

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.006

## 稳定过表达人 *MGST1* 基因抑制肺腺癌细胞 SPC-A-1 的凋亡

曾宝真<sup>1,2</sup>, 葛春蕾<sup>2</sup>, 付桥粉<sup>2</sup>, 张志伟<sup>2</sup>, 宋鑫<sup>2</sup>, 黄文华<sup>1</sup>(1. 南方医科大学基础医学院人体解剖国家重点学科, 广东广州 510515; 2. 昆明医科大学第三附属医院暨云南省肿瘤医院肿瘤生物治疗中心, 云南昆明 650100)

**[摘要]** **目的:**建立稳定过表达微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 1 (microsomal glutathione S-transferase 1, *MGST1*) 基因的肺腺癌 SPC-A-1 细胞系, 探讨 *MGST1* 在肺腺癌中的作用及其机制。 **方法:**重组质粒 pcDNA3-MGST1 和空载体 pcDNA3 以脂质体介导的方法转染至 SPC-A-1 细胞中, 经过 G418 筛选稳转细胞系, 标记为 pcDNA3-MGST1 细胞和空载体 pcDNA3 细胞。实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 鉴定稳转细胞中 *MGST1* mRNA 和蛋白的表达情况。MTS 法检测稳转细胞的活力; 流式细胞仪和 Western blotting 检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导下稳转细胞的凋亡率和下游凋亡相关蛋白水平变化。 **结果:**酶切鉴定和测序结果显示 pcDNA3-MGST1 重组质粒构建成功, 并获得具有 G418 抗性的稳转细胞株。pcDNA3-MGST1 细胞中 *MGST1* 在 mRNA 和蛋白水平表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且细胞活力明显增加 ( $P < 0.05$ )。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导下, pcDNA3-MGST1 细胞的早期凋亡率明显低于 pcDNA3 组 [ $(3.30 \pm 0.40)\%$  vs  $(6.50 \pm 0.95)\%$ ,  $P < 0.05$ ]; pcDNA3-MGST1 细胞凋亡相关蛋白 caspase 9、caspase 3、PARP 表达增多, cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3、cleaved-PARP 表达明显减少。 **结论:**本研究成功构建了稳定过表达 *MGST1* 的 SPC-A-1 肺腺癌细胞系, *MGST1* 可能通过调节 caspase 凋亡通路抑制肺腺癌细胞的凋亡。

**[关键词]** 肺腺癌; 微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 1; 基因克隆; 稳定过表达; caspase 蛋白; 凋亡

**[中图分类号]** R734.2; R730.54

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)06-0608-07

## Stable overexpression of human *MGST1* gene inhibits apoptosis of lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1

ZENG Baozhen<sup>1,2</sup>, GE Chunlei<sup>2</sup>, FU Qiaofen<sup>2</sup>, ZHANG Zhiwei<sup>2</sup>, SONG Xin<sup>2</sup>, HUANG Wenhua<sup>1</sup>(1. Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 2. Department of Cancer Biotherapy Center, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University & Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650100, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** Lung adenocarcinoma SPC-A-1 cell line that stably over-expresses microsomal glutathione S-transferase 1 (*MGST1*) was constructed to explore the function and mechanism of *MGST1* in lung adenocarcinoma. **Methods:** The recombinant plasmid pcDNA3-MGST1 and the empty vector pcDNA3 were transfected into SPC-A-1 by Lipofectamine-mediated method; after being screened by G418, stably transfected cells were labeled and divided into pcDNA3-MGST1 group and empty vector pcDNA3 group. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of *MGST1* at mRNA and protein level in stable cells. MTS was used to detect the viability of cells. Flow cytometry and Western blotting were used to detect the cell apoptotic rate and the downstream apoptotic proteins induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. **Results:** The results of sequencing showed that the recombinant plasmid pcDNA3-MGST1 was successfully constructed, and the stable cell line with G418 resistance was obtained. The mRNA and protein level of *MGST1* in pcDNA3-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. U1502222, No. 81470005, No. 81260307); 国家自然科学基金重大科研仪器研制项目(No. 61427807)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. U1502222, No. 81470005, No. 81260307), and the key Scientific Research Equipment Development Project of the National Natural Science Foundation of China(No. 61427807)

**[作者简介]** 曾宝真(1990-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事肺腺癌发生发展的机制及治疗研究, E-mail: 13516387327@163.com

**[通信作者]** 宋鑫(SONG Xin, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤化疗与生物治疗的研究, E-mail: songxin68@126.com; 黄文华(HUANG Wenhua, co-corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事临床应用解剖学及数字医学研究, E-mail: huangwenhua2009@139.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170603.1027.016.html>

