中 国 科 学
1991年10月 B 辑 第10期

从人食管癌细胞系分离分化基因的新方法*

冯 骆 王秀琴 傅 明 王志华 田 园 蔡 岩 吴 旻

(分子肿瘤学国家重点实验室,中国医学科学院肿瘤研究所,北京 100021)

摘 要

本文报道一种从癌细胞中分离分化基因(抑癌基因)的全过程. 用维甲酸(RA)处理食管癌细胞EC8712可使后者发生终末分化和衰老. 从对数生长期的和RA处理5天后的EC8712各构建一cDNA文库,命名为Lib8712和Lib8712RA,后者为可在哺乳动物细胞内表达的质粒. 用RA处理5天的EC8712制备cDNA探针,先同Lib8712的质粒DNA进行反复杂交,以除去探针中与之共有的DNA序列. 将余下的、富集了的探针(代表RA激活的基因)同Lib8712RA进行集落杂交,以钓取其中的RA激活的序列. 已获得若干个杂交阳性克隆,Northern分析表明,它们是经RA诱导后特异表达的基因.

关键词: 分化基因,抑癌基因,维甲酸,食管癌

人体细胞一般都要经历增殖、分化、衰老和凋亡(apoptosis)几个时期. 当细胞由于某种原因不能及时转入分化阶段而持续增殖时,就会形成恶性肿瘤. 长期以来细胞分化和恶性肿瘤始终是病理学者、临床医生、和实验肿瘤学者共同关注的中心问题之一. 已有不少资料表明,恶性肿瘤细胞在体内或体外条件下,有可能部分地或完全地转变为无害的分化细胞. 这种现象在临床上称为恶性肿瘤的自发消退(自愈)[1],在体外培养条件下叫做逆向转化或逆转(reverse transformation 或reversion)[2]. 近年来有许多实验室探索在体外条件下,使癌细胞发生逆转的条件和机制,取得了不少进展[2-4]. 最近发现和分离到几种所谓抑癌基因,如成视网膜细胞瘤的RB基因[5-7],Wilms瘤的锌指基因(zine-finger gene)[8]等,表明这些基因的纯合缺失或失活导致了相应细胞的癌变,当将这些基因(以cDNA或整条染色体的形式)重新导入各自的恶性细胞,可使后者恢复正常表型,失去恶性特征[9,10]. 更重要的是,这些基因所编码的蛋白质,都是作用于核内的调控蛋白[6,8],它们可能在促进增殖细胞转入分化状态发挥重要作用. 上述事实说明,在分子水平上探明细胞增殖、分化、癌变和逆转之间关系的时机已经成熟. 人类必将从中获得极大的益处. 为此,我们设计了一种利用维甲酸(retinoic acid, RA)促使癌细胞体外分化、建立分化前后的cDNA文库和递减杂交的技术,从人食管癌细胞系中分离分化基因的策略,并取得了成功.

本文1991年2月19日收到,1991年6月9日收到修改稿.

* 国家"863"高技术研究发展计划生物技术领域资助项目.

一、材料和方法

1. 细胞系及培养条件

人食管癌细胞系为本室建立.食管癌组织取自本院病人之手术标本(表 1).成系后培养于含 20% 灭活小牛血清(天津生化试剂厂)之 M199(Gibco)中,每周传代 1 次,细胞生长旺盛,呈典型的多边形上皮细胞形态. 全反式维甲酸(Sigma)溶于少量二甲亚砜中,用磷酸缓冲液稀释成 10^{-3}mol/ L 之基液待用. 处理细胞时将此液加入培基至最终浓度达10^{-5}mol/ L. 在此浓度上继续培养细胞至所需时间.

表1 本实验使用的食管癌细胞系

	EC8501	EC8712
患者住院号	391352	455918
性 别	男	男
年 龄	55	45
病理诊断	髓样鳞状细胞癌	鳞状细胞癌
染色体数	60 — 70	100 — 110
裸鼠接种	2/ 2	4/ 2*

* 每头裸鼠接种两处.

