

文章编号:1005-6947(2005)12-0909-05

· 实验研究 ·

反义 MBD1 基因真核表达载体转染对人胆管癌细胞 MBD1 基因表达的影响

左石, 李占飞, 罗剑, 郭伟, 徐立宁, 刘民锋, 董涇青, 邹声泉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨反义 MBD1 基因真核表达载体转染对人胆管癌 QBC-939 细胞中 MBD1 基因表达的影响,为进一步研究该基因的作用提供依据。方法 构建反义 MBD1 基因真核表达载体,通过脂质体转染入人胆管癌细胞株 QBC-939 中,以 G418 进行筛选得到稳定转染细胞株,用 PCR 鉴定外源性 neo^R 基因在转染细胞中的表达以确定转染成功。半定量 RT-PCR 观察转染前后 MBD1 基因 mRNA 水平的变化,流式细胞术检测转染前后 MBD1 蛋白的变化。结果 人胆管癌 QBC-939 细胞中 MBD1 基因的 mRNA 水平从 0.912 ± 0.022 降低至 0.215 ± 0.017 ,转染前后的差异有显著性 ($P < 0.01$); MBD1 蛋白水平从 $(80.19 \pm 5.05)\%$ 降低到 $(35.11 \pm 4.05)\%$,转染前后的差异有显著性 ($P < 0.01$)。结论 反义 MBD1 基因转染能降低人胆管癌 QBC-939 细胞中 MBD1 基因的表达水平,提示 MBD1 基因在胆管癌的发生发展中具有重要作用,反义 MBD1 基因转染有可能成为胆管癌治疗的一种新方法。

关键词: DNA, 反义; 胆管肿瘤/病因学; 转染; 基因表达

中图分类号: R575.7; R349.64

文献标识码: A

Effect of transfection of antisense MBD1 gene eukaryotic expression vector on the expression of MBD1 gene in human cholangiocarcinoma cell line

ZUO Shi, LI Zhan-fei, LUO Jian, GUO Wei, XU Li-ning, LIU Min-feng, DONG Jing-qing, ZOU Sheng-quan

(Department of General Surgery, The Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of transfection of antisense MBD1 gene eukaryotic expression vector on the expression of MBD1 gene in human cholangiocarcinoma cell line QBC-939. **Methods** The constructed antisense MBD1 gene eukaryotic expression vector was transfected into the human cholangiocarcinoma cell line QBC-939 using lipofectamine transfection reagents, and positive cell clones were obtained using G418 selection after transfection. The constructed recombinant vector was transfected into QBC-939 cells successfully and was confirmed by amplifying the exogenous neo^R gene with PCR method. The expression level of MBD1 gene mRNA and protein was detected by RT-PCR and FCM methods respectively. **Results** Following the transfection, the MBD1 gene mRNA level in human cholangiocarcinoma cell line QBC-939 decreased from 0.912 ± 0.022 to 0.215 ± 0.017 , and the MBD1 gene protein level also decreased from $(80.19 \pm 5.05)\%$ to $(35.11 \pm 4.05)\%$. There were very significant differences on the expression both at the transcription and post-transcription levels of MBD1 gene between non-transfection group and the antisense MBD1 gene eukaryotic expression vector transfection group ($P < 0.01$). **Conclusions** Transfection of the antisense MBD1 gene eukaryotic expression vector significantly reduced the expression level of MBD1 gene in human cholangiocarcinoma cell line QBC-939, and suggests that MBD1 gene plays an

基金项目: 国家高科技研究发展计划(863计划)(2002AA214061)。

收稿日期: 2005-04-05; **修订日期:** 2005-08-01。

作者简介: 左石(1973-),男,湖南道县人,华中科技大学同济医学院附属同济医院讲师,主要从事胆道肿瘤的基础与临床方面的研究。

通讯作者: 邹声泉 电话:027-83662398; E-mail:sqzou@tjh.tjmu.edu.cn。

important role in the development of cholangiocarcinoma and that transfection of antisense MBD1 gene may be a new method to treat cholangiocarcinoma.

