

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)08-0741-03

DOC2 抑制对宫颈癌 SiHa 细胞系的生长

李萍¹, 辛晓燕¹, 刘淑娟¹, 宋庆贺², 毛敬¹(第四军医大学: ¹ 西京医院妇产科, ² 基础部生物化学教研室 陕西 西安 710033)

Inhibitory effect of DOC2 gene on growth of human cervical cancer SiHa cells

LI Ping¹, XIN Xiao-Yan¹, LIU Shu-Juan¹, SONG Qing-He², MAO Jing¹¹Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital,²Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China**【Abstract】** AIM: To explore the inhibitory effect of DOC2 gene on the growth of human cervical cancer cell line SiHa.**METHODS:** Recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1-p93 (containing exogenous human DOC2cDNA) and vector pcDNA3.1 (with neomycin resistance gene only) were transfected into human cervical cancer SiHa cells (no DOC2 gene expression) with lipofectamine respectively. The growth rate, cell cycle and colony formation rate of transfected cells were observed by MTT assay and FCM assay respectively.**RESULTS:** The growth of SiHa transfected with DOC2 gene was markedly suppressed ($P < 0.05$). Colony formation rate in soft agar was also decreased significantly ($P < 0.05$). Cell cycle analysis showed that the percentage of cells in G1 phase of SiHa-p93 cells was significantly increased while that of cells in S phase was decreased.The percentage of cells in the different phases of the cycle did not significantly vary between the SiHa and SiHa-pcDNA-3.1. **CONCLUSION:** DOC2 gene can inhibit the proliferation and DNA synthesis of human cervical cancer.**【Keywords】** cervix neoplasms; DOC2; gene therapy**【摘要】**目的: 探讨卵巢癌缺失 2(DOC2) 基因对宫颈癌 SiHa 细胞系生长的抑制作用。方法: 采用基因转染技术, 将含有全长 DOC2cDNA 的真核重组表达质粒和空载体质粒(pcDNA3.1) 转染到人宫颈癌 SiHa 细胞系(无 DOC2 基因的表达) 中, 了解其对细胞增殖能力及细胞周期的影响。结果: 转染 DOC2 基因的宫颈癌细胞生长受到抑制($P < 0.05$), 其在软琼

收稿日期 2005-11-17; 接受日期 2005-12-26

基金项目 陕西省自然科学基金资助项目(2003C2023)

通讯作者: 辛晓燕. Tel: (029) 84775387 Email: gynobs@fmmu.edu.cn

作者简介: 李萍. 硕士生(导师辛晓燕). Tel: (029) 84775391

Email: liping@fmmu.edu.cn

脂克隆形成能力明显降低($P < 0.05$)。DOC2 有使 G1 期细胞比例增高、S 期细胞比例下降的趋势, 但 SiHa 细胞和 SiHa-pcDNA3.1 细胞之间无显著差异。结论: DOC2 基因能抑制宫颈癌细胞系的增殖。**【关键词】** 宫颈肿瘤; DOC2; 基因疗法**【中图分类号】** R737.33 **【文献标识码】** A

0 引言

卵巢癌缺失 2(differentially expressed in ovarian cancer 2, DOC2) 基因能抑制多种肿瘤细胞系的生长, 是一个新的候选的肿瘤抑制基因。为探讨 DOC2 基因对人宫颈癌细胞的抑制作用, 我们采用基因转染技术研究其对宫颈癌细胞增殖的影响, 为宫颈癌的治疗提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料 无 DOC2 基因表达的人源性宫颈癌细胞系 SiHa 由西京医院妇产科实验室提供, 常规方法复苏细胞并在 37℃, 50 mL/L CO₂ 标准条件下培养。真核表达载体质粒 pCDNA3.1-p93(含有人 DOC2cDNA)、空载体质粒 pCDNA3.1 和免疫组化试剂 DOC-2 抗体均由刘淑娟博士惠赠^[1-2]。DMEM, 质粒转染试剂盒(Lipofectamine 2000) 及胰蛋白酶购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自杭州四季青; MTT 购自华美生物工程公司; SABC 试剂盒与 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物技术有限公司, G418 购自 Sigma 公司。**1.2 方法** 取 pCDNA3.1-p93 2.5 μL (2.0 μg) 与无血清 DMEM 250 μL 混匀得 A 液, 另取 Lipofectamin2000 5 μL 和无血清 DMEM 250 μL 混匀得 B 液。A 与 B 两液混匀, 室温放置 20 min 形成脂质体-pCDNA3.1-p93 复合物(C1 液); 同法制备脂质体 pCDNA3.1 复合物(C2 液)。用 C1 液和 C2 液分别转染 SiHa 细胞, 同时设未转染的 SiHa 作对照。转染 48 h 后, 向培养基中加入 G418 进行筛选, 瓶中 G418 终浓度由 100 mg/L 逐渐升至 400 mg/L, 每 3 d 提高 1 次浓度, 筛选抗 G418 克隆, 挑选阳性克隆并扩大培养。转染克隆采用 ABC 免疫酶染色法检测 DOC2 蛋白的表达。取处于对数生长期的 SiHa-p93 细胞, 常规胰酶

