

DCX 和 SPARC 基因共表达增强 X 射线对 人脑胶质瘤细胞 U-87MG 凋亡的影响

蒋 昕¹ 徐媛媛¹ 张昊文¹ 俞家华¹ 杨吉成² 刘芬菊¹

¹ (苏州大学医学部放射医学与防护学院 苏州 215123)

² (苏州大学医学部基础医学与生物科学学院 苏州 215123)

摘要 用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达、流式细胞仪检测 GFP 表达比例确定重组腺病毒对 U-87MG 细胞的最佳感染剂量; RT-PCR 和 Western blot 法检测 DCX 和 SPARC 在 U-87MG 细胞 mRNA 和蛋白水平的表达; 流式细胞仪检测 Ad-GFP、Ad-DCX、Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 对 X 射线诱导 U-87MG 细胞凋亡的影响。实验结果表明: 重组腺病毒对 U-87MG 细胞的最佳感染剂量为 50 MOI; 目的基因 DCX 和 SPARC 可在 mRNA 和蛋白水平成功表达; Ad-GFP、Ad-DCX、Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 单纯基因组的凋亡率分别为(1.05±0.42)%、(1.11±0.29)%、(1.18±0.37)%和(1.12±0.40)%; 8 Gy 剂量辐照后, 凋亡率分别为(7.54±0.47)%、(23.23±2.72)%、(16.43±1.13)%和(33.01±2.67)%。提示 Ad-DCX-SPARC 可以增强 X 射线诱导的 U-87MG 细胞的凋亡, 从而增强放射敏感性。

关键词 DCX, SPARC, X 射线, 人脑胶质瘤细胞, 凋亡

中图分类号 R811.5, R730.5, R739.4

脑胶质瘤是颅内常见的恶性肿瘤, 约占颅内肿瘤的 44%, 且胶质瘤是恶性程度最高的颅内肿瘤, 只有 14.6 到 19.6 个月的中位生存期^[1,2]。放射治疗几乎是各型胶质瘤的常规治疗, 但因胶质瘤对放疗不敏感而导致放疗效果一般, 因此急需寻找一种有效的辐射增敏方法。随着分子生物学的发展, 基因治疗作为一种肿瘤治疗的新模式, 越来越受到人们的重视。

2005 年 Rich 等^[3]采用基因芯片技术结合多元回归模型统计分析发现 3 个基因与脑胶质瘤病人的生存期有明显关系, 其中两个是 Doublecortin (DCX) 和 Osteonectin (SPARC、ON)。Doublecortin 是一种微管结合蛋白, 通过调节微管的结构和稳定性, 起到促进未成熟神经元迁移和分化的作用^[4]。Osteonectin 为富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白, 是基质细胞蛋白家族中的一员, 参与组织重塑^[5]、骨质矿化^[6]、血管形成等过程。

近年来, 越来越多的研究证实 DCX 和 SPARC 与胶质瘤的发生发展也有一定的关系。DCX 可以抑制胶质瘤细胞的生长^[7]、侵袭和导致周期阻滞^[8],

SPARC 抑制胶质瘤细胞生长的同时也促进细胞侵袭^[9]。目前 DCX 和 SPARC 双基因联合高表达对于辐射诱导的细胞凋亡的影响尚未见研究报道。本实验采用双启动子腺病毒载体介导 DCX 和 SPARC 双基因共表达(Ad-DCX-SPARC), 观察其过表达对辐射引起的胶质瘤 U-87MG 细胞凋亡的影响, 为临床胶质瘤基因治疗及其联合放疗提供依据。

1 实验材料与方法

1.1 细胞系和重组腺病毒载体

人脑胶质瘤 U-87MG 细胞由本实验室留存, 腺病毒 (Adenovirus, Ad) 介导的 DCX (Ad-DCX)、腺病毒介导的 SPARC (Ad-SPARC) 及腺病毒介导的 DCX 和 SPARC (Ad-DCX-SPARC) 由本实验室构建、扩增并测定效价均为 10^9 pfu/mL。人胚胎肾 QBI-293A 细胞和 Ad-GFP 空载体腺病毒由苏州大学基础医学与生物科学学院细胞与分子生物学教研室惠赠。

