DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.003

反义 IGF-1 R基因对肝癌细胞生长的抑制作用*

周 平** 周子成 陈文生 杨建民 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 400038

提 要 目的: 研究反义 IGF-1 R基因对肝癌细胞株 7721细胞生长的抑制作用。方法: 利用基因治疗的反义技术,通过脂质体介导将 IGF-1 R正、反义基因真核表达载体导入人肝癌细胞株 SMMC-7721,经潮霉素筛选阳性克隆后,分别采用流式细胞仪检测细胞周期、凋亡,MTT法检测细胞生长及软琼脂克隆形成试验。结果: IGF-1 R反义细胞与 7721细胞 IGF-1 R正义细胞在前 6 d生长趋势无明显变化,第 7天后反义 IGF-1 R细胞生长减慢。反义 IGF-1 R基因细胞 G_1/G_2期细胞明显增加,为 63.9%,明显高于 7721细胞 (49.8%); S期减少 (19.3%),细胞凋亡增加 (5.89%),不能在软琼脂中生长,而 7721细胞及 IGF-1 R正义细胞在软琼脂中生长良好。结论: 反义 IGF-1 R基因对肝癌细胞株 7721生长具有明显抑制作用。

关键词 IGF-1 R;反义基因;肝癌;凋亡
中图法分类号 R735.7; R977

胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,通过与其受体 IGF-1 R结合,刺激细胞分化、DNA合成,增强肿瘤细胞无限生长能力。封闭 IGF-1 R的表达对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用[1,2],但尚未见有关反义 IGF-1 R基因对肝癌细胞影响的研究报道。本研究将 IGF-1 R正反义基因真核表达载体通过脂质体导入肝癌细胞株 SMMC-7721,以探讨其对肝癌细胞生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 IGF-1 R正反义基因真核表达载体的构建

质粒 DNA的制备应用碱裂解法,用 IGF-1 R基因全长编码区 4.268 kb,亚克隆入经去磷酸化处理的真核表达载体 pCMVhygro的克隆位点 *BamH* I,转化入大肠杆菌 XL-Blue

1.2 试剂

人肝癌细胞株 SMMC-7721(中科院上海细胞所)。潮霉素 (Hygromycin)。脂质体为 Sigma公司产品,细胞培养液 DMEM为 GIBCO公司产品。

1.3 脂质体介导 IGF-1 R cDNA转染

按试剂盒操作说明,稍加改良。溶液 A1 A2于 100μl无血清 DMEM培养液中分别加入 6μg IGF-1 R正反义质粒,溶液 B1 B2于 80μl无血清 DMEM培养液中分别加入 20μl脂质体。将溶液 A1 B1, A2 B2分别轻轻混匀,室温放置 20 min,补足 2 ml无血清 DMEM培养液,加入在 50 ml一次性塑料培养瓶培养的单细胞层上, 37°C, 5% CO_2培养 6 h,移去培养液,加入含 10%血清的 DMEM, 37°C, 5% CO_2继续培养 48 h,加入潮霉素维持细胞生长,直到筛选出阳性克隆,扩增后进行下述试验。

1.4 IGF-1 R基因蛋白表达水平的测定

应用 ABC免疫组化及图象分析。

1.5 细胞生长曲线测定

取对数生长期细胞,于 96孔培养板中每孔加入 3× 10^3个细胞, 37°C, 5% CO_2培养。采用 MTT法:每孔加入 MTT 20μl, 37°C继续孵育 4 h,终止培养。吸弃孔内培养上清液,每孔加入 DMSO 150μl,振荡 10 min,选择 490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,以空白调零,并设复孔。

1.6 流式细胞仪检测

取对数生长期细胞,胰酶消化,离心,用 0.01 mol/L PBS洗 2遍细胞,快速吹入 70%酒精制备单细胞悬液,送检。上机前用 PBS洗细胞 2遍,加入 RNA酶, 37°C 30 min,加入碘化丙啶 (PI)染液, 4°C 30 min,上机检测细胞周期、凋亡。

