DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.028

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0934-04

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

杨仕明,房殿春,杨金亮,罗元辉,鲁 荣,陈 兵,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)反义基因治疗对胃癌细胞恶性表型的逆转作用。**方法** 采用基因重组技术,构建hTRT正、反义真核表达载体,采用脂质体法导入SGC-7901细胞,检测细胞生长曲线、端粒酶活性凋亡、细胞周期、软琼脂中克隆形成率及裸鼠体内成瘤性的变化。**结果** 成功构建hTRT正、反义真核表达载体,并导入SGC-7901胃癌细胞株中,获得稳定表达正、反义基因的细胞系7901-S、7901-AS1和7901-AS2。7901-AS1和7901-AS2出现显著生长抑制现象,端粒酶活性明显下降,细胞凋亡增加,异型性减小,G_0/G_1期细胞增加,S和G_2M期细胞减少,增殖指数减小,软琼脂中无克隆形成,裸鼠体内成瘤消失。**结论** hTRT反义基因治疗可以明显抑制SGC-7901细胞的增殖,部分逆转肿瘤细胞的恶性表型,其机制可能主要是通过诱导细胞分化而非诱导细胞凋亡途径实现的,提示hTRT基因可以作为肿瘤治疗的靶基因。

关键词:人端粒酶蛋白催化亚单位;反义基因治疗;胃癌
中图法分类号:R394.3;R730.23;R735.2 **文献标识码**:A

Reverse malignant phenotypes of gastric cancer cell lines transfected with antisense gene to human telomerase reverse transcriptase

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

Abstract: Objective To study the effects of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase (hTRT) on reversing malignant phenotype of gastric cancer cell lines. **Methods** Sense and antisense eukaryotic expressing vectors of hTRT gene were constructed by recombinant technique of molecule and then transfected into human gastric cancer lines, SCG-7901 with DOTAP liposomal transfection method. Changes of cellular malignant phenotypes through proliferation capability, telomerase activity, apoptosis, cell cycle, clone formation in soft agar and tumorigenicity in nude mice were examined. **Results** Sense and antisense eukaryotic expressing vectors were successfully constructed and transfected into SGC-7901. The transfectants obtained named 7901-sense (7901-S), 7901-antisense 1(7901-AS1) and 7901-antisense 2 (7901-AS2) stablely produced sense and antisense hTRT respectively. 7901-AS1 and 7901-AS2 showed obviously decrease in growth and telomerase activity. Flow cytometric analysis displayed an accumulation of cell in the G_0/G_1 phase of cell cycle and a decreased percentange of proliferative index. Tumorigenicity in nude mice and cloning efficiency in soft agar were also markedly inhibited. **Conclusion** Antisense gene to hTRT could significantly suppress cancer cell growth, partially reverse malignant phenotypes of SGC-7901. Therefore, hTRT may be a new target gene for antisense gene therapy of cancer.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; antisense gene therapy; gastric cancer

我们以前的研究表明,胃癌组织中端粒酶阳性率高达92.3%[1],提示端粒酶是目前发现的最为广谱的肿瘤标志物,有可能成为肿瘤基因治疗的靶位。人端粒酶是至少由3个亚单位组成,即端粒酶RNA(Human telomerase RNA, hTR)、端粒酶催化亚单位(Telomerase catalytic subunit, 或 Human telomerase reverse transcriptase, hTRT/hEST2)和端粒酶相关蛋白1(Telomerase associated protein 1, TP1)。我们已成功地将端粒酶RNA反义基因导入SGC-7901细胞,发现转染细胞在增殖活性、克隆形成率及裸鼠体内致瘤性方面均明显减弱[2]。但hTRT作为胃癌基因治疗的靶基因对胃癌生物学行为的影响国内外尚无报道。为探讨hTRT反义基因对胃癌细胞恶性表型的逆转作用,我们成功地构建了hTRT正、反义真核表达载体,将之转染SGC-7901细胞,以研究转染细胞在恶性表型上的变化。

