DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.008

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1270-03

人DNA MTase反义基因转染对诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡的影响

张 宏[1],肖文华[2],梁后杰[1],房殿春[3],杨仕明[3],罗元辉[3] (1第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038;2解放军第304医院肿瘤科,北京 100037;3第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察人DNA MTase反义基因转染对肝癌细胞系SMMC-7721凋亡的影响。方法 采用脂质体法将构建的包含正、反义DNA MTase基因片段的真核表达载体转染入肝癌细胞系SMMC-7721;采用MTT法绘制生长曲线;流式细胞法和原位末端标记法检测细胞凋亡改变。结果 PCR法扩增外源性NeoR基因证实用脂质体法成功将重组载体转染入细胞;生长曲线显示转染反义DNA MTase基因片段的SMMC-7721细胞增殖速度减慢;流式细胞法测得其凋亡率由3.1%增加到13.5%。末端标记法也显示其凋亡指数增加。结论 人DNA MTase反义基因转染可诱导肝癌细胞系SMMC-7721凋亡。凋亡基因功能被恢复可能是主要原因之一。

关键词:DNA甲基转移酶;DNA,反义;肝癌细胞系;凋亡
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.7 文献标识码:A

Apoptosis of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells induced by the transfected human antisense DNA MTase gene

ZHANG Hong, XIAO Wen-hua, LIANG Hou-jie, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, LUO Yuan-hui (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change of the apoptosis of the human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 transfected by antisense human DNA MTase gene fragment. **Methods** The constructed sense and antisense DNA MTase gene eukaryotic expression vectors were transfected into the hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 with liposome DOTAP, growth speed was observed by MTT assay and the change of the apoptosis of SMMC-7721 cell line by flow cytometry and TUNEL method. **Results** The sense and antisense eukaryotic expression vectors were successfully constructed and affirmed by restriction endonuclease analyzing and sequencing. The constructed recombinant plasmids were successfully transfected into SMMC-7721 cell line with liposome DOTAP and affirmed by amplifying the ectogenetic NeoR gene with PCR. The growth curve showed lower growth speed in the SMMC-7721 cell line transfected with antisense DNA MTase gene fragment. The apoptosis rate increased from 3.1% to 13.5% and apoptosis index also increased. **Conclusion** Transfection of human antisense DNA MTase gene can induce the apoptosis of the SMMC-7721 cell. Recovery of the function of the apoptosis genes may be one of the main causes.

Key words: DNA methyltransferase; antisense DNA; carcinoma, hepatocelluar; cell line; apoptosis

近年来,由于肿瘤分子遗传学和分子生物学的迅速发展,对肝癌发病机制的认识也不断深入。肝癌的发生同其它肿瘤一样,与基因异常有密切关系,其中基因的DNA甲基化异常起着重要的作用,将DNA甲基化作为治疗靶具有潜在的临床应用价值。本实验将构建的正反义DNA(5-胞嘧啶)甲基转移酶[DNA(Cytosine-5)-Methylatransferase, DNA MTase]基因片段真核表达载体[1]转染入肝癌细胞SMMC-7721中,发现转染反义DNA MTase基因的细胞增殖速度减慢,凋亡增加。目前尚无这方面的报道。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系SMMC-7721、大肠杆菌菌株JM109由第三军医大学西南医院全军消化专科中心保存;DOTAP脂质体、G418、原位末端标记试剂盒为Roche公司产品;真核表达质粒载体pCI-neo为Promega公司产品;低熔点琼脂糖为Gibco公司产品;RPMI1640、新生小牛血清为Hyclone公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA MTase基因片段真核表达载体的构建 参见文献[1]。

1.2.2 细胞培养 SMMC-7721细胞在含10%小牛血清的1640培养基中,于37℃,5%CO_2,饱和湿度下培养。

1.2.3 正、反义重组质粒的转染和鉴定 参见文献[3]。

1.2.4 MTT法绘制生长曲线 将7721、7721-S、7721-AS按3×10^3/孔(0.2 ml)接种于96孔培养板上,每3孔为一组,共接种7板。每日取出一板,弃去培养液,生理盐水漂洗一遍,每孔加MTT(5 μg/μl)20 μl,继续培养4 h,弃上清,生理盐水漂洗两遍,加二甲基亚砜150 μl/孔,振荡器振荡10 min,使紫色结晶充分溶解,置酶联免疫检测仪上测定波长490 nm下的A值。然后以A值为纵坐标(以$\bar{x}\pm s$表示),以时间(d)为横坐标绘制生长曲线。

