

[文章编号 1000-1182(2004)02-0096-04

脂质体介导 hES 基因转染人舌鳞癌 Tca8113 细胞及其蛋白表达

潘朝斌, 黄洪章, 王建广, 侯劲松

(中山大学附属第二医院 口腔颌面外科, 广州 510120)

[摘要] 目的 建立转人内皮抑素(hES)基因舌鳞癌 Tca8113 细胞,检测体外培养的转基因细胞基因蛋白表达。方法 为了建立携带 hES 基因的舌鳞癌 Tca8113 细胞克隆,选用阳离子脂质体 Lipofectamin 为载体,将含 hES 基因的质粒——p^{BLAST}-hES 转染 Tca8113 细胞,以 Blasticidin S 抗生素筛选阳性克隆。免疫组织化学 S-P 方法检测体外培养的转基因 Tca8113 细胞克隆中 ES 的表达。结果 经 Blasticidin S 抗生素筛选,转染 hES 基因的 Tca8113 细胞由于具有 bsr 抗性基因,可以在含有 50 μg/ml Blasticidin S 的培养基中生长和传代,从而得到携带 hES 基因的 Tca8113 细胞克隆。该细胞在体外培养传代 96 h 后,经免疫组织化学检测,hES 表达的强阳性(+++)率为 100%。结论 以脂质体介导 hES 基因转染 Tca8113 细胞效率高,转基因细胞具有高效表达活性目的基因产物的能力。

[关键词] 内皮抑素; 转基因; 细胞; 舌鳞癌

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A

Transfection of Human Endostatin Gene with Lipofectamin and the Expression of hES Protein in Tca8113 Cell PAN Chao-bin, HUANG Hong-zhang, WANG Jian-guang, HOU Jin-song. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to establish transgenic Tca8113 cell and evaluate the expression of human endostatin (hES) gene in the cell clone *in vitro*. **Methods** To transfect hES gene into Tca8113 cells, lipofectamin was complexed with plasmid encoding hES gene, and blasticidin S antibiotic was adopted to select Tca8113-hES cell clone. Immunohistochemistry S-P method was adopted to detect the expression of hES in the transgenic Tca8113 cell *in vitro*. **Results** Transfected by hES, the transgenic Tca8113 cells could grow and proliferate in RPMI-1640 culture medium containing blasticidin S antibiotic. The expression rate of hES reached 100%. **Conclusion** hES gene can express in hES-transfected Tca8113 cell *in vitro*.

[Key words] endostatin; gene transfer; cell; squamous cell carcinoma of tongue

近年来有研究表明,以重组的内皮抑素(endostatin, ES)蛋白治疗实体瘤取得了明显的疗效^{1,2}。虽然重组 ES 可以通过基因工程技术获得,但由于该蛋白本身极不稳定,也难以大量制备,故而大规模的应用受到限制。ES 治疗恶性实体肿瘤的研究势必向基因治疗方向发展。以外源性的 ES 基因治疗肿瘤的关键除了含目的基因质粒的构建外,还需要该基因转染到真核细胞后能够高效、稳定地表达相关蛋白——具有活 ES。本研究以脂质体为载体,转染人 ES 基因于舌鳞癌 Tca8113 细胞系,通过体外培养的方法观察该转基因细胞系表达 ES 的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

主要的实验仪器:恒温孵育箱(中国上海),全自动空气浴恒温振荡器(中国太仓),全自动恒温细胞培养箱(Heraeus),LTG6G 恒温水浴箱(Grant),常温离心机和低温离心机(Heraeus),恒温恒流电泳仪(BIORAD),超净工作台(中国苏州),一次成像像机(Polaroid),微波炉(Grantz),DNA 核酸测序仪(ABI 公司)。

实验材料:人舌鳞癌 Tca8113 细胞系由上海第二医科大学口腔医学院何荣根教授惠赠。质粒:含人内皮抑素 cDNA 基因片断的真核表达重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 由中山大学北校区生物化学研究室提供。限制性内切酶 Sal I 和 Nhe I;大肠杆菌 JM109;质粒提取盒;Blasticidin S 抗生素;阳离子型脂质体 LipofectamineTM Reagent;培养液 RPMI 1640 和胎牛血清;免疫组织化学 S-P 试剂盒及抗人 Endostatin 多克隆抗

