

N-ras mRNA 及 P^{21ras} 表达降低, 软琼脂培养能力下降^[7]. 本实验进一步表明, 反义 N-ras₁ 也可抑制 BIU-87 细胞中 VEGF mRNA 的表达. 有关反义癌基因抑制肿瘤细胞中 VEGF 基因表达的机理尚待研究.

参 考 文 献

- 1 Ferrara N, Henzel W J. Biochem Biophys Res Commun, 1989; **161**: 851
- 2 Wouck K A, Ferrara N, Winer G *et al.* Mol Endocrinal, 1991; **5**: 1806
- 3 Ferrara N, Winer J, Burton T *et al.* J Clin Invest, 1993; **91**: 160
- 4 Senger D R, Galli S J, Dvorak A M *et al.* Science, 1983; **219**: 983
- 5 Kim K J, Li Bing, Winer J *et al.* Nature, 1993; **362**: 841
- 6 Chomczynski P, Sacchi N. Analytical Biochem, 1987; **162**: 156
- 7 李惠芳, 周爱儒. 中华泌尿外科杂志, 1994; 待发表
- 8 葛正龙, 周爱儒. 生物化学杂志, 1992; **8** (5): 565
- 9 Breier G, Albrecht U, Sterrer S *et al.* Development, 1992; **114**: 521
- 10 Berkman R A, Merrill M J, Reinhold W C *et al.* J Clin Invest, 1993; **91**: 153
- 11 Kim K J, Li Bing, Winer J *et al.* Nature, 1993; **362**: 841

TGF α 反义寡聚核苷酸对膀胱癌 BIU 87 细胞株的作用*

孙丛梅 王 东 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

摘要 报道了23碱基组成的TGF α 反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸对人膀胱移行细胞癌BIU87细胞增殖及其TGF α mRNA表达的作用. 结果表明: TGF α 反义寡聚核苷酸抑制体外培养的BIU 87细胞的增殖、DNA合成和TGF α mRNA的表达, 进一步证明了TGF α 在BIU 87细胞恶性增殖中的重要作用.

关键词 寡聚核苷酸, 转化生长因子 α , BIU 87细胞株, 反义寡聚核苷酸

转化生长因子(transforming growth factor α TGF α)与癌细胞的关系十分密切. 在人的多种肿瘤组织, 癌细胞及转化细胞如涎腺癌细胞株^[1]、放射线转化细胞^[2]、肾癌组织中均发现有TGF α 的高表达. TGF α 最主要的生物学功能是促进细胞转化, 在肿瘤发生与发展中起重要作用. BIU 87细胞株是我国以人膀胱乳头状移行上皮癌组织体外传代建立, 并能在体外长期传代培养的细胞株. 经各项鉴定表明有恶性细胞特性^[3]. 本实验室已对BIU 87细胞中TGF α 的表达和正调控进行了研究, 结果表明: BIU 87细胞中TGF α mRNA有较高表达. 并与肿瘤恶性增殖有关^[4].

尽管对TGF α 及其表达调控促进因素的研究进行了大量工作, 但对TGF α 表达调控中抑

制因素的研究尚缺乏直接证据. 反义寡聚核苷酸以其作用的特异性而具备明显的优越性. 目前已对CSF-1^[5], bFGF^[6], TGF β ^[7]设计了有效的反义寡聚核苷酸, 通过抑制这些生长因子的表达而抑制了肿瘤的发生、发展. 但有关TGF α 表达的研究尚未见报道. 本文以BIU 87细胞株为对象, 合成了23碱基组成的TGF α 反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸, 并研究了其对细胞生长、DNA合成以及TGF α mRNA表达的作用, 旨在进一步揭示TGF α 在BIU 87细胞恶性增殖中的重要作用, 为肿瘤基因治疗提供实验基础.

自然科学基金和国家教委博士点基金项目.

