

# Apoptin 基因诱导视网膜母细胞瘤凋亡的研究

王 静 王元贵 梁 曼 李旭庭

## Acceleration of apoptosis by transfection of *Apoptin* gene in retinoblastoma cells

Wang Jing, Wang Yuanguai, Liang Man, Li Xuting. Department of Ophthalmology, Frontier Defence Hospital of Guangdong, Shenzhen 518029, China

**Abstract Objective** Present study aimed to observe the effects of *Apoptin* gene on killing retinoblastoma HXO-RB<sub>44</sub> cells and illustrates its mechanisms. **Methods** Human retinoblastoma cells strain, HXO-RB<sub>44</sub>, was cultured and passaged in RPMI 1640 medium containing bovine serum. *Apoptin* gene was transfected into HXO-RB<sub>44</sub> cells by liposome into HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin*, and pcDNA<sub>3</sub> was transfected in HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> group. The expression of *Apoptin* mRNA was detected using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The expression of protein of *Apoptin* and p53 were detected by SABC immunohistochemistry. The growth rate of HXO-RB<sub>44</sub> cells was studied by constructing the growth curve and calculated as the formula: inhibitory rate = 1-cell number in experiment group/cell number in control group × 100%. Cellular apoptosis was determined by flow cytometry. **Results** The RT-PCR result showed the 450 kb specific band in HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* group and absent amplification result in HXO-RB<sub>44</sub> group and HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> group. The difference in SABC-positive cell number between HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* group and control group was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The growth of HXO-RB<sub>44</sub> cells was significantly inhibited in HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* group compared with control group ( $P < 0.05$ ). Apoptosis cells increased significantly. The apoptosis rate was 38.5%. **Conclusion** *Apoptin* gene could inhibit the growth of HXO-RB<sub>44</sub> cells effectively. Up-regulation of expression of p53 gene might not be one of cell apoptosis mechanisms.

**Key words** *Apoptin* gene; retinoblastoma; apoptosis

**摘要 目的** 观察 *Apoptin* 基因对人视网膜母细胞瘤细胞株 HXO-RB<sub>44</sub> 的促凋亡作用,并探讨其可能的机制。 **方法** 用脂质体将 *Apoptin* 基因导入 HXO-RB<sub>44</sub> 细胞,通过 RT-PCR 法检测 *Apoptin* mRNA 的表达,同时用 SABC 免疫组织化学法分析 *Apoptin* 和 p53 的表达。采用细胞计数法检测细胞生长抑制率,流式细胞仪检测细胞周期的变化。 **结果** 转入 *Apoptin* 基因后, HXO-RB<sub>44</sub> 细胞的生长明显受抑制 ( $P < 0.05$ )。细胞周期分析可见凋亡峰,凋亡率为 38.5%。细胞中可见 *Apoptin* 阳性表达 ( $P < 0.05$ ), p53 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。凋亡细胞在荧光显微镜下形成凋亡小体。 **结论** 转入 *Apoptin* 基因可显著促进 HXO-RB<sub>44</sub> 细胞的凋亡, *Apoptin* 诱导的凋亡不依赖功能性 p53 的生成。

**关键词** *Apoptin* 基因; 视网膜母细胞瘤; 凋亡

分类号 R 774.01 文献标识码 A 文章编号 1003-0808(2009)11-0996-04

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,具有恶性程度高、转移快、易扩散、易复发等特点,严重危害患儿的视力及生命。对 RB 患儿的保守治疗越来越受到重视,但目前临床常用的化疗药物均会出现不同程度的毒性反应,甚至发生第二恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。因此寻找新的治疗方法成为研究的方向。细胞凋亡素 (*Apoptin*) 基因是近年来从鸡贫

血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 中分离出的一种类型独特的促凋亡基因<sup>[3]</sup>,而 p53 是细胞凋亡的重要因素。本研究目的在于观察 *Apoptin* 基因抑制 RB 细胞生长的作用,初步探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Apoptin* 基因及其真核载体 pcDNA<sub>3</sub> (深圳市人民医院刘迎博士惠赠);免疫组织化学试剂盒 (武汉博士德公司);脂质体 Dosper (德国 Boehringer Mannheim 公

