

文章编号:1005-6947(2010)02-0139-04

· 基础研究 ·

体外培养胆管癌细胞中 FHIT 基因的表达及其意义

谢放, 黄强

(安徽医科大学附属省立医院 普通外科, 安徽 合肥 230001)

摘要:目的 探讨脆性组氨酸三联体(FHIT)基因在胆管癌细胞株 QBC939 中的表达及其对细胞生物学行为的影响。方法 将构建的 FHIT 真核表达质粒转染入 QBC939 细胞,采用荧光定量 RT-PCR 检测转染前后 FHIT 基因表达的变化,并采用光镜直接计数法观察转染前后细胞生物学行为的变化。结果 转染后 QBC939 细胞的 FHIT 基因表达提高了 2.53 倍,细胞克隆数量明显下降[(11.2 ± 1.3) vs. (10.5 ± 1.1) vs. (6.3 ± 1.0), $P < 0.05$]。结论 FHIT 基因在 QBC939 细胞中表达减弱,恢复表达后能抑制细胞克隆形成。

[中国普通外科杂志, 2010, 19(02):139-142]

关键词:胆管肿瘤; FHIT; 基因表达

中图分类号:R 735.8

文献标识码:A

The expression and significance of FHIT gene in cultured cholangiocarcinoma cells

XIE Fang, HUANG Qiang

(Department of General Surgery, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and significance of fragile histidine triad (FHIT) gene in the cholangiocarcinoma cell line QBC939. **Methods** The eukaryotic expression vector was transfected into QBC939, real-time RT-PCR was used to detect the change of FHIT expression, and direct counting method under microscope was used to detect the change in the biological behavior of cells. **Results** After transfection, the expression of FHIT mRNA increased by 2.53-fold, but the cell clones were significantly less [(11.2 ± 1.3) vs. (10.5 ± 1.1) vs. (6.3 ± 1.0), $P < 0.05$]. **Conclusions** The expression of FHIT gene in QBC939 is attenuated, but after its expression is regained it can inhibit the formation of cell clones.

[Chinese Journal of General Surgery, 2010, 19(02):139-142]

Key words: Bile Duct Neoplasms; Genes, Fragile Histidine Triad; Gene Expression

CLC number: R 735.8

Document code: A

脆性组氨酸三联体(FHIT)基因是一种重要的染色体脆性位点抑癌基因,脆性位点是染色体

在特殊条件下易发生断裂、重排的随意位点。该类基因对 DNA 损伤高度敏感,而 DNA 损伤是恶性肿瘤发生发展的重要机制。FHIT 的低表达或缺失可能与肿瘤的发生、发展高度相关。本课题即研究 FHIT 基因在胆管癌细胞株 QBC939 中的表达及其对细胞生物学行为的影响。

收稿日期:2009-08-12; 修订日期:2009-10-26。

作者简介:谢放,安徽医科大学附属省立医院硕士研究生,主要从事胆道肿瘤的基础性研究和胆胰微创外科临床方面的研究。

通讯作者:黄强 E-mail:hq_sohu@sohu.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与材料 FHIT/pcDNA 3.1 真核表达质粒由我室自行构建;胆管癌细胞株 QBC939 购于 ScienCell Research Laboratories;割胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒、SYBR Green I 及荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂购于上海闪晶生物试剂公司;其他试剂为化学纯购于上海化学试剂公司。

1.1.2 主要仪器 BB5060 型 CO₂ 培养箱购于 Heraeus 公司;XDS-1A 倒置显微镜购于香港先达分析仪器有限公司;荧光定量 PCR 仪 FTC2000 购于 Funglyn Biotech;Universal 32 高速冷冻离心机购于 Hettich 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组设置 按实验需要,在保证随机性和对照的原则下,将实验对象分为如下几组:自然态生长的 QBC939 细胞设为自然对照组(I组),转染了 pcDNA 3.1 空质粒的 QBC939 细胞设为空白对照组(II组),转染了 FHIT/pcDNA 3.1 重组真核表达质粒的 QBC939 细胞设为实验组(III组)。