*MGST1* group were all significantly elevated ( $P < 0.01$ ), and the cell viability was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Under the induction of  $H_2O_2$ , the early apoptosis rate of pcDNA3-*MGST1* group was significantly lower than that of pcDNA3 group ( $[3.30 \pm 0.40]\%$  vs  $[6.50 \pm 0.95]\%$ ,  $P < 0.05$ ). The expressions of apoptotic proteins (caspase 9, caspase3 and PARP) increased, and the expressions of cleaved-caspase 9, cleaved-caspase 3 and cleaved-PARP were significantly decreased in pcDNA3-*MGST1* group. **Conclusion:** The lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1, which stably over-expresses human *MGST1*, has been successfully established. It was found that *MGST1* could inhibit the apoptosis of lung adenocarcinoma cells by regulating caspase apoptosis pathway, which laid the experimental foundation for the follow-up study.

[ **Key words** ] lung adenocarcinoma; microsomal glutathione S-transferase 1 (*MGST1*); gene clone; stable overexpression; caspase protein; apoptosis

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24(6): 608-614. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.006 ]

肺癌发病率和病死率在我国及全世界均高居首位,肺腺癌是肺癌最常见的组织类型之一,其发现时常处于晚期,预后较差<sup>[1-3]</sup>。因此探索肺腺癌的发病机制,探寻肺腺癌新的治疗靶点具有重大意义。微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 1 (microsomal glutathione S-transferase 1, *MGST1*) 基因位于 12 号染色体,主要分布于内质网和线粒体外膜,具有被氧化应激活化的特性<sup>[4]</sup>。近年来,氧化应激逐渐成为研究肿瘤形成及发展因素的热点,氧化和抗氧化失衡通过细胞信号转导调控癌基因和抑癌基因的表达,导致肿瘤细胞凋亡减少,引发肿瘤形成<sup>[5-6]</sup>。大量研究<sup>[7-10]</sup>表明,*MGST1* 与食管癌、上皮性卵巢癌、子宫颈癌等多种肿瘤发生发展有关,且在转基因小鼠肺腺癌组织中高表达,可能是小鼠肺腺癌的早期诊断标志物之一,但作用机制未阐明,而 *MGST1* 在人肺腺癌中的功能和作用机制尚未见报道。笔者前期研究发现,肺腺癌 SPC-A-1 细胞中内源性 *MGST1* 表达较低,严重制约后续功能及机制的研究。因此,本文构建稳定过表达 *MGST1* 的肺腺癌细胞株 SPC-A-1,研究 *MGST1* 对肺腺癌 SPC-A-1 细胞凋亡的影响及机制,为 *MGST1* 成为肺腺癌治疗候选靶基因提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肺癌细胞系 SPC-A-1 购自 ATCC。RPMI Medium 1640 培养基、含 0.25% EDTA 胰酶购于 Gibco 公司,胎牛血清购于 BIOSUN 公司,质粒 pcDNA3 为南京医科大学孙玉洁教授赠予,限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Kpn* I 均购于 TaKaRa 公司,T4 DNA 连接酶购于 BioLabs 公司,真核细胞转染试剂 Lipofectamine™2000、G418 均购自 Invitrogen 公司,Annexin V-APC/7-ADD 细胞凋亡检测试剂盒购于凯基公司,RIPA 裂解缓冲液购于 Solarbio 公司,*MGST1*

一抗购于 Abcam 公司,Caspase 一抗试剂盒购于 Cell Signaling, $\alpha$ -Tubulin 一抗、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 及羊抗兔 IgG(二抗)均购于 Proteintech 公司,PrimeScript™ 逆转录试剂盒和 SYBR® Premix Ex Taq™ II 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒均购自 TaKaRa 公司。测序由上海铂尚生物技术有限公司完成。

### 1.2 肺腺癌 SPC-A-1 细胞培养

SPC-A-1 细胞用含 10% FBS 的 RPMI Medium 1640 完全培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。待细胞生长时汇合到 90% 左右,用 PBS 冲洗 2 次,0.25% 含 EDTA 的胰酶消化后传代 2~3 次,取对数生长期且状态良好的细胞用于实验。

### 1.3 pcDNA3-*MGST1* 重组质粒转染构建稳定过表达 *MGST1* 的 SPC-A-1 细胞

用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增 *MGST1* CDS 区(编码序列,coding sequence)的引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。上游引物:5'-CCCAAGCTTGGCTTGCTGCTTCCTCCTC-3'(含 *Hind* III 限制酶切位点 CCCAAGCTT),下游引物:5'-CGGGGTACCCCTCTGCTCCCTCCTACCT-3'(含 *Kpn* I 限制酶切位点 CGGGGTACC)。选择高表达 *MGST1* 的细胞株,提取 RNA 并逆转录为 cDNA,以此 cDNA 作为模板,用 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 体系进行 PCR 扩增,PCR 条件为:预变性 98 °C 10 s,变性 98 °C 10 s,退火 60 °C 15 s,延伸 72 °C 45 s;共 33 个循环。4 °C 保存。

