

肝细胞生长因子基因转染对人淋巴瘤细胞凋亡的影响

沈蓉蓉¹ 郑筱娇¹ 岑 东^{1,2*} 赵 行¹ 滑世轩¹ 裴仁治³ 吕建新¹ 涂植光⁴

(¹温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325027; ²浙江省鄞州疾病预防控制中心, 宁波 315100; ³浙江省鄞州人民医院血液科, 宁波 315040; ⁴重庆医科大学医学检验系, 教育部“临床检验诊断学”重点实验室, 重庆 400016)

摘要 探讨肝细胞生长因子(HGF)基因转染人淋巴瘤细胞系Raji细胞后, 拮抗足叶乙甙(VP-16)诱导细胞凋亡的研究。将三种细胞: 未转染Raji细胞、空载体pVITRO₂-mcs转染细胞和HGF基因转染细胞, 分成正常对照组和经VP-16处理的药物组。采用Western blot法验证HGF蛋白的表达; CCK-8法检测诱导Raji细胞凋亡的药物浓度; 通过透射电镜、流式细胞术、吖啶橙(AO)染色、苏木精-伊红(HE)染色等方法观察Raji细胞的凋亡情况, 并进行相关分析。结果显示: Western blot法验证了HGF蛋白质的表达; CCK-8法显示100 μg/mL足叶乙甙可明显抑制Raji细胞增殖; 透射电镜下可发现典型的凋亡细胞; 流式检测结果表明: 给药组与正常组相比, 三组细胞的凋亡率明显升高($P<0.01$), 提示VP-16具有诱导细胞凋亡的作用; 但给药组间: HGF基因转染组凋亡率明显低于未转染组($P<0.05$)和空载体pVITRO₂-mcs转染组($P<0.05$), 提示HGF基因转染可明显抑制VP-16诱导的Raji细胞的凋亡, AO染色和HE染色结果也同样提示HGF具有拮抗VP-16诱导的细胞凋亡效应。

关键词 肝细胞生长因子; 基因转染; 凋亡

以往的肿瘤研究工作多注重细胞增生的失调, 现在研究认为, 肿瘤发生往往同时伴有细胞增殖异常和细胞凋亡异常, 细胞凋亡的减少在肿瘤发生发展中也起着重要作用。将细胞凋亡纳入肿瘤的发病机制研究, 可更客观系统地阐明肿瘤发生的本质, 从而研究新的治疗手段与途径, 以有效提高恶性肿瘤的疗效, 降低死亡率。

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)作为一种多功能的细胞因子, 可特异性增强HGF/c-Met途径的信号转导, 在肿瘤细胞、组织及荷瘤个体中高度表达, 其表达水平与恶性肿瘤的发生发展呈正相关^[1-3], 其促进肿瘤的生长、迁徙和侵袭的功能已得到肯定, 而是否还具有抗凋亡功能尚需验证。若能证实HGF兼有促增殖和抗凋亡的作用, 则可以此为切入点, 结合基础性研究与药物开发协同研究HGF抑制剂或拮抗剂, 为恶性肿瘤治疗提供新策略。本实验通过HGF基因重组表达载体pVITRO₂-mcs-HGF转染人淋巴瘤Raji细胞株, 观察HGF基因转染对凋亡诱导剂足叶乙甙(Etoposide, VP-16)的拮抗效应, 以期证实HGF在淋巴瘤中抗凋亡的生物学效应。

限公司, CCK-8试剂盒购自同仁株式会社, Annexin V-FITC试剂盒、吖啶橙染色试剂盒、苏木素-伊红(HE)染液等购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.1.2 细胞株 人淋巴瘤细胞系Raji细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库, 载体pVITRO₂-mcs转染Raji细胞株和HGF基因重组表达载体pVITRO₂-mcs-HGF转染Raji细胞株由本实验室构建^[4], 兔抗人HGF多克隆抗体购自Abcam公司, RPMI-1640培养液、澳洲胎牛血清等购自美国Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 未转染Raji细胞、载体pVITRO₂-mcs转染Raji细胞、HGF基因重组表达载体pVITRO₂-mcs-HGF转染Raji细胞分别置于37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养。待细胞培养液颜色转黄或细胞呈巨大团状时, 用吸管轻轻吹打成单个细胞, 置于15 mL一次性离心管中, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清液; 加入2 mL新鲜培养液混匀, 取1 mL混匀液置于新培养瓶中, 加入4 mL培养液, 37 °C、5%

