论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1338-04

人端粒酶催化亚基启动子联合 *mad*1 基因体外抑制膀胱癌细胞的研究

罗春丽[1],蔡晓钟[1],邹 琳[1],唐 敏[1],胡宏波[1],吴小候[2] (重庆医科大学:[1]检验系实验诊断教研室,[2]第一附属医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨人端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)启动子联合 *mad*1 基因对膀胱癌细胞 T24 和 EJ 细胞的生长抑制作用及机制。**方法** 采用细胞计数、电子显微镜、流式细胞术、RT-PCR 及免疫组化等方法,观察 hTERT 启动子联合 *mad*1 基因表达质粒转染 T24 和 EJ 细胞后的膀胱肿瘤细胞的增殖能力、生长周期、细胞超微结构的变化以及 hTERT 和 TGF-β1 mRNA 基因和蛋白表达影响。**结果** 转染 hTERT 启动子联合 *mad*1 基因后对 T24 和 EJ 细胞生长有明显抑制作用、出现凋亡小体和细胞周期相的改变,S 期细胞明显减少,G_0/G_1 期细胞明显增多,下调 T24 和 EJ 细胞 hTERT 和 TGF-β1 的 mRNA 表达,并能抑制 hTERT 和 TGF-β1 蛋白表达。**结论** hTERT 启动子联合 *mad*1 基因能够抑制膀胱肿瘤细胞的增殖能力,可望为膀胱癌基因治疗提供新思路。

关键词:hTERT 启动子;*mad*1 基因;膀胱癌细胞;基因治疗
中图法分类号:R394.2; R73-36; R737.14 **文献标识码**:A

Inhibition of combination of hTERT promoter and *mad*1 gene on bladder cancer cell proliferation

LUO Chun-li[1], CAI Xiao-zhong[1], ZOU Lin[1], TANG Min[1], HU Hong-bo[1], WU Xiao-hou[2] ([1]Department of Laboratory Diagnosis, Laboratory Medicine Faculty, [2]Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of the growth inhibition of bladder cancer cells by combination of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter and *mad*1 gene. **Methods** The cell proliferation, cell cycle progression, cell ultrastructure alterations, mRNA and protein expression of hTERT and TGF-β1 were detected by cell counting, transmission electron microscopy (TEM), flow cytometry (FCM), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry after T24 and EJ cells were respectively treated with hTERT promoter and mad1 gene plasmids. **Results** Bladder cancer cell growth were suppressed, apoptotic bodies were observed, and the cell number of S phase decreased while the cells of G_0/G_1 increased, both mRNA and protein expression of hTERT and TGF-β1 was decreased after hTERT promoter and *mad*1 gene transfected into T24 and EJ cells. **Conclusion** Combination of hTERT promoter and *mad*1 gene could inhibit the proliferation of bladder cancer cells, which may provide a new idea for gene therapy of bladder carcinoma.

Key words: hTERT promoter; *mad*1 gene; bladder cancer; gene therapy

细胞获得永生化,具备无限的增殖能力主要依赖于细胞内端粒酶的激活,而人端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是决定端粒酶活性最重要的因素。研究表明[1,2],膀胱癌 T24 和 EJ 细胞 hTERT 均表达阳性。膀胱肿瘤组织中 hTERT 阳性表达率 100%,正常膀胱粘膜表达阴性。利用启动子调控外源性基因的表达,获得相对特异性的肿瘤靶向作用近年来有不少报道,现已有一些组织或细胞的特异的启动子被鉴定用于基因表达的调控,如靶向结肠癌和肺癌的癌胚抗原[3],*mad*1 基因作为有丝分裂点检查蛋白,对细胞增殖有明显抑制作用[4],因此我们利用 hTERT 启动子联合 *mad*1 转染膀胱癌 T24 和 EJ 细胞,观察 hTERT 和 TGF-β1 表达变化,及对膀胱癌细胞生长的影响,探讨膀胱癌基因治疗新方法。

