

文章编号: 1004-616X(2003)04-0203-03

· 论著 ·

**pEgr - P16 重组质粒的构建及其在 EC9706 细胞中的辐射诱导表达<sup>①</sup>**吴丛梅<sup>1</sup>, 黄天华<sup>1\*</sup>, 吴德生<sup>\*\*</sup>, 谢庆东<sup>1</sup>, 徐小虎<sup>2</sup>

(1. 汕头大学医学院生殖医学研究中心, 广东 汕头 515031; 2. 汕头大学医学院法医学教研室, 广东 汕头 515031)

**【摘要】**目的: 构建 pEgr - P16 重组质粒并检测其在人食管癌细胞系 EC9706 中的辐射诱导表达。方法: 人 P16cDNA 基因连接到 Egr - 1 启动子的下游构建成 pEgr - P16 重组质粒, 利用脂质体介导转染人 EC9706 细胞, 用 Western blot 方法检测不同剂量  $\gamma$  射线照射后被转染细胞中 P16 的表达。结果: 酶切鉴定证实 pEgr - P16 重组质粒构建正确。被 pEgr - P16 重组质粒转染的人食管癌 EC9706 细胞经不同剂量  $\gamma$  射线照射后, P16 基因表达均高于未照射组。结论:  $\gamma$  射线可诱导 pEgr - P16 重组质粒在人 EC9706 细胞中表达增强。

**【关键词】**Egr - 1 启动子;  $\gamma$  射线; P16 表达; 食管癌细胞系; Western blot

中图分类号: R146

文献标识码: A

**CONSTRUCTION OF pEgr - P16 PLASMID AND ITS EXPRESSION IN EC9706 CELL INDUCED BY IONIZING IRRADIATION**WU Cong - Mei<sup>1</sup>, HUANG Tian - Hua<sup>1\*</sup>, WU De - Sheng<sup>\*\*</sup>, et al

(1. Research Center of Reproductive Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China; 2. Department of forensic medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

**【Abstract】** **Purpose:** To construct pEgr - P16 plasmid and detect its expression in esophageal squamous EC9706 cells induced by irradiation. **Methods:** Human P16cDNA was ligated to downstream of Egr - 1 promoter to construct pEgr - P16 plasmid. The recombinated plasmids were transfected into EC9706 cells with liposome. The expression of P16 after different doses of  $\gamma$  - ray irradiation was detected by Western blot technique. **Results:** Restriction enzyme digestion showed pEgr - P16 was correctly constructed. The P16 expression in cells transfected with pEgr - P16 induced by different doses of irradiation was higher than that of sham - irradiation group. **Conclusion:**  $\gamma$  - ray can induce and enhance expression of pEgr - P16 plasmid in EC9706 cells.

**【Key words】**EGR - 1 promoter;  $\gamma$  - ray; P16 expression; Western blot; esophageal squamous cell line

研究证实, 早期生长反应基因 - 1 (Early growth response gene - 1, Egr - 1) 的启动子中有 6 个 CArG [CC (A + T - rich)<sub>6</sub>GG] 顺式作用元件, 它们在辐射诱导 Egr - 1 基因转录的过程中起着重要作用<sup>[1]</sup>。Ralph R. Weichselbaum 等根据 Egr - 1 启动子的特性提出了肿瘤基因 - 放射治疗的新理论, 并将 Egr - TNF $\alpha$  基因导入人肿瘤细胞, 其研究结果证实 Egr - TNF $\alpha$  基因结合

放射治疗可明显抑制肿瘤的生长<sup>[2]</sup>。本研究将 P16 cDNA 基因连接到 Egr - 1 启动子下游, 构建 pEgr - P16 重组质粒, 以探讨 pEgr - P16 重组质粒在人食管癌细胞中的辐射诱导表达特性。

**1 材料与方法****1.1 pEgr - P16 重组质粒的构建**

① 收稿日期: 2003 - 06 - 30; 修订日期: 2003 - 07 - 16

基金项目: 国家自然科学基金对外交流与合作项目 (No. 国科金生外 (2002) 30210103904 号); 广东省科技计划项目 (No. 2003C30304)

作者简介: 吴丛梅 (1970 - ), 女, 吉林省吉林市人, 讲师, 博士后, 研究方向: 实验肿瘤学。\* \* 吴德生, 兰州医学院 2001 级硕士研究生。