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;人端粒酶蛋白催化单位(Telomerase reverse transcriptase, hTRT) cDNA pGRN145质粒由美国Geron公司惠赠;pCL-neo真核表达载体、*Not* Ⅰ、*Hinf* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ限制性内切酶、T_4 DNA连接酶、碱性磷酸酶(CIP)、无DNase的RNase购自Promega公司;TRAP-ELISA试剂盒、DOTAP脂质体、G_{418}、质粒提取试剂盒、cDNA片段回收试剂盒购自Boehringer Mannheim公司;1640培养基、低溶点琼脂糖购自GIBCO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 参见文献[3]的方法。

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) ①待细胞长至对数生长期时,于转染前1 d换液,转染前2 h换无血清培养基、

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,主要从事肿瘤端粒酶方面的研究,发表论文23篇、电话:(023)68752898
收稿日期:2000-09-06;修回日期:2001-01-20

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

②脂质体转染复合物的制备：A 液，2.5 μg 质粒 DNA 溶于 20 mmol/L HEPES(pH 7.4)中，终体积 25 μl；B 液，15 μl DOTAP 溶于 20 mmol/L HEPES 中，终体积 35 μl，二者混匀，室温下放置 10～15 min。③移去培养基，加入 2 ml 无血清培养基，加入转染复合物，混匀，培养 3～6 h。④换有血清培养基，加 G_{418}，终浓度 400 μg/ml。⑤每 2～3 d 换培养基，同时加 G_{418} 筛选，直到克隆形成。

1.2.4　重组基因是否整合的鉴定　　采用 PCR 技术扩增外源性的 NeoR 基因，常规抽提 DNA，NeoR 引物序列设计及扩增按文献[4]的方法进行。

1.2.5　生长曲线(MTT 法)　　按文献[5]的方法进行。

1.2.6　转染细胞光镜下结构的观察　　将消毒的盖玻片放入 6 孔板中，将细胞接种至盖玻片上，常规培养 48 h 后，10%福尔马林固定，HE 染色，光镜下观察。

1.2.7　端粒酶活性的检测(TRAP-ELISA 法)　　按说明书进行。

1.2.8　细胞凋亡及细胞周期的检测　　取对数生长期的细胞，0.25%的胰酶消化后，1 500 r/min 离心 5 min，再以生理盐水漂洗 2 次，每次 800 r/min 离心 2 min，以去除碎片杂质，70%乙醇固定，置 4 ℃冰箱过夜，然后弃去固定剂，生理盐水洗 2 次，加入 EB 染液(EB 10 mg，NaCl 564 mg，枸橼酸钠 1.0 g，RNase 10 mg，NP-40 0.3 ml 加 ddH_2O 至 1 000 ml，pH 7.2～7.6)1.0 ml，4 ℃放置 30 min 后上机检测。使用美国生产的流式细胞仪 FACS420 型(BD 公司产品)，激发光源为 2 W 氩离子激光器，激发波长为 48.8 nm，输出功率为 300 mW。EB 发出红色荧光，以 590 nm 的长通滤片用于荧光检测，测量的数据和图形输入 Hp-300 Consort30 计算机，应用相应的软件程序进行资料处理，测定前以鸡红细胞作为标准样品调整仪器，使 *CV* 值控制在 5%以内。用增殖指数(Proliferation index，PI)表示细胞的增殖活性，$PI=(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+G_2M)$。

1.2.9　软琼脂克隆试验　　按文献[6]的方法进行。

1.2.10　裸鼠体内成瘤性的变化　　常规消化细胞，并计数，调整细胞浓度为 4×10^7/ml。裸鼠共 9 只，雌雄兼用，饲养在 SPF(Spectic pathogen free)条件下，约 4～5 周龄，随机分为 3 组，各组裸鼠左侧背部皮下接种 0.1 ml SGC-7901 细胞悬液，右侧接种同样数量的转染细胞，每隔 7 d 观察并测量一次肿瘤形成情况及肿瘤大小，并记录，连续观测 6 周。

