

DNA 聚合酶 β 过表达对食管癌 EC9706 细胞的影响

赵军, 路静, 宋谦, 崔自由, 赵国强, 黄幼田, 杨洪艳, 赵继敏, 董子明

赵军, 路静, 宋谦, 崔自由, 赵国强, 黄幼田, 杨洪艳, 赵继敏, 董子明, 郑州大学基础医学院病理生理教研室 河南省郑州市 450052
赵军, 女, 1971-07-15 生, 山西长治人, 汉族. 2002 年郑州大学硕士, 主治医师. 主要从事食管癌病因研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 39870287
教育部科学技术研究重点项目, No. 02088
通讯作者: 董子明, 450052, 河南省郑州市大学路 40 号, 郑州大学基础医学院病理生理教研室. dongzm@zzu.edu.cn
电话: 0371-66974204
收稿日期: 2005-03-06 接受日期: 2005-04-08

Effect of over-expressed DNA polymerase β on malignant degree of esophageal cancer EC9706 cells

Jun Zhao, Jing Lu, Qian Song, Zi-You Cui, Guo-Qiang Zhao, You-Tian Huang, Hong-Yan Yang, Ji-Min Zhao, Zi-Ming Dong

Jun Zhao, Jing Lu, Qian Song, Zi-You Cui, Guo-Qiang Zhao, You-Tian Huang, Hong-Yan Yang, Ji-Min Zhao, Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39870287 and Science Technology Study Of Ministry Of Education, No. 02088
Correspondence to: Dr. Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. dongzm@zzu.edu.cn
Received: 2005-03-06 Accepted: 2005-04-08

Abstract

AIM: To observe the effect of over-expressed DNA polymerase β on the malignant degree of EC9706 cells of esophageal cancer.

METHODS: The wild and mutant type DNA pol β gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pEGFP-C3 vector to obtain wild and mutant pEGFP-C3-pol β . Then pEGFP-C3-pol β was transfected into EC9706 cells using lipofectamine method. The location of DNA pol β gene-encoded protein was observed under fluorescent microscope. The growth of the cells was detected by MTT assay and the cycle of the cells was examined by flow cytometry.

RESULTS: The sequences of the two recombinants were confirmed and they were transfected into the EC9706 cells successfully. The wild DNA pol β protein was mostly located inside the nuclear, but the mutant DNA Pol β protein was distributed in the whole cell. The proliferation of EC9706-wtPol β cells was significantly slower than that of

control cells ($P < 0.05$). Furthermore, the S-period frequency (SPF) was significantly decreased in EC9706-wtPol β cells (22.11 ± 0.12 vs 44.86 ± 0.03 , $P < 0.05$), but not in EC9706-mtpol β ones ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Over-expression of wild type DNA polymerase β can decrease the malignant degree of esophageal cancer.

Key Words: DNA polymerase β ; Enhanced green fluorescent protein; Wild type; Mutation

Zhao J, Lu J, Song Q, Cui ZY, Zhao GQ, Huang YT, Yang HY, Zhao JM, Dong ZM. Effect of over-expressed DNA polymerase β on malignant degree of esophageal cancer EC9706 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(12):1377-1381

摘要

目的: 观察过表达的 DNA 聚合酶 β 对食管癌 EC9706 细胞系的影响。

方法: 运用 PCR 方法, 从质粒 pcDNA3.1-pol β 中扩增出野生型和突变型的 DNA 聚合酶 β 基因, 作为目的片段, 定向克隆至 pEGFP-C3 真核绿色荧光蛋白表达载体, 获得野生型和突变型的重组真核表达载体 pEGFP-C3-pol β 。分别将野生型和突变型的 pEGFP-C3-pol β 转染 EC9706 细胞, 荧光显微镜观察其定位, 绘制生长曲线, 测定细胞周期。

