

稳定过表达 smac 基因胃癌细胞株的建立及其化疗敏感性研究

郑丽端¹, 童强松², 陶凯雄², 汪良², 张波²

Establishment of Gastric Cancer Cell Line Stable Over-expressing smac Gene and Its Chemotherapeutic Sensitivity

ZHENGLi-juan¹, TONG Qiang-song², TAO Kai-xiong², WANG Liang², ZHANG Bo²

1. Department of Pathology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Surgery

Abstract: **Objective** To explore the effects on chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer cell line by stable over-expression of smac gene. **Methods** Under the induction of liposome, the eukaryotic expression vector pcDNA3.1-smac for smac gene and its control vector pcDNA3.1 were transfected into gastric cancer cell line MKN-45. The subclone cell lines were obtained by persistent G₄₁₈ selection. smac gene expression of cancer cells were detected by RT-PCR and Western Blot methods. The growth inhibition effects of mitomycin (MMC) on cancer cells were also observed by tetrazolium bromide colorimetry and clone formation test. **Results** The subclone gastric cancer cell lines, stable expressing smac and neo gene respectively, were successfully selected, named as MKN-45/smac and MKN-45/neo. RT-PCR and Western Blot results demonstrated smac mRNA and protein levels of MKN-45/smac cells were significantly higher than those of MKN-45 and MKN-45/neo ($P < 0.01$). After being treated with 10 μg/ml MMC for 24h, the growth inhibition rates of MKN-45 and MKN-45/neo were 27.85%, 28.12% respectively, with that of MKN-45/smac cells being 43.71% ($P < 0.01$). When compared with MKN-45 and MKN-45/neo cells, the clone formation abilities of MKN-45/smac were reduced by 14.07% ($P < 0.01$), 15.13% ($P < 0.01$) respectively. **Conclusion** Stable transfection of smac gene and its over-expression in gastric cancer cell line could significantly improve their chemotherapeutic sensitivities to MMC, which established an experimental basis for ameliorating chemotherapy of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; smac gene; Gene expression; Apoptosis

摘要: **目的** 探讨 smac 基因过表达对胃癌细胞株化疗敏感性的影响。 **方法** 采用脂质体将 smac 基因真核表达载体 pcDNA3.1-smac 及空白载体 pcDNA3.1 转染入胃癌细胞株 MKN-45, G₄₁₈ 筛选获得抗性亚克隆细胞株, RT-PCR 和 Western Blot 检测癌细胞 smac 基因表达, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法、克隆形成实验检测丝裂霉素 (MMC) 对癌细胞的生长抑制效率。 **结果** 建立分别稳定表达 smac 基因、新霉素抗性基因 (neo) 的胃癌亚克隆细胞株 MKN-45/smac、MKN-45/neo。 RT-PCR 和 Western Blot 证实 MKN-45/smac 细胞的 smac mRNA 及蛋白表达水平均显著高于 MKN-45、MKN-45/neo ($P < 0.01$)。 10 μg/ml MMC 作用 24h 后, MKN-45、MKN-45/neo 细胞生长抑制率分别为 27.85%、28.12%, 而 MKN-45/smac 则高达 43.71% ($P < 0.01$); 同 MKN-45、MKN-45/neo 细胞株比较, MKN-45/smac 的克隆形成能力分别降低了 14.07% ($P < 0.01$)、15.13% ($P < 0.01$)。 **结论** 稳定转染 smac 基因使其在胃癌细胞株中过表达, 能显著提高癌细胞对 MMC 的敏感性, 为改善胃癌化疗效果奠定了实验基础。

关键词: 胃癌; smac 基因; 基因表达; 细胞凋亡

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)01-0018-04

0 引言

2000 年新发现的 smac (second mitochondria-derived activator of caspases) 基因是线粒体释放的一个重要凋亡调节子^[1]。本研究将 smac cDNA 稳

定转入胃癌细胞使其过表达, 建立了 smac 高表达胃癌细胞系, 并以丝裂霉素作为凋亡诱导因素, 观察了胃癌细胞生长活性的改变, 旨在为胃癌化疗效果的改善奠定实验基础。

收稿日期: 2004-03-16; 修回日期: 2004-07-28

作者单位: 1. 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院病理科, 2. 外科

1 材料与方法

1.1 基因、主要试剂及细胞培养

人类 smac 基因全长 cDNA (719 bp) 的真核表达载体 pcDNA 3.1-smac 由王晓东教授 (美国德克萨斯大学西南医学院 Howard Hughes 研究所生化系) 惠赠, 空白载体 pcDNA 3.1 由本院中心实验室常规保存; smac 多克隆抗体由 Emma M. Creagh 教授 (爱尔兰 Trinity 大学 Smurfit 研究所遗传系分子细胞生物学实验室) 惠赠; 脂质体 GeneSHU TTE-40 (G40) 购自 Q-bio 基因有限公司; 丝裂霉素 (MMC) 为日本协和发酵工业株式会社产品, 配成 1 mg/ml 储存液, 4℃ 避光保存。人胃癌细胞株 MKN-45 由本院病毒室董继华教授惠赠, RPMI 1640 常规培养。

