

[文章编号] 1007-385X(2003)02-00130-04

ICE 基因转染联合化疗药物杀伤肝癌细胞的研究

贾随旺¹, 徐 娟², 钱其军³, 曹惠芳³, 吴孟超³(1. 深圳市人民医院肝胆外科, 广东 深圳 518020; 2. 深圳市福田区人民医院皮肤科, 广东 深圳 518033; 3. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

[摘 要] 目的: 研究人 ICE 基因转染联合化疗药物诱导体外杀伤肝癌细胞的作用。方法: 应用电穿孔法将构建成功含有目的基因的逆转录病毒载体 pLXSN-hICE 导入包装细胞系 PA317, 筛选 G418 抗性克隆, 并将其病毒上清转入肝癌细胞株 HepG2, DNA 提取、电泳观察; 采用³H-TDR 掺入法观察、分析化疗药物卡铂对肝癌细胞株 SMMC7721 及转入相应目的基因后的 SMMC7721-ICE, SMMC7721-反义 hICE, SMMC7721-neo 细胞株体外增殖的影响。结果: ICE 基因转染可诱导 HepG2 形成具有凋亡特征的梯状 DNA; 在卡铂低浓度诱导下, 与对照细胞相比 SMMC7721-hICE 细胞株体外增殖明显受抑。结论: 人 ICE 基因转染可直接诱导肝癌细胞株 HepG2 凋亡, 明显提高肝癌细胞 SMMC7721 对化疗药物卡铂杀伤的敏感性, ICE 基因转染联合化疗药物诱导极大增强了对肝癌细胞的杀伤作用, 可能是治疗肝癌一个有前途的方案。

[关键词] ICE 基因; 基因转染; 化疗; 肝癌细胞株; 细胞凋亡

[中图分类号] Q78; R735.7 [文献标识码] A

Cytotoxicity of Hepatocellular Carcinoma Cells Induced by ICE Gene Transfection in Combination with Antitumor Chemicals *in vitro*

JIA Sui-wang¹, XU Juan², QIAN Qi-jun³, CAO Hui-fang³, WU Meng-chao³(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong, China; 2. Futian People's Hospital, Shenzhen 518033 China; 3. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the cytotoxicity of ICE gene transfection in Combination with Antitumor Chemicals killing Hepatocellular Carcinoma Cells *in vitro*. **Methods:** The recombinant plasmid pLXSN-hICE was transferred to virus packing cell PA317 by electroporation method. And then the retrovirus containing human ICE cDNA generated by these PA317 cells were used to transfect human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. The apoptosis of transferred cells were examined by gel electrophoresis. The influence of chemotherapeutic drug Carbo-platin to the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line SMMC7721 and its derivative cells (SMMC7721-hICE, SMMC7721-antisense hICE, SMMC7721-neo) was observed by incorporation of ³H-TDR. **Results:** Electrophoresis of DNA displayed the apoptosis ladder of HepG2 transfected by ICE gene. The proliferation of SMMC7721-hICE was significantly suppressed *in vitro* induced by Carbo-alatin compared to the other three cell lines. **Conclusion:** ICE gene transfection could greatly increase the susceptibility of SMMC7721 cells to apoptotic cell death following chemotherapy. These findings suggest that combining ICE gene transfection with utilizing antitumor drugs would represent a novel approach for the effective treatment of hepatocellular carcinoma.

[Key words] ICE gene; gene transfection; chemotherapy; hepatocellular carcinoma cell line; apoptosis

* 化学治疗是临床治疗肿瘤的一个重要手段, 但肿瘤耐药, 尤其是许多实体瘤, 如肝细胞性肝癌, 对细胞毒药物不敏感, 是临床化疗失败的一个重要原因。近年来, 大量的研究资料表明许多不同种类的抗癌药物对敏感肿瘤细胞的杀伤都具有共同特征(如核固缩、DNA 裂解、凋亡小体形成等), 也就是说是通过诱导肿

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2001375)、国家自然科学基金基金(39500082)资助