结果: DNA 序列分析证实了重组载体中的 DNA 聚合酶 β 序列正确, 荧光显微镜结果显示野生型的 DNA 聚合酶 β 表达以细胞核为主, 突变型的 DNA 聚合酶 β 则表达在整个细胞中, 明显与野生型的 DNA 聚合酶 β 的核定位不同。而且, 野生型的细胞生长较对照组缓慢 ($P < 0.05$), 野生型的还能抑制 EC9706 细胞的生长和使 S 期细胞减少 (22.11 ± 0.12 vs 44.86 ± 0.03 , $P < 0.05$), 而突变型的则不能促进 EC9706 细胞的生长, S 期细胞增殖不明显 ($P > 0.05$)。

结论: 过表达的野生型食管癌 DNA 聚合酶 β 可以降低 EC9706 细胞的增殖。

关键词: DNA 聚合酶 β ; 增强型绿色荧光蛋白; 野生型; 突变

赵军, 路静, 宋谦, 崔自由, 赵国强, 黄幼田, 杨洪艳, 赵继敏, 董子明. DNA 聚合酶 β 过表达对食管癌 EC9706 细胞的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(12):1377-1381
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1377.asp>

0 引言

哺乳动物细胞DNA每天都经历着数次自发突变,并经受着化学、毒素、放射性物质、病毒等外来损伤因素的影响.由于其体内存在着损伤修复系统,才得以使其处于动态平衡,维持正常的代谢. DNA聚合酶 β (DNA pol β)是DNA聚合酶家族中的一员,在DNA的损伤修复中起着非常重要的作用.他主要参与BER,包括短片段BER和长片段BER^[1].他有别于其他DNA聚合酶的一个特点是在合成时缺乏校读能力,在体外DNA复制实验中他缺乏准确性,识别核苷酸时缺乏区别能力,在几种聚合酶中其保真性最低.已证实食管癌中DNA pol β 的表达是增高的^[2].而且这种高表达的是杂合性的^[3-5],即高表达的DNA pol β 的食管癌细胞同时存在着突变型和未突变型的DNA pol β .我们将食管癌野生型的DNA pol β 基因导入食管癌细胞系EC9706中使正常的DNA pol β 过表达,结果发现此细胞株的生长速度减慢,细胞周期中S期的细胞数明显减少.而突变型的导入EC9706细胞后则不能促进EC9706细胞的增殖,S期细胞增殖不明显.这一现象提示过表达的DNA pol β 对食管癌细胞EC9706的增殖有一定的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 重组真核绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-C3 (Clontech公司)为中国人民解放军总医院母义明博士惠赠,野生型和天然突变型(177-234 nt, 58 bp 缺失突变型)的重组真核表达载体pcDNA3.1-pol β 为我室构建, pGEM-TEasy 载体试剂盒, *Hind* III和 *Bam* HI 限制性内切酶, T4 连接酶, 高保真 Taq DNA 聚合酶均购于 Promega 公司, 小提质粒试剂盒, 快速凝胶回收试剂盒均购于 QIAGEN 公司, 食管癌细胞系 EC9706 由本校病理教研室张云汉教授惠赠, RPMI1640 培养基、转染用脂质体 Lipofectamine、G418 均购于 GIBCO 公司. MTT 购于 Sigama 公司, 细胞周期试剂盒购于美国 BD 公司. 胎牛血清、培养瓶、板为 Coring 公司产品.

1.2 方法^[6-7] 根据 GenBank M2423078^[8] 提供的 DNA 聚合酶 β 的 cDNA 序列和所选用的质粒 pEGFP-C3 设计一对带有 *Hind* III 和 *Bam* HI 酶切位点的 pol β 全基因引物 P1, P2. 一对用于鉴定重组 pEGFP-C3-pol β 质粒的通用鉴定引物 P3, P4. 在 DNA pol β 序列 ATG 上游还加有一段 Kozak 序列. 引物由上海生工生物工程公司合成. P1, 5' GCAAGCTTGCCACCATGAGCAAACGGAAGGCGCCGCAGG3', P2, 5' CTGGATCCTTCGCTCCGGTCTTGGGTTTC3'; P3, 5' TCCTGCTGGAGTTCGTGACC3', P4 5' TTCAGGGGAGGTGTGGGAG3'. 在过夜培养的 LB 固体培养基上取含野生型、突变型 pcDNA3.1-pol β 的菌苔少许, 置于含 Milli-Q 纯水 50 μ L 的 EP 管中, 并重悬

