

放疗联合pGL3/EGR1-Bax基因促进肺癌H460细胞凋亡及Bax基因表达的研究

黄 静¹, 沈 庆¹, 李 华¹, 冯玉麟²

Bax Expression and H460 Apoptosis Induced by Recombined Plasmid pGL3/EGR1-Bax Combined with Radiotherapy in Lung Cancer

HUANG Jing¹, SHEN Qing¹, LI Hua¹, FENG Yulin²

1. Department of Respiratory Medicine, The Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China; 2. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University

Corresponding Author: SHEN Qing, E-mail: htsqhh@163.com

Abstract: Objective To investigate Bax expression and the apoptosis of H460 cell induced by recombined plasmid pGL3/EGR1-Bax combined with radiotherapy in lung cancer. **Methods** Lung cancer cell line H460 was transfected with pGL3/EGR1-Bax plasmids and irradiated in groups. Bax expression was detected by RT-PCR and Western blot. The apoptosis of H460 cell was detected by flow cytometry. **Results** Restriction enzyme digestion showed pGL3/EGR1-Bax was correctly constructed. Gene-radiotherapy could significantly enhance the expression of Bax gene and protein in H460 cells ($P < 0.01$, compared with the control group; $P < 0.05$, compared with the empty vector irradiation group). The apoptosis of H460 cell in pGL3/EGR1-Bax gene therapy plus irradiation group was higher than that in either plasmid or irradiation group alone ($P < 0.05$). **Conclusion** Irradiation could induce Bax expression in pGL3/EGR1-Bax plasmid in H460 cells, to significantly enhance the apoptosis of H460 cells, which may establish important experimental basis for gene-radiotherapy for lung cancer.

Key words: pGL3/EGR1-Bax plasmid; Bax gene; H460 cells; Apoptosis; Irradiation

摘 要: 目的 探讨重组质粒pGL3/EGR1-Bax基因联合放射治疗对肺癌H460细胞的凋亡作用及对Bax基因表达的影响。**方法** 将pGL3/EGR1-Bax质粒转染肺癌H460细胞, 分组进行射线照射。RT-PCR检测各组细胞Bax基因的表达, 蛋白免疫印迹检测Bax蛋白的表达; 用流式细胞仪检测各组H460细胞凋亡情况。**结果** 经酶切鉴定pGL3/EGR1-Bax重组质粒构建正确, 基因联合放疗能促进Bax基因及蛋白的表达(与对照组比 $P < 0.01$, 与空载体放疗组比 $P < 0.05$); 基因放疗治疗组H460细胞凋亡率明显高于对照组及空载体放疗组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 射线可通过诱导pGL3/EGR1-Bax重组质粒中Bax基因在肺癌H460细胞表达增强, 从而显著提高H460细胞的凋亡率, 为临床肺癌的基因放射治疗奠定实验基础。

关键词: pGL3/EGR1-Bax重组质粒; Bax基因; H460细胞; 凋亡; 放疗

中图分类号: R734 **文献标识码:** A

0 引言

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一。据世界卫生组织(WHO)统计全球每年肺癌新发病例超过120万, 并呈逐年上升趋势。在中国其死亡率也居恶性肿瘤死亡率之首^[1]。放疗是目前临床最普遍和重要的肺癌治疗手段之一, 但疗效

不理想, 尤其是非小细胞肺癌对放疗不敏感, 因此肿瘤基因治疗联合放疗增敏成为国内外研究的热点。EGR-1(early growth response-1 gene, EGR-1)基因启动子序列中的放射敏感度CArG盒可在电离辐射作用下启动并诱导下游基因大量表达, 实现基因射线双重杀伤效应^[2-3]。Bax是Bcl-2相关蛋白, 能抑制癌基因Bcl-2表达, 促进细胞凋亡^[4]。本实验室以Bax作为目的基因, 已成功构建重组质粒pGL3/EGR1-Bax, 并在此基础上将该质粒转染肺癌H460细胞, 研究放射治疗后该质粒中Bax基因在肺癌H460细胞中表达和诱导凋亡的作用。

收稿日期: 2013-06-27; 修回日期: 2013-10-15

基金项目: 重庆市卫生局医学科研计划项目(2010-2-274)

作者单位: 1. 400014重庆, 重庆市第三人民医院呼吸内科; 2. 四川大学华西医院呼吸内科

通信作者: 沈庆, E-mail: htsqhh@163.com

作者简介: 黄静(1976-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事慢性阻塞性肺病及肺癌发病机制的研究

