

文章编号:1004-616X(2001)02-0092-04

论著·

基因转染法建立 bcl-2 稳定表达的肝癌细胞株

杨连君,王文亮

(第四军医大学病理学教研室,陕西 西安 710032)

摘要:目的与方法:为了建立稳定表达 bcl-2 蛋白的肝细胞癌(简称肝癌)细胞株,用脂质体介导的基因转染法将含有人 bcl-2 cDNA 的逆转录病毒表达载体 pDOR-SB 质粒导入 bcl-2 蛋白阴性的肝癌细胞系 HCC-9 204 细胞中。经 G418 筛选后获得转入 bcl-2 基因的细胞克隆。细胞扩大培养后用免疫细胞化学法检测 bcl-2 表达情况。有限稀释法连续克隆化直至获得 100% 稳定表达 bcl-2 蛋白的单克隆细胞株,并进行流式细胞仪检测。结果:转染了 pDOR-SB 的 HCC-9 204 细胞大部分为 bcl-2 蛋白表达阳性,而转染了 pDOR 空载体或未转染的 HCC-9 204 细胞均为 bcl-2 蛋白阴性。经过连续 3 次克隆化后,流式细胞仪检测表明所获得的单克隆细胞株 100% 表达 bcl-2 蛋白。结论:用基因转染法成功地建立了稳定表达 bcl-2 蛋白的肝癌细胞株。

关键词: bcl-2;肝细胞癌;基因转染;基因表达

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

ESTABLISHMENT OF BCL-2 STABLY-EXPRESSED HEPATOMA CELL STRAIN BY GENE TRANSFECTION METHOD

YANG Lian-jun, WANG Wen-liang

(Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Purpose and Methods: To establish a hepatocellular carcinoma (HCC) cell strain that expresses bcl-2 protein stably the retrovirus expression vector pDOR-SB containing human bcl-2 cDNA was transduced into bcl-2 protein negative cell line HCC-9204 by lipid-mediated gene transfection method. The bcl-2 transfected cells

收稿日期:2000-07-11;修订日期:2000-11-22

作者简介:杨连君(1968-),男,黑龙江省哈尔滨市人,博士研究生,主要从事肝癌分子病理研究。

各剂量组均见微核率显著性增高,但未见剂量-反应关系。人体外周血淋巴细胞 SCE 试验结果,在活化系统(S₀混合液)存在下,高剂量组(终浓度 0.5 mg/ml、5 mg/ml)的 SCE 频率有显著增高,提示 HAH 在本实验条件下(一定剂量,体内或体外活化)对小鼠及人类体细胞具致突变活性。本次实验结果可见 1 580 mg/kg·bw 剂量组精子畸形率明显高于阴性对照组($P < 0.01$),提示 HAH 在该剂量水平对雄性小鼠生殖细胞有损伤作用,干扰精子的正常生成与成熟。

综合 4 项指标结果分析,HAH 不诱发鼠伤寒沙门氏菌回复突变,但在一定剂量范围可引起小鼠微核率和精子畸形率升高。同时,在活化系统存在下,一

定剂量的 HAH 可引起人体外周血淋巴细胞 SCE 频率增高。以上显示 HAH 具有潜在的间接致突变性。至于 HAH 如何经过体内代谢后引起小鼠微核率、精子畸形率增高,以及在体外经代谢活化后引起人淋巴细胞 SCE 频率增高,还有待于进一步研究。

参考文献:

- 1 尹松年,王淑洁,毕文芳. 工业化学品毒性鉴定规范及实验方法 M. 北京:人民卫生出版社,1998. 2~8.
- 2 黄幸纾,陈星若. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法 M. 杭州:浙江科学技术出版社,1985. 218~266.
- 3 秦椿华. 化学物致突变致癌检测技术 M. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1996. 119~120.

were obtained after being selected with G418, and the expression of *bcl-2* was detected by immunocytochemistry after the cells being expanded. The transfected cells were cloned by a limited dilution method, and *bcl-2* expression in the monoclonal cells was detected with flow cytometer. **Results:** Bcl-2 protein was expressed in most of the HCC-9204 cells transfected with pDOR-SB, but was negative in the HCC-9204 cells transfected with pDOR vector and nontransfected HCC-9204 cells. After being cloned for 3 times continually, the monoclonal cell strain that expressed *bcl-2* protein at a 100% positive rate was obtained. **Conclusion:** The HCC cell strain that expressed *bcl-2* protein stably, was established successfully by gene transfection method.