分别将目的 *MGST1* DNA 片段和 pcDNA3 用 *Hind* III 和 *Kpn* I 限制性内切酶双酶切,产物用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞,经 PCR 和 *Hind* III、*Kpn* I 双酶切鉴定并测序,测序正确的质粒命名为 pcDNA3-*MGST1*。

将 SPC-A-1 细胞按  $5.0 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,12~24 h 后按 Lipofectamine™2000 说明书操作,

转染 pcDNA3 空载质粒及 pcDNA3-MGST1 重组质粒各 4  $\mu\text{g}$ , 分别标记为 pcDNA3 组和 pcDNA3-MGST1 组。转染 48 h 后加入 G418 至终浓度为 2 mg/ml, 每 2 d 更换 1 次培养基, 同时以未转染的 SPC-A-1 细胞作为阴性对照。筛选 14 d 左右, 阴性对照组细胞全部死亡, 转染 pcDNA3 和 pcDNA3-MGST1 的细胞均有抗 G418 的克隆长出。运用有限稀释法将各转染组细胞传于 96 孔细胞培养板中培养 10 d 左右, 挑选单克隆细胞胰酶消化传入 48 孔细胞培养板中生长, 待细胞生长时汇合至 90% 左右, 传至 6 孔细胞培养板, 扩大培养, 并及时保种。

#### 1.4 实时荧光定量 PCR 检测 pcDNA3-MGST1 转染对 SPC-1-1 细胞 *MGST1* mRNA 表达的影响

收集 pcDNA3 和 pcDNA3-MGST1 组细胞, TRIzol 提取细胞总 RNA, 按试剂盒说明书进行逆转录, 获得 cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR 检测, 反应体系为 10  $\mu\text{l}$ 。 $\beta$ -actin 作为内参, Prime Bank 上查得扩增引物序列: *MGST1* 上游引物为 5'-ATGACAGAGTAGAACGTGTACGC-3', 下游引物为 5'-TACAGGAGGCCAATTCGAAGA-3';  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 下游引物为 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 34 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。采用 Power 值即  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}[11]}$  表示各组细胞中 *MGST1* mRNA 的表达水平。

#### 1.5 Western blotting 检测转染后 SPC-A-1 细胞 *MGST1* 蛋白的表达

裂解 pcDNA3 和 pcDNA3-MGST1 组细胞提取总蛋白并测定浓度, 加上样缓冲液 (Beyotime) 于 95  $^{\circ}\text{C}$  变性, 取 50  $\mu\text{g}$  总蛋白进行 12% SDS-PAGE 并转至 0.22  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜 (Immobilon<sup>®</sup>-pSQ) 上, 将 8% 脱脂牛奶室温封闭膜 2 h 后加入稀释 (*MGST1* 为 1:1 000, 凋亡蛋白均为 1:500, GAPDH 为 1:1 000) 的一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 将膜置于 HRP 标记的二抗中室温孵育 90 min。TBST 洗 3 次后, 用 ECL 化学发光于暗室曝光检测。

#### 1.6 MTS 法检测过表达 *MGST1* 对 SPC-A-1 细胞增殖活力的影响

对数生长期 pcDNA3 和 pcDNA3-MGST1 各组细胞胰酶消化后, 每孔  $3 \times 10^3$  个细胞铺 96 孔板, 每组设置 6 个平行复孔。细胞贴壁后, 加入 30  $\mu\text{l}$  MTS 工作液, 置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中孵育 2 h 后用全波长扫描仪在 490 nm 波长处测其光密度 ( $D$ ) 值, 之后每隔 24 h 加 1 次 MTS, 测其  $D$  值。整理数

据, 绘制曲线。

#### 1.7 流式细胞仪检测 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导过表达 *MGST1* SPC-A-1 细胞的凋亡水平

$\text{H}_2\text{O}_2$  处理 pcDNA3 和 pcDNA3-MGST1 各组细胞 24 h 后用无 EDTA 胰酶消化, 预冷的 PBS 洗 2 次后弃上清, 500  $\mu\text{l}$  结合缓冲液重悬细胞, 加 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-APC 混匀后, 加入 5  $\mu\text{l}$  7-ADD 染液, 混匀后避光室温孵育 15 min, 1 h 内上机检测。

#### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件及 GraphPad Prism 5.02 绘制图表, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 独立样本比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建质粒 pcDNA3-MGST1 表达载体