混匀, 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 12 000 *g* 离心 5 min, 取上清作为模板进行 PCR 扩增, 条件如下 (30 μ L 体系) H₂O:18.5 μ L, 10 \times buffer 3 μ L, 4 \times dNTP 2 μ L, P1 0.5 μ L, P2 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 模板 5 μ L. 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 25 循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min. 按快速凝胶回收试剂盒说明书回收纯化 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定. 进行 T-A 克隆, 反应体系 (10 μ L 体系): 10 \times buffer 5 μ L, PCR 产物 3 μ L, T4 连接酶 1 μ L, pGEM-T 载体 1 μ L, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜. 用氯化钙法制备感受态, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* JM109, 涂抹至预先含有 IPTG/X-gal/氨苄青霉素的平板上, 进行蓝白筛选, 阳性菌落进行 T7、SP6 通用引物 PCR 扩增鉴定, 并小提质粒用 *Hind* III 和 *Bam* HI 酶切鉴定, 得到重组质粒 pGEM-T-pol β . 用 QIAGEN miniprep kit 小提 pEGFP-C3 空质粒, 用 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切, 酶切产物用 QIAGEN gel extract kit 回收纯化, 并进行 Sephadex G200 凝胶过滤层析再次纯化, 得到双粘质粒并测出其浓度. 同时用 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切重组质粒 pGEM-T-pol β , QIAGEN gel extract kit 回收酶切片段, 胶回收产物和双粘质粒 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 DH5 α 大肠杆菌于卡那霉素阳性的 LB 平板上, 初筛阳性克隆. 用通用引物 P3, P4 进行 PCR 扩增筛选, 阳性克隆分别再用通用引物 P3, P4 和 P1, P2 二次 PCR 扩增鉴定, 再用提质粒 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切鉴定. 经上述方法鉴定后的重组质粒送 DNA 序列分析, 由上海生工生物工程公司测序. 从含野生型和突变型的 DNA 聚合酶 β 的重组真核绿色荧光表达载体 pEGFP-C3-pol β 的 DH5 α 菌和含 pEGFP-C3 的 DH5 α 菌中提质粒备用 (按照 QIAGEN 质粒提取说明书). 测其浓度为 150 g/L. EC9706 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清 (FBS)、100 mg/L 链霉素、100 mg/L 青霉素的 RPMI 1640 培养液在 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度条件下培养传代. 按 4 \times 10⁴/孔细胞数接种于 24 孔板, 当细胞汇合度达 50-70%, 将 1 μ L 野生型和突变型的重组质粒 pEGFP-C3-pol β 和 1 μ L 空质粒 pEGFP-C3 分别与无血清无双抗的 RPMI 1640 培养基 200 μ L 混合, 1 μ L 脂质体 Lipofectamine 与无血清无双抗的 RPMI 1640 培养基 200 μ L 混合, 混匀, 然后将上述两种液体混合, 室温静置 30 min, 用无血清无双抗的 RPMI 1640 培养基冲洗每孔细胞 2 次, 加质粒脂质体混合物 400 μ L 于每孔细胞, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度条件下培养 5 h, 吸去每孔混合物, 加 100 mL/L FBS, 含双抗的 RPMI 1640 培养基 1 mL, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度条件下继续培养. 48 h 后加 G418 1 200 mg/L 筛选, 每 3 d 换一次液, 共筛选 3 wk, 最后 1 wk

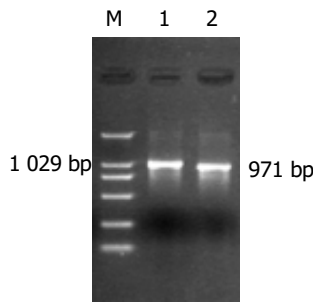


图1 DNAPol β 全基因片段扩增图谱. M: Marker; 1: wtDNA pol β ; 2: mtDNA pol β .

