

文章编号:1005-6947(2008)10-0978-05

· 基础研究 ·

RASSF1A 对人胃癌细胞株 SGC7901 增殖的影响

邓征浩, 周建华, 李景和, 肖德胜, 杨晓静, 文继舫

(中南大学湘雅医学院 病理学教研室, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 观察外源性 RASSF1A 基因对人胃癌细胞 SGC7901 增殖的影响。方法 利用脂质体转染技术将真核表达重组体 pcDNA3.0-RASSF1A 质粒和空载体 pcDNA3.0 质粒分别导入 SGC7901 细胞,经 G418 筛选后获得稳定转染细胞克隆。采用 RT-PCR 和蛋白印迹检测 RASSF1A 基因表达。绘制细胞生长曲线,并用裸鼠成瘤实验、平板克隆形成实验、流式细胞术分析转染细胞的生物学行为。结果 经脂质体转染和筛选,建立了高表达 RASSF1A 基因的 SGC7901 细胞系。与未转染组和转染空载体组比较,转染 RASSF1A 基因的 SGC7901 细胞生长速度明显减慢;细胞周期中 G_1/G_0 期比例明显增加,而 S 期比例减少;克隆形成率明显减少;裸鼠成瘤抑制率为 57.1%。结论 RASSF1A 基因能抑制人胃癌细胞 SGC7901 的增殖。

[中国普通外科杂志,2008,17(10):978-982]

关键词: 胃肿瘤/病理学; Genes, RASSF1A; SGC7901 细胞株; 转染

中图分类号:R 735.2

文献标识码:A

The effect of RASSF1A gene on the proliferation of human gastric carcinoma cell line SGC7901

DENG Zhenghao, ZHOU Jianhua, LI Jinghe, XIAO Desheng, YANG Xiaojing, WEN Jifang
(Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of exogenous RASSF1A gene on the proliferation of gastric carcinoma cell line SGC7901. **Methods** The mammal expression vector pcDNA3.0-RASSF1A and pcDNA3.0 were introduced into SGC7901 cell line by lipofectin transfection, and the SGC7901 cells stably overexpressing RASSF1A gene were established by G418 selection. The expression of RASSF1A gene was detected by Western blotting and RT-PCR. The cytobiologic characterizations of the positive clone were analyzed by MTT assay, cytometry, colony assay, and tumorigenicity experiment. **Results** SGC7901 cells with stably expression RASSF1A protein were established by lipofectin mediated transfection and selected for further study. Compared with the non-transfected and vector transfected cells, the positive clone cells developed more slowly; flow cytometric data showed that more positive clone cells went into phase G_0/G_1 and less cells went into phase S ($P < 0.05$); colony formation efficiency of the positive clone cells was lower than that of non-transfected and vector transfected cells ($P < 0.05$). The average weight of tumor tissue in nude mice in positive clone cells was less than that of non-transfected and vector transfected cells ($P < 0.05$). **Conclusions** RASSF1A gene can suppress the proliferation of SGC7901 cell line.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(10): 978-982]

Key words: Stomach Neoplasms/pathol; Genes, RASSF1A; SGC7901 Cell Line; Transfection

CLC number: R 735.2

Document code: A

收稿日期:2008-03-22; 修订日期:2008-08-20。

作者简介:邓征浩,男,中南大学湘雅医学院讲师,主要从事肿瘤分子病理学方面的研究。

通讯作者:文继舫 E-mail:jifangwen@hotmail.com

胃癌是一种常见的上皮源性恶性肿瘤,目前仍然是我国病死率最高的恶性肿瘤之一^[1-2]。胃癌的发病是与遗传因素、环境因素等有关的多因素多步骤的过程,其分子发病机制仍不十分明了。分子遗传学研究表明,多数实体肿瘤存在3号染色体短臂(3p)等位基因缺失,提示3p区域可能隐含肿瘤抑制基因^[3]。RASSF1A基因位于3P21.3,是最近确定的一种候选抑癌基因^[4]。它在人类多种恶性肿瘤存在缺失^[5];敲除RASSF1A基因可导致动物模型中胃肠道肿瘤^[6]、肺癌、乳腺癌和淋巴瘤^[7]的发生。因此RASSF1A是人类肿瘤发生中非常重要的候选抑癌基因。本实验应用脂质体转染技术将RASSF1A基因导入SGC7901细胞,分析外源性RASSF1A基因对人胃癌细胞SGC7901增殖的影响,探讨RASSF1A基因在胃癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和质粒 人胃癌细胞系SGC7901细胞购自中科院上海细胞中心,用含有10%胎牛血清(杭州四季青公司)的RPMI1640培养基,在37℃,5%CO₂培养箱中培养。pcDNA3.0-RASSF1A,pcDNA3.0质粒由德克萨斯大学西南医学中心Michael A. White博士惠赠。