*MGST1* CDS 区为 468 bp, 扩增产物长度为 616 bp, pcDNA3 载体全长约为 5 400 bp。扩增 *MGST1* 基因 (图 1A) 连入 pcDNA3 载体后, 随机挑选克隆编号 1~5 进行菌液 PCR 鉴定 (图 1B), 选取条带较亮克隆 5 号提取重组质粒用 *Hind* III 和 *Kpn* I 对其进行双酶切鉴定 (图 1C), 得到大小约为 5 400 bp 和 616 bp 的 2 条条带, 与目的基因大小片段相符, 测序结果 (图 1D) 与 NCBI 上公布的编码区序列完全一致, 证明重组质粒 pcDNA3-MGST1 构建成功。

### 2.2 成功构建稳定过表达 *MGST1* 基因的肺腺癌 SPC-A-1 细胞系

常规转染细胞 48 h 后, 用终质量浓度为 2 mg/ml 的 G418 进行筛选, 每 2 d 更换 1 次培养基。筛选 14 d 后, 阴性对照细胞全部死亡, 转染组 (pcDNA3 和 pcDNA3-MGST1) 细胞随培养时间延长细胞死亡逐渐减少, 并有抗 G418 的克隆团长出 (图 2), 且培养至 30 d 左右细胞无死亡, 提示筛选成功。将克隆团运用有限稀释法接种于 96 孔板内, 得到 6 株稳定过表达 *MGST1* 的 SPC-A-1 细胞系。

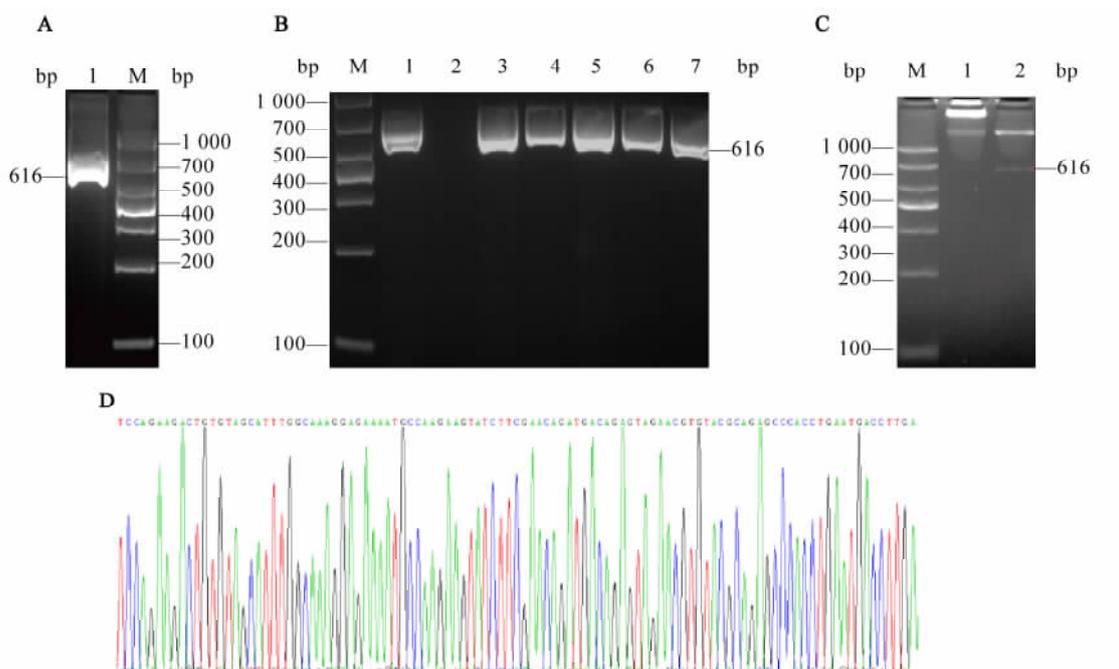
### 2.3 鉴定稳定过表达 *MGST1* 基因的 SPC-A-1 细胞系

实时荧光定量 PCR 检测结果 (图 3A) 及 Western blotting 检测结果 (图 3B) 显示, 在 6 株转染 pcDNA3-MGST1 的 SPC-A-1 细胞系中 *MGST1* mRNA 水平均显著高于转染空载体的对照组 ( $P < 0.01$ ); *MGST1* 蛋白表达水平亦高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 过表达 *MGST1* 提高 SPC-A-1 细胞的增殖活力

MTS 检测稳转细胞系 SPC-A-1 细胞的增殖活力结果 (图 4) 显示, 从第 2 天开始, pcDNA-MGST1 组细胞活力明显比 pcDNA3 组细胞高, 且随时间的推