将加至 1 500 mg/L, 收集阳性克隆, G418 200 mg/L 维持培养. 用荧光显微镜动态观察转染野生型和突变型 pEGFP-C3-pol β 重组质粒和转染 pEGFP-C3 的 EC9706 细胞. 分别接种转染 pEGFP-C3-pol β 重组质粒的对数生长期 EC9706 细胞和转染 pEGFP-C3 的对数生长期 EC9706 细胞于 96 孔板, 2×10^3 /孔, 每种设 5 个复孔, 并设无细胞的一组为 control, 共 6 块板, 每天取一块板, 加 MTT 20 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度条件下培养 4 h, 弃去 MTT 混合液, 加 DMSO 150 μ L/孔, 震荡 10 min, 紫外分光光度计 492nm 测 A 值, 绘制生长曲线. 取对数生长期的未转染的 EC9706 细胞、转染野生型和突变型的 pEGFP-C3-pol β 重组质粒 EC9706 细胞和转染 pEGFP-C3 的 EC9706 细胞各一瓶, PBS 洗两遍, 胰酶消化, 终止消化后, 800 r/min 离心 3 min, PBS 洗两次, 加 500 mg/L 多聚甲醛 1 mL 固定 5 min, 800 r/min 离心 3 min, 重悬于 PBS 中, 计数, 置于细胞周期专用管, 800 r/min 离心 5 min, 加 A 液 250 μ L, 10 min, 加 B 液, 10 min, 加 C 液, 避光 10 min 后用流式细胞仪对 DNA 进行定量分析. 资料用 Madfit LT for Mac 3.0 软件分析处理. S 期细胞百分比 (S-period frequency, SPF): 表示 DNA 合成状态, 借助于 DNA 的合成情况来估计将进入有丝分裂的细胞的百分比. SPF 值 = $S \div (G0/G1+S+G2/M) \times 100\%$. DNA 指数 (DNA index, DI): 表示 DNA 的相对含量, 并判断 DNA 倍体数. 以正常人淋巴细胞 DNA 含量为准. DI 值 = (样品细胞的 G0/G1 峰均道数) \div (正常细胞的 G0/G1 峰均道数) $\times 100\%$. 本实验统计方法均采用 SPSS10.0 统计软件. 生长曲线运用双因素方差分析, FCM 参数比较采用多样本的单因素方差分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为水准.

2 结果

用 P1, P2 扩增野生型 (wtDNA pol β) 和突变型 pcDNA3.1-pol β (mtDNA pol β) 产生的目的条带与预期的野生型 1 029 bp, 缺失突变型 971 bp 一致 (图 1). 从卡那 LB 平板上随机挑选 10 个菌落, 引物 P3, P4 PCR

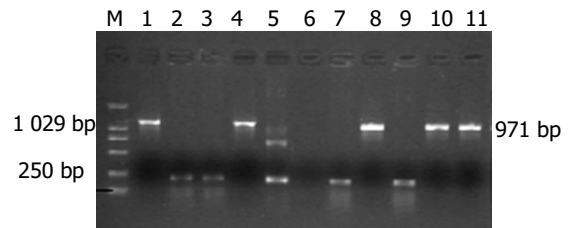


图2 重组子 pEGFP-C3-pol β 的 PCR 扩增筛选图谱. M: Marker (2000DL); 1, 4: inserted by wtpEGFP-C3-pol β ; 2, 3: uninserted by wtpEGFP-C3-pol β ; 8, 10, 11: inserted by mtpEGFP-C3-pol β ; 7, 9: uninserted by mtpEGFP-C3-pol β ; 5: positive control; 6: negative control.

