文章编号:1000-5404(2007)20-1951-03

论著

人可溶性增殖诱导配体促 HeLa 细胞增殖作用的研究

郑英如[1],李 力[1],刘宝英[2],李 媛[2],李蓉芬[2],郭建新[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042,[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察人可溶性增殖诱导配体(soluble a proliferation-induced ligand, sAPRIL)是否具有促进宫颈癌细胞株 HeLa 增殖的作用及其机制。**方法** 用 Brdu 法检测 sAPRIL 蛋白对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的作用,进而用 RT-PCR 法检测 HeLa 细胞 APRIL 受体的表达情况。**结果** 原核表达的 sAPRIL 蛋白能促进 HeLa 细胞增殖。HeLa 细胞表达 APRIL 的受体 HSPG1、HSPG2,而不表达 BCMA 、TACI 及 HSPG4。**结论** sAPRIL 有明确的促 HeLa 细胞增殖作用。由于 HeLa 细胞有 APRIL 受体 HSPG1、HSPG2 的表达,我们初步推测该作用可能是通过 HSPG1 及 HSPG2 起作用的。

关键词: 增殖诱导配体;受体;宫颈癌;细胞增殖
中图法分类号: R392.11;R737.33 **文献标识码:** A

Soluble a proliferation-induced ligand promotes proliferation of HeLa cells

ZHENG Ying-ru[1], LI Li[1], LIU Bao-ying[2], LI Yuan[2], LI Rong-fen[2], GUO Jian-xin[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the promoting function of soluble a proliferation-induced ligand (sAPRIL) to the proliferation of HeLa cells and its possible mechanism. **Methods** The proliferation stimulating effect of sAPRIL to HeLa cells was detected by Brdu. RT-PCR was performed to identify the expression of sAPRIL receptors on HeLa cells. **Results** sAPRIL had positive effect to promote the proliferation of HeLa cells. HeLa cells could express sAPRIL receptors HSPG1 and HSPG2 but not BCMA, TACI or HSPG4. **Conclusion** sAPRIL can effectively promote the proliferation of HeLa cells, which might be associated with HSPG1 and HSPG2.

Key words: a proliferation-induced ligand (APRIL); receptor; uterine cervix cancer; cell proliferation

增殖诱导配体(a proliferation-induced ligand, APRIL)是 TNF 超家族的新成员之一[1]。APRIL 在正常组织中表达很弱,但在多种肿瘤细胞株和肿瘤组织如黑色素瘤、膀胱癌中有高水平表达[2]。APRIL 作为一种配体蛋白,通过与其受体结合而发挥促瘤效应。APRIL 的 105~250 氨基酸区域为天然可溶性 APRIL (soluble APRIL, sAPRIL),其与全长具有一致的生物学活性。sAPRIL 在体外可以促进多种肿瘤细胞系的增殖。BCMA (B cell maturation antigen)、TACI (transmembrane activator and calcium signal-modulating cyclophilin ligand interactor)是目前公认的 APRIL 受体。文献[3]报道,HSPGs(heparan sulphate proteoglycan)可能也是 APRIL 的受体。现有研究少见 APRIL 与宫颈癌或其细胞株增殖之间是否有关联的报道。本研究拟观察 sAPRIL 是否具有促进宫颈癌细胞株 HeLa 增殖的作用,并对 HeLa 细胞表面 APRIL 受体的表达情况进行研究,为进一步了解 APRIL 在宫颈癌的发生、发展及转归中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

Trizol Reagent 为 Invitrogen 公司产品;Random Primer (6mer)、Reverse Transcriptase M-MLV(RNaseH$^-$)、EX *Taq* HS 试剂盒等均为 TaKaRa 公司产品;Brdu 试剂盒为 Roche 公司产品。原核表达 sAPRIL 蛋白由本校生物化学与分子生物学教研室提供。HeLa 细胞由本校全军免疫学研究所惠赠,Raji 细胞由

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC2006BB5110),第三军医大学科研基金(SG200538)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5110) and the Scientific Research Funds of Third Military Medical University (SG200538)