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 VP-16购自江苏恒瑞医药股份有

收稿日期: 2011-12-07 接受日期: 2012-02-10

浙江省医药卫生科技项目(No.2007A175)和宁波市科技计划项目(No.2007C10065, No.2010A610031)资助项目

*通讯作者。Tel: 0574-87418703, E-mail: cendong2002@163.com

CO₂培养箱中常规静置培养, 备用。以HGF基因重组表达载体pVITRO₂-mcs-HGF转染细胞为实验组, 未转染的Raji细胞、载体pVITRO₂-mcs转染细胞为对照组。

1.2.2 Western blot检测HGF蛋白的表达 取转染的Raji细胞培养上清液, 进行12% SDS-PAGE电泳, 之后转至PVDF膜, 封闭; 加入500倍稀释的兔抗人HGF多克隆抗体, 4℃过夜; 洗膜后加入1 000倍稀释的HRP标记的羊抗兔多抗, 室温振荡1 h; 洗膜后以DAB试剂盒显色。以未转染Raji细胞组和载体pVITRO₂-mcs转染组作为对照。

1.2.3 CCK-8法检测VP-16对Raji细胞增殖的影响 将 2×10^4 /mL Raji细胞接种于96孔板中, 100 μL/孔, 平行3孔, 置于37℃、5% CO₂培养箱中常规静置培养24 h后, 加入不同浓度梯度的VP-16(0, 100, 200, 300, 400 μg/mL), 继续培养24 h后加入CCK-8试剂10 μL, 37℃、5% CO₂孵育3 h后, 全自动酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值(D值)。根据公式计算: 细胞抑制率(%)=(1-加入VP-16处理组的D值/对照组的D值)×100%。设空白组和对照组, 空白组仅加培养基, 对照组加Raji细胞和培养基, 每组设5个复孔, 平行实验5次。

1.2.4 透射电镜观察细胞凋亡形态 取3组处于对数生长期的细胞, 分别于37℃、5% CO₂培养箱中常规静置培养48 h, 加入100 μg/mL VP-16 25 μL, 2 h后PBS洗3次, 收集细胞, 2.5%戊二醛固定, 4℃过夜, PBS洗3次, 1%锇酸固定1 h, 乙醇梯度脱水, 纯丙酮脱水2次, 1:1的丙酮:包埋剂中置换1 h, 纯包埋剂37℃固化24 h, 60℃静置48 h, 超薄切片, 电镜下观察并拍片。

1.2.5 HGF基因转染对肿瘤细胞早期凋亡的影响 分别收集处于对数生长期的3组细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 /mL, 接种于6孔板中, 平行3孔。37℃、5% CO₂条件下常规静置培养48 h后, 加入VP-16(100 μg/mL)共同孵育2 h, PBS洗3次, 加入新鲜培养基, 24 h后收集悬浮细胞, PBS洗涤2次, 2 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入100 μL Binding Buffer重悬细胞, 加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL Propidium Iodide, 混匀, 室温、避光反应15 min, 加入400 μL Binding Buffer, 1 h内上机检测, 平行实验5次。

1.2.6 吖啶橙染色检测细胞凋亡率 分别取处于对数生长期的3组细胞, 加入VP-16(100 μg/mL)共同

孵育2 h后, PBS洗3次, 制备浓度为 2×10^6 /mL细胞悬液, 取95 μL细胞悬液和5 μL吖啶橙染液轻轻混匀, 室温避光染色15 min, 取样滴于载玻片上, 加盖玻片。平行计数5次, 拍照。

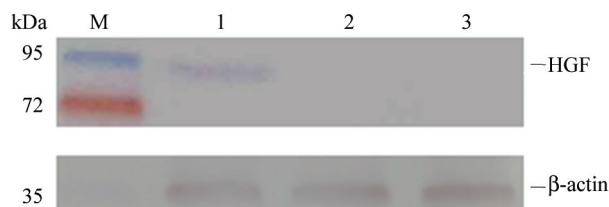
1.2.7 苏木素-伊红(HE)染色检测细胞形态变化 各组悬浮细胞的制备同吖啶橙染色法, 涂片, 4%多聚甲醛固定5 min, 水洗1 min; 苏木素染色5 min, 水洗1 min; 1%盐酸乙醇处理3 s, 水洗1 min; 淡氨水处理30 s, 水洗15 min。伊红染色2 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。平行计数5次。

1.2.8 统计学处理 结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 16.0统计软件进行正态分析和t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot检测HGF基因的表达

Western blot结果表明, 转染HGF基因的Raji细胞培养液有大小约为90 kDa的蛋白质条带存在, 而对照组均无。提示HGF基因转染Raji细胞后可表达HGF蛋白质, 见图1。



M: 蛋白质分子量标准; 1: HGF基因转染Raji细胞株; 2: 未转染Raji细胞株; 3: 空载体pVITRO₂-mcs转染Raji细胞株。

M: protein molecular weight marker; 1: pVITRO₂-mcs-HGF transfected Raji cell strain; 2: non-transfected Raji cell strain; 3: vector pVITRO₂-mcs transfected Raji cell strain.

