

EB 病毒 *BHRF1* 反义寡核苷酸片段诱导 鼻咽癌 SUNE-1 细胞株的凋亡^①

朱振宇¹ 黄必军² 戴克胜¹ 张清秀¹ 马涧泉¹

(中山医科大学 1 生物化学教研室; 广州, 510089 2 肿瘤防治中心)

摘要 目的:观察 EB 病毒 *BHRF1* 反义寡核苷酸片段对鼻咽癌 SUNE-1 细胞株增殖的影响。**方法:**PCR、³H-TdR 的掺入法及电泳等。**结果:**PCR 从 SUNE-1 细胞 DNA 中扩增出 EB 病毒的 4 种(*BHRF1*、DNA 酶、胸苷激酶及核抗原-1)全基因片段;适当浓度 *BHRF1* 反义寡核苷酸片段能引起无血清培养的 SUNE-1 细胞株增殖受抑制;透射电镜及琼脂糖凝胶电泳检测结果发现与 SUNE-1 细胞发生凋亡有关。**结论:**适当浓度 *BHRF1* 反义寡核苷酸片段能抑制无血清培养的 SUNE-1 细胞株的增殖。

关键词 脱噬作用; 反义寡核苷酸类, 反义; 疱疹病毒 4 型, 人/遗传学; 聚合酶链反应; 鼻咽肿瘤/遗传学

中图分类号 R 373.11

EBV *BHRF1* ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDE INDUCES APOPTOSIS OF SUNE-1 CELL LINE

Zhu Zhenyu¹ Huang Bijun² Dai Kesheng¹ Zhang Qingxiu¹ Ma Jianquan¹

(¹ Department of Biochemistry ² Cancer Center Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To investigate the effects of EBV *BHRF1* antisense oligo-deoxynucleotide (ASO) on the proliferation of poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (SUNE-1) cell lines. **Methods:** Polymerase chain reaction (PCR), ³H-TdR incorporation and electrophoresis. **Results:** Intact *BHRF1*, DNase, thymidine kinase (TK) and nuclear antigen-1 gene fragments of EBV were amplified using PCR technique with DNAs from B₉₅₋₈ and SUNE-1 cell lines as template. Inhibited proliferation of SUNE-1 was observed in the absence of fetal calf serum (FCS) and exposed to *BHRF1*-ASO. The results from electron microscopy and agarose gel electrophoresis indicated that apoptosis appeared in SUNE-1 cells. **Conclusion:** Absence of FCS and exposed to *BHRF1*-ASO on proper concentration could inhibit proliferation of SUNE-1.

Subject headings apoptosis; oligodeoxynucleotide, anti-sense; herpes virus 4, human/genetics; polymerase chain reaction; nasopharyngeal neoplasms/genetics

细胞凋亡(apoptosis), 又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)是目前非常活跃的研究领域。细胞凋亡受到抑制可能是肿瘤发生的重要原因之一, 而促进肿瘤细胞凋亡将有助于治疗^[1]。已证实 Bcl-2 蛋白具有拮抗多种因素引起的细胞凋亡的作用^[2]。EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)存在于 95% 以上的鼻咽癌(nasopharyngeal

carcinoma, NPC)细胞基因组中^[3], 与 NPC 发生、发展及转归密切相关。EBV 的 *BHRF1* 的基因产物因与 Bcl-2 有 38% 同源性^[4], 对宿主细胞的生物学行为可能有重要影响。本研究用 EB 病毒 *BHRF1* 基因反义寡核苷酸片段干扰该基因的表达来影响 NPC 低分化细胞株(SUNE-1)增殖, 并初步探讨其发生机制。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

细胞株: B₉₅₋₈ 及人低分化鼻咽癌细胞株(SUNE-1)由本校肿瘤防治中心提供。EBV 的 4 种基因片段的 PCR 引物及 BHRF1 正义(SO)和反义(ASO)寡核苷酸片段(都是 20 bp)均由本室根据 EBV 的 172, 282 bp 全基因序列^[5]设计, 由基因公司合成。PCR 扩增试剂盒及 RPMI-1640 培养液, 购于基因公司。³H-TdR, 购于中国原子能研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 模板 DNA 的抽提及 PCR 扩增 按本室常规方法^[6]进行。

