DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.036

[2] Hirakawa A, Takeyama N, Nakatani T, *et al*. Mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in ischemia-reperfusion injury of the rat liver[J]. J Surg Res, 2003, 111(2): 240—247.
[3] 陈 先, 许彩民, 潘华珍. 线粒体与细胞凋亡[J]. 解剖学报, 2000, 31(3): 285—287.
[4] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death[J]. Biochem J, 1999, 341(Pt 2): 233—249.
[5] Kim J S, He L, Lemasters J J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(3): 463—470.
[6] Halestrap A P, Clarke S J, Javadov S A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(3): 372—385.
[7] Halestrap A P. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury[J]. Biochem Soc Symp, 1999, 66: 181—203.
[8] Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, *et al*. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition[J]. Biochem J, 1998, 336(Pt 2): 287—290.
[9] Crompton M, Virji S, Ward J M. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore[J]. Eur J Biochem, 1998, 258(2): 729—735.
[10] Godbole A, Varghese J, Sarin A, *et al*. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1642(1-2): 87—96.
[11] Kristal B S, Brown A M. Ganglioside GD3, the mitochondrial permeability transition, and apoptosis[J]. Biol J Chem, 1999, 274(2): 23169—23175.
[12] Kowaltowski A J, Castilho R F. Ca^{2+} acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1322(2-3): 221—229.
[13] Halestrap A P, Woodfield K Y, Connern C P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase[J]. J Biol Chem, 1997, 272(6): 3346—3354.
[14] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al*. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5385): 2027—2031.
[15] Li M, Xia T, Jiang C S, *et al*. Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis[J]. Toxicology, 2003, 194(1-2): 19—33.
[16] He L, Lemasters J J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function [J]? FEBS Lett, 2002, 512(1-3): 1—7.
[17] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC[J]. Nature, 1999, 399(6735): 483—487.
[18] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al*. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5385): 2027—2031.
[19] Zamzami N, Marzo I, Susin S A, *et al*. The thiol crosslinking agent diamide overcomes the apoptosis-inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition[J]. Oncogene, 1998, 16(8): 1055—1063.
[20] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, *et al*. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(4): 1455—1459.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)17-1600-02

KAI1基因转染肝癌MHCC97-H细胞及鉴定

Transfection of KAI1 gene into MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells and its identification

司遂海，杨建民，彭志红，周 平，罗元辉 （第三军医大学西南医院全军消化内科中心，重庆 400038）

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，转移与复发是影响预后的主要因素。KAI1基因是近年新发现的肿瘤转移抑制基因[1]。为深入研究KAI1基因在肝癌侵袭、转移中的作用，我们构建了KAI1正、反义基因真核表达质粒，并将其成功地分别转染入高转移潜能的肝癌MHCC97-H细胞株中，现报告如下。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30070348)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070348)
作者简介：司遂海(1966—)，男，河南省新郑市人，硕士，主治医师，现在山东省济宁医学院附属医院消化科，E-mail：cdaghba@yahoo.com.cn
通信作者：杨建民，现在浙江省杭州市浙江省人民医院消化内科，电话：(0571)85235404，E-mail：jianminyang@hotmail.com
收稿日期：2003-06-19；修回日期：2004-01-10

1 材料与方法

1.1 主要材料

pCMV-KAI1表达质粒由KAI1基因发现者美国国立卫生研究院Barrett教授和Dong博士惠赠，全长8.2 kb，含KAI1全长结构基因1.6 kb的cDNA片段。真核表达质粒载体pCI-neo全长5.47 kb，为Promega公司产品。转染用脂质体DOTAP为Roche公司产品。MHCC97-H是一种高转移潜能的肝癌细胞株[2]，购自上海复旦大学中山医院肝癌研究所。KAI1单抗为Santa Cruz公司产品。

（下转1604页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为难以手术的下丘脑错构瘤合并难治性癫痫者可采用γ刀治疗[6,8]。本组2例行γ刀治疗随访癫痫症状也有改善。

关键词：痴笑性癫痫；性早熟；下丘脑错构瘤
中图法分类号：R730.261 文献标识码：B

参考文献：

[1] 周良辅. 现代神经外科学[M]. 上海：上海复旦大学出版社，上海医科大学出版社，2001. 488－489.
[2] Zunigz O F, Tanner S M, Wild W O, *et al*. Hamartoma of CNS associated with precocious puberty[J]. Am J Dis Child, 1983, 137(2): 127－133.
[3] 罗世祺，李春德，马振宇，等. 下丘脑错构瘤40例临床分析[J]. 中华神经外科杂志，2002，18(1)：37－40.
[4] Boyko O B, Curnes J T, Oakes W J, *et al*. Hamartomas of the tuber cinereum: CT, MR, and pathologic findings[J]. Am J Neuroradiol, 1991, 12(2): 310－314.
[5] Valdueza J M, Cristante L, Dammann O, *et al*. Hypothalamic hamartomas: With special referance to gelastic epilepsy and surgery[J]. Neurosurgery, 1994, 34(6): 949－958.
[6] Arita K, Ikawa F, Kurisu K, *et al*. The relationship between magnetic imaging findings and clinical manifestations of hypothalamic hamartoma[J]. J Nearosurg, 1999, 91(2): 212－220.
[7] Rosenfeld J V, Harvey A S, Wrennall J, *et al*. Transcallosal resection of hypothalamic hamartoma, with contral of seizures, in children with gelastic epiepsy[J]. Neurosurgery, 2001, 48(1): 108－118.
[8] Eder H G, Leber K A, Eustacchio S, *et al*. The role of gamma knife radiosurgery in children[J]. Childs Nerv Syst, 2001, 17(6): 341－347.

