

转染反义细胞周期蛋白 A 的舌癌细胞系的建立与鉴定

周 峻 杨连甲 金 岩 董绍忠 赵 宇

摘要 目的:研究反义细胞周期蛋白(cyclin A)基因对舌癌细胞周期的调控作用,为 cyclin A 在基因治疗方面提供理论基础。方法:采用阳离子脂质体转染方法将已构建成功含人全长 cyclin A(1.77 kb)的反义真核表达载体 pAS-A 导入舌癌细胞系(Tca8113),经 G418 选择性培养液筛选,获得阳性克隆细胞,通过细胞原位杂交检测 cyclin A 基因的稳定转染情况。结果:pAS-A 成功转染进入 Tca8113,转染后细胞内 cyclin A mRNA 的转录和蛋白表达明显降低。结论:反义 cyclin A 基因稳定有效的在 Tca8113 细胞系中表达。

关键词 细胞周期蛋白 A 反义技术 基因转染

Establishment and Identification of Squamous Cell Lines Carcinoma of Tongue Transferred with Anti-sense Cyclin A Gene

Zhou Jun, Yang Lianjia, Jin Yan, et al

Department of Pathology, Qindu Stomatological College, the Fourth Military University

Abstract

Objective: The aim of this study is to investigate the relationship between cyclin A and cycle regulation of squamous cells carcinoma of tongue, and to provide basis for cancer gene therapy. **Methods:** Eukaryocyte expression vector (pAS-A) containing anti-sense and the full-length human cyclin A complementary DNA (cDNA) (1.77 kb) was constructed and was transferred into squamous carcinoma of the tongue cell line (Tca8113) by Lipofect AMINEIM introduction. The positive cell clones were selected with G418. Transcription of Neo gene mRNA and cyclin A mRNA were determined by in situ hybridization. The stable expression of anti-sense cyclin A in the Tca8113 cell line was determined using immunohistochemical methods. **Results:** After G418 selection, cells transferred anti-sense cyclin A were obtained successfully. The positive cells of in situ hybridization of specific-stained Neoprobe were observed in cells transferred eukaryocyte expression vector. The positive cells of in situ hybridization of cyclin A in cells transferred anti-sense cyclin A were significantly fewer than those in cells transferred cyclin A. The positive rate of cyclin A immunohistochemical stain in cells transferred anti-sense cyclin A was significantly lower than that in cells transferred cyclin A. **Conclusion:** Human anti-sense cyclin A gene is stably expressed in the Tca8113 cell lines.

Key words: cyclin A antisense gene transfection

细胞周期蛋白 A(cyclin A)属于 DNA 合成期的特征性细胞周期蛋白,是 S 期主要的调节蛋白¹,当细胞由 G1 S 期时,cyclin A 的合成增加,在哺乳细胞 DNA 复制中占重要地位,具有有丝分裂的作用,存在于细胞的胞核内,与细胞的增殖、肿瘤的发生具有极其重要的关系²。反义 RNA 主要作用是通过碱基互补方式与 mRNA 分子特异性的互补结合形成双链 RNA 杂交体,特异的同相应靶基因结

合,阻止其转录或翻译,本实验运用反义 RNA 技术原理,将已构建成功的反义 cyclin A 基因作为目的基因,转染入人舌癌细胞系中,使新建立的舌癌细胞系中 cyclin A 的表达减少,以期达到抑制舌癌细胞的目的,为反义 cyclin A 在基因治疗方面提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

pCycA 质粒由美国 Dr. Tony Hunter 惠赠,内部含人类

cyclin A 的 cDNA 全长片段 (约 1.77 kb), 克隆于质粒载体 pGEM-4Z 的 EcoR 酶切位点上; pcDNA3.1 真核表达载体和 pBCMGSNeo 质粒由第四军医大学病理教研室王哲博士惠赠; 舌癌细胞株 Tca8113 来源于第四军医大学生物学教研室; cyclin A 多克隆抗体购自 DAKO 公司; G418 和 Lipofect AMINE™ 均购自 GIBCO 公司。

