文章编号:1000-5404(2005)15-1593-03

论著

凋亡素基因转染对人胆管癌细胞凋亡作用的研究

陈 健,王曙光 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨凋亡素对人胆管癌细胞凋亡的影响。**方法** 以PCR方法获得凋亡素基因,然后运用T4连接酶将凋亡素基因和含荧光蛋白基因的质粒pAdtrack-CMV连接,通过酶切和测序证实成功构建重组质粒。再以DOTAP脂质体介导凋亡素基因转染人胆管癌细胞株QBC_{939}。通过TUNEL染色证实凋亡素能否导致人胆管癌细胞的凋亡。**结果** 酶切和测序均证实了成功构建含凋亡素基因和荧光蛋白基因的重组质粒。TUNEL染色显示凋亡素基因的转染引发人胆管癌细胞株QBC_{939}的凋亡率与对照组相比具有非常显著的差异($P<0.01$)。**结论** 凋亡素能诱导培养的人胆管癌细胞的凋亡,在胆管癌的基因治疗上有深入研究的价值。

关键词: 凋亡素;转染;人胆管癌细胞;基因治疗
中图法分类号: R394.2; R730.59; R735.8 **文献标识码:** A

Apoptosis of human bile duct carcinoma cell induced by Apoptin gene transfection

CHEN Jian, WANG Shu-guang (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the apoptosis of human bile duct carcinoma cell induced by Apoptin gene transfection *in vitro*. **Methods** Apoptin gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then inserted into pAdtrack-CMV containing green fluorescent protein gene through T4 DNA ligase. The reconstructed plasmids were identified by enzyme digestion and sequencing. Apoptin expression vector was transfected into human bile duct carcinoma cell line QBC_{939}. The apoptosis of human bile duct carcinoma cell induced by Apoptin gene was detected by TUNEL. **Results** Reconstructed pAdtrack-CMV containing Apoptin gene was obtained successfully. TUNEL test showed that there was significant difference in apoptosis index between Apoptin gene transfection and the control group ($P<0.01$). **Conclusion** Apoptin can induce apoptosis of human bile duct carcinoma cell. It may be a promising tool for the gene therapy of cholangiocarcinoma.

Key words: Apoptin; transfection; human bile duct carcinoma; gene therapy

凋亡素(Apoptin)是来源于鸡贫血病毒(chicken anemia virus, CAV)的小分子蛋白质。它能引发一些肿瘤细胞和转化细胞的凋亡,而对正常细胞无此作用。在肿瘤的治疗上具有巨大潜力[1]。而胆管癌的治疗目前难尽人意。我们通过运用转凋亡素基因观察其对人胆管癌细胞凋亡作用的影响,以期摸索胆管癌新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

含凋亡素基因质粒Pblue BakPac-A由北京畜牧兽医研究所杨兵研究员惠赠;高纯度质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自Omega公司(美国);脂质体DOTAP购自Roche公司(德国);含荧光蛋白基因的pAdtrack-CMV质粒由西南医院全军烧伤研究所贺伟峰博士提供;人胆管癌细胞株QBC_{939}由本研究所王曙光教授建株;TUNEL试剂购自Roche公司(德国);六孔板购自Costar公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 凋亡素基因的获得 采用PCR获得凋亡素基因,其引物为:上游引物:5′-AGGCTCGAGTAATTTCAAATGAACGCT-3′,下游引物:5′-TCTGCGGCCGCGTCTTGCCATCTTAC-3′。

在上游引物中含有Xho1酶切位点;在下游引物中含有Not1酶切位点。引物合成由上海申友生物技术有限公司合成。PCR体系50 μl包括10×Mg-Free Buffer 5 μl,2 mmol/L 4×dNTP 2 μl,25 mmol/L $MaCl_2$ 3 μl,10 pmol/L引物各0.5 μl,含凋亡素基因质粒0.5 μl,*Taq*酶1.5 U,去离子水37 μl。置PCR扩增仪(Bio-Rad公司)上扩增。条件为95℃预变性5 min,然后变性、退火、延伸分别为94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,循环30次后,72 ℃延伸5 min。PCR产物以含0.5 mg/L溴化乙锭(EB)的0.8%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪分析结果。