1.1.2 试剂 质粒抽提试剂盒购自Qiagen公司;逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)试剂盒、限制性核酸内切酶BamH I及XbaI购自Ferments公司;脂质体购自Invitrogen公司;鼠抗人RASSF1A抗体购自美国ABCAM公司;G418(Geneticin),trizol及焦碳酸二乙酯(DEPC)购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的小量提取及酶切鉴定 将pcDNA3.0-RASSF1A和pcDNA3.0质粒转化TG₁感受态,常规铺板,挑取菌落扩增后,采用质粒抽提试剂盒提取质粒。应用限制性内切酶BamH I,XbaI双酶切鉴定质粒。

1.2.2 质粒转染 在6孔板中每孔接种 5×10^5 个SGC7901细胞,培养至生长密度为80%细胞时,用脂质体按说明书进行转染。实验分为3组:未转染组(空白对照组),转染空白质粒组(阴性对照组),转染阳性质粒组。质粒转染48h后,换含800 μg/L G418的选择培养基培养4d,再换含300 μg/L G418的选择培养基维持筛选至出现细

胞克隆,挑取细胞克隆扩大培养备用。

1.2.3 蛋白印迹分析 分别选取对数生长期的3组细胞,参照《分子克隆》的实验步骤提取总蛋白质。100 μg总蛋白不连续SDS-PAGE凝胶电泳,蛋白转移至硝酸纤维素膜,丽春红S染色,5%脱脂牛奶封闭2h,加入鼠抗RASSF1A抗体(1:200)4℃过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育4h,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。以β-actin为内参。

1.2.4 RT-PCR检测RASSF1A mRNA的表达 分别选取对数生长期的3组细胞,trizol试剂盒提取总RNA。取2 μg总RNA进行逆转录后各取7.5 μL行PCR反应,β-actin为内参照。RASSF1A基因引物:上游为5'-TCTGGGGCGTCGTGAGTAAA-3',下游为5'-CCACCACCAAGAACAGTCG-3',扩增片段大小为495bp。β-actin引物:上游为5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3',下游为5'-GGAGCAATGATCTTGATCTT-3',扩增片段大小为204bp。上述引物由上海博亚生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系50 μL。反应条件:95℃预变性5min后,94℃变性30s,52℃退火40s,72℃延伸1min;共进行35个循环后72℃延伸10min。取10 μL产物1.5%琼脂糖凝胶电泳、照相。

1.2.5 噻唑兰(MTT)法检测细胞增殖 分别选取对数生长期的3组细胞,以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于96孔板中。分别在培养1,2,3,4,5,6,7d后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL,继续培养4h后终止培养,吸干孔内培养液;每孔加入150 μLDMSO,振荡至结晶充分溶解;选择490nm波长,在酶标仪上测定各孔吸光度(A490)值。以种植当天MTT光吸度值为起始点,以时间为横轴,以吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.6 流式细胞仪分析细胞周期 分别选取对数生长期的3组细胞,用70%乙醇溶液于-20℃固定过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,依次加入50 μg/mL碘化丙啶和1 mg/mL RNaseA,室温避光孵育30min后上机检测。

1.2.7 平板克隆形成实验 将对数生长期的3组细胞接种到6孔板,每种细胞接种3孔, 1×10^3 个/孔。以十字方向轻轻晃动6孔板,使细胞分散均匀。将6孔板在37℃,5%CO₂的培养箱中静止培养至6孔板出现肉眼可见的克隆。PBS小心洗涤细胞2次,甲醇液固定15min,姬姆萨应用液染色15min;流水缓慢洗去染色液,空气干

燥。计数大于 50 个细胞的克隆数,并计算克隆形成率。克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) × 100%。