1.2.2 细胞培养与转染 在 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中使用含 10% 特级胎牛血清的 LB 液态培养基进行细胞培养。QBC939 细胞呈单层贴壁生长。取传 3~5 代之细胞,采用转染效率高且简单易行的脂质体转染法^[1]。由于采用的真核表达质粒 pcDNA 3.1 含有新霉素抗性基因,经新霉素筛选出转染成功的细胞克隆。

1.2.3 细胞克隆计数 将 3 组细胞中每组 2 复孔接种于含 1.2.2 所述培养基的 6 孔板内,同条件培养 5 d 形成克隆细胞群落后,每组细胞在各复孔用吸管随机吸取同样量细胞悬液于血细胞计数板,在发光倒置显微镜下计数。

1.2.4 FHIT 含量检测 采用荧光定量 RT-PCR 法测定各组 FHIT 表达情况。根据 Genebank(基因数据库)所示序列,使用 Primer Express 软件设计引物。上游引物为 5'-GAGTCGGGACAGTGGTG-GA-3';下游引物为 5'-GCTTCTGCTGCCATTC-

CTC-3'。看家基因选择 h_actin。反应体系:总体积 50 μL,含 2 × PCR 缓冲液 25 μL,引物(25 pmol/μL) 0.6 μL × 2,SYBR Green I 0.3 μL,模板 cDNA 1 μL,经焦炭酸二乙酯处理的纯水(DEPC 水) 22.5 μL。参数设置:(94 ℃ 4 min → 94 ℃ 20 s → 60 ℃ 30 s → 72 ℃ 30 s) × 35,72 ℃ 检测信号。

1.3 统计学处理

荧光定量 RT-PCR 检测的 ΔCt 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。将自然对照组(I组)作为参照因子,经看家基因均一化处理后,通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算^[2]。目的基因表达差异以经处理样本相对于未经处理样本的倍数来表示。直接计数法所得细胞数,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行单因素方差分析。组间比较采用 Bonfferoni 检验。所有数据录入 SPSS 17 软件进行计算,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染细胞的光镜观察

在倒置显微镜下观察 3 组细胞的生长情况。各时点 I 组细胞生长均良好,在铺满瓶底约 60% 时拍摄(图 1A)。转染 24 h 后:II 组细胞生长十分迅速,已经铺满培养瓶底 100% (图 1B);III 组细胞表现出重组质粒对细胞生长产生了抑制作用,汇合率只有 70% ~ 80%,细胞不再饱满,很多细胞边际模糊,发生裂解(图 1C)。转染 48 h 后:II 组细胞因 24 h 阶段已长满,此时细胞高度汇合,不再是单层(图 1D);III 组细胞也有生长,但十分缓慢,细胞形态仍不饱满,很多细胞边际模糊且变得扁平(图 1E)。