1.7 软琼脂克隆形成试验

制备 2× DMEM培养液,含 20%小牛血清, 2倍抗生素。1.2%及 0.6%的低熔点琼脂糖,高压消毒。胰酶消化,制备单细胞悬液,调细胞密度为 1× 10^4/ml 各取 1份 2× DMEM及 1.2%低熔点琼脂糖,快速混匀,倒入 12孔培养板制备底层琼脂,置室温凝固后,移入 CO_2孵箱备用。再取 1份 2× DMEM与 1份 0.6%低熔点琼脂,并加入单细胞悬液 50μl,快速混匀,倒入铺有底层琼脂的 12孔培养板中, 4孔重复,置室温,待上层凝固后移入 CO_2孵箱,在 37°C, 5% CO_2饱和湿度环境下培养 10~14 d 于倒置显微镜下计数含 50个细胞以上的克隆。

1.8 统计学分析

使用第四军医大学 SPLM统计软件包, χ^2检验,以 $P<0.05$为相差显著,以 $P<0.01$为相差非常显著。

2 结果

2.1 IGF-1 R正反义基因真核表达重组体的构建

将构建的 IGF-1 R正反义基因真核表达载体转化入大肠杆菌,挑取克隆,接种扩增,抽提质粒后经 *BamH* I酶切鉴定重组体,均含有 4.268 kb目的片段。

IGF-1 R插入片段 5′端 308 bp处有 *Xho* I位点,而载体上

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39800063
** 周 平,男,36岁,主治医师,博士研究生

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

有 *Xba* Ⅰ位点,经 *Xba* Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切,正义重组体应为 9.12 kb、1.698 kb二段,反义重组体应为 5.468 kb、5.35 kb二段,0.8% 琼脂糖凝胶电泳显示位置正确 (Markerλ/*Hind* Ⅲ),表明成功构建了 IGF-Ⅰ R pCMVhygro真核表达的正反义重组体。

2.2 转染细胞免疫组化及图象分析显示

7721细胞、正义细胞 IGF-Ⅰ R蛋白呈高表达,光密度值分别为 252.5± 71.6(n= 166)、240.5± 83.6(n= 170),二者无显著性差异(P> 0.05),反义细胞 IGF-Ⅰ R蛋白表达降低,光密度值为 127.7± 46(n= 160),与 7721细胞、正义细胞有非常显著性差异(P < 0.01)。

2.3 生长曲线测定

在前 6 d IGF-Ⅰ R反义细胞与 7721细胞、IGF-Ⅰ R正义细胞生长趋势无明显变化,第 7天后,反义 IGF-Ⅰ R细胞较 7721细胞、IGF-Ⅰ R正义细胞生长减慢(P < 0.05),见图 1。

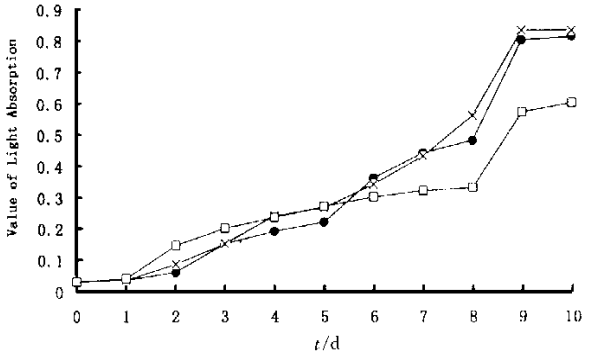


图 **1** 细胞生长曲线

-●-: 7721细胞;　-×-: IGF-Ⅰ R正义细胞;

-□-: IGF-Ⅰ R反义细胞

Fig 1　The curve of cell growth

-●-: 7721 cell;　-×-: IGF-Ⅰ R sense cell;

-□-: IGF-Ⅰ R antisense cell

2.4 细胞周期及细胞凋亡

流式细胞仪检测各组细胞周期及细胞凋亡,见表 1,IGF-Ⅰ R反义组 G_1期细胞明显增加,S期细胞减少,凋亡发生率也增高,均明显高于 7721细胞(P < 0.05),IGF-Ⅰ R正义细胞 S期增加,凋亡发生率减少。