消化并制备 SiHa-p93 单细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 24 孔培养板,每孔加 1 mL 培养基,于接种后 24 h 开始加入 MTT,每次 6 个复孔,每孔加入 75 μ L MTT (20 g/L),37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO₂ 孵箱孵育 4 h 后弃去上清,每孔加入 0.5 mL DMSO,振荡 15 min,再孵育 1 h,使结合的 MTT 充分溶解,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔 A 值,每日测量 1 次,连续 7 d,并绘制 A 值-时间曲线。测量期间每 2 ~ 3 d 换液 1 次。同法绘制 SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1 细胞的 A 值-时间曲线,作为对照。用去离子水配制 7 g/L 和 12 g/L 琼脂溶液,高温高压灭菌后,于 45 $^{\circ}$ C 水浴保温备用。配制 2 \times DMEM 培养液,高温高压灭菌后 45 $^{\circ}$ C 水浴保温。将 2 \times DMEM 与 12 g/L 琼脂溶液等体积混匀后,按 1 mL/孔加入 24 孔培养板,4 $^{\circ}$ C 放置 30 min 使之凝固。再将 2 \times DMEM 与 7 g/L 琼脂溶液等体积混匀,之后加入 SiHa-p93 单细胞悬液并调整细胞终浓度为 1×10^6 /L,此混悬液按每孔 0.5 mL 加入上述 24 孔板,铺平后室温放置使琼脂凝固,之后置于 37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO₂ 孵箱中培养 2 wk,观察细胞克隆形成情况并计算克隆形成率。同时设 SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1 对照。克隆形成率(%) = 克隆数 \div 接种细胞数 \times 100。取 SiHa, SiHa-pcDNA3.1 和 SiHa-p93 细胞分别接种于培养瓶,培养至 80% ~ 90% 融合状态时,用 250 g/L 胰酶消化并收集细胞, PBS 洗涤 2 次后 900 mL/L 乙醇固定过夜。次日再次以 PBS 洗涤,并调整细胞浓度 1×10^8 ~ 1×10^9 /L,碘化丙啶染色 30 min 后,应用 FCM 检测,计算出各期细胞百分比,每组重复 3 次。

统计学处理:用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用完全随机设计的方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

SiHa-p93 细胞 p93 表达蛋白阳性产物呈棕褐色,定位于细胞质。说明转染后,DOC2 基因在 SiHa 细胞中能稳定表达(图 1,2)。比较 3 种细胞的生长曲线,可以看出 SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1 细胞的生长曲线较为接近,而 SiHa-p93 细胞的生长在 3 d 后开始明显低于前两者($P < 0.05$)。说明 SiHa-p93 细胞在转染 DOC2 基因后其增殖受到抑制(图 3)。SiHa, SiHa-pcDNA3.1 和 SiHa-pcDNA3.1 三组细胞,每组测量 8 次,求得其均数 \pm 标准差分别为(43.2 \pm 5.2)%, (40.9 \pm 2.4)%, (17.0 \pm 3.7)%,经分析结果为 SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1 细胞均有较高的克隆形成率,且两者之间无显著差异;在转染 p93 后, SiHa-p93 细胞

的克隆形成率明显降低,与 SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1 之间差异性显著($P < 0.05$),说明 DOC2 对细胞的增殖力有明显的抑制作用。另经 DOC2 转染后受阻于 G1 期的细胞增多,同时 S 期的细胞相应减少,而与 SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1 之间差异显著($P < 0.05$,表 1)。