2.2 各组细胞数比较

I,II 组间的细胞数的差异无统计学意义(P > 0.05),而 III 组的细胞克隆形成数显著低于 I,II 组(P < 0.05)(表 1)。

2.3 FHIT 检测结果

III 组在转染质粒后,FHIT mRNA 的表达量较 2 个对照组升高,是 I 组细胞的 2.53 倍(表 2)。

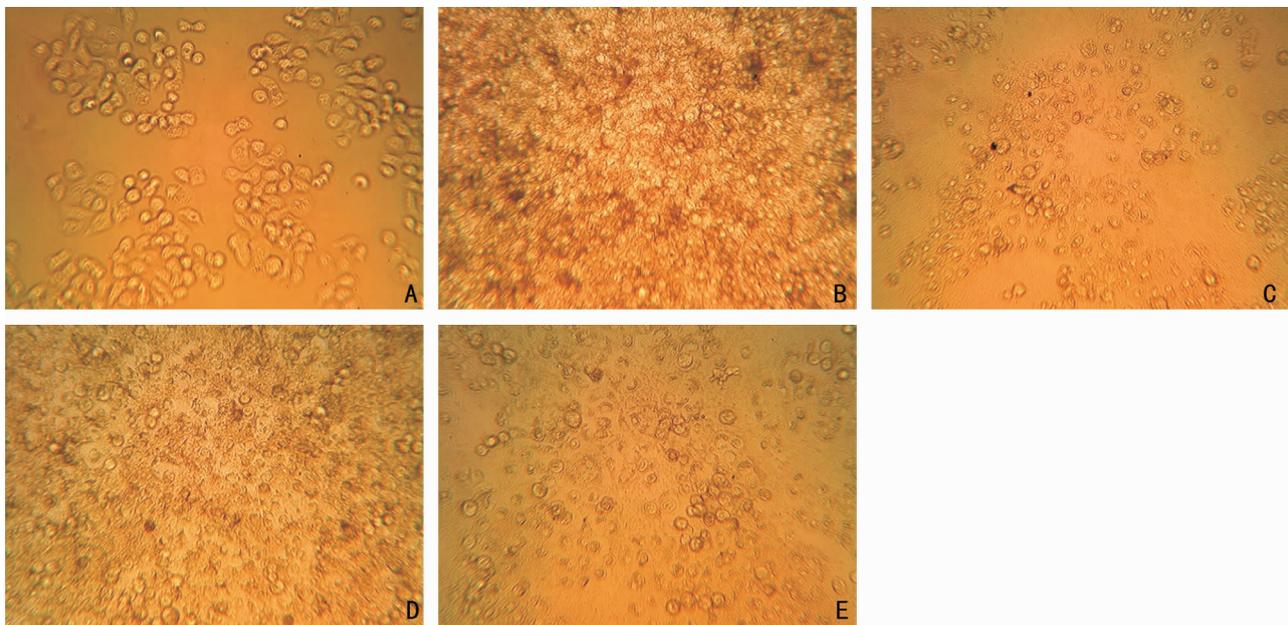


图1 转染前后细胞生长情况(×200) A:I组细胞; B:转染24 h后II组细胞; C:转染24 h后III组细胞; D:转染48 h后II组细胞; E:转48 h后III组细胞

表1 计数法观察 QBC939 细胞克隆形成数目(×10⁶/L)

分组	QBC939 细胞克隆形成数(×10 ⁶ /L, $\bar{x} \pm s$)
I组	11.2 ± 1.3 ¹⁾
II组	10.5 ± 1.1 ¹⁾
III组	6.3 ± 1.0

注:1)与III组比较, $P < 0.05$

表2 FHIT 荧光定量 PCR 结果及其处理($\bar{x} \pm s$)

分组	$\Delta Ct^{1)}$	$\Delta\Delta Ct^{2)}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
I组	5.63 ± 0.13	0.00 ± 0.13	1.00(0.91 ~ 1.09)
II组	5.27 ± 0.08	-0.36 ± 0.08	1.28(1.21 ~ 1.36)
III组	4.29 ± 0.05	-1.34 ± 0.05	2.53(2.45 ~ 2.62)

注:1) $\Delta Ct = FHIT Ct - h-actin Ct$; 2) $\Delta\Delta Ct = Avg. \Delta Ct - Avg. \Delta Ct_{NCC}$ (ΔCt_{NCC} 为I组样本的检测)

3 讨论

胆管癌为起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤,其发生与发展与原癌基因激活、抑癌基因功能丧失以及一些修饰基因功能的改变有密切关系。FHIT 于1996年由 Ohta 等发现并命名。该基因编码的蛋白质与具有组氨酸三联体结构的 HIT 蛋白高度同源,而该基因跨越脆性位点,故得名。FHIT 基因定位于染色体 3p14.2 区,在染色体上占据约 1 Mb 大小,由 10 个外显子组成,跨越脆

性位点 FRA3B。其中第 5 ~ 9 个外显子编码开放读码框,外显子 5 含有起始密码子蛋氨酸,外显子 6 含有 1 个开放读码框内蛋氨酸密码,外显子 8 含有编码 HIT 的核心单元^[3],其余外显子只转录不翻译。几乎所有外显子均以 AC 序列结束,为通常所见基因剪接受体位点序列。

