

Fas/APO -1 基因转染 食管癌 Eca-109 细胞及其表达

张德海¹, 刘 锐², 刘惠萍¹

摘要:目的 通过将 Fas/APO -1 基因转染食管癌细胞,比较转导前后基因及蛋白的表达水平。方法 运用已构建的 Fas/APO -1 真核表达质粒,用脂质体介导法将目的基因导入 Eca-109 细胞,筛选克隆细胞以 Southernblot,Northernblot,Westernblot 法检测 Fas/APO -1 基因的表达。结果 转导株与非转导株均有 Fas/APO -1cDNA 的表达,但转导株在基因及蛋白水平的表达均明显高于非转导株。结论 Fas/APO -1 基因在食管癌细胞中处于低表达状态;通过基因转导能有效增强其表达。

关键词:食管癌;Fas/APO -1;基因转染;基因表达

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2002)06-0465-03

Expression of Fas/APO -1 in human esophageal cancer cell strains transduced with Fas/APO -1 gene

ZHANG De-hai, LIU Kun, LIU Hui -ping

Department of Thoracic Surgery, Lanzhou General Hospital,
Lanzhou Command of PLA, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To compare the expression level of Fas/APO -1 gene in genes transfected and not transfected esophageal cancer cell strains through transduction of Fas/APO -1 gene into esophageal cancer cells. **Methods** The reconstructed plasmid expressing Fas/APO -1 gene with lipofectamine was transduced into esophageal cancer cell line Eca-109. Then the positive clones were chosen and the expression level of Fas/APO -1 gene was determined by the means of Southern blot, Northern blot and Western blot. **Results** The blotting results showed that Fas/APO -1 cDNA was expressed in both genes transfected and not transfected cell strains, but the expression level of Fas/APO -1 mRNA and protein in genes transfected cell strain was much higher than that in genes not transfected cell strain. **Conclusion** The expression level of Fas/APO -1 gene, which was very low in esophageal cancer cells, could be enhanced by the means of gene transduction efficiently.

Keywords: Esophageal cancer; Fas/APO -1; Gene transfection; Gene expression

恶性肿瘤病因学研究表明:肿瘤的发生不仅与细胞的过度增殖有关,而且与细胞的死亡速度有关,即细胞凋亡的减少。细胞凋亡是一种生理条件下的细胞程序化死亡,其生理学功能在于维持正常细胞数量在组织及器官生长与死亡之间的动态平衡。故诱发细胞程序性死亡,目前已成为进行恶性肿瘤治疗新的研究思路^[1]。细胞表面 Fas/APO -1 蛋白分子是一种凋亡信号受体,它与其配体或抗 Fas/APO -1 单克隆抗体特异性结合,可诱导靶细胞发生凋亡^[2]。我们将 Fas/APO -1cDNA 导入食管癌细胞,并观察了 Fas/

APO -1 基因在转导株的表达,期望为食管癌转基因治疗提供有意义的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

食管癌细胞系 Eca-109 购于中国医学科学院肿瘤医院研究所,脂质体 Lipofectamine 购于 GIBCOBRL 公司。Fas/APO -1 抗体购于北京中山生物技术公司; [³²P]dATP 购自北京亚辉公司;G418,胎牛血清及硝酸纤维素膜购于 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

食管癌细胞 Eca-109 以 RPMI-1640-100ml/L FBS 进行常规培养,每两天换一次液。

1.3 重组载体的构建

详见参考文献[3]。

收稿日期:2001-12-20;修回日期:2002-03-15

作者单位:1.730050 兰州军区兰州总医院胸心外科;2. 第四军医大学

1.4 基因转导与克隆筛选

参照 GIBCOBRL 提供的 lipofectamine 介导法所附说明书进行,细胞分 3 组: 组为对照, 组转 pBK-CMV 空载体, 组转 Fas/APO -1 重组载体。取 10 μ g 纯化的质粒 DNA, 溶于 100 μ l 无血清培养基中, 与 20 μ l lipofectamine 混合, 置室温 15min; 转染 35mm 培养皿中处于对数生长期的 Eca109 细胞 (2 $\times 10^5$ cells/孔)。48h 后, G418 筛选转染细胞。克隆细胞形成后, 逐个计数, 随机挑选克隆, 大量扩增抗性细胞。

1.5 转染细胞 Fas/APO -1 基因及表达产物的检测

(1) SouthernBlot 和 NorthernBlot 收集生长状态良好的 1 $\times 10^7$ 细胞, 按细胞裂解法^[4] 提取基因组 DNA, 经 EcoRI 消化后, 普通琼脂糖凝胶电泳; 按异硫氰酸一步法^[4] 提取基因组总 RNA, 经热变性后, 甲醛变性凝胶电泳。经真空转移法转移基因 DNA 和总 RNA 至硝酸纤维膜上, 以同位素 [32 P]dATP 标记随机引物法进行预杂交、杂交及自动显影。(2) WesternBlot 裂解细胞制备细胞膜蛋白, 采用真空转移法将蛋白转移至硝酸纤维素滤膜并封闭, 常规 ABC 法结合抗体, 通过放射自显影技术显色。