司);人 RB 细胞株 HXO-RB<sub>44</sub> 购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HXO-RB<sub>44</sub> 细胞培养于含 120 mL/L 的小牛血清、100 000 U/L 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每 2~3 d 按 1:2 或 1:3 传代 1 次,取第 4~6 代供实验用。

**1.2.2 基因转染** 参照 Dospser 说明书进行,转染细胞命名为 HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin,同步设置空白组和空转 pcDNA<sub>3</sub> 组 (HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub>) 作为对照。

**1.2.3 RT-PCR 反应检测 Apoptin 的表达** 将转染的细胞按上述 3 组爬片生长 48 h 后,在逆转录酶的作用下,以 oligo-dT 为引物合成总 cDNA,以引物 (正向引物为 5' CGTCTAGAGCTTAGCCGAGAGGGGC3';反向引物为 5' CGGTCGACGAGCTCTTGCCATC3') 扩增 Apoptin 片段。

**1.2.4 Apoptin 和 p53 蛋白的表达** 采用 SABC 法,严格按试剂盒说明进行操作。切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,室温下 5~10 min 灭活内源性酶。将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0),加热至沸腾后,5~10 min 重复后冷却。滴加 5% BSA 20 min,分别滴加兔抗 Apoptin 和 p53 抗体,4 °C 过夜。TBS 洗涤,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37 °C 放置 20 min, TBS 洗涤。滴加试剂 SABC,20~37 °C 下放置 20 min, TBS 洗涤。取 1 mL 蒸馏水,分别加入 DAB 试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后至标本片上,显色 5~30 min。苏木素轻度复染,脱水、透明后封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照。用 HMIAS-2000 型医学图文分析系统对免疫组织化学染色结果进行分析处理。

**1.2.5 细胞生长速度** 将 HXO-RB<sub>44</sub>、HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin 和 HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 3 组细胞制成单细胞悬液,细胞以  $1 \times 10^7$ /L 密度接种于 96 孔板 (1 mL/孔),每隔 24 h 各取 4 孔进行细胞计数,取均值绘出细胞生长曲线。按公式:抑制率 =  $1 - \frac{\text{实验组细胞数}}{\text{空白对照组细胞数}} \times 100\%$ ,计算抑制率。

**1.2.6 细胞凋亡分析** 将上述转染的细胞培养 48 h 后,消化制成细胞悬液,PBS 漂洗,70% 冷乙醇固定,37 °C 水浴下,加 RNase A 50  $\mu$ L 作用 30 min,加入含有 5  $\mu$ g/mL 碘化丙锭的 PBS 200  $\mu$ L,4 °C 下避光染色 30 min,

流式细胞仪分析细胞周期,观察亚 G 峰。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析,定量资料多组间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 反应的结果

转染 48 h 后,利用 RT-PCR 反应检测转染细胞株中 Apoptin 的表达情况,HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin 凝胶电泳显示约 450 kb 的特异条带,而作为对照的 HXO-RB<sub>44</sub> 组及 HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 组的扩增结果为阴性 (图 1)。证明 Apoptin 得到表达。



图 1 RT-PCR 结果 M: 分子标记  
A: HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin 组 H: HXO-RB<sub>44</sub> 组 P: HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 组  
Fig. 1 The result of RT-PCR M: marker A: HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin group H: HXO-RB<sub>44</sub> group P: HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> group

### 2.2 免疫组织化学结果

HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin 组 Apoptin 表达阳性,与其他 2 组比较差异有统计学意义 ( $F = 33.108$ ,  $P < 0.05$ ), Apoptin 表达部位主要在胞浆中 (图 2,3)。转染后第 3 天阳性率最高,为 58%。HXO-RB<sub>44</sub> 组及 HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 组无阳性表达,2 组间差异无统计学意义 ( $F = 0.149$ ,  $P > 0.05$ )。说明 Apoptin 基因在细胞内成功表达。HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin 组细胞 p53 表达未明显增加,与其他 2 组比较差异无统计学意义 ( $F = 0.079$ ,  $P > 0.05$ )。

