

转染自杀基因 pCEAc-d-*tk* 的 SPC-A-1 细胞的死亡机制

郭语彬¹, 伍新尧², 骆晓枫¹, 李芳¹, 徐平¹, 何光耀¹

(中山医科大学 1. 生化教研室; 2. 法医学系, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨自杀基因 pCEAc-d-*tk*/前体药物体系旁观者效应的细胞死亡机制。【方法】提取质粒 pCEAc-d-*tk*, 转染到肺癌细胞株 SPC-A-1 中, 与未转染的细胞按 2:8 的比例混合后加到 96 孔培养板中(每孔 3×10^3), 加前体药物 5-FU ($5 \mu\text{mol/L}$) 和 GCV ($10 \mu\text{mol/L}$) 孵育 5 d 后, MTT 法测定细胞存活率而估计旁观者效应。取处理后的细胞, 提取 DNA, 琼脂糖凝胶电泳; Hoechst 染色后荧光显微镜观察及碘化丙啶(PD)染色, 流式细胞仪分析细胞周期。【结果】① SPC-A-1 细胞株在转染了 pCEAc-d-*tk* 体系后加前体药物存在明显的旁观者效应; ② 处理细胞的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈涂布状; ③ 处理细胞用荧光显微镜观察到形状变大, 无凋亡小体形成; ④ 流式细胞仪分析到细胞周期发生改变。【结论】SPC-A-1 细胞在转染了 pCEAc-d-*tk* 后存在旁观者效应, 这种旁观者效应引起的细胞死亡是一种坏死。

关键词: 自杀基因; 旁观者效应; 死亡

中图分类号: R334.34

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)02-0120-03

The Mechanism of Cell Death in SPC-A-1 Cell Line Transfected with Suicide Gene pCEAc-d-*tk*

GUO Yu-bin¹, WU Xin-yao², LUO Xiao-feng¹, LI Fang¹, XU Ping¹, HE Guang-yao¹

(1. Department of Biochemistry; 2. Faculty of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To study the mechanism of cell death of SPC-A-1 cell line transfected with pCEAc-d-*tk*. 【Methods】Plasmid pCEAc-d-*tk* was extracted and transferred into the SPC-A-1 cell line, then it was mixed with untransfected cells (2:8) and seeded onto the 96 well (3×10^3 /well). The prodrugs such as 5-FU ($5 \mu\text{mol/L}$) and GCV ($10 \mu\text{mol/L}$) were added and then cultured for 5 days. The survival rate of cells was measured by MTT assay, and the bystander effect was determined. Genomic DNA from the treated cells was extracted and subject to electrophoresis in 8 g/L agarose gel. Treated cells were stained by Hoechst 33342 and observed under the fluorescent microscopy, stained by propidium iodide for analysis with flow cytometry. 【Results】① The bystander effect of pCEAc-d-*tk*/prodrug system was observed after transfecting SPC-A-1 cell line with pCEAc-d-*tk*; ② The genomic DNA from the treated cells in electrophoresis in 8 g/L agarose gel showed smearing. ③ The treated cells were enlarged but no apoptotic body was observed under fluorescent microscopy when they were stained by Hoechst 33342. ④ S stage of treated cells was longer than that of untreated cells, it showed that there were some changes of cellular cycle in SPC-A-1 cells transfected with pCEAc-d-*tk*. 【Conclusion】There were bystander effect in SPC-A-1 cell transfected with pCEAc-d-*tk*, and it was necrosis rather than apoptosis.

Key words: suicide gene; bystander effect; cell death

自杀基因/前体药物体系的一个显著特点是存在旁观者效应。这种旁观者效应是指不仅转染了

收稿日期: 1999-07-30

基金项目: 在读博士研究生资助项目(331098)

作者简介: 郭语彬(1963-), 男, 湖南益阳人, 博士生, 伍新尧, 博士生导师, 课题负责人。

自杀基因的细胞可以被杀死,而且周围的未转染自杀基因的细胞也继之死亡。这种有趣的现象最早被 Moolten^[1] 用 *HSV-tk* 基因实验时发现。后来 Freeman^[2] 等人的实验也证实了旁观者效应的存在。现将我们前期构建的融合自杀基因^[3] 的旁观者效应细胞死亡机制的研究结果,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 质粒提取、纯化与鉴定

按照 QIAGEN Plasmid Midi Kit (100) 方法制备质粒 pCEAc-dtk, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0。分别用 *Hind* III、*Eco*R I 及 *Bam*H I 酶切鉴定。

