

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0261-04

## caspase-6 基因诱导成骨肉瘤细胞凋亡

丁勇<sup>1</sup>, 范清宇<sup>1</sup>, 崔大祥<sup>2</sup>, 张殿忠<sup>1</sup>, 殷剑宁<sup>1</sup> (1. 第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所, 西安 710038; 2. 第四军医大学基因诊断技术研究所)

[摘要] 目的: 探讨 caspase-6 对成骨肉瘤细胞株的凋亡诱导作用。方法: 应用 RT-PCR 方法检测成骨肉瘤细胞株 SOSP-9607 中 caspase-6 基因的表达水平。以腺病毒 adv5 为载体, 构建含 caspase-6 基因的转基因载体, 用脂质体包裹法转染 SOSP-9607 细胞株, 用 RT-PCR 方法检测转染后 SOSP-9607 细胞中 caspase-6 基因的表达。用 MTT 法检测转染 caspase-6 对 SOSP-9607 细胞株生长的影响。结果: 成骨肉瘤细胞株 SOSP-9607 中未检出 caspase-6 表达。RT-PCR 法证实转染 caspase-6 后 SOSP-9607 中 caspase-6 表达显著增强, MTT 检测显示对 SOSP-9607 细胞的生长有抑制作用, 形态学观察及 DNA 电泳证实转染后的细胞株存在细胞凋亡特征。结论: caspase-6 对成骨肉瘤细胞的生长有抑制作用, 并可诱导成骨肉瘤细胞凋亡。

[关键词] 成骨肉瘤细胞; 细胞凋亡; caspase-6 基因; 基因转染

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

## Apoptosis in Human Osteosarcoma Cell Line SOSP-9607 Induced by Caspase-6

DING Yong, FAN Qing-yu, CUI Da-xiang, ZHANG Dian-zhong, YIN Jian-ning (Orthopedics Oncology Institute of PLA, Tangdu Hospital, FMMU, Xi'an 710038, China)

[Abstract] **Objective:** To explore caspase-6's effect on the apoptosis of osteosarcoma cell line SOSP-9607. **Methods:** The expression level of caspase-6 in the osteosarcoma cell line SOSP-9607 was examined by RT-PCR method. The adenovirus adv5 vector with caspase-6 gene was constructed and transferred into the osteosarcoma cell line SOSP-9607 by lipofection. The cell survival rate after transfection was assayed by MTT method. The cell morphological changes were observed by microscope and electron microscope, the apoptosis of transferred cells were examined by gel electrophoresis. **Results:** No expression of caspase-6 was examined in the osteosarcoma cell line SOSP-9607. A high expression of caspase-6 was identified by RT-PCR after the transfection. The cell growth curve declined after transferring caspase-6. Electrophoresis of DNA displayed the apoptosis ladder. **Conclusion:** Transferring caspase-6 into the osteosarcoma line SOSP-9607 may inhibit the growth of the osteosarcoma cell line SOSP-9607 and this effect might be achieved by inducing apoptosis.

[Key words] osteosarcoma; apoptosis; caspase-6; gene transfection

\* 近年来,随着细胞凋亡分子调控机制研究的不断深入以及细胞凋亡与肿瘤发生发展关系的进一步阐明,人们逐渐认识到诱导肿瘤细胞凋亡不仅仅是放疗、化疗、热疗和一些生物疗法抗肿瘤作用的机制之一,其本身也可以单独作为一种新的肿瘤治疗策略,即针对肿瘤细胞凋亡信号传导通路受阻靶点,通过激发肿瘤细胞促凋亡因素和(或)抑制其抗凋亡因素,增加肿瘤细胞对凋亡诱导的敏感性,重新启动肿瘤细胞凋亡的级联反应,加速肿瘤细胞凋亡,从而达到肿瘤治疗的目的<sup>[1-2]</sup>。caspases,即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteine-specific protease),是1996年由 Al-

nemri 等人统一命名的一类人源的 ICE/Ced3 同源性半胱氨酸蛋白酶。根据 caspase 在级联反应中的作用和活化的先后,caspase 家族的 14 个成员可以分为两类,启动性和效应性 caspase。caspase-6 基因属效应 caspase 分子,是除 caspase-3 和 caspase-7 外重要的凋亡执行分子<sup>[3-4]</sup>。骨肉瘤是较常见的恶性肿瘤,到目前为止,临床治疗仍有很多难点。本实验以人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 为研究对象,探讨 caspase-6 对骨肉

