DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.011
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1027-03

论著

人反义端粒酶RNA转染SGC-7901细胞后细胞周期调控基因表达的改变

杨金亮,房殿春,杨仕明,罗元辉 (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:观察反义人端粒酶RNA(Human telomerase RNA components, hTR)转染的SGC-7901胃癌细胞(7901-ahTR)细胞周期调控基因表达的变化。方法 采用RT-PCR、Western印迹和免疫组化方法检测SGC-7901和7901-ahTR细胞p21、p27、p16、c-myc等基因mRNA和蛋白的表达。结果 反义hTR转染的7901细胞p21和p27表达增加,PCNA和c-myc表达下调,而cyclinD1和p16 mRNA表达无明显变化。结论 抑制端粒酶活性能调节多种细胞周期调控基因的表达,从而抑制肿瘤细胞的增殖和诱导分化。

关键词:胃癌细胞;端粒酶;反义人端粒酶RNA(hTR);细胞周期;p21;p27;p16;c-myc;PCNA
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.2 文献标识码:A

Effect on expression of cell cycle genes in human gastric carcinoma SGC-7901 cells transfected by antisense human telomerase RNA

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

Abstract: Objective To investigate the expression of cell cycle-regulated genes in antisense human telomerase RNA (hTR) transfected gastric carcinoma cell line SGC-7901(7901-ahTR). Methods Expression of mRNA and protein of p16, p21, p27, c-myc and PCNA in SGC-7901 cells and in 7901-ahTR cells were examined by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemcial technique. Results Compared with SGC-7901 cells, 7901-ahTR cells showed an increased mRNA and protein expression of p21 and p27 and decreased PCNA protein and c-myc mRNA expression, but cyclin D1 and p16 mRNA expression had no changes. Conclusion Inhibition of telomerase activity could regulate expression of cell cycle regulated gene and then inhibit the growth and promote the differentiation of 7901 cells.

Key words: telomerase; gastric carcinoma cells(SGC-7901); human telomerase RNA components (hTR); PCNA p21; p27; p16; c-myc; PCNA

我们既往的研究发现,反义人端粒酶RNA(hTR)转染的人胃癌细胞SGC-7901(7901-ahTR)端粒酶活性明显下降,细胞趋向分化,恶性表型发生了逆转[1]。在此基础上,我们进一步观察了7901-ahTR细胞在端粒酶活性下降后细胞周期调控基因表达的变化,旨在探讨端粒酶影响胃癌细胞增殖与分化的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与培养

人胃癌细胞系SGC-7901和反义hTR转染的SGC-7901细胞(7901-ahTR)均培养于含10%灭活小牛血清、100 μg/ml链霉素、100 U/ml青霉素的RPMI1640培养液中,培养条件为37℃、5% CO_2、饱和湿度,每隔2~3 d用0.25%胰酶/0.02%EDTA消化,以1∶3~1∶5传代1次。

1.2 RT-PCR

RT-PCR引物序列(5′→3′)为

GAPDH(598 bp)	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC
	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA
c-myc(505 bp)	CCAGGACTGTATGTGGAGCG
	CTTGAGGACCAGTGGGCTGT
p16(250 bp)	CCATCGCGATGTCGCACGG
	GGCAGGACATTTTTAAAAGCT
cyclinD1(428 bp)	ATGCCAACCTCCTCAACGAAC
	TGGCACAAGAGGCAACGAAGG

RNA提取采用Tripure试剂(Roche)按说明书进行。RT-PCR采用一步一管法(Acess RT-PCR system, Promega)。反应体系为:总体积25 μl、dNTP 0.2 mmol、上下游引物各1 mmol、$MgSO_4$ 1 mmol、AMV逆转录酶0.1 U/ml、Tfl DNA聚合酶0.1 U/ml、1×反应缓冲液、RNA模板100 ng、扩增条件为48 ℃,45 min→94 ℃,2 min→94 ℃,30 s;60 ℃,40 s;68 ℃,1 min;40 cycles→68 ℃,7 min。取3~6 μl扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。

1.3 Western blot

细胞总蛋白质提取按《分子克隆》方法进行,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质条带(每孔上样10 μg),电转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上。2%脱脂奶粉封闭液中过夜,加入1∶100 TBST液稀释的第一抗体(Sigma),37 ℃水浴振荡1 h;TBST液洗膜,加入用1∶1 000 TBST稀释的第二抗体(Sigma),37 ℃水浴振荡1 h,TBST液洗膜后用新鲜配制的DAB染色液显色,NC膜烤干保存。

