功构建了TRP-1反义核酸真核表达载体,在本研究中,我们将其转染恶性黑素瘤细胞,并分别于体内外观察其对恶性黑素瘤细胞增殖的抑制作用。

生长曲线是观察细胞生长基本规律的重要方法,一般细胞的生长曲线近似S形,传代后经过几天的潜伏适应期,然后进入对数生长期,达到平台期后生长稳定^[11]。我们发现,当TRP-1在mRNA水平和蛋白质阻断封闭后,TRP-1反义核酸转染的黑素瘤细胞生长受到明显阻抑,进入对数生长期的时间延长,且平台降

低。克隆形成试验是测定单个细胞增殖能力的有效方法之一,通过计数克隆形成率,可对单个细胞的增殖潜力作定量分析,了解细胞的增殖能力和对环境的适应能力^[11]。我们的实验采用平板克隆形成试验,结果显示 TRP-1 反义核酸转染的黑素瘤细胞的克隆形成率明显低于空载体转染的对照组,表明 TRP-1 反义核酸转染的黑素瘤细胞体外独立生存能力降低。

在体外研究的基础上,我们进一步进行了 TRP-1 反义核酸转染恶性黑素瘤细胞裸鼠体内成瘤实验观察。结果表明,转染反义核酸的细胞成瘤性显著低于未转染细胞及转染载体对照细胞。从绘制的肿瘤生长曲线可以看到,反义核酸组肿瘤第 1 周的生长速度明显低于对照组,而从第 2 周开始,生长速度增高,与对照组趋于接近(曲线近似平行),这可能与注射到动物体内后,TRP-1 反义核酸转染的黑素瘤细胞失去了筛选压力,而逐渐丢失了反义核酸的表达有关。

本研究通过体内、体外试验初步证明:封闭 TRP-1 的表达可使黑素瘤细胞生长抑制,TRP-1 在黑素瘤的治疗中是一个很有希望的靶分子;然而,TRP-1 反义核酸在黑素瘤治疗中的有效性及安全性等问题尚需要进一步的深入探讨,将其应用于临床治疗无疑还要走很长的路。

[参 考 文 献]

[1] Vijayasaradhi S, Doskoch PM, Houghton AN. Biosynthesis and intracellular movement of the melanosomal membrane glycoprotein gp75, the human b (brown) locus product[J]. *Exp Cell Res*, 1991, 196(2): 233-240.

[2] Jimbow K, Chen H, Park JS, *et al.* Increased sensitivity of mel-

nocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo[J]. *Br J Dermatol*, 2001, 144: 55-65.

[3] Phillips J, Gawkrödger DJ, Caddy CM, *et al.* Keratinocytes suppress TRP-1 expression and reduce cell number of co-cultured melanocytes - implications for grafting of patients with vitiligo[J]. *Pigment Cell Res*, 2001, 14: 116-125

[4] Li CY, Gao TW, Gang Wang, *et al.* The effect of antisense tyrosinase related protein 1 on melanocytes and malignant melanoma cells[J]. *Br J Derm*, 2004, 150(6): 1081-1090.

[5] 李春英,高天文,李廷慧,等. TRP-1 编码基因反义核酸对黑素细胞增殖及功能的影响[J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37 (2): 68-70.

[6] Scholl FA, Kamarashev J, Murmann OV, *et al.* PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (3): 823-826.

[7] D'Agano I, Valentini A, Fornari C, *et al.* Myc down-regulation induces apoptosis in M14 melanoma cells by increasing p27 (kip1) levels[J]. *Oncogene*, 2001, 20 (22): 2814-2825.

[8] Tsukamoto K, Hirata S, Osada A, *et al.* Detection of circulating melanoma cells by RT-PCR amplification of three different melanocyte-specific mRNAs in a mouse model[J]. *Pigment Cell Res*, 2000, 13(3): 185-189.

[9] Cox AL, Skipper J, Chen Y, *et al.* Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines [J]. *Science*, 1994, 264(5159): 716-719.

[10] Austin LM, Boissy RE. Mammalian tyrosinase-related protein-1 is recognized by autoantibodies from vitiliginous Smyth chickens. An avian model for human vitiligo[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(6): 1529-1541.

[11] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 1996. 175-176

[收稿日期] 2004 - 03 - 17 [修回日期] 2004 - 09 - 16

《 感 染 、 炎 症 、 修 复 》 杂 志 征 稿 及 征 订 启 事

经国家新闻出版总署批准,由解放军总医院 304 临床部主办的《 感染、炎症、修复》杂志(CN11-5225/R),已于 2004 年第 2 季度正式公开出版发行。本刊为综合性高级医学学术刊物,内容涉及各有关学科疾病所致的全身/局限性感染、炎症反应与组织修复再生的发病机制、诊断技术和临床防治经验。主要读者对象为各学科、各专业从事感染、炎症、修复与再生方面的临床、才学和科研人员,欢迎来稿。本刊现为季刊,大 16 开本,64 页,每季末月 20 日出版。现征订 2005 年度《 感染、炎症、修复》杂志,征订者可直接汇款至杂志编辑部,10.00 元/期,全年 40.00 元。

联系地址:北京市阜成路 51 号《 感染、炎症、修复》编辑部
 邮政编码: 100037
 电 话: 010 - 66867399
 传 真: 010 - 68480755
 E-mail: gryzxf@ vip. sina. com