

# 天花粉蛋白基因的克隆及其诱导 大肠癌细胞 *LoVo* 凋亡的作用

高德富<sup>1</sup>△ 王保奇<sup>1</sup> 曹国梅<sup>2</sup> 张小莉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河南中医学院基础医学院生物学教研室 郑州 450008; <sup>2</sup>郑州旅游职业学院基础部 郑州 450009)

**【摘要】 目的** 克隆天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)基因及研究重组 TCS 诱发大肠癌细胞 *LoVo* 凋亡的作用。**方法** RT-PCR 法克隆 TCS 基因的 cDNA 序列并表达纯化 TCS; MTT 法测定 TCS 对 *LoVo* 细胞生长抑制作用,评估 TCS 体外诱导 *LoVo* 凋亡的作用;琼脂糖凝胶电泳法进行细胞凋亡 DNA 分析。**结果** 成功克隆了 TCS 基因, TCS 对 *LoVo* 细胞体外生长具有抑制作用, DNA 电泳呈梯状条带,表明 TCS 对 *LoVo* 细胞确实存在诱导凋亡作用, TCS 对 *LoVo* 细胞半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 45.0 μg/mL。**结论** TCS 体外能抑制 *LoVo* 细胞生长并诱导细胞凋亡,为今后 TCS 应用于大肠癌的临床治疗提供了重要的实验依据。

**【关键词】** 天花粉蛋白; *LoVo* 细胞; 细胞凋亡

**【中图分类号】** Q 343 **【文献标志码】** A

## Cloning of trichosanthin gene and its induction effects on the apoptosis of colorectal carcinoma *LoVo* cell

GAO De-fu<sup>1</sup>△, WANG Bao-qi<sup>1</sup>, CAO Guo-mei<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-li<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Medical Biology, College of Basic Medical Sciences, Henan Institute of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Basic Foundation, Zhengzhou Tourism College, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

**【Abstract】 Objective** To clone cDNA of trichosanthin (TCS) and purify TCS, and to study its influence on apoptosis and growth inhibition of colorectal carcinoma *LoVo* cells *in vitro*. **Methods** MTT assay was adopted to measure the growth inhibition ratio of *LoVo* cells treated with TCS, and apoptosis was assayed by agarose gel electrophoresis. **Results** The results showed that the higher concentration of TCS and the longer testing time, the stronger growth inhibition of *LoVo* cells. DNA agarose gel electrophoresis showed a gradient, which confirmed that TCS could induce the apoptosis of *LoVo* cells. **Conclusions** TCS can inhibit the growth of *LoVo* cells *in vitro* and induce its apoptosis. Our study provides evidence for the application of TCS in clinical treatment of human colorectal carcinoma.

**【Key words】** trichosanthin; *LoVo* cell; cell apoptosis

天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)是中药天花粉的有效成分,是从葫芦科植物栝蒌的块根中提取出来的一种单链核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIP),具有 RNA N-糖苷酶活性。主要有引发中期流产、抑制人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)增殖、调节人体免疫功能等多方面的作用<sup>[1]</sup>。TCS 能直接作用于滋养层合体细胞,引起细胞的变性坏死,进而引发中期流产<sup>[2]</sup>。TCS 是一种有效并具有专一性的抗肿瘤药

物,与一般化疗药物造成的肿瘤细胞和正常细胞两败俱伤的作用不同,它对人的外周血淋巴细胞、T 细胞和羊膜细胞等正常体细胞影响极小<sup>[3,4]</sup>。研究表明,许多抗癌药物是通过最终引发肿瘤细胞凋亡而达到治疗的目的。本实验旨在用分子生物学手段,建立稳定的具有一定蛋白产率的大肠埃希菌原核表达系统,克隆表达并纯化天花粉蛋白,研究天花粉蛋白在体外对 *LoVo* 细胞增殖的抑制作用和诱导凋亡效应,以促进天花粉蛋白在肿瘤治疗上的应用。

△Corresponding author E-mail:gdf2003@126.com

## 材 料 和 方 法

**材料** 天花粉为新品种牛心栝楼天花粉,产自浙江省。ExTaqDNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司),表达载体 pET32a 和 BL21(DE3)菌种由本实验室保存;PCR 引物(大连 TaKaRa 生物技术有限公司合成)。

