

HCV 核心基因转染对 QBC939 细胞凋亡及细胞周期的影响

李志花¹, 陈汝福², 谢德荣¹, 陈积圣²

(中山大学 1. 附属第二医院肿瘤科, 2. 肝胆外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究丙型肝炎病毒核心蛋白(HCV-C)对肝门部胆管癌细胞(QBC939)细胞凋亡及细胞周期的影响。【方法】将包含HCV-C基因的真核表达质粒pcDNA HCV-C和空载体,利用脂质体介导将其转染QBC939,经G418筛选获得稳定转染HCV-C的QBC939细胞(QBC939 HCV-C+),RT-PCR和免疫荧光法检测HCV-C蛋白表达,MTT法检测QBC939 HCV-C+细胞、空白质粒转染QBC939(QBC939pcDNA)细胞和未转染QBC939细胞生长增殖率;流式细胞术(FACS)检测3组细胞凋亡率和细胞周期,以及QBC939 HCV-C+细胞经Fas抗体诱导凋亡后的细胞周期变化。【结果】①QBC939 HCV-C+细胞增殖率显著高于空白质粒转染QBC939和未转染QBC939细胞增殖率;②细胞未经Fas抗体诱导凋亡时,QBC939 HCV-C+细胞S期(20.1%±1.8%)高于未转染QBC939细胞S期(14.2%±3.6%),QBC939 HCV-C+细胞凋亡率(5.0%±0.7%)低于无HCV-C转染QBC939细胞凋亡率(9.2%±0.7%);③QBC939 HCV-C+细胞经Fas抗体诱导凋亡时,细胞S期低于未经诱导凋亡细胞S期。【结论】HCV-C蛋白具有抑制QBC939细胞凋亡和促进细胞增殖作用。

关键词 肝炎病毒,丙型,核心蛋白;细胞凋亡;细胞周期;胆管癌

中图分类号 R735.35

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2004)02-0119-03

The Effect of Hepatitis C Virus Core Protein on Apoptosis and Cell Cycle of Hilar Cholangiocarcinoma Cells

LI Zhi-hua¹, CHEN Ru-fu², XIE De-rong¹, CHEN Ji-sheng²

(1. Department of Oncology, 2. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To explore the effect of hepatitis C virus core protein (HCV-C) on apoptosis and cell cycle of hilar cholangiocarcinoma cells(QBC939). 【Methods】The recombinant plasmid (pcDNA-HCVC) including the gene of HCV-C and the vector-alone were transfected into QBC939 with -liposome. Then it was selected with G418 and resistant colonies (QBC939 HCV-C+) were obtained. The colonies were identified by reverse transcription PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry. The growth rate of QBC939 HCV-C+, QBC939 pcDNA and QBC939 were detected by MTT assay. The apoptosis rate and cell cycle of this three group cells were detected by flow cytometry (FACS). The change of cell cycle of QBC939 HCV-C+ which was induced apoptosis by Fas antibody was also detected by FACS.【Results】①The cell proliferation rate of QBC939 HCV-C+ was significantly higher than that of QBC939 pcDNA and QBC939; ②When all cells were not induced by Fas antibody, the S stage percentage(20.1%±1.8%) of QBC939 HCV-C+ was higher than that of QBC939(14.2%±3.6%) and the apoptosis rate of QBC939 HCV-C+ was lower than that QBC939 without being tansfected by HCV-C. ③When the QBC939 HCV-C+ was induced apoptosis by Fas antibody, the apoptosis rate of QBC939 HCV-C+ was lower then that of the cells without being induced. 【Conclusion】HCV-C

收稿日期 2003-06-17

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2002031291)

作者简介:李志花(1964-),女,山东东营人,学士,讲师. E-mail: chenrf63@163.com

protein may contribute to hilar cholangiocarcinoma cell proliferation and reduce hilar cholangiocarcinoma cells apoptosis.