[作者简介] 贾随旺(1968-), 男, 山西临汾人, 主治医师, 硕士, 主要从事肝癌生物治疗及临床方面的研究。

[通讯作者] 徐娟

瘤细胞凋亡而实现其抗肿瘤作用的^[1]。哺乳动物白细胞介素 1 β 转换酶(interleukin-1 β converting enzyme, ICE)基因与线虫 *C. elegans* 细胞凋亡基因 *ced-3* 具有很强的同源性,被认为是调节哺乳动物细胞凋亡的关键基因^[2]。前期研究发现 SMMC7721 细胞株中 ICE 基因缺失,为此,本研究通过逆转录病毒载体将人 ICE 基因 cDNA 及反义 ICE 导入 SMMC7721 细胞株中^[3],再用化疗药物卡铂体外诱导,探讨 ICE 基因转染在卡铂体外杀伤肝癌细胞中的作用,另外,观察 ICE 基因转染对另一人肝癌细胞株 HepG2 生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞株

人 ICE-pGEM-4 质粒由美国 Michael J. Tocci 博士惠赠。逆转录病毒载体 pLXSN 由美国 CWRU 大学肿瘤免疫及免疫基因治疗室提供。含有目的基因的逆转录病毒载体 pLXSN-hICE 已构建成功。人肝癌细胞株 HepG2, SMMC7721 及包装细胞系 PA317 为本中心保存。SMMC7721-hICE, SMMC7721- 反义 hICE, SMMC 7721- neo 细胞株(为转入 hICE、反义 hICE、neo 基因后的 SMMC7721 细胞株)^[3]。

1.2 主要仪器和试剂

同位素液闪仪购自 LKB 公司;³H-TDR 购自中国科学院上海核技术开发公司,用培养液稀释为 10 μ ci/ml;卡铂(carbo-platin)购自济南齐鲁制药厂;闪烁液的配制: PPO(2,5-二苯基亚唑)0.5 g, POPOP[1,4 双-2(4-甲基-5 苯基恶唑)]0.25 g, 二甲苯 500 ml, 磁力搅拌下充分溶解后应用。

1.3 pLXSN-hICE 转染 PA317 细胞系

采用电穿孔法将 pLXSN-hICE 转染 PA317 细胞,经 G418(300 μ g/ml)筛选 4 周,获得并收集 G418 抗性克隆。

1.4 逆转录病毒上清感染 HepG2 细胞株

将 0.5 ml 病毒上清过滤加入 HepG2 中,再加 1:100 稀释 Polybrene(8 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 然后换液去除 Polybrene, 再孵育 72 h。分别收集转染后 12, 24, 48, 72 h 的细胞备用。

1.5 转染 ICE 后倒置显微镜观察细胞形态

分别收集转染后 12, 24, 48, 72 h 的细胞,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。

1.6 转染 ICE 后细胞梯状 DNA 形成试验

取 1×10^6 转染 ICE 后的 HepG2 细胞,离心 2 000 r/min \cdot 5, 弃上清,用 PBS 洗 2 次,加入 20 μ l 溶解缓冲液[50 mmol Tris-HCl(PH7.8), 10 mmol/L EDTANA, 0.5% Sodium-N-Lauroylsarcosinate], RNase(10 mg/

ml) 1 μ l 混匀, 50 $^{\circ}$ C 30 min, 加入蛋白酶 K(10 mg/ml) 1 μ l 混匀, 50 $^{\circ}$ C 60 min, 加载样液, 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.7 卡铂对 SMMC7721 等 4 个细胞系的杀伤(³H-TDR 掺入法)

取生长状态良好的细胞系,胰酶消化、计数,接种 96 孔细胞培养板,每孔接种细胞 1×10^3 (100 μ l)。卡铂根据预实验结果设 6 个终浓度,即 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml, 用培养液稀释,加入每孔至终体积 200 μ l。每个浓度组设 3 个复孔做为平行对照,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养 72 h, 尔后从每孔中吸出培养液 100 μ l, 再掺入含 ³H-TDR 培养液 100 μ l, 继续培养 24 h, 然后吸去每孔培养液,用 0.5% 胰酶 + 0.02% EDTA 彻底消化,用多头收集器将细胞完全收集于玻璃纤维滤纸上, 70 $^{\circ}$ C 烘干 1 h, 将玻璃纤维滤纸置入 eppendorf 管, 加入 1 ml 闪烁液, 进行同位素液闪测定, 测出各孔细胞每分钟脉冲数(CPm)。