1.2.5 流式细胞(FCM)法检测细胞凋亡率 FCM基本原理是:经荧光染色的细胞从高速喷嘴喷出,通过聚焦的光源,用光敏元件测量细胞的散射光及荧光,经计算机分析和处理得到细胞内生物大分子如DNA、蛋白质等物质含量。标本制作:待7721、7721-S、7721-AS细胞长至指数生长期时,用消化液分别消化3种细胞,尽量吹打成单细胞悬液,用0.01 mol/L的PBS(pH 7.4)洗涤后,70%冷乙醇4℃下固定24 h以上送检。

1.2.6 肝癌细胞凋亡的检测(TUNEL法) TUNEL法是用于

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870344)
作者简介:张 宏(1967-),男,河南省新乡市人,硕士,主治医师,主要从事肝癌发病机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754128
通信作者:肖文华,电话:(010)66867672
收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-09-04

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

单细胞水平的原位检测凋亡细胞方法, 其原理为: 脱氧核糖核酸末端转移酶以模板依赖方式催化结合了荧光素的 dUTP 与游离的3′-OH DNA 末端发生聚合反应, 掺入的荧光素与结合了辣根过氧化物酶(POD)的荧光素抗体作用, 在阻断了内源性 POD 底物后加入外源性 POD 底物进行显色反应, 着色的细胞可在光镜下观察。凋亡细胞的判断根据细胞核呈棕褐色染色并在形态学上符合凋亡细胞的特征, 包括染色体浓缩、边集和核裂解。每组 5 张玻片, 每张玻片取 5 个高倍视野, 计数 100 个细胞中凋亡细胞所占的比率(%), 即凋亡指数(Apoptotic index, AI), 5 张玻片的平均值代表该组凋亡指数。标本制作: 24 孔培养板孔底置 0.5 cm×0.5 cm 干净玻片, 接种分散均匀的单细胞悬液, 细胞贴壁生长 72 h 后, 捞出玻片, 4%多聚甲醛固定, 胰蛋白酶消化, 3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶。将玻片用 PBS 缓冲液洗 5 min× 3 次, 含 TDT 酶(1∶20)的标记混和液加到切片上, 37℃温育 2 h, 洗涤, 加 TUNEL 液, 37℃温育 30 min, 洗涤后用 DAB 显色。中性树胶封片。

1.2.7　统计学处理　　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件对相关数据进行方差分析。

2　结果

2.1　正、反义真核表达酶切鉴定和测序

参见文献[1]。

2.2　细胞转染鉴定

参见文献[2]。

2.3　生长曲线的测定

从生长曲线的趋势可以看出, 3 种细胞在前 3 d A 值基本接近, 从第 4 天开始 7721-AS A 值与 7721 和 7721-S 相比减低, 7721-S 和 7721 A 值增加速度始终接近, 说明在对数生长期 7721-AS 较 7721 增殖速度减慢。第 7 天后 3 种细胞 A 值不再增加, 可能是细胞增殖后出现接触抑制, 见图 1。

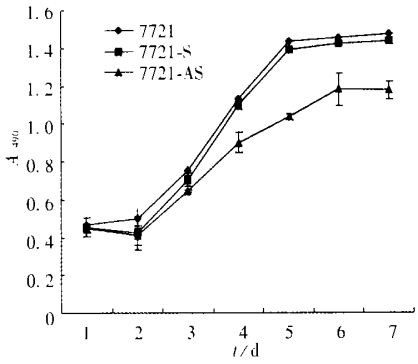


图 1　细胞生长曲线

Fig 1　Growth curve of cell

2.4　细胞凋亡率测定

FCM 结果显示, 凋亡率 7721-AS 较 7721 由 3.1%增高到 13.5%, 7721-AS 亚二倍体峰值较 7721 增高, 见图 2。

2.5　TUNEL 凋亡检测结果

3 种标本中都可检测到凋亡的细胞, 凋亡细胞为染色质浓缩、边集和核裂解, 呈棕褐色染色, 见图 3。7721、7721-S、7721-AS AI($\bar{x}\pm s$)分别为 5.2±1.4、6.4±2.1、16.4±2.1, 7721-AS 与 7721 比较差异显著($P<0.01$), 见图 4。