图1 Western blot检测转染HGF基因后Raji细胞的HGF蛋白表达

Fig.1 Expression of HGF protein in Raji cells transfected with HGF gene by Western blot

2.2 VP-16对Raji细胞增殖的影响

经CCK-8法检测发现, VP-16可显著抑制Raji细胞的增殖, 药物浓度为100 μg/mL时达到半数抑制率(44.1±3.2)%, 且抑制效应与VP-16浓度呈正相关, 见图2。

2.3 透射电镜观察细胞凋亡的形态变化

透射电镜下观察各组细胞, 发现未处理前各组细胞大多呈球形、表面有微绒毛、核浆比大、核内

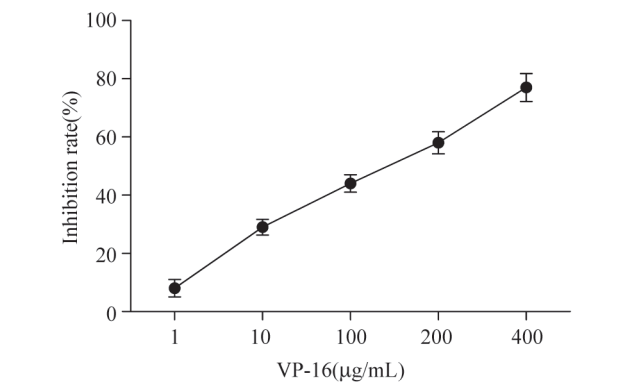


图2 CCK-8法检测VP-16对Raji细胞增殖的抑制作用
Fig.2 Suppression of VP-16 in Raji cells proliferation by CCK-8 assay

异染色质散在分布, 发生典型凋亡改变者较少; 而经VP-16处理后, 具典型凋亡形态改变的细胞明显增多: 细胞表面绒毛脱失、核体积变小、核膜下可见染色质呈斑块状凝聚、双层核膜结构清晰, 但HGF基因转染组凋亡发生相对较少, 见图3。

2.4 流式细胞术检测HGF基因转染对细胞凋亡的影响

采用Annexin V-FITC/PI双染法, 经流式细胞仪分析发现: 经VP-16处理后, 与未处理组相比, 3组细

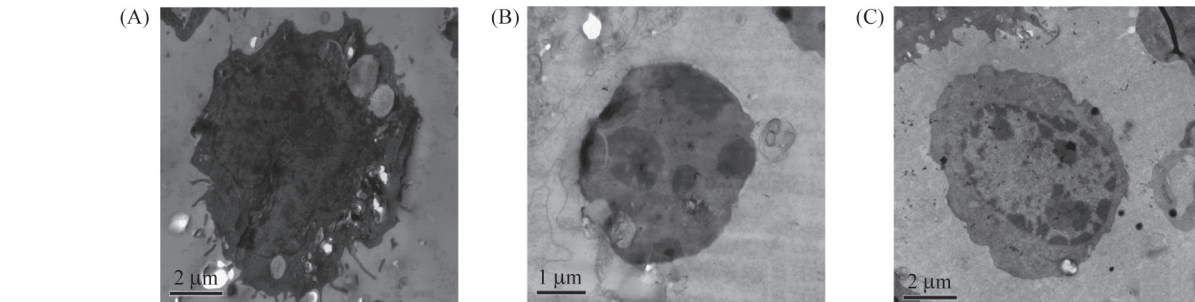
胞凋亡数量明显增加($P<0.05$), 但在药物处理组之间, HGF基因转染组的凋亡率明显低于未转染Raji细胞组($P<0.01$)和空载体pVITRO₂-mcs转染组($P<0.01$), 提示HGF基因转染可明显抑制凋亡的发生, 见表1和图4。