作者简介: 郑英如(1965-),女,山西省怀仁县人,博士研究生,副教授,主要从事宫颈癌治疗方面的研究。电话:(023)68757196
通讯作者: 李 力,电话:(023)68757249,E-mail: xglili@maildph-fsi.com

收稿日期: 2007-01-30;**修回日期:** 2007-07-15

本校生物化学与分子生物学教研室保存。

1.2 sAPRIL 对 HeLa 细胞增殖的影响

常规复苏 HeLa 细胞，5% CO_2，37 ℃培养至对数生长期；收集对数生长期的 HeLa 细胞以 1×10^4/ml 接种于 96 孔板中，每孔 0.2 ml，5% CO_2，37 ℃培养至细胞贴壁。分别加入不同浓度的 sAPRIL 蛋白（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/ml），继续培养 72 h，按 Brdu 试剂盒进行检测，实验设 3 个复孔，取其平均值。

1.3 RT-PCR 检测 HeLa 细胞受体表达情况

1.3.1 总 RNA 的提取 培养至对数生长期的 HeLa 及 Raji 细胞，按照 Trizol 试剂盒操作程序分别提取二者的总 RNA。

1.3.2 PCR 引物的设计与合成 在 GenBank 中查出人 APRIL 受体 BCMA、TACI、HSPG1、HSPG2、HSPG4 的 mRNA 序列，primer primier 5.0 软件设计并选择最优化的 PCR 引物（表 1）。所有引物均由上海生工公司合成。

表 1 PCR 反应引物

基因	正义链	反义链	目的片段(bp)
BCMA	5′-GTTGCAGATGGCTGGGCAGTG-3′	5′-TCAGAGTCGACCTTCGGTTTG-3′	420
TACI	5′-CGCAAGGAGCAAGGCAAGTTC-3′	5′-CCACCAGGAAGCAGCAGAGG-3′	327
HSPG1	5′-ACTCTGACAACTTCTCCGGCTC-3′	5′- TCCCAGCACCTCTTTCCTGTC-3′	643
HSPG2	5′-TGACGATGACTACGCTTCTGC-3′	5′-AACTCCACCAGCAATGACAGC-3′	322
HSPG4	5′-CGCTGCTGCTGTTCTTCGTAG-3′	5′-GTGCTGGACATTGACACCTTG-3′	379

1.3.3 RT-PCR 检测 HeLa 细胞受体表达情况 反转录反应采用随机引物法按 Reverse Transcriptase M-MLV 试剂盒操作程序进行，以 Raji 细胞作为受体 BCMA 及 TACI 的阳性对照。所获得的 cDNA 再按 EX Taq HS 试剂盒操作程序进行 PCR 反应。扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，在 UVP 凝胶成像系统下观察并记录结果。

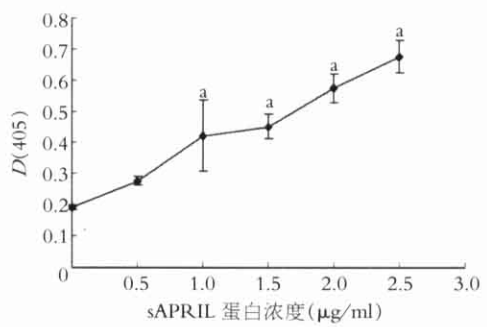
1.4 统计学分析

测定结果用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 sAPRIL 对 HeLa 细胞增殖的影响

Brdu 检测 sAPRIL 对 HeLa 细胞增殖的影响显示（图 1），sAPRIL 以剂量依赖的方式促进 HeLa 细胞的增殖，其中当加入的 sAPRIL 剂量超过 1 μg/ml，其促增殖能力与未加入 sAPRIL 蛋白的空白对照组相比，有显著差异（$P<0.05$）。

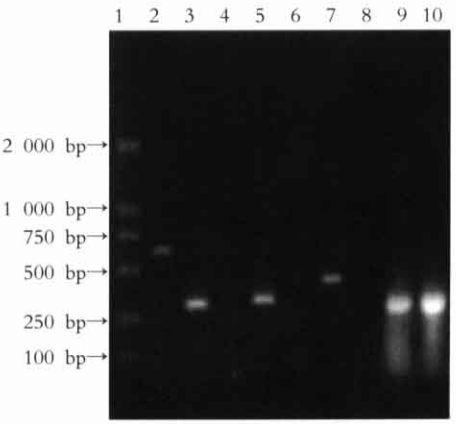


a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 1 Brdu 检测 sAPRIL 对 HeLa 细胞增殖的影响