\* [基金项目] 第四军医大学博士课题基金

[作者简介] 丁勇(1966-),男,陕西咸阳人,主治医师、讲师,博士,主要从事骨肿瘤及其治疗方面的研究。

瘤细胞的存活率及凋亡的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞培养

人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 由本科实验室提供,按常规要求进行复苏、培养。

#### 1.2 RNA 提取及定量

SOSP-9607 细胞生长至约  $5 \times 10^7$  个细胞量时,弃去培养基,PBS 洗 2 次。用 0.25% 胰蛋白酶消化,并收集细胞。采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA,并用紫外分光光度计定量。

#### 1.3 反转录 PCR 反应

扩增 caspase-6 的 PCR 引物由上海生物工程公司合成。上游引物带有 Hind III 酶切位点,下游引物含 Not I 酶切位点,产物全长为 841 bp。PCR 反应条件:94℃ 35 s,55℃ 50 s,72℃ 55 s,30 个循环,最后在 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察结果。

#### 1.4 含 caspase-6 基因的腺病毒 adv5 载体的构建

提取腺病毒 adv5 载体与 caspase-6 基因质粒,用 Hind III 和 Not I 进行双酶切,回收产物,连接过夜,参照分子克隆要求,进行转化,挑克隆,酶切鉴定。

#### 1.5 构建的转基因载体转染骨肉瘤细胞株

adv5-caspase-6 载体,采用脂质体包裹法转染人成骨肉瘤细胞株 SOSP-9607。转染后继续培养,分别收集转染后 2,8,12,24,48 h 的细胞,备用。

#### 1.6 转染后 caspase-6 表达水平的鉴定

取转染前后的细胞 RNA 各 0.1  $\mu$ g,65℃ 温浴 5 min,然后进行 RT-PCR 扩增,产物进行电泳,比较表达水平高低。

#### 1.7 转染 caspase-6 后细胞凋亡检测

1.7.1 分别收集转染后 2,8,12,24,48 h 细胞,在倒置显微镜下观察转染后不同时间细胞形态及贴壁状况。

#### 1.7.2 丫啶橙染色观察细胞凋亡情况

转染后细胞经胰酶消化,离心,调成细胞数为  $(1 \sim 5) \times 10^4$ /ml,取 100  $\mu$ l 细胞制成细胞涂片,在固定液中固定 15 min 后,Bertalan 法染色,1 h 内荧光显微镜下观察结果。

#### 1.7.3 电镜标本制作与观察

SOSP-9607 细胞株转染 caspase-6 48 h 后胰酶消化,PBS 洗涤,离心去上清,沿管壁缓缓加入 2.5% 戊二醛,4℃ 固定 2 h,拨离细胞团块,PBS 洗 2 次,常规脱水,包埋,制备超薄切片,电子染色,水洗,晾干,电镜观察并照相。

#### 1.7.4 转染 caspase-6 后细胞 DNA 提取和电泳观察

收集转染 caspase-6 后细胞( $5 \times 10^6$  个),参照《分子克隆》提取 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳观察结果。

#### 1.8 MTT 法测定转染 caspase-6 对 SOSP-9607 的抑制作用

将未转染 SOSP-9607 细胞以  $2.5 \times 10^4$  个/ml 的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ l,保留一排孔作为调零孔,待细胞贴壁后,分 3 组(不转染组、空载体组、转染组)进行转染,每组平行 3 孔。分别于转染后的不同时间点(24,36,48,60,72,84 h)吸弃培养液,加入 200  $\mu$ l 新配制的 MTT (5 mg/ml),37℃ 继续孵育 4 h,弃 MTT 液加 150  $\mu$ l DMSO,混匀,待所有样品都已做完上述处理后,用 DG3022 型酶标仪,测 490 nm 波长光吸收值,计算肿瘤细胞抑制率,并用软件作图将实验组与对照组进行统计比较。

## 2 结 果

### 2.1 RT-PCR 结果

结果表明,在此 OS-9607 细胞株中 caspase-6 无表达,转染 caspase-6 后表达显著。同时也证实转染成功(见图 1)。

图 1 细胞株中 caspase-6 基因表达水平检测

Fig.1 Detection of caspase-6 gene expression level in SOSP-9607

- 1: After transfection; 2: Before transfection;
- 3: Positive controle; 4: PCR marker;
- 5: Plasmid amplification output