2.5 吖啶橙染色检测HGF基因转染对Raji细胞凋亡的影响

激光共聚焦显微镜于488 nm波长下观察, 呈均匀黄绿色荧光者为未凋亡细胞, 染色质浓缩、细胞核碎裂成点状呈大小不一、致密浓染的绿色颗粒者为凋亡细胞(图4箭头所示)。吖啶橙染色后在激光共聚焦显微镜下观察发现: 经VP-16处理后, 与未处理组相比, 3组细胞凋亡率明显增加($P<0.005$), 但在药物处理组之间, HGF基因转染组的凋亡率明显低于未转染Raji细胞组($P<0.01$)和空载体pVITRO₂-mcs转染组($P<0.01$), 提示HGF基因转染可降低经VP-16诱导后Raji细胞凋亡的发生, 见图5和表2。

2.6 HE染色检测HGF基因转染对Raji细胞凋亡的影响

普通光学显微镜下观察, 凋亡细胞呈圆形, 胞核深染、胞质浓缩、染色质呈团块状, 表面有“出芽”现象(图5箭头所示)。HE染色检测发现: 经VP-16

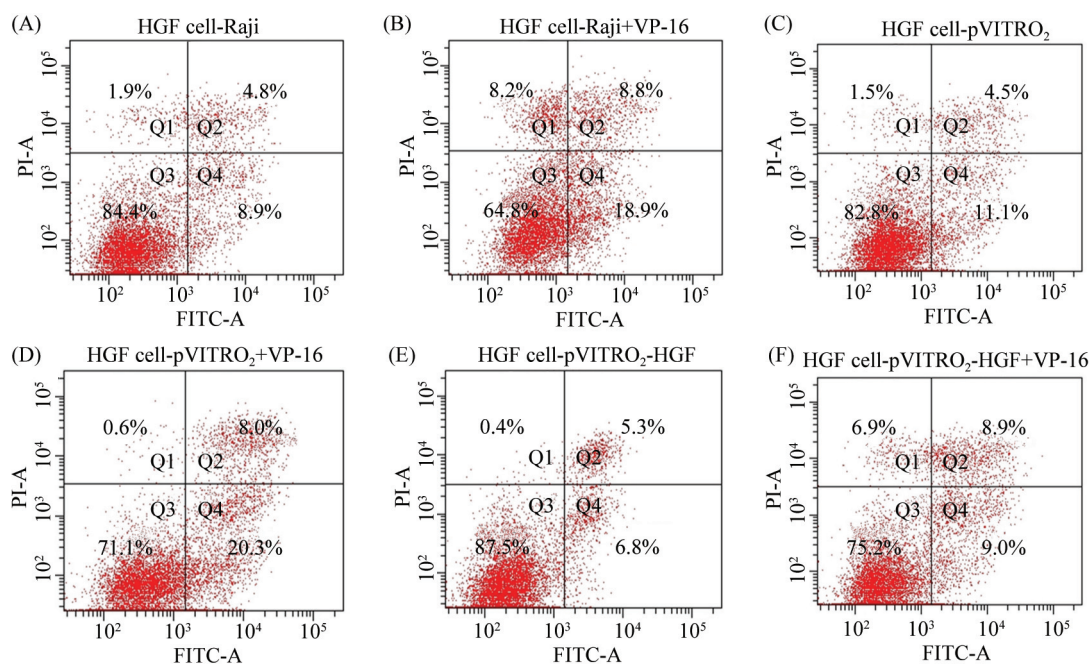


A: 正常Raji细胞; B: 经VP-16诱导凋亡的Raji细胞; C: 经VP-16诱导凋亡的HGF基因转染细胞。
A: normal Raji cell; B: apoptotic Raji cell induced by VP-16; C: apoptotic pVITRO₂-mcs-HGF transfected cell induced by VP-16.

图3 透射电镜下观察经VP-16诱导后Raji细胞形态的改变
Fig.3 Morphological changes of Raji cells induced by VP-16 with transmission electron microscope observation

表1 HGF基因转染对Raji细胞凋亡的影响		
Table 1 Effects of HGF gene transfection on the apoptosis of Raji cells		
组别	对照组(%)	给药组(%)
Groups	Control group(%)	Drug group(%)
Non-transfected Raji group	9.6±0.9	17.6±2.9*
pVITRO ₂ -mcs transfected group	11.7±0.8	21.2±1.3*
pVITRO ₂ -mcs-HGF transfected group	6.0±1.1	10.6±2.3**

三组细胞的给药组与对照组相比, * $P<0.05$; 给药组间: HGF基因转染组与未转染组和空载体pVITRO₂-mcs转染组相比, # $P<0.01$ 。
* $P<0.05$, drug group vs control group; # $P<0.01$, pVITRO₂-mcs-HGF transfected group vs non-transfected Raji group, pVITRO₂-mcs transfected group.