2.2 RT-PCR 检测 HeLa 细胞 APRIL 受体表达情况

UVP 凝胶成像系统下观察 RT-PCR 检测 HeLa 细胞 APRIL 受体表达情况，以 LRaji 细胞作为受体 BCMA 及 TACI 的阳性对照（图 2）。HeLa 细胞有 APRIL 受体 HSPG1、HSPG2 的表达，而不表达受体 BCMA、TACI 及 HSPG4。对照组 Raji 细胞 BCMA 及 TACI 结果阳性。



1：DNA 标准 DL2000；2～4：从 HeLa 细胞中分别扩增的 $HSPG_1$、$HSPG_2$ 和 HSPG4 cDNA 片段；5、7：从 Raji 细胞中分别扩增的 TACI 和 BCMA cDNA 片段；6、8：从 HeLa 细胞中分别扩增的 TACI 和 BCMA cDNA 片段；9、10：分别为从 HeLa 和 Raji 细胞中扩增的 β- actin cDNA 片段

图 2 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

3 讨论

APRIL 属Ⅱ型跨膜蛋白，其 N 端残基在胞内，C 端在胞外残基。人 APRIL 全长为 250 个氨基酸，其中 29～49 氨基酸残基为疏水的跨膜区，50～250 氨基酸残基为胞外区。其胞外区 105～250 氨基酸残基区域在 furin 转换酶的作用下裂解，形成可溶性 APRIL（sAPRIL），sAPRIL 的生物学作用与膜结合型作用相似。APRIL 在正常组织的表达很弱，并且只见于前列腺、外周血淋巴细胞、单核/巨噬细胞、结肠、脾、胰腺等组织或细胞，但 APRIL 在包括黑色素瘤、膀胱癌、结肠癌、腮腺癌及淋巴细胞白血病等多种恶性肿瘤组织中有高表达[2,4]，但尚少见其在宫颈癌或其细胞株是否有表达的研究。我们前期预实验显示，HeLa 细胞在转录水平有 APRIL 高表达。

近年诸多研究表明，APRIL 过表达在多种肿瘤细胞的增殖和存活以及促肿瘤形成的过程中都起着独特的作用，如 Hahne 等[1]检测发现结直肠癌细胞系 SW480、淋巴瘤细胞系 Raji、黑色素瘤细胞系 G36 等均有高水平的 APRIL 表达；在甲状腺癌、淋巴瘤、结肠腺癌等肿瘤组织中，APRIL 的表达均比相应的正常组织

明显增加。Kelly 等[5]比较了 48 种肿瘤及其邻近的正常组织，也发现在肿瘤组织中 APRIL 的表达水平显著升高。APRIL 可作为一种自分泌或旁分泌生长因子而促进肿瘤的形成及肿瘤细胞的增殖与存活[6]。我们原来的研究发现，原核表达的 sAPRIL 与天然 APRIL 具有同样生物学活性，可在体外以剂量依赖方式促进多种肿瘤细胞系（如 Jurkat、Raji、A549 等）的增殖[7,8]。sAPRIL 可以促进上述肿瘤细胞的增殖，但在宫颈癌中的研究尚少见报道。本实验结果证明 sAPRIL 在体外以剂量依赖方式促进人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖。

APRIL 作为一种配体蛋白，通过与其受体结合而发挥促瘤效应。目前已发现的 APRIL 受体有 BCMA、TACI。因为 APRIL 可以促进不表达 BCMA 及 TACI 的细胞增殖，因此近来研究认为 APRIL 的受体可能还有 HSPGs（heparan sulphate proteoglycans）[3]。我们在研究中发现，人宫颈癌 HeLa 细胞不表达受体 BCMA、TACI 及 HSPG4，而表达 HSPG1 及 HSPG2 两种受体。因此我们初步推测，sAPRIL 的促 HeLa 细胞增殖效应可能是通过 HSPG1 及 HSPG2 受体起作用的。至于 APRIL 与 HSPG1 及 HSPG2 如何相互作用，有待进一步研究。