1.2 pAS-A 表达载体的构建³

根据真核表达载体 pcDNA3.1 上的多克隆位点和 cyclin A 的 cDNA 质粒酶切位点图谱, 选定 EcoR 做单酶切, 回收所需要的片段并纯化, 按照载体与插入片段为 1:3 的比例, 取适量去磷酸化的线性化载体 pcDNA3.1 和 cyclin A cDNA 全长片段, 加 T₄ DNA 连接酶于连接反应体系中, 15 连接过夜, 然后用 Nhe 酶切重组质粒根据所切出的片段大小, 判定 cyclin A 已成功反向插入真核表达载体中, 命名为 pAS-A。

1.3 基因转染和克隆筛选

采用脂质体载体 (LipofectAMINE™) 将 pAS-A 导入 Tca8113 细胞, 转染 72h 后, 改换含 G418 400 mg/L 的 RPMI1640 完全培养液, 37 5% CO₂ 条件下培养, 20 d 后绝大多数细胞死亡, 收集 G418 抗性的克隆细胞, 扩大培养并制备细胞爬片, 4% 多聚甲醛 (PFA)/PBS (pH 7.4) 中固定 30 min, 梯度酒精脱水, 晾干, -20 保存备用。同时用常规方法培养舌癌细胞 Tca8113 作为对照组。

1.4 Neo 基因探针的制备

用碱裂解法小量提取 pBCMGSNeo 质粒, 经 Xba 和 Hind 双酶切后得到 1.9 kb 和 12.6 kb 两条片段, Glassmilk 回收 1.9 kb 的片段, 即获得 Neo 基因。用随机引物法标记探针。

1.5 原位杂交

细胞爬片经 0.3% Triton X-100/PBS, 0.2 mol/L HCl 及蛋白酶 K 处理, 0.2% 甘氨酸终止反应, 4% PFA 后固定, 梯度酒精脱水干燥。

1.5.1 转染后细胞鉴定 分别滴加热变性后经地高辛标记的 Neo 探针于转染后细胞与对照组细胞上, 42 杂交过夜, 分别用 2 × SSC, 1 × SSC, 0.5 × SSC 充分漂洗, 2% 正常羊血清封闭, 滴加标记碱性磷酸酶抗地高辛抗体 (Anti-DIGAP, 1:200), 37 温育 2 h, buffer, buffer 充分漂洗后 NBT/BCIP 暗处显色 4~24 h, TE 终止反应, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。光镜下观察若有紫蓝色颗粒样杂交信号即表明反义 cyclin A 基因已成功转染入细胞中。

1.5.2 转染后细胞 cyclin A 基因表达 分别滴加热变性后经地高辛标记的 cyclin A 探针于转染后细胞与对照组细胞上, 42 杂交过夜, 分别用 2 × SSC, 1 × SSC, 0.5 × SSC 充分漂洗, 2% 正常羊血清封闭, 滴加标记 Anti-DIGAP, 37 温育 2 h, buffer, buffer 充分漂洗后 NBT/BCIP 暗处显色 4~24 h, TE 终止反应, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。光镜

下观察 cyclin A 基因阳性表达表现为细胞胞核内可见紫蓝色杂交信号。

1.6 免疫组化检测 cyclin A 蛋白表达

细胞爬片经 3% H₂O₂/PBS, 0.3% Triton X-100/PBS 处理后用正常羊血清封闭 30 min, 加 cyclin A 多抗 (1:500), 置于 4 过夜, 室温下复温 1 h 后滴加生物素化羊抗兔 IgG, 37 反应 30 min, ABC 复合物内 37 孵育 30 min, DAB 显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。光镜下观察阳性结果应为细胞胞核中分布有棕黄色颗粒。