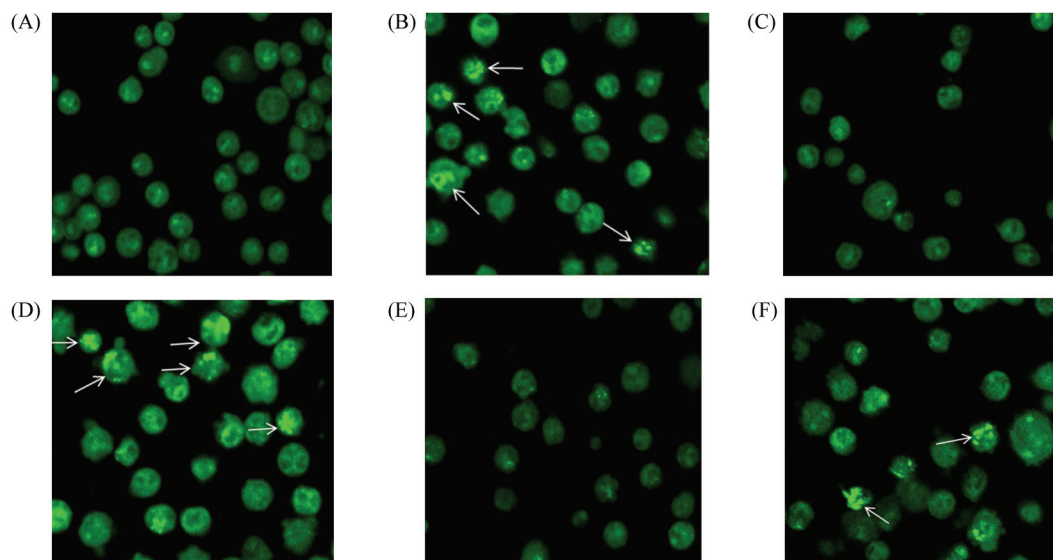


A: 未转染Raji细胞组; B: 经药物VP-16处理的未转染Raji细胞组; C: 空载体pVITRO₂-mcs转染组; D: 经药物VP-16处理的空载体pVITRO₂-mcs转染组; E: *HGF*基因转染组; F: 经药物VP-16处理的*HGF*基因转染组。

A: non-transfected Raji cell group; B: non-transfected Raji cell group+VP-16; C: pVITRO₂-mcs transfected group; D: pVITRO₂-mcs transfected group+VP-16 group; E: pVITRO₂-mcs-HGF transfected group; F: pVITRO₂-mcs-HGF transfected group+VP-16 group.

图4 流式细胞术检测*HGF*基因转染抗细胞凋亡的作用

Fig.4 Effect of anti-apoptosis of *HGF* gene transfection by flow cytometry



A: 未转染Raji细胞组; B: 经药物VP-16处理的未转染Raji细胞组; C: 空载体pVITRO₂-mcs转染组; D: 经药物VP-16处理的空载体pVITRO₂-mcs转染组; E: *HGF*基因转染组; F: 经药物VP-16处理的*HGF*基因转染组。

A: non-transfected Raji cell group; B: non-transfected Raji cell group+VP-16; C: pVITRO₂-mcs transfected group; D: pVITRO₂-mcs transfected group+VP-16; E: pVITRO₂-mcs-HGF transfected group; F: pVITRO₂-mcs-HGF transfected group+VP-16.

图5 吖啶橙染色对*HGF*基因转染抗细胞凋亡作用的检测(400×)

Fig.5 The detection of anti-apoptosis effect of *HGF* gene transfection by AO staining(400×)

处理后, 与未处理组相比, 3组细胞的凋亡率明显增加($P<0.01$); 但在药物处理组之间, *HGF*基因转染组

表2 吖啶橙染色法检测HGF基因转染对细胞凋亡的影响		
Table 2 Effect of HGF gene transfection on the apoptosis of Raji cells by acridine orange staining		
组别	对照组(%)	给药组(%)
Groups	Control group(%)	Drug group(%)
Non-transfected Raji group	1.8±0.9	15.9±0.8*
pVITRO ₂ -mcs transfected group	1.9±0.8	16.5±2.8*
pVITRO ₂ -mcs-HGF transfected group	2.0±0.9	8.3±1.0*#

三组细胞的给药组与对照组相比: * $P<0.005$; 给药组间: HGF基因转染组与未转染组和空载体pVITRO₂-mcs转染组相比: # $P<0.01$ 。
* $P<0.005$, drug groups vs control groups; # $P<0.01$, pVITRO₂-mcs-HGF transfected group vs non-transfected Raji group, pVITRO₂-mcs transfected group.

