

人 NHE1 反义基因转染对 SGC-7901 胃癌细胞增殖和凋亡的影响

滕小春^{1,2}, 刘海峰³, 房殿春¹, 杨仕明¹, 王国安¹, 陈刚¹, 何俊堂¹

Effect of Antisense Gene to Human NHE1 on the Proliferation and Apoptosis of SGC-7901 after Transfection

TENG Xiao-chun^{1,2}, LIU Hai-feng³, FANG Dian-chun¹, YANG Shi-Ming¹, WANG Guo-an¹, CHEN Gang¹, HE Jun-Tang¹

1. Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China; 2. Department of Gastroenterology, Chongqing Iron and Steel Company Hospital; 3. Department of Gastroenterology, Wu Jing Hospital

Abstract :Objective To study the effects of Antisense gene to human NHE1 on the proliferation and apoptosis of SGC-7901 after transefection and its potential role in the genetherapy for gastric cancer. **Methods** NHE1 antisense gene eukaryotic expression vector constructed was transfected into SGC-7901 with liposome DOTAP. We examined the changes of the proliferation index, the clone formation capacity in two layer soft agar, growth curve, apoptotic rates and nude mouse formation carcinoma capacity of the cells transfected antisense gene. **Results** Cells transfected NHE1 antisense gene compared with parent cells, Proliferation index decreased, the clone formation capacity in two layer soft agar play down, apoptotic rates increased, growth curve slowers. Format carcinoma capacity in nude mouse disappear. **Conclusion** Our study demonstrated that NHE1 antisense gene can restrain gastric carcinoma proliferation and induce carcinoma cell apoptosis which implied that may be a new target gene for antisense gene therapy of gastric cancer.

Key words: NHE1 gene; Antisense gene therapy; Gastric cancer; Apoptosis

摘要:目的 探讨人 NHE1 反义基因转染对 SGC-7901 胃癌细胞株增殖和凋亡的影响,探索胃癌治疗的新方法。方法 采用脂质体法将构建好的人 NHE1 基因反义真核表达载体转染至 SGC-7901 胃癌细胞中,比较观察细胞转染前后生长曲线、双层软琼脂克隆形成能力、裸鼠成瘤能力以及细胞周期和细胞凋亡率的变化。结果 NHE1 反义基因能使 SGC-7901 胃癌细胞生长速度减慢,双层软琼脂集落形成能力、体外生长增殖能力降低,细胞凋亡率增加,裸鼠体内成瘤能力显著降低。结论 反义 NHE1 基因能抑制 SGC-7901 胃癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,具有良好的胃癌治疗效果,提示 NHE1 基因可成为胃癌治疗的新靶点,具有一定的临床应用前景。

关键词: NHE1 基因;反义基因治疗;胃癌;凋亡

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)08-0496-03

0 引言

研究表明,糖酵解增强且占优势的肿瘤细胞主要通过胞膜 Na⁺-H⁺ 交换蛋白-1 (Na⁺-H⁺ exchanger 1, NHE1) 的过度表达将胞内过多的氢离子泵出细胞外,形成不同于正常组织的细胞内呈中性或偏碱性而细胞外呈酸性的逆向 pH 梯度的特殊微环境,以利其恶性生长^[1]。我们前期研究证明, NHE1 在胃癌中的表达显著高于正常胃黏膜及癌前病变^[2]。本文采用反义技术将构建好的 NHE1

基因反义真核表达质粒采用脂质体法将其转染至 SGC-7901 胃癌细胞中^[3],比较观察转染前后细胞增殖和细胞凋亡的变化,从而探索胃癌治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

DOTAP 脂质体为 Roche 公司产品;二甲基亚砜、MTT 为 sigma 公司产品; Zeocin PCR 引物根据文献由上海基康公司设计合成。1640 培养基、DMEM 培养基、小牛血清、胰酶、EDTA 购自华美生物公司;其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