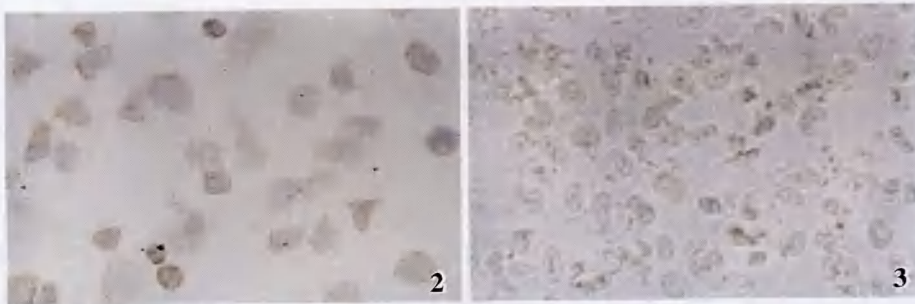


图 2 HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin 组免疫组织化学结果 HXO-RB<sub>44</sub> 细胞胞浆阳性染色呈棕黄色  
图 3 对照组免疫组织化学结果 仅有极少量 HXO-RB<sub>44</sub> 细胞胞浆有弱阳性染色

Fig. 2 There is only small numbers of weaker positive cells in control group Fig. 3 HXO-RB<sub>44</sub> cells show a brown staining in HXO-RB<sub>44</sub>/Apoptin group



### 2.3 细胞生长速度

HXO-RB<sub>44</sub>组和 HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub>组间细胞生长差异无统计学意义 ( $F = 0.583, P > 0.05$ ), HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* 组细胞生长明显受抑制, 与其他 2 组比较差异均有统计学意义 ( $F = 21.026, P < 0.05$ )。第 4 天时细胞生长抑制率最高, 达到 36% (图 4)。

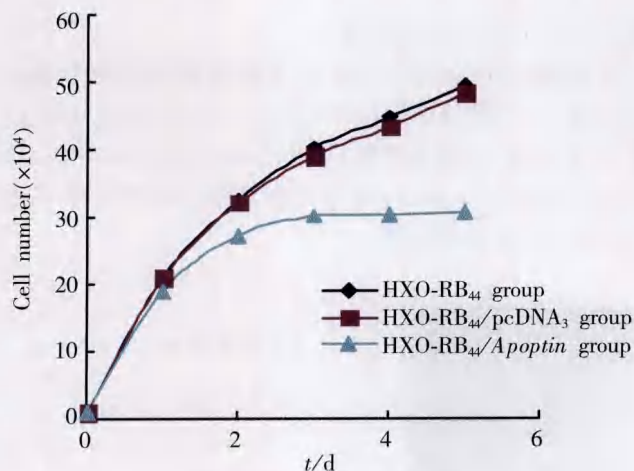


图 4 细胞生长曲线图  
Fig. 4 Growth curves of cells

### 2.4 流式细胞仪检测结果

HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* 组细胞亚 G 峰明显高尖, 显示凋亡率为 38.5%, 与 HXO-RB<sub>44</sub> 组及 HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 组比较差异均有统计学意义 (图 5, 6)。HXO-RB<sub>44</sub> 组与 HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 组间细胞的生长差异无统计学意义, 仅存在少量凋亡细胞。

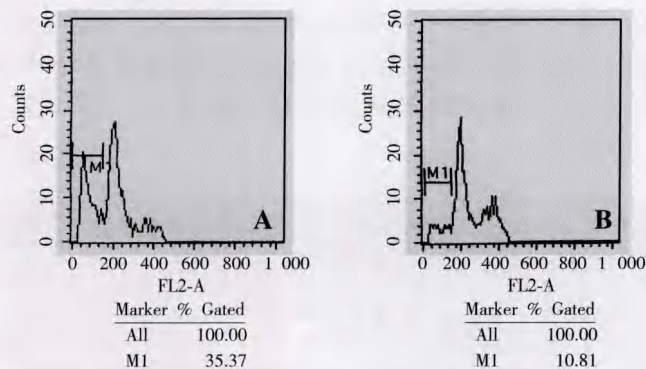


图 5 流式细胞检测结果 A: HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* 组 B: HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> 组

Fig. 5 The results of flow cytometry A: HXO-RB<sub>44</sub>/*Apoptin* group  
B: HXO-RB<sub>44</sub>/pcDNA<sub>3</sub> group