总之，APRIL 可能在宫颈癌的发生和发展中起重要作用，而 APRIL 的作用可能是通过 HSPG1、HSPG2 起作用。通过对 APRIL 及其受体的深入研究，以 APRIL 作为靶分子进行药物设计并阻断其作用，有可能为宫颈癌的治疗提供一种新的方法。

参考文献：

[1] Hahne M, Kataoka T, Schroter M, *et al*. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth[J]. J Exp Med, 1998, 188(6): 1185 - 1190.

[2] Mhawech-Fauceglia P, Kaya G, Sauter G, *et al*. The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(4): 697 - 704.

[3] Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, *et al*. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners[J]. J Exp Med, 2005, 201(9): 1375 - 1383.

[4] Dillon S R, Gross J A, Ansell S M, *et al*. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(3): 235 - 246.

[5] Kelly K, Manos E, Jensen G, *et al*. APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 1021 - 1027.

[6] Nishio M, Endo T, Tsukada N, *et al*. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha[J]. Blood, 2005, 106(3): 1012 - 1020.

[7] 戴双双，何凤田，杨朝辉，等. 人可溶性 APRIL 基因的克隆、表达及生物学活性检测[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2005，21(1)：61 - 64.

[8] 刘宝英，郑英如，何凤田，等. 人可溶性 TALL-2 突变体的原核表达及纯化[J]. 第三军医大学学报，2006，28(23)：2346 - 2348.

（编辑　邓强庭）

（上接 1950 页）

处于高凝状态；剖宫产手术创伤出血进一步引起血小板凝聚能力增强，加之手术后卧床，外周静脉扩张，血流缓慢，这些都导致或加重了深静脉血栓的形成[1]。本例患者在妊娠后期开始出现下肢水肿（是否对称不详），但患者本人和家属因担心胎儿受影响，未进一步检查，产后下肢不对称水肿也未引起医生的注意，仍未进行相关检查，为血栓的形成和加重留下了隐患；同时由于误诊为肾病综合征，使用了糖皮质激素和利尿剂，这与深静脉血栓的治疗原则相悖，更加重了血液高凝状态，使血栓得以迅速延伸，不对称的下肢水肿逐渐成为对称的、严重的双下肢水肿。这就是本例患者血栓的演变过程。

本例之所以误诊为肾病综合征、慢性肾小球肾炎，最主要的原因是医生对肾病综合征和慢性肾小球肾炎缺乏正确的认识。肾病综合征是由于各种肾脏损害引起的以大量蛋白尿、低白蛋白血症、高度水肿和/或高脂血症为主要表现的一组临床综合征，在本例患者的病程中，没有大量蛋白尿史，尿蛋白最多时仅（++），也没有低蛋白血症史，血清白蛋白最低时 34 g/L，唯一存在的是逐渐加重的水肿，但是肾病综合征的水肿几乎全部为对称性。本例患者妊娠后期出现蛋白尿的原因，是妊娠后肾小球滤过率显著升高，蛋白滤出随之增加[2]。而非病理性蛋白尿，更非肾病性蛋白尿，也可能当时患者已经出现了深静脉血栓，已经引起了肾静脉回流受阻和肾静脉淤血，导致蛋白尿的进一步增加；误诊的另一个原因是妊娠后期下肢水肿是孕妇常见情况，将随胎儿出生而消退，且这种水肿有时是不对称的，引起了当地医生对深静脉血栓的麻痹。

通过本例巨大深静脉血栓误诊为肾病综合征、慢性肾炎的报告，希望临床医生引起对妊娠深静脉血栓的重视，同时清楚认识肾病综合征，避免因此类误诊而造成的如本例的无法挽回的结果。

关键词：深静脉血栓；肾病综合征；误诊

中图法分类号：R364.1^{+5}　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 张改凤. 产后下肢深静脉血栓形成的原因与防治[J]. 实用诊断与治疗杂志，2007，21(3)：225 - 226.

[2] 王海燕. 肾脏病学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1996：1595 - 1596.

（编辑　王　红）