DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.015
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1034 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1034-03

反义hTRT转染对SGC-7901胃癌细胞株形态学的影响

杨仕明,房殿春,杨金亮,罗元辉,鲁 荣,刘为纹 (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 探讨人端粒酶蛋白催化亚单位(hTRT)反义基因转染对SGC-7901胃癌细胞株形态学的影响;方法 采用脂质体法将hTRT正、反义真核表达载体导入SGC-7901胃癌细胞株中,从光镜、电镜水平观察转染细胞形态学的变化。结果 与未转染细胞相比,光镜下hTRT反义基因转染的SGC-7901胞体增大,胞浆丰富,分裂相减少,核浆比增大,异型性减小;透射电镜下反义基因转染细胞细胞器丰富,胞浆内出现分泌泡样结构及胞质内微囊;扫描电镜下反义基因转染细胞表面微绒毛增多,胞体周围可见大量颗粒样物质,根据AB/PAS染色结果,这些颗粒样物质有可能是其分泌的粘液颗粒。结论 hTRT反义基因有促进SGC-7901细胞分化的作用。

关键词:人端粒酶蛋白催化亚单位;反义基因;胃癌
中图法分类号:R329.24;R394.2;R735.2 文献标识码:A

Effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase subunit on the morphology of SGC-7901 after transfection

YANG Shi-ming, FANG Dian-chun, YANG Jin-liang, LUO Yuan-hui, LU Rong, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective The study was designed to explore the effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase subunit (hTRT) on the morphology of SGC-7901. Methods Sense and antisense gene to hTRT were transfected into SGC-7901 with liposome method. Morphological changes of the transfected cells were examined under light and electron microscopy. Results Under light microscope cells transfected with antisense gene to hTRT were larger with abundant cytoplasm and nuclear division decreased, the ratio of nuclei to cytoplasm increased as compared with their parent cells. Ultrastructure revealed that organelles in these cells were abundant under transmission electron microscope, several kinds of cytoplastic giant vaculoes were present in most of these cells which could be stained with AB/PAS. Under scanning electron microscope, these cells showed more microvilli than their parent cells. In addition, many granulae were distributed around the surface of these cells, which might be its secreting granulae according to the AB/PAS stain. Conclusion hTRT antisense gene could promote differentiation of SGC-7901.

Key words: human telomerase reverse transcriptase, antisense gene transfection, gastric cancer

我们以往的研究表明,胃癌组织中端粒酶阳性检出率高达92.3%[1],进一步研究表明,在端粒酶的3个亚单位中,端粒酶蛋白催化亚单位(hTRT)只在胃癌组织及部分癌前病变组织中可以检测得到[2],提示hTRT可以作为胃癌基因治疗的一个良好的靶位。我们最近的研究亦表明,将hTRT反义真核表达载体导入SGC-7901胃癌细胞株中,发现反义hTRT可以明显抑制胃癌细胞的生长,逆转其恶性表型[3],这些现象仅用反义hTRT诱导胃癌细胞凋亡无法解释。本研究拟从转染细胞形态学的改变来初步探索其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SGC-7901胃癌细胞株 *E. Coli* JM109由本室保存;人端粒酶蛋白催化亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT) cDNA pGRN145由美国Geron公司惠赠;pcI-neo真核表达载体,*Not*Ⅰ、*Hinf*Ⅰ、*EcoR*Ⅰ限制性内切酶,T4 DNA连接酶,碱性磷酸酶(CIP),无DNase的RNase,RT-PCR试剂盒购自Promega公司;TRAP-ELISA试剂盒、DOTAP脂质体、G418、Tripure、质粒提取试剂盒、cDNA片段回收试剂盒购自Boehringer Mannheim公司;十二烷基肌酸钠(SDS),DEPC购自Sigma公司;1640培养基,低溶点琼脂糖购自GIBCO公司;Sephadex-G50购自Pharmacia公司;高强度琼脂糖9201购自中山公司;血清、蛋白酶K、胰酶购自华美;γ-^{32}P-ATP购自亚辉公司;聚蔗糖(ficoll 400)购自sigma公司;聚乙烯吡咯烷酮、牛血清白蛋白、硝酸纤维素膜购自华美公司;其余试剂均为国产优质分析纯。

