论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0694-03

胃癌细胞中端粒位置效应研究

巩 艳,房殿春,罗元辉 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 研究插入端粒片段的荧光素酶报道质粒在胃癌细胞的转染及它对相邻荧光素酶报道基因表达的影响,探讨胃癌细胞中端粒位置效应的存在。**方法** 将pTET-OFF调节质粒和携带荧光素酶报道基因的pTRE2-Hyg-Luciferase反应质粒共转染胃癌细胞SGC7901,经强力霉素(deoxycyline)诱导24 h后检测报道基因活性,观察强力霉素诱导的抑制反应。然后将插入有端粒片段的荧光素酶报道质粒pBX质粒和对照质粒pBX-ntf(no teloemere fragment)分别与pTET-OFF调节质粒共转染细胞,在强力霉素诱导下,检测报道基因活性的改变。**结果** 共转染pTET-OFF和pTRE-Hyg-Luciferase质粒的SGC7901细胞,在强力霉素作用下荧光素酶报道基因的活性逐渐降低。强力霉素诱导分别共转染有pTET-OFF和pBX质粒或pTET-OFF和pBX-ntf的细胞时,前者荧光素酶活性较后者降低4倍。**结论** 转染TET-OFF基因表达调控系统的胃癌细胞SGC7901受强力霉素的诱导抑制;转染入胃癌细胞中的端粒片段降低了存在它附近荧光素酶报道基因的表达水平。

关键词: 胃癌细胞;端粒位置效应;荧光素酶报道基因;表达

中图法分类号: R394.2; R730.23; R735.2 **文献标识码**: A

Telomere position effect in gastric cancer cell SGC7901

GONG Yan, FANG Dian-chun, LUO Yuan-hui (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the possibility of telomere seeding in human gastric cancer cell SGC7901 and the influence of telomere on the expression of luciferase reporter gene nearby and to explore the position effect of telomere in gastric cancer cell. **Methods** The TET-OFF regulatory system was prepared and then transfected to gastric cancer cell SGC7901 by Lipofectamine™ 2000. With doxycycline added, the activity of the fluorescence caused by the expression of the target gene (the luciferase gene) with TET-OFF regulatory system was analyzed. The luciferase reporter plasmid in which telomere fragment pBX was inserted and the control plasmid pBX-ntf (no teloemere fragment) were co-transfected to cell 7901 with pTET-OFF regulate plasmid respectively and the luciferase activity was determined with doxycycline's induction. **Results** With the inducing of Dox, the activity of the fluorescence caused by the expression of the luciferase gene was inhibited. Treated with deoxycyline, there was a 4-fold decrease in the activity of the fluorescence in the cells infected with pBX and pTET-OFF as compared with that in the cells infected with pBX-ntf and pTET-OFF. **Conclusion** With the help of Lipofect2000, the gastric cancer cell SGC7901 can be transfected by TET-OFF regulatory system successfully. Dox could repress luciferase gene expression. Telomere seeding in gastric cancer cell SGC7901 could decrease the expression of luciferase reporter gene.

Key words: gastric cancer cell; telomere position effect; luciferase reporter gene; expression

端粒位置效应[1]可以沉默它附近基因的表达,并与端粒长度有关。正常细胞端粒随细胞分裂逐渐缩短,端粒附近沉默的基因重新表达,但具体基因还不清楚。已有研究表明,将端粒序列插入染色体可导致基因不稳[2],在酵母细胞中已经证实存在端粒位置效应,为探讨胃癌细胞中是否存在端粒位置效应,本实验采用四环素调控系统(TET-OFF)真核细胞基因表达调控系统对荧光素酶基因在胃癌细胞中的表达调控进行初步观察,确定四环素调控系统调控荧光素酶基因在胃癌细胞中表达的可能性后,使用该调控系统研究胃癌细胞中端粒植入对它相邻荧光素酶基因表达的影响,从而为下一步位置效应与基因不稳定的研究打下基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270609)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270609)

作者简介:巩 艳(1977-),女,山东省淄博市人,博士研究生,医师,主要从事胃癌发生机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754124

通讯作者:房殿春,电话:(023)68754124,E-mail: fangdianchun@hotmail.com

收稿日期:2004-12-31;**修回日期**:2005-02-28

1　材料与方法

1.1　材料

质粒、菌种及细胞：TET-OFF 基因表达系统中质粒 pTET-OFF、pTRE2-Hyg、pTRE2-Hyg-Luciferase 由叶治家博士（美国耶鲁大学遗传研究所）惠赠。pBX 质粒和对照 pBX-ntf 质粒由 Shay 教授（美国得克萨斯大学西南医学中心）惠赠，pBX 是荧光素酶报道质粒，在荧光素酶基因后方插入 1.6 kb 大小的端粒 TTAGG 重复序列，启动子区含有四环素反应元件。pBX-ntf 没有插入相应的端粒片段。pBX-neo 由本实验室构建，新霉素基因片段替代端粒重复序列。DH5α、SGC7901 细胞由本实验室保存。