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肺癌H460细胞株(中国科学院上海细胞所); Bax兔多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA); RNA抽提试剂盒及RT-PCR试剂盒(日本TOYOBO公司); Lipofectamine™ 2000基因转染试剂(美国Invitrogen公司); Annexin V-PI双染试剂盒(北京碧云天公司); PCR System 7500 美国应用生物系统公司(Applied Biosy Stems); 酶标仪(美国Thermo Varioskan Flash公司); 直线加速器(美国Varian Medical Systems, Inc公司); Quantity One凝胶分析系统(美国伯乐公司)。

1.2 重组质粒pGL3/EGR1-Bax的构建与鉴定

1.2.1 pTA2/EGR1、pTA2/Bax载体的构建与鉴定 分别设计扩增EGR1、Bax基因的引物,以小鼠脑组织基因组DNA为模板,PCR法分别扩增(反应条件: 95℃ 1 min、95℃ 30 s、62℃ 1 min、72℃ 5 min, 35个循环)EGR1、Bax基因的全长编码序列,分别克隆入载体pTA2中,采用EcoR I 酶切与测序进行鉴定,所构建的重组载体分别命名为pTA2/EGR1、pTA2/Bax。

1.2.2 pGL3/EGR1-Bax质粒的构建与鉴定 再次设计扩增EGR1、Bax基因,并含酶切位点及保护碱基的引物,以pTA2/EGR1、pTA2/Bax为模板分别扩增EGR1、Bax基因,分别采用Kpn I、Nhe I、Hind III、Xba I 酶切位点将EGR1、Bax基因亚克隆至pGL3-Basic载体中,采用切酶与测序进行鉴定,所构建的重组质粒命名为pGL3/EGR1-Bax。具体方法见参考文献^[5]。

1.3 EGR1、Bax基因向H460细胞株的转染

复苏、培养及传代所购买的H460细胞株,待细胞生长至60%~80%融合状态时,以Lipofectamine™ 2000介导纯化的pGL3/EGR1-Bax质粒转染细胞,具体按Lipofectamine™ 2000说明书进行。采用Amp筛选获得足够数量阳性克隆的含pGL3/EGR1-Bax质粒的H460细胞。以未转染及空pGL3-Basic载体转染的细胞做对照。

分组设计为H460空白对照组(不转染,不照射),空载体组,载体组,单纯照射组,空载体照射组,载体照射组,脂质体对照组。照射条件:直线加速器(6 Mev电子线)照射或假照射各组H460细胞10 Gy(剂量率: 3 Gy/min), 7 h后收集细胞。

1.4 RT-PCR检测H460细胞Bax mRNA的表达

抽提H460细胞总RNA,进行RT-PCR分析,同

时设β-actin作为内参对照。Bax上游引物: 5'-ACC CGGTGCCTCAGGATGCG-3', 下游引物: 5'-GCTGCCACTCGGAAAAAGACCTC-3'; 内参β-actin上游引物: 5'-CATGTTTCGAGACCTTCAAC-3', 下游引物: 5'-CAGCTCGTAGCTCTTCTC-3'。PCR反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30s, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃ 10 min。PCR产物于1.2%琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶图像扫描系统进行密度扫描,计算Bax与β-actin的灰度比。

1.5 Western blot检测Bax蛋白的含量

提取每实验组H460的总蛋白,蛋白含量测定按BCA法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。以每孔50 μg上样,10%十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,通过电转移法将蛋白质从SDS-PAGE 凝胶转移至PVDF膜上。PVDF膜在含5%脱脂奶粉的TTBS中室温封闭2 h,加入鼠抗人Bax一抗(1: 500倍稀释)4℃摇床过夜,转至室温放置约30 min,TTBS充分漂洗(10 min×3次);加入山羊抗小鼠二抗(稀释浓度为1: 1 000)室温反应2 h,TTBS充分漂洗(10 min×3次)。化学荧光法(ECL)显色,以β-actin蛋白为内参照,曝光获取图像。采用Quantity one 软件分析灰度值,比较各组蛋白相对含量。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将纯化的H460细胞直接收集到10 ml的离心管中,每样本调整细胞浓度为 5×10^5 /ml, 800 r/min离心5 min,弃上清液,加入预冷1×结合缓冲液100 μl重悬细胞,再加入标记有异硫氰酸荧光素的磷脂结合蛋白(Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)各5 μl于细胞悬液中,4℃下避光染色10 min,补加490 μl结合缓冲液混悬细胞后行流式细胞仪分析。结果判断:细胞的凋亡率为早期及晚期细胞凋亡数/细胞总数×100%。