1.2.2 ³H-TdR 的掺入^[7] SUNE-1 细胞株按常规方法隔天胰酶消化及换液和传代培养。于换液、传代 8 h 后, 将细胞分为 A、A'、B、B' 4 大组, 每组各 6 瓶细胞(实验组 4 瓶, 对照组 2 瓶)。A、A' 组每瓶细胞数均为 5 × 10⁵, 各瓶均加入 ³H-TdR 2 μCi; B、B' 组每瓶细胞数均为 1 × 10⁶, 不加 ³H-TdR。A、B 组细胞均用含小牛血清的 1640 复合培养液培养; A'、B' 组细胞则用不含小牛血清的 1640 培养液培养, 同时进行下述操作(实验重复 3 次)。

1.2.3 反义寡核苷酸片段的加入 B、B' 组中的各实验组加入 BHRF1-ASO, 终浓度分别为 5, 10, 20 和 40 μmol/L; 对照组一瓶加入等体积生理盐水, 另一瓶加入与 EBV 基因无关的寡核苷酸片段, 终浓度为 c_B(URO) = 20 μmol/L。继续培养 36 h, 常规方法收集细胞。

1.2.4 SUNE-1 细胞株增殖情况的检测^[7] A、A' 组细胞经磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍后, 分别收集在纤维滤纸上, 烘干后检测其放射性核素计数值 (min⁻¹)。

1.2.5 细胞凋亡及其程度的检测 B、B' 组细胞按照本室方法^[8, 9]均进行透射电镜观察及 DNA 的抽提、琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 统计学处理 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 SUNE-1 的 PCR 扩增结果

以 B₉₈₋₈ 及 SUNE-1 细胞株 DNA 为模板, 经常规 PCR 扩增 BHRF1、DNA 酶、胸苷激酶及核抗原-1 基因片段, 其结果见图 1, 各扩增条带与其理论值相符。



图 1 EBV 的 4 种基因片段的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of EBV 4 gene fragments with PCR lane1: pBR332/ Bst N I (1 857, 1 060, 929, 383, 121 bp); lane 2, 7: nuclear antigen-1 gene fragment (564 bp); lane 3, 8: DNase gene fragment (1 460 bp); lane 4, 9: thymidine kinase gene fragment (1 843 bp); lane 5, 10: BHRF1 gene fragment (592 bp); lane 6: pGEM7Zf/ Hae III (657, 458, 434, 328, 289, 267, 174, 142, 102, 80, 40, 18, 11 bp); lane 2~5: B₉₅₋₈ cell line DNA as template; lane 6~10: SUNE-1 cell line DNA as template

2.2 SUNE-1 增殖情况

不同浓度的 BHRF1 反义寡核苷酸片段影响 SUNE-1 细胞株增殖的结果见表 1。从表 1 可见在本实验浓度范围内, BHRF1 反义寡核苷酸片段在常规培养条件下对 ³H-TdR 的掺入影响并不大; 在缺少小牛血清的培养条件下能明显抑制 ³H-TdR 掺入 SUNE-1 细胞, 且浓度越高, 抑制作用越明显, 但并不呈正比关系; 而相等浓度 EBV 则基因无关的寡核苷酸片段无此抑制作用(加 BHRF1-SO 的结果与加 EBV 基因无关寡核苷酸片段相似, 文中未列出)。

2.3 SUNE-1 的电镜观察

经不同浓度的 BHRF1 基因反义寡核苷酸片段处理后的 SUNE-1 细胞株, 只有缺血清培养组在常规透射电镜下可见较多量数目不等的凋亡细胞, 即出现细胞核凝缩, 但线粒体膜及细胞膜尚完整等细胞凋亡的典型特征(图 2); 而含小牛血清组较少见到典型的凋亡细胞。

表1 *BHRF1*-ASO 对³H-TdR 掺入 SUNE-1 的影响

Table 1 The effects of *BHRF1*-ASO on the proliferation of SUNE-1

Groups	Expreimental groups				Control groups	
	$c_B(\text{EBV}^- \text{BHRF1-ASO}) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				$c_B(\text{URO}) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\rho_B(\text{NaCl}) = 9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
	5	10	20	40	20	0
Group A (min^{-1})	20 736	18 270	17 113	16 640	22 042	21 886
Group A' (min^{-1})	7 824	5 595	4 672	4 037	12 677	13 328
$P^1)$	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	—	—

1); Group A', experiment groups compared with unrelated oligodeoxynucleotide (URO) group (control group). Experiment repeated for three times