2. 材料

酶和化学试剂购自下列公司: AMV 逆转录酶,Life Sciences; DNA Polymerase I 末端脱氧核苷转移酶(TDT),Boehringer; Oligo(dT)-pSV7186引物和 Oligo(dG)-pSV1932-Hind III 接头,Oligo(dT)-PCDV1引物和Oligo-PL1-Hind III接头, Pharmacia; RNase H, BRL; α-^{32}P-dCTP(3000μCi/ mmol/ L),Amersham 或NEN;involucrin 基因片段的质粒 pL-2 来自英国帝国癌症基金;actin 探针 pHRL83IV 得自 ATCC;c-myc 探针pMC14 由 H.Land 惠赠.

3. RNA 分离

用 6mol/ L 异硫氰酸胍提取 10^8 个细胞的总 RNA,再经 5.7mol/ LCsCl 密度梯度离心纯化[11]. 经 Oligo(dT)纤维素将Poly(A)$^+$RNA 分离出来[12].

4. cDNA 文库之构建

采用 Okayama 和 Berg 的克隆系统构建 cDNA 文库[13,14],即在— Oligo(dT)连尾的载体引物上合成cDNA,再用— Oligo(dG)连尾的 Hind III接头将cDNA同载体连接. 用此法构建 3 个文库; Lib8501和 Lib8712,构自未经处理的 EC8501 和 EC8712 细胞,采用 Oligo(dT)-pSV1引物和Oligo(dG)-pSV1932-Hind III 接头;另一称 Lib8712RA,为一在哺乳类动物细胞中可表达的文库,构自维甲酸(10^{-5}mol/ L)处理 5 天后 EC8712 细胞,采用 Oligo(dT)-pcDV1 引物和Oligo(dG)-pL1-Hind III接头.

5. RA 特异性 cDNA 探针之富集和递减杂交

cDNA 递减杂交参照 Scott[15] 的方法,经若干改进.将Lib8712 的全部菌落合并,经碱裂解和 CsCl 密度梯度离心(Beckman VTi80, 直角转头, 80000 r/ min, 20°C, 3h 分离到质粒 DNA300μg,经 NaOH 变性后将单链 DNA 转移到 APT 滤纸上(Aminophenyl-thioester, Bio-Rad),依照厂家规定的方法进行. 将此共价结合了单链质粒 DNA的APT 纸剪碎成大约

1 × 1mm 的小块以增进杂交. cDNA 探 针得自维甲酸(10^{-5}mol/ L)处理5 天后的 EC8712 细胞的 mRNA，逆转录后，再以 0.2mol/ L NaOH，10mmol/ L EDTA 70°C 处理 20min 水解去除模板 RNA，再以1 mol/ L HCl中和溶液. 总共获得300ng cDNA 探针(比放射性为 0.3×10^{8}cpm/ μg DNA)，用于同APT 纸上的 DNA 进行杂交.

6. 集落杂交

将 Lib8712RA 接种于琼脂平皿上，然后将菌落转移到硝酸纤维素膜(Bio-Rad) 上，照 Thayer 的方法[16] 处理膜，然后，依标准方法[17] 同 cDNA 探针进行杂交.

7. Southern 印迹分析

依标准程序[17] 进行.

8. Northern 吸印分析

20μg 总 RNA 经甲醛变性后在琼脂糖甲醛凝胶上电泳分部，照 Maniatis 手册[17] 的方法进行杂交分析.

9. 基因转移

用 Baekon 2000 基因转移系统将 cDNA 克隆转入 EC8712 细胞，即在含有 5×10^{6} 个细强的 100μl 磷酸缓冲液中加入20μgcDNA(质粒 DNA)和 1μg neo 基因(pSV2 neo) 混匀后在室温下经 5 kV 电场处理，然后将细胞悬液移入培养瓶中培养 3 天，再换成含有 G418 (最终浓度为400μg/ ml)的培养液继续培养 2 周，计数 G418 抗性细胞集落.