### 2.2 caspase-6 转基因腺病毒 adv5 载体的构建酶切鉴定

证实转基因载体构建成功(见图 2)。

图 2 caspase-6 转基因腺病毒 adv5 载体的构建与酶切鉴定

Fig.2 Construction of caspase-6 transgeneic adv5 vector

- 1: Adenovirus empty vector; 2: Blank control;
- 3:  $\lambda$ DNA/Hind III marker; 4: Constructed adv5 vector; 5: Results of enzyme digestion

### 2.3 转染后凋亡检测结果

2.3.1 转染后 24 h 倒置显微镜观察有部分细胞变圆、折光强,并有部分漂浮皱缩,至 48 h 漂浮皱缩细胞增多。

2.3.2 转染后 24 h 丫啶橙染色,在荧光显微镜下,部分细胞核及细胞质内可见致密浓染的黄绿色染色,48 h 时凋亡细胞明显增多。

#### 2.3.3 电镜观察

电镜结果显示,转染 caspase-6 后 48 h,细胞株超微结构出现显著变化,可见核浓缩及凋亡小体(见图 3)。

图 3 透射电镜观察转染 caspase-6 后的细胞凋亡(×6000)

Fig.3 Apoptosis under transmission electron microscope after caspase-6 transfection (×6000)

#### 2.3.4 转染 caspase-6 后进行琼脂糖凝胶电泳观察结果

转染 48 h 后提取 DNA,电泳观察可见“梯状”DNA 条带,大小为 180 bp 及其整倍数(见图 4)。

### 2.4 MTT 法测定转染 caspase-6 后对 SOSP-9607 的生长抑制作用

MTT 法测定转染后的结果如下:

可见实验组细胞从 24 h 起有较微下降,36 h 明显,48 h 达到最低,60 h 后曲线开始上扬,表明转染 caspase-6 对 SOSP-9607 生长有抑制作用。

表 1 转染 caspase-6 后 MTT 检测的分光光度

Tab. 1 Spectrophotographic value assayed by MTT method after caspase-6 transfection

Time after transfection (h)	12	24	36	48	60	72
Control group	0.41	0.57	0.83	0.95	1.25	1.52
Empty vector group	0.38	0.59	0.95	1.02	1.17	1.46
Transfection group	0.45	0.53	0.41	0.29	0.33	0.57

图 4 转染 caspase-6 后琼脂糖凝胶电泳观察结果

Fig.4 Agarose gel electrophoresis after caspase-6 transfection

- 1: Results of DNA electrophoresis after transfection;
- 2: Results of DNA electrophoresis without transfection;
- 3. Bacillus coli Genome DNA

图 5 转染后抑制生长曲线

Fig.5 Growth restrain curve after transfection

## 3 讨论

细胞凋亡对多细胞动物机体的正常发育和自身稳定起着极其重要的作用。细胞凋亡与细胞增殖,分化均是细胞的基本生命活动,三者密切相关。与细胞凋亡相关的基因大致分为促凋亡基因和抗凋亡基因两大类。当细胞促凋亡基因活性受到抑制和(或)抗凋亡基因被激活,使该细胞不能凋亡而长期存活,如再加上癌基因异常表达和(或)肿瘤抑制基因活性受抑制,最

终可能导致细胞癌变和肿瘤形成。肿瘤的发生发展与凋亡相关基因表达异常所引起的肿瘤细胞凋亡受阻有关。因此通过基因转移技术将促凋亡基因选择导入肿瘤细胞增强其对凋亡诱导的敏感性,或将抗凋亡基因导入机体正常细胞以增强正常细胞对放疗、化疗诱导凋亡的抗性,此乃肿瘤基因治疗研究的一个重要方向<sup>[1,5-6]</sup>。