1.3　统计学处理

对所得资料进行 t 检验、χ^2 检验。

2　结果

2.1　hTRT 正、反义真核表达载体构建及初步鉴定

参见文献[3]。

2.2　克隆的筛选

经 G_{418} 筛选 2 周后，可见克隆形成，且正义重组基因克隆数较反义要多得多。分别刮取 1 个正义及 2 个反义克隆，命名为 7901-S、7901-AS1 及 7901-AS2。

2.3　外源重组基因是否整合的鉴定

采用 PCR 法扩增外源性 Neo R 基因，结果见图 1，hTRT-S 和 hTRT-AS1、hTRT-AS2 转染细胞可见一条特异性的扩增条带，大小约为 790 bp，而未转染的细胞未见特异性扩增条带。说明正、反重组质粒已转入 SGC-7901 细胞。

2.4　hTRT 正、反义基因对 SGC-7901 细胞生长曲线的影响

见图 2，由生长曲线形态可以看出，反义细胞生长速度较未转染细胞减慢，而且倒置显微镜下反义细胞有明显的接触抑制现象，细胞失去叠加生长的能力，并容易发生脱落，而 7901 及 7901-S 细胞则叠加生长非常显著(结果未显示)。

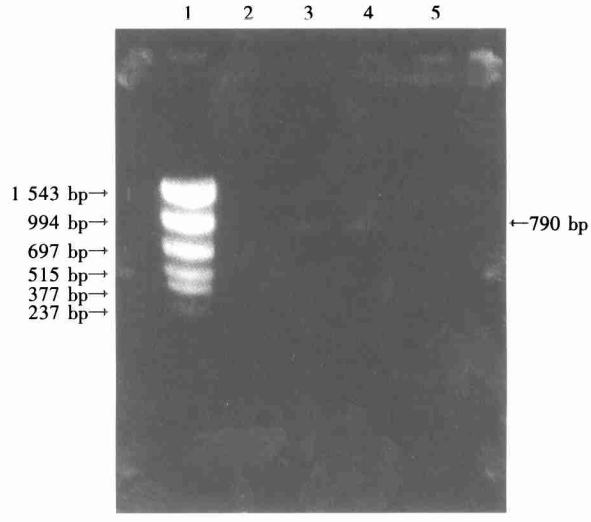


图 1　外源性 NeoR 基因 PCR 扩增结果

Fig 1　Results of PCR amplification of NeoR gene

1：PCR Marker；2：SGC-7901；3：7901-S；4：7901-AS1；5：7901-AS2

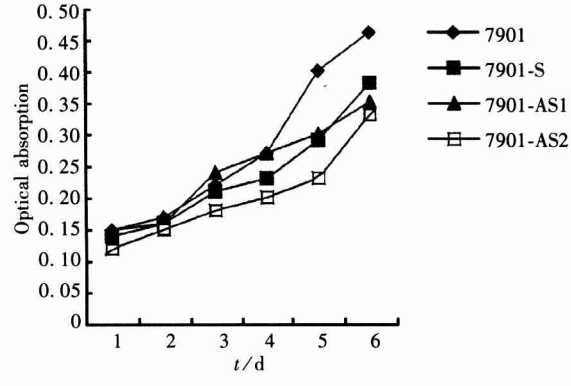


图 2　hTRT 正、反义基因转染对 7901 细胞生长曲线的影响

Fig 2　Effects of transfection of sense and anti-sense gene to hTRT on growth curve of SGC-7901 cell line

2.5　光镜下结构

与未转染的 7901 细胞相比，7901-AS 胞体增大，胞浆增多，核大小相对一致，较规则，核分裂相少见，核浆比减小，异型性减小；而 7901-S 胞体大小不一，胞浆少，核不规则，大小不一，核仁突出，核分裂相多见，出现巨核细胞和多核巨细胞，见图 3。

2.6　hTRT 正、反义基因对 SGC-7901 细胞端粒酶活性的影响

采用 TRAP-ELISA 法检测各组细胞端粒酶活性的变化见表 1，hTRT-AS1、hTRT-AS2 端粒酶活性较未转染的 7901 组分别下降了 60%和 47%，而 7901-S 变化不明显。