的凋亡率(6.0%)明显低于未转染Raji细胞组(11.9%, $P<0.05$)和空载体pVITRO₂-mcs转染细胞组(10.2%, $P<0.05$), 提示HGF基因转染一定程度上具有抑制Raji细胞凋亡发生的作用, 见图6和图7。

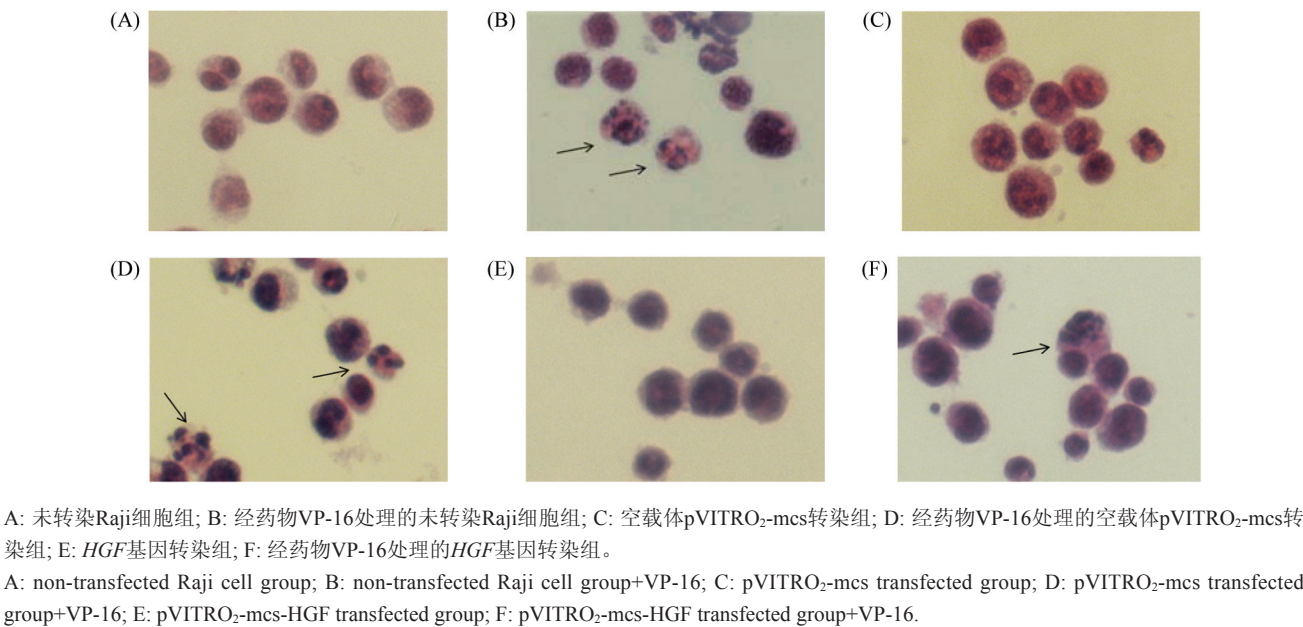


图6 HE染色法检测HGF基因转染对细胞凋亡的影响(400×)

Fig.6 Effect of anti-apoptosis of HGF gene transfection in Raji cells by HE staining(400×)