二、结　果

1. RA 诱导食管癌细胞分化

EC8712 细胞经最终浓度 10^{-5}mol/ L 的 RA 处理后增殖速度明显受到抑制(图 1)，前5

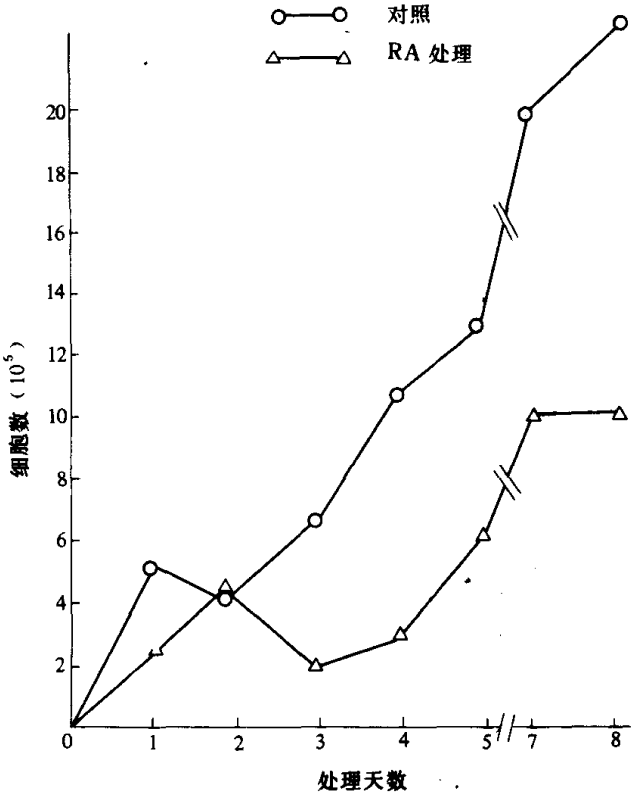

图 1　RA(10^{-5}mol/ L)处理前后 EC8712 细胞的生长曲线

(此结果为 3 次实验的平均值)

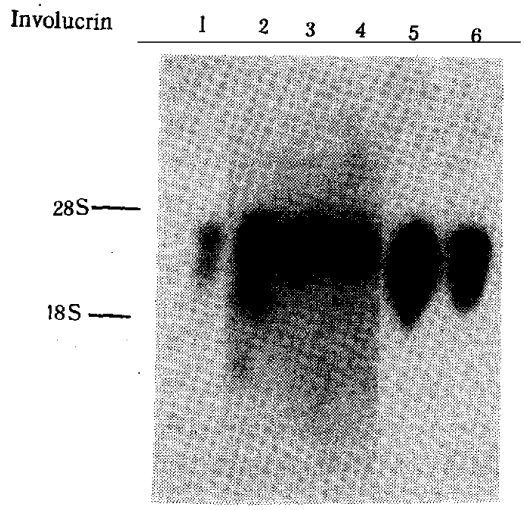

图 2 involucrin 表达的 Northern 印迹杂交

(20μg 总RNA 经甲醛变性后,用琼脂糖-甲醛变性电泳分离,转至尼龙膜(Zeta 膜,Bio-Rad)后用involucrin探针(pL-2 经 Pst I 酶切后制备的0.65kb片段)杂交. 1 —— 未用RA 处理的EC8712 细胞RNA. 2 — 6—— RA(10^{-5}mol/L)处理1—5 天的EC8712细胞 RNA. 探针量 10^6cpm/ml)