收稿日期:2004-10-19;修回日期:2005-02-21

作者单位:1. 400038 重庆西南医院全军消化专科中心; 2. 重钢职工总医院消化科; 3. 武警总医院消化科



SGC-7901 胃癌细胞培养于含 10% 灭活的小牛血清、100 μ g/mL 链霉素、100U/mL 青霉素的 RPMI1640 培养基中,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度,每隔 2~3d 用 0.25% 胰酶、0.02% EDTA 消化,传代培养。

1.2.2 质粒转染

(1) 待细胞长至对数生长期,于转染前一天换液,转染前 2 小时换无血清培养基。(2) 脂质体转染复合物的制备: 2.5 μ g 质粒 DNA 溶于优化转化液中,终体积 25 μ L。15 μ L 脂质体溶于优化转化液中,终体积 35 μ L。二者混匀,室温下 10~15min。(3) 移去培养基,加入 2mL 无血清培养基。加入转染复合物,混匀,培养 3~6h。(4) 换有血清培养基,加 Zeocin,终浓度 100 μ g/mL。每 2~3 天换培养基,同时加 Zeocin 筛选,直到克隆形成。

1.2.3 外源基因是否整合的分析

采用 PCR 法扩增外源 ZeoR 基因,常规抽提 DNA,Zeo 基因引物根据文献由上海基康公司设计合成,反应条件:先 94 $^{\circ}$ C 5min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 秒,53 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 30 秒,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,1% 琼脂糖电泳,紫外灯下观察并拍照。

1.2.4 生长曲线(MTT 法)^[4]

按文献进行,并加以改良,(1) 收集基因转染后 48h 的细胞,然后以每孔 1 $\times 10^3$ 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔体积 200 μ L,将培养板置于 CO₂ 孵箱中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度下培养。每个样本设 3 个复孔。(2) 每天呈色一块板,共进行 6 天,每孔加入 MTT (5mg/mL) 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 继续培养 4h,移去上清,每孔加入 DMSO (二甲基亚砷) 150 μ L,振荡 10min,使结晶物充分溶解。(3) 选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,然后以时间为横坐标,光吸收值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞周期及细胞凋亡的测定

收集基因转染后 48h 的细胞,PBS 漂洗后,75% 冷乙醇固定 24h 后,采用流式细胞仪(用 EB 染液染色)检测细胞周期及细胞凋亡。增殖指数(proliferation index,PI)表示细胞的增殖活性,PI = (S + G₂M) / (G₀/G₁ + S + G₂M)。

1.2.6 双层软琼脂集落形成实验

(1) 无菌制备 DMEM 培养液(含 2 种抗生素和 20% 的血清),37 $^{\circ}$ C 保存备用。(2) 底层琼脂的制备:按 1:1 混合 1.2% 的琼脂糖和 DMEM 培养液,取 1mL 注入 24 孔培养板,使凝固,置 CO₂ 冰箱备用。(3) 常规消化基因转染后 48h 的细胞并计数,调整细胞密度为 1 $\times 10^4$ /mL,根据要求作梯度稀释。(4) 顶层琼脂的制备:按 1:1 混合 0.7% 的琼脂糖和细胞

悬液,使细胞密度为 1 $\times 10^3$ /mL,充分混匀后,取 1mL 注入 24 孔培养板,形成双层琼脂,待上层琼脂凝固后,置入培养箱中,培养 2~3 周。(5) 观察细胞集落,对镜下直径大于 75 μ m 或细胞数大于 50 个以上的克隆进行计数。

1.2.7 裸鼠体内致瘤性分析

收集基因转染后 48h 的细胞,并进行细胞计数。离心沉淀细胞。加入无血清培养基洗 1 次,离心并沉淀细胞。用无血清培养基重悬细胞,调整细胞密度为 4 $\times 10^7$ ~6 $\times 10^7$ /mL。裸鼠右下侧皮背下接种 0.1mL SGC-7901 细胞悬液,右上侧皮背下接种同种数量的转染反义基因细胞悬液,左下侧皮背下接种同种数量的转染空载体细胞悬液。观察裸鼠体内成瘤情况。

