DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.032
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1203-03

论著

稳定表达细胞周期蛋白D1反义基因逆转人胃癌细胞恶性表型

陈 兵[1],常杭花[2],彭亦良[1],刘宝华[3],刘为纹[4],房殿春[4],张学庸[5],樊代明[5] ([1]第三军医大学附属西南医院内分泌科,重庆 400038;[2]重庆市第九人民医院胃镜室,重庆 400700;[3]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042;[4]第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038;[5]第四军医大学西京医院全军消化病研究所,西安 700032)

提 要:目的 探讨细胞周期蛋白D1对肿瘤生物学行为的影响及用于基因治疗的可能。方法 利用重组技术将人细胞周期蛋白D1 cDNA全片段克隆至亚克隆载体Bluescript-KS中。利用该载体内的T2/T3成对启动子体系,体外转录法制备正、反义细胞周期蛋白D1单链RNA探针。同时利用该载体转换酶切位点的作用,构建了人细胞周期蛋白D1反义RNA真核表达载体pDORD1AS,阳离子脂质体介导下转染胃癌细胞株,经G418筛选获得细胞周期蛋白D1反义RNA稳定表达的阳性细胞克隆。用免疫细胞化学、流式细胞仪、分子杂交、病理形态学和细胞生物学方法对该阳性细胞克隆进行检测,同时设未经转染和转染空载体胃癌细胞组作对照。结果 阳性细胞克隆细胞周期蛋白D1表达较对照组减少(抑制率约为36%);细胞体积增大,核浆比例下降;细胞倍增时间延长(42.2 h比26.8 h及26.4 h),生长饱和密度下降(1.9×10^5比4.8×10^5及4.8×10^5),G_1/G_0期细胞比例增加(80.9%比64.6%及63.8%),血清依赖性有所恢复,裸鼠成瘤率下降(0/4比4/4及4/4)。结论 稳定表达细胞周期蛋白D1反义RNA对胃癌细胞SGC7901/VCR的恶性表型有一定的逆转作用,进一步深入的研究是有意义的。

关键词:胃肿瘤;细胞周期蛋白D1;反义基因
中图法分类号:R394.2;R73-36;R735.2 文献标识码:A

Stable overexpression of cyclin D1 antisense gene reverses the transformed phenotype of human gastric cancer cells

CHEN Bing, CHANG Hang-hua, PENG Yi-liang, LIU Bao-hua, LIU Wei-wen, FANG Dian-chun, ZHANG Xue-yong, FAN Dai-ming (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To further investigate the effect of cyclin D1 on the biologic behavior of cancer cells and its potential role in gene therapy of tumor. **Methods** A cyclin D1 subcloning plasmid termed BKSD1 was constructed by subcloning the human cyclin D1 cDNA into Bluescript-KS, a plasmid vector with a pair of T7 and T3 promoters, with recombinant DNA technology of molecular biology. So, it is easy to generate digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes of antisense and sense to cyclin D1 using RKSD1 as a template vector. PDORD1AS, an eukaryotic expression vector containing the full-length human cyclin D1 cDNA in its antisense orientation cloned into the retroviral vector pDOR-neo, was successfully constructed with BKSD1 to change restriction sites. A gastric cancer cell line, SGC7901/VCR, was transfected with pDORD1AS by Lipofect Amine-mediated introduction and a subline termed SGC7901/VCRD1AS, which had stable overexpression of antisense RNA to cyclin D1, was obtained by selection in G418. The subline, control subline transfected pDOR-neo and SGC7901/VCR were evaluated by methods of immunohistochemistry, flow cytometry, molecular hybridization, morphology and cell biology. **Results** Compared with control cell lines, SGC7901/VCRD1AS had a reduced expression of cyclin D1 (inhibition rate was about 36%), increased cell size and cytoplasm to nucleus ratio, increased doubling time (42.2 h to 26.8 h and 26.4 h), decreased saturation density (1.9×10^5 to 4.8×10^5 and 4.8×10^5), increased percentage of cells in the G_1/G_0 phase (80.9% to 64.6% and 63.8%), reacquired serum dependence, and a loss of tumorigenicity in nude mice (0/4 to 4/4 and 4/4). **Conclusion** Stable overexpression of antisense RNA to cyclin D1 can reverse the transformed phenotype of human gastric cancer cells and may provide an approach of gene therapy for gastric cancer.

