

Fas 基因转导大肠癌细胞株的表达

李恕军¹, 肖冰², 姜泊², 韩英¹ 渊北京军区总医院消化内科 北京 100700 白第一军医大学南方医院消化内科 广州 510515 冤

摘要 目的 建立表达外源性 Fas 基因的大肠癌细胞株 观察 Fas 基因在转导前后的表达 方法 采用分子克隆技术将 Fas 基因插入真核表达载体 pBK-CMV 的多克隆位点之间 以脂质体介导法将 Fas 基因导入受体细胞 LoVo 尧 G418 筛选克隆细胞 以 dotblotting 尧 Westernblotting 检测转导细胞 Fas 基因的表达 结果 成功建立了 Fas 基因表达株 转导株在 RNA 及其蛋白水平表达均明显高于非转导株 转导细胞增殖速度 倍增时间 对数生长期等均比非转导株更为缓慢 袁但无显著性差异 袁在 Fas 抗体作用下 转导株细胞生长明显受到抑制 袁有非常显著性差异 遥结论 Fas 基因在大肠癌细胞中处于低表达状态 通过真核表达载体介导 袁as 基因在 RNA 及其蛋白水平能有效表达 遥 Fas 表达株在 Fas 抗体作用下可明显抑制体外培养的大肠癌细胞的生长增殖 遥

关键词 Fas 基因 尧 基因转导 尧 大肠癌 尧 细胞凋亡

中图分类号 735.34 文献标识码 文章编号 000-2588 渊2002 冤 8-0700-04

Expression of Fas genes transduced into colorectal cancer cells

LI Shu-jun¹, XIAO Bing², JIANG Bo², HAN Ying¹

¹Department of Digestive Diseases, General Hospital of Beijing Command, Beijing 100700, China; ²Department of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To construct colorectal cancer cells expressing exogenous Fas gene and observe the expression level of its mRNA and protein before and after transduction. Methods Fas cDNA was inserted into the multiple cloning site of the expression vector pBK-CMV with molecular cloning technique, and the resultant recombinant plasmid was transduced into colorectal cancer LoVo cells via lipofectamine. G418 was utilized to screen the positive clones containing the recombinant plasmid, where Fas mRNA and protein expression was determined with Western blotting and dot blotting. Results pBK-CMV Fas cDNA plasmid was successfully constructed. The transduced colorectal cancer cells were screened by G418 and are resistant cell line (LoVo Fas cells) was obtained. Fas expression was detected in both transduced and non-transduced cell lines, but the expression level of both Fas mRNA and protein was much higher in the former, which showed lower proliferation rate and lengthened doubling time and logarithm growth period than the non-transduced cells, but the difference was not significant. Treatment of the transduced cells with Fas antibody produced significant difference ($P < 0.05$), manifested by apparently inhibited cell growth. Conclusions LoVo cells normally has only very low expression level of Fas gene, while transduction with pBK-Fas cDNA can enhance the efficiency of Fas mRNA and protein expressions. Fas antibody significantly inhibits the growth and proliferation of in vitro cultured Fas-expressing LoVo cells.

Key words: Fas gene; gene transduction; colorectal cancer; apoptosis

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育 尧 维护内环境稳定 尧 由基因控制的细胞主动死亡过程 遥这一过程与肿瘤的发生发展密切相关 遥因此 袁提出诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的一个新突破 遥 Fas 诱导细胞凋亡 袁由于其相对的简洁性而成为凋亡机制研究中的热点 袁但 Fas 蛋白分子仍未用于临床 袁并且对大肠癌细胞的相关研究报道甚少 遥我们将 Fas cDNA 导入 Fas 低表达的大肠癌细胞使其逆转为高表达 袁建立表达外源性 Fas 基因的大肠癌细胞株 观察 Fas 转导株细胞体外抑瘤效应 袁为今后大肠癌的基因治疗寻找一条可行途径 遥

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 尧 细胞 尧 大肠癌细胞株 LoVo 尧 H5a 菌株 尧 pBK-CMV 载体及原始质粒 pBluescript Fas cDNA 均为南方医院全军消化病研究所保存 遥

1.1.2 试剂 EcoR 尧 Sal 尧 Xho 尧 玉内切酶 尧 Nase A 尧 4 DNA 连接酶 尧 购于广州基因公司 遥 Lipofectamine 购于 GIBCO-BRL 公司 遥 质粒提取试剂盒 尧 琼脂糖 尧 蛋白酶 K 尧 G418 尧 MTT 及硝酸纤维素膜为 Sigma 产品 遥 Fas 抗体购于武汉博士德公司 遥