国家自然科学基金 (31270897、30870585)、江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD) 资助

第一作者: 蒋昕, 女, 1987 年 8 月出生, 2009 年毕业于泰山医学院, 现为苏州大学医学部放射医学与防护学院在读硕士研究生, E-mail: jiangxin002@163.com

通讯作者: 刘芬菊, E-mail: fangsh@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2012-09-27, 修回 2012-11-12

1.2 最佳感染剂量的测定

将对数生长期的 U-87MG 细胞,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养过夜后,将 Ad-GFP、Ad-DCX、Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 重组腺病毒分别以 10、50、100、150 和 200 MOI (Multiplicity of infection, 感染复数) 的不同剂量感染细胞,培养箱中培养 24 h 后在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光表达情况,以判断最佳感染剂量。

1.3 流式细胞仪测定 GFP 表达细胞比例

将对数生长期的 U-87MG 细胞,以 5×10^5 /孔接

种于 6 孔板,培养过夜后,将 Ad-GFP、Ad-DCX、Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 重组腺病毒以 1.2 节中测定的最佳感染剂量感染细胞,培养 24 h 后收获细胞,用流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司 COULTER EPICS X1 型) 检测 GFP 表达细胞比例。

1.4 RT-PCR 检测基因 mRNA 水平的表达

用 1.3 节中方法,将重组腺病毒感染细胞,培养 48 h 后收获细胞,TRIzol 试剂裂解细胞,提取总 RNA,使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 后 PCR 法扩增。扩增使用的引物见表 1。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'-3')
DCX forward	GCAAGATCTATGAAAACACTCCCCCTTC
DCX reverse	TAAGGTACCTTACATGGAATCACCAAGCG
SPARC forward	TAAGCGGCCGCATGAGGGCCTGGATCTT
SPARC reverse	TAGCTCGAGTTAGATCACAAGATCCTTGT
Actin forward	TGCGTGACATTAAGGAGAAG
Actin reverse	CTGCATCCTGTCGGCAATG

1.5 Western blot 检测基因蛋白水平的表达

同样以 1.3 节中的方法将重组腺病毒感染细胞,48 h 后收获细胞,裂解细胞并提取蛋白,测定蛋白浓度后与 SDS 蛋白的上样缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭后进行免疫反应、化学发光,显影,定影。

1.6 流式细胞仪测定细胞凋亡

以 1.3 中方法将重组腺病毒感染细胞,48 h 后进行照射,剂量为 8 Gy,培养 48 h 后,消化收集细胞,预冷的 PBS 洗两遍,重悬细胞于 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,取 100 μL 的细胞悬液分别加入 5 μL AnnexinV-PE 和 5 μL 7-AAD,室温避光作用 15 min,加入 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 400 μL ,1 h 内上机检测。细胞辐照由苏州大学放射医学与防护学院提供的剂量率为 1.165Gy/min 的 X 线机 (美国 RADSOURCE 公司 RS2000PRO 型) 照射。

1.7 统计学处理

实验数据以“均数 $\pm$ 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SAS 软件进行统计分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳感染剂量

因为使用的质粒中含有 GFP 报告基因,可表达绿色荧光蛋白,所以,可根据荧光蛋白表达量来判断感染效率。将重组腺病毒以 10、50、100、150 和 200 MOI 不同剂量分别感染 U-87MG 细胞,24 h 后,激光共聚焦显微镜下观察感染效率和细胞形态,结果为 10、50、100、150 和 200 MOI 不同剂量的重组腺病毒均可观察到绿色荧光,如图 1 所示。在 50MOI 剂量时感染效率可达 90% 以上,且细胞生长良好,无明显脱落、皱缩等由腺病毒本身引起的细胞病变。因此认为,50 MOI 可作为腺病毒感染 U-87MG 细胞的最佳感染剂量。

