

LIGHT 基因和干扰素- γ 转染诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的研究

李金朋 吴力群 韩冰 卢云 吕振华 刘相萍 杨堃 隋爱华

【摘要】 目的 探讨脂质体介导 LIGHT 基因和 IFN- γ 转染诱导肝癌 HepG2 细胞的促凋亡作用。**方法** 以脂质体介导 LIGHT 基因和 IFN- γ 转染肝癌 HepG2 细胞,设立转染组(单转、联合转染组)和对照组(未转染组)。分别于转染后 12、24、48 h 检测肝癌 HepG2 细胞的凋亡率、Bcl-2 及 Caspase-8 的表达量,并采用方差分析。**结果** (1)细胞凋亡率:单转组转染后 12、24、48 h 为 $18.8\% \pm 3.5\%$ 、 $25.7\% \pm 2.8\%$ 、 $36.4\% \pm 3.6\%$;联合转染组为 $23.8\% \pm 2.4\%$ 、 $31.1\% \pm 2.1\%$ 、 $42.5\% \pm 4.5\%$;对照组为 $8.7\% \pm 2.1\%$ 、 $9.3\% \pm 1.6\%$ 、 $10.9\% \pm 1.2\%$ 。3 组比较差异有统计学意义($F = 15.69, 53.33, 48.28, P < 0.01$)。(2) Bcl-2 表达量:单转组在转染后 12、24、48 h 为 $16.4\% \pm 5.0\%$ 、 $13.4\% \pm 3.5\%$ 、 $8.6\% \pm 2.3\%$;联合转染组为 $14.7\% \pm 3.8\%$ 、 $9.1\% \pm 2.0\%$ 、 $4.6\% \pm 2.0\%$;对照组为 $25.3\% \pm 6.3\%$ 、 $19.8\% \pm 4.4\%$ 、 $10.1\% \pm 3.8\%$ 。3 组比较差异有统计学意义($F = 6.19, 12.29, 5.81, P < 0.05$)。(3)Caspase-8 表达量:单转组在转染后 12、24、48 h 为 $19.3\% \pm 2.4\%$ 、 $27.2\% \pm 1.9\%$ 、 $33.7\% \pm 3.0\%$;联合转染组为 $22.7\% \pm 2.2\%$ 、 $30.9\% \pm 3.1\%$ 、 $38.2\% \pm 3.2\%$;对照组为 $1.2\% \pm 0.8\%$ 、 $1.8\% \pm 0.6\%$ 、 $3.2\% \pm 1.5\%$ 。3 组比较差异有统计学意义($F = 71.54, 112.78, 101.61, P < 0.01$)。**结论** LIGHT 基因转染肝癌 HepG2 细胞后通过调节 Bcl-2 及 Caspase-8 的表达来发挥促凋亡作用,IFN- γ 能增强 LIGHT 基因诱导肝癌 HepG2 细胞的凋亡。

【关键词】 癌,肝细胞; HepG2 细胞; LIGHT 基因; 干扰素- γ ; 凋亡

Apoptosis of HepG2 cells after transfection with LIGHT gene and interferon- γ LI Jin-peng, WU Li-qun, HAN Bing, LU Yun, LÜ Zhen-hua, LIU Xiang-ping, YANG Kun, SUI Ai-hua. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