扩增后显示特异性条带, 野生型位于 1 029 bp 附近, 缺失型位于 971 bp 附近, 未插入的条带位于 250 bp 附近 (图 2). 上步筛选后的阳性重组子用 P1, P2 和 P3, P4 双引物二次鉴定, 可见: P1, P2 扩出的条带较 P3, P4 扩出的分子略小. 再小提质粒, HindIII 和 BamHI 双酶切鉴定, 结果可见野生型: 1 017 bp, 4 732 bp 两条带, 缺失型 969 bp, 4 732 bp 两条带 (图 3). LB 液体培养基过夜培养重组的两种突变型质粒, 取 1.5 μ L 测序, 结果野生型 1 029 bp, 缺失突变型 971 bp 序列读码框序列正确. 用野生型和突变型 pEGFP-C3-pol β 和空质粒 pEGFP-C3 转染 EC9706 细胞, 获得野生型 EC9706-wtpol β , 突变型 EC9706-mtpol β 和 EC9706-neo^r 细胞. 在荧光显微镜下发现, 与未转染的 EC9706 细胞相比, pEGFP-C3-wtpol β , pEGFP-C3-mtpol β 和 pEGFP-C3 编码的蛋白均有 GFP 表达, 即在 488 nm 波长下发出绿色荧光, 说明转染成功. 所不同的是, EC9706-neo^r 细胞激发出的绿色荧光在细胞核与胞质中无任何差别, 整个细胞呈均匀绿色 (图 4A), 而 EC9706-wtpol β 细胞虽然整个细胞都可见绿色荧光, 但细胞核内的荧光强度明显较胞质中的强 (图 4B), 而的 EC9706-mtpol β 细胞却与 EC9706-wtpol β 完全不同, 他也是以整个胞质分布为主, 没有核定位的趋势 (图 4C). 与未转染的

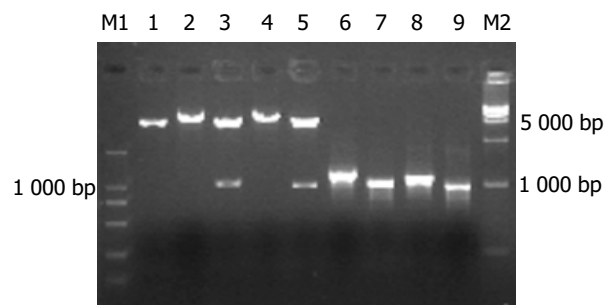


图3 重组表达载体 pEGFP-C3-pol β 酶切图谱和 PCR 扩增鉴定图谱. M1: Marker(2000DL); M2: Marker(15000DL); 1: pEGFP-C3/HindIII; 2: wtpEGFP-C3-pol β /HindIII; 3: wtpEGFP-C3-pol β /HindIII, BamHI; 4: mtpEGFP-C3-pol β /HindIII; 5: mtpEGFP-C3-pol β /HindIII, BamHI; 6: wtpEGFP-C3-pol β amplified by primer P3, P4; 7: wtpEGFP-C3-pol β amplified by primer P1, P2; 8: mtpEGFP-C3-pol β amplified by primer P3, P4; 9: mtpEGFP-C3-pol β amplified by primer P1, P2.