1.2 方法

1.2.1 hTRT正、反义真核表达载体的构建及初步鉴定见文献[4]。

1.2.2 细胞培养 SGC-7901细胞在含10%小牛血清的1640培养基中,于37 ℃、5% CO_2,饱合湿度下培养。

1.2.3 正、反义重组质粒的转染(脂质体法)及转染正确性的鉴定见文献[3]。

1.2.4 转染细胞光镜下结构的观察 将消毒的盖玻片放入六孔培养板中,将细胞消化后接种在盖玻片上,待细胞贴壁后,10%福尔马林固定,部分做HE染色,另一部分做AB/PAS染色,方法见文献[5],光镜下观察。

1.2.5 电镜结构 ①透射电镜样品制备:待细胞生长至对数生长期后,低浓度胰酶常规消化细胞,1 000 r/min离心5 min,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770302)
作者简介:杨仕明(1969-),男,湖南省双峰县人,博士,主治医师,讲师,主要从事消化肿瘤端粒酶的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752898
收稿日期:2001-07-11;修回日期:2001-09-04

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

去上清, 生理盐水洗 1 次, 3%戊二醛固定后送检。② 扫描电镜样品制备: 在六孔培养板中放入大小适当的盖玻片, 接种 2 ml 细胞悬液, 放入 CO_2 孵箱中, 培养一定时间, 去掉培养基, 生理盐水漂洗细胞 1~2 次, 3%戊二醛固定后送检。

2　结果

2.1　转染细胞倒置显微镜下结构

7901 细胞呈复层生长, 细胞胞体较小, 呈梭形或多边形, 7901-AS 细胞呈单层生长, 细胞胞体较大, 而 7901-S 细胞呈复层生长, 胞体大小不一, 呈圆形或椭圆形, 可见瘤巨细胞, 见图 1。

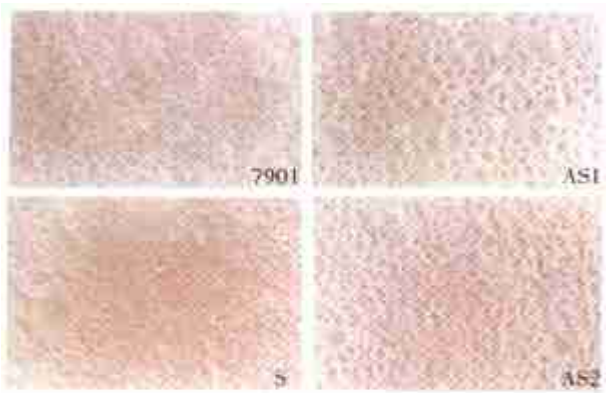


图 1　转染细胞倒置显微镜下形态变化　(× 200)

Fig 1　Morphological changes of transfected cells　(Inverted microscope× 200)

2.2　转染细胞 HE 染色

未转染细胞的 7901 细胞胞体小, 且大小不一, 核大, 核浆比大, 核分裂相多见, 异型性明显; 7901-AS 胞体增大, 大小相对一致, 胞浆丰富, 核分裂相减少, 核浆比减小, 异型性减小; 7901-S 细胞胞体大小不一, 核大、深染, 核仁突出, 病理性核分裂相多见, 出现较多的多核巨细胞和巨核细胞, 见图 2。

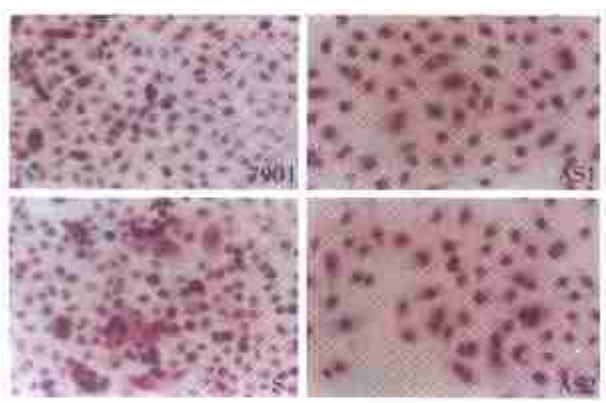


图 2　转染细胞光镜下形态改变　(HE× 200)

Fig 2　Morphological changes of transfected cells under light microscope　(HE× 200)