2.7　细胞凋亡及细胞周期的变化

如表 2 所示，反义细胞凋亡数增加，G_0/G_1 期细胞增加，S 和 G_2M 期细胞减少，增殖指数减少，而正义细胞细胞凋亡数略有增加，但 G_0/G_1 期细胞减少，而 S 和 G_2M 期细胞增加，增殖指数增加。

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

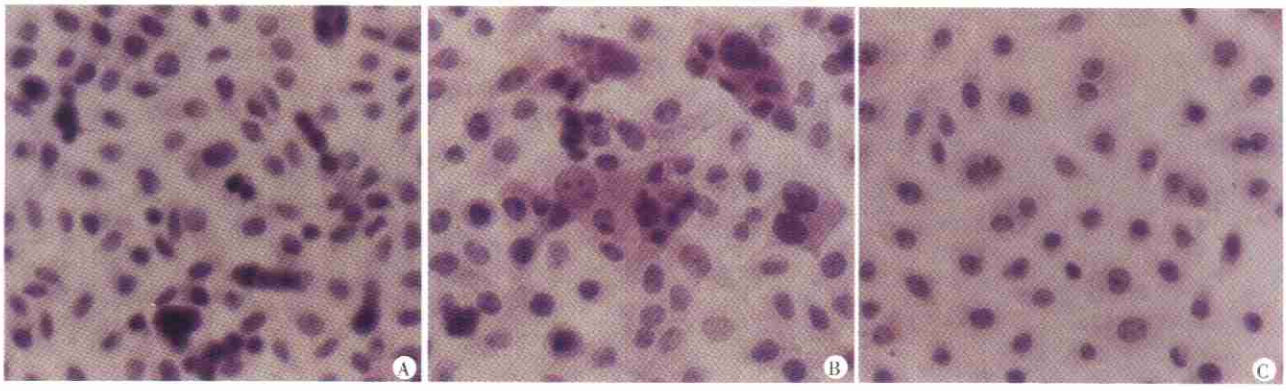


图3 转染细胞形态学变化 (HE×200)

Fig 3 Morphorlogical changes of transfected and untransfected cells (HE×200)

A:SGC-7901; B:7901-S; C:7901-AS

表1 各组端粒酶活性变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Changes of telomerase activity in transfected and untransfected cells($x \pm s$)

	n	Telomerase activity
7901	3	1.36±0.03
hTRT-S	3	1.25±0.10
hTRT-AS1	3	0.54±0.01**
hTRT-AS2	3	0.72±0.13**

**: $P<0.01$ *vs* 7901

表2 hTRT正、反义基因对7901细胞周期及凋亡的影响(%)

Tab 2 Effect of sense and anti-sense gene to hTRT on cell cycle and apoptosis of SGC-7901 cell line(%)

	Apoptosis	G_0/G_1	S	G_2M	PI
7901	5.3	67.3	17.1	15.6	32.7
7901-S	8.4	61.9	21.0	17.1	38.1
7901-AS1	10.3	78.9	10.6	10.5	21.1
7901-AS2	13.0	83.4	9.1	7.5	16.6

2.8 软琼脂克隆试验

软琼脂中接种1 000个细胞,3周可见7901及7901-S细胞成簇生长,且集落大,数目亦多,而7901-AS1和7901-AS2软琼脂中可见散在的细胞,不能形成集落,说明hTRT反义基因转染后,7901细胞不依赖于锚着生长的能力丧失,细胞恶性程度明显降低(SGC-7901 *vs* 7901-S,7901-AS1, 7901-AS2;36.0±9.5 *vs* 34.3±11.3, 0,0)。

