文章编号:1000-5404(2007)01-0001-04

论著

双功能基因APE1敲低后人体骨肉瘤细胞基因表达谱变化的研究

王 东[1,2], 仲召阳[1,2], 李增鹏[2], 杨镇洲[1], Mark R Kelley[3] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心, [2]病理科,重庆 400042; [3]美国印地安纳大学医学院, 印地安纳 46202)

提 要:目的 探索APE1敲低后骨肉瘤细胞恶性表型受抑的可能机制,以及APE1相互作用的可能分子。**方法** 应用免疫印迹和AP核酸内切酶活性检测确证合成APE1 siRNA对人体骨肉瘤细胞HOS APE1基因的敲低作用;应用GEArray™ Q系列cDNA微阵列研究HOS细胞APE1敲低后基因表达谱的改变。**结果** APE1 siRNA对HOS细胞APE1基因具有特异性"敲低"作用,其抑制效率为91.5%。APE1抑制对cDNA微阵列六族途径均有影响,其中对细胞周期族基因影响较少;96个基因中有42个基因有明显变化(43.8%),其中CDK4、FGFR2、KAI1和NCAM1表达上升,其余38个基因表达均呈下降。**结论** APE1的敲低对骨肉瘤细胞的细胞周期及DNA损伤、细胞凋亡、信号转导、细胞黏附、血管生成、肿瘤转移途径基因均有影响。

关键词:骨肿瘤; RNA干扰;脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶; 基因微阵列
中图法分类号:R394-33; R394.3; R738.1 **文献标识码**:A

The altered gene profile of human osteosarcoma cell after knock-down of double functional gene apurinic/apyrimidinic endonuclease

WANG Dong[1,2], ZHONG Zhao-yang[1,2], LI Zeng-peng[2], YANG Zhen-zhou[1], Mark R Kelley[3] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; [3]Herman B Well Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, USA)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of inhibited malignant phenotype by knock-down of apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) in human osteosarcoma cell HOS, as well as the possible interacting molecules among APE1. **Methods** Knock-down of APE1 by synthesized APE1 siRNA in HOS cell was identified first by Western blotting and AP endonuclease assay, then the gene profile was determined with GEArray™ series Human CancerPathwayFinder gene array. **Results** The specific knock-down of APE1 was found in HOS cell transfected with APE1 siRNA, and its inhibited rate was 91.5%. Six biological pathways of the gene array were involved in HOS cell after knock-down of APE1, but the cell cycle pathway was less influenced. Forty-two out of 96 genes were altered (43.8%), in which only CDK4, FGFR2, KAI1 and NCAM were increased, 38 others were decreased. **Conclusion** The knock-down of APE1 was detected to be involved in all the pathways including cell cycle and DNA repair, apoptosis, signal transduction, adhesion, angiogenesis, invasion and metastasis. These findings are significant to further elucidate APE1 role in tumor genesis and to provide experimental evidence for gene therapy targeting APE1 gene in the future.

Key words: bone tumor; RNA interference; APE1; gene array

无嘌呤/无嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonudease, APE1),又称氧还因子Ref-1(redox factor-1),是一个具有双功能的蛋白[1]。APE1 2个功能分别位于2个分立的功能域,N-端(约127 aa)呈现氧还活性,C-端(约157 aa)则起DNA修复功能。2个功能域可以人为地分开而各自发挥作用,但对哺乳动物细胞的存活两者则是绝对不可缺少的[2]。RNA干扰(RNAi)是新近发展的一种转录后基因沉默技术,应用该技术敲低(knock-down)APE1的蛋白表达表现为凋亡增加,对放疗和细胞毒性化疗药物敏感性增加以及诱导内皮细胞迁移和肿瘤血管生成受抑[3-5]。为了探索上述骨肉瘤恶性表型受抑的可能机制,以及APE1相互作用的可能分子,我们应用cDNA微阵列技术研究人骨肉瘤细胞APE1敲低后分子表达谱的改变。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人骨肉瘤细胞株HOS源于ATCC细胞库,含10%胎牛血

基金项目:国家自然科学基金(30340044,30472004),第三军医大学校管基金(XG200357)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340044, 30472004) and the Scientific Research Funds by Third Military Medical University (XG200357)

作者简介:王 东(1964-),男,天津市人,博士,主任医师,教授,主要从事肿瘤DNA损伤修复及基因治疗方面的研究,发表论文50余篇。电话:(023)68757706,E-mail: dongwang64@hotmail.com