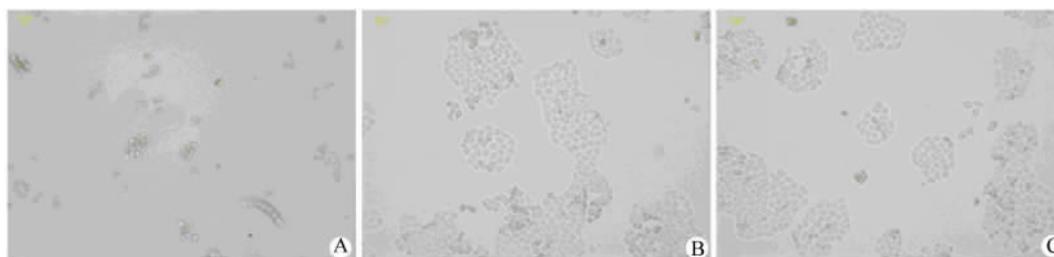
移,活细胞数的差值明显扩大( $P < 0.05$ )。



A. RT-PCR of *MGST1* gene. 1: PCR fragment of *MGST1* amplified from RNA of SPC-A-1; M: DNA marker (DL1000);  
 B. 1: Positive control (using SPC-A-1 extracted RNA reverse transcription of the cDNA as the template for the amplification);  
 2: Negative control (LB medium with resistant to ampicillin as the template); 3~7: pcDNA3-*MGST1* clone No. 1-5 bacterial  
 culture PCR results; M: DNA marker (DL1000);  
 C. 1: pcDNA3-*MGST1*; 2: pcDNA3-*MGST1* digested with *Hind* III and *Kpn* I; M: DNA marker (DL1000);  
 D: Sequencing comparison of recombinant plasmid pcDNA3-*MGST1*, the results are completely consistent

图1 重组质粒 pcDNA3-*MGST1* 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmids pcDNA3-*MGST1*



A: The untransfected cell line as negative control; B: Transfected with pcDNA3 showed clone cells;  
 C: Transfected with pcDNA3-*MGST1* showed clone cells

图2 转染组筛选得到具有 G418 抗性的 SPC-A-1 细胞克隆团( $\times 50$ )

Fig.2 SPC-A-1 cells clones with G418 resistance were screened from transfection group( $\times 50$ )

2.5 过表达 *MGST1* 显著抑制  $H_2O_2$  诱导的 SPC-A-1 细胞早期凋亡

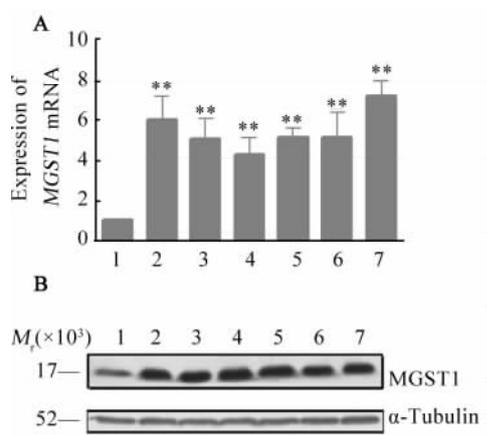
流式细胞术检测  $H_2O_2$  诱导稳转细胞系 SPC-A-1 凋亡显示, pcDNA-*MGST1* 组细胞早期凋亡率(Q4)明显比 pcDNA3 组低[ $(3.30 \pm 0.40)\%$  vs  $(6.50 \pm 0.95)\%$ ,  $P < 0.05$ ], 但晚期凋亡率无明显

差异。

2.6 过表达 *MGST1* 抑制 SPC-A-1 细胞内活性凋亡蛋白的表达

Western blotting 检测经  $H_2O_2$  诱导的稳转 SPC-A-1 细胞系凋亡蛋白表达结果(图5)显示, pcDNA-*MGST1* 组与 pcDNA3 组细胞相比, caspase 9、caspase

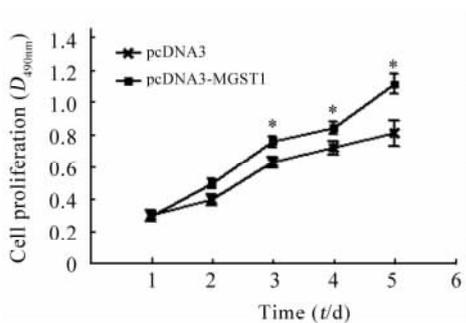
3 和 PARP 的前体蛋白表达升高, 其活性蛋白 cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3、cleaved-PARP 表达明显减少。



\*\*  $P < 0.01$  vs 1 group

1: SPC-A-1 cells transfected with pcDNA3;  
2-7: SPC-A-1 cell lines 1-6 transfected with the pcDNA3-MGST1