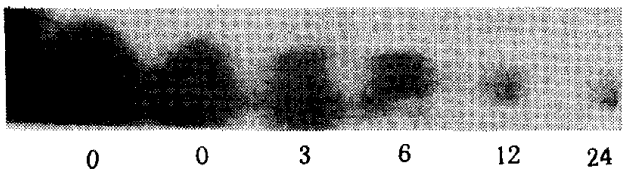

图 3 c-myc 基因表达的Northern印迹杂交

(3μg Poly(A)$^+$RNA 经甲醛变性并用琼糖-甲醛变性电泳分离后,转至尼龙膜上进行杂交. 探针由含人c-myc 基因的质粒pMC14 经 EcoR I-BamHI 双酶切,取其8.2kb 片段制备. 0 h 示未经 RA 处理的 EC8712 细胞RNA,3h — 24h 示经 RA(10^{-5} mol/L)处理相应时间的EC8712 细胞 RNA)

天下降约 50%,持续处理 10 天后,停止增殖,细胞老化(图略). RA处理还导致 involucrin 的表达增加,说明这种鳞状上皮癌细胞发生了终末分化[18],如图 2 所示,RA 处理过的癌细胞 RNA 中involucrin mRNA 急剧增多,而未处理的EC8712 细胞中则几乎查不出involucrin 的表达(图2,对照). 此外,RA 处理还使癌细胞的c-myc 表达水平急剧下降(图3).

2. cDNA 文库构建

采用 Okayama 和Berg 的方法从对数生长期的食管癌细胞和经RA 连续处理了5 天的食管癌细胞共构建3个cDNA 文库. 详见表2.

表 2 3 个 cDNA 文库的主要数据

名 称	Lib8501	Lib8712	Lib8712RA
细 胞	EC8501	EC8712	RA 外理 5 天的 EC8712
载 体	pSV7186	pUC18(Pst I切)[13]	pcD
克隆系统	Okayana & Berg 之系统	α(C)-α(G)接尾	Okayama[14] & Berg 之系统
总集落数	50000	20000	50000
鉴 定	c-myc, actin 皆能检出	c-myc, actin 皆能检出	actin 能检出, c-myc 不能检出
哺乳动物细胞中之表达	−	−	+

3. 通过递减杂交富集RA特异性cDNA探针

从RA处理5天的EC8712细胞分离mRNA，经逆转录制成单链^{32}P标记cDNA探针，比放射性0.3×10^{8}cpm/μg DNA，总量约300ng. 用此探针首先同DNA-APT滤纸反复进行杂交，以去除探针中与Lib8712共有的序列. 如表3所示，经4轮杂交后90%以上的探针已被去除，剩余未杂交上的8.4%的放射性代表RA激活的基因. 这种RA激活基因的cDNA探针被富集和纯化了许多倍.

表3　cDNA探针经递减杂交后之结果

杂交 (轮数)	cDNA探针投入量 (cpm %)	cDNA探针剩余量 (cpm %)
1	100	40.4
2	40.4	21.0
3	21.0	8.5
4	8.5	8.4

为证实cDNA探针是否反映了RA激活的基因，将其与前述3个cDNA文库的质粒DNA进行Southern印迹杂交，从图4可知该探针仅同Lib8712RA有杂交信号，另两个未经RA处理的食管癌细胞系cDNA文库均为杂交阴性. 作为对照，以actin基因为探针，3个文库均显示阳性结果（图4）.