1.7 统计学方法

采用SPSS12.0软件包进行统计分析,数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及鉴定

重组 pTA2/EGR1、pTA2/Bax质粒DNA分别经EcoR I 酶切,0.7%琼脂糖凝胶电泳分别显示2 957 bp的pTA2骨架片段,含EGR1的907 bp与含Bax的701 bp的目的片段。测序证实,所克隆到的EGR1、Bax基因序列与GenBank发布的EGR1、

Bax基因序列完全一致。重组pGL3/EGR1-Bax载体经*Kpn* I、*Nhe* I酶切,切下约3 794 bp与883 bp的EGR1片段;经*Hind* III、*Xba* I酶切,切下约4 000 bp与677 bp的Bax片段。测序证实,重组pGL3/EGR1-Bax质粒构建成功,见图1。

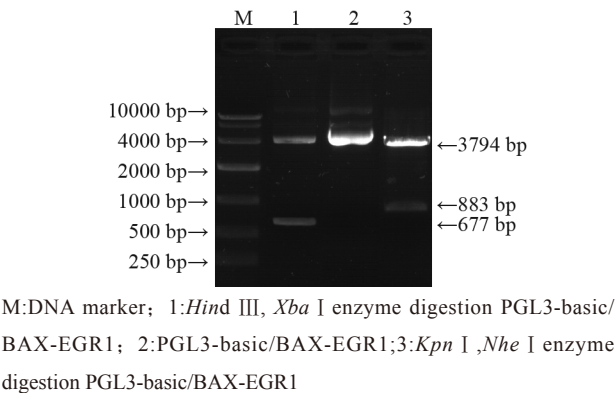


Figure1 The restriction analysis of pGL3/EGR1-Bax

2.2 各组H460细胞Bax mRNA及蛋白的表达

pGL3/EGR1-Bax 重组质粒转染H460细胞后, 分组予以直线加速器10 Gy照射或假照射。7 h后收集细胞行RT-PCR法检测各组Bax基因转录水平; 裂解细胞, 提取蛋白, 用Western blot法检测Bax蛋白表达水平。电泳结果见图2, 蛋白印迹见图3。用Quantity One凝胶分析系统行半定量分析结果见表1、2, 各载体组及载体照射组Bax基因转录及蛋白表达水平与未转染组、空载体组、单纯照射组比显著升高, *P*值均<0.05。且以转染载体并照射组升高最为明显 (*P*<0.01)。本实验表明辐射能诱导pGL3/EGR1-Bax重组质粒中Bax基因在肺癌H460细胞表达明显增强。

2.3 各组H460细胞的凋亡率

Annexin V-PI双染, 流式细胞仪检测显示, 见图4, H460细胞凋亡率照射组(空载体照射组、单纯照射组、载体照射组)较非照射组(即对照

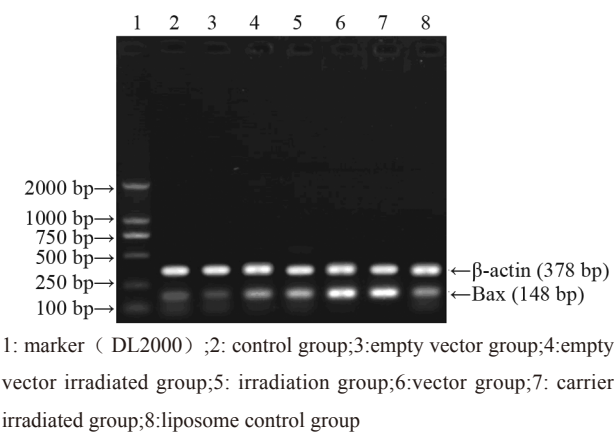


Figure2 Bax mRNA expression in H460 cells in each group

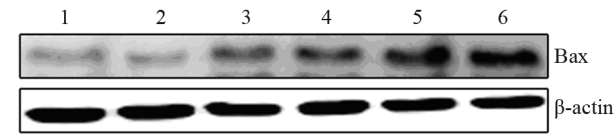


Figure3 Bax protein expression in H460 cells in each group

3 讨论

组、空载体组、载体组)显著升高, *P*值均小于0.01。载体加照射组与空载体加照射组细胞凋亡率分别为(19.17±1.10)%与(13.31±1.11)%, 两者相比差异有统计学意义(*P*=0.00)。提示放疗能促进肺癌H460细胞的凋亡, 基因结合放疗能加速肺癌H460细胞凋亡, 见表3。