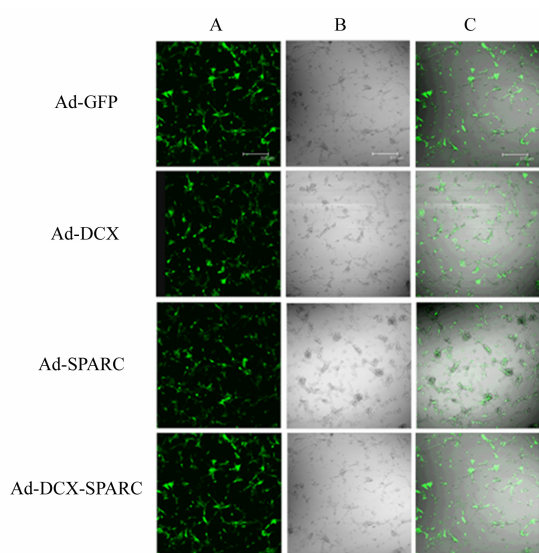


Fig.1 Fluorescence photographs of U-87 MG cells infected with adenoviruses: (A)Fluorescence microscope; (B)Light microscope; (C)Merged

2.2 最佳感染剂量感染细胞后 GFP 表达细胞比例

为进一步确定最佳感染剂量,采用流式细胞仪测定最佳感染剂量感染细胞后 GFP 表达的细胞所占比例。用 50 MOI 剂量的重组腺病毒分别感染 U-87MG 细胞,24 h 后收集细胞,流式细胞仪检测

显示表达 GFP 的细胞比例分别为:99.64%、98.52%、95.08%和 97.62%,均可达 90%以上(见图 2),进一步确定了 50 MOI 为最佳感染剂量。

2.3 腺病毒介导的 DCX、SPARC 基因在 U-87MG 细胞中的表达

用 50 MOI 剂量的重组腺病毒分别感染 U-87MG 细胞,48 h 后收集细胞,提取总 RNA 和蛋白,进行 RT-PCR 和 Western blot 检测,以确定 DCX、SPARC 基因在细胞中的表达。RT-PCR 结果显示(见图 3A),Ad-DCX、Ad-DCX-SPARC 组在 1326 bp 的位置出现了 DCX 阳性电泳条带,而 U-87MG 组和 Ad-GFP 组均未出现条带;因 U-87MG 细胞本身即有少量 SPARC 基因的表达,所以 U-87MG 组和 Ad-GFP 组在 912 bp 的位置出现了条带,而 Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 组则产生了比前者深的条带。Western blot 检测结果显示(图 3B) Ad-DCX、Ad-DCX-SPARC 组产生了与抗 DCX 抗体结合的特异性条带,而 U-87MG 组和 Ad-GFP 组均未出现上述条带; Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 组产生了比 U-87MG 组和 Ad-GFP 组深的与抗 SPARC 抗体结合的特异性条带。结果表明腺病毒介导的外源性目的基因 DCX 和 SPARC 在 U-87MG 细胞中能够成功转录和表达。