2 结果

2.1 克隆的筛选

每 2~3 天换培养基,同时加 Zeocin 筛选,2 周后可见克隆形成,刮取克隆进行扩大培养,并冻存。

2.2 转染正确性鉴定

采用 PCR 法扩增外源性 ZeoR 基因,Anti-7901 胃癌细胞(转染反义基因的 SGC-7901 细胞)和 Zeo-7901 胃癌细胞(转染空质粒的 SGC-7901 细胞)可各见一条特异性条带,大小为 357bp,与预期结果一致,而 SGC-7901 胃癌细胞未见特异性条带,说明反义重组质粒、空载体已成功转染至胃癌细胞内,见图 1。

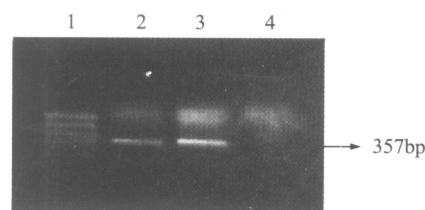


图 1 外源性 ZeoR 基因 PCR 扩增结果

1. PCR marker; 2. Zeo-7901; 3. Anti-7901; 4. SGC-7901

2.3 生长曲线

由生长曲线可以看出,Anti-7901 与 Zeo-7901、SGC-7901 细胞相比,Anti-7901 在增殖速度上明显减慢,而且在倒置显微镜下有明显的接触抑制现象,细胞失去重叠生长的能力,且易发生脱落,而 SGC-7901 细胞则重叠生长显著。Anti-7901 与 Zeo-7901、SGC-7901 细胞的吸光值相比,具有显著性差异($P < 0.01$),见图 2。

2.4 细胞周期和细胞凋亡

Anti-7901 细胞凋亡率为 26.1%,较 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 细胞凋亡率明显增高(分别为 5.12%、4.48%, $P < 0.01$)。Anti-7901 细胞增殖指

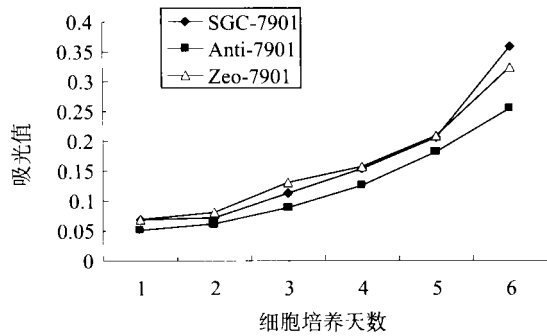


图 2 反义基因转染对 SGC-7901 胃癌细胞生长曲线的影响

数为 40.43%，较 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 增殖指数轻度降低（分别为 45.48%、44.86%）。Anti-7901 细胞 G₀/G₁ 期细胞较 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 轻度增加，S 和 G₂/M 期细胞轻度减少。说明反义 NHE1 基因可通过诱导细胞凋亡来抑制胃癌细胞的生长。各细胞周期分布、增殖指数和细胞凋亡率，见表 1。

表 1 SGC-7901、Zeo-7901 和 Anti-7901 细胞的细胞周期分布、增殖指数和细胞凋亡率

细胞组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	增殖指数	凋亡率
Anti-7901	59.57 %	33.99 %	40.44 %	40.43 %	26.1 %
Zeo-7901	54.52 %	36.85 %	8.63 %	45.48 %	5.12 %
SGC-7901	55.13 %	37.44 %	7.42 %	44.86 %	4.48 %

2.5 软琼脂克隆形成率

软琼脂中培养，2 周后可见 SGC-7901、Zeo-7901 细胞成簇生长，且集落大，数目增多，形成率分别为 41% 和 38%，而反义细胞在软琼脂中可见散在的细胞，形成集落少，形成率显著降低（8%， $P < 0.01$ ），说明 NHE1 反义基因转染后，SGC-7901 细胞不依赖于锚着能力丧失，细胞恶性程度降低。