2 结 果

2.1 基因转染细胞及其筛选情况

经 400 mg/L G418 选择 4 d 后, 培养细胞中开始出现大量死亡细胞 (图 1), 8 d 后存活细胞基本稳定, 为在转染细胞中稳定表达 Neo 基因, 在 100 mg/L G418 存在的环境中继续生长, 逐渐增殖形成克隆细胞 (图 2), 对照组舌癌细胞经 400 mg/L G418 选择培养 6 d 全部死亡, 初步鉴定 pAS-A 转染进入舌癌细胞系中。

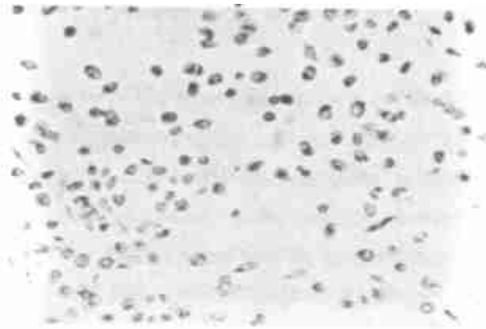


图 1 400 mg/L G418 选择培养 3 d 后大量细胞核固缩悬浮死亡 倒置显微镜 ×100

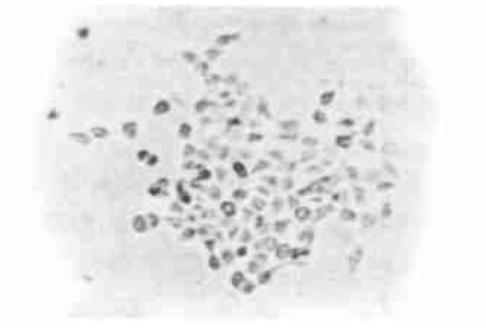


图 2 100 mg/L G418 继续培养 15 d 后转染 pAS-A 基因的细胞形成克隆 倒置显微镜 ×100

2.2 转染后细胞鉴定

在转染细胞中有紫蓝色颗粒样阳性杂交信号 (图 3), 对照组舌癌细胞为阴性, 确切鉴定 pAS-A 已成功导入舌癌细胞, 将其命名为 Tca/AS-cyclin A。

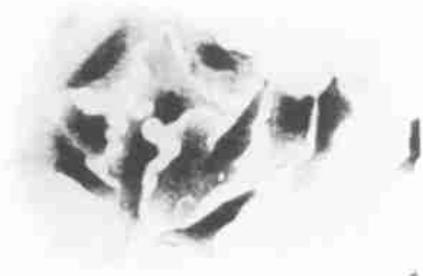


图 3 转染细胞中 Neo 探针表达阳性 ISH ×200

2.3 cyclin A 基因表达

Tca/AS-cyclin A 细胞和对照组 Tca8113 细胞的胞核及核仁内虽然均可见紫蓝色阳性杂交信号,但 Tca/AS-cyclin A 细胞中阳性颗粒明显少于 Tca8113 细胞,证明 Tca/AS-cyclin A 细胞中 cyclin A mRNA 表达明显下降(图 4、5)。

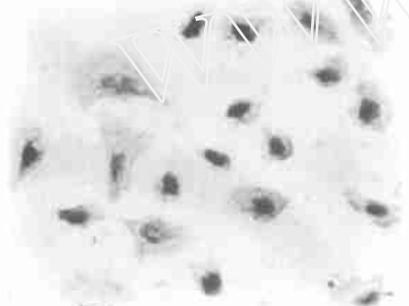


图 4 对照组 Tca8113 细胞核内 cyclin A mRNA 表达 ISH ×200

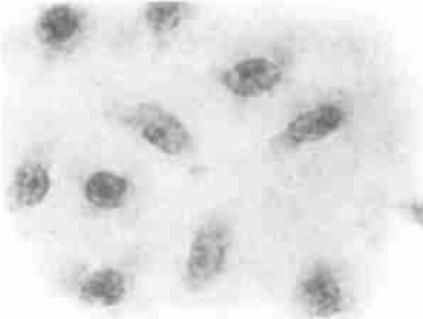


图 5 转染细胞核内 cyclin A mRNA 表达降低 ISH ×200

2.4 cyclin A 蛋白表达

对照组 Tca8113 细胞胞核中有棕黄色颗粒分布,但核仁不着色,Tca/AS-cyclin A 细胞中阳性信号较少,证明 Tca/AS-cyclin A 细胞中 cyclin A 蛋白降低表达(图 6、7)。