1.2.8 裸鼠成瘤实验 0.25% 胰蛋白酶消化 3 组细胞,离心收集细胞;细胞沉淀重悬于 PBS 中;将 9 只 4~6 周龄的 BALB/c 雌性裸小鼠(体重为 16~18 g)随机分配到 3 组,在裸鼠腋下进行接种。每个部位注射 0.2 mL 细胞悬液,约含细胞数 7×10^6 个。观察肿瘤形成情况,6 周后处死裸鼠,完整取出肿块,称重记录,比较各组间瘤块大小。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS11.0 统计分析软件对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒酶切鉴定

pcDNA3.0-RASSF1A 质粒经 XbaI 和 BamH I 双酶切,获得大小与 pcDNA3.0 质粒相符的 5.4 kb 大片段和与目的基因片段相符的 1.1 kb 片段(图 1)。

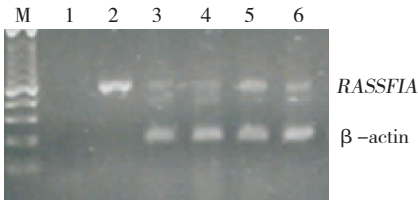


图 2 RASSF1A mRNA 在胃癌 SGC790 细胞中过表达 M: Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: SGC790 细胞; 4: 空白质粒转染组细胞; 5-6 阳性质粒转染组细胞

2.3 RASSF1A 基因抑制 SGC7901 细胞增殖

MTT 结果显示,与未转染组和空白质粒转染组相比,阳性质粒转染组 SGC7901 细胞增殖受到明显抑制,细胞生长速度明显下降。48 h 细胞生长抑制率为 28.13% (图 4)。

2.4 RASSF1A 基因转染对 SGC7901 细胞周期和凋亡的影响

流式细胞仪分析显示,与未转染组和空白质粒转染组相比,阳性质粒转染组 SGC7901 细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显增加,而 S 期比例减少,细胞凋亡率增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

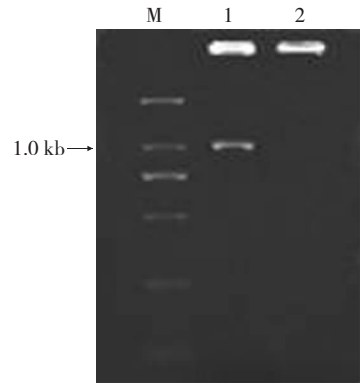


图 1 质粒的酶切鉴定结果 M: Marker; 1: pcDNA3.0-RASSF1A 质粒; 2: pcDNA3.0 质粒

2.2 RASSF1A 过表达 SGC7901 细胞阳性株的建立

RT-PCR 和 Western blotting 分析,结果显示,与未转染组和空白质粒转染组相比,阳性质粒转染组 SGC7901 细胞 RASSF1A 蛋白表达明显增加。随机选择抗性克隆扩大培养用于后续实验(图 2-3)。

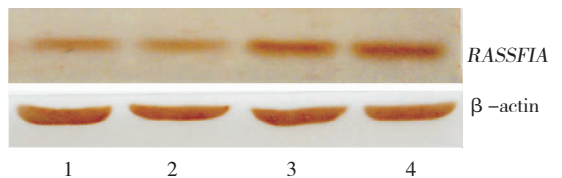


图 3 RASSF1A 蛋白在胃癌 SGC790 细胞中过表达 1: SGC7901 细胞; 2: 空白质粒转染组细胞; 3-4: 阳性质粒转染组细胞

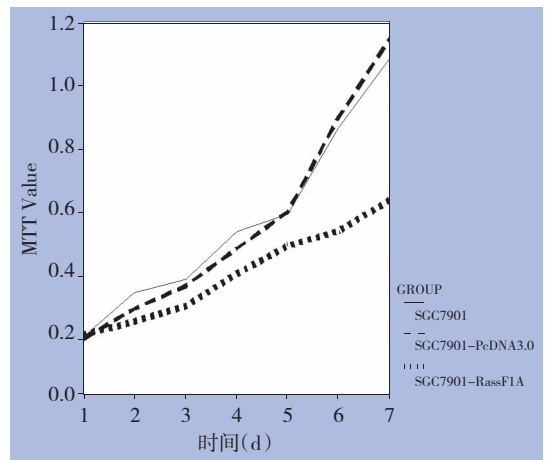


图 4 RASSF1A 基因转染对 SGC7901 细胞生长的抑制作用

表1 各组细胞周期比例的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期分布(%)			凋亡率(%)
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
未转染	6	48.9±0.56	40.1±1.07	11.0±0.62	0.78±0.62
空白转染	6	47.3±1.33	43.1±1.10	9.6±0.25	0.88±0.62
阳性转染	6	76.6±0.62 ¹⁾	27.7±1.12 ²⁾	4.7±0.19	2.33±0.62