收稿日期: 1993-11-04, 修回日期: 1994-03-05

1 材料和方法

1.1 材料

TGF α cDNA 探针由中国科学院上海生化所提供; RPMI 1640 为 Sigma 产品; α -³²P-dCTP 为 Free 产品; HPLC 所用乙腈为光谱纯试剂, 其余试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 细胞培养

BIU 87 细胞株由北京医科大学泌尿所提供, 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 小牛血清 65℃, 1h 灭活。

1.3 寡聚核苷酸的合成与纯化

TGF α 反义寡聚核苷酸与 TGF α cDNA 前 6 个密码子及其上游部位共 23 个碱基互补, 序列为 5'-TCC AGC CGA GGG GAC CAT TT-TAG-3'; 对照寡聚核苷酸的碱基数目及含量比例与反义寡聚核苷酸相同, 但与 TGF α cDNA 无互补性, 为 5'-GAT GAT TAC GTA ACT GGC CCGCG-3'。以上寡聚核苷酸均由 381A 型 DNA 自动合成仪合成。

寡聚核苷酸采用高压液相仪 5000 型反相 C18 柱纯化。A 液为 100mmol/L 乙酸溶液, B 液为乙腈。以 10%—17% 乙腈梯度洗脱, 样品收集波长为 254nm。纯化后的样品经冷冻干燥, 过滤除菌, 直接加入细胞培养液中与细胞共同孵育。

1.4 细胞生长抑制实验

取指数生长期 BIU 87 细胞, 胎盘蓝染色计数, 观察细胞存活率 (大于 95%)。然后在与细胞计数平行的 24 孔培养板中分别加入含 2 μ mol/L, 4 μ mol/L, 8 μ mol/L 的反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸的培养液, 培养 12, 24, 48h 后进行胎盘蓝染色细胞计数, 以下式计算生长抑制率: $\frac{N_n - N}{N_n} \times 100\%$ N 为处理后细胞计数, N_n 为未处理细胞计数。

1.5 ³H-TdR 参入实验

按文献 [8] 方法进行。

抑制率 = $\frac{\text{未处理 cpm 值} - \text{实验组 cpm 值}}{\text{未处理 cpm 值}}$

$\times 100\%$

1.6 TGF α mRNA 斑点印渍杂交

按文献 [9] 方法进行。

2 实验结果

2.1 寡聚核苷酸 HPLC 纯化

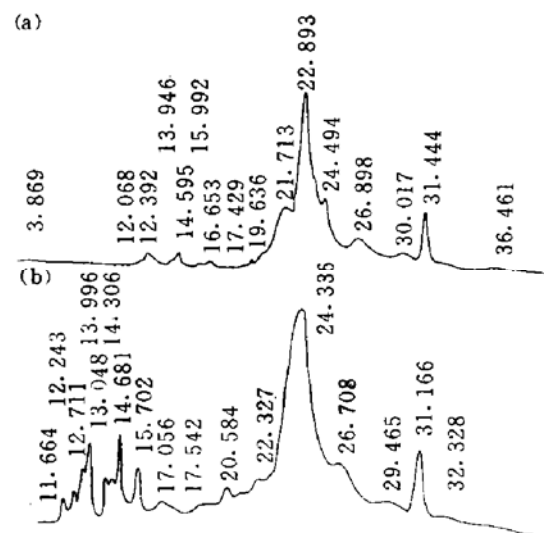


图 1 寡聚核苷酸 HPLC 纯化图谱

(a) 反义寡聚核苷酸, (b) 对照寡聚核苷酸。

图谱显示: TGF α 反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸均以单峰形式被纯化。

2.2 TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞增殖的抑制作用

图 2 及图 3 所示结果为重复两次实验的均值。

由图 2 可知, 2 μ mol/L, 4 μ mol/L, 8 μ mol/L 的 TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞生长的抑制率分别为 31%, 36%, 44%, 抑制作用随浓度升高而增强; 而相同浓度的对照寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞生长抑制率仅为 17%, 10%, 17%, 且无剂效关系。说明反义寡聚核苷酸作用有一定的特异性。从图 3 还可看出, 4 μ mol/L 的反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的抑制率在 12, 24, 48h 分别为 32%, 36%, 26%; 相同浓度的对照寡聚核苷酸则为 15%, 10%, 5%。表明寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的作用与时间有关, 时间过分延长, 抑制作用逐渐降低。