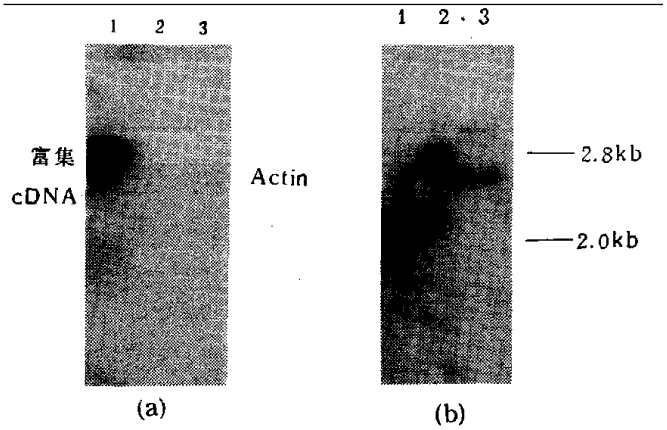

图4　递减杂交(Subtractive Hvbridization)富集的cDNA探针Southern印迹分析.
(1,2,3 —— 来自cDNA文库Lib8712RA,Lib8712和Lib8501的质粒DNA2μg经Hind III酶切后，用0.8%琼脂糖电泳分离，转移至尼龙膜后，用递减杂交后剩余的未被结合探针(a)进行杂交，尼龙膜上探针洗脱后，再与Actin基因(来自Pst I酶切质粒pHRL83IVS4制备的片段）探针杂交(b))

4. 递减杂交

RA激活基因cDNA探针以集落杂交法筛选另一个经RA处理过的EC8712细胞的cDNA文库，即Lib8712RA. 该库共有约50000个集落，对其中的10000个集落进行两轮集落杂交后得到39个阳性克隆. 把它们各自用Taq I酶切后经琼脂糖凝胶电泳分析，39个中的29个克隆拥有大于0.4 kb的cDNA插入序列，根据Taq I酶切片段分析及其cDNA阳性克隆间的交叉杂交结果表明，这29个克隆来自3个不同的序列(数据略). 为验证这些克隆是否来自RA激活之基因，将经RA处理和未处理的EC8712细胞的总RNA分别提取出来，

在变性琼脂糖凝胶上分部，再同 cDNA 克隆的探针杂交. 如图 5 所示，已发现有两个 cDNA 克隆特异地同 RA 处理过的细胞 RNA 杂交阳性，却不能同未处理过的细胞 RNA 杂交，它们被分别命名为 pRA503 和 pRA538(图 5).

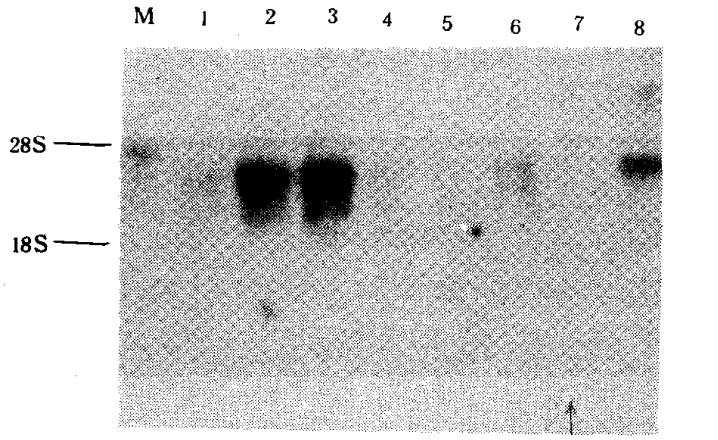

图 5 RA 诱导特异表达的 cDNA 克隆的 Northern 印迹分析

(20 μg 总 RNA 经甲醛变性凝胶电泳后，转至尼龙膜上与 cDNA克隆 pRA538 探针 (10^6cpm/ml)杂交，M 示标准 RNA 分子，1 —— 未经 RA 处理的 EC8712 细胞 RNA，2—8—— RA(10^{-5}mol/ L)处理 5h、1 至6 天不同时间的 EC8712RNA. RNA 上样量以电泳胶的溴化乙啶染色校正(图略). 箭头示第 5 天换液)

