

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0098-03

丁胱亚磺酰亚胺增强 DAAO/D-Ala 系统杀伤 K562e 细胞作用的研究

翟勇平¹, 王健民², 张雨生², 吕书晴²(1. 南京军区南京总医院血液科, 南京 210002; 2. 第二军医大学附属长海医院血液科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究丁胱亚磺酰亚胺(BSO)增强 D-氨基酸氧化酶(DAAO)/D-丙氨酸(D-Ala)自杀基因系统在白血病基因治疗中的作用。方法: 应用逆转录病毒转染技术获得稳定表达 DAAO 的高致瘤性 K562e 单克隆细胞 K_{DfGC}, 用 PCR、原位杂交对 DAAO 基因修饰的 K_{DfGC} 进行鉴定。应用 MTT 法检测 D-Ala 对 BSO 预处理过的 K_{DfGC} 细胞的杀伤作用。结果: PCR 和原位杂交分析证明 DAAO 基因已整合至细胞基因组中, 并在 mRNA 水平上表达。D-Ala 作用 24 h, K_{DfGC} 细胞的半数抑制浓度(C₅₀)为 10.21 mmol/L, K_{DfGC} + BSO 的 IC₅₀ 为 7.92 mmol/L, 两者的 95% 可信区间不重叠。结论: BSO 可增强 DAAO/D-Ala 系统杀伤 K562e 细胞作用。

[关键词] DAAO 基因; 丁胱亚磺酰亚胺; 基因表达; 白血病细胞

[中图分类号] R733.7 **[文献标识码]** A

Effect of Buthionine Sulfoximine on DAAO/D-Ala System Killing K562e Cells

ZHAI Yong-ping, WANG Jian-min, ZHANG Yu-sheng, Liu Shu-qing (Department of Hematology, Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of BSO on DAAO/D-Ala system killing K562e cells. **Methods:** K_{DfGC} cell stably expressing DAAO was obtained by retrovirus transfection. The integration and expression of DAAO gene in K_{DfGC} cells were identified by PCR and *in situ* hybridization. The killing effects of D-Ala on K_{DfGC} cells treating with 1 mmol/L BSO were observed. **Results:** PCR and *in situ* hybridization analysis confirmed integration of DAAO gene in positive clone and expression of it at mRNA level. The IC₅₀ of K_{DfGC} and K_{DfGC} + BSO treating with D-Ala for 24 hours were 10.21 mmol/L and 7.92 mmol/L, respectively. The 95% confidence limits of them were different. **Conclusion:** BSO can enhance the killing effect of DAAO/D-Ala system on K562e cells.

[Key words] DAAO gene; BSO; gene expression; leukemia cell

* D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO)能分解代谢 D-氨基酸产生具有细胞杀伤作用的 H₂O₂, 我们前期的研究^[1-2]已证明 D-氨基酸氧化酶(DAAO)/D-丙氨酸(D-Ala)系统能有效杀伤肿瘤细胞, 并且作用特点与 HSV-tk/GCV, CD/5-Fc 系统不同, 因此 DAAO 基因有可能是一有效的新自杀基因。丁胱亚磺酰亚胺(buthionine sulfoximine, BSO)是 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶特异的抑制剂, 可以有效抑制 GSH (glutathione, 谷胱甘肽)的合成, 因此可能有助于提高 H₂O₂ 杀伤细胞作用, 本研究的目的是进一步研究 BSO 增强 DAAO/D-Ala 系统对转基因细胞 K_{DfGC} 的杀伤作用, 为 DAAO 基因治疗肿瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒抽提纯化试剂盒、基因组 DNA 抽提纯化试剂盒为华舜生物工程公司产品; 多聚季胺(Polybrene)、四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tertrazolium bromide, MTT]、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、丁胱亚磺酰亚胺(BSO)为 Sigma 公司产品。

* **[基金项目]** 本课题受国家自然科学基金(39870710)资助
[作者简介] 翟勇平(1964-), 男, 南京人, 博士, 主要从事肿瘤基因治疗研究。

1.2 质粒和细胞

质粒 pLDfG 由 Dr. Ross 惠赠, 为 pLzrus 切除 LacZ 后再插入 DAAO-IRES-GFP 基因形成, 启动子为 Moloney 病毒的 LTRs。φNXA 为包装细胞。裸鼠高致瘤性人白血病细胞株 K562e 由本室采用 BABL/c 裸鼠体内移植和体外培养相结合的方法^[3]建立并传代保存。