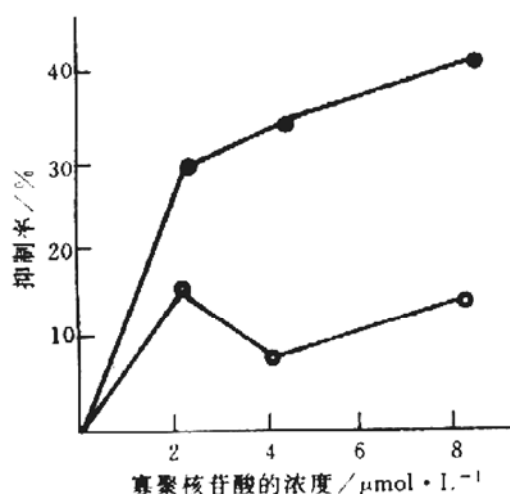


图2 不同浓度的寡聚核苷酸作用 BIU 87 细胞 24h 后对细胞生长的抑制

●—●, TGF α 反义寡聚核苷酸, ○—○, 对照寡聚核苷酸.

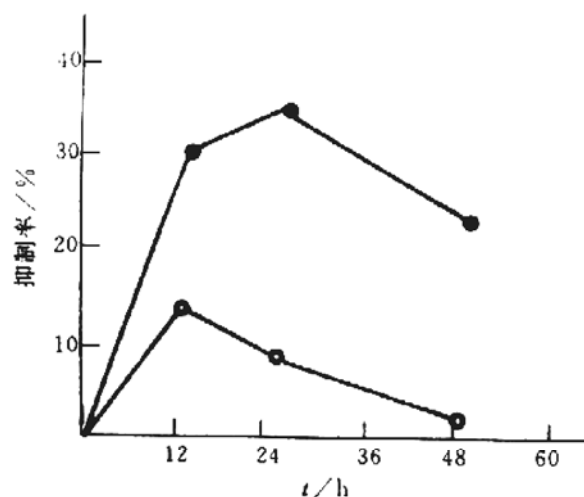


图3 4 $\mu\text{mol/L}$ 寡聚核苷酸在不同时间对 BIU 87 细胞生长的抑制

●—●, TGF α 反义寡聚核苷酸, ○—○, 对照寡聚核苷酸.

2.3 TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞 DNA 合成的作用

图4显示 8 $\mu\text{mol/L}$ 寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞 ^3H -TdR 参入的结果 (三次重复实验的均值).

2 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$ TGF α 反义寡聚核苷酸作用 BIU 87 细胞 24h 后对细胞 ^3H -TdR 参入的抑制率分别为 25.2%, 38.5%, 88.0%, 相同浓度的对照寡聚核苷酸抑制率仅为 19.5%, 17.4%, 27.0%. 这表明: TGF α

反义寡聚核苷酸比对照寡聚核苷酸更强地抑制了 BIU 87 细胞中的 DNA 合成.

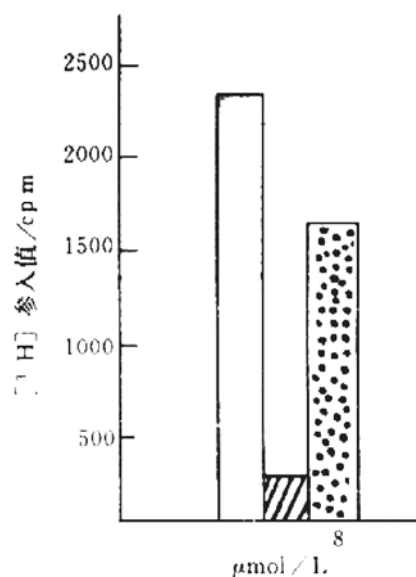


图4 8 $\mu\text{mol/L}$ 寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞 ^3H -TdR 参入的抑制作用

□: 无寡聚核苷酸, ▨: TGF α 反义寡聚核苷酸, ▤: 对照寡聚核苷酸.