收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-11

清（Hyclone Laboratories, UT），2 mmol/L L-谷氨酰胺，0.1 mmol/L非必需氨基酸，1.0 mmol/L 丙酮酸盐，100 U/L 青霉素-100 μg/L 链霉素的 MEMα 培养基（Invitrogen CA），5% CO_2，37 ℃ 孵育。

1.2　APE1 siRNA 转染

参照 Wang[3] 设计的 APE1 siRNA cDNA 序列合成双链 siRNA（Dharmacon Res Inc, Lafayette, CO），并根据说明进行去保护和水化。APE1 双链 siRNA 的序列为：5′-GUCUG-GUACGACUGGAGUACC-3′；5′- UACUCCAGUCGUACCAGACCU-3′；无义对照双链 siRNA 的序列为：5′-CCAUGAGGUCAG-CAUGGUCUG-3′；5′ -GACCAUGCUGACCUCAUGGAA-3′。将处于对数生长期的 HOS 细胞浓度调整为 1×10^5/ml，选 5 ml 接种于 6 孔培养板中培养过夜。10 mmol/L Hepes 缓冲液将双链 siRNA 稀释至 100 μl，以 1∶2 比例加入 Optimen Ⅰ（总体积为 200 μl），室温放置 15 min。随后加入 PBS 洗涤过的待转染细胞中，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度培养 4～8 h，更换新鲜培养液继续培养。双链 siRNA 的终浓度分别为 50、100、200 nmol/L。

1.3　免疫印迹

收集细胞，PBS 洗涤 2 次，按 1×10^7 细胞加入 100 μl 细胞裂解液，低温 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液沸水煮沸 5 min，取上清测定蛋白浓度，用 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离。转 PVDF 膜，先后加入兔抗人 APE1 抗体（1∶2 000）和鼠抗 β-actin 抗体（1∶1 000）；加入二抗：3% BSA 40 ml＋抗兔 HRP-IgG 8 μl（工作浓度为 1∶5 000），同时加入 3% BSA 40 ml＋抗鼠 HRP-IgG 16 μl，室温反应 1 h，洗膜显影。Image-pro plus 4.5 图像分析系统测定各条带灰度值。

1.4　AP 核酸内切酶活性检测

AP 酶反应底物为中间含有 THF 残基的 26 个碱基单链寡核苷酸及互补链（University of Iowa），HEX-ATP 5′-末端标记后退火形成双链寡核苷酸[6]；当存在 AP 核酸内切酶时，即可产生 HEX 标记的 13 mer 寡核苷酸片段；收集细胞，超声破碎提取蛋白，Bradford 法蛋白定量（Bio-Rd Inc）。反应体积 20 μl，含 0～1 μg 蛋白提取物，0.2 pmol HEX 标记的底物和反应缓冲液；37 ℃孵育 15 min，甲酰胺终止反应，凝胶电泳显像。

1.5　cDNA 阵列分析

100 nmol/L APE1 双链 siRNA 处理 HOS 细胞 48 h，应用 Trizol（Invitrogen）分别提取处理组和对照组细胞总 RNA，TruLabeling-AMP 试剂盒（SuperArray Bio Co）合成生物素标记 UTP 的 cRNA，按照 GEArray™ Q 系列试剂盒（SuperArray Bio Co）说明进行预杂交、杂交和 X 光胶片显像。

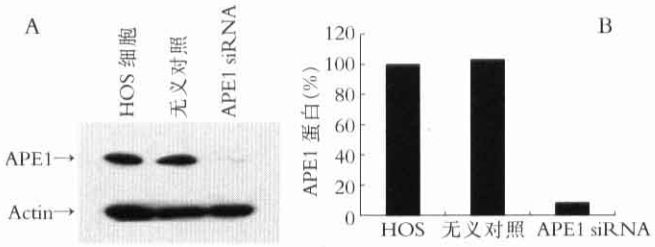
1.6　数据处理

IDEA 软件（SuperArray Bio Co）进行结果分析，具体步骤按说明进行。上述实验重复 2 次以减少结果误差，变化倍数 2 界定为显著影响，5 为极显著影响。