Key words: *bcl-2*; hepatocellular carcinoma; gene transfection; gene expression

细胞凋亡是在多基因参与调控下发生的一种细胞主动死亡方式。*bcl-2*及其家族成员是目前研究最为广泛的凋亡相关基因。*bcl-2*能够抑制多种因素诱导的多种细胞凋亡¹。目前关于*bcl-2*在原发性肝癌(以下简称肝癌)细胞凋亡调控中的作用报道很少。我们用脂质体介导的基因转染法把含有*bcl-2*基因的逆转录病毒质粒转入*bcl-2*蛋白阴性的肝癌细胞系 HCC-9204 细胞中,使其稳定表达,建立 100%表达 *bcl-2* 蛋白的肝癌细胞株,为进一步进行 *bcl-2* 与肝癌细胞凋亡关系的研究奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 主要材料 人肝癌细胞系 HCC-9204 为本室建立²。含有 *bcl-2* 逆转录病毒表达载体 pDOR-SB 质粒的菌株为本校生物化学教研室朱峰博士惠赠³。大肠杆菌菌株 HB 101 为本室保存。Wizard plus 质粒提取试剂盒、限制性内切酶 EcoR 和 T4 DNA 连接酶均为美国 Promega 公司产品。DNA 片段回收和纯化试剂盒为美国 Clontech 公司产品。LipofectAMINE 脂质体转染试剂盒和 G418 为美国 Gibco 公司产品。鼠抗人 *bcl-2* 单克隆抗体(mAb)和 FITC 标记的鼠抗人 IgG mAb 为美国 Oncogene 公司产品。免疫组化 ABC 试剂盒为美国 Vector 公司产品。

1.2 鉴定 pDOR-SB 质粒和获得 pDOR 空质粒 提取 pDOR-SB 质粒,经 EcoR 酶切后,进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。回收并纯化 6.5 kb 的基因片段,经 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 HB 101。

1.3 细胞转染和 G418 筛选 参照 LipofectAMINE 说明书,将纯化的 pDOR-SB 质粒转染入 HCC-9204 细胞,同时设 pDOR 空质粒转染对照和 HCC-9204 细胞对照。3 d 后换用含 G418 (500 mg/L) 的培养液,2~3 周后 HCC-9204 细胞对照完全死亡,转染细胞呈小克隆生长时,扩大培养。

1.4 免疫细胞化学鉴定 细胞爬片用 950 ml/L 乙

醇固定。以鼠抗人 *bcl-2* mAb 为一抗,PBS 为对照,进行常规免疫细胞化学 ABC 法染色。

1.5 细胞克隆化 细胞系列稀释至每 ml 含 10 个细胞。以 100 μ l/孔加入到 96 孔板。5 d 后标记单克隆孔。至其细胞长满孔底面积的 1/2 时,取细胞进行 *bcl-2* 免疫细胞化学染色。连续克隆化,直至所有单克隆孔均为 *bcl-2* 阳性。

1.6 流式细胞仪检测 细胞以鼠抗人 *bcl-2* mAb 为一抗,PBS 为对照,FITC 标记的鼠抗人 IgG mAb 为二抗,进行流式细胞仪检测。分析约 10×10^3 个细胞。

2 结果

2.1 质粒鉴定 用 EcoR 酶切 pDOR-SB 质粒后,琼脂糖凝胶电泳显示除了 8.4 kb 的未切开的 pDOR-SB 条带以外,出现了 6.5 kb 的 pDOR 片段和 1.9 kb 的 *bcl-2* cDNA 片段。

2.2 G418 筛选细胞 经 G418 持续筛选,未转染细胞 1 周内全部死亡。2 周时转染细胞大部分死亡,可见散在的 G418 抗性细胞克隆。

2.3 免疫细胞化学鉴定 大部分转染 pDOR-SB 的细胞胞质中可见棕色阳性信号,而转染 pDOR 空质粒和未转染的 HCC-9204 细胞未见阳性染色(图 1)。