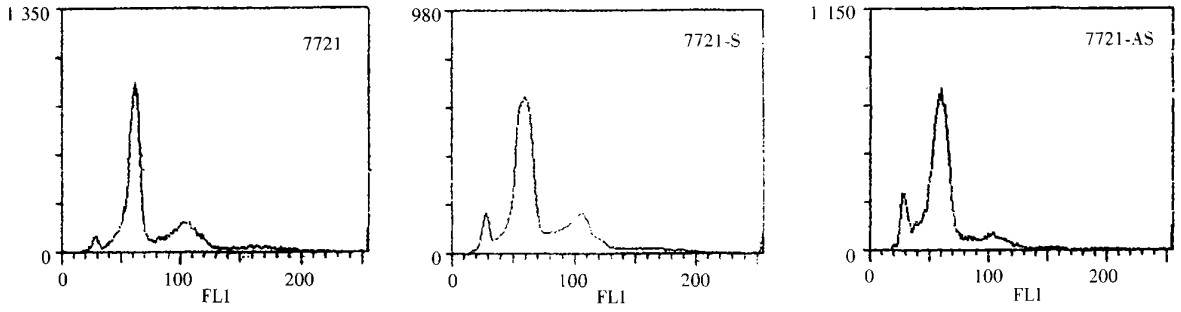


图 2　FCM 检测结果 7721-AS 的亚二倍体峰较 7721 增高

Fig 2　Analysis of apoptosis by FCM　The peak of hypodiploid was higher in 7721-AS than 7721



图 3　7721-AS TUNEL 凋亡检测结果

Fig 3　Determination of apoptosis of 7721 by TUNEL method

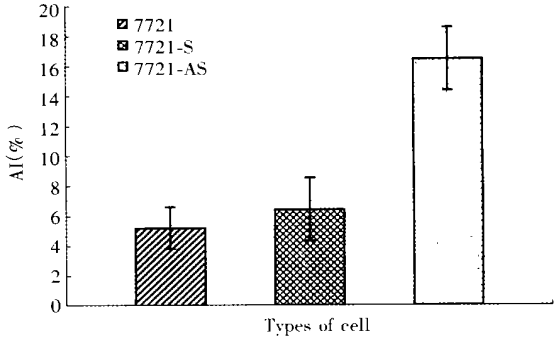


图 4　TUNEL 法检测细胞凋亡指数

Fig 4　Determination of apoptosis index by TUNEL method

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

3 讨论

肿瘤细胞中 DNA MTase 活性增强和表达增高被认为在 DNA 甲基化紊乱中起主要作用[3,4]。多种基因因启动子区域高甲基化而失活。大量的研究显示 DNA MTase 过表达先于高甲基化异常，是肿瘤细胞一个具有特征性的早期分子改变。因此，近年来 DNA MTase 已被作为肿瘤预防和治疗的新靶点。目前国内外研究中应用较多的是 5-脱氧杂氮胞苷[5~8]。Cote 等[9]应用全反式维甲酸和 5-脱氧杂氮胞苷协同作用，有效地抑制了大肠癌细胞系 DLD-1 的生长。但 5-脱氧杂氮胞苷有较强的细胞毒性等副作用。Macledod 等[10]应用反义技术对肾上腺皮质肿瘤细胞系 Y1 的 DNA MTase 表达进行阻抑，导致 Y1 细胞总甲基化减低，细胞恶性表型发生逆转，细胞生长受抑制，凋亡增加。本研究以构建的 DNA MTase 反义基因片段真核表达载体转染肝癌细胞系 SMMC-7721，以正义表达载体作为阴性对照，对细胞增殖及凋亡状况进行了检测。发现转染反义基因的细胞系对数生长期增殖减缓，FCM 检测发现其亚二倍体峰值较 7721 增高，AI 增高，提示凋亡增加。以上实验结果显示 SMMC-7721 细胞中凋亡基因可能因高甲基化而失活，而 DNA MTase 反义基因有可能通过减低 DNA MTase 活性使被高甲基化的凋亡基因恢复活性。因此有可能将 DNA MTase 作为肝癌治疗的靶位点。