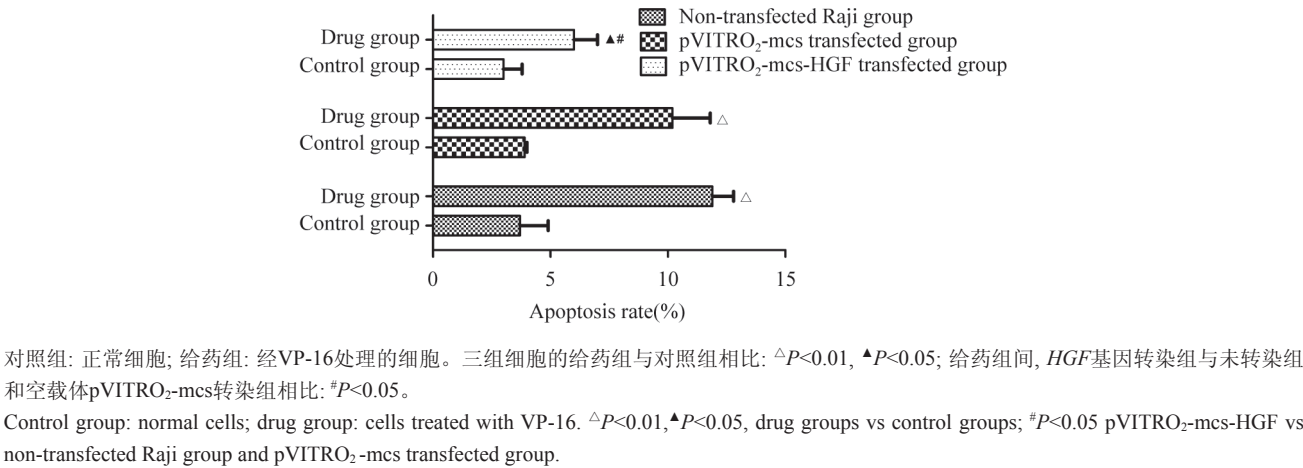


图7 HE染色法检测HGF基因转染对细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of anti-apoptosis of HGF gene transfection in Raji cells by HE staining

3 讨论

人HGF基因位于7q21.1, 约70 Kb, 包含18个外显子和17个内含子, 是目前已知的生物学活性广泛的生长因子之一。修饰的HGF由69 kDa的 α 链和34 kDa的 β 链通过二硫键连接成异二聚体, 其 α 链为一短的可形成发夹结构的N末端区, 连接4个Kringle结构; 而 β 链呈丝氨酸蛋白酶样, 是与c-Met结合的位点, 两者结合后首先诱导胞膜上c-Met受体酪氨酸磷酸化, 并通过下游多种胞内信号转导途径发挥HGF的生物学效应。

Toyama等^[5]检测了59例非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者的血清HGF水平, 发现其在T、B淋巴瘤中均明显升高, 且水平与中性粒细胞平行。研究还发现淋巴瘤患者的淋巴结HGF免疫组化染色为强阳性, 但骨髓液中HGF的变化不确定。在经过治疗缓解的患者中, 绝大部分患者血清HGF浓度显著降低, 但患者的生存率及预后的关系与HGF之间无明显相关性。他们认为虽然HGF因其具有的血管生长活性而参与了NHL的发病, 但血清中的HGF主要来源于中性粒细胞等髓系细胞的分泌。对于HGF在弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中的表达, Kawano等^[6]检测了96例弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的HGF表达后发现HGF阳性者的预后较阴性者差。此外, 在低风险组中, HGF阴性组的预后显著好于阳性组; 由此认为, HGF是DLBCL的有价值的预后指标。Hsiao等^[7]发现77例NHL患者的血清HGF显著高于对照者, 且与临床症状和疗效有关; 在DLBCL中该现象更为显著。Tjin等^[8]还发现在MET阳性的DLBCL细胞中, HGF介导MEK依赖性的ERK的活化和PI3K依赖性的PKB、GSK3和FOXO3a的磷酸化, 而DLBCL细胞自分泌HGF活化因子有助于淋巴瘤的形成。Kurosu等^[9]发现BCL6过度表达可抑制VP-16诱导的细胞凋亡, 其机制可能与加强细胞的抗氧化防御系统有关。Grotegut等^[10]发现HGF表达于肝母细胞瘤(HB), 虽然没有对细胞活力和增殖产生影响, 但其可有效增强HB细胞对凋亡诱导剂如顺铂和喜树碱的抵抗作用。Lee等^[11]发现肝细胞生长因子可阻断血管紧张素II诱导的内皮细胞凋亡。此外, 有研究表明HGF受体过表达于多种肿瘤细胞, 与肿瘤的发生发展及预后均关系密切^[12-13]。因此, 研究HGF是否参与了淋巴瘤细胞凋亡及其在此过程中的作用, 将进一步揭示HGF在淋巴瘤发生发展过程中的价值。结合基础性