2.4 流式细胞仪检测 经 3 次连续克隆化后,流式细胞仪检测显示,获得的细胞株 100% 表达 *bcl-2* 蛋白(图 2)。

3 讨论

bcl-2 是最早在 B 细胞淋巴瘤中发现的一个凋亡抑制基因,定位于细胞线粒体膜、内质网膜和核膜孔周围。*bcl-2* 过表达可抑制化疗药物、加热、X 射线、细胞生长因子撤销、*c-myc* 基因或野生型 *p53* 基因等多种因素诱导的多种细胞凋亡¹。但是也有研究表明导入 *bcl-2* 基因并不能抑制某些细胞的凋亡⁴。

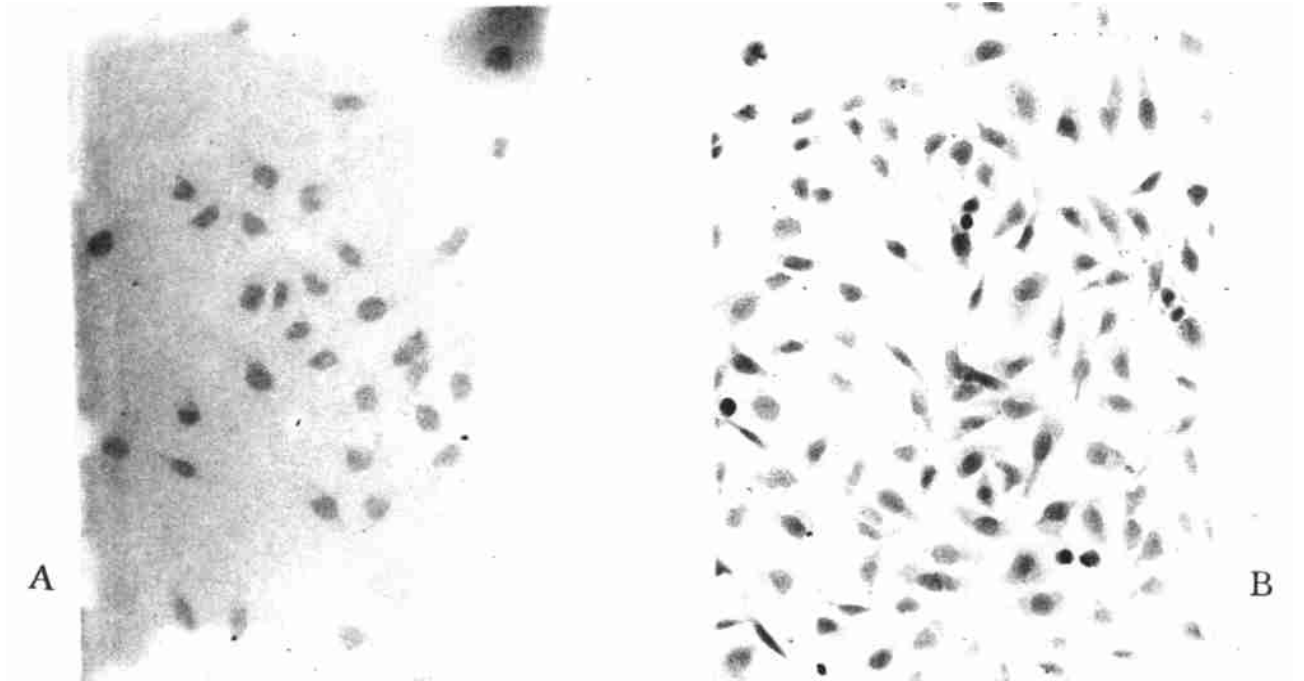


图 1. 转染 pDOR-SB 前后的 HCC-9204 细胞的 bcl-2 表达免疫细胞化学检测

Figure 1. Immunocytochemical detection of bcl-2 expression in HCC-9204 cells before and after being transfected with pDOR-SB(ABC, ×200)