（编辑 薛国文）

（上接1600页）

1.2 实验方法

1.2.1 基因重组与鉴定 采用亚克隆技术进行基因重组，然后以限制性内切酶酶切分析区分正、反义重组质粒，鉴定重组是否成功。

1.2.2 重组质粒的转染 重组质粒的转染采用脂质体法，实验步骤与我们以往报道的IGF基因转染相似[3]。转染后用含G418的选择性培养基进行筛选和扩增。

1.2.3 转染基因的整合鉴定 采用PCR扩增载体中neo标志基因的方法。上游引物为5′-CAA GAT GGA ATT GCA CGC AGG-3′，下游引物为5′-CCC GCT CAG AAA GAA CTC GTC-3′，扩增片段长度为790 bp。扩增反应在GeneAmp® PCR system 2700型(Applied Biosystems)上完成。

1.2.4 转染基因的表达鉴定 采用Western blot方法。二抗为辣根过氧化物酶标记，采用化学发光法显色，在暗室中用X线胶片曝光记录结果。免疫细胞化学染色采用S-P法。

2 结果

根据对目的片段和载体序列的分析，对重组后获得的重组子先用*Sal*Ⅰ酶切，分别得到2.25、6.22 kb两个片段及0.75、7.72 kb两个片段，前者与预期的正义重组质粒的结构一致，后者与预期的反义重组质粒的结构一致。为证实目的片段已插入载体中，再用*Xba*Ⅰ酶切上述两个重组子，又重新获得连接前的3 kb及5.47 kb两个片段，证明已成功构建KAI1正、反义真核表达质粒。

采用脂质体DOTAP转染系统将KAI1正、反义重组质粒转染肝癌MHCC97-H细胞，经G418筛选出稳定的阳性细胞克隆后，转染有KAI1正义基因的细胞重新命名为MHCC97-H-S，转染有KAI1反义基因的细胞命名为MHCC97-H-AS，而转染有pCI-neo空载体的细胞则命名为MHCC97-H-pCI。

PCR结果显示，从MHCC97-H-S、MHCC97-H-AS及MHCC97-H-pCI转染细胞基因组中均可扩增出了790 bp大小的特异性片段，而对照组MHCC97-H亲本细胞基因组中则不能扩增出此特异性片段，证明重组基因已整合入细胞的基因组中。

Western blot和免疫细胞化学染色结果均显示，与亲本细胞MHCC97-H相比，MHCC97-H-S细胞KAI1蛋白表达明显增强，MHCC97-H-AS细胞KAI1蛋白表达明显减弱，而MHCC97-H-pCI细胞则无明显变化。

3 讨论

KAI1基因是Dong等[1]首先于1995年在前列腺癌细胞中克隆出的肿瘤转移抑制基因。研究表明，KAI1在人类多种恶性肿瘤中均有表达的异常[4]。其分子结构中有4个疏水区和1个含有3个潜在N-糖基化位点的细胞外亲水区，因而属跨膜4超家族成员[4]。由此推测其抑制肿瘤转移的作用可能与细胞-细胞间或细胞-细胞间基质的相互作用，介导细胞间及细胞与间质之间的粘附机制有关。

我们通过亚克隆技术，成功构建了KAI1基因的正、反义真核表达质粒，并用DOTAP脂质体法将其分别转染入具有高转移潜能的肝癌MHCC97-H细胞系中。PCR结果表明KAI1正、反义基因已分别成功整合入肝癌细胞的基因组中。Western blot和免疫细胞化学结果均显示，转入的KAI1基因可在肝癌靶细胞内出现预期表达，且载体pCI-neo本身对肝癌细胞KAI1蛋白的表达无明显影响。这些特异性基因转染细胞株的建立和选择性传代培养的成功，为进一步深入研究KAI1基因对肝癌细胞侵袭、转移的影响及其分子机制奠定了良好基础。

关键词：肝细胞癌；KAI1基因；肿瘤转移抑制基因
中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Dong J T, Lamb P W, Schaeffer R, *et al*. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2[J]. Science, 1995, 268(5212): 884－886.
[2] Li Y, Tang Z Y, Ye S L, *et al*. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97[J]. World J Gastroenterol, 2000, 7(5): 630－636.
[3] Yang J M, Chen W S, Liu Z P, *et al*. Effects of insulin-like growth factors-IR and -IIR antisense gene transfection on the biological behaviors of SMMC-7721 human hepatoma cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(3): 296－301.
[4] Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, *et al*. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer[J]. Br J Cancer, 2003, 89(1): 158－167.

（编辑 栾 嘉）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net