3 讨论

以手术、化疗、放疗为主的综合治疗是肺癌的主要治疗方法, 但疗效尚不理想, 肺癌患者5年生存率仍很低, 美国约为15%, 我国仅为10%^[6]。因此亟待寻找治疗肺癌的更为有效的手段。肿瘤基因治疗联合放疗增敏是继手术、放疗及化疗之

表1 各组H460细胞Bax mRNA的表达结果 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Table1 Bax mRNA levels in H460 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Groups	Control	Empty vector	Empty vector irradiated	Irradiation	Vector	Carrier irradiated
Bax mRNA (Grayscale ratio)	0.612±0.034 ^b	0.510±0.029 ^b	0.639±0.083 ^b	0.673±0.082 ^b	0.817±0.041 ^a	1.240±0.083 ^{a,b}

Notes: ^a: vs. Control group, *P*<0.01; ^b:vs. Vector group, *P*<0.05

表2 各组H460细胞Bax 蛋白的表达结果 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Table2 Bax protein Levels in H460 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

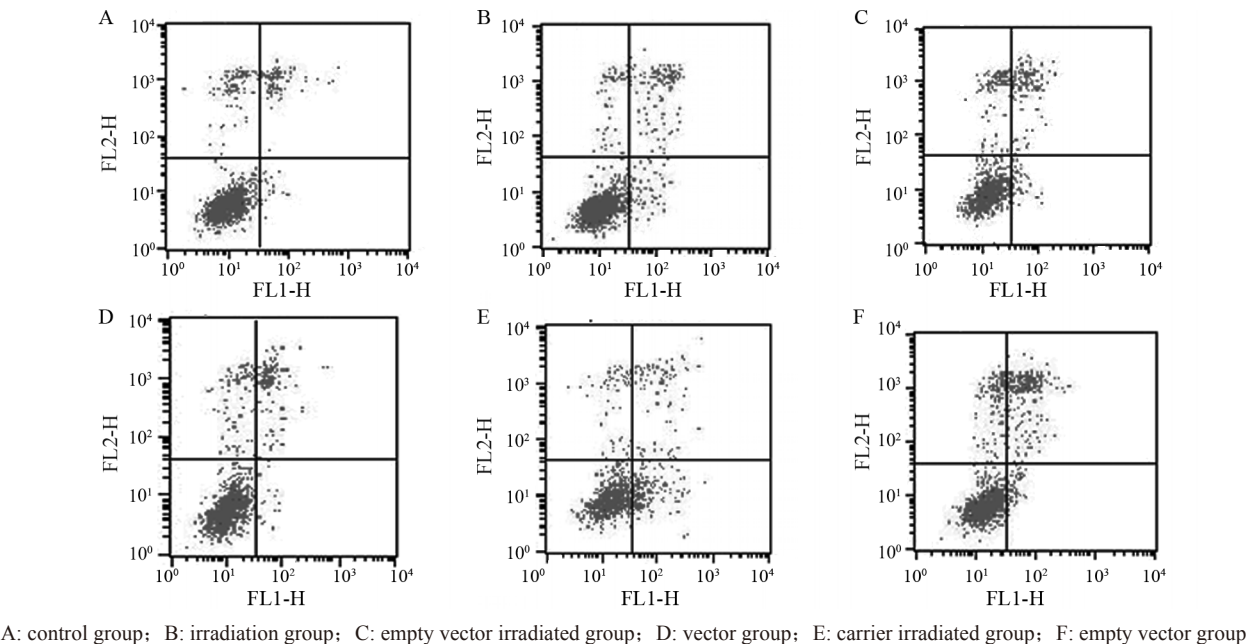
Groups	Control	Empty vector	Empty vector irradiated	Irradiation	Vector	Carrier irradiated
Bax Protein (Grayscale ratio)	0.135±0.019	0.157±0.015	0.167±0.032	0.187±0.025	0.403±0.015 ^a	0.453±0.025 ^{a,b}

Notes: ^a: vs. Control group, *P*<0.01; ^b: vs. Vector group, *P*<0.05

表3 各组H460细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Groups	Control	Irradiation	Empty vector irradiated	Vector	Carrier irradiated	Empty vector
Apoptosis rate of H460 cells	6.650±0.57	12.82±1.70 ^a	13.31±1.11 ^a	9.24±1.24	19.17±1.10 ^{a,b}	5.63±0.85