图 1 阴性 SiHa 细胞 p93 蛋白表达 SABC \times 400

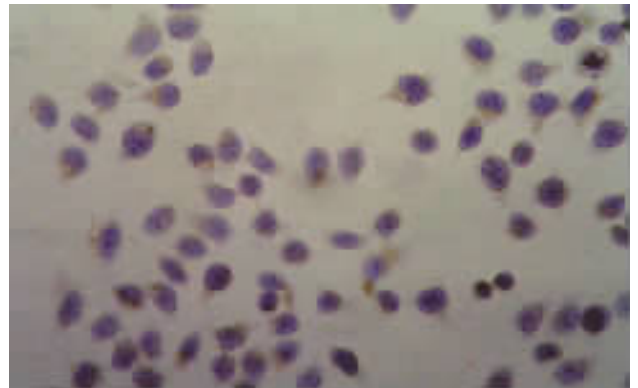


图 2 转染后阳性产物定于细胞质 SABC \times 400

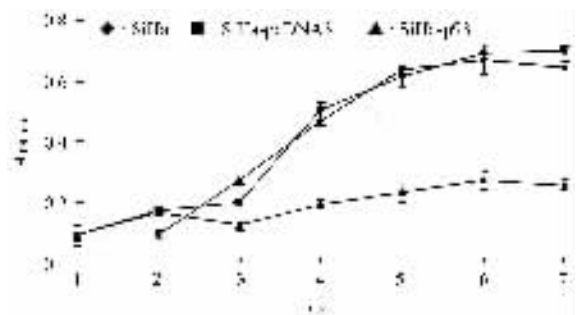


图 3 3 种细胞的生长曲线(MTT 法)

表 1 DOC2 基因对人宫颈癌细胞周期的影响

组别	(n=3, %, $\bar{x} \pm s$)		
	G1 期细胞	S 期细胞	G2 期细胞
SiHa	41.7 \pm 2.0	47.1 \pm 1.4	11.2 \pm 1.0
SiHa-pcDNA3.1	43.4 \pm 2.2	45.2 \pm 1.3	11.4 \pm 1.3
SiHa-p93	69.6 \pm 2.0*	16.3 \pm 1.0*	14.1 \pm 1.7

* $P < 0.05$ vs SiHa 和 SiHa-pcDNA3.1.

3 讨论

细胞的癌基因和抑癌基因是维持细胞正常生命活动中最重要的一些基因,当它们的基因结构发生改变和异常表达(抑癌基因不表达)时,正常增殖调控紊乱,细胞无限生长,发生癌变。DOC2/DAB2 广泛存在于正常组织中,但在许多肿瘤组织和细胞系中低表达或无表达,提示其表达缺失是肿瘤发生的早期步骤^[3-4]。我们将含 DOC2cDNA 的 pCDNA3.1-p93 真核重组表达质粒和空载体质粒(pCDNA3.1)在 Lipofectamin 介导下,转入人宫颈癌 SiHa 细胞系中,经 G418 筛选 14 d 空白对照组细胞全部死亡,而转染空载体和 pCDNA3.1-p93 的细胞仍有存活,并形成克隆,说明这些克隆具有 G418 抗性,即为转染成功的细胞。经 MTT 比色法检测细胞的增殖情况,发现经 p93 转染后的宫颈癌细胞,其增殖受到抑制。此外, SiHa-p93 的克隆形成率明显低于 SiHa-pcDNA3.1 和 SiHa($P < 0.01$),也说明经 DOC2 转染的宫颈癌细胞在软琼脂中克隆形成能力下降,其增殖能力受到明显抑制。流式细胞仪的分析结果也提示 DOC2 有使 G1

期细胞比例增高、S 期细胞比例下降的趋势。G1 期是细胞的 DNA 合成前期,增殖旺盛的细胞 G1 期时间短。转染 DOC2 后 G1 期细胞比例增高、S 期细胞比例下降,说明卵巢癌细胞的分裂受到了抑制。本实验将 DOC2/DBA2 基因转入人宫颈癌细胞中并获得了稳定的表达,明显抑制了肿瘤细胞的生长及恶性增殖能力,为宫颈癌的基因治疗提供实验依据。