[收稿日期 2003-05-28; 修回日期 2003-10-15]

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30271423);广东省医学科学技术研究基金(2003A025)

[作者简介]潘朝斌(1965-),男,广西人,副教授,博士

[通讯作者]黄洪章, Tel: 020-81332507

体, CD₃₄ 单克隆抗体 (QB Eend/10) 和 VEGF (JH121) 多克隆抗体; 其他试剂。

1.2 方法

1.2.1 真核表达重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 的扩增
参照金冬雁等³ 介绍的方法, LB 平板及 LB 培养基的 Blasticidin S 抗生素终浓度为 100 μg/ml。扩增步骤包括: 大肠杆菌 JM109 感受态细胞制备。细菌的转化。真核表达重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 扩增。

1.2.2 真核表达重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 的提取及鉴定 采用 QIAGEN 大剂量质粒提取试剂盒大量提取质粒。鉴定包括: 重组质粒酶切鉴定。酶切产物鉴定在电泳上进行, 用 DNA 分子量标准物同时进行电泳。p^{BLAST}-hEndostatin 质粒 DNA 核酸序列测定: 由宝灵曼公司以 ABI 373 自动测序仪进行分析。

1.2.3 细胞复苏和培养 细胞至 80% 融合后传代培养。

1.2.4 质粒的转染 转染步骤为: 舌鳞癌细胞 Tca8113 以 1 × 10⁵ 接种 6 孔板, 待细胞生长到 50% ~ 80% 融合时开始转染。转染过程按 LipofectaminTM Reagent 说明书进行。将 2 μg 真核表达重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 溶解至 100 μl 无血清 RPMI 1640 培养液, 同时将 20 μl LipofectaminTM Reagent 用无血清 RPMI 1640 培养液稀释至 100 μl。以含质粒和脂质体 LipofectamineTM Reagent 的上述混合液转染孔内细胞。

1.2.5 阳性克隆筛选 p^{BLAST}-hEndostatin 转染 Tca8113 细胞 48 h 后进行阳性转染细胞的筛选。将配制的 Blasticidin S 溶液加入含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液, 使 Blasticidin S 的最终浓度达到 100 μg/ml。用含 Blasticidin S 的培养液, 筛选具有 bsr 抗性的阳性转染克隆, 持续传代培养, 直至获得增殖稳定的转染细胞——p^{BLAST}-hEndostatin-Tca8113。

1.2.6 免疫组织化学 S-P 法检测 p^{BLAST}-hEndostatin-Tca8113 细胞内 hES 蛋白表达 标本的制备: 以 5 × 10⁵ 细胞/孔接种 6 孔板, 板底放置盖玻片, 共 4 张 6 孔板, 计 24 孔。其中 12 孔作阳性克隆细胞 p^{BLAST}-hEndostatin-Tca8113 的培养, 另 12 孔作 Tca8113 细胞培养, 方法相同, 但其过程中 Tca8113 和空白质粒 p^{BLAST} 与 Lipofectamin 混合液混合。加入含 10% 胎牛血清的培养液, 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下孵育上述细胞 96 h。后去除培养液, 待细胞爬片自然干燥, 以作免疫组织化学 (immunohistochemistry, IM) 检测。免疫组织化学 S-P 方法检测转基因 Tca8113 细胞内 hES 蛋白表达: hES 蛋白显色反应指标: 每片随机选择 4 个高倍镜视野, 计算 100 个细胞中的阳性细胞数, 取平均数, 作为显色指数。显色指数为 (0 ~ 1)、(1 ~ 25)、(25 ~ 50)、(50 ~ 100) 时相应显色反应度依次定为阴

性 (-), 阳性 (+), 较强阳性 (++) 和强阳性 (+++)。

1.2.7 Western blot 检测 ES 蛋白的表达 对转基因 Tca8113 细胞体外培养 96 h, 细胞于 -80 °C 保存备用。100 μg 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜; 杂交后将硝酸纤维素膜与 10 ml Lumi-CLO 作用, 室温 1 min。然后将硝酸纤维素膜放入暗盒中, 暗室内将 X 线片放置硝酸纤维素膜上, 曝光, 记录结果。

