DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.028

论文摘要

转化生长因子 β_1 基因转染对人肺巨细胞癌细胞体内外增殖调控机理的研究

A Study on regulatory effects of human lung giant cell carcinoma cells by transfection of sense and antisense TGFβ_1 gene

杨和平 毛宝龄 沈寒放* 陆应麟** (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所)重庆,630037

目前认为,转化生长因子 β_1(TGFβ_1)是机体主要的负调控生长因子,能抑制大多数正常上皮细胞、多种上皮性肿瘤细胞的生长。本研究采用磷酸钙沉淀基因转染方法,以人肺巨细胞癌细胞系 PLA-801 D 为靶细胞,转染正义 TGFβ_1 基因以增加细胞自泌性 TGFβ_1 的产生,或转染反义 TGFβ_1 基因以阻断自泌性 TGFβ_1 产生,观察对转染细胞体内、外增殖的影响及在分子水平的调控机理,探索应用 TGFβ_1 基因防治肺癌的可能前景。主要结果如下:

(1)Northern 杂交发现,转染 TGFβ_1 基因的细胞 TGFβ_1 mRNA 表达增加了 2.5 倍;而转染反义 TGFβ_1 基因的细胞 TGFβ_1mRNA 表达水平则下降了 3.5 倍。MTT 法测定各组细胞培养上清中 TGFβ_1 生物活性(对 CCL-64 细胞的生长抑制%)表明,TGFβ_1 基因转染细胞 TGFβ_1 生物活性(65%)明显高于对照细胞(46% $P<0.001$),而转染反义 TGFβ_1 基因细胞 TGFβ_1 生物活性(33%)降低($P<0.05$)。计数法测定细胞体外增殖速度发现,TGFβ_1 基因转染细胞增殖速度减慢,生长抑制率为 37%~52%($P<0.001$);而反义 TGFβ_1 基因转染组细胞的增殖速度增加,生长增加率为 18%~33%($P<0.05$)。倒置显微镜观察,对照细胞呈梭形或多边形,呈堆叠性生长;TGFβ_1 基因转染细胞多为扁平形,少部分呈圆形,堆叠性生长不明显;反义 TGFβ_1 基因转染细胞形态与对照细胞大致相同,但堆叠性生长更为明显。在双层软琼脂培养中,对照细胞、反义 TGFβ_1 基因转染细胞生长旺盛,一般在 5~7 d 即形成簇状细胞集落;但后者的细胞集落较大,且数目较多(分别为 144±13、231±18,$P<0.05$)。TGFβ_1 基因转染细胞生长速度较缓慢,集落小且形成数(54±6)减少($P<0.001$)。

(2)流式细胞仪(FCM)测定细胞增殖周期和 DNA 含量,TGFβ_1 基因转染细胞处于 G_0/G_1 期比例增加(由 26.5% 增至 54.7%)、S/G_2+M 期的比例下降(由 73.5% 减至 45.3%);而反义 TGFβ_1 基因转染细胞处于 G_0/G_1 期的比例减少(由 26.5% 减至 15.1%),S/G_2+M 期的比例上升(由 73.5% 增至 84.9%);两组细胞周期 DNA 荧光分布亦有相同变化。细胞基因组 DNA 电泳显示,TGFβ_1 基因转染(G_{418} 筛选)的漂浮细胞 DNA,每隔 180~200 bp 出现电泳带,呈现典型的"DNA 阶梯"现象。透射电镜观察发现,反义 TGFβ_1 基因转染细胞核/浆比例增大,细胞核异染色质增多。TGFβ_1 基因转染细胞则可见到细胞核内异染色质凝集、紧贴核膜内壁的"半月征"现象及细胞崩解形成有完整胞膜的"凋亡小体"。RNA 狭缝杂交或 Northern 杂交表明,TGFβ_1 基因转染细胞 P^{53}、nm23mRNA 表达水平增多,分别是对照细胞的 2.0 和 8.9 倍,而 c-myc mRNA表达水平降低,为对照组细胞的 1/3.3。反义 TGFβ_1 基因转染细胞 P^{53} mRNA 表达水平下降 50%,c-myc mRNA 表达水平增加 50%,而 nm23 mRNA 表达不明显。

(3)裸鼠体内实验表明,与对照组比较,TGFβ_1 基因转染细胞组平均成瘤时间(25±11 d)延长,肿瘤平均体积(931±845mm^3)较小($P<0.05$),成瘤率(4/7)降低趋势,未发现肺及淋巴结转移。反义 TGFβ_1 基因转染细胞组成瘤时间(10±4 d)比对照组(13±8 d)提前,成瘤率与对照组相同(7/7),但肿瘤体积(5457±1757 mm^3)较对照组(3194±2533 mm^3)增大($P<0.05$)。对照细胞组和反义 TGFβ_1 转染细胞组,均有 2 只裸鼠发生肺或淋巴结转移。

以上研究结果提示,TGFβ_1 基因转染不但可使 PLA-801 D 细胞增殖在 G_0/G_1 期发生阻滞、体外增殖速度减慢,恶性程度降低,并能诱发细胞凋亡,其发生机理与 TGFβ_1 基因转染细胞 TGFβ_1、P^{53}的表达增加、c-myc 的表达减少有一定关系。此外,我们还发现,TGFβ_1 基因转染细胞 nm23 mRNA 表达明显增加,目前国内外未见报道。初步认为 TGFβ_1 基因转染人肺癌细胞 nm23 基因的转录增加可能与转染细胞体外生长抑制有联系,并可能对转染细胞在裸鼠体内的成瘤和转移特性产生影响。

关键词 转化生长因子 β_1;人肺巨细胞癌细胞;基因转染;细胞凋亡

中图法分类号 R734.2

(收稿:1995-08-07;修回:1995-10-04)

* 附属西南医院呼吸内科 重庆,630038

** 军事医学科学院基础医学研究所 北京,100850

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