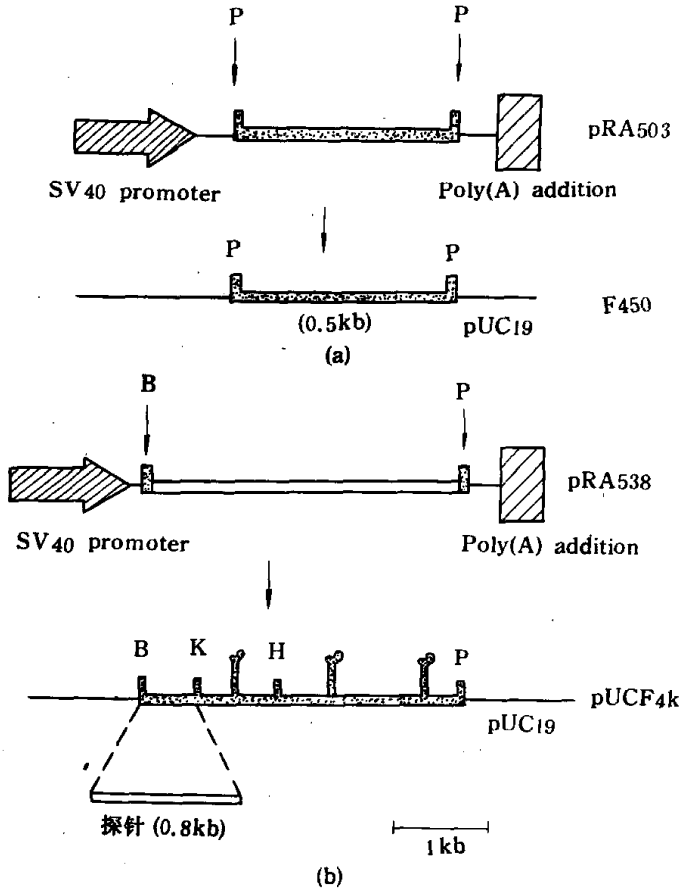

图 6 cDNA 克隆 pRA503(a)及 pRA538(b)的部分酶切图

(pRA503 经 PstI 酶切，其 0.5kb 片段亚克隆至 pUC19 载体中称 F450. pRA538 经 BamH I-PstI 双酶切，其 3.2kb 片段亚克隆至 pUC19 中称 pUCF4K)

5. 两个 cDNA 克隆之鉴定

两个 cDNA 克隆的限制性酶切分析见图 6，pRA503 用PstI 消化后可得一约0.5kb 的插入序列(图6(a))，测序结果表明为一cDNA 之断片，同c-myc 有约90% 的同源性(将另文报道). pRA538 的部分酶切图显示Bam HI-Pst I 的插入序列，分子量大约为3.2kb(图 6(b))，为一全长 cDNA，测序工作已接近完成，将另文发表.

如前所述，Lib8712RA 是构建于可在哺乳类动物细胞内表达的载体上的，因此，我们可以将pRA538 直接引入EC8712 细胞，以检测其对母本细胞的生物学功能. 以1:20(重量)的比例将neo 基因(pSV2neo)和 pRA538 用Baekon 2000 电转移系统共转染EC8712 细胞，然后再用G418 筛选，G418 抗性集落大约每5×10^6个细胞中出现50 个，转化率为10^{-1}/μgDNA. 这些集落中绝大多数均转入了 pRA538. Northern 印迹杂交分析表明，转入的pRA538 在细胞中获得了表达，但在母系细胞EC8712 中则无表达(图略). 以pRA538 为探针对用和未用RA 处理过的EC 8712 以及手术切除的一块人食管癌组织进行Southern 印迹分析，表明三者的基因组内均有pRA538 的基因存在，以三种不同酶(EcoRI，BamHI 和PstI)消化后均在同一位置显示杂交带(图 7)，说明该基因在癌细胞中完好无缺，只是不表达而已. 最重要的是，pRA538 转入癌细胞后明显抑制了细胞的生长，单纯转入neo 基因的细胞生长却未受到影响. 此项实验曾重复进行多次，均获得类似的结果(另文报道).

