

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0369-03

# Cx43 蛋白在宫颈癌细胞中的表达及其对细胞通讯功能的影响

辛晓燕, 马向东, 陈必良, 王德堂 (第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033)

**关键词:** 间隙连接; 子宫肿瘤; 细胞间隙连接通讯; 流式细胞仪分析; 划痕标记荧光传输技术

**中图分类号:** R730 **文献标识码:** A

**摘要:** **目的** 探讨细胞间隙连接蛋白 Cx43 在人子宫颈癌细胞系 HeLa 中表达, 及其对细胞间隙连接通讯的影响 **方法** 应用流式细胞仪以及 Lucifer Yellow 划痕标记荧光传输技术, 研究维甲酸作用对 HeLa 细胞 Cx43 蛋白表达, 以及细胞生长状态和间隙连接通讯功能的调节作用 **结果** HeLa 细胞经维甲酸处理后, 流式细胞仪分析, Cx43 蛋白荧光强度明显增强, Cx43 蛋白表达阳性细胞计数率由 1.9% 上升至 26.3%; HeLa 细胞生长明显受抑; 细胞间隙连接通讯功能得到恢复 **结论** 维甲酸可通过上调 Cx43 蛋白在 HeLa 细胞中的表达, 使细胞间隙连接通讯功能得到恢复, 实现对宫颈癌细胞恶性表型的逆转作用

## Expression of gap junction protein connexin 43 in HeLa cell line and its effect on gap junctional intercellular communication

XIN Xiaoyan, MA Xiangdong, CHEN Bilian, WANG Detang

Department of Obstetric & Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**Keywords:** gap junction; cervical neoplasm; gap junction intracellular communication; flow cytometer analysis

**Abstract:** **AIM** To investigate the expression of gap junction protein connexin (Cx) 43 in human cervical carcinoma cell line HeLa and its effect on gap junctional intercellular communication **METHODS** Cell culture, flow cytometer (FCM) and Lucifer Yellow scrape loading and dye transfer (SLDT) were employed to detect the expression of Cx43 pro-

tein in HeLa and the regulatory effect on gap junctional intercellular communication treated by ATRA-retinoic acid (ATRA). **RESULTS** After treated by ATRA, HeLa cell grew much slower than the untreated cell. FCM found the positive rate of Cx43 in HeLa increased from 1.9% to 26.3%. Gap junction intracellular communication (GJIC) capacity recovered in ATRA-treated cells. **CONCLUSION** The anti-tumor effect of ATRA in HeLa may result from the up-regulation of Cx43 gene and recovery of Cx43 mediated GJIC.

## 0 引言

20 世纪 90 年代以来, 国外已逐渐兴起对细胞间隙连接蛋白(connexin, Cx)的研究。尤其对恶性肿瘤和转化细胞发生的关系已成为肿瘤分子机制研究的前沿课题<sup>[1]</sup>。cx 基因被认为是非突变型肿瘤抑制基因, 恶性肿瘤的发生及其恶性表型可能与间隙连接蛋白基因表达受抑。间隙连接通讯功能(gap junction intercellular communication, GJIC)的抑制密切相关<sup>[2]</sup>, 这一现象又受到维甲酸(RA)等抗肿瘤药物的抑制。cx43 基因表达缺失对子宫颈癌的发生的关系仍不清楚, 国内尚未见报道。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞培养及维甲酸处理** 人子宫颈癌细胞系 HeLa (西安医科大学微生物教研室提供) 培养于含 10 mL · L<sup>-1</sup> 热灭活小牛血清(美国 Gibco)的 RPMI-1640(美国 Gibco)培养基中, 于细胞对数生长期加入全反式维甲酸(美国 Sigma), 终浓度分别为 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>及 10<sup>-4</sup> mol · L<sup>-1</sup>, 间隔 24 h 按原浓度换液。每 24 h 进行细胞计数, 绘制生长曲线。