2　结果

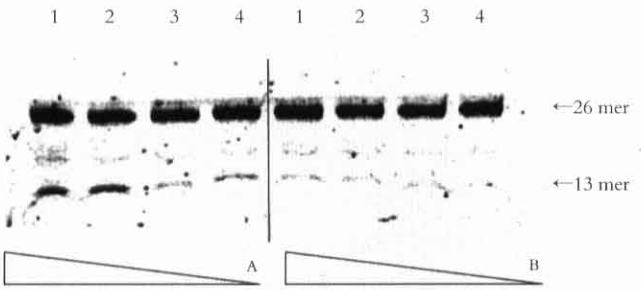
2.1　APE1 siRNA 抑制 APE1 蛋白表达及核酸内切酶活性

如图 1 所示，APE1 siRNA 转染 48 h 后，免疫印迹显示 HOS 细胞 APE1 蛋白表达明显抑制（抑制效率为 91.5%），同时 APE1 核酸内切酶活性也随之降低（图 2）。结果证实本研究合成的 APE1 siRNA 能够发挥 RNA 干扰作用，有效敲低 APE1 表达，该细胞适用于下一步研究 APE1 抑制后 HOS 细胞基因表达谱的变化。



A：转染 APE1 siRNA 48 h 后 HOS 细胞 APE1 蛋白表达抑制
B：APE1 蛋白表达抑制灰度密度分析结果

图 1　APE1 蛋白印迹结果

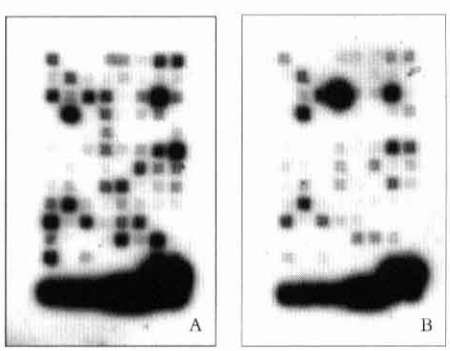


A：无义对照；B：APE1 siRNA
1：1 μg；2：0.5 μg；3：0.1 μg；4：0.05 μg

图 2　转染 APE1 siRNA 48 h 后 HOS 细胞 APE1 核酸内切酶活性显著抑制

2.2　cDNA 微阵列杂交分析

本实验应用 GEArray™ Q 系列“肿瘤途径结果显示（cancer pathway finder）”cDNA 微阵列。它包含细胞周期与 DNA 修复、细胞凋亡、信号转导、细胞黏附、血管生成、肿瘤转移六族共计 96 个基因。APE1 siRNA 转染 HOS 细胞 48 h 后，cDNA 阵列杂交结果见图 3。



A：对照组；B：APE1 siRNA 转染 48 h 后

图 3　人体骨肉瘤细胞 GEArray™ Q 系列“肿瘤途径发现”cDNA 微阵列杂交显像结果

应用 IDEA 软件进行分析结果如表 1 所示。APE1 抑制对六族途径均有影响，其中对细胞周期族基因影响较小；96 个基因中有 42 个基因有明显变化（43.8%），其中 CDK4、FGFR2、KAI1 和 NCAM1 表达上升，其余 38 个基因表达均呈下降；以 2 倍变化界定为影响显著，其中 CDK4、NFKBIA、CD44、MICA、EGFR、TGFβ1、TGFβR1、THBS1、SERPINE1 和 TIMP1 变化倍数超过 5 倍（10/42），为影响最为显著者。

表 1　人体骨肉瘤细胞 APE1 抑制后基因谱的变化

基因途径	名称	降低	升高	基因途径	名称	降低	升高
细胞周期				细胞黏附			
1	AKT1	2.136		17	CD44	6.863	
5	ATM	2.310		36	ICAM1	4.026	
20	CDK4		12.930	44	ITGA4	2.634	
细胞凋亡				46	ITGA6	2.423	
4	APAF1	2.413		48	ITGB1	3.604	
8	BCL2	2.463		61	MICA	7.654	
9	BCL2L1	2.191		63	NCAM1		3.101
13	CASP8	2.771		血管生成			
24	CFLAR	3.031		28	EGFR	6.141	
56	MDM2	3.041		31	FGF2	3.017	
73	PRKDC	2.101		32	FGFR2		2.846
77	RB1	3.663		40	IL-8	2.943	
91	TNFRSF10B	3.206		67	PDGFA	2.061	
信号转导				85	TGFβ1	7.41	
26	CTNNB1	2.314		86	TGFβR1	12.098	
54	MAP2K1	2.460		87	THBS1	11.831	
55	MAPK14	2.654		肿瘤转移			
64	NFKB1	2.626		52	KAI1		3.164
65	NFKBIA	5.793		60	MTA1	2.104	
69	PIK3CB	4.521		66	NME4	3.016	
70	PIK3R1	2.602		81	SERPINE1	5.421	
75	RAF1	3.146		89	TIMP1	12.466	