1.3 统计学处理

Fisher 精确概率法。在电脑中应用 SPSS8.0 软件包进行分析。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 人舌鳞癌 Tca8113 细胞系的体外培养结果

在培养液 RPMI 1640 (含 10% 胎牛血清) 于 37 °C, 5% CO₂ 温箱中培养, 显微镜观察见细胞呈多边形, 排列规则, 大小及染色均匀一致。

2.2 p^{BLAST}-hEndostatin 质粒的扩增和提取

p^{BLAST}-hEndostatin 阳性转化的大肠杆菌 JM109 能在含有 Blasticidin S 的 LB 平板形成良好的单菌落, 并在含有 Blasticidin S 的 LB 培养基中大量扩增, 经过 QIAGEN 大剂量质粒提取试剂盒提取质粒后, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳证明 p^{BLAST}-hEndostatin 质粒提取成功。

2.3 重组 p^{BLAST}-hEndostatin 酶切鉴定及测序

提取之质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 经限制性内切酶 Sal I 和 Nhe I 双酶切后在电泳胶带上得到一分子量约为 550 pb 片段 (图 1), 大小与预测的基因片段一致。质粒 DNA 核酸序列测序与已知的 hEndostatin 序列一致。

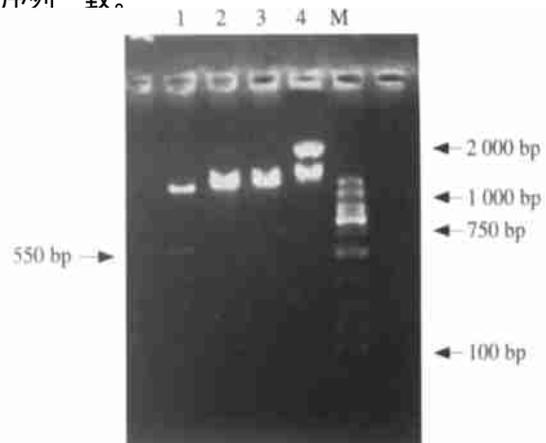


图 1 p^{BLAST}-hES 双酶切结果

带 1: Sal-I 和 Nhe-I 双酶切后, 带 2: Sal-I 单酶切后, 带 3: Nhe-I 单酶切后, 带 4: 完整质粒, 带 M: DNA 标准分子量

Fig 1 Restriction mapping of recombinant p^{BLAST}-hES

2.4 p^{BLAST}-hEndostatin-Tca8113 阳性克隆筛选结果

重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 转染 Tca8113 细胞 24 h 后加入 Blasticidin S (终浓度为 100 μg/ml), 与未转染质粒的 Tca8113 细胞作对照。含 Blasticidin S 100 μg/ml 终浓度的 RPMI-1640 培养液培养转化后, 实验组部分细胞失去贴壁生长能力。更换培养液, Blasticidin S 浓度降到 50 μg/ml, 继续培养, 转基因细胞多数仍贴壁生长, 但增殖缓慢, 而对照组 (未转染) 的细胞经 Blasticidin S 筛选已全部死亡浮起。转染细胞经 1 周的培养传代形成小集落。挑选集落传代。经传代后细胞生长和增殖仍以集落方式出现。阳性转染细胞克隆贴壁生长 (图 2), 表明真核表达质粒转染成功, 转染 hES 基因的 Tca8113 细胞有 Blasticidin S 抗性基因 bsr 表达。

2.5 免疫组化 S-P 检测 ES 在转染 hEndostatin 基因 Tca8113 细胞中的表达

选用阳离子型脂质体 Lipofectaimin, 与重组质粒 p^{BLAST}-hEndostatin 和空白质粒 p^{BLAST} 分别转染 Tca8113 细胞, 经免疫组织化学 S-P 法检测发现实验组 (p^{BLAST}-hEndostatin-Tca8113 细胞组) 细胞全部染成棕色或棕褐色 (图 3), 强阳性 (+++) 率为 100%, 而对照组 (p^{BLAST}-hEndostatin 细胞组) 无阳性染色细胞。ES 染色主要位于细胞质中。经精确概率法检验, $P = 0.000$, 差异具有显著性, 证明转 hEndostatin 基因的 Tca8113 细胞可高效表达 ES。