Key words: stomach neoplasms; cyclin D1; antisense gene

癌基因和抑癌基因功能性研究的结果表明,这些基因多数涉及到信号传导通路并在细胞增殖、分化乃至细胞周期调控中起着重要的作用。这些研究的结果提示一些调控细胞周期的关键性蛋白可能也与癌症的发生和发展有关。目前的研究结果显示,由细胞周期蛋白(Cyclins)和细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependant kinases, CDKs)构成的一系列全酶的激活是细胞周期调控的核心因素,其中cyclins是决定合酶细胞周期时相特异性的调节亚单位。由于G_1期是细胞周期中决定细胞增殖分化的关键时相,因此作用在G_1期的Cyclin D1被认为是极好的癌基因候选者[1]。事实上定位于11q13区的Cyclin D1基因的重排、扩增和过高表达,已在多种肿瘤中检出。Cyclin D1过表达可导致鼠成纤维细胞株的加速增殖和植瘤力增加。Cyclin D1基因与ras或E1A癌基因共转染可使啮齿类原代成纤维细胞转化。为了进一步证实Cyclin D1的癌基因作用,我们构建了含人Cyclin D1基因全片段的反义RNA真核表达载体[2],观察了其转染后对SGC7901/VCR人胃癌细胞恶性表型的影响。

基金项目:总后勤部博士后科学基金资助项目(中博基[1998]6号)
作者简介:陈 兵(1960-),男,江苏省南京市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事内科疾病的研究。电话:(023)68754138
收稿日期:2001-07-19;修回日期:2001-09-07

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃癌细胞株SGC7901/VCR、人膀胱癌细胞株T24和人白

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

血病细胞株 K562 由第四军医大学全军消化病研究所和口腔生物中心惠赠[3,4]。培养液为加有 10%胎牛血清及青、链霉素的 RPMI1640(GIBCO)。neo 抗性细胞培养液中另加入 G418(GIBCO)[4]。

1.2 反义 Cyclin D1 表达载体的构建

在 *Hind* Ⅲ酶切位点插有人 Cyclin D1 cDNA 全片段的 RKSD1 质粒,由哥伦比亚大学癌症研究中心惠赠。利用该质粒中的 Cyclin D1 cDNA 片段、Bluescript KS 和 pDOR-neo 质粒,我们自行构建了 Cyclin D1 亚克隆载体 BKSD1 和反义 Cyclin D1 真核表达载体 pDORD1AS,具体构建方法见文献[2]。

1.3 细胞转染

采用阳离子脂质体 LipofectAMINE(GIBCO)介导的方法[5],将反义 Cyclin D1 真核表达载体 pDORD1AS 和对照用空载体 pDOR-neo 转入人胃癌细胞 SGC7901/VCR 中。G418 筛选后获得 Cyclin D1 反义 RNA 稳定表达的细胞株 SGC7901/VCRD1AS。

1.4 免疫细胞化学染色[6]

用抗 Cyclin D1 单克隆抗体 DSC-6(NewMarkers),对指数生长期细胞爬片进行免疫细胞化学染色。T24 和 K562 细胞株分别用作为 Cyclin D1 表达的阳性和阴性对照。

1.5 原位杂交[7]

利用 Cyclin D1 亚克隆载体 BKSD1 含有 T7/T3 成对启动子体系的特性,采用体外转录法制备地高辛标记的 Cyclin D1 正、反义 RNA 探针。按非放射性原位杂交程序对指数生长期细胞爬片进行杂交。设 T24、K562、SGC7901/VCR 和转染 pDOR-neo 的 SGC7901/VCRneo 细胞作对照。

1.6 流式细胞仪检测[5]

取指数生长期的实验细胞和未转染、转染空载体的对照细胞,PI 或免疫荧光染色后上流式细胞仪,检测细胞周期分布和 Cyclin D1 蛋白的表达水平。所有检测均重复 3 次。

1.7 细胞倍增时间和生长饱和密度的测定[4]

按 2.5×10^4/孔的密度 3 复孔接种细胞至 24 孔板,每孔加 1 ml 完全培养液培养,每日取一板细胞计数共 10 d。绘制生长曲线计得细胞倍增时间和生长饱和密度。

1.8 细胞生长血清依赖性试验[7]

按 2.5×10^4/孔的密度 3 复孔接种细胞至 24 孔板,分别加入含 10%、2.5%和 0.5%胎牛血清的培养液中培养,绘制生长曲线观察每种细胞生长血清依赖性的不同。

1.9 软琼脂克隆形成试验[4]

每种细胞 3 复孔接种于加有 0.3%软琼脂培养基的 24 孔板中,培养 2 周后显微镜下计数克隆形成率。试验重复两次。

1.10 植瘤力试验[7]