3　讨论

APE1 敲除研究表明，APE1$^{-/+}$ 小鼠可以正常发育，而 APE1$^{-/-}$ 小鼠在胚胎期 5.5 d 就出现不正常发育，于着床后不久死亡[7]。这充分证明了 APE1 蛋白在正常生长中是必不可少的。在进化中 APE1 非常保守，甚至植物拟南芥（*arabiodopsis thaliana*）的无嘌呤/无嘧啶内切酶 Arp 也可以还原人的 Fos/Jun，这从另一方面反映了 APE1 在生命长河中所处的重要地位。

APE1 为 DNA 碱基切除修复途径的限速酶，是细胞 DNA 放射性损伤和烷化剂致伤重要的修复因子，具有与碱基切除修复有关的 AP 核酸内切酶和 3-磷酸二酯酶活性的多功能酶。此外，APE1 通过氧原功能，能够还原一些氧原敏感的转录因子，如 AP-1、NF-κB、P53 等的 DNA 结合功能域中关键胱氨酸的硫基，并活化它们的 DNA 结合与转录激活能力[1]。研究与 APE1 相互作用的蛋白质对揭示 APE1 的功能，调控有着深远的意义。Hirota 等[8] 的研究表明硫氧还蛋白 TRX 与 APE1 相互作用，提示细胞内存在氧还调控级联；Ku 抗原也可与 APE1 相互作用。说明 DNA 激活蛋白对 DNA 元件的专一性识别可被氧还调控机制改变[9]。应用酵母双杂交和凝胶泳动变位技术，Bennett 等[10] 证实 APE1 和 DNA 多聚酶 β 相互结合，共同作用于 DNA 碱基切除修复途径。严明达等[11] 应用 APE1 氧还功能域进行了酵母双杂交库的筛选，在 5 种阳性克隆中其一经测序证实为泛蛋白连接酶 ubc9，表明 ubc9 参与了 Ref-1 的蛋白降解。热休克蛋白 70（HSP70）是参与多种蛋白质活动的重要伴侣分子。Kenny 等[12] 应用免疫共沉淀方法发现 HSP70 可以与 APE1 相结合，而且能显著提高 APE1 与 DNA 损伤 AP 位点的结合以及其核酸内切酶的活性。

应用 RNAi 技术敲低 APE1 蛋白表达，骨肉瘤细胞表现为凋亡增加，对放疗和细胞毒性化疗药物敏感性增加以及诱导内皮细胞迁移和肿瘤血管生成受抑等表型。为了探讨 APE1 作用的可能分子机制，我们应用 cDNA 微阵列技术研究人骨肉瘤细胞 APE1 敲低后分子表达谱的变化。首先，通过蛋白印迹和核酸内切酶活性检测证实本研究合成的 APE1siRNA 能够发挥 RNA 干扰作用，有效地敲低 APE1 表达，该细胞适用于下一步研究 HOS 细胞基因表达谱的变化。进而，我们应用 GEArray™ Q 系列“肿瘤途径发现（cancer pathway finder）”cDNA 微阵列。它包含细胞周期、细胞凋亡、信号转导、细胞黏附、血管生成、肿瘤转移六族共计 96 个基因。结果表明 APE1 抑制对六族途径均有影响，其中对细胞周期族基因影响较小；96 个基因中有 42 个基因有明显变化（43.8%），其中 CDK4、FGFR2、KAI1 和 NCAM1 表达上升，其余 38 个基因表达均呈下降；以 2 倍变化界定为影响显著，其中 CDK4、NFKBIA、CD44、MICA、EGFR、TGFβ1、TGFβR1、THBS1、SERPINE1 和 TIMP1 变化倍数超过 5 倍（10/42），为影响最为显著者。由此可见，双功能基因 APE1 的敲低对骨肉瘤细胞分子途径具有比较广泛的影响。但哪些作用是间接的、哪些是直接的，仍需要今后深入的研究。我们过去的研究表明敲低 APE1 可显著抑制骨肉瘤细胞诱导的内皮细胞迁移[4]。本实验结果显示 APE1 敲低对 VEGF 的表达影响不明显，但对其他血管生成相关因子如 EGFR、TGFβ1 和 TGFβ1 受体却有显著的抑制作用。APE1 敲低对细胞黏附和转移中多个基因亦有抑制作用，提示 APE1 基因对肿瘤的侵袭和转移可

能有重要作用。上述结果为今后深入研究 APE1 在肿瘤中的作用，以及以 APE1 为靶点的肿瘤基因治疗有着重要的指导意义。

参考文献：

[1] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83-108.

[2] Izumi T, Brown D B, Naidu C V, *et al*. Two essential but distinct functions of the mammalian abasic endonuclease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(16): 5739-5743.