3 讨 论

迄今为止,许多的研究表明,肿瘤的发生与细胞周期的调控异常密切相关,细胞周期信号通道的失控是癌变发生的重要因素,因此,有关细胞周期

的研究日趋成为热点,目前一些 cyclins 已被证实为原癌基因,它们的过度表达和错误调控可引起细胞由正常向恶性的转化。其中 cyclin A 在 G1-S 期转化中起着非常重要的作用,是 S 期的特征性细胞周期蛋白,人的 cyclin A cDNA 全长约 1.77kb,由 432 个氨基酸组成,其中 210~295 位氨基酸为保守序列,称为“cyclin box”,靠近 N 端 47~55 位氨基酸序列称为“destruction box”,在 M 期通过“ubiquitin(泛素)”途径降解⁴。国外文献报道 cyclin A 在多数肿瘤中有高表达,如肝癌⁵,肺癌⁶等。

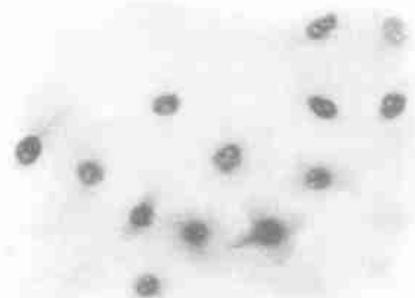


图 6 对照组 Tca8113 细胞核内 cyclin A 蛋白表达 IHC ×200

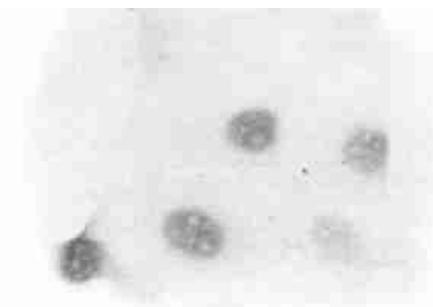


图 7 转染细胞核内 cyclin A 蛋白表达降低 IHC ×200

核酸转染是将目的基因通过生物化学或生物物理学方法介导进入真核细胞的过程。本实验采用阳离子脂质体介导 DNA 转染的方法。因为大部分转染方法均存在着一些弊端,如细胞毒性、重复性差、使用不方便、效率不高等,而阳离子脂质体介导的转染则不同,它容易得到重复性结果,并能使大多数真核细胞获得暂时性高表达,且所需 DNA 量较少⁷。

随着反义技术的出现为肿瘤的基因治疗开辟新途径,反义技术将特异性的抑制相应癌基因的过度表达来抑制肿瘤细胞的增殖,通过利用反义核酸在转录和翻译水平阻断某些异常基因(通常是癌基

(下转第 293 页)

功能需要协同作用。本实验的组织学观察证明,在弱激光照射侧,破骨活动与成骨活动均活跃于对照侧。对破骨细胞的析因分析显示,照射侧破骨细胞中数目大于对照侧 ($P < 0.05$),与对照侧相比,照射侧各组破骨细胞数目变化以 3、5、7 d 有统计学意义 ($P < 0.05$)。从时间因素分析,照射侧破骨细胞的活动均早于对照侧。对牙齿移动距离的测量进一步表明,经弱激光照射侧兔上颌第一磨牙近中移动的速度快于对照侧。实验的结果证实弱激光的局部照射促进了正畸的骨改建。分析其机制认为,首先弱激光的照射促进了正畸牙周组织的血管化作用,其次促进了牙周组织中细胞的活化与增殖。牙周组织中细胞的活化与增殖涉及到激素、炎症因子、细胞因子、生长因子等一系列复杂的调节过程,有待于进一步的研究探讨。