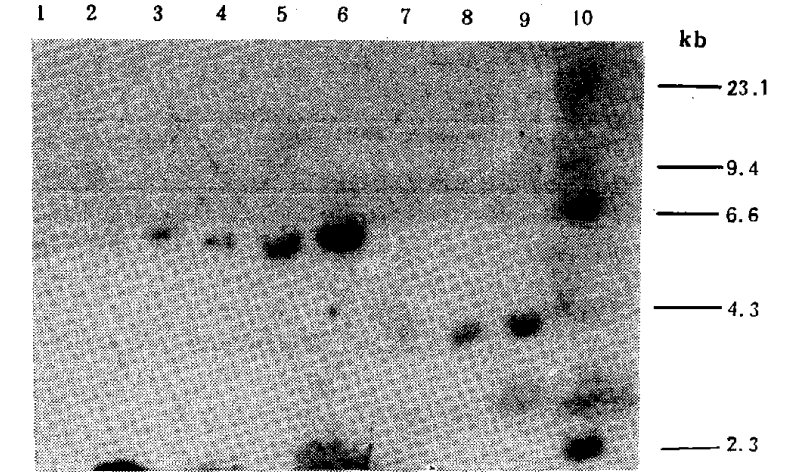

图 7　cDNA 克隆 pRA538 的 Southern印迹分析

(1,4,7 —— 用 10μg 来自 EC8712 细胞 DNA. 2,5,8 —— 一例人食管癌的肿瘤DNA，以及 3,6,9 —— 来自用 10^{-5}mol/ L RA处理的EC8712 细胞 DNA，经 1 —3 EcoR I，4—6 BamH I 以及7—9 Pst I 酶切后，0.8% 琼脂糖电泳分离，转膜后与从pUCF4k 制备探针(图 6(b))杂交(2×10^6cpm/ml))

三、讨　论

我们通过用 RA 迫使人食管癌细胞在瓶中发生分化[19]，建立细胞分化前后的 cDNA 文库，通过两个库的递减杂交获得 RA 激活基因的 cDNA，再视其能否抑制原来的癌细胞来筛选分化基因. 这是一种从癌细胞中分离分化基因(抑癌基因)的策略(图 8). 我们通过这一策略已从人食管癌细胞中分离到一些能抑制癌细胞生长的 cDNA. 这些基因在癌细胞基因组中

存在,但不表达. 经 RA 诱导癌细胞分化时,它们才开始表达. 因此,它们应属于角化上皮细胞分化基因的范畴. 我们仅筛选了 Lib8712RA 1/5的集落,也未将筛出的克隆逐个进行分析,因此,无法判断RA 大概激活了多少基因,其中哪些属抑癌基因范畴. 对 pRA538 和 pRA503 功能的研究已显示出这个策略在分离具抑癌作用的分化基因方面具有潜力.