Corresponding author: WU Li-qun, Email: wulq5810@126.com

【Abstract】 Objective To investigate apoptosis of HepG2 cells after transfection with LIGHT gene and interferon- γ . **Methods** LIGHT gene and interferon- γ were transfected into HepG2 cells by liposome mediated method. The HepG2 cells were divided into group A (transfected with LIGHT gene or interferon- γ), group B (transfected with LIGHT gene and interferon- γ) and group C (non-transfection group). The apoptosis rate of the HepG2 cells and the expression of Bcl-2 and Caspase-8 were detected 12, 24, 48 hours after transfection. **Results** (1) The apoptosis rates of HepG2 cells at hour 12, 24 and 48 after transfection were $18.8\% \pm 3.5\%$, $25.7\% \pm 2.8\%$ and $36.4\% \pm 3.6\%$ in group A, $23.8\% \pm 2.4\%$, $31.1\% \pm 2.1\%$ and $42.5\% \pm 4.5\%$ in group B, and $8.7\% \pm 2.1\%$, $9.3\% \pm 1.6\%$ and $10.9\% \pm 1.2\%$ in group C. There was a significant difference in apoptosis rate among the 3 groups ($F = 15.69, 53.33, 48.28, P < 0.01$). (2) The expression of Bcl-2 in HepG2 cells at hour 12, 24 and 48 after transfection was $16.4\% \pm 5.0\%$, $13.4\% \pm 3.5\%$ and $8.6\% \pm 2.3\%$ in group A, $14.7\% \pm 3.8\%$, $9.1\% \pm 2.0\%$ and $4.6\% \pm 2.0\%$ in group B, and $25.3\% \pm 6.3\%$, $19.8\% \pm 4.4\%$ and $10.1\% \pm 3.8\%$ in group C. There was a significant difference in the expression of Bcl-2 among the 3 groups ($F = 6.19, 12.29, 5.81, P < 0.05$). (3) The expression of Caspase-8 at hour 12, 24 and 48 after transfection were $19.3\% \pm 2.4\%$, $27.2\% \pm 1.9\%$ and $33.7\% \pm 3.0\%$ in group A, $22.7\% \pm 2.2\%$, $30.9\% \pm 3.1\%$ and $38.2\% \pm 3.2\%$ in group B, and $1.2\% \pm 0.8\%$, $1.8\% \pm 0.6\%$ and $3.2\% \pm 1.5\%$ in group C. There was a significant difference in the expression of Caspase-8 among the 3 groups ($F = 71.54, 112.78, 101.61, P < 0.01$). **Conclusions** LIGHT gene can significantly promote cell apoptosis through regulating the expression of Bcl-2 and Caspase-8. Interferon- γ enhanced the effect of LIGHT gene on the apoptosis of HepG2 cells.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; HepG2 cells; LIGHT gene; Interferon- γ ; Apoptosis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2009.02.017

作者单位: 266003 青岛大学医学院附属医院肝胆外科(李金朋、吴力群、韩冰、卢云),中心实验室(吕振华、刘相萍、杨堃、隋爱华)

通信作者: 吴力群, Email: wulq5810@126.com

肝细胞癌居恶性肿瘤死亡原因的第 3 位, 全身化疗无效, 部分原因是由于肝癌细胞的凋亡受阻^[1-2]。本研究将 LIGHT 基因和 IFN- γ 配比转染人肝癌 HepG2 细胞, 并检测细胞凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞购自南京凯基生物科技有限公司; 超纯质粒抽提试剂盒及脂质体转染试剂购自德国 QIAGEN 公司; 细胞凋亡检测试剂盒、Mouse IgG1 Isotype Control/PE 同型标记抗体、固定液和破膜剂均购自北京市品美基因谷科技有限公司; Bcl-2、Caspase-8 鼠抗人单克隆抗体分别购自美国 Santa Cruz Biotechnology 和 Cell Signaling Technology 公司; Caspase-8 的二抗 Alexa Fluor 488 F(ab')₂ Fragment of goat anti-mouse IgG(H+L) * 2 Mouse IgG1 Isotype Control/PE 标记抗体购自美国 Molecular Probe 公司; LIGHT 基因和 IFN- γ 真核细胞表达质粒 pcDNA4C-LIGHT-cDNA、pcDNA4/HisMax-hIFN- γ 为本实验室自行构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养人肝癌 HepG2 细胞至对数生长期、80% 细胞汇合时进行实验, 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞转染: 以脂质体介导 LIGHT 基因、IFN- γ 转染肝癌 HepG2 细胞接种 6 孔板, 每孔接种细胞数为 2×10^5 , 设定转染组(单转、联合转染组)和对照组(未转染组, 加等量 PBS)各 5 个平行孔。转染步骤按 QIAGEN 公司脂质体转染试剂盒说明书进行。分别于转染后 12、24、48 h 收集细胞备用。

1.3 细胞凋亡测定

将收集的细胞用流式细胞分析仪按试剂盒说明检测细胞凋亡率, 测定凋亡因子 Bcl-2 和 Caspase-8 的表达量。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌 HepG2 细胞的凋亡情况