1.2 质粒的制备和鉴定

pcDNA 3.1-smac 经转化大肠杆菌 DH₅ 感受态细胞, 挑取单菌落, 质粒小提。根据 smac 基因和载体 pcDNA 3.1 的物理图谱, 选取 Bam HI 和 Xho I 位点双酶切鉴定, 并进行核酸序列分析 (TaKaRa 公司)。

1.3 基因转染和亚克隆细胞株的筛选

取对数生长期的 MKN-45 细胞接种于 24 孔板, 设置未转染组对照组、空载体 pcDNA 3.1 转染组、pcDNA 3.1-smac 转染组。转染步骤参照 G40 说明书进行, 72h 后加入 G₄₁₈ 筛选并维持 4 周。将稳定表达 smac 基因、新霉素抗性基因 (neo) 的亚克隆细胞株分别命名为 MKN-45/sm ac、MKN-45/neo。在倒置显微镜下观察并比较 MKN-45 及其亚克隆细胞株细胞的形态, 行相差摄影。

1.4 稳定表达 smac 亚克隆细胞株的鉴定

运用 RT-PCR 及 Western Blot 法分别检测亚克隆细胞株内 smac mRNA 及蛋白水平, 参照《分子克隆实验指南》^[2] 进行。smac 基因 RT-PCR 引物序列如下: 上游引物 5'-CTGTGACGATTG-GCTTTG-3', 下游引物 5'-GTGATTCCTGGC-GTTAT-3'; 以 α -tubulin (310 bp) 为内参照。MGIAS-1000 凝胶成像系统扫描定量并拍照。

1.5 癌细胞化疗敏感性检测

采用 MTT 法。将 MKN-45、MKN-45/neo、MKN-45/sm ac 三种细胞株以 3×10^3 / 100 μ l 的密度接种于 96 孔板, 每种细胞株均设置未加药对照组及 0.1、1、10 μ g/ml MMC 实验组, 每组 5 个复孔。加药后常规条件下培养 24 h, 每孔加入 MTT 20 μ l, 继续培养 4 h, 弃上清, 加入 DMSO, 充分溶解后检测各孔吸光度值 (A_{490} 值); 癌细胞生长抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 A 值 / 空白对照组平均 A 值) \times 100 %。

1.6 癌细胞克隆形成实验

将上述三种细胞以 300 个细胞/平皿的密度接种于 35 mm² 培养皿, 待细胞贴壁后, 分别加入 0.1、1、10 μ g/ml MMC, 并设置未加药空白对照组, 6h 后换普通培养基, 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 14 天, 甲醇固定 10 min, 0.2% 结晶紫染色 20 min, 倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆。克隆形成率 = (克隆形成数 / 接种细胞数) \times 100 %。

1.7 统计学分析

采用 *t* 检验及方差分析, 运用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 真核表达载体的鉴定

pcDNA 3.1-smac 经 Bam HI、Xho I 双酶切后, 可见 5.4 kb 的载体片段和 719 bp 的 smac cDNA 片段, 见图 1。核酸序列分析进一步证实全长 smac cDNA 插入在真核表达载体 pcDNA3.1 的 Bam HI、Xho I 位点间。

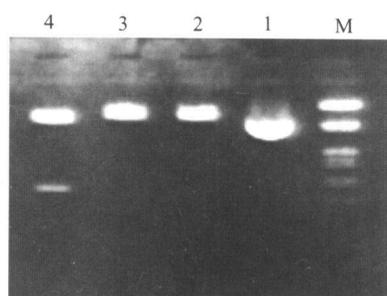


图 1 真核表达载体 pcDNA 3.1-smac 酶切鉴定分析

M: DNA/ Hind III + EcoR I; 1: pcDNA3.1-smac; 2: pcDNA3.1-smac/Bam HI; 3: pcDNA3.1-smac/Xho I; 4: pcDNA3.1-smac/Bam HI + Xho I