图3 6株稳定转染 pcDNA3-MGST1 的 SPC-A-1 细胞中 MGST1 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达水平升高  
Fig.3 Expressions of MGST1 mRNA (A) and protein (B) were increased in six stable SPC-A-1 cell lines transfected with pcDNA3-MGST1



\*  $P < 0.05$  vs pcDNA3.0 group

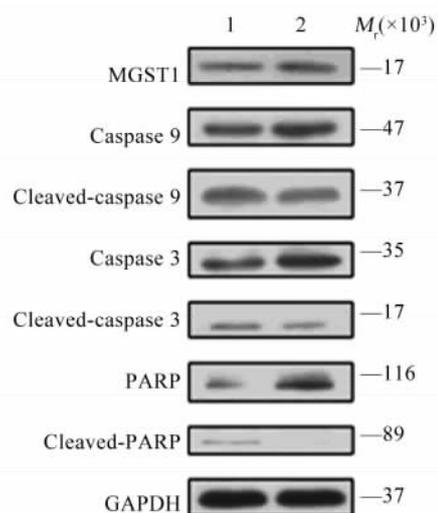
图4 pcDNA3-MGST1 组 SPC-A-1 细胞增殖活力高于 pcDNA3 组

Fig.4 SPC-A-1 cell proliferation viability of pcDNA3-MGST1 group was higher than that of pcDNA3 group

### 3 讨论

MGST1 高表达于肝脏, 属于谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GSTs) 的一个亚型, 为第 II 相膜结合酶。GSTs 在肿瘤中高表达且与患者预后不良及化疗药物耐药有关, 而 MGST1 主要在肝微粒

体通过催化亲核性的谷胱甘肽和各种亲电子试剂的结合反应发挥解毒作用<sup>[12-13]</sup>, 并使毒物毒性更低, 药物代谢更彻底, 且更容易排除体外。因此, MGST1 既往研究<sup>[14-17]</sup>多局限在肿瘤化疗药物耐药方面, 对阿霉素、吉西他滨、顺铂、苯丁酸氮芥等药物的耐药均有报道。近年来, 采用芯片和微阵列研究<sup>[18]</sup>发现, MGST1 在多种恶性肿瘤中高表达, 并参与调节肿瘤的发生发展, 在恶性黑色素瘤中通过调节 ROS 的水平影响细胞转移能力。有研究<sup>[19]</sup>显示, 成神经细胞瘤对表达 MGST1 较高的细胞或器官转移能力下降, 且机制与氧化应激有关, 氧化应激平衡失调可导致细胞凋亡减少, 促进肿瘤的发生。目前已有大量文献<sup>[20-22]</sup>报道, 中药及化学药物可通过调节氧化应激促进细胞凋亡参与肿瘤的治疗。Caspase 家族蛋白与细胞凋亡形态学变化关系密切, 是控制细胞凋亡起关键作用的蛋白酶家族<sup>[23]</sup>。Caspase 以无活性的单体前体酶存在, 分为启动子(顶端: caspase 2、8、9、10)和效应器(实施者: caspase 3、6、7), 启动子的作用是在各种刺激下(如化疗药物、TNF- $\alpha$  介导、细胞黏附丧失和细胞骨架损伤)发生自我激活并识别和活化下游的 caspase 蛋白, caspase 3 活化后凋亡进入不可逆阶段, 是 caspase 家族中重要的凋亡实施者, caspase 家族蛋白发生级联放大反应活化水解线粒体发挥促凋亡作用<sup>[24-26]</sup>。



1: pcDNA3; 2: pcDNA3 - MGST1

图5 稳定过表达 MGST1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SPC-A-1 细胞下游凋亡蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of stable overexpression of MGST1 on the expressions of downstream apoptotic proteins in SPC-A-1 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

有研究<sup>[26]</sup>发现, MGST1 在肺腺癌细胞株 SPC-A-1 中表达较低。为研究 MGST1 对肺腺癌 SPC-A-1

细胞凋亡的影响及分子机制,本研究构建了 pcDNA3-MGST1 重组质粒,并成功筛选出稳定过表达外源性 *MGST1* 的肺腺癌细胞株 SPC-A-1。将此细胞模型作为工具细胞研究 *MGST1* 在肺腺癌中的作用,结果显示过表达 *MGST1* 增加 SPC-A-1 细胞的增殖活力,提示 *MGST1* 可能参与肺腺癌的发生。用  $H_2O_2$  诱导 SPC-A-1 细胞凋亡后,过表达 *MGST1* 可抑制 SPC-A-1 细胞的早期凋亡率。为了进一步阐明 *MGST1* 抑制 SPC-A-1 细胞凋亡的分子机制,Western blotting 检测 caspase 家族蛋白的表达水平,结果发现  $H_2O_2$  诱导过表达 *MGST1* SPC-A-1 凋亡的细胞中,前体蛋白 caspase 9、caspase 3、PARP 表达升高,活性蛋白 cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3、cleaved-PARP 表达明显减少,表明 *MGST1* 可能通过影响下游 caspase 9-caspase 3-PARP-apoptosis 这条凋亡通路抑制肺腺癌细胞的凋亡,促进肺腺癌的发生。