2 结果

2.1 Fas/APO -1 转导株的建立

基因转导后, 转导株及对照组各 1 $\times 10^5$ 细胞经 G418 筛选 10 ~ 20 天, 空载体和 Fas/APO -1 表达载体转染的细胞培养孔内逐渐出现抗性克隆, 见图 1。经计算发现, 转导率在 0.15% 以上。而非转导株以同剂量的 G418 筛选 2 周, 细胞即已完全死亡。随机挑选 2 个生长状态良好的阳性克隆, 进行扩增培养, 结果筛选出稳定的抗性细胞株 pBK-Fas/APO -1 Eca109。



图1 Eca109 细胞抗性克隆形成

2.2 转染细胞 Fas/APO -1 基因 DNA 的检测

Southernblot 杂交放射自显影结果显示, 转导后的细胞基因组 DNA 在 2.5kb 处均有 Fas/APO -1 表达, 而表达载体转导株在 1.8kb 处也有一条显影带, 其大小与表达载体携带的片段一致。转导空载体的阳性重组细胞 pBK- Eca109 则没有 Fas/APO -1 杂

交带显示, 见图 2。

2.3 转染细胞 Fas/APO -1mRNA 的检测

NorthernBlot 杂交结果显示: 非转导细胞和空载体转导细胞以 5 $\times 10^6$ cells 的总 RNA 电泳转膜杂交, 仅有微弱的显影, 而 Fas/APO -1 转导株 1 $\times 10^6$ cells 的总 RNA 电泳转膜杂交, 具有很强的杂交信号, 且随着细胞数量增加, 信号不断增强, 表明有较高水平的 Fas/APO -1mRNA 表达, 见图 3。

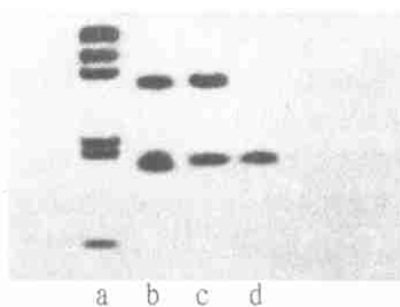


图2 Southernblot

a. DNAMarker/Hind b. ECA-109-Fas/APO -1 cells/3 $\times 10^6$
c. ECA-109-Fas/APO -1 cells/4 $\times 10^6$ d. ECA-109 cells/4 $\times 10^6$

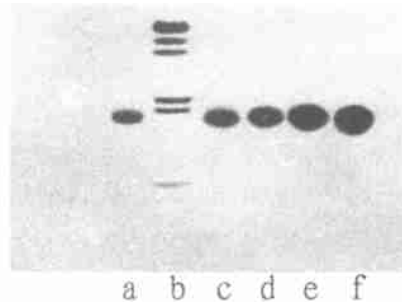


图3 Northernblot

a. ECA-109 cells/5 $\times 10^6$ b. RNAMarker c. ECA-109-Fas/APO -1 cells/1 $\times 10^6$
d. ECA-109-Fas/APO -1 cells/2 $\times 10^6$ e. ECA-109-Fas/APO -1 cells/3 $\times 10^6$
f. ECA-109-Fas/APO -1 cells/4 $\times 10^6$

2.4 转染细胞 Fas/APO -1 蛋白表达的检测

Westernblot 结果显示, 未转染细胞出现非常弱的印迹着色, 而转染细胞 Fas/APO -1 抗体结合的蛋白出现较明显的印迹着色, 其大小与 Fas/APO -1 蛋白的相对分子量相符, 见图 4。

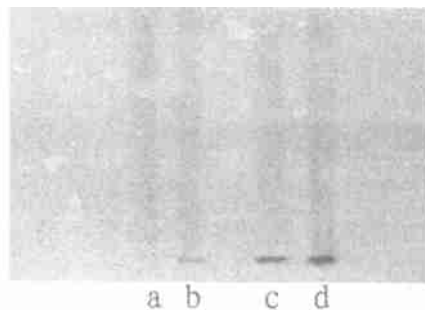


图4 Westernblot

a. ECA-109 cells/3 $\times 10^6$ b. ECA-109-Fas/APO -1 cells/1 $\times 10^6$ c. ECA-109-Fas/APO -1 cells/4 $\times 10^6$