Notes: ^a: vs. Non-irradiated group, $P < 0.01$; ^b: vs. Empty vector irradiated group, $P < 0.01$



A: control group; B: irradiation group; C: empty vector irradiated group; D: vector group; E: carrier irradiated group; F: empty vector group

图4 H460细胞凋亡率的Annexin V-FITC/PI流式细胞图

Figure4 Annexin V-FITC/PI flow cytometry of apoptosis rate of H460 cells

后兴起的一种新的治疗肺癌的方法，被认为是目前治疗肺癌极有前景的治疗手段之一。肿瘤基因治疗是将对肿瘤有直接或间接杀伤作用的基因经载体转入体内，在肿瘤生长部位表达而发挥杀伤肿瘤作用。Egr-1启动子的发现使放疗和基因治疗得到了有效结合。国内外研究表明，Egr-1启动子可受电离辐射等因素刺激而激活，进而诱导其下游基因表达。Weichselbaum等于1992年首先提出基因放射治疗的设想，该研究小组其后的实验结果亦证实将具有辐射诱导特性的基因和肿瘤杀伤基因一同转入肿瘤局部，在实施局部放疗的同时诱导肿瘤杀伤基因表达，产生双重杀伤效果^[7]。

Bax是Bcl-2的相关蛋白，是Bcl-2家族中研究最广泛的促凋亡蛋白，它作用于肿瘤的抑制物促进细胞凋亡。Bax可与抗凋亡基因Bcl-2形成异源二聚体，Bax与Bcl-2两者之间的比例决定了细胞的命运，若Bax占多数，则Bcl-2被抑制，凋亡被诱导，加速细胞死亡；反之则Bax受到抑制，细胞得以生存^[8-9]。当细胞内Bax较多时，Bax自身亦可形成同源二聚体占主导，从而促进细胞凋亡^[10]。由于肿瘤细胞对放疗的敏感度不同，不同程度上影响了非小细胞肺癌放疗治疗的效果。凋亡相关基

因Bcl-2在许多人类肿瘤中都存在着过表达，过高的抗凋亡蛋白基因Bcl-2表达打破了正常的细胞凋亡机制，使细胞对放疗和化疗表现出广泛的抵抗性^[11]。因此我们构建pGL3/EGR1-Bax重组载体，脂质体介导重组质粒转染肺癌细胞H460后进行电离辐射的诱导。实验发现重组载体照射组Bax的mRNA与蛋白表达量均较其他各组明显升高。提示Egr-1启动子经辐射激活，刺激下游Bax基因在肿瘤细胞表达显著增强，从而抑制了肿瘤细胞中高表达的抗凋亡基因Bcl-2，增加了肺癌细胞的放射敏感度，进一步促进Egr-1启动子的激活。

国内外学者将Egr-1启动子连接P16^[12]、INF^[13]、TNF- α ^[13-14]、TRAIL^[15]、endostatin^[16]等不同的下游基因，联合放射治疗胰腺癌、食管癌等不同的肿瘤都取得了明显的抑瘤效应。为了探讨Bax基因联合放射治疗对非小细胞肺癌的作用，本实验在构建辐射诱导表达载体pGL3/EGR1-Bax的基础上，研究了体外转染联合辐射对肺癌H460细胞凋亡的影响。结果表明，pGL3/EGR1-Bax重组质粒转染H460细胞后联合照射组细胞凋亡率较其他照射组明显升高，提示射线通过激活Egr-1启动子诱导治疗基因Bax表达增强，从而加强了基因

对肿瘤细胞的凋亡杀伤作用。本实验同时发现重组载体组Bax的mRNA与蛋白表达量低于载体照射组, 高于其他各组; 但重组载体组细胞凋亡率却低于各单纯照射组, 那么高表达Bax的载体组与单纯照射组和空载体照射组相比凋亡率为什么更低呢? 可能由于辐射较高表达的Bax基因更为显著抑制了肺癌细胞过表达的抗凋亡基因Bcl-2, 而致单纯照射组和空载体照射组凋亡率较单纯重组载体组更高。重组载体联合照射双重因素作用下导致H460细胞凋亡显著增加。本研究为促凋亡基因Bax联合放射治疗的临床应用提供了重要的理论和实验依据。我们希望在以后的相关研究中继续探索并逐步得到解决和论证。

参考文献:

- [1] Peng H, Han BH, Li XQ, *et al.* Analysis of clinical characteristics and survival rates in 1 279 lung cancer patients[J]. Zhongguo Ai Zheng Za Zhi, 2011, 21(5):354-8. [彭红, 韩宝惠, 李小青, 等. 1279例肺癌患者临床特征及生存率分析[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(5):354-8.]
- [2] Liu C, Calogero A, Ragona G, *et al.* EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity[J]. Crit Rev Oncog, 1996, 7(1-2):101-25.
- [3] Papanikolaou NA, Sabban EL. Ability of Egr1 to activate tyrosine hydroxylase transcription in PC12 cells. Cross-talk with AP-1 factors[J]. J Biol Chem, 2000, 275(35):26683-9.
- [4] Valentijn AJ, Upton JP, Gilmore AP. Analysis of endogenous Bax complexes during apoptosis using blue native PAGE: implications for Bax activation and oligomerization[J]. Biochem J, 2008, 412(2):347-57.
- [5] Huang J, Shen Q, Feng YL, *et al.* Constructon of recombinant vector pGL3/EGR1-Bax and its transfection into the cell of non-small-cell lung carcinoma[J]. Shanghai Jiao Tong Da Xue Xue Bao(Yi Xue Ban), 2012, 32(12):1659-62. [黄静, 沈庆, 冯玉麟, 等. pGL3/EGR1-Bax重组载体的构建及对非小细胞肺癌细胞的转染[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(12):1659-62.]
- [6] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-49.
- [7] Staba MJ, Mauceri HJ, Kufe DW, *et al.* Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft[J]. Gene Ther, 1998, 5(3):293-300.
- [8] Lai MY, Huang JA, Liang ZH, *et al.* Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(26):4227-33.
- [9] Huang JH, Ling CH, Yang JC, *et al.* The in vitro and in vivo effects of adenovirus-mediated inhibitor of growth 4 and interleukin-24 co-expression on the radiosensitivity of human lung adenocarcinoma[J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2011, 34(6):413-8. [黄锦宏, 凌春华, 杨吉成, 等. 腺病毒介导的肿瘤生长抑制因子4和白细胞介素-24双基因共表达对肺腺癌放疗增敏的体内外实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(6):413-8.]
- [10] Yethon JA, Epand RF, Leber B, *et al.* Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(49):48935-41.
- [11] Xu XY, Xu DQ, Chen M, *et al.* To Explore the activity of generation and the cell cycle of NCI-H460 by RNAi inhibiting Bcl-2 gene expression and combining treatment with radiation[J]. Shi Yong Zhong Liu Xue Za Zhi, 2012, 26(1):37-41. [徐向英, 许德权, 陈蜜, 等. Bcl-2基因表达抑制联合射线对NCI-H460细胞增殖状态及细胞周期影响的研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 2012, 26(1):37-41.]
- [12] Ma HB, Wang XJ, Hu HT, *et al.* Anti-tumor effect of pcDNA3.1-Egr.1p-p16 gene combined with radiotherapy in tumor-bearing nude mice[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao(Yi Xue Ban), 2005, 30(1):7-10, 15. [马红兵, 王西京, 胡海涛, 等. pcDNA3.1-Egr.1p-p16基因联合放射治疗对裸鼠肿瘤的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 30(1):7-10, 15.]
- [13] Kufe D, Weichselbaum R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4):326-9.
- [14] Wu CM, Huang TH, Wu DS, *et al.* Experimental study on inhibition of pEgr-TNFalpha gene therapy combined with radiotherapy on esophageal cancer cells[J]. Ai Bian·Ji Bian·Tu Bian, 2006, 18(1):6-8. [吴丛梅, 黄天华, 吴德生, 等. pEgr-TNFalpha基因联合放疗抑制食管癌细胞生长的实验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(1):6-8.]
- [15] Hu Y, Ouyang W, Wu F, *et al.* Enhanced radiosensitivity of SW480 cells via TRAIL up-regulation mediated by Egr-1 promoter[J]. Oncol Rep, 2009, 22(4):765-71.
- [16] Zhong YC, Jiang P, Wang LP, *et al.* Experimental study on anti-tumor effect of PIRES-EGR-1-endostatin gene by radiotherapy[J]. Zhonghua Fang She Zhong Liu Xue Za Zhi, 2010, 19(1):12-3. [张永春, 姜鹏, 王路平, 等. PIRES-EGR-1-endostatin基因放疗抗肿瘤效应的实验性研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2010, 19(1):12-3.]

[编辑: 黄园玲; 校对: 杨 卉]