基金项目:重庆医科大学创新基金项目资助(CX200205)
Supported by the Research Foundation for Innovation of Chongqing University of Medical Sciences (CX200205)
作者简介:罗春丽(1957-),女,重庆市人,教授,主要从事泌尿系肿瘤方面的研究。电话:(023)68485223
收稿日期:2004-11-25;**修回日期**:2005-04-25

1　材料和方法

1.1　材料来源

1.1.1　主要试剂　　RPMI1640 购自 Gibco 公司，限制性内切酶、DOTAP 阳离子脂质体转染试剂购自 Roche 公司，Ex *Taq* 酶、RNA 提取试剂盒等购自 TaKaRa 公司。

1.1.2　细胞株、质粒　　人膀胱移行细胞癌细胞株 T24 细胞由本室保存；EJ 细胞由第三军医大学泌尿外科实验室提供；正常人原代成纤维细胞由重庆医科大学病理生理实验室提供。空载质粒：pcDNA3.1/(+)购自 Invitrogen 公司；含人 *mad*1 基因的质粒：pcDNA3.1/ *mad*1 由美国 NIH 癌症研究中心 J Carl Barrett 教授惠赠。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与转染　　常规培养膀胱癌 T24、EJ 细胞和成纤维细胞，取对数生长期细胞用于转染。DOTAP 阳离子脂质体转染按试剂盒说明书进行：用 10 mmol/L Hepes 缓冲液将 hTERT 启动子 1.0 μg + pcDNA3.1/*mad*1 1.0 μg 稀释至 25 μl，按质粒 DNA∶脂质体为 1∶6 的比例吸出 DOTAP 脂质体稀释至 50 μl，二者混匀，室温放置 15 min，加入 1.5 ml 完全培养基即为转染培养基，37 ℃，5% CO_2 培养 10 h，1 次/h，换新鲜培养液继续培养 72 h，收获细胞。以 pGL3 空载 1.0 μg + pcDNA3.1/(+)空载 1.0 μg 为对照，hTERT 启动子 1.0 μg + pcDNA3.1/*mad*1 1.0 μg 为治疗组。

1.2.2　细胞培养计数　　将上述 3 株转染细胞分别接种 5.0×10^3 个细胞于 96 孔板上，对照组和治疗组平行培养 5 d，每天各取 3 孔，台盼蓝染色，计数，每孔重复计数 3 次，根据每组细胞的均值绘制细胞生长曲线。

1.2.3　电镜检测　　T24 和 EJ 细胞治疗组和对照组作用 96 h 后，收获细胞，PBS 洗涤，4 ℃冷戊二醛固定 2 h 后，浸泡于 PBS 中，电子显微镜室常规透射电镜制样，观察及摄像。

1.2.4　流式细胞仪分析　　T24、EJ 细胞和成纤维细胞治疗组和对照组作用 72 h 后，收获细胞，75% 乙醇固定，RNase 消化，碘化丙啶(PI)室温染色 30 min，经 Beckman Coulter 流式细胞仪检测细胞周期相分布和细胞凋亡情况。

1.2.5　RT-PCR 检测　　治疗组作用前后的 3 种细胞，收获 10^6 个细胞，提取总 RNA，采用 M-MLV 逆转录酶进行 RT，各基因的引物序列及反应主要参数如下：

hTERT：正义：5′-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3′；反义：5′-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3′。PCR 反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 1 min，60 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 7 min，合成目的片段 145 bp。

TGF-β1：正义：5′-GCCCTGGACACCAACTATTGCT-3′；反义：5′-AGGCTCCAAATGTAGGGCAGG-3′。PCR 反应条件：95 ℃ 5 min；93 ℃ 45 s，54 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 7 min，合成目的片段 161 bp。

GAPDH：正义：5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′；反义：5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3′。PCR 反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 1 min，60 ℃ 30 s；72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 7 min，合成目的片段 208 bp。