1.2 方 法

1.2.1 重组载体构建与鉴定 在原始质粒 pBluescript 质粒 Xho 尧 玉位点之间有 2500bp 的 Fas cDNA 袁其 5' 端上游有一个 Sal 尧 玉位点 袁在 Fas cDNA 终止密码子下游约 600bp 处有一个 EcoR 尧 玉位点 袁al 尧 玉与 EcoR 尧 玉位点

收稿日期 001-10-05

作者简介 李恕军 渊964- 冤 男 袁 内蒙古赤峰人 袁 001 年毕业于第一军医大学 尧 袁 主治医师 尧 电话 010-66721629 转 8023

之间约为 1 830bp袁根据重组真核表达载体构建方法^[9]在证实原始质粒含有完整 FascDNA 基础上袁利用相应的限制性内切酶消化 pBluescript-FascDNA袁融合法回收 1830bp 的 FascDNA袁在 T4DNA 连接酶作用下与经 Sal I 和 EcoR I 双酶切的 pBK-Neo-CMV 载体 DNA 连接 渊6 益袁0 h袁转化 DH5a 感受态细胞袁常规培养袁随机挑选 Amp 抗性菌落及少量制备重组质粒袁用 Sal I 和 EcoR I 双酶切及琼脂糖凝胶电泳袁鉴定其连接效果与正确性遥

1.2.2 基因转导与克隆筛选 按 lipofectamine 介导法^[10]袁取 0.5g/L 纯化 pBK-FascDNA1 渊袁用灭菌去离子水稀释成 10 渊袁与 5 渊 lipofectamine 混合袁静置 10min袁转染六孔板中处于对数生长期的 LoVo 细胞 渊伊0⁵ cells/ 孔袁24 h 后袁418(500mg/L)筛选转染细胞遥同时袁设 pBK 空载体和非转导细胞作为对照遥克隆细胞形成后袁随机挑选克隆袁大量扩增抗性细胞遥

1.2.3 Western blotting 检测 以三去污剂裂解细胞方法^[11]制备细胞膜蛋白袁取 1/2 进行 SDS-PAGE 分离蛋白条带袁考马斯亮蓝显色及脱色袁仔细分辨条带差异遥另一半膜蛋白加样电泳后袁00 V 电转移过夜袁SDS 变性 NC 膜袁常规 ABC 法结合抗体与显色遥

1.2.4 RNA 斑点杂交方法鉴定 Fas 在转导株的表达

1.2.4.1 细胞总 RNA 的提取^[12] 分别收集 2伊0⁵ Fas 转导细胞袁转导空载体和非转导细胞遥用 PBS 洗涤袁分别加入异硫氰酸胍裂解液 500 渊袁 1 mol/L NaAc 100 渊袁饱和酚及氯仿各 500 渊袁置冰浴 20min袁益离心 渊2000r/min袁5min遥取水相袁等体积氯仿再抽提一次遥用异丙醇沉淀袁益离心 渊2000r/min袁5min遥用 70%乙醇洗涤一次袁沉淀溶于 50 渊 DEPC 水处理过的三蒸水中袁20 益储存袁同时取少量做含量测定遥

1.2.4.2 FasmRNA 的斑点杂交 取已定量的 RNA 样品袁经甲醛变性点样于硝酸纤维膜袁80 益烤箱 2 h 遥加预杂交液封口后袁置 68 益水浴 2 h 遥取出杂交袋袁杂交袋中加入探针袁重新封口袁在 68 益中温浴 16~24 h 遥取出杂交膜袁放入 2伊 SSC 和 0.1% SDS 液中袁室温漂洗 20min袁再用 2伊 SSC 和 0.1% SDS 液在 68 益漂洗 3 次袁每次 10min 遥取出 NC 膜袁用滤纸吸干水分袁保鲜膜覆盖袁暗室中压上 X 光胶片袁置 20 益曝光 渊

射自显影 8~72h 遥冲洗胶片袁晾干袁观察结果遥
1.2.5 细胞生长曲线描记 在 24 孔细胞培养板中袁分别种入 2伊0⁴ 细胞袁细胞分组包括非转导细胞组袁 Fas 转导细胞渊转导株组渊非转导细胞 + Fas 抗体组渊 Fas 转导细胞 + Fas 抗体 渊抗体结合组渊 Fas 抗体浓度 1 颐 100 渊次日始每天 3 孔细胞计数袁连续 10 d 袁然后根据细胞生长规律计算细胞倍增时间和描记生长曲线遥
1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 版统计软件对相关数据进行字处理遥