2.2 稳定转染 smac 基因胃癌细胞株的建立及其细胞形态

G₄₁₈ (600 μ g/ml) 筛选 1 周后, 对照组 MKN-45 细胞完全死亡。pcDNA 3.1、pcDNA3.1-smac 转染组经 G₄₁₈ 持续筛选 4 周, 分别获得稳定表达 neo 基因、smac 基因的胃癌亚克隆细胞株 MKN-45/neo、MKN-45/sm ac。转导后的 MKN-45/neo、MKN-45/sm ac 细胞生长旺盛, 形态规则, 以梭形、多边形居多, 与 MKN-45 细胞无明显差异。

2.3 稳定转染 smac 基因亚克隆细胞株的鉴定

见图 2, 三种细胞株经 RT-PCR 检测均可见 425 bp 的 smac 扩增条带, 其中 MKN-45、MKN-45/neo 细胞仅有微弱的显影, 二者条带灰度值之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 MKN-45/sm ac 以同量的 RNA 模板扩增后可见明亮的扩增条带, 其灰度值分别为前二者的 3.8 倍 ($P < 0.01$)、3.7 倍 ($P <$

0.01)。上述细胞株经 Western Blot 检测均可见 27 KD 的蛋白条带。MKN-45/ smac 细胞株的 smac 蛋白条带灰度值为 MKN-45、MKN-45/ neo 细胞的 4.1 倍 ($P < 0.01$)、4.2 倍 ($P < 0.01$) ;而后二者条带灰度值之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

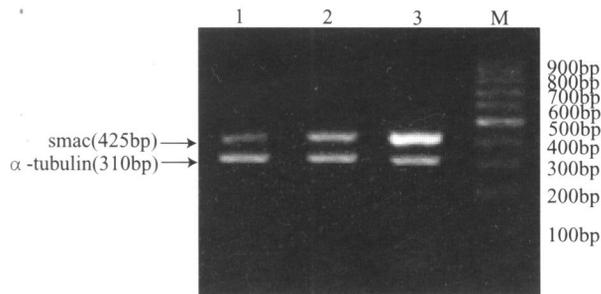


图 2 RT-PCR 法检测各细胞株 smac mRNA 表达

M: PCR marker 1: MKN-45; 2: MKN-45/ neo; 3: MKN-45/ smac

2.4 癌细胞化疗敏感性检测

经 0.1、1、10 $\mu\text{g/ml}$ MMC 作用后, MKN-45、MKN-45/ neo、MKN-45/ smac 细胞生长均不同程度地减慢, 并呈时间和浓度依赖性。10 $\mu\text{g/ml}$ MMC 作用 24h 后, MKN-45 细胞生长抑制率为 27.85%, 而 MKN-45/ smac 的抑制率达到 43.71%, 二者之间比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。各浓度 MMC 对 MKN-45、MKN-45/ neo 细胞生长抑制率间的差异无显著性 ($P > 0.05$) ,见图 3。

2.5 癌细胞克隆形成率检测

上述 3 种细胞株空白对照组体外生长活跃, 克隆形成率间差异无显著性意义 ($P < 0.05$)。经 0.1、

1 及 10 $\mu\text{g/ml}$ MMC 处理 6h 后, 三种细胞株的克隆形成率均有所降低, 呈浓度依赖性。其中, MKN-45/ smac 克隆形成抑制率最高, 与 MKN-45、MKN-45/ neo 克隆形成抑制率比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$) ,见图 4、表 1。

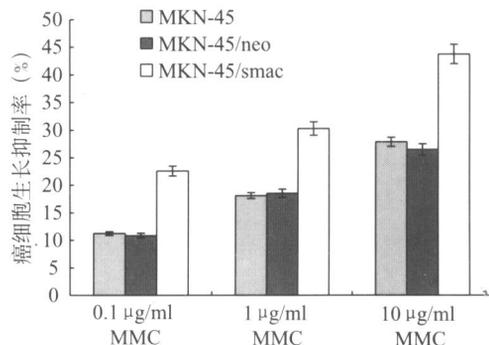


图 3 不同浓度 MMC 对各胃癌细胞株生长的抑制作用

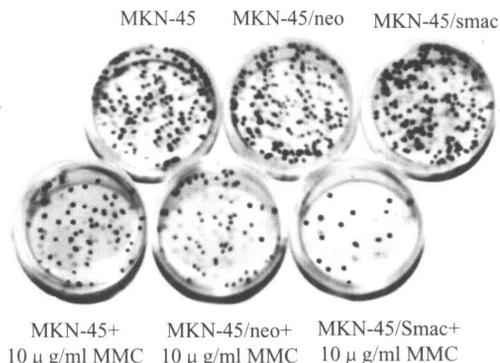


图 4 10 $\mu\text{g/ml}$ MMC 对各胃癌细胞株克隆形成的影响

表 1 不同浓度 MMC 对各胃癌细胞株克隆形成率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

细胞株	空白对照组	0.1 $\mu\text{g/ml}$ MMC	1 $\mu\text{g/ml}$ MMC	10 $\mu\text{g/ml}$ MMC
MKN-45	89.42% \pm 12.14%	77.26% \pm 13.15%	68.65% \pm 11.32%	60.19% \pm 8.24%
MKN-45/ neo	88.56% \pm 10.56%	78.03% \pm 11.24%	69.22% \pm 10.32%	61.25% \pm 9.24%
MKN-45/ smac	87.92% \pm 13.25%	69.83% \pm 10.45%	57.12% \pm 8.12%	46.12% \pm 7.52%