[3] Wang D, Luo M H, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[4] 王 东，仲召阳，李增鹏，等. pSilence APE1 对骨肉瘤诱导血管内皮细胞迁徙抑制作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(2)：93-96.

[5] 仲召阳，王 东，向德兵，等. pSilence APE1 抑制骨肉瘤生长的实验研究[J]. 解放军医学杂志，2005，30(11)：962-964.

[6] Kreklau E L, Limp-Foster M, Liu N, *et al*. A novel fluorometric oligonucleotide assay to measure O(6)-methylguanine DNA methyltransferase, methylpurine DNA glycosylase, 8-oxoguanine DNA glycosylase and abasic endonuclease activities: DNA repair status in human breast carcinoma cells overexpressing methylpurine DNA glycosylase[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(12): 2558-2566.

[7] Xanthoudakis S, Smeyne R J, Wallace J D, *et al*. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(17): 8919-8923.

[8] Hirota K, Matsui M, Iwata S, *et al*. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(8): 3633-3638.

[9] Chung U, Igarashi T, Nishishita T, *et al*. The interaction between Ku antigen and REF1 protein mediates negative gene regulation by extracellular calcium[J]. J Biol Chem, 1996, 271(15): 8593-8598.

[10] Bennett R A, Wilson D M, 3rd., Wong D, *et al*. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(14): 7166-7169.

[11] 严明达，徐蔚晶，鲁林荣，等. 泛蛋白连接酶 Ubc9 参与氧还蛋白 Ref-1 的降解[J]. 生物化学与生物物理学报，2000，32(1)：63-68.

[12] Kenny M K, Mendez F, Sandigursky M, *et al*. Heat shock protein 70 binds to human apurinic/apyrimidinic endonuclease and stimulates endonuclease activity at abasic sites[J]. J Biol Chem, 2001, 276(12): 9532-9536.

（编辑 龙 亮）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)01-0004-01

宫腔镜与气囊导尿管在宫腔黏连致不孕治疗中的联合应用

袁超燕 （湖北民族学院医学院附属医院妇产科，恩施 445000）

宫腔黏连(intrauterine adhesion，IUA)指经宫腔手术操作或因放射、感染造成子宫内膜破坏引起宫壁相互黏连面出现的一系列临床病变，包括腹痛、闭经、月经过少或流产、不孕等现象[1]。其发病率逐年增加是引起不孕的重要原因，占不孕症40%(Sirbu，1957)[2]。虽然我院多年来对宫腔黏连的患者采用分离黏连后上节育环，但对不孕症患者需再次宫腔操作取出节育环，增加了宫腔操作的次数及对子宫内膜的损伤。自2004年5月以来我们对宫腔黏连致不孕患者采用宫腔镜下分离黏连后上气囊导尿管扩张宫腔的方法，使患者术后恢复正常月经周期，改善妊娠条件和提高生育功能，取得良好的效果，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2004-2005年外院共收治宫腔部分黏连致不孕21例，年龄最大37岁，最小25岁，平均28.5岁。其中来源于人流术后15例，药流不全刮宫1例，产褥期胎盘黏连多次刮宫2例，慢性宫颈炎2例，急性内膜炎1例。

临床表现：其中周期性腹痛5例，占23.8%，月经量减少7例，占33.3%，闭经14例，占66.7%，HSG检查术中发现输卵管黏连3例，占14.3%，宫腔黏连18例，占85.7%。超声提示宫腔内液性暗区3例，占14.3%。

1.2 方法

患者均常规查血糖、心电图及白带后用0.2%碘伏棉球擦洗阴道3 d。术前禁食水4 h，肌注术前针，静脉推注安定10 mg，肌注度冷丁50 mg。常规消毒铺巾，先用探针分离黏连的宫颈管，再用6-7 mm扩宫棒扩宫，让宫腔积血流出，然后用宫腔镜检查。宫腔镜进入宫腔后，先观察宫腔形态，然后依宫底、前壁、后壁、侧壁的顺序检查宫腔，了解黏连部位、程度，接着在宫腔镜下分离黏连，待宫腔黏连分离完毕后可见双侧输卵管开口。术毕放置8号气囊导尿管，气囊中注入生理盐水3-5 ml，导尿管外端接引流袋，2周后拔除导尿管。

（下转17页）

作者简介：袁超燕(1969-)，女，湖北省恩施市人，副主任医师，副教授，主要从事妇科肿瘤及不孕不育方面的研究，发表论文16余篇。电话：(0718)8221842

收稿日期：2006-03-14；修回日期：2006-05-22