Key words: hepatitis C virus core protein; apoptosis; cell cycle; hilar cholangiocarcinoma
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(2): 119-121, 134]

我们在以往的研究中已证实肝门部胆管癌组织中不但有丙型肝炎病毒核心蛋白(HCV C)的高表达,同时存在细胞增殖/细胞凋亡平衡状态和细胞周期的紊乱^[1,2]。但对于HCV C蛋白与细胞凋亡和细胞周期在肝门部胆管癌发生发展中的作用以及它们之间关系的研究缺乏深入的了解,为此本研究旨在探讨HCV-C对细胞凋亡及细胞周期调控的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

DNA 纯化试剂盒(QIAGEN),培养基DMEM,脂质体Lipofectamine2000、G418(均为GIBCO产品),RT-PCR逆转录试剂盒(Promega公司),鼠抗人HCV C蛋白的单抗(Santa Cruz Biotech公司产品),FITC标记山羊抗人IgG(武汉博士德),兔抗人Fas多克隆抗体(Santa Cruz公司),PcDNA HCV-C重组质粒(第三军医大学唐都医院冯志华博士馈赠),质粒pcDNA3.1(+),大肠杆菌JM109及肝门部胆管细胞系QBC939为我科保存的,流式细胞仪(FACS420)。

1.2 pcDNA HCV-C 重组质粒扩增、纯化和鉴定

按文献[3]进行。将重组真核表达质粒经抗生素筛选,PCR扩增、Xho I-Hind III双酶切证实重组真核表达质粒中包含目的片段HCV-C(600 bp),证实含有目的基因HCV-C的重组真核表达质粒构建成功。

pcDNA HCV-C及空白质粒pcDNA3.1转染QBC939,经脂质体介导转染QBC939,经G418筛选获得稳定转染重组真核表达质粒的QBC939细胞(分别称为QBC939 HCV-C+和空白质粒转染QBC939)。

1.3 RT-PCR 检测 QBC939 HCV-C+ 中 HCV-C mRNA 表达

按Trizol RNA提取试剂盒说明提取细胞RNA。细胞置于放有盖玻片的6孔细胞培养板中培养48 h后,细胞经冷丙酮固定30 min,滴加山羊血

清室温孵育20 min封闭;以鼠抗人HCV C蛋白的单抗(1:50)作为一抗孵育2 h,FITC标记的山羊抗鼠IgG(1:32)为二抗37℃孵育1 h,PBS漂洗3次;于荧光显微镜下观察HCV-C mRNA表达。

1.4 MTT 法检测 HCV-C 蛋白对 QBC939 细胞增殖率的影响

分别接种 2×10^4 个QBC939 HCV-C+、空白质粒转染QBC939和未转染QBC939细胞于96孔细胞培养板中,每孔200 μL,同时设细胞对照孔和培养液调零孔。培养48 h后加入MTT(甲基噻唑蓝四氮唑蓝)20 μL于37℃继续孵育,4 h后终止培养。每孔加DMSO(二甲基亚砷)150 μL,震荡10 min,使结晶物充分溶解,以上实验重复2次。用酶标仪在490 nm波长下测定吸光度A,计算肿瘤细胞抑制率:IR%=(1-试验孔A值/对照孔A值)×100%。

1.5 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡

分别传代 2×10^5 个QBC939 HCV-C+、空白质粒转染QBC939和未转染QBC939细胞至6孔细胞培养板中培养72 h,细胞经胰酶消化后用冷70 mL/L乙醇固定细胞于4℃保存,细胞经流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期情况。

1.6 Fas 抗体诱导 QBC939 细胞凋亡

HCV-C转染QBC939首先培养48 h后加入Fas抗体(200 ng/mL)后再培养24 h,细胞经流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期情况。

1.7 统计学处理

用SPSS10.0软件进行统计分析:多组之间进行比较采用方差分析,当 $P < 0.05$ 时,采用LSD法分别进行两两比较;两组之间进行比较采用成组设计t检验。

2 结果

2.1 pcDNA HCV-C 重组质粒酶切鉴定

用限制性内切酶Xho I-Hind III,将pcDNA HCV-C重组质粒切成2条片段,证明插入片段和载体的大小均正确,见图1。

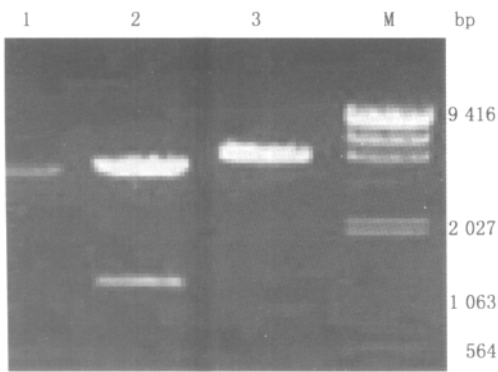


图 1 pcDNA HCV-C 重组质粒酶切鉴定

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis map of the recombinant plasmid pcDNA HCV-C