**1.2 流式细胞仪分析(FCM)** 取维甲酸处理的 HeLa 细胞及对照细胞制成单细胞悬液, 加入鼠抗 Cx43 mAb(美国 Zymed, 1:1000), 4~60 min, 离心收集细胞, 用 0.01 mol · L<sup>-1</sup> PBS 洗涤并悬浮, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(美国 Jackson, 1:40), 4~30 min, PBS 洗涤并悬浮后, 于 EPICS-PROFILE II 流式细胞仪(美国 Coulter) 488 nm 波

收稿日期: 1999-12-02; 修回日期: 2000-01-31

作者简介: 辛晓燕(1952-), 女(汉族), 江苏省无锡市人, 副教授, 主任医师, 硕士生导师。Tel: (029) 3375388(H)

长激发 FITC, 测定阳性荧光染色显示基因表达产物, Multicycle 软件(美国 Phoenix) 处理结果, 设无关鼠抗 IgG 代替一抗为特异性对照

**1.3 Lucifer Yellow (LY) 划痕标记荧光传输法** 取经维甲酸处理前后 HeLa 单层细胞爬片, 锐刀划痕标记,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  LY 标记细胞 3 min, 无血清 RPMI-1640 洗净背景, 以 490 nm 波长激发后荧光显微镜上观察细胞间隙连接通讯状态

## 2 结果

**2.1 维甲酸对 HeLa 细胞生长的影响** HeLa 细胞经维甲酸处理后, 生长速度明显减慢, 尤以  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  对细胞的抑制作用最明显, 其次是  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最后是  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 处理后第 2 日开始出现抑制作用, 以后逐渐明显, 维甲酸对 HeLa 细胞的抑制作用呈现时间和剂量依赖性(Fig 1).

**2.2 流式细胞仪分析** HeLa 细胞经维甲酸作用后, HeLa 细胞中 Cx43 蛋白表达阳性细胞计数率由维甲酸作用前的 1.9% 上升至 26.3%, Cx43 蛋白平

均荧光强度明显增强, 由维甲酸作用前的 1.76 上升至维甲酸作用后 8.30(Fig 2).

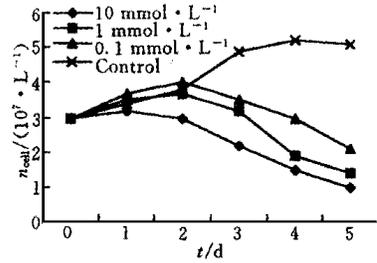


图 1 不同浓度维甲酸作用对 HeLa 生长状态的影响  
Fig 1 Effect of different concentration of ATRA on HeLa

**2.3 Lucifer Yellow 划痕标记荧光传输** Lucifer Yellow 划痕标记荧光传输实验显示, 常规培养的 HeLa 细胞, 期 Lucifer Yellow 荧光染色仅限于单个细胞, 无明显的荧光传输现象 HeLa 细胞经维甲酸处理后, 细胞间通讯功能显著增强, Lucifer Yellow 荧光通过细胞间隙连接传输至相邻细胞, 形成片状荧光染色(Fig 3).

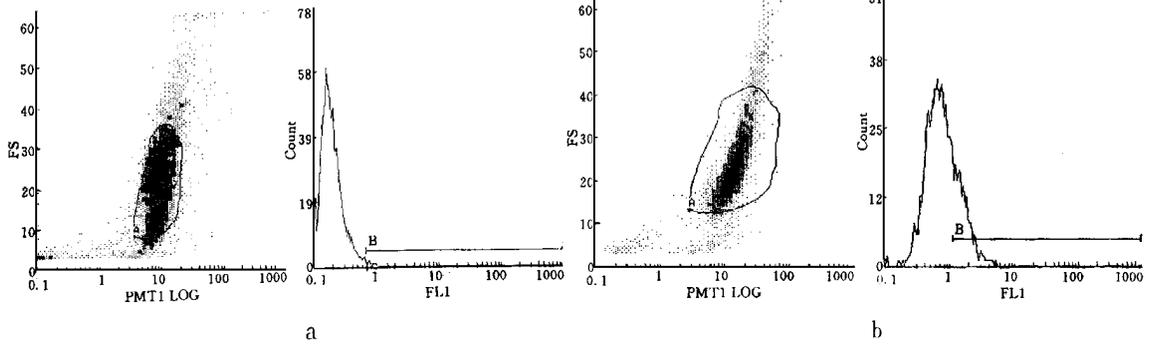


图 2 维甲酸作用前后 HeLa 细胞 Cx43 阳性细胞计数率  
Fig 2 Positive rates of Cx43 in HeLa treated by RA  
a Before RA treated; b After RA treated