FHIT 基因编码的蛋白与微管蛋白结合,可阻止细胞有丝分裂过程,抑制细胞过度增殖,从而发挥抑癌功能^[4]。FHIT 蛋白的二腺苷酸三磷酸水解酶活性可能通过 FHIT-底物复合物的形成达到抑癌目的^[5]。其低表达或无表达与很多环境敏感因素的恶性肿瘤,如胃癌、肺癌、食管癌、宫颈癌、肝癌等的发生发展有密切关系^[6-9]。

随着对 FHIT 基因研究的不断深入, Roz 等^[10]将 FHIT 基因导入 FHIT 蛋白低表达或无表达的肺癌和宫颈癌细胞株,使其表达 FHIT 蛋白,发现肿瘤细胞聚集在 G₁ 期和 S 期,并且有大量细胞死亡。G₁/S 期是细胞周期中一个重要的增殖节点,一旦细胞通过这一节点,即会很快进入对数生长期;肿瘤细胞的无限增殖性与癌基因促进肿瘤细胞通过此节点有密切关系;因此阻止或减少细胞通过 G₁/S 期,可以降低肿瘤细胞增殖,使肿瘤进展受阻。本研究将构建的人 FHIT 真核表达质粒转染入 FHIT 基因表达缺失的胆管癌细胞中,发现胆管癌细胞的 FHIT 表达确有恢复, FHIT 蛋白重

新表达,同时导致了胆管癌细胞增殖克隆的减弱。说明 FHIT 基因具有抑制肿瘤细胞发展的作用,通过外源导入 FHIT 基因,人为地恢复其表达,可能对肿瘤细胞的增殖起到负性调控作用。故认为, FHIT 可作为肿瘤基因治疗的一个候选基因。

然而,目前对于 FHIT 基因作用机制的研究还比较缺乏,其对肿瘤细胞凋亡途径、下游调控基因还不很明了,目前我室正在就此方向进行进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 李华,刘维全,王太一,等. 基因导入的脂质体转染法和磷酸钙转染法之比较[J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(2): 65 - 68.
- [2] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [3] Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14. 2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3:8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers [J]. Cell, 1996, 84(2): 587 - 597.
- [4] Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, et al. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention [J]. Lancet Oncol, 2002, 3(12): 748 - 754.
- [5] Trapasso F, Krakowiak A, Cesari R, et al. Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4): 1592 - 1597.
- [6] Butler D, Collins C, Mabruk M, et al. Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to high-risk HPV infection but is independent of histopathological features [J]. J Pathol, 2000, 192(1): 502 - 514.
- [7] Yuan BZ, Keck-Waggoner C, Zimonjic DB, et al. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 1049 - 1053.
- [8] 张淑红,张向宁. 脆性位点抑癌基因 FHIT 和 WWOX 蛋白与卵巢上皮癌的相关性[J]. 实用医药杂志, 2008, 25(7): 786 - 789.
- [9] 赵坡,吕亚莉,钟梅,等. 胆管细胞癌 FHIT 蛋白丢失与 Cyclin D1 蛋白表达的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(20): 1552 - 1555.
- [10] Roz L, Gramegna M, Ishii H, et al. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 3615 - 3620.

本刊获 2009 年全国高校科技期刊优秀编辑质量奖

2009 年全国高校科技期刊优秀编辑质量奖、优秀编辑工作者及优秀编辑学论著(简称“三优”)评比活动已告一段落,评比结果已经揭晓。本刊荣获全国高校科技期刊优秀编辑质量奖,颁奖大会于 2009 年 11 月 20 - 26 日在广东省东莞市举行。

这次评优活动的目的是总结经验,表彰先进,展示成果,鼓励全国高校科技期刊编辑工作者提高政治素养和业务水平,学习并实践科学发展观,勇于创新,锐意改革,认真做好编辑工作,不断提高期刊质量。经过严格的评比,本刊获全国高校科技期刊优秀编辑质量奖殊荣,我们倍感欣慰,在此一并感谢多年来一直在关心、支持、帮助我们的作者和读者。我们将再接再厉,争取更大进步。

中国普通外科杂志编辑部