每个实验重复 3 次,每个细胞系每个药物浓度取药物处理复孔与对照复孔 CPm 平均值比较 ³H-TDR 掺入细胞的量^[4], 结果用细胞生存率表示。生存率(%) = 药物组 CPm / 对照组 CPm \times 100%。肝癌细胞对药物越敏感, 细胞增殖受抑制或被杀伤的就越多, ³H-TDR 掺入就越少, 细胞生存率就越低。应用 Slide 统计软件绘制 4 个细胞系细胞生存率-药物浓度曲线。

1.8 统计学分析

应用 SAS 统计软件包对各曲线之间进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 转染 ICE 后倒置显微镜观察 HepG2 细胞形态

转染后 24 h 倒置显微镜观察有部分细胞变圆、折光性强, 并有部分细胞漂浮皱缩, 至 72 h 几乎所有细胞均漂浮皱缩, 无法进行 G418 抗性克隆筛选, 而转入反义 ICE 及空载体的对照细胞则生长良好。

2.2 HepG2 进行琼脂糖凝胶电泳观察结果

转染 ICE 72 h 后提取 DNA, 电泳观察可见具有凋亡特征的“梯状” DNA 条带, 大小为 180 bp 及其整倍数(见图 1)。

2.3 卡铂对 SMMC7721 等 4 个细胞系杀伤的显微镜观察

当卡铂作用浓度为最低 20 μ g/ml, 细胞培养 12 ~ 24 h 后, SMMC7721-hICE 细胞即有大量死亡, 而 SMMC7721、SMMC7721-反义 hICE、SMMC7721-neo 细胞株则生长良好。当卡铂作用浓度为 40 μ g/ml 以上, 细胞培养 24 ~ 72 h 后, SMMC7721、SMMC7721-反义

hICE, SMMC7721-neo 细胞株才见到死亡细胞, 卡铂对肿瘤细胞的杀伤与药物作用浓度呈剂量依赖关系。

2.4 卡铂对 SMMC7721, SMMC7721-neo, SMMC7721-hICE, SMMC7721-反义 ICE 4 个细胞系细胞增殖的影响

图 1 转染 ICE 后 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 DNA agarose gel electrophoresis after ICE gene transfection

1: HepG2; 2,3: HepG2 after ICE gene transfection

M: pGEM-7Zf/HaeIII marker

应用³H 掺入法观察了不同浓度卡铂对 SMMC7721 等 4 个细胞系体外细胞增殖的影响(见图 2)。结果表明随着药物浓度增加, 每个细胞系的生存率都有不同程度下降, SMMC7721 与 SMMC7721-neo 两者基本相似 ($P > 0.05$), SMMC7721-hICE 与其它 3 个细胞系比较, 有明显差异 ($P < 0.0001$), 当卡铂浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, SMMC7721-hICE 明显受抑, 其生存率降至 $(17.2 \pm 3.8)\%$, 而其它 3 个细胞系未受到明显抑制。SMMC7721-反义 ICE 与对照 SMMC7721 及 SMMC7721-neo 相比, 有一定差异 ($P < 0.05$)。

图 2 卡铂对 SMMC7721 等 4 个细胞株体外增殖的影响

Fig. 2 Influence of Carbo-platin on proliferation of SMMC7721 and its derivative cells

3 讨论

过去肿瘤多药抗药性 (multiple drug resistance, MDR) 被认为与 *mdr* 基因高度表达有关, 即肿瘤依赖膜转运泵——P 糖蛋白 (PGP) 的过度表达使抗癌药物泵出细胞外, 降低细胞内药物浓度, 从而对一系列天然抗癌药物耐受。近来国外研究资料表明 PGP 的高表达可能与血液系统肿瘤耐药性的获得有关, 但对实体瘤而言, 其作用甚微^[5]。近几年随着对细胞凋亡分子机制及基因调控的深入研究, 人们认识到肿瘤耐药的本质是肿瘤细胞对凋亡诱导不敏感, 即化学因子所致的、作为凋亡诱导信号的 DNA 损伤不能启动细胞凋亡机制^[6]。