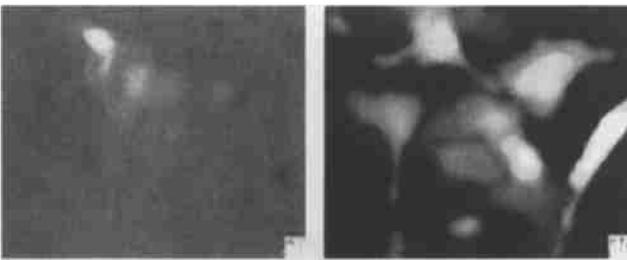


图 3 Lucifer Yellow 划痕标记荧光传输  
Fig 3 SLDT in HeLa by Lucifer Yellow  
a Before RA treated; b After RA treated

## 3 讨论

细胞间隙连接蛋白是整合膜蛋白, 为提供信号和

能量传递的跨膜亲水性通道<sup>[1]</sup>. 研究发现<sup>[3]</sup>, 人宫颈癌细胞系 HeLa 等多种肿瘤和转化细胞的发生, 与 cx 基因的表达缺失, GJIC 功能缺陷密切相关 cx 基因的表达对绝大多数肿瘤细胞的生长起负调控作用, GJIC 功能的恢复表现出肿瘤生长控制和转化表型抑制 cx 基因被认为是非突变型抑癌基因

Cx43 蛋白表达的缺失可能造成宫颈癌细胞间隙连接结构和功能的异常, 为宫颈癌细胞恶性转化、增殖提供必要条件. 应用 FCM 技术测定细胞表面特定抗原成分, 对培养状态下经维甲酸处理前后的 HeLa 细胞所表达的 Cx43 蛋白进行定性和定量分析, 发现维甲酸使 Cx43 表达缺失的 HeLa 细胞 Cx43 蛋白表

达明显上调 同时划痕标记荧光传输技术证实, 随着 Cx43 表达的升高, 细胞间隙连接通讯功能显著恢复, 最终使宫颈癌细胞生长严重抑制, 实现对恶性肿瘤的杀伤作用

Cx 基因的重要意义还在于其表达受到多种因素的调节, 从而对肿瘤的生长起调控作用 其中肿瘤抑制剂维甲酸的调节作用和机制尚需深入研究 维甲酸可抑制肿瘤细胞的增殖并诱导分化, 全反式维甲酸 (ATRA) 是维生素 A 类化合物, 能诱导细胞分化成熟或恶性逆转, 达到治疗肿瘤的目的, 是一类颇具潜力的癌细胞分化诱导剂<sup>[4]</sup>

Cx 基因在宫颈癌的研究, 揭示了维甲酸诱导分化作用新的理论基础, 改变了传统肿瘤治疗中只能将其杀死的概念, 如何诱导和上调肿瘤抑制基因 Cx 基因的表达, 并恢复它所介导的细胞间隙连接通讯功能是肿瘤化疗的新途径<sup>[5,6]</sup> Cx 基因理论丰富和完善了传统的肿瘤化疗理论, 为揭示宫颈癌在内的多种肿瘤的分子机制和理论开拓一条新的道路<sup>[7,8]</sup> 有重要的基础和临床意义