2.6 Western blot 结果

与未转染对照组比较, 转染组在 20 kD 处出现强的染色带, 说明 ES 在转基因细胞中有强表达。



图 2 转染 hES 基因 Tca8113 细胞克隆 直接显微镜观察 ×200
Fig 2 hES-Tca8113 cell clone without staining ×200

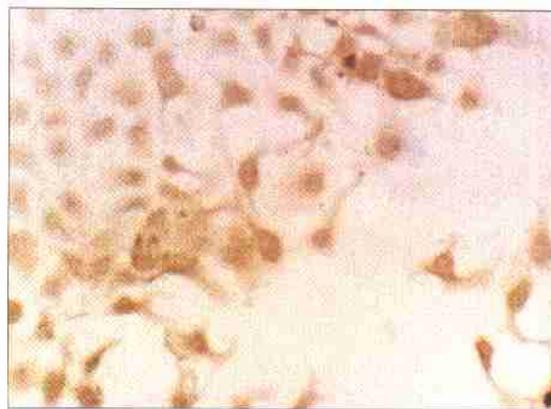


图 3 转染 hES 基因细胞爬片免疫组化呈阳性 Endostatin 染色 ×200

Fig 3 Expression of the brown protein appeared in the cell transfected Endostatin ×200

3 讨论

基因治疗的载体要求转导效率高, 表达稳定, 安全性好, 而且能够反复使用。选用一种高效、安全、使用简单的转染方法对基因治疗推广应用极为重要。尽管病毒性载体由于它们具有体外高效转染性, 一些学者以病毒为载体转染 Endostatin 基因到大肠杆菌等原核细胞, 获得了高表达的菌种^{3~5}。但这些研究的主要目的是 ES 的诱导表达及提取, 以作内皮抑素蛋白抑瘤效应的观察。模拟临床的给药途径, 如通过肌肉内注射, 瘤体注射或静脉注射含基因质粒, 考虑到对人体安全性和毒性问题, 病毒载体并不适宜在体内反复应用。相反, 脂质体作为载体已被证明毒性极低, 应用简单。本研究选用的载体为阳离子型脂质体 LipofectaminTM Reagent, 该脂质体能提高转染效率, 对于表达 -半乳糖苷的真核细胞可达 90% 阳性转染⁶。实验结果显示转基因细胞能在含 Blasticidin S 培养基中生长, 证明转染成功。质粒真核表达载体 p^{BLAST} 为一种无需克隆的即用型表达载体, 可用于基因的体内外转染, 转染迅速而且效果稳定。由于该质粒载体的结构中 HLV-的 5' VTR 区域连接有 EF-1 启动子, 因而可显著提高所携带基因的表达。p^{BLAST} 表达载体体内外都可提高 hEndostatin 基因表达 (Invitrogen 网页相关说明)。

本实验成功地大剂量提取质粒, 该重组质粒经双酶切鉴定及基因 DNA 序列测定, 证明了质粒中含有人 ES 素基因片段。由于重组质粒结构中有 bsr 基因, 其表达蛋白能对抗 Blasticidin S 抗生素。通过含 100 μg/ml Blasticidin S RPMI-1640 培养液培养, 转染 p^{BLAST}-hEndostatin 的 Tca8113 细胞由于具有 bsr 抗性基因能正常生长及传代增殖, 而未转染 hEndostatin 基因的 Tca8113 细胞死亡。经 Blasticidin S 的筛选, 成功建