M :DNA marker λDNA / Hind III ; 1 :pcDNA3 ; 2 :pcDNAHCV-C cut with Xho I-Hind III ; 3 :pcDNAHCV-C

2.2 PCR 检测转染 HCV-C 转染 QBC939 细胞中 DNA 表达

经 RT-PCR 检测证实 HCV-C 转染 QBC939 细胞中有 HCV-C mRNA 和蛋白质表达, 而未转染 QBC939 细胞和空白质粒转染 QBC939 细胞中无 HCV-C 表达, 见图 2。

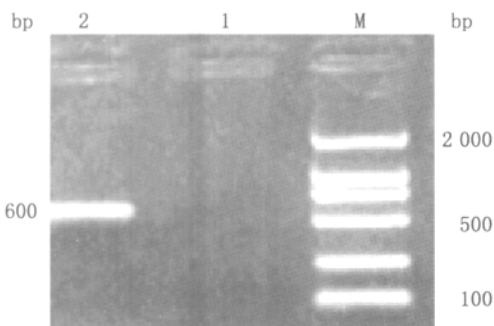


图 2 PCR 产物

Fig. 2 The PCR product (2% Electrophoresis)

M :DNA marker DL2000 ; 1 :pcDNA3 QBC939 ; 2 :pcDNAHCV-C QBC939

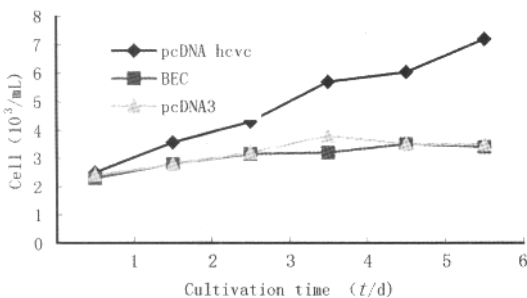


图 3 hcvc 基因转染对 QBC939 细胞增殖的影响

Fig. 3 The effect of HCVC on QBC939 cell proliferation ($\bar{x} \pm s$)

2.3 HCVC 基因转染对 QBC939 细胞增殖的影响

QBC939 HCV-C + 细胞组生长增生率高于空白质粒转染 QBC939 组和未转染细胞组, 说明 HCV-C 蛋白促进 QBC939 细胞生长增生, 见图 3。

2.4 HCV-C 蛋白对 QBC939 细胞周期的影响

表 1 结果说明细胞未经 Fas 抗体诱导凋亡时, QBC939 HCV-C + 细胞凋亡率低于未转染 QBC939 细胞凋亡率, 同时 QBC939 HCV-C + S 期所占百分率高于未转染细胞 QBC939 细胞 S 期所占百分率 ($P < 0.05$) ; 表 2 结果显示 QBC939 HCV-C + 经 Fas 抗体 (200 ng/mL) 作用后凋亡率显著增加, 并且细胞凋亡增加时 S 期所占百分率少于未经 Fas 抗体诱导凋亡对照组 S 期所占百分率 ($P < 0.05$)。

表 1 HCV-C 蛋白对 QBC939 细胞周期的影响

Table 1 The effect of hepatitis c virus core protein (HCV-C) on cell cycle of QBC939

Group	n	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis rate %
QBC939	6	70.5 ± 5.2	14.2 ± 3.6	15.3 ± 2.4	9.2 ± 0.7
QBC939 HCV-C +	6	66.5 ± 1.9	20.1 ± 1.8	13.4 ± 1.6	5.1 ± 0.7

表 2 细胞凋亡对 HCV-C 转染 QBC939 细胞周期的影响

Table 2 The effect of apoptosis on QBC939 HCV-C + cell cycle

Group	n	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis rate %
Not induced	6	64.0 ± 2.0	20.0 ± 1.8 ¹⁾	16.0 ± 1.4	5.6 ± 0.6 ¹⁾
Induced apoptosis by Fas antibody	4	69.6 ± 3.6	15.2 ± 2.2	15.2 ± 1.6	15.4 ± 1.5