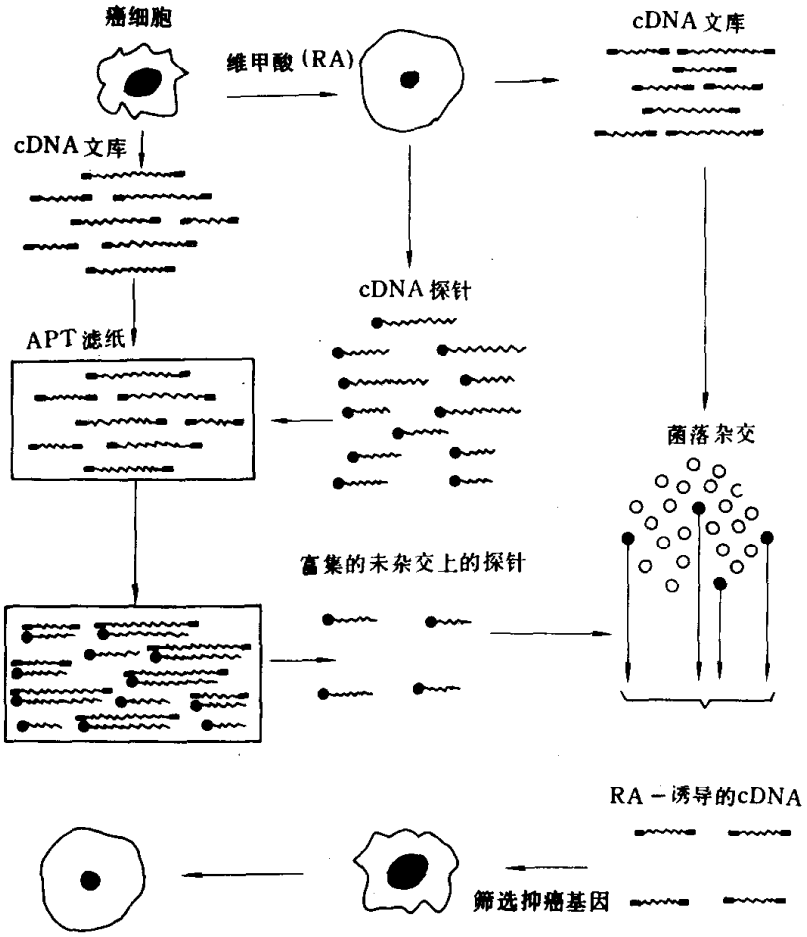

图 8 从癌细胞分离分化基因的示意图.

目前国际上通用的分离抑癌基因的策略是首先从罕见的遗传性儿童肿瘤(如成视网膜细胞瘤,Wilms 肾癌,家族性结肠腺瘤样息肉病 FAP)患者中寻找规律性的染色体缺失,然后通过染色体步移或跳移的方法去分离缺失的 cDNA和基因组基因. 我们的方法比上述程序简单、并可适用于不同的恶性肿瘤,只要有相应的细胞系和建立使该细胞发生分化的条件. 此外,我们的策略是从癌细胞中分离"静止的"分化基因,而国际上通用的方法则是从正常细胞中分离癌细胞中丢失或改变了的抑癌基因. 这两种策略在研究分化和癌变机理以及探索人类基因组的奥秘方面各具有特色,可以互相补充.

参 考 文 献

[1] 吴旻.中国医学百科全书,肿瘤学,1983,4 — 5.

[2] Puck, T.T. et al., *Somat. Cell Mol. Genetics*, **16**(1990), 257 — 265.

[3] Hsie, A. W. & Puck, T. T, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **68** (1971), 358 — 361.

[4] Pastan, I. & Willingham, M., *Nature*, **274**((1978),645 — 650.
[5] Friend, S.H. et al., *ibid.*, **323**(1986),643 — 646.
[6] Lee, W.-H. et al., *Science*. **235**(1987), 1394-1399.
[7] Fung, Y.-K.T. et al ., *ibid*, **236**(1987),1657-1661.
[8] Gessler, M. et al., *Nature*, **343**(1990),774 — 778.
[9] Huang, H.-J.S. et al., *Science*, **242**(1988),1563 — 1566.
[10] Weisman, B.E. et al., *ibid.*, **236**(1987),175-180.
[11] Chirgwin, J.M. et al., *Biochemistry*, **18** (1978),5294 — 5299.
[12] Aviv, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**(1972), 1408— 1412.
[13] Okayama, H. & Berg, P., *Mol. Cell. Biol.*, **2** (1982),161 — 170.
[14] Okayama, H. & Berg, P., *ibid.*, **3**(1983), 280 — 289.
[15] Scott, M.R.D. et al., *Cell*, **34**(1983),557 — 567.
[16] Thayer, R.E., *Anal. Biochem.*, **98** (1979),60 — 63.
[17] Maniatis, T., et al., *Molecular cloning, a laboratory manuql.*, Cold Spring Harbour Laboratory, 1982.
[18] Eckert, R.L. & Green, H., *Cell*, **46** (1986),583 — 589.
[19] Sporn, M.B. & Roberts, A.B., *Cancer Res.*, **43** (1983), 3034 — 3040.
[20] Solomon, E. et al., *Nature*, **328**(1987),616 — 619.