A: Untransfected HCC-9204 cells; B: HCC-9204 cells transfected with pDOR-SB

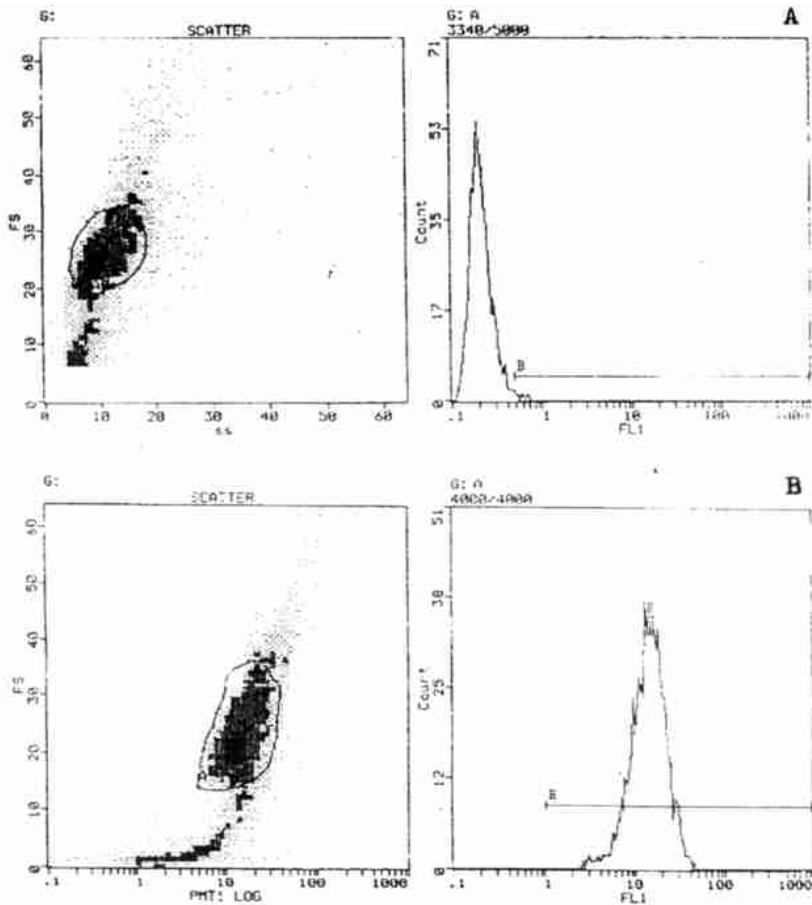


图 2. 经 3 次克隆化后的转染了 pDOR-SB 的 HCC-9204 细胞的 bcl-2 表达流式细胞仪检测

Figure 2. bcl-2 expression detected by flow cytometry in the HCC-9204 cells transfected with pDOR-SB after being cloned for 3 times

A: Untransfected HCC-9204 cells; B: HCC-9204 cells transfected with pDOR-SB

说明 bcl-2 在不同细胞凋亡中的作用有差异。bcl-2 蛋白在多数肿瘤中的表达高于其起源组织,而肝癌组织只能低度表达或不表达 bcl-2 蛋白,并且其阳性率往往低于癌旁肝组织⁵。说明 bcl-2 在肝癌细胞凋亡调控中的作用有一定的特殊性。有作者报道转染 bcl-2 基因能够抑制抗 TGF- β 或 Fas mAb 诱导的肝癌细胞凋亡^{6,7}。关于 bcl-2 基因在其他因素诱导的肝癌细胞凋亡中是否具有调节作用尚未见报道。

脂质体介导的基因转染法,尤其是新一代产品 LipofectAMINE,对于一些难以转染的细胞效率很高,是目前常用的一种基因转染方法⁸。脂质体和 DNA 形成的脂类-DNA 复合物能够通过内吞方式入胞,从而使外源基因在脂质体介导下转入靶细胞。逆转录病毒表达载体是目前常用的真核细胞表达载体。pDOR 是一种高效的逆转录病毒表达载体,可以整合进入宿主细胞基因组中,使其携带的外源基因得到稳定表达。pDOR 载体含有可表达氨基甙类抗生素(G-418,或称 Geneticin)抗性蛋白的 Neo 基因。细胞转染后用 G-418 筛选,未转入目的基因的细胞死亡,转入含目的基因载体的细胞因具有 G-418 抗性而存活,可获得稳定表达目的基因的细胞克隆。为了得到 100% 稳定表达 bcl-2 蛋白的肝癌细胞株,我们用有限稀释法连续进行了 3 次克隆化。免疫细胞化学染色和流式细胞仪检测结果显示,最终获得的细胞克隆 100% 表达 bcl-2 蛋白。说明成功地建立了稳定表达 bcl-2 蛋白的肝癌细胞株。