参考文献：

[1] 张 宏，肖文华，梁后杰. 正反义人 DNA(5-胞嘧啶)甲基转移酶基因片段真核表载体的构建[J]. 癌症，2001，20(11)1 325－1 326
[2] 张 宏，肖文华，梁后杰，等. 人 DNA MTase 反义基因转染对肝癌细胞 DNA MTase 基因 mRNA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(11)：1 264－1 266.
[3] Simpson D J, Hibberts N A, McNicol A M, *et al*. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1 211－1 216.
[4] Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, *et al*. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2000, 149(1): 125－134.
[5] Si H X, Tsao S W, Lam K Y, *et al*. E-cadherin expression is commonly downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2001, 173(1): 71－78.
[6] Nojima D, Nakajima K, Li L C, *et al*. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2001, 32(1): 19－27.
[7] Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, *et al*. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2 765-2 769.
[8] Liu L H, Xiao W H, Liu W W. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the p16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line $HepG_2$[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(1): 131－135.
[9] Cote S, Momparler RL. Activation of the retinoid acid receptor β gene by 5-Aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells[J]. Anti Cancer Drugs, 1997, 8(1): 56－61.
[10] Macled A R, Szyf M. Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis[J]. J Biol Chem, 1995, 270(14): 8 037－8 043.

（编辑 张 宁）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)11-1272-01

食管癌 PF 方案化疗发生频发室性早搏 1 例

A case report of frequent premature ventricular beats in treating esophageal carcinoma with PF regime chemotherapy

朱宇熹，陈绪元 （重庆医科大学附一院肿瘤科，重庆 400016）

患者，男，47 岁，因进行性吞咽困难 3 月于 2001 年 11 月 5 日入院。既往无心脏及肺病史。查体：KPS 评分 80 分，浅表淋巴结未扪及肿大。纤维胃镜发现食管新生物，活检诊为鳞癌。心电图及常规检查无手术禁忌，2001 年 11 月 9 日行食管癌切除术，术后病检发现切缘阳性，3 周后行放射治疗，总剂量 50 Gy，常规分割，出院休息。于 2002 年 3 月 4 日再次入院，检查无化疗禁忌，予辅助化疗，PF＋CF 方案（第 1～5 天）：顺铂（DDP）20 mg；氟尿嘧啶（5-Fu）750 mg；亚叶酸钙（CF）200 mg。化疗中出现轻度心悸、乏力，心电图发现偶发早搏，化疗后予心肌营养药物治疗约 1 周后症状及心电图好转。第 2、3 次化疗时又出现类似症状和心电图改变，相同治疗后好转，但第 3 次化疗结束后，随访心电图发现偶发早搏未消失。第 4 次化疗时症状加重，高枕卧位。双肺呼吸音清晰，无啰音，心率 90 次/min，律不齐，心电图提示频发室性早搏，二联律，S-T 段及 T、Q 波正常，心肌酶谱正常，电解质正常，心脏彩色多谱勒检查，发现心脏左室射血功能下降。停化疗，采用利多卡因、心脏营养和扩张血管冠药物治疗 3 周后痊愈。

讨论

5-Fu 的心脏毒性发生率较低，容易被忽视，一组 1 083 例的报道中其发生率为 1.6%，DDP 和 CF 对 5-Fu 心脏毒性的影响不大[1]。根本原因尚未完全清楚，研究发现了一些可能的机

作者简介：朱宇熹(1973－)，男，重庆市人，硕士，医师，主要从事肿瘤放射治疗方面的研究。电话：(023)69012242

收稿日期：2002-06-07；修回日期：2002-09-29

（下转 1275 页）

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