表 **1** 细胞周期及凋亡

Tab 1　Cell cycle and apoptosis

Phase/Apoptosis	7721(%)	Ⅰ R-S(%)	Ⅰ R-AS(%)
G_0/G_1	49.8	54.4△	63.9*
S	24.6	35.0△	19.3*
G_2/M	25.6	10.6△	16.8*
Apoptosis	1.71	0.23△	5.89*

Ⅰ R-S: IGF-Ⅰ R Sense cell; Ⅰ R-AS: IGF-Ⅰ R antisense cell; * : P < 0.01 Ⅰ R-AS *vs* 7721 cell; △: P < 0.01 Ⅰ R-S *vs* 7721 cell

2.5 软琼脂克隆形成数

在双层软琼脂培养中,7721细胞、IGF-Ⅰ R正义细胞生长良好,均能形成明显簇状细胞集落,而且细胞集落大,数量多,平均克隆形成分别为 97.8± 22.2,112.7± 30.2,两者无显著差异(P> 0.05)。而 IGF-Ⅰ R反义细胞,初可见几个克隆,大多少于 50个细胞,不能形成明显集落,10 d后,细胞散落、死亡,说明 IGF-Ⅰ R反义基因转染后,细胞不依赖于锚着生长的能力丧失。

3 讨论

业已研究表明 IGF-Ⅰ 在细胞增殖、转化及肿瘤发生、发展中具有十分重要的作用,通过对人 Wilms瘤、乳腺癌、肺鳞状细胞癌、肺小细胞癌等癌与癌旁组织比较,前者 IGF-Ⅰ R均呈高表达。应用 IGF-Ⅰ R cDNA探针进行 Northern印迹杂交分析,发现肝癌组织 IGF-Ⅰ R过量表达,明显高于相应的癌旁组织和正常肝组织。

国外学者报道,在大鼠成纤维细胞,IGF-Ⅰ R过度表达可出现配体依赖的细胞转化,在软琼脂中能够增殖形成克隆,注射入裸鼠体内则可形成肿瘤[4],而 IGF-Ⅰ R缺陷的成纤维细胞则不能在软琼脂中生长。在鼠胚成纤维细胞,IGF-Ⅰ R发生无功能的变异,则细胞周期的各阶段均减慢。大鼠胶质细胞瘤 C6细胞在注入裸鼠时可快速形成肿瘤,当预先用反义 IGF-Ⅰ R寡聚脱氧核糖核苷酸处理细胞后,则其形成肿瘤的能力明显降低[1]。本研究结果表明,IGF-Ⅰ R反义基因转染细胞在早期与 7721细胞、IGF-Ⅰ R正义细胞生长无明显差异,在 7 d后其生长速度略有减慢,显示其生长速度、复层增殖能力下降,恶性表型有一定程度的逆转。同时,流式细胞仪检测反义 IGF-Ⅰ R基因细胞 G_1期增高,为 63.9%,明显高于 7721细胞(G_1期为 49.8%)。这与陈文生[5]研究结果基本相符,其通过将反义 IGF-Ⅱ R基因导入 7721细胞后,封闭 IGF-Ⅱ R的表达,但出现 IGF-Ⅰ R的上调,细胞周期显示 G_1期为 52.3%,而 S期细胞明显增加,为 40.7% (本组反义 IGF-Ⅰ R基因细胞 S期为 19.3%)。IGF-Ⅰ R正义细胞 S期细胞增加,凋亡发生率减少。说明 IGF-Ⅰ R能够促进细胞增殖、分裂,跨过 G_1期,而进入 S期,并抑制细胞凋亡的发生,当封闭 IGF-Ⅰ R后则阻抑细胞分裂,使其停滞于 G_1期而不能进入 S期,并促进细胞凋亡,与国外许多报道相符。7721细胞能够在软琼脂中生长,以每孔 500个细胞接种于 12孔培养板,4孔中均有细胞生长克隆形成,呈簇状,集落较大,平均克隆形成数 7721细胞为 97.8,IGF-Ⅰ R正义细胞为 112.7,而