2 结果

2.1 原始质粒结构鉴定与重组真核表达载体的构建

2.1.1 原始质粒结构鉴定 原始质粒经 Xho I 内切酶消化袁琼脂糖凝胶电泳证实分离出 2900bp 的载体和 2500bp 的 FascDNA 全长片段袁如图 1 所示遥

2.1.2 重组载体构建与鉴定 FascDNA (1830bp) 产物与载体连接后袁转化受体菌 DH-5a 的阳性重组子袁提取重组质粒袁经 EcoR I 和 Sal I 双酶切袁琼脂糖凝胶电泳可见 4500bp 的载体片段与 1830bp 的 FascDNA 片段袁如图 1 第 3 条泳道所示遥

2.2 Fas 转导株的建立

2.2.1 免疫组织化学检测 LoVo 细胞株 Fas 的表达 证实 LoVo 细胞株 Fas 基因蛋白产物低表达遥免疫组织化学检测结果见图 2 遥

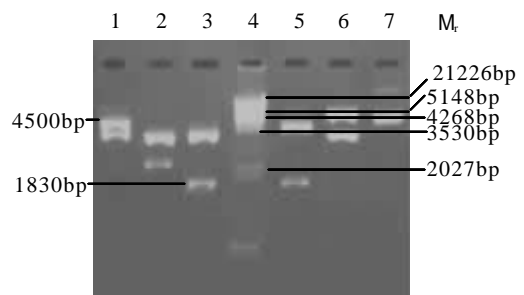


图 1 pBK-FascDNA 酶切电泳鉴定

Fig.1 Identification of pBK-Fas cDNA by electrophoresis Lane 1:pBluescriptFascDNA;Lane2:pBluescriptFascDNA/XhoI Lane3:pBluescriptFascDNA/SalI+EcoRI Lane4: pBluescriptFascDNA/HindIII; Lane5:pBK Fas cDNA/SalI+EcoRI Lane 6:pBK Fas cDNA Lane 7:pBK-CMVcDNA Lane 8:blank vector

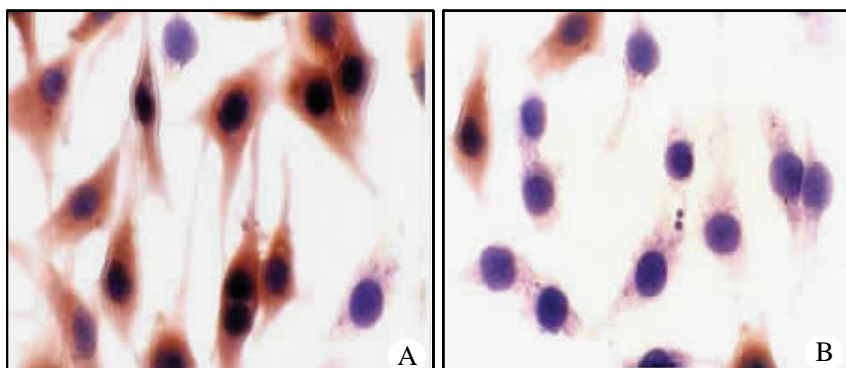


图 2 免疫组织化学检测 LoVo 细胞株 Fas 的表达
Fig.2 Fas expression in LoVo cells identified by immunohistochemistry
A: Before Fas transfection; B: After Fas transfection

2.2.2 基因转导 LoVo 细胞株 基因转导后袁伊⁰ 5 转染细胞经 G418 筛选 4~5 周袁空载体和 Fas 表达载体转染细胞培养孔内逐渐出现抗性克隆遥继续抗性筛选同时袁进行扩增培养 30~40d袁结果筛出一个稳定的抗性细胞株袁即 LoVoFascells袁图 3 冤遥



图 3 Fas 转导细胞抗性克隆
Fig.3 Positive clones selected by G418

2.3 Fas 在转导株的表达

SDS-PAGE 显色和 Westernblotting 结果见图 4 和图 5袁在 M_r 3.6~4.0伊⁰ 4 处转导株比非转导株明显出现一条电泳带袁并随蛋白加样量增加而显色更加明显袁与 Fas 抗体结合的蛋白也出现印迹着色袁其大小均与 Fas 蛋白相对分子质量相符遥