注:与未转染组和空白转染组比较,1) $F=54.882, P<0.05$; 2) $F=27.100, P<0.05$

2.5 RASSF1A 基因抑制 SGC7901 细胞克隆形成

平板克隆形成实验结果显示,未转染组和空

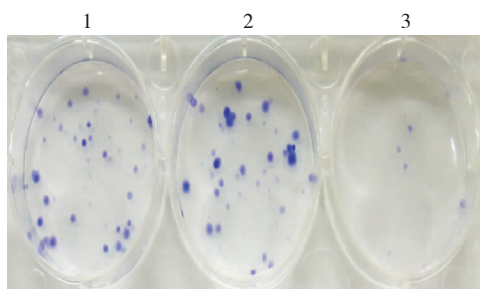


图5 RASSF1A 基因抑制 SGC7901 细胞克隆形成 1:SGC7901 细胞; 2:空质粒转染组细胞; 3:阳性质粒转染组细胞

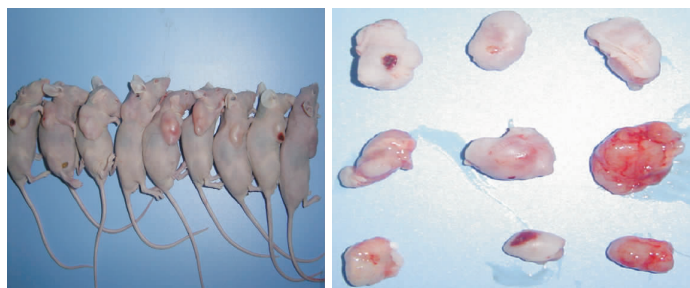
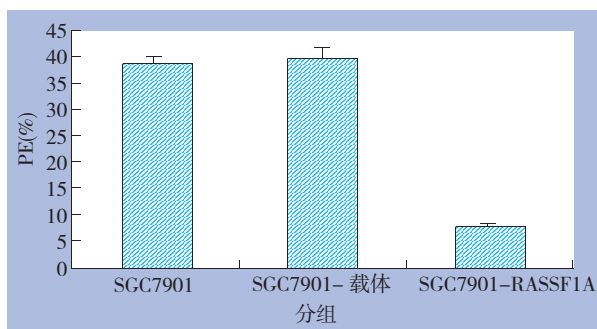
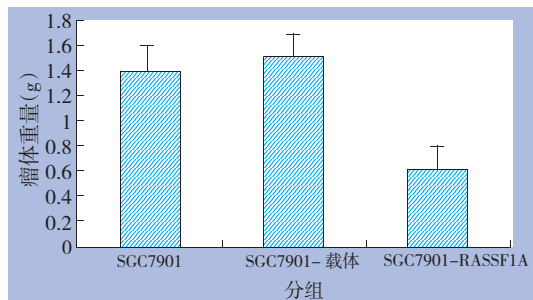


图6 RASSF1A 基因抑制 SGC7901 细胞在裸鼠体内生长 1:SGC7901 细胞; 2:空质粒转染组细胞; 3:阳性质粒转染组细胞



3 讨论

RASSF1A 基因是新近从 3p21.3 克隆的候选抑癌基因,其 cDNA 全长 1,873 bp,有 6 个外显子,编码含 340 个氨基酸的阅读框架,产物为 38.8kD 的可溶性胞浆蛋白。应用基因芯片技术发现,RASSF1A 调控的靶基因涉及基因转录、细胞骨架、信号传导、细胞周期、细胞黏附以及凋亡,具有广泛的生理作用^[8]。RASSF1A 基因表达缺失可见于多种肿瘤,RASSF1A 基因启动子超甲基化