**试剂** 新生牛血清(杭州四季青公司)、DMEM、胰蛋白酶(Invitrogen 公司);MTT (Sigma 公司);pBR322、DH5 $\alpha$  为本室保存;荧光染料 Hoechst 33258、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI) (Sigma 公司)。

**细胞株** 人大肠癌细胞 LoVo 由郑州大学公共卫生学院卫生毒理学教研室传代并保存。

**MTT 溶液** 用 PBS 溶解 MTT,配制成 5 mg/mL 的溶液,过滤除菌后,棕色瓶 4℃ 保存;Hoechst 33258 染液:用 PBS 将 Hoechst 33258 配制成 50  $\mu$ g/mL 的贮藏液,贮于棕色瓶 4℃ 避光保存备用。

**天花粉总 RNA 的提取** 采用 Plant reagent concert 试剂,按使用说明从天花粉中提取总 RNA,进行总 RNA 的鉴定。

**TCS 基因的 cDNA 克隆** 根据已发表的 TCS 基因序列(基因登录号为 M34858)设计了如下 1 对特异性引物:上游引物为 5'-GCGAATTCATGATCAGATTCTTAGTCCTCTC-3',引入酶切位点 *EcoR* I,下游引物为 5'-GCCTCGAGACTAAATAGCATAACTTCC-3',引入酶切位点 *Xho* I。采用一步法 RT-PCR 合成目的基因,操作过程按 TaKaRa 一步法 RT-PCR 试剂盒推荐的程序进行。把扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离后回收,将回收后的 PCR 产物连接到 pMD18 载体,通过菌液 PCR 进行鉴定后的重组体进行 DNA 测序鉴定。

### pET-28a-TCS 在 BL21 (DE3) 中的表达和纯化

为使 TCS 的成熟蛋白(相对分子质量 30 000)能以融合表达的方式在大肠埃希菌中表达,PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切消化克隆到 PET-32a 载体中,构建重组质粒,将其命名为 PET-VP1,PCR、酶切分析和测序验证。挑取阳性重组菌落在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中培养至  $D_{600}$  达到 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,28℃ 进行诱导表达。收集 IPTG 诱导前和诱导后 5 h 的菌液,用于 SDS-PAGE 电泳鉴定和蛋白纯化。产物经 Ni 离子纯化柱纯化、复性。用 PBS 对纯化的 TCS 蛋

白进行透析后用于肿瘤生长抑制实验。

**TCS 对 LoVo 细胞生长抑制作用** TCS 对 LoVo 细胞株的体外生长实验由 48 微孔板 MTT 法测定。将处于对数生长期 LoVo 细胞悬液以每孔 200  $\mu$ L (10<sup>4</sup> 个/mL) 接种在 48 孔板上,细胞贴壁后换 0.5% DMEM 培养液同步培养 56 h,再换用 10% DMEM 培养液或处理液,分实验组和对照组,加入 TCS,其浓度按:20、40、60、80、100、120、140、160、180 和 200  $\mu$ g/mL,由低到高依次加入,每一浓度设 4 个复孔,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 48 h。每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h 后终止培养。小心吸去孔内培养液,每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。以等体积 DMSO 调零,未处理组为对照,振荡 5 min 后用酶标仪于 492 nm 波长下比色。计算化合物对肿瘤细胞的抑制率,绘制生长抑制曲线并测出其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。细胞生长抑制率由下列公式计算:细胞生长抑制率(%) = (1 -  $D_{\text{treated}}/D_{\text{control}}$ ) × 100。该实验每个细胞株重复 4 次,每次每个浓度各设 4 个平行孔,取 4 次实验结果的均值进行统计分析。

**TCS 引起的肿瘤细胞凋亡核形态的观察** 将各种细胞制成细胞爬片,用 PBS 洗涤细胞 3 次,将细胞用细胞固定液固定 10 min, PBS 洗涤 3 次,用 5  $\mu$ g/mL Hoechst 33258 染色 10 min,室温 500 g 5 min 收集细胞,再用 PBS 洗涤细胞 1 次。用少量封片液悬浮细胞,涂片后置荧光显微镜下观察并拍照。