1.2.6　免疫组化方法检测　　将消毒无菌的小盖玻片置入 12 孔细胞培养板中，每孔分别加入 T24、EJ 细胞和成纤维细胞 5×10^3 细胞，24 h 后进行转染，继续培养 72 h 后收获细胞，经冷 95% 乙醇固定后，1/100 anti-hTERT 和 1/100 anti-TGF-β1 37 ℃孵育 1 h，再经 PBS 洗涤和 SABC 及 DAB 显色，脱水，透明，封片，观察 hTERT 和 TGF-β1 的蛋白表达变化。

1.3　统计学处理

所有数据采用 SAS 统计软件包进行 t 检验。

2　结果

2.1　观察转染 hTERT 启动子联合 *mad*1 对膀胱癌细胞增殖能力的影响

转染 hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 对 T24 和 EJ 细胞生长有抑制作用，出现细胞生长受抑；而对正常成纤维细胞的生长无明显抑制作用。对照组 pGL3 空载 + pcDNA3.1/(+)空载后各细胞仍保持良好的生长状况(表 1)。

表 1　不同作用组处理不同细胞后的生长情况 ($\times 10^3$)

Tab 1　The growth of EJ, T24 and primary fibrocytes in treatment group and control group ($\times 10^3$)

Time (d)	Cultivated cell number					
	EJ (control)	EJ (treatment)	T24 (control)	T24 (treatment)	Normal (control)	Normal (treatment)
1	5.3	4.8	5.6	4.5	5.7	5.3
2	6.0	4.6	6.1	4.3	6.4	6.1
3	6.5	4.2	6.6	3.8	6.7	6.4
4	8.1	3.9	7.7	3.6	7.9	7.0

2.2　hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 对膀胱癌细胞的影响

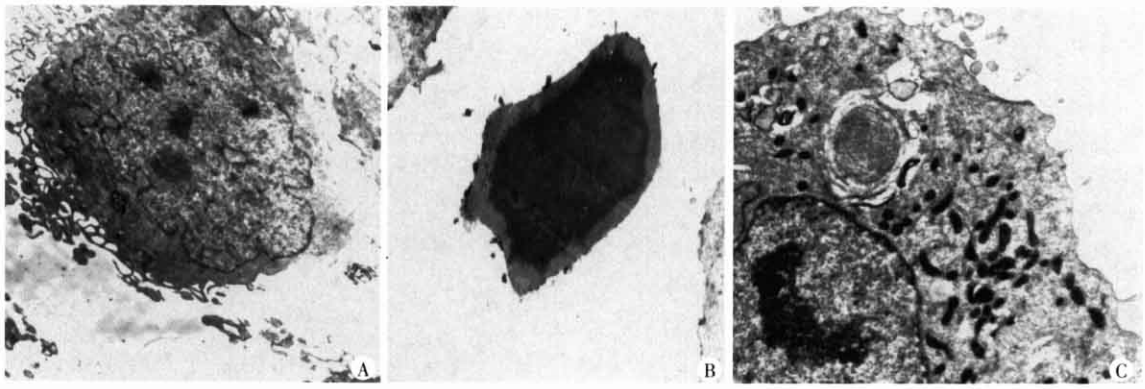
转染 hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 后，在透射电子显微镜下观察到 T24 或 EJ 细胞出现凋亡小体、细胞膜髓样结构等超微结构改变(图 1A～C)，对照组 pGL3 空载 + pcDNA3.1/(+)空载作用 T24、EJ 和正常成纤维细胞时，细胞超微结构无明显改变。

2.3　hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 对膀胱癌细胞生长周期的影响

hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 作用后，T24 和 EJ 细胞出现细胞周期相的改变，S 期细胞明显减少，G_0/G_1 期细胞增多，对照组 pGL3 空载 + pcDNA3.1/(+)空载作用 T24、EJ 和正常成纤维细胞时细胞周期无明显变化，提示经 hTERT 启动子与 *mad*1 真核表达质粒共同作用膀胱癌细胞后，细胞的无限增殖活性减弱。