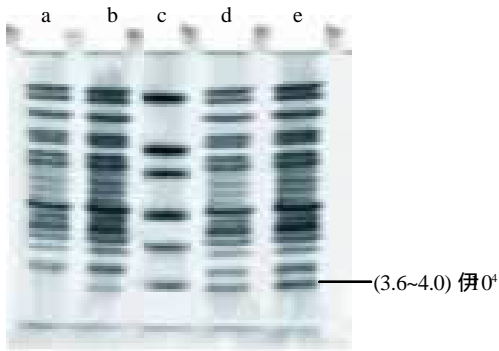


图 4 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色
Fig.4 Fas protein stained by SDS-PAGE
a:LoVocells(3伊⁰);b:LoVocells(5伊⁰);c:protein marker;d:LoVo-Fascells(1伊⁰);e:LoVo-Fascells(3伊⁰)

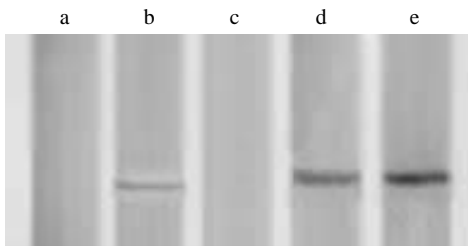


图 5 Westernblotting
Fig.5 Fas protein identified by Western blotting
Lanea:LoVocells(3伊⁰);Laneb:LoVocells(5伊⁰);Lanec: Proteinmarker;Laned:LoVo-Fascells(1伊⁰);Lanee: LoVo-Fascells(3伊⁰)

2.4 RNADotblotting 杂交分析

结果见图 6袁LoVo Fascells FasmRNA 表达信号明显高于 LoVocells 及转染空载体渊BK院含 CMV 启动子袁 Fas cDNA 对照组遥

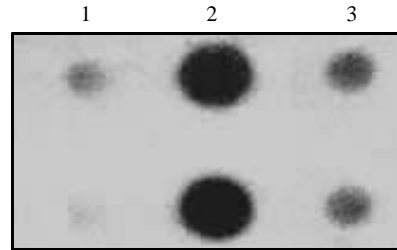


图 6 RNADotblotting 杂交分析
Fig.6 Result of Fas mRNA by dot blotting
1:LoVocells;2:LoVoFascells;3:Transducedemptyvectorcontrol cells

2.5 Fas/Fas 抗体抑瘤效应

直接记数法检测 Fas 基因转染前后及抗体结合组细胞生长曲线如图 7 所示袁LoVo 细胞群体倍增时间 2.0d袁对数生长期在 2~6d袁LoVo Fascells 细胞群体倍增时间为 4.0d袁对数生长期在 4~7d之间袁最大细胞数为 1.0伊⁰袁低于非转导株细胞袁二者比较无显著性差异袁转导 + 抗体组细胞群体倍增时间为 4.0d袁对数生长期 4~7d之间袁最大细胞数 1.5伊⁰袁明显低于非转导株细胞和单纯转染细胞袁二者比较差异有显著性意义渊<0.05冤遥

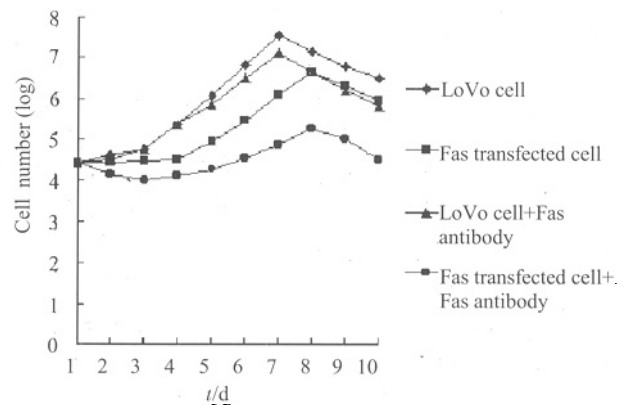


图 7 Fas 细胞生长曲线
Fig.7 Growth curves of LoVo Fas cells

3 讨论

大肠癌是一种发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤袁近年大肠癌发病率还有不断增高的趋势袁虽然在诊治方面已经取得很大进展袁但 5 年生存率仍在 40% 左右遥因此袁如何防治袁仍然是当前工作的重点遥

近年来研究表明袁Fas 基因在肿瘤细胞的表达状态与细胞凋亡关系密切袁遥人类恶性肿瘤细胞系对

Fas 抗体或配体触发凋亡信号的敏感性主要依赖于细胞表面的 Fas 蛋白的表达水平。Fas 基因低表达是肿瘤细胞产生凋亡抗性的重要机制之一。因此上调 Fas 在肿瘤细胞的表达,增强肿瘤细胞对凋亡的敏感性,是有效启动肿瘤细胞凋亡的重要手段。大肠癌的细胞凋亡可能是通过癌细胞表面特殊受体 Fas 等作用而诱导的。根据 Fas 信号可以诱导某些肿瘤细胞凋亡的特点,利用特异性抗体或配体拮抗剂,可以产生有效抗肿瘤治疗作用。^[1-2] 大肠癌细胞 Fas 基因多为低表达。我们对大肠癌高转移细胞株 LoVo 细胞的检测发现,其 Fas 基因表达明显降低。因此,为进一步证实 Fas 基因对大肠癌细胞凋亡的作用,我们将 Fas 基因转导至大肠癌细胞株,以证实 Fas 基因转导诱导大肠癌细胞凋亡的作用。