### 3 讨论

近年来, 随着基因重组及核酸序列分析、PCR 等

技术的不断应用, 极大地推动了 CAV 分子生物学的研究, 与其他凋亡相关基因不同的是: *Apoptin* 只能诱导肿瘤或表型转化细胞凋亡, 而对正常细胞无作用<sup>[4-5]</sup>。用表达 *Apoptin* 的质粒或腺病毒已成功诱导人成骨肉瘤、淋巴瘤、肾癌、肝癌等多种肿瘤细胞的凋亡。而在原代 T 细胞、脐静脉血管内皮细胞、平滑肌细胞等人体正常细胞中, 在 *Apoptin* 表达条件下, 细胞凋亡率仅与正常细胞自然凋亡水平相当。提示 *Apoptin* 诱导的细胞凋亡需要细胞具有一种致癌性表型或至少是一种恶性转化表型。Noteborn<sup>[6]</sup>报道 *Apoptin* 的独特诱导凋亡作用依赖于其在细胞内的定位, 而且不受 p53 家族的调控。在正常细胞 *Apoptin* 基因仅于胞浆表达, 而在肿瘤细胞中它转移到核内。关于 *Apoptin* 基因核转移的机制国际上尚无定论<sup>[7-8]</sup>, 可能与核染色质超螺旋作用导致 DNA 固缩和碎裂, 也可能作为一种转录调节因子导致参与凋亡过程的某些基因的表达。

在肿瘤治疗中, 许多化学治疗性复合物和同位素辐射是通过野生型 p53 诱导肿瘤细胞凋亡的, 但大多数肿瘤在其发展中却往往发生 p53 突变, 从而影响治疗的效果。研究证明凋亡蛋白诱导肿瘤细胞凋亡过程并不涉及到产生野生型 p53 的过程, 也不被 BAG-1、Bcr-abl 的生成所抑制, 甚至不受凋亡抑制因子 bcl-2 过分产生的影响<sup>[9]</sup>。利用可表达不同 p53 状态的骨肉瘤细胞系 (产生野生型 p53 的 U20s 细胞, 不产生 P53 的 Saos-2 细胞和产生突变型 p53 的 Saos-2/ala143 细胞) 研究凋亡蛋白的抗癌效应时, 发现这些细胞对凋亡蛋白诱导的凋亡具有相同的敏感性, 表明凋亡蛋白诱导肿瘤细胞凋亡过程并不涉及到产生野生型 p53 的过程<sup>[10-11]</sup>。此外还发现, 凋亡蛋白诱导的凋亡也不受抑制性凋亡因子 bcl-2、bcr-abl 和一种与 bcl-2 相关的蛋白 BAG-1 生成的影响<sup>[12-13]</sup>。为进一步证实这种不依赖 p53 的方式并不是 Saos-2 细胞所特有的<sup>[14]</sup>, 有学者研究了凋亡蛋白在 p53 阴性的人肝癌细胞 Hep3B 中的生成效应, 发现凋亡蛋白可同样有效地诱发这种细胞的凋亡。

本实验结果表明, 转入 *Apoptin* 基因可有效抑制人 RB 细胞株 HXO-RB<sub>44</sub> 体外生长。基因转入后, RB 细胞凋亡增多, 细胞凋亡率随时间的延长而增加。同时, 导入 *Apoptin* 基因的 RB 细胞 p53 的表达无明显减少, 表明 *Apoptin* 诱导凋亡的作用不受 p53 生成的影响。值得关注的是, 凋亡蛋白诱导肿瘤细胞凋亡与这些细胞表达的 p53 状态无关。以上研究表明, 凋亡蛋白在肿瘤治疗中所具有的巨大潜力, 深入研究可望开辟一条崭新的抗肿瘤途径。 *Apoptin* 的这些特性使之可被



用作一种治疗因子,只要它在体内能被大量传递给肿瘤细胞,就可选择性地将其根除。这一基因治疗策略超越了目前所有基因治疗方法,可能会给 RB 的基因治疗带来广阔的治疗前景。