1.4 免疫组化染色

4%多聚甲醛固定细胞爬片;30% H_2O_2/甲醇孵育20 min,0.1%胰酶消化20 min,0.1%Triton X-100处理5 min,PBS冲洗;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770302)
作者简介:杨金亮(1967—),男,山西省平顺县人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的免疫和基因治疗研究,发表论文10余篇。电话:(023)65180109
收稿日期:2001-06-25;修回日期:2001-08-30

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

正常羊血清封闭 20 min，加 1∶300 一抗(Sigma)4 ℃过夜；PBS 冲洗，加生物素化二抗(1∶100)37 ℃孵育 30 min，PBS 冲洗，DAB 显色，中性树胶封片，以 0.1 mol/L PBS 代替一抗作阴性对照。结果判断：阳性着色为胞核着色，颜色为棕黄色至棕红色，依据颜色深浅判断染色强度。

2 结果

2.1 反义 hTR 转染的 7901 细胞 p21 和 p27 基因的表达

RT-PCR 和 Western blot 结果显示，见图 1，7901-ahTR 细胞 p21、p27 mRNA 和蛋白表达明显上调。

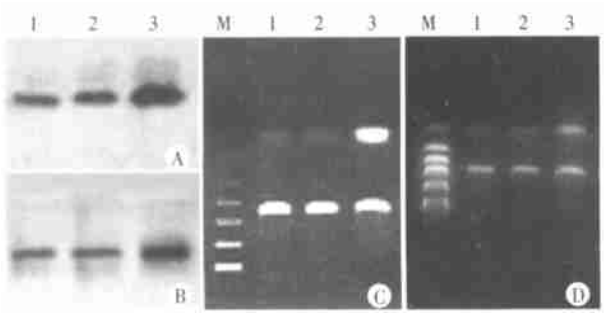


图 1 p21、p27 RT-PCR 和 Western blotting 结果

Fig 1 Results of RT-PCR and Western blotting of p21 and p27 in 7901-ahTR cells

Lane 1: 7901 cells; Lane 2: 7901-neo cells; Lane 3: 7901-ahTR cells; M: PCR marker(1 543, 994, 695, 515, 377, 237 bp); A: Western blotting of p21; B: Western blotting of p27; C: RT-PCR result of p21; D: RT-PCR result of p27

2.2 反义 hTR 转染的 7901 细胞 c-myc、cyclinD1 和 p16 基因的表达

RT-PCR 结果显示，见图 2，7901-ahTR 细胞 c-myc mRNA 表达明显下调，而 cyclinD1 和 p16 mRNA 表达水平无明显变化。

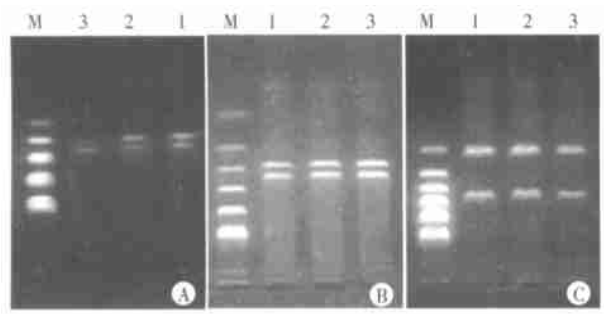


图 2 c-myc、cyclin D1 和 p16 RT-PCR 结果

Fig 2 RT-PCR results of c-myc, cyclin D1 and p16 genes in 7901-ahTR cells

Lane 1: 7901cells; Lane 2: 7901-neo cells; Lane 3: 7901-ahTR cells; M: PCR marker(1 543, 994, 695, 515, 377, 237 bp); A: RT-PCR result of c-myc; B: RT-PCR result of cyclin D_1; C: RT-PCR result of p16

2.3 反义 hTR 转染的 7901 细胞 PCNA 的表达

免疫组化染色显示，见图 3，7901-ahTR 细胞胞核形态相对一致，而强阳性细胞所占比例和染色深度较 7901 细胞明显降低。

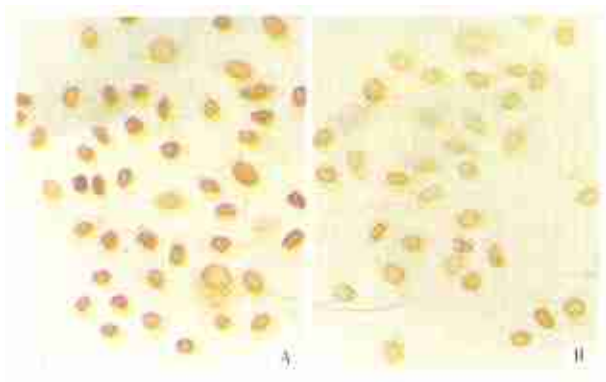


图 3 PCNA 免疫组化染色结果 (S-P× 200)