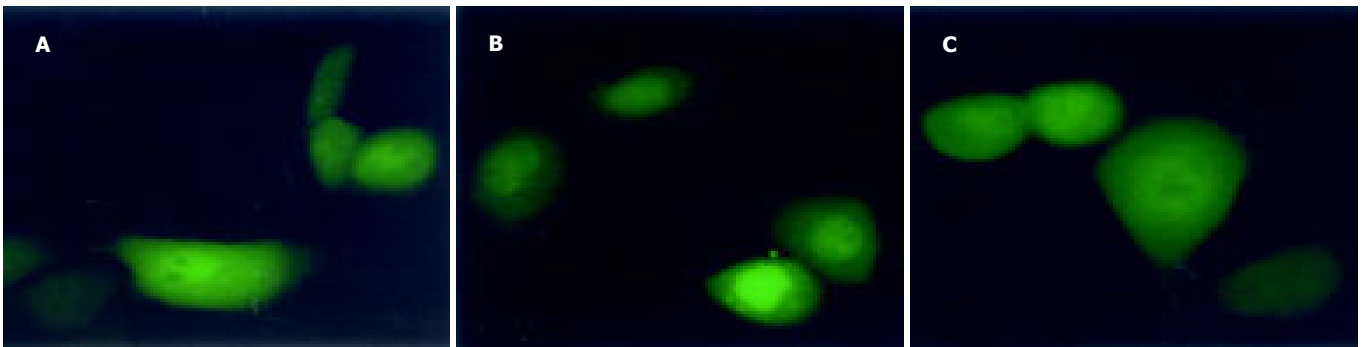


图4 DNAPol β 蛋白在 EC9706 细胞中的分布 (× 400). A: EC9706-neo^r; B: EC9706-wtpolβ; C: EC9706-mtpolβ.

EC9706 细胞相比, 在前 1 wk EC9706-neo^r 细胞、EC9706-wtpolβ 和 EC9706-mtpolβ 细胞体积均有增大, 细胞内颗粒状物质增多, 随着继续培养, 每种细胞均有少数大体积细胞, 但转染的两种细胞无明显差别, 而未转染的 EC9706 细胞无此变化.

2.1 pEGFP-C3-polb 转染细胞增殖速度 与未转染的 EC9706 细胞相比, EC9706-neo^r 细胞的生长速度变化不大 ($P>0.05$), EC9706-wtpolβ 细胞的生长速度较慢 ($P<0.05$), EC9706-mtpolβ 细胞则影响不明显 ($P>0.05$, 图 5).

2.2 pEGFP-C3-polb 转染细胞的细胞周期 未转染的 EC9706 细胞、EC9706-neo^r 细胞的细胞周期 S 峰相似, 而 EC9706-wtpolβ 细胞的 S 期细胞明显减少 ($P<0.05$), EC9706-mtpolβ 细胞的 S 期细胞与未转染细胞相比变化不大, 而与野生型的转染细胞相比则 S 期细胞明显增多 ($P<0.05$, 图 6).

2.3 转染细胞各组恶性度 各组 DI 值无明显差异 ($P>0.05$), 均为近二倍体细胞; EC9706-wt 细胞的 SPF 值明显却明显低于 EC9706 和 EC9706-neo^r ($P<0.05$); 而 EC9706-mt 细胞的 SPF 值与 EC9706 和 EC9706-neo^r 的无明显差别 ($P>0.05$, 表 1).

表 1 不同转染细胞各组间 FCM 参数比较(mean±SD)

FCM	EC9706	EC9706-neo ^r	EC9706-wt	EC9706-mt
DI	0.88 ± 0.010	0.81 ± 0.10	0.85 ± 0.10	0.84 ± 0.00
SPF	44.86 ± 0.03	36.56 ± 0.36	22.11 ± 0.12	39.79 ± 0.20

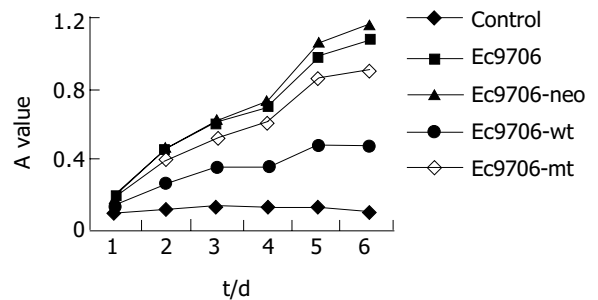


图5 EC9706 各转染组和对照组的生长曲线.

3 讨论

DNA 聚合酶 β 是一种 DNA 修复基因, 我们证实在食管癌中, 高表达的 DNA 聚合酶 β 是野生型和突变型的杂合体, 突变型的 DNAPolβ 抑制野生型的正常功能^[2, 6]. GFP 是一种新型的生物标签^[9-10], 与外源基因偶连时不影响外源蛋白的构象和功能, 他可以发绿色荧光. 在 pEGFP-C3 表达载体的 C 端具有多克隆位点, 可以将 DNA polβ 基因与之在阅读框架中融合, 融合蛋白在哺乳细胞中表达, 可直接通过荧光显微镜, 流式细胞仪进行检测. 重组表达载体中含有一个 SV40 早期启动子, 他可促使载体中与 DNA polβ 基因融合的绿色荧光蛋白基因 GFP 表达. 同时载体中还含有 CMV 早期即刻启动子, 他可有效的促进插入的目的基因的表达^[8]. 在引物设计时我们在目的基因序列的 ATG 上游加上了一段 Kozak 引导序列, 这样可使目的基因在真核细胞中的表达明显提高^[11], 更利于观测. GFP 含有一种修饰