2.9 裸鼠体内成瘤性的变化

经过6周的观察,7901及7901-S成瘤率为100%,而7901-AS1和7901-AS2则无致瘤性。

3 讨论

1997年,Meyerson[7]和Nakamura[8]分别在不同的实验室同时克隆出端粒酶蛋白催化活性亚单位基因,该基因单拷贝定位于5p15.33。与端粒酶RNA和端粒酶相关蛋白1不同,hTRT仅在恶性肿瘤组织及部份癌前病变中表达,而正常组织中少有表达[7~11],将hTR和hTRT体外进行重组,人工构建的端粒酶亦具有合成端粒重复序列的功能[12],而将hTRT基因导入无端粒酶活性的正常体细胞中,转染细胞端粒酶被激活,体外倍增次数明显增加[13],提示hTRT在端粒酶亚单位中具有调控端粒酶活性的作用。基于以上认识,我们成功构建了hTRT反义真核表达载体,采用脂质体法导入SGC-7901细胞中,发现反义细胞增殖速度减慢,并出现接触抑制现象,流式细胞仪检测发现G_0/G_1期细胞增加,S和G_2M期细胞减少,增殖指数减少,软琼脂中无克隆形成,大剂量裸鼠皮下接种转染细胞,发现正义和未转染细胞可以成瘤,而反义细胞体内致瘤性消失。提示反义hTRT可以抑制细胞的增殖及部分逆转肿瘤细胞的恶性表型。

有学者将反义hTR转染恶性胶质瘤细胞,提出反义hTR通过诱导凋亡和分化两条途径来抑制细胞的增殖[14]。本研究采用流式细胞仪检测7901-AS1和7901-AS2的细胞凋亡数目虽有增加,但并非很高。光镜下正义细胞核大、巨核细胞多见,反义细胞胞体增大、核浆比例及异型性减小。另外,透射电镜下可见反义转染细胞胞浆内出现粘液样颗粒(结果待发表)。而且杨金亮等[2]的研究亦表明,反义hTR转染后的SGC-7901细胞凋亡率也不高,用反义hTR直接瘤体内注射,几周后瘤体内可见腺腔样结构出现,因此,我们认为针对端粒酶的反义基因治疗,不管是针对hTR,还是针对hTRT,细胞生长受抑制,细胞凋亡途径可能不是主要的,而诱导细胞分化可能是主要的作用机制。

综上所述,针对端粒酶hTRT的反义基因治疗可以抑制胃癌细胞的生长,部分逆转其恶性表型,提示hTRT可以作为肿瘤基因治疗的一个靶位。

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] 杨金亮,房殿春,杨仕明,等.反义hTR基因对胃癌细胞恶性表型的逆转作用[J].第二军医大学学报,2000,22(7):611-613.

[3] 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.

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

[4] 张腾飞,陈诗书.γ-干扰素基因的导入及删除对人肿瘤细胞HLA-Ⅰ、Ⅱ类抗原表达的影响[J].胃肠病学,1999,4(1):6-7.
[5] 司徒镇强、吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,1996.186-187.
[6] 鄂 征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1995.157-158.
[7] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, *et al*. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell, 1997, 90(4): 785-794.
[8] Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B, *et al*. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5 328): 955-959
[9] Ramakrishnan S, Eppenberger U, Mueller H, *et al*. Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene[J]. Cancer Res, 1998, 58(4): 622-625.
[10] Jong H S, Park Y I, Kim S, *et al*. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis[J]. Cancer, 1999, 86(4): 559-565.
[11] Sumida T, Hamakawa H, Sogawa K, *et al*. Telomerase components as a diagnostic tool in human oral lesions[J]. Int J Cancer, 1999, 80(1): 1-4.
[12] Beattie T L, Zhou W, Robinson M O, *et al*. Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*[J]. Curr Biol, 1998, 8(3): 177-180.
[13] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, *et al*. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal cells[J]. Science, 1998, 279(5 349): 349-352.
[14] Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, *et al*. Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation[J]. FASEB J, 1998, 12(7): 801-811.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2001)08-0937-01

个案与短篇

重度角结膜热烧伤1例超急性期手术治疗效果

A case report of therapeutic effect of super-acute severe theramal burn of cornea-conjunctiva by operation

戴 超,刘 翔 (第三军医大学附属新桥医院眼科,重庆 400037)