2.3　转染细胞 AB/PAS 染色

7901-AS 胞浆中出现较多的红色颗粒样物质, 而未转染细胞和 7901-S 中少见这种红色颗粒样物质, 见图 3。

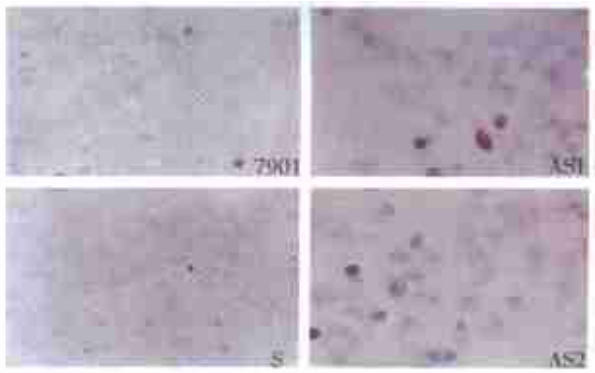


图 3　转染细胞 AB/ PAS 染色结果　(× 200)

Fig 3　Transfected cells after stained with AB/ PAS　(× 200)

2.4　转染细胞透射电镜结果

透射电镜下 7901 细胞核大、核仁大, 形状不规则, 核膜有皱缩, 细胞器不发达, 线粒体少, 形状不规则, 少见粗面内质网, 可见大量的游离核糖体; 7901-AS 线粒体丰富, 形态较为成熟, 可见粗面内质网, 胞浆内出现大量不同类型的空泡样结构, 第一种未见明确的包膜, 但边界清楚, 形状规则, 体积大, 主要位于核旁, 其内可见大量的低电子密度样物质; 第二种空泡未见明确包膜, 边界清晰, 但形状不规则, 其内可见少量低电子密度样物质; 第三种可能是胞质内微囊, 边界晰, 有单层膜包绕, 膜的内面可内散有的微绒毛, 腔内未见低电子密度物质, 根据 AB/PAS 染色结果, 我们初步认为前二种空泡样结构有可能是分泌粘液的分泌泡, 见图 4。 7901-S 胞浆少, 细胞器不发达, 核大, 核仁突出。

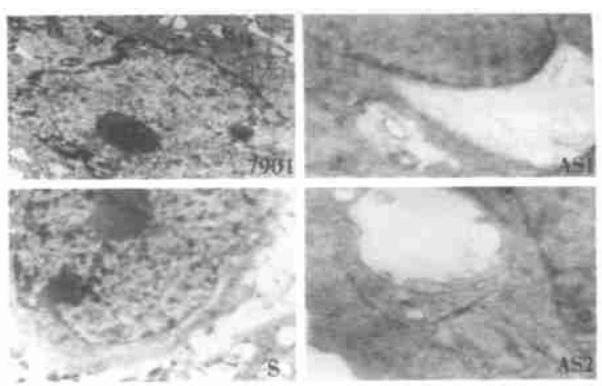


图 4　转染细胞透射电镜下超微结构的变化

Fig 4　Ultrastructural changes of transfected cells

7901: TEM× 4 000; AS1: TEM× 6 000;
S: TEM× 4 000; AS2: TEM× 20 000

2.5　转染细胞扫描电镜结果

7901 细胞呈叠层生长, 大小不一, 形状不规则, 呈椭圆形或梭形, 表面可见少许微绒毛; 7901-AS 细胞呈梭形, 大小一致, 形状规则, 表面微绒毛丰富, 周边可见许多颗粒样物质, 根据 AB/PAS 染色结果, 不排除是其分泌的粘液颗粒的可能; 7901-S 细胞呈四边形, 表面亦可见较多的微绒毛, 成簇分布, 见图 5。