有的肝癌细胞系可低量表达 bcl-2 蛋白⁹,而 HCC-9204 细胞完全不表达 bcl-2 蛋白,选用 bcl-2 阴性的肝癌细胞系建立 bcl-2 蛋白高表达的细胞模型,

更有利于进一步研究 bcl-2 与肝癌细胞凋亡的关系。因此,我们选取 HCC-9204 细胞,用转染 bcl-2 基因的方法建立了稳定表达 bcl-2 蛋白的肝癌细胞株,为 bcl-2 与肝癌细胞凋亡关系的研究奠定了实验基础。

参考文献:

- 1 Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, *et al.* Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways J. *Leukemia*, 1997, 11 (Suppl 3): 380 ~ 382.
- 2 Hu CM, Liu YF, Sui YF, *et al.* Establishment of the hepatocellular carcinoma cell line HCC-9204 and its characteristics J. *J Med Coll PLA*, 1995, 10(1): 1 ~ 4.
- 3 朱峰,金明,惠宏襄,等. bcl-2 和反义 bcl-2 逆转录病毒表达载体的构建与鉴定. 第四军医大学学报, 1995; 16(3): 234 ~ 235.
- 4 陈德喜,马丽萍,曹国栋,等. bcl-2 蛋白不能抑制 VP16 诱导的乳腺癌细胞(Bcap37)凋亡 J. *实用肿瘤学杂志*, 1999, 13(1): 6 ~ 7.
- 5 Nakopoulou L, Stefanaki K, Voullakou C, *et al.* Bcl-2 protein expression in acute and chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma J. *Pathol Res Pract*, 1999, 195(1): 19 ~ 24.
- 6 Huang YL, Chou CK. Bcl-2 blocks apoptotic signal of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells J. *J Biomed Sci*, 1998, 5(3): 185 ~ 191.
- 7 Takahashi M, Saito H, Okuyama T, *et al.* Overexpression of bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis J. *J Hepatol*, 1999, 31(2): 315 ~ 322.
- 8 司晓辉,杨连甲,金岩. 稳定表达人骨形成蛋白 2 成纤维细胞系的建立与鉴定 J. 第四军医大学学报, 1999, 20(2): 127 ~ 129.
- 9 Luo D, Cheng SC, Xie H, *et al.* Chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703 is related to bcl-2 protein levels J. *Tumour Biol*, 1999, 20(6): 331 ~ 340.

中国科技期刊编辑学会 医学委员会肿瘤专业委员会在穗成立

经中国科技期刊编辑学会批准,中国科技期刊编辑学会医学委员会肿瘤专业委员会于 2000 年 11 月 10 日在广州市召开大会宣布成立。参加大会的成员单位有全国 28 家肿瘤专业期刊编辑部。肿瘤专业委员会隶属于中国科技期刊编辑学会及其医学委员会,会址设于北京。

本会推举《中华肿瘤杂志》编辑部主任谭颖波编审为主任委员,舒咏冰、白润萍、张麟、雷通海、钟均行、刘亚民为副主任委员,魏玫玫为秘书。

会议根据中国科技期刊编辑学会的章程制订了本会的工作条例。本会的建立对发展建设我国的肿瘤期刊编辑事业具有重大意义,其中心任务为:进行医学编辑基础理论和应用技术的探索,以加强编辑专业的学科建设和学术研究;指导各编辑部提高业务水平,加快编辑部的自身建设;开展继续教育,培养本学科的专业队伍。

本会将每两年举行一次学术年会,开展本专业领域的学术交流和经验交流,培训编辑专业人员的业务水平和职业技能,介绍先进的办刊经验和应用技术,开展成员间的业务联系和合作,以达到相互促进、共同提高的目的。

作为学会组织,本会还将在从编人员中发展会员,以壮大会组织。