\* 通讯作者: 黄天华 Tel: 0754 - 8900845, E - mail: thuang@stu.edu.cn

pEgr - P16 质粒的构建流程如图 1 所示。

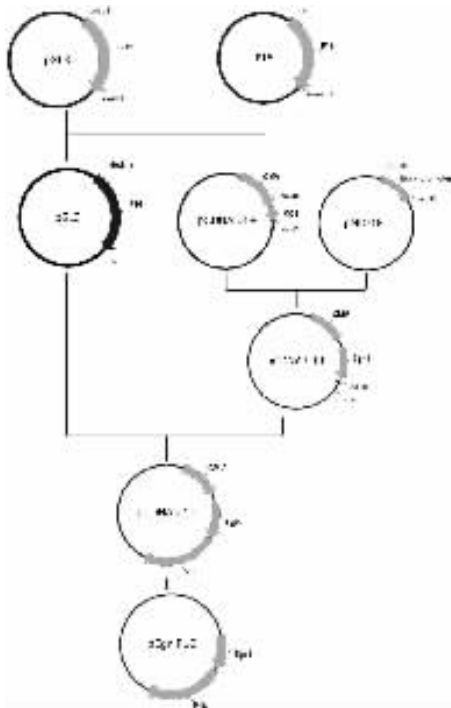


图 1. pEgr - P16 质粒的构建

Figure 1. Diagram of the construction of the plasmid pEgr - P16

### 1.2 细胞

人食管癌细胞 EC9706 由中国医学科学院肿瘤医院王明荣教授惠赠。

### 1.3 细胞的培养和转染

EC9706 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液常规培养, 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种 6 孔板, 待生长至 80% 融合时开始转染。用无血清 RPMI1640 洗细胞 2 次, 取脂质体(GIBICO 公司) 10 μl (1 μg/μl), 加入 500 μl 无血清 RPMI1640 培养液中, 另取 10 μg 重组质粒加入 500 μl 无血清 RPMI1640 培养液中, 两液体混匀, 室温放置 30 min, 轻轻覆盖细胞表面, 置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养, 6 h 后更换培养液。

### 1.4 照射条件

剂量率 0.784 Gy/min, 照射剂量分别为 0、2、4、8、10、20 Gy <sup>60</sup>Co γ 射线照射。

### 1.5 Western blot 实验方法参照文献[3]。

### 1.6 统计学处理

采用 t 检验进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 质粒的构建

pEgr - P16 重组质粒构建流程如图 1 所示。得到的重组粒用 ApaI 和 XbaI 酶切鉴定, 琼脂糖电泳鉴定

结果如图 2 所示。得到相应特异片段, 提示 pEgr - P16 重组质粒构建正确。

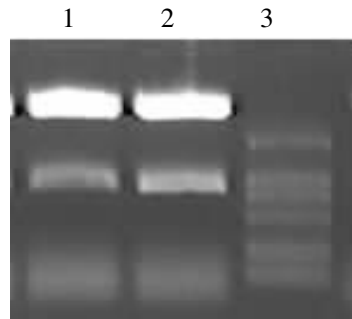


图 2. 重组质粒酶切鉴定

Figure 2. Identification of recombinant clone by restriction enzyme  
1. XbaI cut 2. ApaI cut 3. DL2000 marker

### 2.2 不同剂量 γ 射线照射后 P16 基因表达的变化

用脂质体介导法将 pEgr - P16 质粒转染进入人食管癌 EC9706 细胞中, 并被转染的细胞不同剂量的 γ 射线照射。(对照组转染 pcDNA3.1<sup>+</sup>质粒)。照射后 8 h 裂解细胞, 提取蛋白, 用 western blot 方法检测 P16 蛋白的表达。结果显示: 对照组没有 P16 蛋白的表达。转染 pEgr - P16 质粒的 EC9706 细胞经 2、4、8、10、20 Gy γ 射线照射后, P16 的表达量高于未照射组。

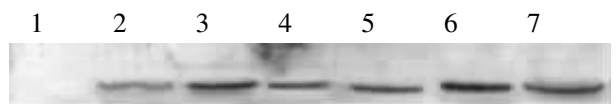


图 3. 不同剂量 γ 射线照射后 P16 在 EC9706 细胞中的表达

Figure 3. Expression of P16 in EC9706 cell after γ - irradiation in different doses

1. control group, 2. 0 Gy group, 3. 2 Gy group, 4. 4 Gy group, 5. 8 Gy group, 6. 10 Gy group, 7. 20 Gy group

## 3 讨论

美国肿瘤放射治疗专家 Weichselbaum 于 1992 年提出了肿瘤的基因 - 放射治疗的设想: 即将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导特性的基因转入体内, 在对肿瘤实施局部放疗时诱导肿瘤杀伤基因表达, 造成射线和基因对肿瘤的双重杀伤作用。这样一方面可以相对降低等效照射剂量, 缓解正常组织的损伤; 另一方面通过射线局部照射来实现肿瘤杀伤基因的定位表达<sup>[4,5]</sup>。