转染 24 h 后收集肝癌 HepG2 细胞, 处理后加入膜联蛋白 V/异硫氰酸酯及碘化丙啶荧光抗体, 荧光倒置显微镜观察可见早期凋亡的细胞膜上有绿色荧

光表达(图 1), 凋亡晚期或死亡的细胞核上有红色荧光表达(图 2)。

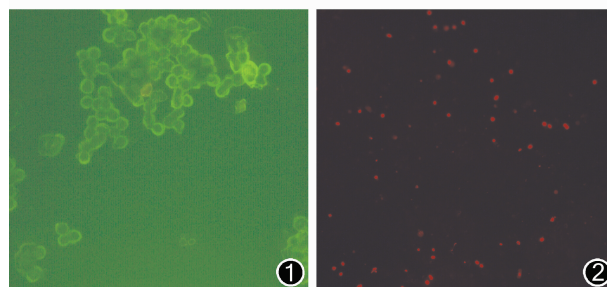


图 1 凋亡早期的肝癌 HepG2 细胞膜 膜联蛋白 V/异硫氰酸酯染色 $\times 200$ 图 2 转染后凋亡晚期的肝癌 HepG2 细胞核 碘化丙啶染色 $\times 200$

单转组转染后 12、24、48 h 细胞凋亡率分别为 $18.8\% \pm 3.5\%$ 、 $25.7\% \pm 2.8\%$ 、 $36.4\% \pm 3.6\%$; 联合转染组为 $23.8\% \pm 2.4\%$ 、 $31.1\% \pm 2.1\%$ 、 $42.5\% \pm 4.5\%$; 对照组为 $8.7\% \pm 2.1\%$ 、 $9.3\% \pm 1.6\%$ 、 $10.9\% \pm 1.2\%$ 。3 组比较差异有统计学意义($F = 15.69, 53.33, 48.28, P < 0.01$)。两两比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 凋亡因子 Bcl-2 的表达情况

单转组和联合转染组均可见肝癌 HepG2 细胞 Bcl-2 表达下调, 与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。联合转染组与单转组比较, 在 24、48 h 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组凋亡因子 Bcl-2 表达水平($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	Bcl-2		
	12 h	24 h	48 h
对照组	25.3 ± 6.3	19.8 ± 4.4	10.1 ± 3.8
单转组	16.4 ± 5.0^a	13.4 ± 3.5^a	8.6 ± 2.3^a
联合转染组	14.7 ± 3.8^a	9.1 ± 2.0^{ab}	4.6 ± 2.0^{ab}
F 值	6.19	12.29	5.81
P 值	<0.05	<0.01	<0.05

注: 与对照组比较, ^aP < 0.05; 与单转组比较, ^bP < 0.05

2.3 凋亡因子 Caspase-8 的表达情况

单转组和联合转染组均检测到凋亡因子 Caspase-8 表达的上调, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合转染组与单转组 Caspase-8 12 h 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

LIGHT 基因是 1998 年由 Mauri 发现的 TNF 超家族成员(TNFSF14), 在其生物效应中重要的是抗肿瘤作用。LIGHT 基因联合 IFN- γ 对体外肿瘤细

表 2 各组凋亡因子 Caspase-8 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	Caspase-8		
	12 h	24 h	48 h
对照组	1.2 ± 0.8	1.8 ± 0.6	3.2 ± 1.5
单转组	19.3 ± 2.4 ^a	27.2 ± 1.9 ^a	33.7 ± 3.0 ^a
联合转染组	22.7 ± 2.2 ^{ab}	30.9 ± 3.1 ^a	38.2 ± 3.2 ^a
F 值	71.54	112.78	101.61
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与单转组比较,^b $P < 0.05$

胞抑制作用的研究报道较少。熊刚等^[3]在研究 LIGHT 对食管癌细胞株 Eca109 的抑制作用时发现 LIGHT 通过其下游分子来实现其生物学效应需要一个较长的时间过程,认为单独转染 LIGHT 基因来对肿瘤进行免疫治疗的效果可能是有限的。