主要试剂和仪器：荧光素酶分析试剂购自 Promega 公司，小量质粒抽提试剂盒购自上海生物工程公司，内切酶购自 MBI 公司，脂质体转染试剂购自 Clontech 公司，G418、RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司；仪器使用 TurnerBiosystems 公司荧光发光计 TD-20/20 型。

1.2　方法

1.2.1　质粒的制备和鉴定　　常规制备 DH5α 感受态细胞，经质粒转化，小量抽提质粒 DNA。pBX-ntf 经 *Eco*R Ⅰ单酶切，pBX 质粒经 *Pst* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ双酶切，TET-OFF 表达系统质粒 DNA 经 *Hind* Ⅲ单酶切、*Hind* Ⅲ和 *Bam*H 双酶切、琼脂糖凝胶电泳进行酶切鉴定后，大规模提取质粒。

1.2.2　细胞培养和转染效率的测定　　SGC7901 细胞在含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养。将培养的 SGC7901 细胞转染前 24 h 传至 6 孔细胞培养板上，24 h 后待细胞密度达到 80% ~ 90% 时，将待转染绿色荧光蛋白质粒和脂质体分别用 optimen 稀释后，混匀，室温放置 30 min，加入细胞中，补加低血清培养基，培养 24 h 后，换有血清培养基，荧光显微镜下观察结果。

1.2.3　转染细胞和强力霉素调控基因的表达　　按 1.2.2 所述方法将 TET-OFF 基因表达系统中 pTET-OFF、pTRE-Hyg-Luciferase 两种质粒共转染胃癌细胞 SGC7901。细胞分组：分 6 组，第 1 组为空白对照组，不转染质粒，其余 5 组均转染此两种质粒。每组种植细胞 3 孔。培养 24 h 后，加入不同剂量强力霉素诱导 24 h，进行荧光素酶活性检测。第 1、2 组细胞不加强力霉素，第 3 ~ 6 组细胞分别加入不同剂量强力霉素，其终浓度分别为 20、100、500 ng/ml、1 μg/ml。

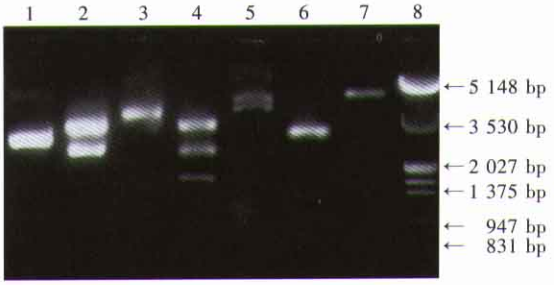
1.2.4　荧光素酶活性检测　　强力霉素加入 24 h 后，倒掉培养板内培养液，PBS 洗涤细胞 2 次，加入 100 μl 细胞裂解液，室温下裂解 20 min，收集细胞，转入离心管中。室温 12 000 r/min 离心 10 min，收集上清并转入一新离心管中。取 20 μl 上清，加入 100 μl 荧光素酶反应底物，放入检测仪中，检测各组相对空白对照的荧光数值，简称相对荧光值（relative-luciferase-unit，RLU），同一组样品测量后，取均值绘图。

1.2.5　端粒质粒的转染和荧光素酶活性检测　　实验分组：种植细胞共 15 孔，每 3 孔为 1 组，共 5 组。第 1 组未转染质粒 DNA，第 2 组转染 pTET-OFF 质粒和 pBX 质粒，第 3 组转染 pTET-OFF 质粒和 pBX-ntf 质粒，第 4 组转染 pTET-OFF 质粒和 pBX-neo 质粒，第 5 组转染 pTET-OFF 质粒和 pBX 质粒，细胞培养 24 h 后，20 ng/ml 强力霉素浓度分别诱导前 4 组细胞 24 h，进行荧光素酶活性检测。同时设空白对照，不转染任何质粒，不经强力霉素诱导。因实验还未建立稳定表达的克隆，为排除瞬时转染实验本身的不稳定性，做 3 次重复实验。

2　结果

2.1　质粒鉴定

质粒 pBX-ntf、pBX、TET-OFF 表达系统质粒 DNA 经酶切、琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。其中，pBX 经 *Pst* Ⅰ和 *Bg* Ⅲ双酶切后出现大小为 4 612 bp 和 1 600 bp 的片段。pTET-OFF 经 *Hind* Ⅲ和 *Xho* Ⅰ双酶切后出现大小分别为 1 711、2 458、3 145 bp 3 个片段，pTRE2-Hyg 经 *Xho* Ⅰ酶切后出现分别为 1 492 bp 和 3 815 bp 的片段。与质粒图谱所示完全一致。



1：pBX-ntf；2：pBX/*Pst* Ⅰ + *Bgl* Ⅱ；3：pBX；4：pTET-OFF/*Hind* Ⅲ + *Xho* Ⅰ；5：pTET-OFF；6：pTRE2-hyg/*Xho* Ⅰ；7：pTRE2-hyg；8：Molecular marker