本实验应用的 He-Ne 和 CO₂ 激光都属于红外光谱,但二者在波长、功率密度上差别较大。He-Ne 激光器出现最早,使用也较普遍,CO₂ 激光器在理疗方面也有很多的应用。但这两种弱激光照射有促进慢性皮肤溃疡愈合,新生上皮覆盖,无瘢痕形成的效果,而且都有加速骨折愈合的作用⁵。由于 CO₂ 激光有良好的热效应,He-Ne 激光则穿透力强,生物刺激作用良好,二者的结合应用在吉林大学口

腔医院激光室对各种炎症、创伤的治疗中均收到满意的疗效。为此,本实验选择了 He-Ne 和 CO₂ 激光的共同照射的方法。

从 60 年代弱激光器诞生以来,弱激光在医学临床上的应用取得了满意的效果。但其治疗作用的机理至今仍在探索之中。弱激光局部照射的方法若能应用于正畸临床,将有着使用方便,易于为患者接受,无副作用,效果好的特点和便于临床上推广的应用前景。

参考文献

- 1 Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, et al. Electric current, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*, 1980, 77(1): 14 ~ 47
- 2 陈文静,张世学,隋采莓. 超声波对兔牙移动影响的透射电镜观察. *中华口腔医学杂志*, 1993, 28(2): 103 ~ 105
- 3 张建国,周播江,李华滢. 氦氛激光对兔胫骨骨折愈合微血管重建的影响. *中华理疗杂志*, 1998, 219(1): 11 ~ 13
- 4 Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, et al. Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg*, 1981, 116(2): 293 ~ 296
- 5 赵福运. *实用激光治疗学*. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1997: 260

(2000-06-14 收稿, 2001-04-23 修回)

(本文编辑 王 晴)

(上接第 289 页)

因)的表达,使反义 RNA 与相应的 mRNA 形成双链,阻断 mRNA 的翻译,以期达到阻断肿瘤细胞内的异常信号转导,使癌细胞降低增殖或进入正常分化轨道。许多学者通过用反义基因抑制癌基因表达或自分泌生长因子的分泌或封闭其受体来研究对肿瘤生物学特性的影响,已取得实验成果。本实验采用阳离子脂质体介导的转染方法将通过反义技术构建的反义 cyclin A 转染入人舌癌细胞,并使其在舌癌细胞中稳定有效的表达,经过检测同时发现转染前后的细胞间有明显差异,转染前细胞内 cyclin A mRNA 和 cyclin A 蛋白均较转染后的细胞高表达,说明舌癌细胞中转染入反义 cyclin A 后有一定的抑癌作用,为以后进一步研究反义 cyclin A 与肿瘤的关系奠定一定的基础。

参考文献

- 1 Min I, Stubbs MC, Strachan GD, et al. Cyclin A levels, the duration of S phase and sensitivity to a chemotherapeutic agent are altered in fibroblasts cultured on a fibronectin matrix. *Int J*

Oncol, 1998, 13(3): 549 ~ 555

- 2 Desdubets C, Sobczak Thepot J, Murphy M, et al. Cyclin A: function and expression during cell proliferation. *Prog Cell Cycle Res*, 1995, 1(1): 115 ~ 123
- 3 周 峻,杨连甲,陈 萍,等. 正反义人 cyclin A 基因真核细胞表达载体的构建与鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 1999, 15(3): 208 ~ 209
- 4 Noble ME, Endicott JA, Brown NR, et al. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(12): 482 ~ 487
- 5 Chao Y, Shih YL, Chiu JH, et al. Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1998, 58(5): 985 ~ 990
- 6 Shimizu E, Zhao M, Shinohara A, et al. Differential expressions of cyclin A and the retinoblastoma gene product in histological subtypes of lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123(10): 533 ~ 538
- 7 Abe A, Miyahara A, Friedmann T. Polybrene increases the efficiency of gene transfer by lipofection. *Gene Ther*, 1998, 5(5): 708 ~ 711

(1999-08-27 收稿, 2001-07-31 修回)

(本文编辑 王 晴)