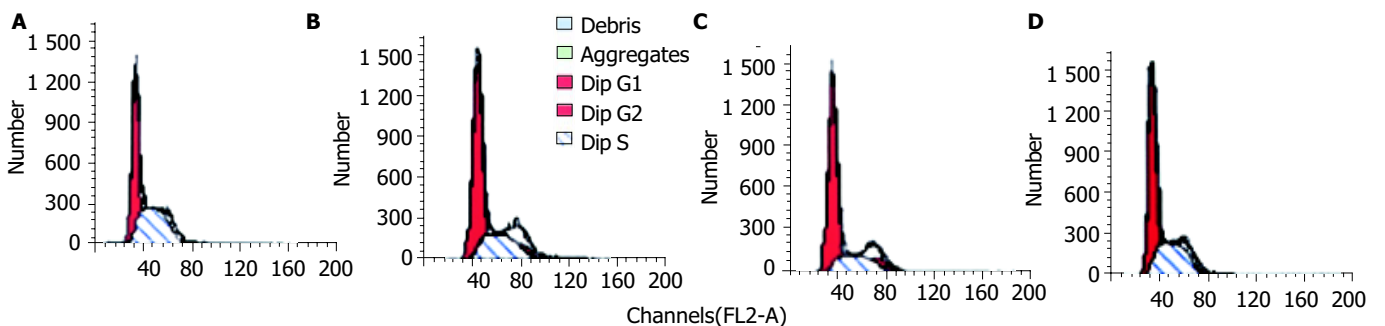


图6 EC9706 转染各组和对照组细胞周期. A: EC9706; B: EC9706-neo^r; C: EC9706-wtpolβ; D: EC9706-mtpolβ.

过的氨基酸(Leu-Tyr-Gly)所组成的载色中心, 当 gfp 基因表达, GFP 的载色中心即自发形成, 用普通荧光显微镜以标准的波长紫外线就很容易观察到该基因的产物, 将 gfp 基因与另一种基因连接在一起构成融合基因, 另一种基因表达的蛋白质可由 GFP 产生的荧光来反映^[10]. EGFP 的荧光强度比其天然产物高几十倍. EGFP 本身不是核蛋白, 没有核定位信号, 他的浓聚不可能由其本身引起, 只能是由与之融合的定位细胞核内的 DNA pol β 蛋白所引起^[12]. 利用 EGFP 可诱发荧光而又没有核定位信号的特性, 我们将野生型和缺失突变型的 DNA pol β 与 EGFP 的融合基因通过脂质体转染的方法导入了 EC9706 细胞系. 我们标记了 EGFP 可以通过绿色荧光来观察外源基因的表达情况. 结果发现除了 EC9706 细胞自身高表达的 DNA pol β 之外, 外源的 DNA 聚合酶 β 蛋白还可以高表达并可以定位, wtDNA pol β 定位在细胞核内, pEGFP-C3 蛋白和 mtDNA pol β 蛋白却在整个细胞发出绿色荧光, 而且 24 h 表达最高并定位最明显.