2.4 TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞中 TGF α mRNA 表达的作用

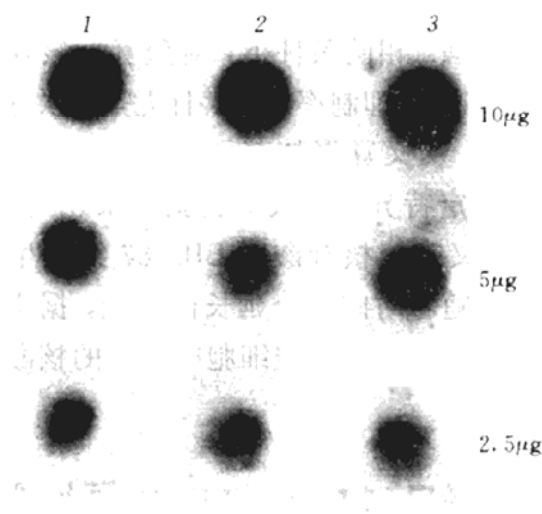


图5 BIU 87 细胞中 TGF α mRNA 斑点印渍杂交分析

总 RNA 10 μg , 5 μg , 2.5 μg . 1: 对照组, 2: 反义组, 3: 空白组.

3 $\mu\text{mol/L}$ 的 TGF α 反义寡聚核苷酸和对照寡聚核苷酸分别处理 24h, TGF α mRNA 表达分别被抑制 61.4% 和 42.5%, 可见 TGF α 反

义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞中 TGF α mRNA 的表达具有较强的抑制作用。

表 1 BIU 87 细胞中 TGF α mRNA 斑点杂交扫描测量

	IOD	抑制率/%
对照 (空白)	0.94	
对照寡聚核苷酸	0.54	42.5
反义寡聚核苷酸	0.36	61.5

3 讨 论

本实验采用了两条由 23 碱基组成的寡聚脱氧核苷酸链, 一条链与 TGF α cDNA 转录起始区及前 6 个密码子互补, 可在复制、转录等水平上抑制 TGF α 表达; 另一条链所含碱基数目及比例均与前者相同, 但与 TGF α 基因无互补性, 为对照寡聚核苷酸, 衡量寡聚核苷酸对本实验体系的非特异性影响。

本实验中, TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的细胞计数及 ^3H -TdR 参入作用的结果基本一致: 反义寡聚核苷酸可抑制 BIU 87 细胞的生长及其 DNA 合成, 其抑制作用随浓度升高而增强。相同条件下, 对照寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的抑制率较低, 且无剂效关系。提示: TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞的作用有一定特异性。从本实验结果还可看出: TGF α 反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞生长的抑制作用随着时间过分延长而降低, 据文献报道认为是寡聚核苷酸被细胞中释放的核酸酶所降解^[8]。

为进一步了解反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞抑制作用的机理, 本实验应用分子杂交分析显示: 反义寡聚核苷酸可明显抑制 TGF α mRNA 的表达, 但对照寡聚核苷酸也显示出一定的抑制作用。可能是寡聚核苷酸本身对细胞产生的非特异性毒副作用。在 CSF-1, TGF β 3 和 bFGF 的反义寡聚核苷酸的研究中也发现有高非特异性毒副作用^[5-7], 这是目前反义寡聚核苷酸应用所面临的一个重要问题, 如何减少其毒副作用也是当前研究反义寡聚核苷酸的一个主要方面。