图 1　质粒的鉴定

Fig 1　The identification of plasmid

2.2　转染效率评价

转染 24 h，荧光显微镜下观察。低倍视野下结果如图 2 所示，可见多数发绿色荧光的细胞。高倍视野（100 倍）转染效率达 30% ~ 40%，多为明亮的绿色荧光，少数表达较高，呈黄绿色。



图 2　绿色荧光蛋白质粒转染 SGC7901 细胞　（荧光显微镜 × 100）

Fig 2　Green fluorescent protein plasmid transfected to SGC7901 cell line　（Fluorescence microscopy × 100）

2.3 转染 TET-OFF 基因调控系统后胃癌细胞对强力霉素诱导调控的反应

通过脂质体介导的瞬时转染方法，将 pTET-OFF 和 pTRE2-Hyg Luciferase 共转染胃癌细胞。加入不同浓度的强力霉素，观察它诱导调控反应的可能性和量效关系。结果显示：随着强力霉素浓度(0、20、100、500 ng/ml，1 μg/ml)的增加，荧光素酶的活性逐渐降低(平均 RLU 值分别为 60905、25108、5468、988、61)；这说明转染 TET-OFF 基因表达调控系统的胃癌细胞 SGC7901 受强力霉素的诱导抑制。

2.4 端粒质粒转染 SGC7901 细胞和荧光素酶活性检测

pTET-OFF 质粒分别和 pBX 质粒、pBX-ntf 质粒共转染 SGC7901 细胞，经强力霉素诱导后，结果显示，后者荧光素酶活性(3 次实验平均的 RLU 值为21 558)接近前者荧光素酶活性(3 次实验平均 RLU 值为6 134)4 倍；转染 pTET-OFF 质粒和 pBX-neo 质粒的 7901 细胞经诱导后荧光素酶活性接近 pTET-OFF 质粒和 pBX-ntf 质粒共转染的 7901 细胞组。此结果表明转染入胃癌细胞中的端粒片段降低了存在它附近荧光素酶报道基因的表达水平。

3 讨论

TET-OFF 基因表达调控系统是目前一种实现在真核细胞对转染目的基因进行严密、特异、高效地调控系统[3]。其中，pTET-OFF 是系统的调节部分，由 CMV 启动子调控表达调节蛋白 tTA，pTRE2-Hyg 是反应质粒，含有四环素反应元件(TRE)，可插入目的基因。在缺少四环素时，tTA 结合 TRE 时，TET-OFF 基因表达，激活目的基因转录。pTRE2-Hyg 含有嘌呤霉素抗性基因，可对 TET-OFF 建立的细胞克隆进行筛选。pTRE2-Hyg-Luciferase 是报告载体，在四环素存在和缺乏的情况下检测荧光素酶活力，常用于筛选及分离具有最佳诱导效果和最低背景的 TET-OFF 细胞株。

本实验通过脂质体介导的瞬时转染方法，将 TET-OFF 基因表达调控系统质粒转染胃癌细胞。通过不同浓度强力霉素的加入，观察强力霉素诱导的调控反应和量效关系后，确定转染 TET-OFF 基因表达调控系统的胃癌细胞 SGC7901 受强力霉素的诱导抑制。然后将插入有端粒片段的以荧光素酶为目的基因的报道质粒及对照质粒转染分别转染胃癌细胞，强力霉素作用下发现，转染有端粒片段的质粒，其荧光素酶活性下降 4 倍。这提示：胃癌细胞中，端粒的存在影响了它附近基因的表达。

文献[4～6]报道端粒位置效应与端粒长度有关，与染色质中组蛋白表达水平和状态有关。细胞在多次分裂复制后逐渐衰老，其间许多蛋白发生程序性[7]表达水平改变。那么，哺乳动物细胞端粒位置效应是否通过端粒进行性缩短，端粒附近沉默基因重新表达从而干预许多预衰老程序化改变，引起相应基因表达模式的改变呢，并影响细胞和器官功能呢？目前重要的是，鉴定受到端粒长度影响的内源性基因，从而确认端粒位置效应确实影响细胞衰老或癌症发生的生理及病理过程，揭示肿瘤发生及衰老的秘密。

参考文献：

[1] Baur J A, Zou Y, Shay J W, *et al*. Telomere position effect in human cells [J]. Science, 2001, 292(5524): 2075－2077.

[2] Kilburn A E, Shea M J, Sargent R G, *et al*. Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21 (1): 126－135.

[3] Yin D X, Zhu L, Schimke R T. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression[J]. Anal Biochem, 1996, 235(2): 195－201.

[4] Wood J G, Sinclair D A. TPE or not TPE? It's no longer a question[J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(1): 1－4.

[5] Ning Y, Xu J F, Li Y, *et al*. Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12 (11): 1329－1336.

[6] Koering C E, Pollice A, Zibella M P, *et al*. Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity [J]. EMBO Rep, 2002, 3(11): 1055－1061.

[7] Lengauer C, Kinzler K W, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers [J]. Nature, 1998, 396(6712): 643－649.

(编辑 龙 亮)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有 1 个、2 个或 3 个，但“姓”只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q.

本刊编辑部