众所周知, 蛋白质的结构决定功能, 正常的 DNA pol β 是一种核蛋白, 他应该在核内表达发挥其生物功能. 他编码 39 ku 的蛋白, 由 335 个氨基酸组成, 含有两个结构域^[13-14]: 他的修复功能遵循 BiBi 机制首先与受损的 DNA 单链结合才能发挥其聚合功能. 突变型的 DNA 聚合酶 β 由于其 177-234 位的核苷酸缺失, 导致 59-78 位的氨基酸缺失, 即其 8 ku 结构域丧失了完整性, 这种截短的蛋白表达异常, 导致其在 EC9706 细胞中表达于整个细胞表达, 与野生型的核内表达明显不同. 我们推测其丧失了与损伤 DNA 结合的功能, 故不能完成其修复受损 DNA 功能, 也可能丧失了整个聚合酶的功能. 我们继续进行转染细胞的生长曲线和细胞周期的测定, 发现 EC9706-wtpol β 细胞的生长速度比未转染细胞和 EC9706-mtpol β 细胞减慢 ($P < 0.05$), 但 EC9706-mtpol β 细胞则与 EC9706 细胞和 EC9706-neo^r 细胞相比无显著差别 ($P > 0.05$). DNA 倍体分析提示转染前后均为近二倍体各组间无明显差异 ($P > 0.05$). 我们知道, 正常细胞的 SPF 是低增殖的, SPF 值越高, 肿瘤的恶性度越高. 恶性肿瘤有较高的增殖比率^[14], EC9706-wtpol β 细胞 SPF 值明显

降低 ($P < 0.05$), 但 EC9706-mtpol β 细胞 SPF 值却变化不大 ($P > 0.05$). NANDAN^[15] 曾在结直肠、乳腺癌中发现 208-236 氨基酸缺失 (87 bp), 其测定 DNA pol β 活性结果显示: 野生型转染的 HeLa 细胞的 DNA pol β 活性是未转染细胞的 10 倍, 而 87 bp 缺失型转染后 HeLa 细胞 DNA pol β 活性则极低, 这与我们的结果极其相似.

因此, 用野生型的 DNA 聚合酶 β 去转染肿瘤细胞, 可以减缓细胞的增殖, 降低恶性度, 有望进一步深入研究运用于人类的肿瘤生物治疗.

4 参考文献

- 1 Srivastava DK, Husain I, Arteaga CL, Wilson SH. DNA polymerase β expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis* 1999;20:1049-1054
- 2 董子明. DNA 聚合酶 β 的研究现状. 郑州大学学报 2003;38:477-480
- 3 Iwanaga A, Ouchida M, Miyazaki K, Hori K, Mukai T. Functional mutation of DNA polymerase beta found in human gastric cancer-inability of the base excision repair in vitro. *Mutat Res* 1999;435:121-128
- 4 Matsuzaki J, Dobashi Y, Miyamoto H, Ikeda I, Fujinami K, Shuin T, Kubota Y. DNA polymerase beta gene mutations in human bladder cancer. *Mol Carcinog* 1996;15:38-43
- 5 Dong Z, Zhao G, Zhao Q, Yang H, Xue L, Tan X, Zheng N. A study of DNA polymerase beta mutation in human esophageal cancer. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:899-902
- 6 萨母布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 889-942
- 7 D. L. 斯佩克特, R. D. 戈德曼, L. A. 莱因万德. 第三版. 细胞实验指南. 北京: 科学出版社, 2001:781-792
- 8 Miller BA, Barber DL, Bell LL, Beattie BK, Zhang MY, Neel BG, Yoakim M, Rothblum LI, Cheung JY. Identification of the erythropoietin receptor domain required for calcium channel activation. *J Biol Chem* 1999;274:20465-20472
- 9 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263:802-805
- 10 刘默芳, 王恩多. 绿色荧光蛋白. 生物化学与生物物理进展 2000; 27:238-243
- 11 Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* 1987;15: 8125-8148
- 12 于廷曦, 朱应葆, 童坦君. HR24L 基因编码的蛋白质定位于细胞核内并参与细胞周期的调节. 癌症 2001;20:453-459
- 13 王谷亮, 余应年. DNA 聚合酶 β 可能参与了更广泛的细胞反应并引起遗传不稳定. 中国病理生理杂志 2002;18:427-432
- 14 Koss L G, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989;20:528-531
- 15 Bhattacharyya N, Banerjee S. A variant of DNA polymerase β acts as a dominant negative mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10324-10329

编辑 潘伯荣 审读 张海宁