图2 凋亡的 SUNE-1 细胞透射电镜图

Fig.2 The apoptosis SUNE-1 cell under electron microscopy

Cell chromatin condensed, but membrane and mitochondrial were preserved after cultured with $20 \mu\text{mol/L}$ *BHRF1*-ASO in the absence of FCS for 36 h

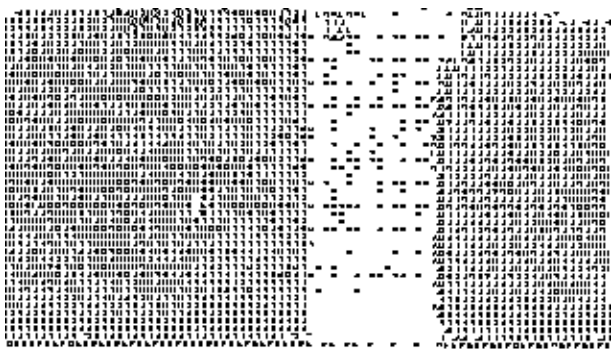


图3 经不同处理的 SUNE-1 细胞 DNA 电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from SUNE-1 cell line cultured with differernt conditions

lane 1; 10% FCS + unrelated oligodeoxynucleotide(URO, $20 \mu\text{mol/L}$); lane 2; 10% FCS + normal saline; lane 3; absence of FCS + URO($20 \mu\text{mol/L}$); lane 4; absence of FCS + 0.9% saline; lane 5; pBR332/ *Bst* NI (1 857, 1 060, 929, 383, 121 bp); lane 6~9; absence of FCS, containing *BHRF1*-ASO 5, 10, 20 and $40 \mu\text{mol/L}$ respectively

2.4 SUNE-1 的 DNA 电泳结果

经不同浓度 *BHRF1* 反义寡核苷酸片段处理

的 SUNE-1 细胞 DNA, 在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳时均可出现细胞凋亡特征性的梯形(ladder)DNA 降解片段(图 3), 但在本实验浓度范围内, SUNE-1 细胞 DNA 降解的程度与 *BHRF1*-ASO 浓度间不成正比关系, 在较低浓度($0.25 \sim 4 \mu\text{mol/L}$) 范围内, 具有量效关系(图 4)。

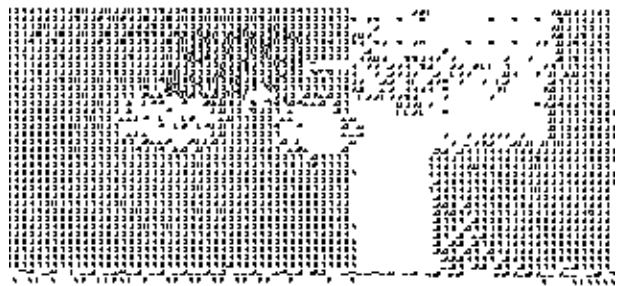


图4 经较低浓度 *BHRF1*-ASO 处理的缺血清培养 36 h 的 SUNE-1 细胞株 DNA 电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from SUNE-1 cell line cultured with lower concentration of

BHRF1-ASO and absence of FCS for 36 h

line 1; PCR Marker (1 543, 994, 695, 515, 377, 237 bp); line 2~7; absence of FCS, containing *BHRF1*-ASO 4, 2, 1, 0.5, 0.25 and $0 \mu\text{mol/L}$ respectively; line 8; λ DNA *Hind* III (23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564, 125 bp) line 9 and 10; un-treated SUNE-1 cell line DNA

3 讨论

细胞凋亡是正常组织清除某些对机体无益细胞的一种独特的死亡方式, 无论在生物个体生长发育过程中, 还是在保持机体正常组织的平衡、稳定方面均具有重要作用。人类的多数肿瘤之所以能够发生、发展及转移, 其重要原因之一就是肿瘤细胞对多种诱导细胞凋亡的因素丧失了反应性^[1]。