在本实验中,我们采用基因转染方法将克隆化的外源基因通过特定手段导入大肠癌细胞株^[3-4]。利用脂质体介导的基因转染方法,成功地将 Fas 表达质粒 pBKFas 转入到了 Fas 低表达的大肠癌细胞 LoVo cells,筛选出一株稳定的 LoVoFas cells 细胞株。经过 Dot blotting 和 Western blotting 检测,转导细胞株 Fas 在 mRNA 水平和蛋白水平都获得有效的表达。转导株 Fas 基因表达明显增强。结果显示,低表达的 LoVo 细胞株通过 Fas 基因转导能够有效地表达较高水平的 Fas。并且 Fas 转导株在 Fas 抗体作用下,肿瘤细胞生长较非转导株受到明显抑制($P < 0.05$)。其机制可能与细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] 姜泊. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999:3-14.
- [2] Martin SJ, Green DR. Apoptosis as a goal of cancer therapy[J]. Curr Opin Oncol, 1994, 6(6):616-21.

- [3] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8):2013-26.
- [4] Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA of human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis[J]. Cell, 1991, 66(2):233-43.
- [5] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 等. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996:15-162.
- [6] Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(12):3057-62.
- [7] Strater J, Wellisch I, Riedl S, et al. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis[J]. Gastroenterology, 1997, 113(1):160-7.
- [8] Moller P, Koretz K, Leithauer F, et al. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNFR superfamily, in normal and neoplastic colonic epithelium[J]. Int J Cancer, 1994, 57(3):371-7.
- [9] Meterissian SH, Kontogianna M, Po J, et al. Apoptosis induced in human colorectal carcinoma by anti-Fas antibody[J]. Ann Surg Oncol, 1997, 4(2):169-75.
- [10] Morimoto Y, Hizuta A, Ding EX, et al. Functional expression of Fas and Fas ligand on human intestinal intraepithelial lymphocytes[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 116:84-9.
- [11] Arbuckle E, Langlois NE, Eremin O, et al. Evidence for Fas counter attack in vivo from a study of colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2000, 7(1):45-7.
- [12] Ben-Hur H, Gurevich P, Huszar M, et al. Apoptosis and apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, bcl-2, p53) in lymphoid elements of human ovarian tumors[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2000, 21(1):53-7.
- [13] 肖冰, 时永全, 赵燕秋, 等. Fas 基因转导胃癌细胞的表达[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(5):400-3.
- [14] Xiao B, Shi YQ, Zhao YQ, et al. Expression of Fas gene transduced in gastric cancer cells[J]. World Chin J Dig, 1998, 6(5):400-3.
- [15] 肖冰, 李恕军, 姜泊, 等. CD95 抑制大肠癌细胞生长的实验研究[J]. 中华消化杂志, 2001, 11(11):690-1.
- [16] Xiao B, Li SJ, Jiang B, et al. The study of suppressing growth in colorectal cells by CD95[J]. Chin J Dig, 2001, 11(11):690-1.

焦虑有关的基因

最新研究表明,如果某人具有一个重要脑基因的野等位基因,那么该携带者更易产生焦虑情绪。当然,并非该基因就能决定个体是野寻烦恼型还是野无忧无虑型。对于许多复杂的精神状态,有或没有该等位基因的个体间相对差异很小。该等位基因为 SLC6A4 编码的蛋白负责将神经递质 - 复合胺从一个大脑神经元传递到其它神经元。亲代将该基因短或长的拷贝传递给子代。Ahmad R. Hariri 等研究发现,该拷贝编码的蛋白转运复合胺的效率较低。具有一个或两个短等位基因的个体易表现出焦虑状态。但研究人员同时指出,由于情感和个性很难客观地加以测量,因此他们利用脑成像技术测量大脑杏仁体 (amygdala) 区活动。杏仁体是大脑中与情感相关的器官。当受测者看到气愤或受惊表情时,具有一个以上短 SLC6A4 等位基因的个体杏仁体活动更为强烈。研究人员发现,虽然该差异很小,但在两个群体的志愿者中该差别是具有统计意义的。