ICE 是一个胞浆内半胱氨酸蛋白酶, 在通过细胞凋亡维持生物体自身平衡和稳定方面, 起着非常重要的作用, ICE 基因被认为是调节细胞凋亡通路的关键基因^[7]。2000 年 Fujikawa 等^[8] 研究发现人肝癌细胞对凋亡表现出强烈抵制作用与人肝癌细胞中 ICE 基因缺失或表达下调有关, 这与作者前期研究发现 SMMC7721 细胞株中 ICE 基因缺失^[3] 相符。作者曾将 ICE 基因转染 SMMC7721, 发现与对照细胞相比, 其克隆形成减少, 体外生长速度明显降低, 在裸鼠体内的致瘤性明显下降, 而且肿瘤生长减慢^[3]。本实验通过逆转录病毒载体将人 ICE 基因 cDNA 导入人另一肝癌细胞株 HepG2 中, 结果发现 HepG2 对 ICE 基因更敏感, ICE 基因转入 72 h 后可直接诱导 HepG2 细胞凋亡, 在琼脂糖凝胶电泳出现细胞凋亡特征性的 DNA 梯状 (DNA ladder) 图谱, 进一步证明 ICE 基因在哺乳动物细胞中的重要促凋亡作用。

我们以 SMMC7721, SMMC7721-neo 及 SMMC7721-反义 hICE 做为对照, 应用³H 掺入法了解 ICE 基因转染对卡铂体外杀伤肝癌细胞的影响。结果表明 ICE 基因的导入能明显提高肝癌细胞对卡铂的敏感性, 当卡铂作用浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, SMMC7721-hICE 细胞增殖明显受抑, 生存率降至 17.2% 左右, 而其它 3 个细胞系在此浓度下无明显抑制, 个别细胞系甚至还有少量增殖。当然随着卡铂浓度升高, 4 个细胞系均出现不同程度抑制, 这与肿瘤对药物剂量的依赖性一致。卡铂做为铂类配合物与顺铂的作用机制相同, 能与 DNA 交联, 造成 DNA 损伤, 而 DNA 损伤可能做为凋亡诱导信号, 诱导 ICE 基因表达, 激活凋亡通路, 实现其抗肿瘤作用, 从而提示 ICE 基因的激活可能是细胞凋亡的最终通路^[9]。

由于肝癌发生的病因极其复杂, 单一抗肿瘤基因 (如 ICE 基因) 治疗可能难以达到完全抑制肝癌生长

的目的,然而应用 ICE 基因能明显提高肝癌细胞对化疗药物的敏感性,因此将抗癌基因 ICE 转染与化疗药物联合应用,可能是解决肝癌耐药、治疗肝癌的一个有前途的方案。

【参考文献】

- [1] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1992, 11: 121-139.
- [2] Kumar S. ICE-like proteases in apoptosis[J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 198-202.
- [3] 贾随旺, 钱其军, 姚晓平, 等. 白细胞介素 1 β 转换酶基因转导人肝癌细胞株的建立及其生物学特性研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1997, 4(4): 255-258.
- [4] 杨甲梅, 吴孟超, 陈汉, 等. 人新鲜肝癌细胞体外短期微量培养抗癌药敏试验及其临床意义[J]. *中华消化杂志*, 1993,

13(1): 8-10.

- [5] Kaye SB. Clinic drug resistance: The role of factors other than P-glycoprotein[J]. *Am J Med*, 1995, 99(suppl 6A): 40-44.
- [6] Fisher DE. Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the threshold[J]. *Cell*, 1994, 78: 539-542.
- [7] Miura M, Zhu H, Rotello R, *et al*. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*[J]. *Cell*, 1993, 75: 653-660.
- [8] Fujikawa K, Shiraki K, Sugimoto K, *et al*. Reduced expression of ICE/caspase1 and CPP32/caspase3 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(3B): 1927-1932.
- [9] Kondo S, Barna BP, Morimura T, *et al*. Interleukin-1 β -converting enzyme mediates cisplatin-induced apoptosis in malignant glioma cells[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 6166-6171.