1.2.2 凋亡素基因与pAdtrack-CMV质粒的连接 采用凝

基金项目:重庆市科委资助项目(2002012)
Supported by the Research Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2002012)
作者简介:陈 健(1970-),男,云南省陆良县人,博士,讲师,主要从事胆管癌方面的研究。电话:(023)68752879,E-mail: chenjian2000425@yahoo.com.cn
通讯作者:王曙光,电话:(023)68754181
收稿日期:2005-03-03;修回日期:2005-03-24

胶回收试剂盒回收凋亡素基因，将回收的凋亡素基因用 T4 DNA 聚合酶（TaKaRa 公司）末端平滑化。根据 pAdtrack-CMV 质粒的酶切图谱采用 *Eco*R Ⅴ 酶切线性化质粒，并且为平滑化末端线性质粒。再采用碱性磷酸酶（TaKaRa 公司）进行去磷酸化处理防止自身环化。最后用 T4 连接酶（TaKaRa 公司）将凋亡素基因与线性化的 pAdtrack-CMV 质粒连接。

1.2.3 重组质粒的鉴定 酶切鉴定：使用绿化钙法将重组质粒转入 DH5α 感受态中进行扩增，质粒提取试剂盒大批量提取。用 *Hind*Ⅲ 酶切鉴定正向连接的重组质粒。由于在凋亡素基因的 305 bp 处有个 *Hind*Ⅲ 酶切位点，同时在质粒的酶切区域也有 1 个同样的酶切位点，所以我们选取它来鉴定正向连接。如果没连接上目的基因则不能切除条带。如果能切除一条条带说明含有目的基因。如果目的基因与载体是反向连接的则只能切出约 70 bp 的 1 条条带，很难分辨出。只有正向的连接才能切除 300～400 bp。测序鉴定：将酶切鉴定为正向的含凋亡素基因的重组质粒菌液送上海博亚生物技术有限公司测序。

1.2.4 细胞转染 用脂质体转染法转染六孔板内的人胆管癌细胞爬片（5×10^5/孔），同时转染空白质粒 pAdtrack-CMV 作为阴性对照。通过观察发荧光细胞数来计算转染率（细胞记数不少于 300），在转染效率最高后 48 h 收集细胞爬片。

1.2.5 人胆管癌细胞爬片的 TUNEL 染色 人胆管癌细胞爬片的 TUNEL 染色严格按照试剂盒说明书进行。同时计算凋亡率（apoptosis index，AI）。

凋亡率 =（阳性细胞数/500 个细胞）×100%。

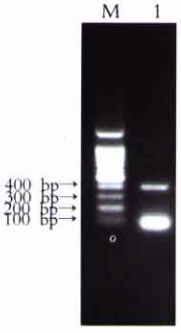
1.3 统计学处理

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 凋亡素基因的获得

运用 PCR 方法成功扩出凋亡素基因，在 400 bp 处清楚观察到凋亡素基因条带（图 1）。



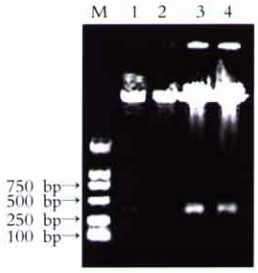
M：100 bp DNA marker；1：Apoptin gene

图 1 凋亡素基因的 PCR 扩增图

Fig 1 PCR results of Apoptin gene

2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 酶切鉴定 如图 2 所示：在 1、3、4 泳道上能观察到相应的质粒用 *Hind*Ⅲ 酶成功地切出 300～400 bp 的条带，说明这些质粒含有正向连接的凋亡素基因。