白质粒转染组 SGC7901 细胞的平板克隆形成率为 $(38.6 \pm 1.5)\%$, $(39.7 \pm 2.1)\%$,阳性质粒转染组 SGC7901 细胞平板克隆形成率为 $(7.3 \pm 0.6)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.6 RASSF1A 基因抑制 SGC7901 细胞在裸鼠体内生长

未转染组,空白质粒转染组,阳性质粒转染组 SGC7901 细胞成瘤潜伏期均为 7 d,瘤体重量分别为 (1.4 ± 0.26) g, (1.5 ± 0.32) g 和 (0.6 ± 0.1) g,后者与前两者比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。

是其表达缺失的重要途径^[9]。研究表明,胃癌中 46% 癌组织和 33% 的细胞系中存在 RASSF1A 表达缺失,与肿瘤分级、分期有关,但与组织学类型无关^[10]。有作者研究胃癌、胃腺瘤、肠上皮化生、慢性胃炎四种病变的甲基化谱,发现 RASSF1A 启动子甲基化仅见于胃癌中^[11]。这些现象提示 RASSF1A 表达缺失在胃癌发生发展中是常见事件,RASSF1A 可能在其中扮演了重要角色。

笔者将 RASSF1A 基因转染至人胃癌细胞 SGC7901,发现转染组 SGC7901 细胞生长速度较

未转染组和空白质粒转染组明显下降; G_0/G_1 期细胞百分比明显增加,处于 S 期的细胞百分率明显减少 ($P < 0.05$),提示 RASSF1A 基因转染 SGC7901 可诱导细胞 G_1 期阻滞。上述结果与 Shivakumar 等^[12]报道的结果一致。平板克隆形成实验表明,RASSF1A 基因能抑制 SGC7901 细胞克隆形成,抑制率为 80.6%。裸鼠成瘤实验表明,RASSF1A 基因抑制 SGC7901 细胞在裸鼠体内生长。Burbee 等^[13]将 RASSF1A 基因转染非小细胞肺癌细胞株 NCI-H1299,与对照组相比,转染细胞软琼脂克隆形成率减低 90%,裸鼠成瘤率明显降低。Dreijerink 等^[14]将 RASSF1A 基因转染肾细胞癌株 KRC/Y,也得到类似的结论。

综上所述,本实验研究表明外源性 RASSF1A 基因表达能抑制人胃癌细胞 SGC7901 的增殖,诱导细胞 G_0/G_1 期阻滞,提示其可能是胃癌的候选抑制基因。

参考文献:

- [1] 董志伟,乔友林,李连弟,等. 中国癌症控制策略研究报告[J]. 中国肿瘤,2002,11(5):250-260.
- [2] 孙秀娣,牧人,周有尚,等. 中国 1990~1992 年胃癌死亡调查分析[J]. 中华肿瘤杂志,2002,24(1):4-8.
- [3] Kok K, Naylor SL, Buys CH, *et al*. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes[J]. *Adv Cancer Res*,1997,71(1):27-92.
- [4] Dammann R, Li C, Yoon JH, *et al*. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3):315-319.
- [5] Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers [J]. *Cancer Res*,2005,65(9):3497-3508.
- [6] van der Weyden L, Tachibana KK, Gonzalez MA, *et al*. The RASSF1A isoform of RASSF1 promotes microtubule stability and suppresses tumorigenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(18):8356-8367.
- [7] Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, *et al* Tumor susceptibility of RASSF1A knockout mice[J]. *Cancer Res*,2005,65(1):92-98.
- [8] Agathangelou A, Bieche I, Ahmed-Choudhury J, *et al*. Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17):5344-5351.
- [9] 邓征浩,周建华,文继舫. 肿瘤候选抑制基因 RASSF1A [J]. 国外医学肿瘤学分册,2004,31(11):806-809.
- [10] Byun DS, Lee MG, Chae KS, *et al*. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*,2001,61(19):7034-7038.
- [11] Kang GH, Lee S, Kim JS, *et al* Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis [J]. *Lab Invest*,2003,83(4):519-526.
- [12] Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, *et al*. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclinD1 accumulation [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(12):4309-4318.
- [13] Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, *et al*. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001,93(9):691-699.
- [14] Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, *et al*. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis [J]. *PNAS*, 2001,98(13):7504-7509.