Fig 3 Immunohistochemical staining of PCNA in 7901-ahTR and 7901 cells (S-P× 200)

A: 7901 cells; B: 7901-ahTR cells

3 讨论

Harley 等[2]认为肿瘤的发生可分为两个步骤，首先是多基因变异的累积导致细胞增殖失控，其次是随着端粒的进行性缩短，最终激活了端粒酶而使肿瘤细胞获得永生化表型。抑制端粒酶活性能重新激活肿瘤细胞的衰老死亡程序或诱导分化[1,2,4]。本研究则从细胞周期调控角度来探讨抑制端粒酶活性后 7901 细胞分化和增殖抑制的机制。

p21 和 p27 是最重要的细胞周期抑制蛋白，能广泛抑制 CDK4/CDK6 活性，阻止细胞周期进程和促进细胞分化[5,6]。本研究反义 hTR 转染的 7901 细胞呈现分化表型，可能与 p21 和 p27 表达上调从而抑制细胞由 G_1 期向 S 期移行和促进分化有关。Kondo 等[4]也发现在抑制端粒酶活性可明显上调 p21 和 p27 表达，促进胶质瘤细胞 U251-MG 分化，与本结果相一致。

c-myc 对细胞增殖和凋亡起双向调节作用，它的表达严格依赖于分裂信号，肿瘤细胞在诱导分化过程中 c-myc 表达下降[7]。PCNA 是 DNA 聚合酶辅因子，细胞增殖信号必须通过 PCNA 参与才能引发 DNA 合成。PCNA 在许多肿瘤组织高表达，与肿瘤的恶性程度成正相关，是细胞活跃分裂的指标[8]。本研究发现，将反义 hTR 转染 7901 细胞可使其 PCNA 表达下调，细胞 DNA 合成减少，进一步使肿瘤细胞增殖受阻或减慢。

p16 是 CDK4 的特异性抑制剂，可竞争 cyclinD 与 CDK4 结合，抑制 CDK4 活性和 Rb 磷酸化，阻止细胞进入 S 期，与细胞衰老有密切关系[9]。cyclin D1 在整合和传递外源增殖信号中起重要作用，其过表达与肿瘤细胞无限制增殖有关[10]。本研究发现反义 hTR 转染的 7901 细胞 p16 和 cyclin D1 表达水平无明显变化，提

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

示抑制端粒酶活性不能逆转 7901 细胞的无限制增殖能力。综上所述，抑制 7901 细胞端粒酶活性可能主要通过下调 p21、p27 和 PCNA 表达来减慢细胞周期运行的速度，促进细胞分化。然而，细胞周期调控是一个非常复杂的过程，还有许多其它分子参与，因此抑制端粒酶活性对细胞周期的影响的详细机制和作用模式值得进一步研究，这将有助于阐明端粒酶参与细胞增殖分化调节的机制。

参考文献：

[1] 杨金亮，杨仕明，房殿春，等. 反义 hTR 对人胃癌细胞系 SGC-7901 恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报，2000，22(7)：611－614.
[2] Harley C B，Futcher B A，Greider C W. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts[J]. Nature，1990，345(6 274)：458－460.
[3] Feng J L，Funk W D，Wang S S，*et al*. The RNA component of human telomerase[J]. Science，1995，269(1)：1 236－1 241.
[4] Kondo S，Tanaka Y，Kondo Y，*et al*. Antisense telomerase treatment：induction of two distinct pathways，apoptosis and differentiation[J]. FASEB J，1998，12(4)：801－811.
[5] 范祖森，敖世州. 细胞周期关卡调控与细胞癌变[J]. 自然杂志，1999，21(1)：8－11.
[6] Waga S，Hannon G J，Beach D，*et al*. The P21 inhibitor of cyclin-dependent kinases contains DNA replication by interaction with PCNA[J]. Nature，1994，369(5)：574－578.
[7] 庄贤韩，郑　树. c-myc 介导的细胞凋亡途径[J]. 国外医学：分子生物学分册，1999，21(4)：214－217.
[8] Robbins B A，Vega D，Ogata K，*et al*. Immunohistochemical detection of proliferation cell nuclear antigen in solid human malignancies[J]. Arch Pathol Lab Med，1987，111(7)：841－845.
[9] 胡　云. Cyclin D1 与肿瘤[J]. 国外医学：遗传学分册，1999，22(1)：30－32.
[10] 王晓明，张桂茹，刘汉奇. p16 基因与细胞周期调节[J]. 国外医学：临床生物化学与检验分册，1998，19(6)：263－265.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2001)09-1029-01