1.3 细胞克隆的建立及培养

用磷酸钙沉淀法介导质粒 pLDfG 转染包装细胞 φNXA, 48 h 后收集病毒上清 0.22 μm 微孔滤器抽滤。取对数生长期的白血病细胞, 使密度达 5×10^5 /ml 加入含 Polybrene 2 μg/ml 病毒上清, 37℃ 24 h 后换 RPMI-1640 培养液, 48 h 后用流式细胞仪测定 K562e 细胞的转染率, 以有限稀释法接种 96 孔板, 在荧光显微镜下标定阳性单克隆孔, 进一步培养扩增得 K_{DfGC} 克隆。

1.4 PCR 分析外源基因的整合

基因组 DAAO 基因 PCR 分析方法参见文献[1]。

1.5 原位杂交分析外源基因在 mRNA 水平上的表达

DAAO 基因 mRNA 水平原位杂交分析方法参见文献[1]。

1.6 BSO 增强 D-Ala 杀伤作用实验

采用 MTT 法^[4], 将对数生长期的 K_{DfGC}, K562e 分别接种于 96 孔板内 (1×10^3 /孔), 48 h 后加入 1 mmol/L BSO, 72 h 后加入不同浓度 (0 ~ 60 mmol/L) 的 D-Ala, 继续培养 24 h, 结束后加入 MTT, 每孔设 4 个复孔。37℃, 4 h 后吸出上清加入 DMSO, 充分溶解沉淀后以酶标仪测 A₄₅₀, 按下列公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{用药组 } A_{450}}{\text{对照组 } A_{450}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 K562e 细胞感染

质粒 pLDfG 结构见图 1。经逆转录病毒感染的 K562e 细胞, 48 h 后即可在荧光显微镜表达明显的绿荧光, 转染率约为 16%。阳性克隆 K_{DfGC}, 经 PCR 扩增出长 600 bp 的特异性条带, 表明外源基因已整合至细胞基因组中。原位杂交表明 DAAO 基因在 mRNA 水平上表达, K_{DfGC} 细胞呈均一的蓝紫色, 表明 mRNA 表达水平一致, 反映 K_{DfGC} 为单克隆(见图 2)。

2.2 BSO 增强 D-Ala 杀伤作用实验

图 3 所示加用 BSO 可以增强 D-Ala 对 K562e 的杀伤作用。K_{DfGC} 的 IC₅₀ 为 10.21 mmol/L (95% 可信区间 9.22 ~ 11.32), K_{DfGC} + BSO 的 IC₅₀ 为 7.92 mmol/L (95% 可信区间 6.93 ~ 8.92), 95% 可信区间不重叠, 表明 BSO 可以显著增强 D-Ala 杀伤 K562e 的

作用。

图 1 质粒 pLDfG 结构

Fig. 1 Structure of plasmid pLDfG

图 2 K_{DfGC} 细胞原位杂交

Fig. 2 *in situ* hybridization analysis of DAAO mRNA expression in K_{DfGC} cells

图 3 BSO 增强 D-丙氨酸杀伤 K_{DfGC} 细胞作用

Fig. 3 Enhanced killing effect of D-Ala on K_{DfGC} with BSO

3 讨论

DAAO 可氧化代谢 D-氨基酸产生相应 α-酮酸、氨

和 H₂O₂。H₂O₂ 是一种反应氧(reactive oxygen species, ROS), 极易穿过细胞膜, 通过直接氧化或还原产生羟自由基损伤细胞 DNA、蛋白质和脂质等物质而致使细胞死亡, 本实验所用的 DAAO 基因来源于红色酵母 *R. gracilis*, 能有效的降解 D-丙氨酸, 并且是一种有可能安全地用于治疗肿瘤的自杀基因^[5-6]。

1998 年 Stegman 等^[7]报导应用含 DAAO cDNA 的真核细胞表达质粒, 导入大鼠神经胶质瘤细胞 9 L, 并用 D-丙氨酸杀伤转基因细胞, 取得了一定效果。我们以往的实验结果^[1-2]表明, 经逆转录病毒介导转染含 DAAO 基因的肿瘤细胞可被 D-丙氨酸杀伤, D-丙氨酸杀伤转基因细胞的作用呈阈值性, 达到一定有效浓度后, 杀伤效率成倍提高, 而且在 24 h 内达到最大, 延长至 48 h 并不能增加杀伤作用。DAAO 杀伤作用的特点是迅速和短暂。