本研究首先采用 RT-PCR 技术检测了人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 中 caspase-6 基因的表达情况,结果在此细胞株中未检出 caspase-6 基因表达。之后以腺病毒 adv5 作载体,构建了含 caspase-6 基因的转基因载体,采用脂质体包裹法转染进入 SOSP-9607 细胞株。转染后再次检测 caspase-6 基因的表达水平,呈显著升高。形态学观察显示,SOSP-9607 细胞株转染 caspase-6 基因后 24 h,部分细胞有漂浮皱缩,转染后 48 h 漂浮皱缩细胞增多。转染后丫啶橙染色,可见实验组部分细胞核及细胞质内可见致密浓染的黄绿色染色,48 h 后明显增多,而对照组则没有发生以上现象,因此我们认为,转染了重组 caspase-6 基因后,细胞有部分凋亡。进一步采用电镜观察,也见到一些凋亡细胞,这些细胞的核膜仍完整,而核浓缩边集,内质网疏松,溶酶体明显增多,有的可见凋亡小体。转染 caspase-6 后 48 h,收集细胞,提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,结果呈“梯状”带形,证实转染 caspase-6 可诱导人成骨肉瘤细胞株 SOSP-9607 凋亡。

MTT 法测定转染 caspase-6 后的细胞存活率及转染后细胞生长曲线,可见实验组的曲线在 24 h 处开始下降,48 h 达到最低点。因此,我们认为重组的 caspase-6 基因对 SOSP-9607 细胞的生长有一定的抑制作用,而从 60 h 开始曲线又开始上扬,分析为转染成功的部分细胞已死亡,而未转染成功细胞继续增殖,造成曲线回升。

大多数细胞凋亡依赖于 caspase 的激活,它们是一类在进化上比较保守的半胱氨酸蛋白酶家族,能够特异性识别并在天冬氨酸残基的羧基端切割蛋白。根据 caspase 在级联反应中的作用和活化的先后,caspase 家族的 14 个成员可以分为两类,启动性和效应性 caspase。启动性 caspase 在细胞凋亡信号和调节因子的作用下首先被活化,再激活效应性 caspase,另一类是效应性或下游 caspase,其活化是

通过 caspase 及级联反应而实现的,活化后的效应 caspase 可以进一步识别、切割其下游的底物,从而引起凋亡的发生<sup>[7-8]</sup>。caspase-6 基因是一个效应 caspase 分子,是除 caspase-3 和 caspase-7 外重要的凋亡执行分子。它在细胞以酶原的形式合成和存在,只有上游 caspase 及粒酶 B 激活后才成为活性形式,大小亚基相互聚集形成二聚体,2 个二聚体再聚合成活性更强的四聚体,作用于下游凋亡有关的底物,引起凋亡<sup>[9]</sup>。

总之,本实验表明,caspase-6 基因在人成骨肉瘤细胞 SOSP-9607 中无或极低表达,转染 caspase-6 后,SOSP-9607 生长受到抑制,并出现细胞凋亡,因此,我们认为 caspase-6 基因可能具有诱导骨肉瘤细胞凋亡作用,此研究为进一步探讨 caspase-6 基因在临床的应用提供参考依据。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[ J ]. Science, 1998, 281( 5381 ): 1309-1312.
- [ 2 ] Wang J, Leonardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies[ J ]. J Cell Sci, 2000, 113( Pt5 ): 753-757.
- [ 3 ] Grutter MG. Caspases: Key players in programmed cell death[ J ]. Curr Opin Struct Biol, 2000, 10( 6 ): 649-655.
- [ 4 ] Srinivasula SM, Saleh A, Ahmad M, et al. Isolation and assay of caspases[ J ]. Methods Cell Biol, 2001, 66: 1-27.
- [ 5 ] Huston CD, Mann BJ, Hahn CS, et al. Role of host caspases in cell killing by entamoeba histolytica[ J ]. Arch Med Res, 2000, 31( 4 Suppl ): S216-217.
- [ 6 ] Colussi PA, Kumar S. Targeted disruption of caspase genes in mice: What they tell us about the functions of individual caspases in apoptosis[ J ]. Immunol Cell Biol, 1999, 77( 1 ): 58-63.
- [ 7 ] Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation[ J ]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1477( 1-2 ): 299-306.
- [ 8 ] Marti A, Graber H, Lazar H, et al. Caspases: Decoders of apoptotic signals during mammary involution. Caspase activation during involution[ J ]. Adv Exp Med Biol, 2000, 480: 195-201.
- [ 9 ] Zhivotovskiy B, Samali A, Gahn A, et al. Caspases: Their intracellular localization and translocation during apoptosis[ J ]. Cell Death Differ, 1999, 6( 7 ): 644-651.

[ 收稿日期 ] 2001 - 11 - 26

[ 修回日期 ] 2002 - 07 - 15