1.2 细胞培养、转染及筛选

选用 SPC-A-1 (肺腺癌) 细胞培养 ($\varphi = 5\%$ CO_2 , $37^\circ C$), 选用 RPMI 1640 加 $\varphi = 10\%$ 灭活小牛血清做完全培养基, 用胰酶消化细胞后, 将 $500 \times 10^6/L$ 个细胞接种在 6 孔培养板上, 待细胞的密度大约为 60% 时转染。将 $5 \mu L$ 质粒 DNA ($1 g/L$), $15 \mu L$ ESCORT Transfection TM 脂质体 (Sigma) 及 $230 \mu L$ DMEM 培养基在体外混合, 室温放置 15 min, 再加到 6 孔培养板中, $37^\circ C$ 孵育 6 h 后, 弃去 DNA-ESCORT 混合液, 加入完全培养基继续培养, 24 h 后加入含 G 418 (GIBCO) $0.3 g/L$ 的选择培养基筛选, 直至出现阳性克隆。

1.3 细胞毒性测定

转染细胞大量培养后, 与未转染细胞按 2:8 比例加入到 96 孔培养板中, 每孔 3×10^3 , 加入不同浓度的前体药物 GCV ($0.1 \sim 1 mol/L$) 和 5-FC ($0.5 \mu mol/L \sim 5 mol/L$) 孵育 5 ~ 6 d 后加入 MTT ($2 g/L$) $50 \mu L$, $37^\circ C$ 孵育 4 h, 再加入溶剂二甲基亚砜 (Sigma) $150 \mu L$, 以 570 nm 为测定波长, 630 nm 为参考波长, 测定吸光度值。根据下列公式计算细胞存活率: 存活率 = 实验孔平均吸光度值 / 对照孔平均吸光度值 (%)。

1.4 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 变化

SPC-A-1 及 SPC-A-1/*cd-tk* 细胞加前体药物 GCV $10 \mu mol/L$ 和 5-FC $5 \mu mol/L$ 孵育 5 ~ 6 d 后, 收集各 2×10^6 个细胞。制备染色体 DNA。

1.5 Hoechst 荧光染色法

将培养后的细胞连同培养液收集到试管中, 加入 $2 mg/L$ Hoechst 33342 (Sigma), $37^\circ C$ 孵育 10

min, 然后滴入载玻片, 盖上盖玻片, 在 352 nm 光激发下, 细胞摄取 Hoechst 染料发 460 nm 蓝色荧光。

1.6 流式细胞仪分析细胞周期的变化

收集 5×10^5 个细胞, PBS 洗一次, 将细胞悬浮在 PBS 中, $\varphi = 70\%$ 乙醇固定, 然后用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色, 在 488 nm 激发光的激发下, PI 能发出 610 ~ 620 nm 的红色荧光。然后用流式细胞仪分析细胞周期的变化。

1.7 细胞生长曲线的绘制

转染细胞加前体药物与未转染细胞, 制成 $100 \times 10^9/L$ 悬液, 接种在 24 孔培养板中 (每孔 1×10^4 个细胞), 每日取 3 孔计数, 取均值绘制细胞生长曲线, 连续 7 d。

2 结 果

2.1 质粒 pCEAc-dtk 酶切鉴定结果

用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后的融合基因 *cd-tk* 长约 2.5 kb; *Eco*R I 和 *Bam*H I 切后的 *tk* 基因长约 1.2 kb; *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后的 *cd* 基因长约 1.3 kb (图 1)。

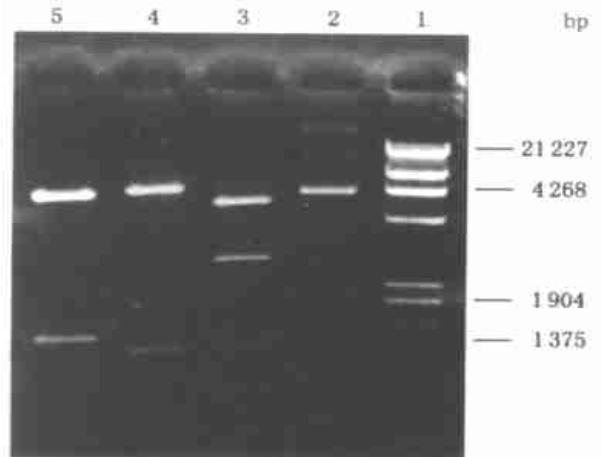


图 1 核酸内切酶法鉴定 pCEAc-dtk 重组质粒

Fig. 1 Identification of recombinated pCEAc-dtk cut with endonuclease

1. λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III; 2. pCEAc-dtk; 3. pCEAc-dtk/*Eco*R I + *Hind* III, *cd-tk* gene; 4. pCEAc-dtk/*Eco*R I + *Bam*H I, *tk* gene; 5. pCEAc-dtk/*Bam*H I + *Hind* III, *cd* gene

2.2 旁观者效应

转染细胞 SPC-A-1/*cd-tk* 和未转染细胞 SPC-A-1 按不同比例 (0、20%、40%、60%、80%、100%) 混合后, 分两种细胞密度 (5×10^3 个细胞/孔和 1×10^3 个细胞/孔) 接种在 96 孔培养板中, 加入 10