2.6 裸鼠体内致瘤性分析

在接种约 $4 \sim 6 \times 10^6$ 个细胞/只裸鼠的情况下，6 周后接种 SGC-7901 胃癌细胞的裸鼠右下和左下侧皮下长出肿瘤，成瘤率为 100%，而接种反义细胞裸鼠右上侧皮下未长出肿瘤，成瘤率为 0%。

3 讨论

胞膜离子交换蛋白 Na⁺-H⁺ 交换泵-1 是存在于所有真核细胞的跨膜蛋白，其主要作用是进行 Na⁺-H⁺ 交换，将大部分 H⁺ 泵出细胞外，保持细胞内 pH 值的稳定。研究证实，pHi 下降参与调控细胞凋亡的形成，pHi 升高抑制凋亡的发生。酸性 pHi 对促发肿瘤细胞凋亡发挥重要作用，酸中毒对肿瘤细胞的生长产生直接抑制作用，并导致肿瘤细胞凋亡。胃黏膜癌变过程中不仅存在细胞过度增

殖，而且存在细胞凋亡的异常，细胞凋亡与细胞增殖平衡失调在胃癌发生中可能具有重要意义^[5,6]。对细胞凋亡的研究启迪人们，肿瘤的治疗可以通过诱导肿瘤细胞凋亡，而不单是抑制肿瘤的增殖来实现。我们前期研究证明，NHE1 蛋白在胃癌组织中的表达程度显著高于正常胃黏膜及胃癌前病变^[2]，提示 NHE1 可成为肿瘤治疗的靶点。由于 Na⁺-H⁺ 交换是癌细胞的主要排 H⁺ 机制，因此 NHE1 基因产物对酸性 pHi 诱发的细胞凋亡无疑具有重要的调控作用。曾有学者以氨基吡啶的同系物抑制 NHE-1 蛋白活性来研究细胞凋亡，确也能证明诱发凋亡，但这些化合物也抑制 DNA、蛋白和 ATP 的合成。因此，其作用特异性尚需进一步阐明。反义技术具有特异抑制专一靶基因的优点，是在体外细胞培养中研究某一基因功能的良好手段。

本实验采用反义基因来封闭 NHE1 基因，抑制了 NHE1 基因的表达，间接抑制 Na⁺-H⁺ 交换，导致细胞内酸化，而细胞内酸化又可激活酸性核酶（DNase），将基因组 DNA 在核小体间降解，终致细胞凋亡。研究结果表明，抑制 NHE1 基因的表达能诱导肿瘤细胞凋亡，从而为在酸性 pHi 诱发的胃癌细胞凋亡中，NHE1 基因所起的间接调控作用提供了重要证据。因此，人胃癌细胞 NHE1 基因超表达是阻止胞内酸化，以维持其抗凋亡生长特性的重要机制，NHE1 基因的表达可能在肿瘤细胞增殖凋亡的调控中起着重要作用，这一理论观点将为胃癌防治研究提供新的依据和方向。

参考文献：

- [1] Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, et al. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging[J]. J Biol Chem, 2002, 277(49): 47399-47406.
- [2] 滕小春, 刘海峰, 刘永生, 等. NHE1 蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(5): 402-404.
- [3] 滕小春, 刘海峰, 陈刚, 等. 人 NHE-1 基因反义真核表达载体的构建及初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(2): 112-114.
- [4] 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 等. 人端粒酶蛋白催化亚单位反义基因转染对胃癌细胞恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 934-937.
- [5] 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 等. 胃癌变中细胞凋亡及其与 bcl-2 蛋白表达关系的研究[J]. 中华消化内镜杂志, 2000, 17(1): 41-42.
- [6] Wu KL, Khan S, Lakhe RS, et al. Renal tubular epithelial cell apoptosis is associated with caspase cleavage of the NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(4): 829-839.

[编辑:周永红]