个案与短篇

结肠钩虫病 3 例报告

Report of 3 cases of colon ancylostomiasis

刘明涛，杨建民，肖天利，王振华，李向红　（第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038）

例 1：患者女性，41 岁，农民，因间歇性脐周腹痛 4 月余，加重伴腹泻、血便 20 d 入院。查体：慢性病容，贫血貌，扶入病房，心肺检查无异常，腹平软，无压痛、反跳痛。胃镜检查示胃、十二指肠均未见异常，结肠镜检查发现：结肠各段见众多寄生虫吸附在肠壁上，虫体呈线形，大小约 0.2 cm×1.0 cm，吸附处粘膜有活动性出血及充血水肿。虫体经我校寄生虫学教研室鉴定为十二指肠钩虫。经复方甲苯咪唑等治疗，痊愈出院。

例 2：患者女性，33 岁，农民，因左下腹痛 5 年余，在院外诊疗无效来我院门诊就医。查体：一般情况可，心肺检查无异常，腹平软，左下腹轻度压痛，无反跳痛及包块。

例 3：患者女性，43 岁，农民，因脓血便 3 年，在院外诊治无效来我院门诊就医。查体无异常。例 2、例 3 胃镜检查见胃及十二指肠均无异常，但结肠镜检查发现大肠粘膜有外形和大小与例 1 所见相似的寄生虫附着，其中例 2 虫体吸附于回盲部，例 3 虫体同时吸附于回盲部、乙状结肠及直肠，吸附处有渗血。虫体均经我校寄生虫学教研室鉴定为十二指肠钩虫。

讨论

钩虫病由十二指肠钩虫或/和美洲钩虫感染引起，成虫主要寄生在空肠，少数寄生在十二指肠与回肠上段。虫体单独寄生于结肠的钩虫病少见报道。钩虫成虫移行至结肠定居，其原因不清，是否与虫体的感染度、宿主的营养状况及肠道内环境的改变，以及虫体寄生特性变异有关，尚待进一步研究证实。

文献[1～4]及本组 3 例，患者均为农民，女性多见，临床表现主要为腹痛、腹泻、乏力、头昏、贫血及浮肿等，虫体寄生于直肠和乙状结肠者，则同时有血便和脓血便，消化道出血多表现为慢性少量出血，但亦可表现为急性大量下消化化道出血，甚至体位性低血压或失血性休克。本病由于缺乏特异的临床表现，容易漏诊和误诊，应引起广大临床医师的注意。对一些不明原因的贫血，经大便常规检查，甚至胃镜检查胃、十二指肠也未见异常者，仍应考虑有无结肠钩虫感染的可能。对消化道出血者，除考虑溃疡、门脉高压性胃病、胃肠肿瘤等常见疾病外，找不到其他原因时，也应考虑结肠钩虫病的可能性并及时行结肠镜检查，将有助于明确诊断。本病治疗同一般钩虫病。

关键词：钩虫病；结肠
中图法分类号：R532.12　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 裘雁秋. 钩虫结肠寄生引起消化道出血 1 例报道[J]. 实用寄生虫病杂志，1995，3(3)：131.
[2] 孙恒芳. 以下消化道大出血为表现的回盲部钩虫病 1 例报告[J]. 临床医学，1995，15(6)：47－48.
[3] 董志英. 纤维结肠镜检查确诊钩虫病 1 例[J]. 实用医学杂志，1994，10(4)：435.
[4] 魏玉涵. 结肠钩虫病致下消化道出血临床分析[J]. 职业与健康，1998，14(1)：51－52.

（编辑　郭建秀）

作者简介：刘明涛(1964－)，男，重庆市人，主治医师，主要从事消化内科方面的研究，现在重庆市渝北区人民医院内二科，重庆 401120。电话：(023)67802356

收稿日期：2000-09-30；修回日期：2001-03-25

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