

NHE1 基因调控细胞内酸碱平衡对 SGC-7901 胃癌细胞增殖和凋亡的影响

滕小春, 刘海峰¹, 房殿春¹, 杨仕明¹, 陈刚¹, 王国安¹, 何俊堂¹

关键词: NHE1 基因; 真核表达载体; 胃癌; 反义技术

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2005)04-0255-01

0 引言

Na⁺ - H⁺ 交换泵第一亚型 (Na⁺ - H⁺ exchanger 1, NHE1) 是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白, 是调节细胞内 pH 值 (intracellular pH, pHi), 中性或偏碱性的重要膜蛋白^[1,2]。近来发现 NHE1 基因在肿瘤细胞中的活性明显增高, 与肿瘤细胞的生长有着密切的关系^[3]。为了解 NHE1 基因在胃癌细胞中的作用, 我们利用基因转染技术, 构建 NHE1 反义真核表达载体, 将 NHE1 反义基因转染入 SGC-7901 胃癌细胞, 观察 NHE1 反义基因对 SGC-7901 胃癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

pcDNA3.1-Zeo 哺乳动物真核表达载体、转染细胞筛选所用抗生素 Zeocin 为 invitrogen 公司产品。限制性内切酶 EcoR、Hind 购自 TakaRa 生物公司。转染用脂质体 DOTAP 为 Roche 公司产品。Zeocin 引物根据文献由上海基康公司设计合成。

1.2 方法

采用亚克隆重组技术进行基因重组, 脂质体法进行基因转染, PCR 法用于外源基因整合的鉴定。SGC-7901 胃癌细胞在 10% 小牛血清 1640 培养基中, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养。采用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡, MTT 法绘制生长曲线。观察软琼脂

克隆集落形成能力, 对镜下直径大于 75 μm 或细胞数大于 50 个以上的克隆进行计数。观察裸鼠体内成瘤情况。

2 结果

重组质粒经酶切鉴定重组成功后, 采用脂质体法将其转染至 SGC-7901 胃癌细胞中, Zeocin 筛选出稳定的克隆后, 将 NHE1 反义基因转染的 SGC-7901 细胞命名为 Anti-7901 细胞, 空载体 pcDNA3.1 (-)/Zeo 转染的 SGC-7901 细胞命名为 Zeo-7901 细胞。Anti-7901 细胞和 Zeo-7901 细胞 PCR 法扩增可各见一条特异性条带, 大小为 357bp, 与预期结果一致, 而对照组 SGC-7901 胃癌细胞未见特异性条带, 说明反义重组质粒及空载体已成功转染。流式细胞仪 (用 EB 染液染色) 检测显示, Anti-7901 细胞凋亡率为 26.1%, 显著高于 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 细胞 (5.12%, 4.48%, $P < 0.01$)。Anti-7901 细胞增殖指数为 40.43%, 低于 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 细胞 (45.48%, 44.86%, $P < 0.01$)。生长曲线显示, Anti-7901 细胞较 Zeo-7901 细胞及 SGC-7901 细胞在增殖速度上明显减慢。软琼脂中培养, 2 周左右可见 SGC-7901 细胞和 Zeo-7901 细胞形成集落大, 数目多, 形成率分别为 (38.6 ± 4.63)%、(40.0 ± 4.53)%、而 Anti-7901 细胞在软琼脂中仅见散在的细胞, 集落少, 形成率为 (9 ± 3.54)%。显著少于 SGC-7901 细胞和 Zeo-7901 细胞

($P < 0.01$)。6 周后接种 SGC-7901 细胞的裸鼠右下侧皮下长出肿瘤, 成瘤率为 100%, 而接种 Anti-7901 细胞的裸鼠右上侧皮下未长出肿瘤, 成瘤率为 0%。

3 讨论

由于肿瘤细胞糖酵解优势, 导致肿瘤细胞内产生大量的乳酸和 H⁺, 但用核磁共振波谱等技术证明肿瘤细胞内 pH 值却为中性或偏碱性, 这种 pH 值的形成主要是由于细胞膜 NHE1 mRNA 表达增加, 从而使肿瘤细胞进行强大的 Na⁺ - H⁺ 交换, 将大部分 H⁺ 泵出细胞外, 保持肿瘤细胞内 pH 值为中性或偏碱性, 由于 Na⁺ - H⁺ 交换依赖于 Na⁺ - K⁺-ATP 酶供能, 这一耗能过程又反馈地刺激癌细胞对糖的摄取和对糖酵解的依赖, 胞内 H⁺ 不断增多, 进一步加强 Na⁺ - H⁺ 交换, 从而使肿瘤细胞免遭凋亡^[4]。我们通过转染 NHE1 反义基因成功抑制了 SGC-7901 胃癌细胞的 NHE1 基因表达, 阻断了 Na⁺ - H⁺ 交换, 破坏了胃癌细胞的能量代谢模式, 使癌细胞增殖受抑, 凋亡率增加, 细胞恶性程度降低, 达到了有效治疗胃癌的目的, 为胃癌基因治疗提供了新的思路。

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] Putney L K, Denker SP, Barber DL, et al. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: Structure, regulation, and cellular actions[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002, 42: 527.
- [3] 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.
- [4] 滕小春, 刘海峰. Na⁺ - H⁺ 交换蛋白与肿瘤[J]. 重庆医学, 2004, 26(4): 623-625.

[编辑: 刘红武; 校对: 杨 卉]

收稿日期: 2004-06-07; 修回日期: 2004-10-08

作者单位: 1. 400038 重庆, 第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心; 2. 重庆钢铁公司职工总医院消化科