3 讨论

随着凋亡相关基因的不断发现与克隆,利用基因转导技术诱导肿瘤细胞的凋亡,倍受人们的关注。

Fas/APO -1 基因产物是一种典型的型膜蛋白,属 TNF 和 NGF 受体家族成员。细胞表面 Fas/APO -1 分子与它的配体分子或抗 Fas/APO -1 抗体结合,可向细胞内传递死亡信号,使靶细胞在数小时内发生凋亡^[2]。有研究表明:肿瘤细胞对 Fas/APO -1 系统介导凋亡的敏感程度是由多因素决定的,可能涉及到多种调控机制。其中最基本的前提之一,即有功能的 Fas/APO -1 分子在肿瘤细胞表面的表达为 Fas/APO -1 依赖性细胞凋亡所必需,Fas/APO -1 缺陷的 Lpr 和 lpr^{cg}鼠由于不能够表达或表达不能向细胞内传递死亡信号的变异 Fas/APO -1,因而导致自身免疫性疾病^[5]。对于不表达或低表达 Fas/APO -1 受体的肿瘤细胞能否通过细胞因子的活化作用或基因转移来促进其表达并增加对抗 Fas/APO -1 抗体介导凋亡的易感性,值得进一步研究。

我们利用已构建的真核表达载体 pBK-Fas/APO -1cDNA, 转导 Eca109 细胞后,通过抗性筛选,有效地建立了 Fas/APO -1 基因表达株 Eca109-Fas/APO -1。我们用免疫印迹的方法从基因及蛋白水平检测

了人食管癌细胞系 Eca109 中 Fas/APO -1 的表达水平,结果显示其表达量极低;而通过脂质体介导法转染 Fas/APO -1cDNA 的 Eca109-Fas/APO -1 细胞较未转染株基因和蛋白的表达量则明显增高。从而,不仅证实了 Fas/APO -1 基因转导成功和能够进行有效的表达,同时,为食管癌细胞有机会结合大量的 Fas/APO -1 配体或抗 Fas/APO -1 抗体,向细胞内传递死亡信号,诱导食管癌细胞凋亡,提供了可能。这一结果也为今后进一步研究 Fas/APO -1 转基因表达在食管癌细胞的体内外生长抑制效应,以及临床基因治疗中的应用,奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] Kerr JFR, Wintertord CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy [J]. Cancer, 1994, 73 (4): 2013-2026.
- [2] Trauth BC, Klas C, Peters AM, Jettl M. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis [J]. Science, 1989, 245 (3): 301.
- [3] 张德海,肖冰. Fas/APO -1 基因真核噬菌粒表达载体的构建[J]. 西北国防医学杂志, 2001, 22 (2): 163-164.
- [4] 姜泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1996. 15-162.
- [5] Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations [J]. Immunol Today, 1995, 16 (1): 39-43.

(刘红武校对)

脾脏错构瘤 1 例报告

杨荣华,吕民生,梅建民,聂洪峰

关键词:脾肿瘤;错构瘤;脾切除术

中图分类号:R733.2 文献标识码:D

文章编号:1000-8578(2002)06-0467-01

脾脏错构瘤是一种罕见的脾脏良性肿瘤,于 2000 年收治 1 例,现报告如下。

1 临床资料

患者男性,53 岁,体检时发现脾脏实性占位性病变,一般检查未见异常。B 超见:脾门实性占位,中央为中、低回声,周边为较强回声晕,有环行血流,肿物边缘

不清晰,不能排除恶性变;CT 于脾门区见一直径 3cm 的低密度圆形影,增强后在动脉期明显变化,CT 值由 51.9Hu 到 141.6Hu,密度均匀,考虑脾血管瘤可能性大。剖腹探查见:脾门处有一直径 4cm 的肿物突出脾脏表面,呈暗红色,质地中等,表面光滑,与周围组织无粘连,行脾切除术。术后病理报告为脾脏错构瘤伴

紫斑样改变。

2 讨论

脾脏错构瘤发生率低,在脾切除术中发生率约为 3/20 万,近年来,由于体检开展,国内报道逐渐增多。Rappaport 认为:脾脏错构瘤是脾胚基早期发育错乱所致,造成正常构成成分的组合比例失调,即某些成分增多,某些成分减少,瘤内主要为失调的脾窦构成,大多数表现为单发的圆球形、分叶状的实性结节,边界清楚,无包膜。本例无不适症状,仅单位体检时发现,CT 和 B 超均提示血管瘤的可能性大,但不能排除恶性变,与错构瘤无完整的包膜一致。脾脏错构瘤术前 B 超和 CT 只作定位诊断,若在 B 超引导下穿刺活检,可发生大出血等严重的并发症,患者亦难于接受。因此,脾脏错构瘤大多依靠手术后的病理诊断。

(安凤校对)

收稿日期:2001-12-16;修回日期:2002-02-18

作者单位:100700 北京军区总医院肝胆外科