按 5×10^5 细胞/点皮下复点接种裸鼠。每周检测移植瘤形成情况,1 月后处死。

2 结果

2.1 Cyclin D1 反义 RNA 在 SGC7901/VCR 细胞中的表达

Cyclin D1 过表达的 SGC7901/VCR 细胞经转染 Cyclin D1 反义结构 pDORD1AS 和 G418 筛选,随机挑取 neo 抗性细胞克隆(neo+)并命名为 SGC7901/VCRD1AS。同时转染空载体 pDOR-neo,G418 筛选后,随机挑取的 neo+ 细胞克隆 SGC7901/VCRneo 用作载体对照。免疫细胞化学、流式细胞仪和原位杂交的检测结果表明:SGC7901/VCRD1AS 细胞出现 Cyclin D1 反义 RNA 的表达,而对照 SGC7901/VCR 和 SGC7901/VCRneo 细胞中未检出。可观察到 SGC7901/VCRD1AS 细胞的 Cyclin D1 mRNA 和蛋白表达水平较对照细胞明显减低,流式细胞仪蛋白表达水平定量检测差异非常显著($P<0.01$),抑制率为 36%。

2.2 形态学和细胞生物学特性的观察结果

形态学观察的结果示,SGC7901/VCR 和 SGC7901/VCRneo 对照细胞表现为接触抑制能力的丧失,呈堆叠的致密性生长。而 SGC7901/VCRD1AS 细胞呈单层疏松性生长,细胞较为扁平,体积有所增大,核浆比例减少,见图 1。细胞生物学检测结果见图 2、3 和表 1。与对照细胞相比,SGC7901/VCRD1AS 细胞的倍增时间显著延长($P<0.01$),G_1/G_0 期细胞比例增加,血清依赖性有所恢复,生长饱和密度显著降低($P<0.01$),软琼脂克隆形成率和裸鼠移植瘤形成率显著减低($P<0.01$)。

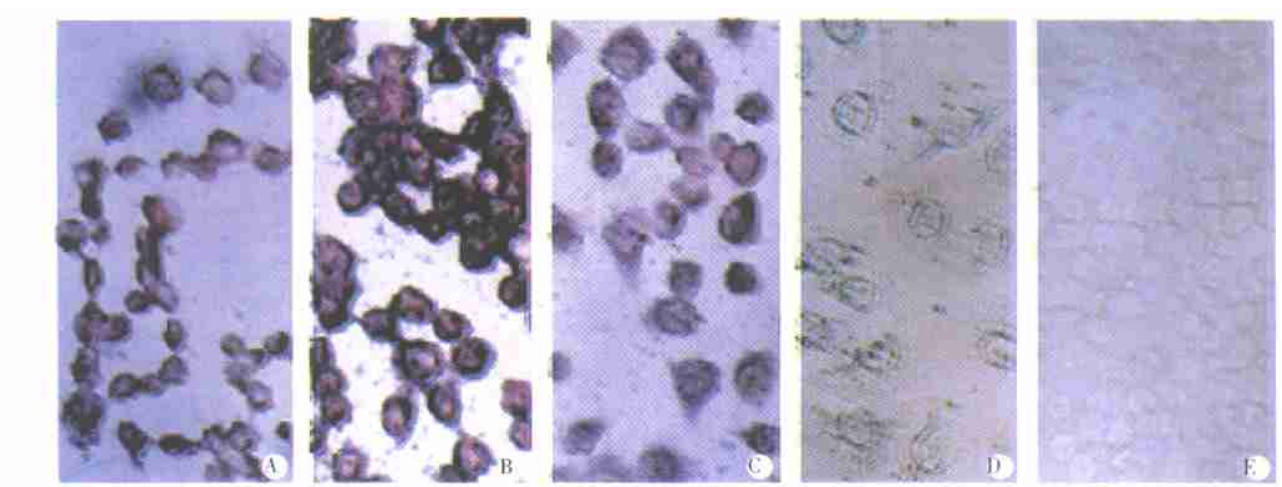


图 1 **DIG 标记的 Cyclin D1 反义 DNA 单链探针原位杂交的结果** (×400)

Fig 1 *In situ* hybridization of Cyclin D1 mRNA in cell lines (×400)

A: T24; B: SGC7901/VCR; C: SGC7901/VCRneo; D: SGC7901/VCRD1AS; E: K562

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

表 1　Cyclin D1 反义 RNA 对胃癌细胞生长特性和植瘤力的影响

Tab 1　Growth properties and tumorigenicity of SGC7901/VCRD1AS and control cell lines

	SGC7901/VCR	SGC7901/VCRneo	SGC7901/VCRD1AS
Doubling time (h)	26.8	26.4	42.2 *
Saturation density ($\times 10^5$)	4.8	4.8	1.9 *
Distribution of cell cycle (%)			
G_1/G_0	64.6	63.8	80.9
S	25.9	27.8	13.0
G_2-M	9.4	8.3	6.1
Eefficiency of colony forming (%)	5.47	5.50	0.03 *
Tumor formation in nude mice	4/4	4/4	0/4 *