- [1] Steinberg TH. Gap junction function the messenger and the message [J]. *Am J Pathol*, 1998; 15(3): 851- 854
- [2] Holder JW, Elmore E, Barrett J. Gap junction function and cancer [J]. *Cancer Res*, 1993; 53(24): 3475- 3485
- [3] 马向东, 隋延仿, 王文亮. 间隙连接 cx32 mRNA, cx43 mRNA 及其蛋白产物在肝细胞肝癌中的表达[J]. *临床与实验病理学杂志*, 1999; 15(1): 32- 34
- [4] 江 宁, 曾朝阳, 湛凤凰 *et al*. 细胞间隙连接蛋白基因在鼻咽癌细胞株中的表达及维甲酸对其表达及调控作用[J]. *癌症*, 1998; 17(4): 321- 323
- [5] Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C *et al*. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: Connexin species specific [J]. *Cancer Res*, 1995; 55(3): 629- 639
- [6] Zhu W, Mironov N, Yamasaki H. Increased genetic stability of cells after connexin 43 gene transfection [J]. *Cancer Res*, 1997; 57(12): 2148- 2150
- [7] Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G *et al*. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 8(19): 1831 - 1835
- [8] Mesnil M, Piccoli C, Yamasaki H. A tumor suppressor gene, Cx26, also mediates the bystander effect in HeLa cells [J]. *Cancer Res*, 1997; 57(31): 2929- 2932

编辑 王 睿

## 参考文献

### · 文 摘 · L-12 及 HBV 基因疫苗共同免疫小鼠的效果

[杜德伟, 周永兴, 冯志华 *et al*. 世界华人消化杂志, 2000; 8(2): 128- 130]

**目的** 观察编码鼠 L-12 的真核表达载体对 HBV DNA 疫苗诱导 BALB/c 小鼠免疫应答的影响 **方法** 肌肉注射 DNA 疫苗, ELISA 法检测小鼠血清抗 HBs, 4 h <sup>51</sup>Cr 释放法检测小鼠脾细胞 CTL 杀伤活性 **结果** 免疫 8wk 后, 注射 pCR3 1 组、注射 pCR3 1-S 组及共注射 L-12 真核表达载体的血清 A (OD 值) 分别为 (0.04 ± 0.01), (0.87 ± 0.1) 及 (1.67 ± 0.15). CTL 细胞杀伤活性分别为 (10.1 ± 6.4)%, (50.5 ± 6.4) % 及 (73.3 ± 8.8) %, 后两组与 pCR3 1 组比较均有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 后两组比较均有显著差异 ( $P < 0.01$ ). 脾细胞悬液经抗 CD4<sup>+</sup> 单克隆抗体处理后分别为 (48.3 ± 5.9)%, (75.6 ± 9.1) %, 抗 CD8<sup>+</sup> 单克隆抗体处理后分别为 (10.6 ± 1.4)%, (16.9 ± 2.3) % **结论** L-12 的真核表达载体能够提高小鼠对 DNA 疫苗的免疫应答, CTL 细胞杀伤活性主要由 CD8<sup>+</sup> 执行, 基因疫苗可能用于预防及治疗 HBV 感染 (井晓梅 王 睿)

### · 简 讯 · 细胞和分子免疫学与抗体工程学术会议征文通知

为了交流我国、我军基础和临床免疫学以及单克隆抗体和抗体工程研究领域的学术成果, 推动我国免疫学的发展, 经中国免疫学会基础免疫分会和全军免疫学专业委员会研究决定: 于 2000 年 10 月在西安第四军医大学召开“细胞和分子免疫学与抗体工程”学术会议

- 1 会议主题: 交流单克隆抗体、抗体工程与免疫学研究领域的学术成果以及新技术和新方法
- 2 征文内容: 论文范围包括细胞与分子免疫学, 临床免疫学, 肿瘤免疫学, 免疫学技术与方法, 生物传感器技术, 单克隆抗体, 基因工程抗体及噬菌体表面呈现技术等
- 3 投稿要求: 参加会议交流的论文, 将择优发表于核心期刊和源期刊的《细胞与分子免疫学杂志》今年第 5 期或增刊上, 投稿格式详见 2000 年出版的该刊 欢迎通过电子信箱 (immuedit@fmmu.edu.cn) 投稿
- 4 截止时间: 论文征集截止于 2000 年 6 月 30 日
- 5 投稿地址: (邮编 710033) 西安市第四军医大学《细胞与分子免疫学杂志》编辑部 请在信封和论文首页的左下角标注“会议征文”, 并同时寄审稿费 15 元 (注明会议审稿费). 电话: 029- 3374550 传真: 029- 3253816 Email: immuedit@fmmu.edu.cn