## 参考文献

- 1 Harbort JW. Molecular basis of low penetrance retinoblastoma[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119: 1699 - 1074
- 2 Munier FL, Verwey J, Pica A, et al. New developments in external beam radiotherapy for retinoblastoma: from lens to normal tissue-sparing techniques[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2008, 36: 782 - 789
- 3 de Smit MH, Niteborn MH. Apoptosis-inducing proteins in chicken anemia virus and TT virus[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 331: 131 - 149
- 4 Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, et al. Cancer-selective therapy of the future: apoptosis and its mechanism of action[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5: 10 - 19
- 5 Zur Hausen H, de Villiers EM. TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties[J]? Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 331: 109 - 116
- 6 Niteborn MH. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms[J]. Vet Microbiol, 2004, 98: 89 - 94
- 7 Leliveld SR, Zhang YH, Rohn JL, et al. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 9042 - 9051
- 8 Liu Q, Fu H, Xing R, et al. Survivin knockdown combined with apoptin overexpression inhibits cell growth significantly[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7: 1053 - 1060
- 9 Guelen L, Paterson H, Gaken J, et al. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23: 1153 - 1165
- 10 Janssen K, Hofmann TG, Jans DA, et al. Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies[J]. Oncogene, 2007, 26: 1557 - 1566
- 11 Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE, et al. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53[J]. Genes Dev, 2004, 18: 1952 - 1957
- 12 Burek M, Maddika S, Burek CJ, et al. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent[J]. Oncogene, 2006, 25: 2213 - 2222
- 13 Natesan S, Kataria JM, Dhama K, et al. Anti-neoplastic effect of chicken anemia virus VP3 protein (apoptin) in Rous sarcoma virus-induced tumours in chicken[J]. J Gen Virol, 2006, 87: 2933 - 2940
- 14 Leliveld SR, Dame RT, Rohn JL, et al. Apoptin's functional N- and C-termini independently bind DNA[J]. FEBS Lett, 2004, 557: 155 - 158

(收稿: 2008-12-25 修回: 2009-09-29)

(本文编辑: 尹卫靖)

## · 临床经验 ·

# 经结膜 Müller 肌分离术矫正甲状腺相关眼病上睑回缩

张虹 张洁 汪东 宋国祥

甲状腺相关眼病(TAO)是常见的眼眶疾病,患者常由于眼睑回缩、眼球突出、眼眶软组织水肿、暴露性角膜炎而致眼部不适及视力下降。上睑回缩是该病常见的体征之一,与交感神经支配的 Müller 肌收缩有关,患者呈凝视状态,严重影响外观,还可由于睑裂闭合不全、角膜结膜暴露导致疼痛和视力减退。以往矫正上睑回缩的方法包括胍乙啶滴眼液点眼、注射肉毒杆菌 A 毒素、Müller 肌切除术、提上睑肌延长术等。我们应用 Müller 肌分离术矫正 TAO 引起的上睑回缩,报告如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2006—2008 年因 TAO 上睑回缩行 Müller 肌分离术患者 10 例进行临床分析,其中男 3 例,女 7 例;年龄

22~65 岁,平均 37 岁。术前检查患者视力、眼球突出度、有无睑裂闭合不全和暴露性角膜炎。以上睑缘至角膜上缘的距离为标准详细记录上睑回缩程度,1~2 mm 为轻度回缩,3~5 mm 为中度回缩,>5 mm 为重度回缩。

**1.2 手术方法** 上睑缘和上穹隆结膜下 2% 利多卡因和 1% 肾上腺素局部浸润麻醉,上睑缘做一牵引线,以眼睑拉钩翻转上睑。自睑板上缘做一结膜切口,于 Müller 肌和其下方的提上睑肌腱膜之间分离,根据上睑回缩程度决定分离深度。翻转上睑,观察上睑缘位置及形状,直至双侧眼睑对称。术后随访 1~28 个月,平均 12 个月。

## 2 结果

10 例上睑回缩患者行 Müller 肌分离术,均为单侧,左、右眼各 5 例。术前轻度上睑回缩 3 例,中度 5 例,重度 2 例。睑裂闭合不全 8 例,暴露性角膜炎 5 例。视力 0.4~0.7 者 1 例,0.8~1.0 者 5 例,>1.0 者 4 例。眼球突出度测量,患眼较对侧眼突出 <2 mm 者 5 例,2~3 mm 者 5 例。

10 例患者术后视力、眼球突出度均无改变,8 例睑裂闭合不全改善,暴露性角膜炎好转 2 例,痊愈 3 例。上睑回缩矫正程度观察表明,上睑缘遮盖角膜上缘 1~2 mm(图 1~3)。



图 1 TAO 患者轻度上睑回缩 A: 右上睑回缩,上睑缘位于角膜上缘 1 mm B: 术后双上睑缘位置及睑裂形状对称