2.4　hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 对膀胱癌细胞 hTERT 和 TGF-β1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果以琼脂糖凝胶电泳条带的亮度和吸光度值(D)来判断，凝胶电泳条带越亮，D 值越大，提示其 mRNA 表达越高。实验结果(图 3)显示，hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 作用可引起 T24 和 EJ 细胞 hTERT 和 TGF-β1 的 mRNA 表达下降，D 值分别下降 3.5 和 2.4 倍，而对照 pGL3 空载 + pcDNA3.1/(+)空载对 T24 和 EJ 细胞内的 hTERT 和 TGF-β1 的 mRNA 表达几乎无影响。同时对正常成纤维细胞的 hTERT 和 TGF-β1 的 mRNA 表达也未产生影响($P > 0.05$)。



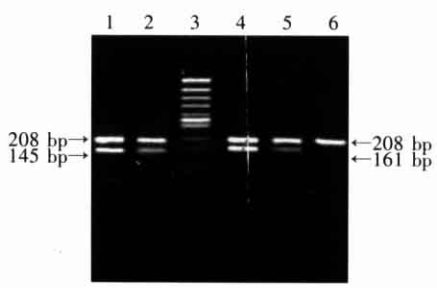
A: Low-differential T24 cells in control group (TEM × 6 000); B: Apoptotic body in EJ cells in treatment group (TEM × 15 000); C: Myelin figure of cell membrane of T24 cells in treatment group (TEM × 12 000)

图 1 不同处理组细胞超微结构的观察

Fig 1 Cell ultrastructure of treatment and control groups

2.5 hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 对膀胱癌细胞 hTERT 和 TGF-β1 蛋白表达影响

免疫细胞化学以细胞核或细胞浆内呈棕染,以及胞浆或核内有棕色颗粒者视为免疫阳性细胞。实验结果显示,T24 和 EJ 细胞经 hTERT 抗体免疫细胞染色后可见细胞核和核膜棕染,细胞核内有较多的棕色颗粒,在正常成纤维细胞经 hTERT 和 TGF-β1 抗体染色后均未见细胞核及核膜、细胞浆颜色深染,也无棕色颗粒出现。hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 作用 T24 和 EJ 细胞 72 h 后,hTERT 和 TGF-β1 蛋白表达呈现不同变化。hTERT 启动子 + pcDNA3.1/*mad*1 作用可引起 T24 和 EJ 细胞的 hTERT 和 TGF-β1 蛋白表达下降,抗体相应的阳性部位细胞浆、胞核或核膜内的染色变浅,棕色颗粒减少,各自平均的 IOD 值下降了 2.8 和 2.0 倍($P<0.05$);而对照组 pGL3 空载 + pcDNA3.1/(+) 空载对 T24 和 EJ 细胞内的 hTERT 和 TGF-β1 的蛋白表达几乎无影响,抗体相应的阳性部位胞核或胞浆内的染色未见变浅和大量棕色颗粒存在,IOD 值变化不明显($P>0.05$)。各处理组对正常成纤维细胞内 hTERT 和 TGF-β1 的蛋白表达也无影响,染色未见明显变化($P>0.05$)。



1-2: hTERT expressed at 145 bp; 1: control group; 2: treatment group; 3: DNA marker; 4-5: TGF-β1 expressed at 161 bp; 4: control group; 5: treatment group; 6: Each lane had inner control GAPDH band, which expressed uniformly at 208 bp in each group

图 3 不同处理组 hTERT 和 TGF-β1 mRNA 表达水平的检测

Fig 3 The expression of hTERT and TGF-β1 mRNA in T24 cells in treatment and control groups