美国的哈佛大学和芝加哥大学的研究者首先利用 Egr - 1 基因启动子和 TNFα 基因构建成表达质粒 ΔpEgr - TNF, 将转染该质粒的靶细胞注入对辐射具有抗性的异种移植瘤, 肿瘤局部给予 X 射线照射后, 瘤体内 TNFα 水平较未照射组明显增加, 肿瘤生长受到明显抑制, 未见明显的局部和全身副作用<sup>[2]</sup>。随后,

## 药物 AC-88 对荷瘤鼠 T 细胞内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 mRNA 含量及其增殖功能影响<sup>①</sup>

马栋柱, 孙克任, 赵 丽, 肖志峰, 李 慧

(山东大学公共卫生学院毒理学研究室, 山东 济南 250012)

**【摘要】**目的: 探讨 AC-88 抗肿瘤作用及可能机制。方法: 以移植 H22 肝癌细胞的小鼠为体内模型, 研究了 AC-88 的抑瘤作用; 应用细胞培养和 MTT 法研究荷瘤小鼠 T 淋巴细胞的增殖功能; 用 RT-PCR 法研究荷瘤小鼠 T 淋巴细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 含量变化。结果: 实验发现, AC-88 的体内抑瘤率可高达 76%, 而且 AC-88 能促进荷瘤鼠 T 淋巴细胞的增殖, 能使 T 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等细胞因子的 mRNA 含量增加 2~4 倍。结论: AC-88 有良好的抑瘤作用, 还可以调节 T 淋巴细胞的功能, 是一种具有较高开发价值的抗癌药物。

**【关键词】**AC-88; 细胞因子; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-6; T 细胞增殖

中图分类号: R446.62

文献标识码: A

① 收稿日期: 2002-12-10; 修订日期: 2003-03-03

基金项目: 本文受山东省公关课题资助(No. 8190503)

作者简介: 马栋柱(1969-), 男, 安徽省蚌埠人, 讲师, 博士研究生, 主要从事基因调控, 细胞信号转导和实验肿瘤学的研究。

E-mail: mdzwy@sohu.com

国内外学者构建了不同的质粒, 用于不同肿瘤的基因-放射治疗。研究结果均表明在电离辐射诱导下, 与 Egr-1 启动子连接的治疗基因均有较明显的表达和提高放疗疗效的作用<sup>[6]</sup>。

限制性酶切长度多态和微卫星 DNA 多态分析表明, 食管癌组织中 3 号和 9 号染色体存在较高频率的杂合性丢失和微卫星 DNA 不稳定。P16/MST-1 位于 9 号染色体短臂 2 区 1 带。在食管癌细胞系和原发食管癌中存在 P16/MST-1 基因的突变或缺失。P16 的过表达可阻止细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期, 因此人们认为 P16 可作为一种肿瘤抑制因子<sup>[7,8]</sup>。

在以上研究的基础上, 我们根据 P16 的抗肿瘤作用, 构建了 pEgr-P16 质粒, 并通过脂质体介导转染法, 将 pEgr-P16 质粒转入人食管癌 EC9706 细胞中, 利用  $\gamma$  射线诱导, 研究其表达特性。研究结果证实, 转染 pEgr-P16 质粒的 EC9706 细胞经 2、4、8、10、20 Gy  $\gamma$  射线照射后, P16 的表达量高于未照射组。结果提示我们所构建的 pEgr-P16 重组质粒可被 X 射线照射激活, 并增强 P16 基因表达, 本研究可能对食管癌基因-放射治疗的进一步研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Datta R, Rubin E, Sukhatme VP, *et al.* Ionizing radiation activates transcription of Egr-1 gene via CarG elements[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 10 149-10 153.
- [2] Weichselbaum RR, Halahan DE, Sukhatme VP, *et al.* Gene therapy targeted by ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, 24(3): 565-567.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 400-403.
- [4] Stackhouse MA, Buchsbaum DJ. Radiation to control gene expression [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(13): 1 085-1 086.
- [5] Marples B, Scott SD, Hendry JH, *et al.* Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6): 511-517.
- [6] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Becktt MA, *et al.* Gene therapy by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 4 266-4 269.
- [7] Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, *et al.* Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition [J]. *Nature*, 1995, 375: 506-510.
- [8] Lukas J, Parry D, Aagaard L, *et al.* Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16[J]. *Nature*, 1995, 375: 503-506.