$\mu\text{mol/L}$ GCV 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 5-FC, 37°C 孵育 120 h, MTT 法测定每孔的吸光度, 然后计算细胞生长存活率。结果显示, 在转染细胞与未转染细胞的比例均为 20% 时, 细胞密度为 1×10^3 个细胞/孔时的细胞存活率为 31%, 而细胞密度为 5×10^3 个细胞/孔时细胞存率为 43%, 由此可见, 以细胞密度稀疏时旁观者效应也较为明显。故可以推测, *cd-tk* 的旁观者效应可能不依赖于缝隙连接, 而与通过细胞与细胞之间的介质传导有关。

2.3 琼脂糖凝胶电泳的分析

转染细胞与未转染细胞按 50% : 50% 的比例混合, 加前体药物 24、48 和 72 h 后, 提取细胞基因组 DNA, 琼脂糖电泳 DNA 图谱不呈梯状带而呈涂布状。

2.4 Hoechst 荧光染色

未转染细胞大小均一, 发弱蓝色荧光; 而转染细胞与未转染细胞 (50% : 50%) 混合后加前体药物 72 h, 部分细胞体积增大; 加前体药物 120 h 后, 可见变大的细胞发生崩解。

2.5 流式细胞仪分析细胞周期

转染细胞与未转染细胞以 1 : 1 混合后加前体药物孵育 72 h, 细胞周期发生明显变化, S 期 DNA 合成时间占 41.1%, 而未转染细胞为 10.8%。S 期 DNA 合成时间延长结合后面的细胞生长曲线分析, 细胞增殖被阻止在 S 期。另细胞形态发生改变, 体积明显较未转染细胞增大。

2.6 细胞生长曲线

未转染细胞 SPC-A-1 分裂增殖较快, 而转染细胞 SPC-A-1/ *cd-tk* 加前体药物 3 d 后, 细胞开始死亡; 到第 5 天, 转染细胞几乎全部死亡, 而未转染细胞正处于对数生长期。

3 讨论

Freeman^[2] 对 *HSV-tk* 基因的旁观者效应的机理进行了研究, 观察到转染了的 *HSV-tk* 基因的细胞染色质浓缩, 核固缩, 细胞体积变小, 所以他提出了 *HSV-tk* 基因的旁观者效应是一种凋亡, 细胞凋亡之后释放凋亡小体, 这种凋亡小体可以携带自杀基因或其表达的 tk 酶本身, 邻近的未转染细胞吞噬了这种凋亡小体继发凋亡 (虽然有许多研究认为

HSV-tk 基因的旁观者效应需要细胞与细胞间的缝隙连接的介导^[4])。这种凋亡学说后人未经进一步研究证实, 不过从现存的研究结果看来, 不同的自杀基因/前体药物体系引起旁观者效应死亡的机制各不一样^[5], 如 *cd* 基因的旁观者效应是通过介质传导, *tp* 基因的旁观者效应对缝隙连接并非必需。本实验的结果证明融合基因 *cd-tk* 的旁观者效应也通过介质传导。不论是通过何种方式传递了何种死亡信号, 均引起了细胞的死亡。这种死亡是凋亡还是坏死, 或者二者兼而有之?

从本实验结果看来, 融合基因 *cd-tk* 的旁观者效应引起细胞死亡的机制不是凋亡而是坏死。从形态学上看, Hoechst 荧光染色后细胞体积变大。当加前体药物孵育 120 h 后, 细胞发生崩解, 未找到凋亡小体。琼脂糖凝胶电泳分析细胞染色体 DNA 结果显示, 无典型 DNA 梯状带, DNA 呈涂片状, 且 PI 染色后流式细胞仪分析并未见亚二倍体峰。

参考文献:

- [1] Moolten F L. Tumour chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(10): 5276.
- [2] Freeman S M, Aboud C N, Whartenby K A, *et al*. The bystander effect: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(21): 5274.
- [3] 许道松, 伍新尧, 钟文奇, 等. CEA 启动子驱动 *cd-tk* 表达对 CEA 阳性肿瘤的杀伤作用 [J]. *癌症*, 1998, 17(5): 349.
- [4] Touraine R L, Ishii-Morita H, Ramsey W J, *et al*. The bystander effect in the *HSV tk* / ganciclovir system and its relationship to gap junctional communication [J]. *Gene Therapy*, 1998, 5(12): 1705.
- [5] Denning C, Pitts J D. Bystander effects of different enzyme prodrug systems for cancer gene therapy depend on different pathways for intercellular transfer of toxic metabolites: a factor that will govern clinical choice of appropriate regimes [J]. *Human Gene Therapy*, 1997, 8(15): 1733.

(编辑 张敏瑞)