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

IGF-Ⅰ R反义细胞不能在软琼脂中生长,说明IGF-Ⅰ R反义基因阻抑了 IGF-Ⅰ R的表达,使其介导 7721细胞增殖能力下降,其不依赖于锚着生长的恶性表型丧失。本研究表明,IGF-Ⅰ R在肿瘤增殖、恶性表型的维持具有十分重要的作用,反义 IGF-Ⅰ R基因能够阻抑肿瘤细胞的增殖、促进凋亡,逆转恶性表型。以生长因子受体为靶向目标,为肝癌生物治疗的应用奠定了一定的基础。

参考文献

1 Resnicoff M, Burgaud J L, Rotman H L. Correlation between apoptosis, tumorigenesis and levels of insulin-like growth factor I receptor. Cancer Res, 1995, 559(17): 3739

2 徐勤生,王玉芝,袁 玖,等.I 型胰岛素样生长因子受体的反义寡核苷酸对胰腺癌细胞生长的抑制作用.中国肿瘤生长治疗杂志, 1997, 4(3): 213

3 周筱梅,钱连芳,严根宝,等.胎肝及肝癌组织中 IGF-Ⅰ R的表达研究.自然科学进展:国家重点实验通讯, 1995, 5(3): 378

4 Claire E H S, Petter R. Growth, differentiation, and survival: Multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiological Rev, 1996, 76(4): 1005

5 陈文生,刘为纹,周筱梅,等. IGF-Ⅱ 受体(IGF-Ⅱ R)反义基因对肝癌细胞癌基因转录及生物学行为的影响.重庆医学, 1997, 26(2): 79

(收稿: 1999-01-19;修回: 1999-08-31)

(编辑 汪勤俭)

The inhibitory effects of IGF-Ⅰ R antisense gene on the growth of human hepatoma cell line*

Zhou Ping, Zhou Zicheng, Chen Wensheng, Yong Jianmin (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To observe the effects of IGF-Ⅰ R antisense gene on the growth of the human hepatoma cell line 7721. **Methods**: The human hepatoma cells were stably transfected with a plasmid vector expressing IGF-Ⅰ R cDNA in antisense orientation using liposomes and then the growth cycle of the cells was observed. The apoptosis of the cells was studied with flow cytometry, the cell growth with MTT method and cloning on soft agar. **Results**: IGF-Ⅰ R antisense gene inhibited the growth of the cells 7 d after transfection. The proportion of G_1/G_2 phase cells was increased (63.9% *vs* 49.8% before transfection) and that of S phase cells significantly decreased (19.3%). The rate of cell apoptosis was elevated (5.89%). The cells were unable to grow on soft agar after transfection with IGF-Ⅰ R antisense gene but grew normally before transfection or after transfection with IGF-Ⅰ R sense gene. **Conclusion**: IGF-Ⅰ R antisense gene exerts significant inhibition on the growth of human hepatoma cell line 7721.

Key words IGF-Ⅰ R; antisense gene; liver neoplasms; apoptosis

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39800063

(上接 623页)

2 讨论

急性肾功能衰竭根据其病因可分为肾前性、肾性、肾后性[1]。此患儿有腹泻脱水及肌注小诺霉素史,故其急性肾衰原因考虑为:一方面,由于脱水后血容量不足导致肾血流量减少对肾功能的影响;另一方面,在肾缺血的基础上加用小诺霉素,而小诺霉素本身就对肾脏有毒性,可致急性间质性肾炎[2],双重作用的后果就导致了急性肾衰。此病例可考虑为急性肾前性、肾性肾衰,在治疗中结肠透析的效果不尽人意,这也与药物性间质性肾炎本身治疗困难有关。从中值得借鉴的是在婴儿腹泻脱水时应避免使用肾毒性药物,治疗上需要我们吸取教训的是在肾衰的治疗中应及早采用腹膜透析。

关键词 腹泻;小诺霉素;肾衰

中图法分类号 R723.11; R723.12; R726.92

参考文献

1 张 澍 主编.现代儿科学.北京:人民军医出版社, 1998. 780~785

2 佟琳如,万瑞香 主编.儿科药物的临床应用.北京:人民卫生出版社, 1996. 367

(收稿: 1999-04-08;修回: 1999-07-28)

(编辑 王 红)

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