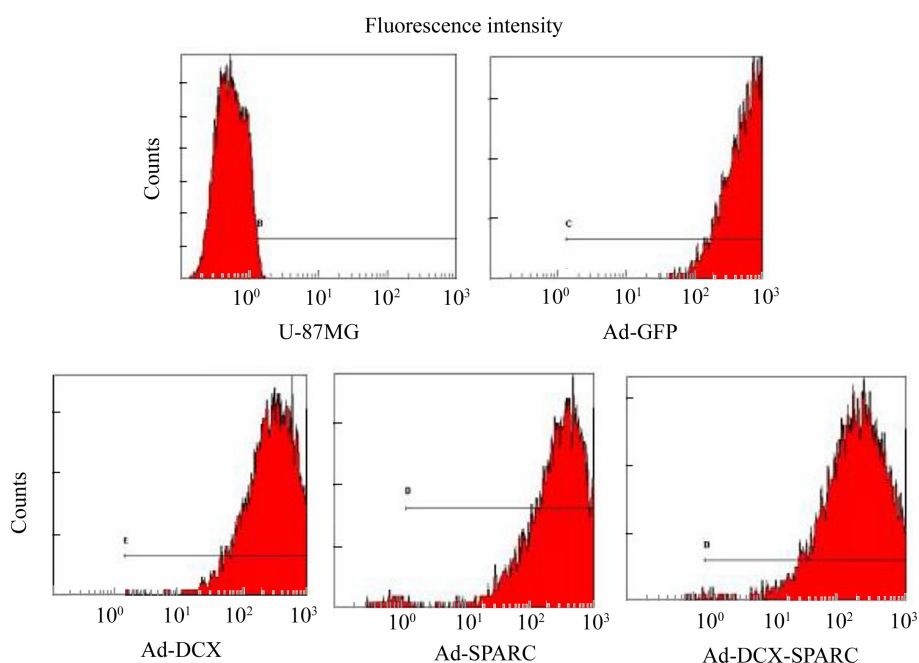


Fig.2 Analysis of GFP expression by flow cytometry

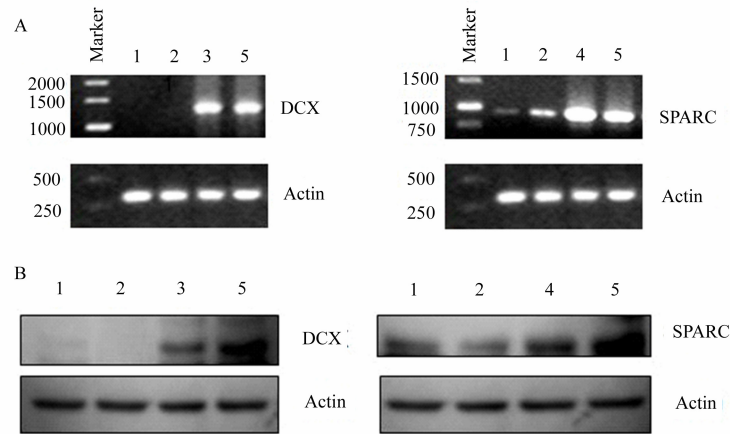


Fig.3 Expression of DCX, SPARC in U-87MG cells infected with Ad-GFP, Ad-DCX, Ad-SPARC, and Ad-DCX-SPARC, respectively: (A)RT-PCR analysis transcriptional expression of DCX and SPARC in U-87MG cells; (B)Western blotting analysis protein expression of DCX and SPARC in U-87MG cells. 1: U-87MG group; 2: Ad-GFP group; 3: Ad-DCX group; 4: Ad-SPARC group; 5: Ad-DCX-SPARC group

2.4 流式细胞仪检测腺病毒介导的 DCX、SPARC、DCX-SPARC 基因对 X 射线诱导的细胞凋亡的影响

各组细胞经 Annexin-V-PE/7-AAD 双染后使用流式细胞仪检测细胞凋亡率,结果如图 4 所示。单纯基因组各组之间凋亡率无明显差别,8 Gy 剂量辐照后 Ad-GFP、Ad-DCX、Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 组凋亡率均较单纯基因组增加,且 Ad-DCX-SPARC 组增加更为明显 ($p<0.05$)。双基因的作用约相当于两个单基因作用之和,显示为两个基因的相加效应。结果表明,单纯腺病毒介导的基因不能诱导产生凋亡,双基因组较单基因组更有效地增强辐射引起的凋亡的产生。

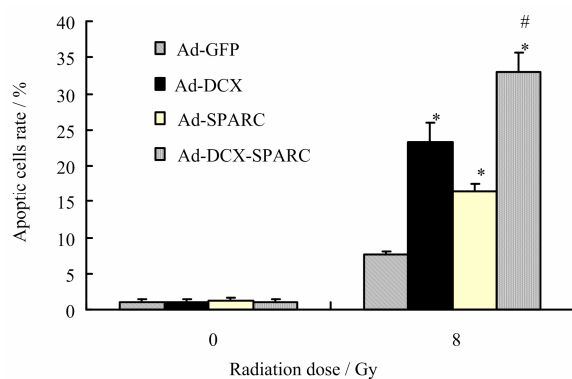


Fig.4 Apoptosis of U-87MG cells analysis by flow cytometry. (* compared with Ad-GFP groups, $p<0.05$. # compared with Ad-DCX and Ad-SPARC groups, $p<0.05$. $n=3$)