患者,男,33岁,因双眼被铝水烫伤9 h入住我科,入院时视力右眼手动/眼前,左眼0.6。右眼睑红肿,睫毛全部炭化,睑缘苍白,球结膜及穹隆部结膜苍白、挛缩、上下穹窿极浅近消失。全角膜呈乳白色混浊水肿,全角膜缘苍白。诊断:右眼烧伤Ⅲ度。入院后经保守治疗,烧伤面清洁无感染。入院后第3天,在局麻下行右眼新鲜带结膜和角膜缘的全板层角膜移植术。术中角膜缘及结膜植床均较少有出血。术后包眼2 d,术后第3天,结膜植片开始轻度转红,用贝复舒、泰利必妥、素高睫疗滴眼。术后6 d拆结膜缝线。术后10 d出院,出院时右眼视力数指/50 cm,结膜植片轻度发红,角膜缘部约270°仍无明显充血,角膜植片贴伏好,层间无积液、积血,上皮完整,光泽好,虹膜可见,瞳孔5 mm。出院带药加用1% CsA滴眼抗排斥反应(2~3次/d)。出院后1月复查,患者自觉有异物感5 d,右眼视力手动/眼前,上方角膜缘部约180°范围仍苍白无血管。全角膜植片呈乳白色混浊水肿,全角膜上皮缺损,无明显分泌物,刮片未查见霉菌,以术后排斥反应收入院。经抗排斥反应及支持治疗,上皮愈合仍极缓慢,角膜缘部充血差。住院2周出院时仍有角膜中央2/3上皮缺损。带药院外滴眼继续治疗,每2周复查1次。术后3月,当上皮愈合到中央有3 mm×5 mm上皮缺损区时,上皮缺损区不再缩小,呈持续性中央上皮缺损。术后4月可见数根新生血管长入角膜,上下穹窿较浅。术后5月见角膜植片长入较多新生血管及结膜上皮化。

讨论

重症眼表烧伤除保守治疗外,有人在急性期采用手术治疗,谷树严等[1]曾早期行穿孔性角膜移植取得一定效果,但排斥反应高,植片混浊,增视效果不理想。吴彦超等[2]在伤后7~15 d行板层角膜移植取得一定效果,并指出对重症烧伤者用新鲜带角膜缘板层角膜移植为宜。贺焱等[3]认为角结膜化学伤后早期手术在伤后1~3周为宜。本例为热烧伤,伤情重,且角膜缘烧伤极重,手术时机早,为烧伤后仅3 d,应用了新鲜带结膜、角膜缘的板层角膜移植,防止了角膜的融解穿孔,术后早期恢复了一定的视力。由于在超急性期手术,术后炎症反应重,可能是术后1月发生了排斥反应的原因之一。而术后持续性角膜中央上皮缺损是造成植片血管化和结膜上皮化的主要原因,我们认为持续性中央角膜上皮缺损与以下因素有关:①由于角膜缘及结膜烧伤严重,移植后角膜缘血液循环重建困难、缓慢,使移植后角膜缘干细胞成活和发挥功能困难,这可能是影响角膜缘干细胞成活的主要原因;②术后排斥反应的影响,使角膜干细胞功能趋于耗竭;③烧伤后泪液功能低下,使术后角膜上皮易剥脱。因此,重症眼烧伤的急性期,超急性期手术治疗要严格掌握适应症,只有在角膜融解、有穿孔威胁时,才考虑用新鲜带角膜缘板层角膜移植,如有大量结膜损伤,同时行结膜移植。尽量在急性期以后手术治疗,至少可以解除因角膜缘部缺血所致的干细胞失活。而急性期以前要以保守治疗为主。

关键词:角膜烧伤;板层角膜移植
中图法分类号:R779.1 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 谷树严,张瑞雪,徐锦春.早期角膜移植治疗重症眼灼伤[J].眼外伤职业眼病杂志,1993,15(2):86.
[2] 吴彦超,鲁建疆,鲁韶音.板层角膜移植早期重症眼灼伤[J].中国实用眼科杂志,1998,16(1):32-33.
[3] 贺 焱,孙秉基,胡志民,等.重度角结膜化学烧伤早期和晚期手术的探讨[J].中国实用眼科杂志,1998,16(4):230-232.

(编辑 谢义霞)

作者简介:戴 超(1966-),男,四川省泸县人,硕士,医师,主要从事角膜眼表疾病方面的研究。电话:(023)68755385
收稿日期:2000-05-27;修回日期:2000-10-11

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