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

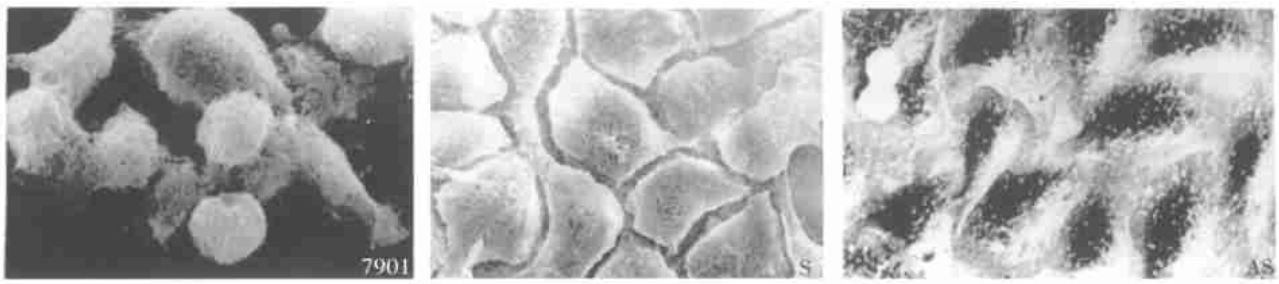


图5 转染细胞扫描电镜下超微结构的变化

Fig 5 Ultrastructural changes of transfected cells

7901: SEM×2 500; S: SEM×1 500; AS: SEM×1 000

3 讨论

我们以前的研究表明，人端粒酶蛋白催化亚单位(hTRT)反义基因可明显抑制胃癌细胞的增殖，进一步研究发现，反义 hTRT 可诱导胃癌细胞凋亡，但凋亡率不足 13%，转染细胞在 G418 筛选下仍可继续生长传代，但这种细胞已失去软琼脂中形成克隆及裸鼠皮下致瘤性的能力[3]，因此，仅用诱导凋亡尚无法解释转染反义 hTRT 后细胞生长受抑的机制。Konda 等[6]将反义人端粒酶 RNA (hTR)转染肿瘤细胞，发现转染细胞出现细胞凋亡及分化两种现象，因此 Konda 认为反义 hTR 通过诱导凋亡及分化机制来抑制肿瘤细胞的生长。晚近，有学者将反义 hTRT 基因或 hTRT 核酶导入肿瘤细胞，发现反义技术可以明显抑制肿瘤细胞的生长，端粒酶活性及端粒长度明显下降，并可诱导细胞凋亡[7,8]。我们研究了转染反义 hTRT 后细胞光镜及电镜下形态学的变化，发现光镜下转染细胞胞体增大，胞浆增多，核浆比减小，异型性减小；透射电镜下转染细胞细胞器丰富，可见较多的粗面内质网，胞浆中出现分泌泡样结构及胞质内微囊；扫描电镜下转染细胞胞体周围可见较多的颗粒样物质，根据 AB/PAS 染色结果，不排除是其分泌的粘液颗粒的可能。

以上形态学结果提示，hTRT 反义基因转染的细胞出现一种分化的趋势，在此基础上，转染细胞克隆形成率及裸鼠皮下致瘤能力消失[3]，提示反义 hTRT 可以促进 SGC-7901 细胞的分化，从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的。

参考文献：

[1] 杨仕明，房殿春，罗元辉 等. 胃癌及癌前组织中端粒酶活性的检测及临床意义[J]. 中华医学杂志，1998，78(3)：207－209.

[2] 杨仕明，房殿春，罗元辉 等. 不同病变胃粘膜端粒酶活性及其亚单位的检测[J]. 癌症，2001，20(1)：23－27.

[3] 杨仕明，房殿春，杨金亮 等. 人端粒酶蛋白催化亚单位反义基因转染对胃癌细胞恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(8)：934－937.

[4] 杨仕明，房殿春，杨金亮 等. 人 hTRT 正、反义真核表达载体的构建及初步鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000，22(11)：1 113－1 114.

[5] 房殿春，刘为纹. 抗人结肠癌单克隆抗体 MC3 用于胃癌及肠上皮化生的免疫组织化学研究[J]. 解放军医学杂志，1990，15(1)：4－7.

[6] Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, *et al*. Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation[J]. FASEB, 1998, 12(10): 801－811.

[7] Zhang X L, Mar V, Zhor W, *et al*. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells[J]. Genes Dev, 1999, 13(18): 2 388－2 399.

[8] Ludwig A, le Saretzki G, Holm P S, *et al*. Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitzes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase [J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 3 053－3 061.

（编辑 薛国文）

消息

欢迎订阅《第二军医大学学报》

《第二军医大学学报》是中国基础医学类及综合性医药卫生类核心期刊，是中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊，被美国《化学文摘》(CA)等国内外权威数据库和文摘性刊物收录。本刊主要报道基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、药学和祖国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新经验。辟有：院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、综述、临床病理(病例)讨论、技术和方法、经验交流、争鸣园地、学术讲座、短篇报道、个案报告、书评等栏目。

本刊为月刊，大16开，100页，铜版纸印刷，每月月末出版。每期定价10.00元，全年120.00元。邮发代号：4-373，请及时向当地邮局订阅，漏订读者请直接汇款至本刊编辑部，免收邮寄费。地址：上海市翔殷路818号《第二军医大学学报》编辑部，邮编：200433，联系人：邓晓群。电话：021-25070130，电子信箱：bxue@smmu.edu.cn。

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