3 讨论

近年来治疗脑胶质瘤的放疗技术在不断进步,但胶质瘤的预后依然不够理想,主要在于大多数胶

质瘤病例都存在辐射抵抗的问题。随着基因治疗技术的开展,基因治疗已经逐渐成为提高放射治疗效果的一个新方法^[10]。

腺病毒是目前基因治疗中应用最为广泛的一种病毒载体,它具有以下优点:宿主细胞范围广泛,既可以感染分裂细胞又可以感染非分裂细胞;容易制备高滴度病毒粒子,可达 10^{11} pfu/mL;而且在受感染细胞内不发生整合,因此没有致癌和致突变的危险,并可插入大片段的外源基因^[11]。正是由于腺病毒载体的上述优点,目前国外已进行了大量的腺病毒载体治疗脑胶质瘤的临床试验^[12],Sandmair 等^[13]于 2000 年进行了临床 IIa 期试验,研究腺病毒介导 HSV tk 基因 (Ad.HSV-tk) 治疗脑胶质瘤的效果,以腺病毒介导 LacZ 基因作为对照组,结果显示,Ad.HSV-tk 组的病人中位生存期为 15 个月,明显高于对照组 (8.3 个月) ($p<0.012$),而且病人无明显不良反应。Immonen 等^[14]于 2004 年进行了临床 IIb 期试验,以进一步评估 Ad.HSV-tk 治疗脑胶质瘤的有效性和安全性,取得了和 Sandmair 一致的结果。

本实验采用双启动子腺病毒载体介导 DCX 基因、SPARC 基因和 DCX-SPARC 双基因,将 DCX 基因和 SPARC 基因连接于多聚腺苷酸及启动子 polyA-promoter 序列的两端,分别构建成功了 Ad-DCX、Ad-SPARC 和 Ad-DCX-SPARC 重组腺病毒。Ad-DCX-SPARC 因有双启动子启动,故可使双基因分别转录成为 2 条不同的、单独的 mRNA,并翻译出各自的蛋白质,从而可使两个基因同时得到高效率的表达。RT-PCR 和 Western blot 结果显示,两个基因可在 mRNA 和蛋白水平获得成功表达。

因胶质瘤细胞对放射治疗不敏感, 导致疗效下降, 因此提高肿瘤细胞对放疗的敏感性一直是科研人员关注的研究方向。细胞放射敏感性与细胞凋亡密切相关^[15], 细胞受照射后凋亡形成率和细胞的辐射敏感性密切相关已有大量的报道。目前国外对于 DCX 和 SPARC 基因对脑胶质瘤的作用的研究仅限于生长、侵袭方面, 而这两个基因单独及联合高表达, 特别是双基因联合高表达对于辐射诱导的细胞凋亡的影响还尚未有研究报道。本实验室研究发现高表达 DCX 基因可使辐照后 U-87MG 细胞凋亡率增加; 而低表达 SPARC 基因可使辐照后 U-87MG 细胞凋亡率低于对照组细胞^[16], 从而推测高表达 SPARC 基因应使照后细胞凋亡率增加。本实验旨在研究 DCX 和 SPARC 联合作用能否较单基因更加增强辐射诱导的细胞凋亡作用。

流式细胞仪检测细胞凋亡显示, Ad-GFP 空载体组细胞经照射后凋亡率较低, 而腺病毒介导的 DCX、SPARC 和 DCX-SPARC 基因表达可显著增强辐射诱导的凋亡, 与 Ad-GFP 空载体组相比有统计学意义 ($p < 0.05$), 且 DCX-SPARC 双基因组的促凋亡作用明显大于 DCX 和 SPARC 单基因组 ($p < 0.05$)。但未经辐照的 Ad-DCX 组、Ad-SPARC 组和 Ad-DCX-SPARC 组的凋亡率与 Ad-GFP 组相比无统计学意义。由此我们认为, 单纯的 DCX 基因、SPARC 基因和 DCX-SPARC 双基因对胶质瘤细胞的凋亡无影响, 而可以增加辐射诱导的细胞凋亡, 从而提高辐射敏感性, 且双基因增敏效果明显强于单基因的效果, 似乎为两个单基因作用之和, 显示为两个单基因的联合作用。这为 Ad-DCX-SPARC 基因治疗胶质瘤提供了具有参考和应用价值的依据。