Key words: DNA, Antisense; Bile Duct Neoplasms/etiology; Transfection; Gene Expression

CLC number: R575.7; R349.64

Document code: A

DNA 甲基化在基因表达调控中具有重要作用^[1]。研究表明,胆管癌的发生与其相关基因甲基化状态异常相关,包括癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化等;通过调节基因的甲基化而改变基因表达和功能的基因或分子治疗,可望在胆管癌的发生与发展中起阻断作用。为了探讨甲基磷酸胞苷酰鸟苷结合蛋白1(methyl-CpG binding domain protein 1, MBD1)基因在胆管癌的发生与发展中的作用及其与肿瘤相关基因的关系,笔者通过构建反义 MBD1 基因真核表达载体,用脂质体转染入人胆管癌细胞 QBC-939 中,观察其对内源性 MBD1 基因 mRNA 和蛋白表达水平的影响,为进一步研究 MBD1 基因提供研究方法和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体 pcDNA3.1(+)由本院黄保军博士惠赠。人胆管癌细胞株 QBC-939 由第三军医大学王曙光教授惠赠。RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司;质粒抽提试剂盒购自上海博亚生物技术公司;脂质体 Lipofectamine 2000TM, Trizol 试剂和 G418 购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶购自 NEB 公司;T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品;逆转录(RT)和聚合酶链式反应(PCR)试剂盒及 DNA 抽提试剂盒购自 MBI 公司;Ultra PureTM PCR 产物纯化试剂盒为上海赛百盛基因技术有限公司产品;鼠抗人 MBD1 单克隆抗体购自 IMGENEX 公司;FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自北京中山生物技术有限公司(Pierce 公司产品);所用引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 反义 MBD1 基因片断真核表达载体的构建和鉴定

1.2.1.1 引物设计 在 GenBank 中检索 MBD1 基因的 cDNA 序列(NM_015846),根据其编码序列(140~1957bp)应用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件联合进行引物设计,分别在引物的 5'端添加 Xba I 和 Kpn I 酶切位点和保护碱基^[2]。设计的引

物序列如下:上游引物为 5'CCC CTC TAG ACG CTC AGA CAC CTA TTA CCA 3';下游引物为 5'AAA AGG TAC CCA CAG TTC TCA CAG CAC CC 3',(划线部分分别为 Xba I 和 Kpn I 酶切位点)。扩增片断长度为 342bp(217~558bp),其中含有部分甲基 CpG 结合域序列。

1.2.1.2 载体构建及鉴定 应用 Trizol 试剂从 QBC-939 细胞中提取总 RNA,然后采用两步法进行 RT-PCR 获取目的 DNA 片断。将质粒 pcDNA3.1(+)和目的 DNA 片断分别用 Xba I 和 Kpn I 进行双酶切。胶回收纯化后,将 PCR 产物反向插入 pcDNA3.1(+)的 Kpn I 和 Xba I 多克隆位点上,然后转化到 DH5 α 菌中扩增。提取重组质粒进行 PCR 鉴定、酶切鉴定,并送上海博亚生物技术公司测序鉴定。将构建成功的重组质粒命名为 pcDNA-MBD1(AS)。

1.2.2 细胞培养 人胆管癌细胞株 QBC-939 生长在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 饱和湿度下培养。

1.2.3 基因转染 转染前 1d,用 0.25% 胰蛋白酶将细胞消化制成细胞悬液,计数后传代至 6 孔板,每孔细胞数为 5×10^5 。转染当日,取 pcDNA-MBD1(AS)和 pcDNA3.1(+)质粒各 2 μ g,按照 Lipofectamine 2000TM说明书进行转染,分别为转染组和转染空质粒组,并设未转染组对照(对照组)。转染后 72h,用 800 μ g/mL 浓度的 G418 进行筛选,待出现阳性克隆后,挑取单个细胞克隆扩大培养,并用浓度为 200 μ g/mL 的 G418 维持。

1.2.4 转染细胞外源性 neo^R 基因的检测 由于 pcDNA3.1(+)上含有新霉素抗性基因(neomycin resistance gene, neo^R),而 QBC-939 细胞中无该基因表达。通过检测该基因是否在转染细胞中表达初步确定转染是否成功。分别提取 QBC-939 细胞、转染组细胞和转染空质粒组细胞的 DNA,PCR 法扩增克隆细胞基因组中 neo^R 基因的特异性序列。neo^R 基因引物序列:上游引物为 5'GGT GGA GAG GCT ATT CGG CTA TGA 3';下游引物为 5'ATC CTG ATC GAC AAG ACC GGC TTC 3',扩增片段为 424bp。