**DNA 凝胶电泳** 以 105 个/mL 的密度接种 LoVo 细胞至一块 6 孔板上,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的湿润培养箱中培养,至对数生长期时,分别加入等体积不同浓度的 PMBE 处理液或培养液(对照),培养至 12、24、48、72 h 时,分别以 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞,以 1 × PBS 低速离心(1 000 r/min)2 次,每次 10 min。细胞沉淀以 40  $\mu$ L PC 缓冲液(0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.1 mol/L Citric acid = 24:1)室温孵育 1 h 后,480 r/min 离心 30 min,上清转入相应的 1.5 mL 微量离心管中,分别加入 3  $\mu$ L NP-40(2.5 mg/mL)和 3  $\mu$ L RNaseA (10 mg/mL),37℃ 孵育 1 h 后,再分别加入 3  $\mu$ L 蛋白酶 K(10 mg/mL),并于 50℃ 孵育 50 min。反应结束后,各取 10  $\mu$ L 与 2  $\mu$ L 6 × loading buffer 均匀混合,用含 0.5  $\mu$ g/mL EB 的 1% Agarose gel 进行电泳,1 × TAE,120 V 出孔,75 V 恒压电泳 1.5 h。凝胶成像分析系统(美国 BIO-RAD 公司)观察拍照。

### Northern blot 检测 *Bcl-2* 和 *Bax* 基因的表达

取对数生长期的 *LoVo* 细胞分别以  $5 \times 10^5$  个/瓶的密度接种于 75 mL 培养瓶,加入 10 mL 0 或 40 mg/L MAP30 处理液,收集处理 0~120 h 的细胞提取细胞的总 RNA,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。42  $^{\circ}\text{C}$  预杂交 4 h,用[32P]dCTP (China Isotope 公司)标记 *Bcl-2* 和 *Bax* 基因 cDNA 探针后 42  $^{\circ}\text{C}$  杂交 20 h,洗膜后用 X 光片 (Kodak, Rochester, NY) 压片 3~7 d。 $\beta$ -actin 作为内参。

### Western blot 检测 *Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白的表达

取同代生长的 *LoVo* 细胞分别以  $5 \times 10^5$  个/瓶的密度接种于 75 mL 培养瓶,加入 10 mL 浓度为 40 mg/L MAP30 处理液,对照组不加药物,培养 72 h,用胰蛋白酶法收集细胞,1 000 r/min 离心收集提取细胞总蛋白及二辛可宁酸法 (bicinchoninic acid, BCA 法)测蛋白浓度,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。取 30  $\mu\text{g}$  蛋白样品,稀释到 25  $\mu\text{L}$ ,加入等体积  $2 \times$  上样缓冲液,沸水浴变性 5 min,将总蛋白在 SDS-PAGE 胶上分离,接着将总蛋白转移到 PVDF 膜 (Pall),封闭,4  $^{\circ}\text{C}$  下用一抗 (按 1:1 000 稀释)轻摇孵育过夜,室温下把膜封闭在 HRP 标记的二抗 (1:2 000 的效价稀释)杂交液中轻摇孵育 1 h,进行信号检测。

**数据分析** 数据采集和处理采用 SPSS 13.0 软件,结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示 ( $n=3$ );插图采用 Origin7.0 软件绘制。

## 结 果

**天花粉总 RNA 的提取与鉴定** 采用 Plant reagent concert 试剂按使用说明从天花粉中提取总 RNA,其  $D_{260}/D_{280}$  为 1.92,取 1  $\mu\text{g}$  RNA 进行甲醛变性胶电泳,溴化乙锭染色后可见 28 S 和 18 S 条带明显,且两者之比大于 2 (图 1),这说明所获得的 RNA 样品的质量良好,无 DNA、蛋白质及小分子污染,总 RNA 在提取过程中未降解,符合继续实验的要求。纯度已达到了反转录实验的要求,可用于合成 cDNA。

### 天花粉 TCS 基因 cDNA 的克隆、表达和纯化

以重组质粒为模板,用合成的引物对 TCS 基因进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测可见到 850 bp 左右的目的片段,与预期大小一致。将测得的基因序列在 NCBI 上进行 BLASTN 分析,发现与基因登录号为 M34858 的基因的核苷酸序列相差 2 个碱基。分别是 428 位的 A 变为 G 和 663 位的 A 变为 G,这些差异未导致保守氨基酸的改变。TCS 基因 cDNA 的整个可译框被克隆进

原核表达载体 pET28a 中。转化重组质粒后的 BL21 (DE3) 菌株以 1 mmol/L IPTG 诱导收集菌液,进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,可观察到约在相对分子质量 25 000 处有明显可见的条带,与预期大小相一致 (图 2)。