3 讨论

hTERT 位于人染色体的 5p21 上,具有逆转录酶活性,是端粒酶活性的主要决定因素,通过调控 hTERT 转录水平的表达,可以有效控制端粒酶活性[5]。在膀胱肿瘤细胞中 hTERT 则被激活呈高表达,正常膀胱粘膜表达阴性[1],由此可以推断 hTERT 参与了膀胱肿瘤细胞永生化增殖,在膀胱癌的发生、发展过程中起着重要作用。抑制 hTERT 活性就可能抑制端粒酶的表达,从而抑制膀胱肿瘤细胞的生长,因此,hTERT 可以作为膀胱肿瘤基因治疗理想的靶点,以 hTERT 启动子调控 hTERT 肿瘤基因的表达,进而达到靶向膀胱肿瘤细胞并抑制肿瘤细胞的目的。

bHLH 家族基因是指具有碱性-螺旋-环-螺旋结构的一大类基因,其成员主要有 *mad*1、*c-myc* 等基因,近年来研究发现他们在细胞的增殖、分化和凋亡方面起着重要作用。Wu 等[6,7]的研究证实了 *c-myc*/mad 网络由于具有 E-box(CACGTG)结合位点能作用于多种基因的启动子部位对基因的转录活性进行调控。抑癌基因 *mad*1 由于具有碱性螺旋-环-螺旋结构,故能作为转录调节因子对多种基因进行表达调控。*mad*1 位于人染色体的 2p12-2p13 上,其 cDNA 编码的蛋白质共有 220 个氨基酸,分子质量约为 25.2×10^3。*mad*1 对细胞的增殖抑制表现为能负相调节细胞由 G_1 期至 S 期的转变,使细胞停滞于细胞周期中的 G_1 阶段,诱导细胞的分化[4]。它促进细胞分化的另一机制在于可作为细胞有丝分裂的检查点蛋白,在细胞周期转化变化时含量增多,使细胞增殖停滞在 G_1 期[8]。*mad*1 的不同羧基末端(CT)缺失也会引起其 bHLH 结合位点的改变导致 *mad*1 蛋白功能的变异,导致细胞生长抑制。细胞有丝分裂作用时 *mad*1 多和其羧基末端的共阻遏物 mSin3A

或 mSin3B 复合物和一起协调抑制。

将抗肿瘤基因特异地导入到肿瘤细胞并有效控制肿瘤基因的表达，以达到抑制或杀伤肿瘤细胞的目的，Koga 等[9]构建了 hTERT 启动子驱动的 *caspase* 基因表达载体，进行体内外实验，在端粒酶及 hTERT mRNA 均为阳性表达的包括前列腺癌、恶性胶质瘤、乳腺癌、膀胱癌等 10 种肿瘤细胞系中，hTERT 启动子驱动的 *caspase* 基因表达，并诱导细胞发生高水平的凋亡。目前 hTERT 启动子联合 *mad*1 对膀胱肿瘤生长抑制研究尚少有报道，本研究表明转染 hTERT 启动子联合 *mad*1 基因，发现其对膀胱癌细胞内的 hTERT 和 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白表达下调，而对正常成纤维细胞的生长无抑制作用，提示 hTERT 启动子联合 *mad*1 基因可以通过这些途径来达到抑制膀胱癌细胞的增殖与生长的作用。由此笔者认为，hTERT 启动子联合 *mad*1 基因可望为膀胱癌基因治疗提供新思路。

参考文献：

[1] 邹 琳，罗春丽，涂植光. 膀胱肿瘤中端粒酶逆转录酶和 C-myc 的表达研究[J]. 临床检验杂志，2003，21(特)：51－53.

[2] Suzuki T, Suzuki Y, Fujioka T. Expression of catalytic subunit associated with telomerase gene in human urinary bladder cancer [J]. J Urol, 1999, 162(6): 2217－2220.