该反义寡聚核苷酸对 BIU 87 细胞中 TGF α 蛋白表达水平的作用有待进一步研究。

本实验进一步证实了 TGF α 在 BIU 87 细胞增殖中的重要作用, 并为膀胱癌的反义寡聚核苷酸治疗提供了实验基础。

参 考 文 献

- 1 胡 征, 周爱儒. 北京医科大学学报, 1991; 23: 286
- 2 石东平, 周爱儒. 生物化学杂志, 1991; 7: 455
- 3 俞利章. 中华泌尿外科杂志, 1989; 10: 131
- 4 葛正龙, 周爱儒. 生物化学杂志, 1991; 8: 486
- 5 Birchenall-Roberts M C, Ferrer C, Ferrer D *et al.* J Immunology, 1990; 145: 3290
- 6 Becker D, Meier C N, Merlyn M. EMBO J, 1989; 8: 3685
- 7 Potts J D, Dagle J M, Walder J A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 1516
- 8 许 毅, 邓国仁. 中国科学 B 辑, 1990; 1: 64
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd ed, New York: CSHL Press, 1989

人重组 IL6/IL2 融合蛋白的变性、复性及纯化*

赵春华 凌世淦 毛 宁 唐佩弦

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 经超声破碎, 分离已表达 CH925 包涵体, 较系统地研究变性剂浓度、融合蛋白浓度对蛋白折叠的影响。在还原型及氧化型谷胱甘肽复性条件下, 成功地将融合蛋白 CH925 折叠成具有 IL6 及 IL2 双

mRNA expression.

Key words vascular endothelial growth factor. Dot blot. tumor. SGC-7901 cell line. mRNA expression

The Inhibition of BIU87 Cell Proliferation and TGF α mRNA Expression by an TGF α Antisense Oligodeoxynucleotide. Sun Congmei. Wang Dong. Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 429—432

Two 23-mer unmodified oligodeoxynucleotides have been synthesized, one to hybridize with the region across the transcription initiation site of TGF α cDNA called antisense, and the second with an identical base composition, but the nucleotide sequence randomized. The random oligodeoxynucleotide was used to control for any non-specific effects of the oligodeoxynucleotides. TGF α antisense inhibited cell proliferation and DNA synthesis from 31% to 44% and 25.8% to 88.0% respectively. This effect is specific and dose-responed. However, at the same condition, the inhibition by random is only 10% to 17% and 17% to 27%. This effect is not dose-responed. By RNA dot blot analysis, the addition of 3 μ mol/L TGF α antisense and random upon BIU87 cells resulted in 61.4% and 42.5% inhibition in TGF α mRNA expression respectively. These results suggested that TGF α may play an important role in the proliferation of BIU87 cell line and provide a rational basis for the development of selective cancer therapeutical approaches.

Key words oligodeoxynucleotide. TGF α (transforming growth factor α). BIU87 cell. antisense oligodeoxynucleotide

Purification and Renaturation of Recombinant Fusion Protein IL6/IL2. Zhao Chunhua. Ling Shigan. Mao Ning. Tang Peih sien. (*Institute of Basic Medical Science, AMMS, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 432—435

The expressed CH925 was aggregated into inclusion bodies (IB) in *E. coli* cytoplasm. The IBs were isolated by centrifugation and sonication. CH925 were refolded and reoxidated in a glutathione redox system following denaturation of the IBs in 7mol/L guanidine hydrochloride. The specific activities of IL2 and IL6 assayed by CTLL-2 and 7TD1 cell line were 2.2×10^6 U/mg and 2.3×10^8 U/mg, respectively, following renaturation. The renatured CH925 was chromatographed through DEAE-Sephacryl column and Sephacryl column. The active fractions were pooled and applied to HPLC with reversed-phase C-18 column, while CH925 was eluted through 10%—70% acetonitrile gradient. It showed only one protein peak and SDS-PAGE confirmed that the purified CH925 was almost homogeneous.

Key words fusion protein IL6/IL2. denaturation. renaturation. protein purification

Effects of C-17 Deletion in the Spacer on the Strength of β -Lactamase Gene Promoter. Sun Nai en. Wang Yan. Xie Wei. Zhu Dexu. (*National Laboratory of Medicine Biotechnology, Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 436—439

The C : G base-pair at position -17 in the spacer of β -lactamase gene promoter was removed by restriction with BspH I. partial filling-in with Klenow fragment, and trimming with mung bean nuclease. The β -lactamase activities of both bacteria harboring the wild-