【参考文献】

- [1] 刘淑娟,辛晓燕,韩军涛,等. 兔抗人 DOC-2 抗血清的制备与鉴定[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(6): 465-467.
- [2] Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers[J]. Int J Cancer, 2005, 113(1): 59-66.
- [3] Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2082-2089.
- [4] Kleeff J, Huang Y, Mok SC, et al. Down-regulation of DOC-2 in colorectal cancer points to its role as a tumor suppressor in this malignancy[J]. Dis Colon Rectum, 2002, 45(9): 1242-1248.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)08-0743-01

新生儿黄疸经皮胆红素测定部位的选择

庄玉梅, 张同利, 张美丽

(解放军 451 医院妇产科, 陕西 西安 710054)

【关键词】新生儿黄疸, 光照疗法

【中图分类号】R722.17 【文献标识码】B

1 临床资料 新生儿黄疸 42(女 18, 男 24)例, 均为足月儿, 体质量 > 2500 g。均接受光疗, 每次 12 h, 1 次/d, 分别应用日本产 MINOAL-101 型 TCB 测定仪做经皮胆红素(TCB)测定, 同时测定两个部位的 TCB 读数, 常规部位在上额正中部位, 遮盖部位在患儿光疗时眼罩遮盖的前额眉心部位。光疗结束时常规部位的 TCB 读数较光疗前降低 5.0, 而在光疗后 12 h 又明显升高了 3.3, 均有非常显著性差异($P < 0.01$, 表 1)。光疗结束时, 遮盖部位的 TCB 读数较光疗前降低 0.8, 有显著性差异($P < 0.05$), 但在光疗后 12 h 其 TCB 读数较光疗结束时降低了 0.5, 无统计学意义(表 1)。

表 1 新生儿经皮胆红素 TCB 读数 ($n = 42, \bar{x} \pm s$)

部位	光疗前	光疗结束时	光疗结束后
常规	16.3 ± 2.4	11.5 ± 2.2 ^b	14.5 ± 2.5
遮盖	16.5 ± 2.5	15.6 ± 2.6 ^a	15.2 ± 2.5

^a $P < 0.05$ vs 光疗前, ^b $P < 0.01$ vs 光疗前和光疗结束后。

收稿日期 2006-01-20; 接受日期 2006-03-01

作者简介 庄玉梅, 本科, 副主任护师。Tel: (029) 84734142

2 讨论 TCB 测定仪是检查新生儿黄疸动态变化的一种简便、无创伤性的仪器, 它检测的读数与血清总胆红素浓度呈高度正相关^[1]。黄疸的出现一般由上到下、由深到浅分布, 额部黄疸出现时间早, 皮肤暴露, 局部坚实易操作, 故临床以前额正中作为常规的 TCB 检测部位, 并以查房时的 TCB 读数为主要的治疗依据。光疗是治疗新生儿黄疸常用的方法, 能有效地降低血清间接胆红素的浓度, 其作用部位在浅层组织, 因此光疗后皮肤黄疸的测试数并不表示血液中胆红素的相应下降。在光疗过程中或光疗后短时间内做经皮胆红素测定, 其反映血清胆红素水平的准确性和可靠性会受到明显影响。

本结果显示, 光疗后患儿皮肤的黄疸程度有较明显的减退。经皮 TCB 测定的读数明显降低, 经过 12 h 后, 经皮 TCB 测定读数明显增高, 这是因为血中胆红素经过重新分布皮肤浅层组织使 TCB 浓度增加所致, 故皮肤黄疸程度又有所加重。在临床上医护人员在作经皮胆红素测定评价患儿黄疸程度时, 往往没有注意检测当时患儿是否刚接受光疗后不久, 这样检测的结果便不能正确反映患儿真实的黄疸情况。我们探讨了避免光疗影响经皮 TCB 测定的措施, 把经皮 TCB 测定的部位选在光疗时眼罩遮盖的部位, 结果显示在遮盖部位检测时降低, 但经过 12 h 后其经皮 TCB 测定读数没有明显变化, 因此选用光疗时的遮盖部位作经皮 TCB 测定, 可较可靠地反映患儿的黄疸情况。我们认为对接受蓝光光疗后的新生儿进行 TCB 测定时, 检测部位应选在光疗时遮盖避光的部位, 从而可避免光疗时经皮胆红素测定结果的影响, 能更准确地评价患儿的黄疸程度。

【参考文献】

- [1] 石柱枝, 吴鸣. 经皮 TCB 测定仪测定新生儿胆红素的应用[J]. 浙江医学, 1994, 16(1): 62-63.

编辑 潘伯荣