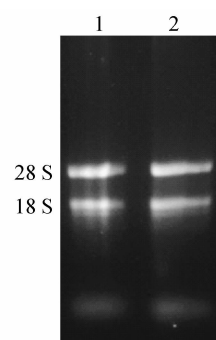


图 1 天花粉总 RNA 甲醛变性琼脂糖电泳图

Fig 1 Electrophoretic analysis of total RNA by a denaturing formaldehyde agarose/EB gel

1 and 2: Total RNA of two repetitions

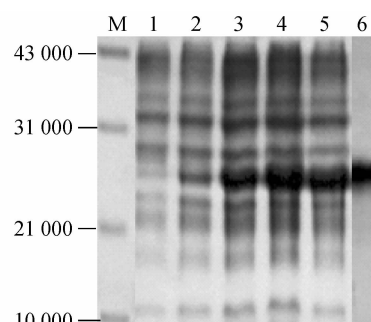


图 2 大肠埃希菌表达的 TCS 和经过纯化后的 TCS 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig 2 SDS-PAGE of expression and purification of TCS in *E. coli*

Samples were separated on a 12% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Brilliant Blue. M: Molecular mass protein markers; Lanes 1-2: Cell lysates respectively from *E. coli* strain BL21 (DE3)/pET28a and BL21 (DE3)/pET28a-TCS without IPTG induction; Lane 3-5: Cell lysates from *E. coli* BL21 (DE3)/pET 28a-TCS, with 0.2, 0.4, 0.6 mmol/L IPTG induction; Lane 6: Purified TCS by immobilized metal affinity chromatography from *E. coli*.

**TCS 对肿瘤细胞 *LoVo* 生长的抑制** 使用 120、100、80、60、40、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度梯度,测得 TCS 对人大肠癌 *LoVo* 细胞的生长抑制曲线 (图 3)。80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TCS 处理 *LoVo* 细胞 24、36、48 和 72 h 的抑制率分别为 14.7%、22.6%、25.2% 和 27.2%。结果显示,TCS 对 *LoVo* 细胞体外生长的抑制呈现浓度和时间依赖的特点。

**TCS 引起肿瘤细胞凋亡的分析** 染色后对照组细胞细胞膜完整,细胞核为圆形,染色均匀。而 *LoVo* 细胞经 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TCS 处理 24 h 后,大部分

细胞发生了凋亡,核形态呈现固缩或不规则、边集、分裂,核凝聚变小,有的细胞核已碎裂为诸多小块(图 4)。

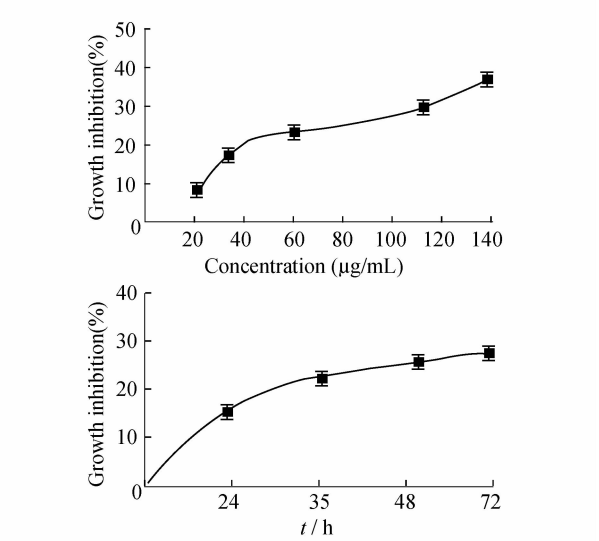


图 3 TCS 对肿瘤细胞生长抑制曲线(MTT 法)  
Fig 3 Cytotoxic analysis of to LoVo by the MTT method

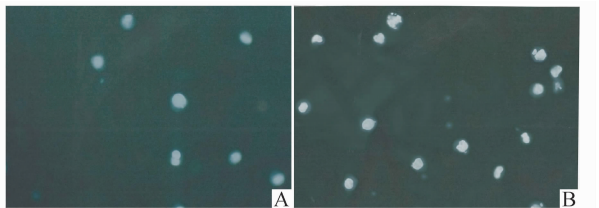


图 4 TCS 引起的 LoVo 细胞凋亡核形态观察(×100)  
Fig 4 The nuclei of the apoptotic cells (LoVo) induced by the TCS stained by Hoechst 33258 (×100)  
A: The untreated control LoVo cells; B: LoVo cells incubated with 20 μg/mL TCS for 24 h