【收稿日期】 2003-03-14

【修回日期】 2003-04-10

· 研究简报 ·

【文章编号】 1007-385X(2003)02-0133-01

榄香烯或/和热休克对肿瘤细胞凋亡的影响

金梅¹, 胡景慧¹, 吴志华¹, 朴花², 钱振超²(1. 辽宁师范大学生命科学院, 大连 116029; 2. 大连医科大学肿瘤研究所)

为了进一步研究榄香烯的抗癌和诱导肿瘤主动免疫效应及其分子机制,我们设想它可能与榄香烯作为一种应激原(stressor)诱导肿瘤细胞产生热休克蛋白(heat shock protein, HSP)及 HSP-肿瘤肽之间有一定的关系。因此我们对小鼠 H22 腹水型肝癌细胞和 L615 白血病细胞进行不同浓度的榄香烯(elemene)或/和不同时间的热休克(42 $^{\circ}$ C)处理,用光镜和透射电镜观察其对形态结构变化的影响,并分别采用直接免疫荧光法流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡百分率。结果表明,不同浓度的榄香烯和不同温度、不同时间的热休克处理对肿瘤细胞的形态、结构的影响不尽相同,并呈榄香烯浓度和热休克温度和热休克时间的依赖性。就 H22 肝癌和 L615 白血病 2 种肿瘤细胞来说,榄香烯或热休克处理在某种程度上可对它们产生相同或相似的影响,都能引起细胞的凋亡和坏死。未见有榄香烯或热休克特定的形态学变化,也未见有 H22 肝癌或 L615 白血病细胞所特有的变化;但在相同条件下对 2 种肿瘤细胞产生的影响程度不同, L615 白血病较 H22 肝癌细胞更敏感,形态学变化更为剧烈。不同浓度榄香烯或不同时间 42 $^{\circ}$ C 热休克处理 H22 和 L615 细胞,都能引起此 2 种肿瘤细胞凋亡。在相同因素同样处理条件下 L615 白血病细胞比 H22 腹水肝癌细胞的凋亡率显著增加($P < 0.01$, 除 42 $^{\circ}$ C 0.5 h 外)。也即 L615 发生细胞凋亡的敏感性明显高

于 H22 细胞。对于 H22 肝癌细胞来说,其凋亡细胞率并未随热休克时间的延长而有明显变化($P > 0.05$),但却随着榄香烯浓度的增加而凋亡数明显升高($P < 0.01$)。榄香烯和热休克复合处理,特别是榄香烯在热休克之前或与热休克同时处理使 H22 肿瘤细胞的凋亡数略有增加,但不显著($P > 0.05$)。对于 L615 肿瘤细胞来说,随着榄香烯浓度的增加和热休克时间的延长, L615 细胞的凋亡数均显著增加($P < 0.01$),并且榄香烯和热休克复合处理,不论榄香烯处理在热休克之前、同时或之后均能使 L615 细胞的凋亡率明显升高($P < 0.01$)。总之,榄香烯和热休克诱发肿瘤细胞凋亡是其抗肿瘤作用机制的重要方面之一;但也有不同之处,榄香烯或/和热休克可使肿瘤细胞产生凋亡,热休克除了使肿瘤细胞产生凋亡外,还能起到防御保护细胞死亡的作用,因此两者又存在着不同的作用机制。通过研究凋亡的调控机制将有助于治疗人类恶性肿瘤疾病。本研究初步证实榄香烯的作用机理可能和热休克的作用机理有一定的相同之处,与热休克所产生的热休克蛋白 HSP-肿瘤肽相关联。

【关键词】 榄香烯; 热休克; 细胞凋亡; 肿瘤

【中图分类号】 Q813; R730.5

【文献标识码】 D

【收稿日期】 2002-12-11

【修回日期】 2003-03-20