EBV 的 BHRF1 蛋白与 Bcl-2 有 38% 同源性^[4], 且在细胞中的定位也相同, 但是否与 Bcl-2 蛋白一样具有拮抗多种因素引起的细胞凋亡的作用, 尚未有定论。本研究结果初步显示单纯用无血清培养或加入 BHRF1 寡核苷酸片段的方法仅可轻度抑制 SUNE-1 细胞株的增生, 但发生凋亡的细胞数很少; 若两种方法合并使用则有协同作用, 可导致所培养的细胞株普遍发生凋亡而较为显著地抑制细胞增殖。其可能原因是: ①单纯缺血清培养虽能减慢细胞增殖的速度, 但因宿主细胞此时可表达 BHRF1 蛋白而抑制凋亡, 所以发生凋亡的细胞数很少。本室已有实验结果^[10]显示, 多种 EBV⁻BHRF1 阳性细胞株(SUNE-1、B₉₅₋₆ 及 Raji)比阴性的 K₅₆₂、小细胞肺癌细胞株对无血清培养、43 °C 作用 10 min 或由适当浓度的地塞米松所引起的细胞凋亡具有较强的抵抗能力。②在正常培养条件下, BHRF1 一般不表达(仅在诱导凋亡因素存在时才表达), 此时加 BHRF1 寡核苷酸片段也就不会对细胞增殖产生明显影响。本实验结果初步表明 BHRF1 基因产物在抑制无血清培养时其宿主细胞的凋亡方面起着重要作用。

参 考 文 献

1 Hickman J A, Potten C S, Merritt A J, *et al*. Apoptosis and cancer chemotherapy. Philos Trans R Soc Lond [Bi-

- ol], 1994, 345:319
- 2 Miyashita T, Reed J C. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. Blood, 1993, 81(1):151
- 3 Wolf H, Zur H H, Becker V, *et al*. EB-virus genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. Nature New Biol, 1973, 244(2):245
- 4 Henderson S, Huen D, Rowe M, *et al*. Epstein-Barr virus-code BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:8479
- 5 Bear R, Bankier A T, Biggin M, *et al*. DNA sequence and expression of the B₉₅₋₈ Epstein-Barr virus genome. Nature, 1984, 310:207
- 6 朱振宇, 严世荣, 黄 迪, 等. EBV-DNA 酶全基因扩增克隆和鉴定. 中山医科大学学报, 1995, 16(4):5
- 7 朱振宇, 简志瀚, 李树浓. 裸鼠荷人鼻咽癌细胞株后免疫状态的动态观察. 中国病理生理学杂志, 1992, 8(5):585
- 8 朱振宇, 潘景轩, 赵 群, 等. 地塞米松诱导裸鼠脾细胞凋亡的研究. 中国病理生理学杂志, 1996, 12(2):131
- 9 潘景轩, 朱振宇, 李惠玲, 等. 糖皮质激素诱导大鼠胸腺细胞程序性死亡研究. 中国免疫学杂志, 1996, 14(2):228
- 10 朱振宇, 黄必军, 戴克胜, 等. EBV⁻BHRF1 基因阳性与阴性细胞株对 3 种诱导凋亡因素抵抗性差异的研究. 肿瘤, 待发表

(1997-07-14 收稿 1997-12-26 修回)

·新成果·

性病性沙眼衣原体分子克隆流行状况和诊治

课题负责人 白 桦

(中山医科大学附属第一医院皮肤性病科; 广州, 510080)

本项目在国内首先应用 Mc Coy 细胞培养法, 从性乱妇女泌尿生殖道分离出沙眼衣原体, 从病原学角度证实了该类疾病在国人中的存在; 进一步克隆了我们分离出的 F 株的主要外膜蛋白基因——CTMOMP, 经亚克隆后在大肠杆菌中表达成功, 且证实具有抗原活性, 为进一步制备适宜国人的分子生物学诊断试剂及疫苗奠定了基础; 在临床上首先应用先进方法对本地区不同人群泌尿生殖道沙眼衣原体感染状况做了研究, 明确了沙眼衣原体不存在于正常人体, 而通过性接触而感染, 并获得了各相关人群的流行病学资料, 有着重要的预防学意义; 应用免疫学方法首次获得了国人泌尿生殖道沙眼衣原体感染分离株的血清型分布资料, 探索了该病的传播来源, 对该病的防治十分必要; 把免疫学、细胞培养及分子生物学的诊断方法较早应用于大规模的临床诊断, 解决了该类疾病的临床鉴定技术; 探索了针对国人感染者的体内外抗沙眼衣原体的有效治疗药物, 在国内外首次获得大样本临床分离株的全部血清型对 19 种抗生素的敏感性资料, 且同时以标准株对照, 对该病的有效治疗有着重要指导意义。该成果于 1997 年获广东省科技进步二等奖。

(陈丽芳)