M：DL2000 DNA marker；1－4：The recombinant plasmid containing Apoptin gene

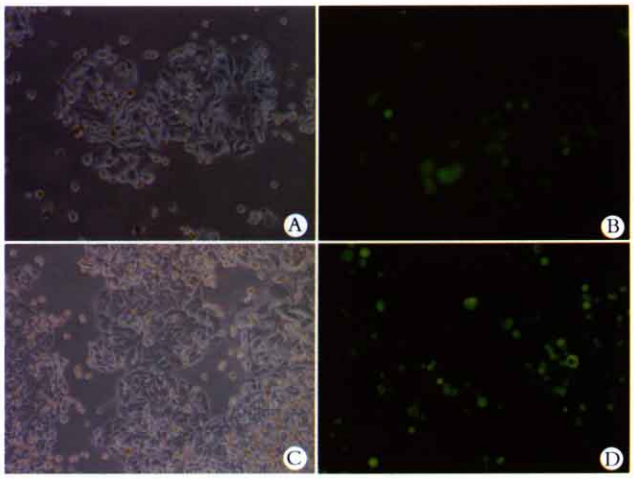
图 2 重组质粒 HindⅢ酶切在 0.8% 的琼脂糖凝胶上的电泳图

Fig 2 Electrophoresis of the recombinant plasmid digested with *Hind* Ⅲ on 0.8% agarose gel

2.2.2 测序鉴定 将测序结果与 GenBank 数据库中的凋亡素基因匹对，结果 100% 完全匹对。证实为完整的凋亡素基因。

2.3 人胆管癌细胞株 QBC_{939} 的转染及 TUNEL 染色

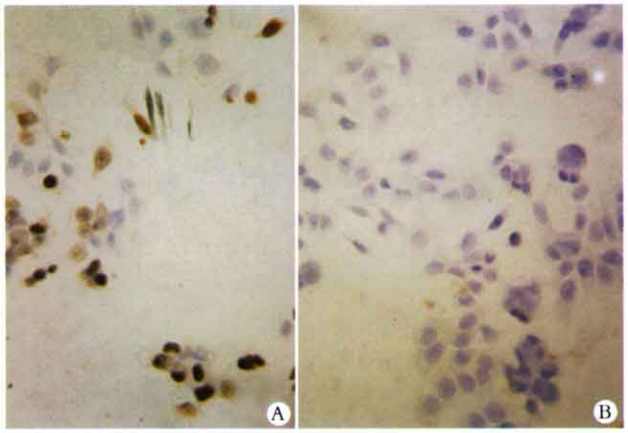
在转染后 48 h 观察到绿色荧光人胆管癌细胞数到达高峰。其中含凋亡素基因质粒转染的阳性细胞率为（22.5±4.56）%，与空质粒相比（24.4±5.78）% 不具有显著性差异（$P>0.05$）（图 3）。同时细胞也出现不同程度的脱落死亡，其中含凋亡素基因组的脱落、死亡细胞数较空质粒组多（图 3）。此时收集细胞爬片进行 TUNEL 染色。结果显示含凋亡素基因质粒组的凋亡率为（36.84±5.8）%，与空质粒组（12.54±3.56）% 相比具有非常显著差异（$P<0.01$）（图 4）。提示凋亡素基因的转染能诱导人胆管癌细胞株 QBC_{939} 的凋亡。



A：Group of plasmid transfection containing Apoptin gene（Light microscope ×400）；B：Group of plasmid transfection containing Apoptin gene（Fluorescence microscope ×400）；C：Control group（Light microscope ×400）；D：Control group（Fluorescence microscope ×400）

图 3 重组质粒转染后人胆管癌细胞株 QBC_{939} 的光镜和荧光观察

Fig 3 Human bile duct carcinoma cell QBC_{939} on day 2 after the recombinant plasmid transfection



A: Group of transfection plasmid containing Apoptin gene; B: Control group

图 4　人胆管癌细胞株 QBC_{939} 的凋亡　(TUNEL×400)

Fig 4　Apoptosis of human bile duct carcinoma cell line QBC_{939} (TUNEL×400)

3　讨论

1994 年,Chalfie 等[2]从研究维多利亚水母发光现象中分离纯化出绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因,由于其荧光稳定,检测方便, 分子量小,蛋白性质极为稳定,转染细胞后不影响目的基因的表达及目的蛋白的结构和功能,对细胞无毒性作用,易于耐受高温等处理,已被作为一种标记基因广泛应用到生物学的各个领域。我们构建的含荧光蛋白基因和凋亡素基因的真核表达载体在转染宿主细胞时能通过荧光的观察来确定感染情况,在它的指导下能不断改善转染条件,使转染达到很高的水平,同时也能明确目的基因已经进入细胞并发挥作用,使我们的实验更直观和可靠,达到事半功倍的效果。