*: $P < 0.01$ *vs* control (SGC7901/VCR and SGC7901/VCRneo)

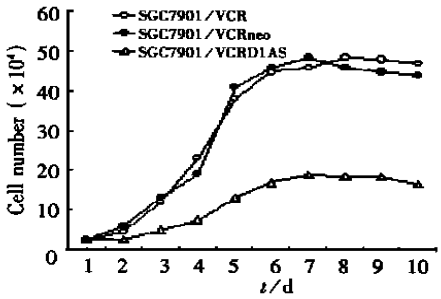


图 2　细胞生长曲线

Fig 2　Growth curve of SGC7901/VCRD1AS and control cell lines

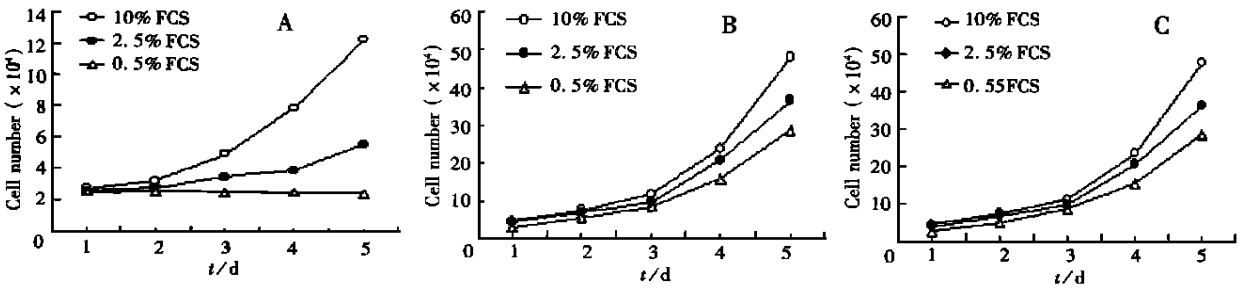


图 3　血清依赖性细胞生长曲线

Fig 3　Growth curve of serum dependence cells of SGC7901/VCRD1AS and control cell lines (SGC7901/VCR and SGC7901/VCRneo)

A: SGC7901/VCRD1AS; B: SGC7901/VCRneo; C: SGC7901/VCR

3　讨论

有学者曾利用微注射技术在 G_1 期时将 Cyclin D1 抗体或质粒注入成纤维细胞或 B 淋巴细胞中, 发现这些细胞无法进入 S 期, 提示 Cyclin D1 可能在 G_1-S 期转换中起重要的作用。但是这些微注射的研究方法存在着基因表达短暂的缺陷, 无法研究 Cyclin D1 过表达在持续性分裂的细胞、细胞增殖调控和肿瘤发生发展中的作用[1]。因而又有学者在成纤维细胞稳定过表达 Cyclin D1 基因, 发现细胞 G_1 期缩短[8]。我们的实验表明, 稳定表达 Cyclin D1 反义 RNA 可抑制胃癌细胞中 Cyclin D1 的表达, 并出现一些恶性表型逆转的现象: 倍增时间延长 G_1/G_0 期比例增加, 提示细胞增殖受抑于 G_1 期; 生长饱和密度的下降和血清依赖性的增加, 说明细胞增殖受外源性信号调控的特性有所恢复; 单层低密度的生长方式和核浆比例的减低, 说明锚着依赖性和上皮细胞表型有所恢复。总之, 这些结果提示抑制 Cyclin D1 的过表达能逆转胃癌细胞的恶性表型, 并有可能成为一种潜在的胃癌基因疗法的途径。由于 Cyclin D1 的过表达已在多种人类肿瘤中检出, 故本研究的结果对其它类型的肿瘤可能也是有意义的。

参考文献:

[1] Sandhu C, Slingerland J. Deregulation of the cell cycle in cancer[J]. Cancer Detect Prev, 2000, 24(2): 107—118.

[2] 陈　兵, 张学庸, 樊代明, 等. Cyclin D1 反义基因真核表达载体的构建及其鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(2): 45—46.

[3] 蔡学君, 张学庸, 樊代明, 等. 胃癌多药耐药株的建立及其生物学特性[J]. 中国肿瘤临床, 1994, 2(增刊): 67—71.

[4] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 186—187.

[5] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al*. Short protocols in molecular biology[J]. 3rd ed. Canada: John Wiley & Sons, 1995. 208—211.

[6] 蔡文琴, 王伯行, 主编. 实用免疫细胞化学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988. 98—102.

[7] Jeha S, Basu H S, Sakakura C, *et al*. Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cell[J]. Cancer Res, 1996, 56(11): 1 445—1 450.

[8] Assoian R K, Schwartz M A. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G_1 phase cell-cycle progression[J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(1): 48—53.

（编辑　王　红）

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