立了 p^{BLAST}-hEndostatin Tca8113 细胞克隆。

免疫组织化学及 Western blot 方法证明 p^{BLAST}-hEndostatin-Tca8113 细胞在培养了 96 h 后能有效地表达 ES。实验中发现实验组的培养液(细胞间)中含有 ES,说明肿瘤细胞具有表达并分泌 ES 的能力。在 Chen 等⁷ 的研究中,他们同样以脂质体介导转染 hEndostatin 到乳腺癌细胞系,体内外实验均证明分泌型 ES 在肿瘤细胞和循环中存在。为了证明转染基因肿瘤细胞分泌 ES 的活力,他们通过对培养液的提取和分析,发现人 ES 的量达到了 610~724 ng/ml。有关 ES 浓度与内皮细胞增殖的相关性研究中揭示,在培养液中,当 ES 的浓度达到 1 ng/ml 时,内皮细胞的增殖率下降 50%⁷。另有研究侧重于宿主分泌 ES 的时间与浓度的关系。通过商品化的 ELISA 试剂盒来检测人 ES 的分泌量,Blezinger 等⁸ 发现,以 2 μg DNA 质粒转染 2.5 × 10⁵ 肾癌细胞 48 h,在其 2 ml 培养液中人 ES 的浓度已达到 5 ng/ml,第 7 天达到高峰,随后逐渐下降,到 14 d 还能检测到 ES。这些研究不仅证明了携带 hEndostatin 基因的宿主可以表达及分泌 ES,而且揭示了 ES 分泌的一些规律,为 hEndostatin 基因治疗打下了基础。Chen 等⁷ 直接从携带 hES 基因的乳腺癌细胞培养液中分离出人的 ES,并在动物实验中以碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)诱导局部组织的血管生成,后注入上述人 ES,结果证明了该分泌型 ES 具有很强的抑制血管生成活性。温玉明等⁹ 的研究表明,口腔癌组织中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)强表达,该 VEGF 促进肿瘤血管生成,为肿瘤的生长和转移提供了前提条件。笔者认为,以脂质体介导法转染 hEndostatin 于 Tca8113 肿瘤

细胞能达到表达及分泌具有活性的 ES 目的。该方法可有望用于肿瘤的治疗¹⁰。

[参考文献]

- 1] O'Reilly MS, Boehm T, Shying Y, et al. Understating: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth J. Cell, 1997, 88(2): 277-285.
- 2] Cohen J. Behind the headlines of endostatin ups and downs J. Science, 1999, 283(5406): 1050-1257.
- 3] 金冬雁,黎孟枫译.分子克隆实验指南M. 第二版.北京:科技出版社,1992:38-39.
- 4] Nguyen JT, Wu P, Clouse ME, et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of anti angiogenic factors as an antitumor strategy J. Cancer Res, 1998, 58(24): 5673-5677.
- 5] 赵跃然,游力,张健,等.人内皮抑素基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达 J. 中国生化药物杂志,2000, 21(6): 271-273.
- 6] Li X, Fu GF, Fan YR, et al. Potent inhibition of angiogenesis and liver tumor growth by administration of an aerosol containing a transferring-liposome-endostatin complex J. World J Gastroenterol, 2003, 9(2): 262-266.
- 7] Chen QR, Kumar D, Stass SA, et al. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice J. Cancer Res, 1999, 59(14): 343-346.
- 8] Blezinger P, Wang J, Gondo M, et al. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene J. Nat Biotechnol, 1999, 17(4): 343-348.
- 9] 温玉明,于大海,王昌美,等.血管内皮细胞生长因子-C在口腔中的表达及与颈淋巴结转移关系 J. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(1): 5-8.
- 10] Sacco MG, Cato EM, Ceruti R, et al. Systemic gene therapy with anti-angiogenic factors inhibits spontaneous breast tumor growth and metastasis in MMTVneu transgenic mice J. Gene Ther, 2001, 8(1): 67-70.

(本文编辑 王 晴)

《中国口腔医学年鉴》第十一卷出版发行

四川大学华西口腔医学院周学东教授主编,全国口腔医学院校近百名口腔医学专家、学者共同编撰的《中国口腔医学年鉴》第十一卷,已由四川科学技术出版社正式出版。

本卷作为我国口腔医学界的一部史记性、综合性和资料密集型的连续出版物之一,设立了回顾、论坛、全国优秀博士学位论文摘登、文选、述评、口腔医学文献题录索引、教育、人物、口腔医学组织机构、记事和特载等 10 个栏目,全面准确地记录和反映了 2002 年间我国口腔医学临床、科研和教学等领域的最新发展动态和学术水平,我国口腔医学领域的重大事件。本书内容丰富翔实,是我国口腔医学建设和发展阶段重要的工具书,尤其适用于口腔医学研究生阅读。

本书 40 万字,16 开,精装,每册定价 50.00 元(邮购加挂号费 6.00 元)。

欲购者请汇款至成都市人民南路三段 14 号(邮编 610041)《中国口腔医学年鉴》编辑部,联系电话:028-85502414,028-85503479;E-mail:hxkqbj@s@mail.wcums.edu.cn