¹⁾ Not induced compare with induced by Fas antibody, $P < 0.05$

3 讨论

胆管癌的发生不仅与细胞异常增殖和细胞凋亡的平衡稳乱有关, 也与细胞周期的异常有关。肿瘤细胞的自发凋亡是机体抗肿瘤的一种保护机制, 也是机体清除病毒的主要方式。目前 HCV-C 蛋白对细胞增生和细胞凋亡的影响还没有定论^[4, 5]。细胞增生、凋亡是受细胞周期调控的, 细胞周期分为 G0/1 期、S 期和 G2/M 期, 其中最关键的两期为 S 期和 M 期。不同生物细胞增生周期时间不同, 主要

(下转第 134 页 to page 134)

[5] 焦泽旭,庄广伦,周灿权,等. 对 β 地中海贫血携带者进行胚胎植入前遗传学诊断[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(4): 298-301.

[6] Hattori M, Yoshioka K, Sakaki Y. High-sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutation[J]. Electrophoresis, 1992, 13(8): 560-5.

[7] Zhang L, Cui X, Schmitt K, et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(13): 5847-51.

[8] Findlay I, Ray P, Quirke P, et al. Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis[J]. Hum Reprod, 1995, 10(6): 1609-18.

[9] Richitsky S, Strom C, Verlinsky Y. Allele dropout in polar bodies and blastomeres[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(5): 253-7.

[10] Ao A, Wells D, Handyside A H, et al. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(3): 140-4.

[11] Sermon K, De Vos A, Van de Velde H, et al. Fluorescent PCR and automated fragment analysis for the clinical application of preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy (Steinert's disease) [J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(8): 791-6.

[12] 李晓红,庄广伦,周灿权,等. α -地中海贫血种植前基因诊断妊娠成功[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(4): 268-9.

[13] Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, et al. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells [J]. Ann Hum Genet, 1998, 62(1): 9-23.

(编辑 张恩健)



(上接第 121 页 from page 121)

是由 G1 期持续时间所决定的,而且 G1 启动是细胞周期启动的关键,因此 G1/S 期的调控尤为重要。本实验结果表明 HCV-C 蛋白促进 QBC939 细胞由 G1 期进入 S 期,因此主要作用于 G1/S 调控点,可能启动并加速细胞周期进程,促进细胞增生和抑制细胞凋亡。HCV-C 蛋白作用于 G1/S 调控点的机制有待进一步研究。

细胞凋亡和增生分化是独立的两种方式,但细胞凋亡和增生分化可同时存在;细胞凋亡可发生在细胞周期不同时期,细胞凋亡与细胞增生并非一定成负相关。研究证实肝门部胆管癌组织中细胞凋亡率和增生率同时升高,并且存在增生/凋亡失衡^[2]。Kwun 等^[6]发现 HCV-C 蛋白通过抑制 P21 促进细胞增生,当 HCV-C 转染 HepG2 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡时 S 期百分率减少,细胞被阻滞于 G1 期,增生细胞对某些凋亡诱因的敏感性常依赖于细胞周期。但本实验结果表明,不管是 HCV-C 蛋白抑制细胞凋亡,还是由 Fas 抗体诱导细胞凋亡增加时都不是作用于 G2/M 期。细胞周期阻断与细胞凋亡关系不明确,并不是细胞周期阻断越完全越促使细胞凋亡,细胞周期阻断并不直接诱导细胞凋亡。

参考文献:

[1] 陈汝福,邹声泉,赵西平. 门部胆管癌组织中丙肝病毒核心蛋白表达的生物学价值[J]. 中华普通外科杂志 2001, (6) 243-4.

[2] 陈汝福,李志花,陈积圣,等. 丙肝病毒核心蛋白对肝门部胆管癌细胞增殖和细胞凋亡的调控作用[J]. 中华实验外科杂志 2002, 19(6) 510-1.

[3] 冯志华,周永兴,贾战生,等. 含有丙型肝炎病毒核心基因表达质粒构建及其基因免疫[J]. 中国免疫学杂志 2000, 16(2) :184-6.

[4] Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, et al. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Cancer, 2003, 97(12): 3036-43.

[5] Liu X F, Zou S Q, Qiu F Z. Construction of HCV-core gene vector and its expression in cholangiocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 135-8.

[6] Kwun H J, Jung E Y, Ahn J Y, et al. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3[J]. J Gen Virol, 2001, 82(9): 2235-41.

(编辑 黄小延)