PCR 条件:94℃ 3 min;94℃ 45 s,61℃ 50 s,72℃ 50 s,共 30 个循环;72℃ 5 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 半定量 RT-PCR 观察 MBD1 基因的 mRNA 水平 分别提取以上各组细胞的总 RNA,然后用两步法行 RT-PCR。MBD1 基因引物序列如下:上游引物为 5'CGC TCA GAC ACC TAT TAC CA 3';下游引物为 5'CAC AGT TCT CAC AGC ACC C 3',扩增片段为 322 bp。 β -actin 引物序列:上游引物为 5'TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG 3';下游引物为 5'ATC TCC TTC TGC ATC CTG TG 3',扩增片段为 682 bp。PCR 条件:94℃ 3 min;94℃ 45 s,61℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环;72℃ 5 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。分析各条带的吸光度 A 值,并与内参照的吸光度 A 值相比,以此作为 MBD1 基因 mRNA 的相对表达值。

1.2.6 流式细胞仪检测转染前后细胞内 MBD1 蛋白 流式细胞仪为美国 BD 公司产品,型号为 FAC-SCalibur。采用间接免疫荧光标记法检测。一抗为鼠抗人 MBD1 单克隆抗体,二抗为 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG。除设正常实验对照外,还设有用 PBS 代替 1:100 稀释的鼠抗人 MBD1 单克隆抗体的阴性

对照。每组细胞设 6 个标本数,用双参数点阵图分别采集 1×10^4 个细胞,然后计算阳性细胞的百分率。阳性细胞数(%) = (实验组阳性细胞数 - 阴性对照组阳性细胞数) $\times 10^{-4}$,即为 MBD1 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用 SPSS 11.5 软件统计包进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 转染细胞观察

转染后 24 h,转染组和转染空质粒组中即可见较多的死亡细胞。72 h 后加入 800 μ g/mL 的 G418 进行筛选。6~8 d 对照组细胞全部死亡,转染组和转染空质粒组亦见大量死亡细胞,活细胞剩余约 15%~20%,继续筛选培养,14~21 d 可见到阳性细胞克隆(图 1)。

2.2 外源性 neo^R 基因的检测

结果表明,转染组和转染空质粒组两组细胞均出现 424 bp 的特异扩增条带,而对照组则无此条带。表明所构建的 pcDNA-MBD1(AS)重组质粒和空质粒均转染入 QBC-939 细胞内(图 2)。

图 1 转染 pcDNA-MBD1(AS)重组质粒后形成的细胞克隆

图 2 PCR 鉴定外源性 neo^R 基因的凝胶电泳图

2.3 RT-PCR 观察各组细胞中 MBD1 基因的 mRNA 表达水平

转染组出现的条带光密度明显较空质粒转染组和对照组减弱,而空质粒转染组与对照组中的条带光密度无明显变化。半定量分析示:对照组 mRNA 表达水平为 0.912 ± 0.022 ,空质粒转染组为 0.924 ± 0.011 ,转染组为 0.215 ± 0.017 。转染组与对照和空转染质粒组比较均有明显统计学意义($P <$

0.01)。说明转染反义 MBD1 基因真核表达载体能使 QBC-939 细胞内 MBD1 基因的 mRNA 表达水平降低,转染空质粒 pcDNA3.1(+)对其 mRNA 水平无影响(图 3)。

2.4 转染前后细胞内 MBD1 蛋白的变化

对照组细胞中 MBD1 蛋白阳性率为 $80.19\% \pm 5.05\%$,转染组阳性率为 $35.11\% \pm 4.05\%$,空质粒转染组阳性率为 $81.34\% \pm 3.05\%$ 。转染组与

空质粒转染组和对照组比较,差异均有显著性($P < 0.01$);而空质粒转染组与对照组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。说明转染反义 MBD1 基因真