TCS 处理对染色质结构的影响 图 5 表示 20 μg/mL TCS处理LoVo细胞不同时间后,对其染色

质结构的影响。凋亡发生时,细胞内特异的核酸内切酶被激活,切断核小体之间的 Linker DNA,导致凝胶电泳时会出现大小约等于 180~200 bp 整数倍的 DNA 梯形条带,此乃细胞凋亡典型的生化特征。从图中可见,对照组细胞中,无核小体之间连接 DNA 被切割现象发生,而实验组细胞核小体之间的连接 DNA 均发生了不同程度的断裂,且呈现出一定的时间依赖性。LoVo 细胞分别经 20 μg/mL 的 TCS 诱导 12、24、48 h,提取 DNA 后进行凝胶电泳结果显示,相同 TCS 浓度诱导,凋亡条带随着诱导时间延长愈加明显。

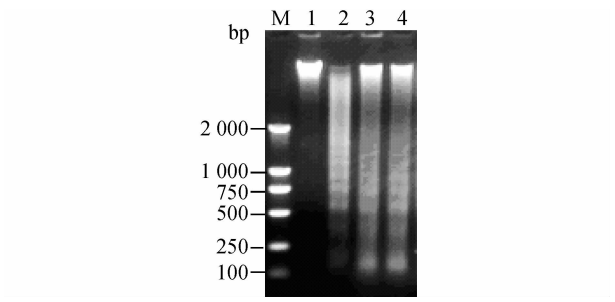


图 5 TCS 对 LoVo 细胞染色质结构的影响  
Fig 5 Electrophoresis pattern of DNA fragments of LoVo cells treated with TCS  
M: Marker DL2000; Lane 1: Contro 0 μg/mL TCS for 24 h; Lane 2-4: 20 μg/mL respectively for 12, 24 and 48 hours

Northern blot 和 Western blot 检测凋亡相关基因和蛋白的表达 在浓度为 40 mg/L 的 MAP30 处理下,随着处理时间的增加 TCS 能抑制 Bcl-2 基因的表达而上调 Bax 基因的表达(图 6A)。Western blot 进一步测定 MAP30 处理对 LoVo 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响,经过 40 mg/L TCS 处理后 Bcl-2 蛋白的表达比阳性对照组有显著下降,Bax 蛋白随着处理时间的增加而有所增加(图 6B)。

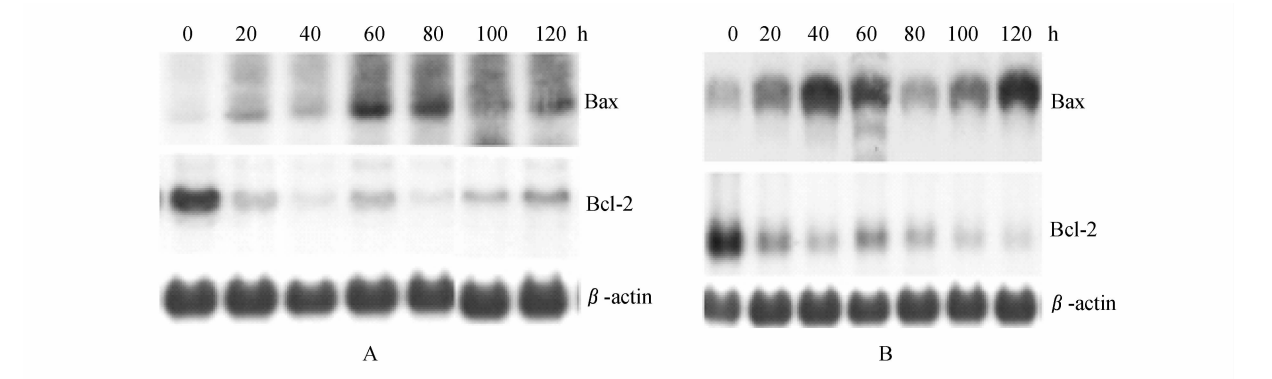


图 6 Northern blot 和 Western blot 分析凋亡相关基因和蛋白的表达  
Fig 6 Analysis of apoptosis-related genes and protein by Northern blot and Western blot  
The mRNAs and proteins expression of Bcl-2 and P<sub>53</sub> was detected by Northern blot (A) and Western blot (B) at indicated times in presence of 40 mg/L TCS treatment. β-actin served as the internal control.