[3] Ueno M, Koyama F, Yamada Y, *et al*. Tumor-specific chemo-radio-gene therapy for colorectal cancer cells using adenovirus vector expressing the cytosine deaminase gene [J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A): 2601－2608.

[4] Ayer D E, Kretzner L, Eisenman R N. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity[J]. Cell, 1993, 72 (2): 211－222.

[5] Horikawa I, Cable P L, Afshari C, *et al*. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene [J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 826－830.

[6] Wu K J, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by c-MYC [J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220－224.

[7] Xu D, Popov N, Hou M, *et al*. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(7): 3826－3831.

[8] Roussel M F, Ashmun R A, Sherr C J, *et al*. Inhibition of cell proliferation by the Mad1 transcriptional repressor [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16 (6): 2796－2801.

[9] Koga S, Hirohata S, Kondo Y, *et al*. A novel tolomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter [J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(10): 1397－1406.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2005)13-1341-01

个案与短篇

术中立止血静注致哮喘 1 例

A case of asthma caused by intravenous injection of Reptilase during operation

刘荣胜[1]，易 斌[2]（[1] 重庆市合川人民医院麻醉科，合川 401520；[2] 第三军医大学西南医院手术麻醉科，重庆 400038）

患者女，33 岁，身高 160 cm，体质量 52 kg，一般情况较好，ASA Ⅱ级。自述既往无支气管哮喘、慢性支气管炎、药物过敏史。因胃癌在全麻下经腹切口行胃癌根治术。术前 0.5 h 阿托品 0.5 mg、鲁米那钠 0.1 mg 肌注。使用 Datex-ohmeda 7800 型麻醉机静吸复合麻醉。以氟芬合剂、咪唑安定 2 mg、硫喷妥钠 5 mg/kg、琥珀胆碱 1.5 mg/kg 行快速诱导麻醉，气管深度 21 cm。定容呼吸模式，吸入纯氧，潮气量(VT)8～12 ml/kg，保持呼吸末 CO_2 浓度在 35 mmHg 左右。通过间断注射芬太尼、维库溴铵，持续吸入异氟醚维持麻醉；术中维持较合适的麻醉深度、血压水平，通过中心静脉压监测维持较稳定的血容量，输液种类包括平衡液、羟乙基淀粉等。手术开始 1 h 顺利，患者生命体征平稳，SPO_2 保持在 100%，气道压力波动在 1.5～2 kPa。未进行特殊手术操作情况下，因术野渗血给予立止血 1 000 U 静脉注射。约 3 min 后，呼吸机发生高压报警，吸气峰压达 4.5 kPa，SPO_2 降至 78%，HR 升至 136 次/min，呼吸末 CO_2 下降至 20 mmHg 左右；立即检查呼吸回路，无异常发现；检查气管位置未发生变化；气管内吸痰时未发现气管阻塞；立即进行双肺听诊，发现双肺满布哮鸣音。嘱外科医师暂停手术，进行手工快速正压通气支持，静脉注射地塞米松 20 mg，氨化可的松 100 mg、2.5% 氨茶碱 10 ml 加入 250 ml 盐水中快速静滴。15 min 后 SPO_2、$PetCO_2$、HR、气道压力回复到正常水平；双肺哮鸣音逐渐减轻，20 min 后完全消失。顺利完成外科手术。术后第 3 天在病房以立止血 10 U 皮下试验呈阳性。患者 2 周后痊愈出院。

讨论

立止血(Reptilase)有“类凝血酶”和“类凝血激酶”样作用，能促进出血部位的血小板聚集，释放出凝血因子Ⅲ而被激活，然后激活第Ⅹ因子，协同第Ⅴ因子及磷脂，加速外源性凝血过程；

（下转 1344 页）

作者简介：刘荣胜(1965－)，男，重庆合川市人，主治医师，主要从事临床麻醉方面的研究。电话：(023)42823120-3019

收稿日期：2005-01-12；修回日期：2005-04-23