GSH (谷胱甘肽) 是体内具有重要生理作用的肽, GSH 上的氢, 在谷胱甘肽过氧化物酶的催化下, 能还原细胞产生的 H₂O₂, 使其变成 H₂O。γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶是谷胱甘肽合成过程中的一个重要酶, BSO 是其特异的抑制剂。本实验表明 BSO 能显著提高 DAAO/D-Ala 系统对转基因细胞 K_{DIC} 杀伤效率。BSO 对 DAAO/D-Ala 系统杀伤肿瘤细胞显著的增强作用,

使 DAAO/D-Ala 自杀基因系统具有更高的实际应用价值。

[参 考 文 献]

[1] 翟勇平, 王健民, 周虹, 等. D-氨基酸氧化酶基因在 K562 细胞中的表达及其介导的细胞毒性作用的研究[J]. 中华血液学杂志, 2001, (12): 646-648.

[2] 王健民, 翟勇平, 张雨生, 等. DAAO/D-Ala 系统对高致瘤性 K562e 细胞体外杀伤效应及机制[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(1): 12-15.

[3] 许小平, 丁训杰, 阎影, 等. 裸鼠高成瘤性人白血病细胞系的建立及生物学特性观察[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(3): 142-146.

[4] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养. 四唑盐(MTT) 比色试验[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1999. 186-187.

[5] Pollegioni L, Falbo A, Pilone MS, *et al.* Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1120: 11-16.

[6] D'aniell A, D'onofrio G, Pischetola M, *et al.* Biological role and D-aspartate oxidase: Effects of D-amino acids[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 26941-26949.

[7] Stegman LD, Zheng H, Neal ER, *et al.* Induction of cytotoxic oxidase stress by D-alanine in brain tumor cell expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: A novel cancer gene therapy strategy[J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9: 185-193.

[收稿日期] 2002 - 01 - 24

[修回日期] 2002 - 04 - 16

2003 年中国器官移植免疫学学术会议征文通知

为推动 21 世纪我国器官移植免疫学基础与临床研究的发展, 增进国内外学术团体和科研人员间的学术交流, 由中华医学会微生物与免疫学分会主办的 2003 年中国器官移植免疫学学术会议拟定于 2003 年 5 月上旬在南京举行。会议为中华医学会全国一类会议, 是新世纪全国器官移植免疫学的第一次学术盛会。会议将邀请国内外器官移植学界著名专家、学者做专题演讲, 并就移植免疫的基础与临床研究成果进行交流和讨论。与会者不仅可以从中了解到近年来器官移植免疫学最新的研究成果, 总揽器官移植免疫学研究和治疗的现状, 而且可以从与国内外著名专家的交流中洞悉未来器官移植免疫学研究的方向, 从而把握科研创新。参会者同时将获得得国家 I 类继续教育学分。

一、会议主题: 器官移植与移植免疫

二、征文内容: (1) 器官移植免疫学的现状与发展趋势; (2) 器官移植技术的最新研究进展; (3) 器官移植免疫耐受研究的成果与进展; (4) 器官移植现代配型方法及其评价; (5) 新型免疫抑制剂的开发与应用研究; (6) 免疫抑制剂的临床应用经验。

三、征文要求: (1) 500 ~ 800 字的论文摘要(结构式), 打印稿并加盖单位公章, 附加 3.5 英寸软盘(保存为 word 文档) 或将摘要 E - mail 至会议秘书处(urologist025@sohu.com 或 jiaruipengnj@msn.com), 自留底稿不退稿; (2) 综述性文章请寄来全文。欢迎暂无论文但对器官移植感兴趣的基层医院临床医生及从事免疫教学和科研人员参加会议并交流经验。

征文截止日期: 2003 年 2 月 28 日

来稿请寄: 南京市长乐路 68 号, 南京医科大学附属南京第一医院泌尿外科研究室贾瑞鹏博士收。邮政编码: 210006。电话: 025 - 6624213 转 8480 或 8331。

会议招展: 会议期间将开展丰富多彩的科技成果展及器官移植相关药品、食品展、欢迎各有关厂商在会议期间举办产品展示。

论文评选: 本次会议是中华医学会全国性会议, 并出版论文集, 大会组委会将从与会的会议论文中评选出青年学者优秀论文并进行奖励。