目前单、双基因高表达增加辐射诱导的凋亡率的作用机制尚未明确, 低表达 SPARC 基因后加强照射后 PI3K/AKT 信号通路的激活是降低细胞凋亡率的机制之一^[16], 那么 SPARC 增加辐射诱导的凋亡可能是通过降低 PI3K/AKT 信号通路来实现的, 但 DCX 是否通过这种途径来增加凋亡还未可知, 且双基因, 可能是通过比单基因更强烈地下调此信号通路来增加凋亡, 但也可能是通过其他的凋亡信号通路如 caspase 家族、BCL-2 家族来实现的。这些都是下一步研究双基因明显增强辐射诱导的胶质瘤细胞凋亡机制的方向。

参考文献

- 1 Stupp R, Mason W P, Van Den Bent M J, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005, **352**: 987-996
- 2 Grossman S A, Ye X, Piantadosi S. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin Cancer Res*, 2010, **16**(8): 2443-2449
- 3 Rich J N, Hans C, Jones B, *et al.* Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res*, 2005, **65**(10): 4051-4058
- 4 Gleeson J G, Allen K M, Fox J W, *et al.* Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, 1998, **92**(1): 63-72
- 5 Tremble P M, Lane T F, Sage E H, *et al.* SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol*, 1993, **121**(6): 1433-1444
- 6 Termine J D, Kleinman H K, Whitson S W, *et al.* Osteonectin, a bonespecific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 1981, **26**: 99-105
- 7 Santra M, Zhang X, Santra S, *et al.* Ectopic doublecortin gene expression suppresses the malignant phenotype in glioblastomacells. *Cancer Res*, 2006, **66**(24): 11726-11735
- 8 Santra M, Santra S, Roberts C, *et al.* Doublecortin induces mitotic microtubule catastrophe and inhibits glioma cell invasion. *J Neurochem*, 2009, **108**(1): 231-245
- 9 Schultz C, Lemke N, Ge S, *et al.* Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 2002, **62**(21): 6270-6277
- 10 Frey S O, Kim J H, Brown S L, *et al.* Gene therapy strategies to enhance the effectiveness of cancer radiotherapy. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, **6**(5): 513-524
- 11 王德利. 腺病毒载体的研究进展. *海军总医院学报*, 2004, **17**(4): 227-230
WANG Deli. Research progress of the adenovirus vector, *Journal of Naval General Hospital of PLA*, 2004, **17**(4): 227-230
- 12 Pulkkanen K J, Yla-Herttuala S. Gene Therapy for Malignant Glioma: Current Clinical Status. *Mol Ther*, 2005, **12**(4): 585-98
- 13 Sandmair A M, Loimas S, Puranen P, *et al.* Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum*

- Gene Ther, 2000, **11**(16): 2197-2205
- 14 Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, *et al.* AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. Mol Ther, 2004, **10**(5): 967-972
- 15 Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis, Exp Cell Res, 1999, **248**(1): 10-17
- 16 Liu H, Zhang H, Jiang X, *et al.* Knockdown of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) expression diminishes radiosensitivity of glioma cells. Cancer Biother Radiopharm, 2011, **26**(6): 705-715

Effects of DCX and SPARC co-expression on the apoptosis of human glioma cells U-87MG induced by X-rays irradiation

JIANG Xin¹ XU Yuanyuan¹ ZHANG Haowen¹ YU Jiahua¹ YANG Jicheng² LIU Fenju¹

¹(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(School of Biology and Basic Medical Sciences, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The laser confocal microscope and flow cytometry (FCM) were used to confirm the best infection dose. The expression on mRNA and protein levels of DCX and SPARC were detected by RT-PCR and Western blot. FCM was used to detect the apoptosis rate. The results showed that the best infection dose of U-87MG cells was 50MOI. DCX and SPARC were successfully expressed in U-87MG cells. Without irradiation, the apoptosis rates of Ad-GFP group, Ad-DCX group, Ad-SPARC group, and Ad-DCX-SPARC group were (1.05±0.42)%, (1.11±0.29)%, (1.18±0.37)%, and (1.12±0.40)%, respectively. And after 8 Gy dose irradiation, the apoptosis rates were (7.54±0.47)%, (23.23±2.72)%, (16.43±1.13)%, and (33.01±2.67)%, respectively. The results revealed that Ad-DCX-SPARC could augment the apoptosis induced by X-rays irradiation.

KEYWORDS DCX, SPARC, X-rays irradiation, Glioma, Apoptosis

CLC R811.5, R730.5, R739.4