核表达载体能使 QBC-939 细胞内 MBD1 蛋白表达水平降低,转染空质粒 pcDNA3.1(+)对其表达水平无明显影响(图4)。

图3 各组细胞 RT-PCR 凝胶电泳图

图4 各细胞中 MBD1 蛋白的相对表达量

3 讨论

DNA 甲基化是真核生物基因表达调控的重要方式之一^[1],它对基因表达的抑制需要特异结合于甲基化 CpG 位点的蛋白因子参与^[3],这类蛋白称为甲基 CpG 结合蛋白(methyl-CpG binding proteins, MeCPs)。近年来,随着新的 MeCPs 成员的出现及其结构的深入认识,其在基因转录抑制中的作用日益成为研究热点。

MBD1 是甲基 CpG 结合蛋白家族中最大的成员,其 N-末端含有一个甲基 - CpG - 结合域(methyl-CpG-binding domain, MBD)并包含着 2 个或 3 个半胱氨酸富含区(CxxC 基序),C 端含有转录抑制功能域(transcriptional repression domain, TRD)。目前认为 MBD1 通过甲基化方式抑制基因转录的机制与其结构有关^[4~6]。它可以特异性地识别 mCpG,与甲基化的 DNA 结合,直接干扰转录因子与启动子结合,从而抑制基因转录的功能,使某些基因不表达或表达降低。虞先浚等^[7]通过基因芯片对手术切除的中分化胰腺癌标本和正常胰腺组织的基因表达谱进行研究,发现 MBD1 在胰腺癌中表达明显升高,同时伴有多个与甲基化修饰相关的肿瘤抑制基因表达下降,提示 MBD1 介导的甲基化转录抑制作用可能是造成许多抑癌基因转录表达下降,以致失活的重要原因。Samir K. Patra 等^[5]研究发现,在前列腺癌细胞和组织中,MBD1 的表达水平很高,并与 DNA 甲基转移酶 1 的表达有关,亦提示 MBD1 基因在肿瘤发生和发展过程中有着

重要的意义。

胆管癌是危害人类健康的恶性肿瘤,其发生与 P16, PTEN, nm23-H1 等抑癌基因的表达降低和失活有关^[8~10],而这些抑癌基因的异常表达又与其甲基化状态异常相关。通过对甲基 CpG 结合蛋白家族成员如 MBD1 的表达和作用进行干预,从而调控以上抑癌基因的甲基化状态及其表达,以期恢复这些基因抑制肿瘤生长和转移的作用,达到治疗胆管癌等恶性肿瘤的目的。

本实验将构建好的反义 MBD1 基因真核表达载体通过脂质体介导转染到人胆管癌 QBC-939 细胞中,半定量 RT-PCR 检测发现对照组 mRNA 表达水平显著高于转染组,而转染空质粒组与对照组之间无明显差异($P > 0.05$),流式细胞术检测结果显示对照组细胞中 MBD1 蛋白明显高于转染组($P < 0.01$),而转染空质粒和对照组间差异亦无显著性($P > 0.05$)。说明通过构建反义 MBD1 基因真核表达载体并导入人胆管癌 QBC-939 细胞中,可以转录出与内源性 mRNA 互补的序列,在转录和转录后水平降低 MBD1 基因的 mRNA 水平,并阻止 mRNA 翻译成相应的 MBD1 蛋白,从而降低其在胆管癌细胞中的表达水平。同时也说明反义核酸技术作为一种基因下向调节作用方法,在抑制某些基因的表达上能发挥着重要的作用^[11,12]。本实验为进一步研究 MBD1 基因在 DNA 甲基化和胆管癌的发生、发展中的作用提供了方法和实验依据,并可望成为胆管癌治疗的新方法。

参考文献:

- [1] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(22):4632-4642.
- [2] Joseph Sambrook, David W. Russell. 黄培堂,等译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京:科学出版社, 2002. 630.
- [3] Wade PA. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation [J]. *Oncogene*, 2001, 20(24):3166-3173.
- [4] Jorgensen HF, Ben-Porath I, Bird AP. Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(8):3387-3395.
- [5] Patra SK, Patra A, Zhao H, et al. Methyl-CpG-DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(4):759-766.
- [6] Mario F. Fraga, Esteban Ballestar, Guillermo Montoya, et al. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(6):1765-1774.
- [7] Yu XJ, Long J, Fu DL, et al. Analysis of gene expression profiles in pancreatic carcinoma by using cDNA microarray [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2003, 2(3):467-470.
- [8] 谷化平,尚培中,周翠玲. 胆管癌中 PTEN 和 p16 抑癌基因蛋白的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2):101-102.
- [9] 高戈,韦军民,邹声泉,等. 肝门胆管癌中 p16 基因突变及蛋白表达异常的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2):98-100.
- [10] 常实,汤恢煊,周军,等. 肝外胆管癌 nm23-H₁ 和 VEGF 的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(8):625-627.
- [11] Crooke ST. Antisense strategies [J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(5):465-487.
- [12] Lee LK, Roth CM. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(5):505-511.

文章编号:1005-6947(2005)12-0913-01

· 病例报告 ·

肝移植术后并发肺结核 1 例

马锋, 刘昌, 于良, 仵正, 王博, 吕毅

(西安交通大学医学院第一附属医院 肝胆外科, 陕西 西安 710061)

关键词:肝移植/副作用; 结核,肺/病因学; 病例报告

中图分类号:R657.3; R521

文献标识码:D

患者 男, 33 岁。因慢性重症乙型肝炎、肝性脑病 (IV 级), 行原位肝移植术。术前胸片提示双肺呈弥漫性渗出病变, 考虑肺部感染, 给予抗生素治疗。术后免疫抑制剂方案为环孢素 A + 骁悉 + 强的松, 恢复良好。术后 25 d 出现不明原因间歇性发热, 体温波动在 37.6℃ ~ 38.3℃, 多于下午至次日晨出现, 偶有咳嗽伴少许白色黏痰, 伴出汗较多, 精神差, 食欲减退。实验室检查: 白细胞 (9.55 ~ 10.8) × 10⁹/L, 胸水培养示棒状杆菌 (对左克, 泰能, 马斯丁, 丁胺卡那敏感), PPD 试验 (-), 多次行痰、胸水涂片抗酸染色检查均 (-), 胸水、血 TB-DNA 均为零,

血沉 95 mm/h。胸片提示右侧少量积液, 左上肺微结节。胸部 CT 示: 左肺上多发结节影, 两侧胸腔积液, 以右侧为主。依药敏用药, 1 周后白细胞正常, 但仍有发热。遂用试验性抗结核治疗, 采用传统四联用药方案: 雷米封 + 利福喷汀 + 异胺丁醇 + 强的松。2 d 后体温恢复正常, 出汗明显减少。ALT, AST 轻度升高, 同时给予保肝药物。治疗 27 d 后, 血沉恢复正常, 胸片提示胸腔积液明显减少, 左上肺微结节缩小。4 个月后, 胸水吸收, 微结节消失, 停用异胺丁醇, 强的松减量。6 个月后, 患者无不适, 胸部 CT 未见异常, 停止抗结核治疗。随访 5 个月未发现结核症状、体征。该患者抗结核期间环孢素 C₂ 浓度明显降低, 遂依浓度调整剂量使达到有效治疗窗, 未发生排斥反应。

讨论 肝移植术后结核较为少见 (1%), 我院 80 例肝移植术后仅出现 1 例肺结核复发。笔者体会对于非活动性肺结核患者, 术后由于大量应用免疫抑制剂, 易使其复发或伴机会感染, 使结核病的临床表现、实验室检查缺乏特异性。该类患者移植术后出现的不明原因发热, 经常规治疗无效时应考虑结核病的可能性, 必要时可采用试验性抗结核治疗。抗结核期间环孢素 C₂ 浓度明显降低, 其间必须严密检测环孢素浓度、肝功能, 以免发生排斥反应及肝功能受损。术前诊断主要依据胸片、实验室检查及临床症状, 一旦确诊, 应给予抗结核治疗。另外, 由于抗结核疗程长, 药物毒性大, 使患者的精神及心理负担加重, 影响治疗与预后, 所以, 治疗的同时切莫忽视患者的精神与心理问题。

收稿日期: 2004-07-26。

作者简介: 马锋 (1979-), 男, 陕西西安人, 西安交通大学医学院第一附属医院住院医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者: 马锋