本实验将 LIGHT 基因和 IFN- γ 联合转染人肝癌细胞 HepG2,应用流式细胞仪来检测细胞凋亡,结果显示联合转染组各时段肝癌 HepG2 细胞凋亡率均较对照组和单转组增高,且随着时间的延长凋亡越来越明显,表明 IFN- γ 能增强 LIGHT 基因诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的效果。

Bcl-2 是滤泡性 B 细胞淋巴瘤的癌基因,它可延长细胞的存活时间,但对细胞增殖无促进作用,主要是通过抑制依赖于线粒体的凋亡途径来发挥作用。本研究结果表明,无论 LIGHT 基因单独转染还是 LIGHT 基因与 IFN- γ 联合转染均通过下调 Bcl-2 的表达来促进肝癌细胞的凋亡,以联合转染组最为显著,进一步证实 IFN- γ 能增强 LIGHT 基因诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡作用。Caspase-8 蛋白属于半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族成员,是死亡受体介导的凋亡途径中关键的启动子。我们检测到联合转染组和

单转组 Caspase-8 明显上调,但两组比较仅 12 h 差异有统计学意义,24、48 h 差异不大。表明 IFN- γ 的参与在上调 Caspase-8 表达中的作用不大。

从凋亡因子的检测结果看,LIGHT 基因单独转染促进肝癌 HepG2 细胞凋亡可能主要通过上调 Caspase-8 的表达来实现。其促进肝癌细胞凋亡的机制可能为与受体 LT β R 结合,通过募集活化 TRAF3,传递死亡信号,包括下调 Bcl-XL,诱导凋亡信号调节激酶 1 活化,发挥直接的细胞毒作用并通过 Caspase 途径诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。LIGHT 基因与 IFN- γ 联合转染诱导凋亡的作用更为明显。LIGHT 基因与 IFN- γ 联合可协同激活 Caspase-3 来使 Bcl-2 从抗凋亡的形式转变为亲凋亡的状态,并通过线粒体途径放大效应。此可能为其促凋亡的机制之一^[5]。

参考文献

- [1] Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int*, 2007, 27(2):155 - 162.
- [2] Bruix J, Hessheimer AJ, Forner A, et al. New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006, 25(27):3848 - 3856.
- [3] 熊刚, 吴蔚, 李军, 等. 重组 LIGHT-Fc 基因对食管鳞癌 Eca109 细胞生长的抑制. *中华消化外科杂志*, 2008, 7(4):307 - 309.
- [4] Rooney IA, Butrovich KD, Glass AA, et al. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(19):14307 - 14315.
- [5] Chen MC, Hsu TL, Luh TY, et al. Overexpression of Bcl-2 enhances LIGHT and Interferon- γ -mediated apoptosis in Hep3BT2 Cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(49):38794 - 38801.

(收稿日期: 2008-12-19)

(本文编辑: 毛蜀)

2009 中国普通外科焦点问题学术论坛会议通知

为了促进国内与国际普通外科学术交流,加快普通外科中青年学术交流的国际化进程,由《中华医学杂志英文版》、《中华医学杂志》、中山大学附属第三医院和兰州大学第二医院共同主办的“2009 中国普通外科焦点问题学术论坛”定于 2009 年 5 月 22 - 25 日在广东省广州市召开。会议主要就肿瘤的综合治疗、普通外科微创手术、外科感染与外科营养等热点话题进行学术探讨,学术交流形式包括大会演讲、论文展板、典型病例讨论、中青年优秀论文评比、手术录像展示等。

欢迎国内的普通外科医生参与学术交流,参会代表将获得国家级继续教育学分 8 分。参会论文请寄 800 字以内的中英文摘要,参加论文竞赛单元的作者请同时寄论文全文(中英文均可)。会议将选择参会的中英文优秀论文分别在《中华医学杂志》和《中华医学杂志英文版》上刊登。参会论文请寄至:北京市东城区东四西大街 42 号,中华医学会《中华医学杂志英文版》季媛媛收,邮编:100710。信封上注明“普外论坛征文”。欢迎通过 Email 投稿:2009fis@gmail.com。会议注册费 800 元/人。会议详细信息请访问:www.cmj.org。

论文投稿截止日期:2009 年 4 月 30 日