DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.05.036

维甲酸诱导的人肺腺癌细胞促分化基因的克隆*

黎伯铨 毛宝龄 张雪艳** 王秀琴** 吴 旻** (第三军医大学新桥医院呼吸中心) 630037

肿瘤分子生物学研究揭示,正常细胞发生恶性转化时,有显性癌基因激活和抑癌基因失活,由于这些遗传改变破坏了细胞增殖与分化平衡的调控机制,导致癌症的发生和演进。大量基础和临床研究资料还表明,肿瘤细胞并没有完全丢失控制正常生长的基因,通过应用各种分化诱导剂,可望诱导肿瘤细胞分化,抑制或或逆转肿瘤细胞恶性表型。

本研究在用全反式维甲酸(RA)诱导人肺腺癌细胞GLC-82分化的基础上,采用cDNA扣除杂交策略,从肺腺癌细胞中克隆具有抑制肺腺癌细胞增殖、诱导肺腺癌细胞向终末分化的基因,主要结果如下:

(1)RA对人肺腺癌细胞的分化诱导作用:用10^{-5}mol/L RA连续处理细胞,观察到GLC-82细胞生长速度减慢,抑制率为33%～55%;在双层软琼脂中形成集落的能力降低,抑制率为97.5%;^{3}H-TdR掺入率减少30%～60%;流式细胞仪检测发现细胞DNA合成受到抑制,细胞增殖被阻滞于G_1期;相差显微镜下观察到细胞堆叠性生长情况消失,胞浆内出现较多空泡,并逐渐衰老和凋亡,表明GLC-82细胞在RA作用下发生了分化,获得了相对正常的表型。

(2)定向cDNA文库的构建:用异硫氰酸胍/盐酸胍分级沉淀法提取细胞mRNA,采用引物-衔接头法合成cDNA,定向克隆进噬菌粒载体pSPORT1,分别构建了未经RA诱导的Lib·GLC-82和经RA诱导1 d和4 d的Lib·GLC-82·RA1及Lib·GLC-82·RA4共3个cDNA文库,重组子分别为56 000、54 300和58 000,插入片段介于0.5～6.5kb。

(3)RA特异性目的cDNA的克隆:用M13KO7辅助噬菌体转染RA诱导文库的转化子,提取单链DNA。经羟基磷灰石柱层析和限制性内切酶消化除去残存的双链DNA后,用10μg纯化的单链重组DNA与转印于APT滤纸上的80μg未诱导文库的cDNA进行6轮杂交,去除RA诱导的单链DNA中与未诱导文库重组子相同的序列。以线性载体DNA为引物,应用Taq DNA聚合酶反应体系将富集的RA特异性单链重组DNA转换成双链,转化大肠杆菌感受态细胞,经菌落原位杂交差示筛选,获得124个RA特异性目的cDNA克隆。

(4)目的cDNA克隆鉴定分析:对所获目的cDNA克隆作DNA斑点杂交进行同源性分析,发现这些cDNA克隆可能分属于几个不同类型的基因。RNA Norhtern杂交、限制性内切酶分析和部分序列测定结果表明,这些基因可能是具有新意的促分化基因。

应用各种方法从人类恶性肿瘤和正常细胞中分离各种癌基因、抑癌基因和促分化基因,是洞悉癌症发生和演进的内在规律、探讨肿瘤细胞恶性表型抑制或逆转的有效途径,并可能为分化治疗、基因治疗提供理论依据,为人类最终攻克癌症提供有力武器。本文对体外诱导癌细胞分化、从诱导分化的肿瘤细胞中克隆促分化基因作了一些有益的尝试。

关键词 cDNA扣除杂交;基因克隆;促分化基因;肺腺癌

* 国家"863"计划和世界实验室资助课题

** 中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室

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