本研究成功构建 pcDNA3-MGST1 并筛选出了稳定过表达 *MGST1* 的肺腺癌 SPC-A-1 细胞系,发现 *MGST1* 可能通过调节 caspase 9-caspase 3-PARP-apoptosis 凋亡通路抑制肺腺癌细胞的凋亡,促进肺腺癌的增殖,为 *MGST1* 成为肺腺癌新候选治疗靶基因提供可靠的实验依据,为临床上针对肺腺癌的基因靶向治疗提供新的策略。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMA L. A Cancer statistics, 2016 [ J ]. CA Cancer J Clin, 2016, 66( 1 ): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- [ 2 ] FAHRMANN J F, GRAPOV D D, WANICHTHANARAK K, et al. Integrated metabolomics and proteomics highlight altered nicotinamide and polyamine pathways in lung adenocarcinoma[ J/OL ]. Carcinogenesis, 2017, 2017[ 2017-03-01 ]. https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgw205. DOI: 10.1093/carcin/bgw205.
- [ 3 ] DROSTEN M, BARBACID M. Modeling K-Ras-driven lung adenocarcinoma in mice: preclinical validation of therapeutic targets [ J ]. J Mol Med ( Berl ), 2016, 94( 2 ): 121-135. DOI: 10.1007/s00109-015-1360-5.
- [ 4 ] SHIMOJI M, FIGUEROA R A, NEVE E, et al. Molecular basis for the dual subcellular distribution of microsomal glutathione transferase 1[ J ]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1859( 2 ): 238-244. DOI: 10.1016/j.bbame.2016.11.014.
- [ 5 ] HASSAN W, NOREEN H, REHMAN S, et al. Oxidative stress and antioxidant potential of one hundred medicinal plants[ J/OL ]. Curr Top Med Chem, 2017, 2017[ 2017-03-01 ]. http://www.eurkaselect.com/148872/article. DOI: 10.2174/1568026617666170102125648.
- [ 6 ] ANDREOZZI E, ANTONELLI A, CANGIOTTI M, et al. Interactions of nitroxide-conjugated and non-conjugated glycodendrimers with normal and cancer cells and biocompatibility studies[ J ]. Bioconjug Chem, 2017, 28( 2 ): 524-538. DOI: 10.1021/acs.bioconjugchem.6b00635.
- [ 7 ] BUAS M F, HE Q, JOHNSON L G, et al. Germline variation in inflammation-related pathways and risk of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma[ J/OL ]. Gut, 2016, 2016[ 2017-03-01 ]. http://gut.bmj.com/content/early/2016/08/02/gutjnl-2016-311622.long. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-311622.
- [ 8 ] CHORNOKUR G, LIN H Y, TYRER J P, et al. Common genetic variation in cellular transport genes and epithelial ovarian cancer ( EOC ) risk[ J/OL ]. PLoS One, 2015, 10( 6 ): e0128106 [ 2017-03-01 ]. http://journals.plos.org/plosone/article/10.1371/journal.pone.0128106. DOI: 10.1371/journal.pone.0128106.
- [ 9 ] TAN G M, LIM H J, YEOW T C, et al. Temporal proteomic profiling of chlamydia trachomatis-infected HeLa-229 human cervical epithelial cells[ J ]. Proteomics, 2016, 16( 9 ): 1347-1360. DOI: 10.1002/pmic.201500219.
- [ 10 ] LINNERTH N M, SIRBOVAN K, MOOREHEAD R A. Use of a transgenic mouse model to identify markers of human lung tumors [ J ]. Int J Cancer, 2005, 114( 6 ): 977-982. DOI: 10.1002/ijc.20814.
- [ 11 ] MASOCHA W. Gene expression profile of sodium channel subunits in the anterior cingulate cortex during experimental paclitaxel-induced neuropathic pain in mice[ J/OL ]. Peer J, 2016, 4: e2702 [ 2017-03-01 ]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119229/. DOI: 10.7717/peerj.2702.
- [ 12 ] BAKARI S, LEMBROUK M, SOURD L, et al. Lactococcus lactis is an efficient expression system for mammalian membrane proteins involved in liver detoxification, CYP3A4, and MGST1[ J ]. Mol Biotechnol, 2016, 58( 4 ): 299-310. DOI: 10.1007/s12033-016-9928-z.
- [ 13 ] BJORKHEM-BERGMAN L, JOHANSSON M, MORGENSTERN R, et al. Prenatal expression of thioredoxin reductase 1 ( TRXR1 ) and microsomal glutathione transferase 1 ( MGST1 ) in humans[ J/OL ]. FEBS Open Bio, 2014, 4: 886-891[ 2017-03-01 ]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215115/. DOI: 10.1016/j.fob.2014.10.005.
- [ 14 ] VAN GISBERGEN M W, CEBULA M, ZHANG J, et al. Chemical reactivity window determines prodrug efficiency toward glutathione transferase overexpressing cancer cells[ J ]. Mol Pharm, 2016, 13( 6 ): 2010-2025. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00140.
- [ 15 ] BAI J, SATA N, NAGAI H. Gene expression analysis for predicting gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer patients[ J ]. HPB ( Oxford ), 2007, 9( 2 ): 150-155. DOI: 10.1080/13651820601175918.
- [ 16 ] JOHANSSON K, ITO M, SCHOPHUIZEN C M, et al. Characterization of new potential anticancer drugs designed to overcome glutathione transferase mediated resistance[ J ]. Mol Pharm, 2011, 8( 5 ): 1698-1708. DOI: 10.1021/mp2000692.
- [ 17 ] JOHANSSON K, AHLEN K, RINALDI R, et al. Microsomal glutathione transferase 1 in anticancer drug resistance[ J ]. Carcinogenesis, 2007, 28( 2 ): 465-470. DOI: 10.1093/carcin/bgl148.
- [ 18 ] BRACALENTE C, IBANEZ I L, BERENSTEIN A, et al. Repro-

- gramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression: upregulation of antioxidant genes correlates with regression of melanoma malignancy and with malignant progression when downregulated[ J ]. *Oncotarget*, 2016, 7( 27 ): 41154-41171. DOI: 10.18632/oncotarget.9273.
- [ 19 ] KELNER M J, DICCIANNI M B, YU A L, et al. Absence of MGST1 mRNA and protein expression in human neuroblastoma cell lines and primary tissue[ J/OL ]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69: 167-171[ 2017-03-01 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010302/>. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.021.
- [ 20 ] BASHASH D, ZAREII M, SAFAROGHLI-AZAR A, et al. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells[ J/OL ]. *Hematology*, 2017, 2017: 1-11[ 2017-03-01 ]. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10245332.2016.1275426>. DOI: 10.1080/10245332.2016.1275426.
- [ 21 ] ROH J L, KIM E H, JANG H, et al. Aspirin plus sorafenib potentiates cisplatin cytotoxicity in resistant head and neck cancer cells through xCT inhibition[ J/OL ]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 1-9[ 2017-03-01 ]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584917300011>. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.002.
- [ 22 ] TAWANI A, AMANULLAH A, MISHRA A, et al. Evidences for piperine inhibiting cancer by targeting human G-quadruplex DNA sequences[ J/OL ]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39239[ 2017-03-01 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5171706/>. DOI: 10.1038/srep39239.
- [ 23 ] RUPNOW B A, KNOX S J. The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy[ J ]. *Apoptosis*, 1999, 4( 2 ): 115-143.
- [ 24 ] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease[ J/OL ]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5( 4 ): a008656[ 2017-03-01 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683896/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a008656.
- [ 25 ] RAHMANIAN N, HOSSEINIMEHR S J, KHALAJ A. The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy[ J/OL ]. *J Biomed Sci*, 2016, 23( 1 ): 88[ 2017-03-01 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5142153/>. DOI: 10.1186/s12929-016-0306-8.
- [ 26 ] CHIPUK J E, BOUCHIER-HAYES L, GREEN D R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario[ J ]. *Cell Death Differ*, 2006, 13( 8 ): 1396-1402. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401963.
- [ 收稿日期 ] 2017-03-12 [ 修回日期 ] 2017-04-21  
[ 本文编辑 ] 王映红

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: $^{60}\text{Co}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$ 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: $\text{N}^{14}$ ,  $\text{Co}^{60}$ 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ 等,不应写成 $\text{O}^{-2}$ ,  $\text{O}^{--}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 $*$ ;核子激发态用正体 $\text{m}$ ,也可用 $*$ )标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$ ,  $^{110}\text{Ag}^*$ ,  $\text{He}^*$ ,  $\text{NO}^*$ 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: $\text{H}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$ ,  $_{26}\text{Fe}$ 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锕)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)