对于正常胆管上皮细胞来说,其细胞的更新和凋亡是维持动态平衡的。在致瘤因素的长期作用下,必然会引发癌基因和抑癌基因的突变,特别是凋亡相关基因的突变,使本该凋亡的缺陷细胞得以生存下来,长期的增殖就可能形成肿瘤[3]。所以胆管癌的发生、发展是伴随着机体细胞凋亡异常的。而当胆管癌形成后由于局部缺血、基质反应失控和内在的凋亡机制的激活会出现自发的凋亡现象[4]。张丰深等[5]发现胆管癌临床标本的自发凋亡率约为 7.89%,而且低分化和具有转移潜能的人胆管癌细胞的自发凋亡率较低,由此判断自发凋亡率低的人胆管癌细胞可能具有更多的逃避凋亡的机制,因此诱发转化的胆管上皮细胞和人胆管癌细胞的凋亡在预防和治疗胆管癌以及抑制其转移都具有重要意义。

凋亡素是外来蛋白,其对多数转化细胞和肿瘤细胞具有促凋亡作用,而对正常细胞无凋亡效应和毒副作用[6~8]。多位研究人员均观察到同样的现象[6~8]:在转染含凋亡素的质粒后的肿瘤细胞和转化细胞中,凋亡素是呈细颗粒状集中分布于细胞核中,随着凋亡素的积累,肿瘤和转化细胞直接发生凋亡;而在正常细胞中,凋亡素主要局限于细胞质或位于细胞核周边区域,并且不会引发凋亡。表明凋亡素的定位与功能密切相关。因而 Leliveld 等[9]推测凋亡素可能在核内引发凋亡,不象其它因素在细胞浆或细胞外,通过信号转导引发凋亡,并形象称凋亡素为凋亡的"核装置(nuclear switch)"。

因此我们构建了含凋亡素基因和荧光蛋白基因的真核表达载体,并将其导入人胆管癌细胞中。结果显示凋亡素基因能引发人胆管癌细胞株 QBC_{939} 的凋亡,与 Noteborn 等[10]在其它肿瘤中的研究结果相似,但凋亡率相对偏低,这与细胞转染有关。以后我们准备构建含凋亡素的腺病毒,一方面可大幅提高转染率,另一方面能进行动物体内实验,能充分了解凋亡素的作用及可能的机制。希望能探索出胆管癌新的治疗方法。

参考文献:

[1] Noteborn M H, Zhang Y H, van der Eb A J. Apoptin specifically causes apoptosis in tumor cells and after UV-treatment in untransformed cells from cancer-prone individuals: a review[J]. Mutat Res, 1998, 400(1-2): 447 - 455.

[2] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al*. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148): 802 - 805.

[3] 索金友, 顾红光. 胆道肿瘤相关基因的研究进展[J]. 消化外科, 2004, 3(4): 296 - 300.

[4] Kerr J F, Winterford C M, Harmon B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013 - 2026.

[5] 张丰深, 何振平, 马宽生, 等. 胆管癌组织中自发性细胞凋亡现象的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2000, 29(6): 381 - 383.

[6] Van der Eb M M, Pietersen F, Speetjens P, *et al*. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(1): 53 - 61.

[7] Leliveld S R, Zhang Y J, Rohn J L, *et al*. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 9042 - 9051.

[8] Zhang Y H, Leliveld S R, Kooistra K, *et al*. Recombinant Apoptin multimers kill tumor cells but are nontoxic and epitope-shielded in a normal-cell-specific fashion[J]. Exp Cell Res, 2003, 289(1): 36 - 46.

[9] Leliveld S R, Dame R T, Mommaas M A, *et al*. Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(16): 4805 - 4813.

[10] Noteborn M H, Todd D, Verschueren C A, *et al*. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis[J]. J Virol, 1994, 68(1): 346 - 351.

(编辑　栾　嘉)