讨 论

肿瘤疾病已成为仅次于心血管疾病的世界第二号“杀手”,从天然物中草药中筛选抗癌新药已成为近年来抗癌药物研发的热点<sup>[5-8]</sup>。初步研究发现天花粉蛋白能通过抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、提示其在抗肿瘤方面具有广阔的应用前景。

本实验将天花粉蛋白处理人大肠癌 *LoVo* 细胞后,*LoVo* 细胞的生长受到明显抑制,出现凋亡的特征性改变:染色体凝聚、核碎裂等形态改变,凝胶电泳呈现典型的梯级格局,这些结果表明天花粉蛋白能抑制 *LoVo* 细胞增殖,诱导人大肠癌 *LoVo* 细胞发生凋亡,为天花粉蛋白的开发和临床应用提供了有力的依据。

参 考 文 献

[1] 汪猷,金善炜. 天花粉蛋白[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2000:

1-444.

[2] 潘学田,彭名炜,罗仁,等. 中国药品实用手册[M]. 北京:石油工业出版社,2000;379-380.

[3] 毕黎琦,李洪军,张华. 中药天花粉蛋白对黑色素瘤细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中西医结合杂志,1998,18(1):35-37.

[4] 周广宇,汪丽,毕黎琦,等. 天花粉蛋白对人 PBMC 分泌细胞因子水平及离子通道的影响[J]. 中国免疫学杂志,2001,17(12):650-652.

[5] Dunne AL,Price ME,Mothersill C,*et al.* Relationship between clonogenic radiosensitivity. Radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells[J]. *Br J Cancer*,2003,89(12):2 277-2 283.

[6] Dou CM,Li JC. Effect of extracts of trichosanthes root tubers on HepA-H cells and HeLa cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2004,10(14):2 091-2 094.

[7] 张曙,胡梅洁,吴裕祈,等. 天花粉蛋白诱导的胃癌细胞凋亡与 Bcl-2 表达下降有关[J]. 中华消化杂志,2000,20(6):380-382.

[8] 唐文皓,吴志全,樊嘉,等. 天花粉蛋白对荷人肝癌裸小鼠的抑癌作用[J]. 中华肝胆外科杂志,2003,9(4):228-230.

(收稿日期:2009-05-11;编辑:王蔚)

(上接第 130 页)

[4] 贾晓凡,张木勋,郭伟,等. 定量感觉检查对糖尿病周围神经病变的诊断价值[J]. 中华物理医学与康复杂志,2005,27(10):610-613.

[5] 缪秀珍,陈君秋. 糖尿病下肢震动感觉阈值检查 186 例分析[J]. 实用糖尿病杂志,2008,4(2):36-37.

[6] 宋玉强,邹宏丽,阎文静,等. 糖尿病性周围神经病的定量感觉检查[J]. 临床神经电生理学杂志,2007,16(1):30-32.

[7] 项曼,杨虹,俞海燕. 振动觉阈值检查对周围神经病变的诊断价值[J]. 实用糖尿病杂志,2007,3(3):37.

[8] Ford ES,Giles WH. A Comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions [J]. *Diabetes Care*,2003,26(3):575-581.

[9] Abbott CA,Vileikyte L,Williamson S,*et al.* Multicenter study of the incidence of and predictive risk factors for diabetic neuropathic foot ulceration[J]. *Diabetes Care*,1998,21(7):1 071-1 075.

[10] Viswanathan V, Snehalatha C, Seená R, *et al.* Early

recognition of diabetic neuropathy: evaluation of a simple outpatient procedure using thermal perception[J]. *Postgrad Med J*,2002,78(923):541-542.

[11] Inami K,Chiba K,Toyama Y. Determination of reference intervals for vibratory perception thresholds of the lower extremities in normal subjects[J]. *J Orthop Sci*,2005,10:291-297.

[12] Quattrini C, Jeziorska M, Malik RA, *et al.* Small fiber neuropathy in diabetes: clinical consequence and assessment [J]. *Int J Low Extrem Wounds*,2004,3:16-21.

[13] Bansal V, Kalita J, Misra UK. Diabetic neuropathy [J]. *Postgrad Med J*,2006,82:95-100.

[14] Chéliout-Hérait F,Zrek N,Khemliche H,*et al.* Exploration of small fibers for testing diabetic neuropathies[J]. *Joint Bone Spine*,2005,72(5):412-415.

(收稿日期:2009-03-11;编辑:张秀峰)