3 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一。利用基因转导技术促进肿瘤细胞凋亡, 成为目前胃癌治疗研究的热点。

线粒体被视为细胞死亡调控的关键元件。当线粒体膜间隙蛋白释放入胞浆后, 激活分解反应, 最终出现生物大分子的降解和凋亡细胞形态学改变^[3]。smac 是 2000 年由 Du 等^[1] 率先报道的一种与细胞色素 C(cyt-c) 同时从线粒体内释放到细胞质中的膜间隙蛋白。研究表明, cyt-c 可通过促使 Apaf-1 的多聚化来激活天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 (cysteiny l aspartate specific protease, caspase), 而 smac 则可消除多种凋亡抑制蛋白 (inhibitors of ap-

optosis protein, IAPs) 的抗凋亡作用。细胞凋亡的一大特征就是 caspases 的活化, 已证明 smac 可以通过消除 IAPs 对 caspase-3 活化的阻滞作用, 包括诱导前 caspase-3 的活化和增强成熟 caspase-3 的酶催化活性两种途径来促进凋亡^[4]。因此, smac 成为哺乳动物细胞凋亡的主要调节子。

本研究采用脂质体介导的方法, 将真核表达载体 pcDNA3.1-smac 转染入胃癌细胞后, 通过 G_{418} 筛选, 成功建立了稳定高表达 smac 基因的亚克隆株 MKN-45/ smac。应用 RT-PCR 和 Western Blot 方法, 鉴定了 MKN-45/ smac 细胞株存在 smac 基因的高度表达, 同时发现人胃癌细胞系 MKN-45 中有极其微量的 smac 表达。而 Yoo 等^[5] 采用免疫组化方

法检测了包括结肠癌、肺癌、横纹肌肉瘤等在内的多种肿瘤组织 smac 基因的表达,发现许多肿瘤 smac 表达缺失,可能与肿瘤细胞凋亡活性抑制有关。

根据文献[6],本研究选用了胃癌体外敏感和临床有效的化疗药丝裂霉素(MMC)作为凋亡诱导因子,通过 MTT 法和克隆形成实验观察到:与 MKN-45、MKN-45/neo 细胞比较,MKN-45/smac 对同样浓度的 MMC 更敏感,即稳定转染 smac 后,能增强化疗药物 MMC 对胃癌细胞的诱导凋亡作用。Fulda 等报道转染 smac 基因能增强化疗药物的诱导凋亡作用,通过建立颅内恶性胶质瘤模型,他们进一步发现 smac 能显著增强 Apo-2L/ TRAIL 的体内抗肿瘤作用^[7]。这一结果与本研究结果相似。因此,我们认为建立 smac 基因高表达胃癌细胞系 MKN-45/smac 的意义不仅在于发现 smac 能增强了化疗药物 MMC 诱导胃癌细胞凋亡效应,为提高胃癌患者化疗敏感性、降低毒副作用提供了新的思路,而且还为进一步研究 smac 基因在胃癌细胞体内外生长活性、胃癌凋亡调控中的作用奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Du C, Fang M, Li Y, et al. smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by elimination IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.
- [2] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Third ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 254-325.
- [3] Petit PX, Zamzami N, Vayssiere JL, et al. Castedo M. Implication of mitochondria in apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 1997, 174 (1-2): 185-188.
- [4] Jia L, Patwari Y, Kelsey SM, et al. Role of smac in human leukemic cell apoptosis and proliferation[J]. Oncogene, 2003, 22 (11): 1589-1599.
- [5] Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, et al. Immunohistochemical analysis of smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas[J]. APMIS, 2003, 111(3): 382-388.
- [6] 辛华雯, 吴笑春, 李馨, 等. 胃癌体外化疗药物敏感性及其临床疗效研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2002, 7(2): 147-149.
- [7] Fulda S, Wick W, Weller M, et al. smac agonists sensitize for Apo2L/ TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo [J]. Nat Med, 2002, 8(8): 808-815.

[编辑: 贺文; 校对: 周永红]