研究与药物开发协同研究HGF抑制剂或拮抗剂, 可为恶性肿瘤治疗提供新策略。

本实验通过CCK-8法来筛选诱导Raji细胞凋亡的药物浓度, 结果显示随着VP-16浓度的增加, Raji细胞的生存率明显降低, 呈剂量依赖性; 经流式细胞仪对凋亡细胞的生化特征变化进行定量分析; 通过Annexin V-FITC/PI双染法、吖啶橙染色及HE染色均发现经VP-16处理后, 未转染组、空载体转染组和HGF基因转染组3组细胞的凋亡率均有所增加($P<0.05$), 且在透射电镜下可见明显的凋亡细胞形态, 提示VP-16可以诱导淋巴瘤细胞的凋亡; 但研究同时发现: 经VP-16处理后, 与未转染组和空载体转染组相比, HGF基因转染组的细胞凋亡率也明显降低($P<0.05$), 提示HGF基因转染可在一定程度上抑制VP-16所诱导的细胞凋亡, 由此证实了HGF作为一种多功能细胞因子, 在淋巴瘤的发生发展中除了具有促增殖、侵袭和转移的生物学效应外, 还可能具有抗细胞凋亡的作用, 但其具体机制尚需要进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Hematology* 2005; 53(1): 35-61.
- 2 Tjin EP, Groen RW, Vogelzang I, Derksen PW, Klok MD, Meijer HP, *et al.* Functional analysis of HGF/MET-signaling and aberrant HGF activator expression in diffuse large B cell lymphoma. *Blood* 2006; 107(2): 760-8.
- 3 Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, *et al.* Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: Proliferation, migration and differentiation. *Stem Cells* 2006; 24(1): 23-33.
- 4 岑东, 赵行, 沈蓉蓉, 滑世轩, 吕建新, 裴仁治, 等. 肝细胞生长因子基因转染对淋巴瘤细胞的生物学效应. *浙江大学学报(医学版)* 2010; 39(4): 378-85.
- 5 Toyama T, Ido A, Sasak H, Maeda K, Yamashita K, Kubuki Y, *et al.* Possible involvement of neutrophils in a serum level increase of hepatocyte growth factor in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol Rep* 2005; 133: 439-44.
- 6 Kawano R, Ohshima K, Karube K, Yamaguchi T, Kohno S, Suzumiya J, *et al.* Prognostic significance of hepatocyte growth factor and c-MET expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2004; 1273: 305-7.
- 7 Hsiao LT, Lin JT, Yu IT, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, *et al.* High serum hepatocyte growth factor level in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2003; 705: 282-9.
- 8 Tjin EP, Groen RW, Vogelzang I, Derksen PW, Klok MD, Meijer HP, *et al.* Functional analysis of HGF/MET-signaling and aberrant HGF activator expression in diffuse large B cell

- lymphoma. *Blood* 2005; 107(2): 760-8.
- 9 Kurosu T, Fukuda T, Miki T, Miura O. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 2003; 22(29): 4459-68.
- 10 Grotegut S, Kappler R, Tarimoradi S, Lehembre F, Christofori G, von Schweinitz D. Hepatocyte growth factor protects hepatoblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis by AKT activation. *Int J Oncol* 2010; 36(5): 1261-7.
- 11 Lee YH, Marquez AP, Mungunsukh O, Day RM. Hepatocyte growth factor inhibits apoptosis by the profibrotic factor angiotensin II via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in endothelial cells and tissue explants. *Mol Biol Cell* 2010; 21(23): 4240-50.
- 12 He F, Wu LX, Shu KX, Liu FY, Yang LJ, Zhou X, *et al.* HGF protects cultured cortical neurons against hypoxia/reoxygenation induced cell injury via ERK1/2 and PI-3K/Akt pathways. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 61(2): 290-7.
- 13 Rui C, Li C, Xu W, Zhan Y, Li Y, Yang X. Involvement of Egr-1 in HGF-induced elevation of the human 5 alpha-R1 gene in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem J* 2008; 411(2): 379-86.

The Effect of Hepatocyte Growth Factor Gene Transfection on the Apoptosis of Human Lymphoma Cell Line Raji Cells

Shen Rongrong¹, Zheng Xiaojiao¹, Cen Dong^{1,2*}, Zhao Hang¹, Hua Shixuan¹,
Pei Renzhi³, Lü Jianxin¹, Tu Zhiguang⁴

(¹Zhejiang Provincial Yinzhou District Centre for Disease Control and Prevention, Ningbo 315100, China; ²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China; ³Department of Hematology, Zhejiang Provincial Yinzhou People's Hospital, Ningbo 315040, China; ⁴Faculty of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Diagnostics of Education Ministry of China, Chongqing Medical University, Chongqing 410006, China)

Abstract To investigate hepatocyte growth factor (HGF) gene transfection and its inhibitory effect on the apoptosis of human lymphoma cell line Raji cells induced by VP-16, three cell lines (non-transfected Raji cells, empty vector transfected Raji cells and pVITRO₂-mcs-HGF gene transfected Raji cells) were designed into normal groups and drug groups. Western blot was used to estimate the HGF protein level. CCK-8 assay was used to measure proliferated inhibition on Raji cells induced by VP-16. Quantitative and qualitative analyses on the apoptosis of Raji cells were performed through transmission electron microscopy, flow cytometry, acridine orange (AO) fluorescent staining and HE staining. The results showed that HGF protein expression was evaluated. CCK-8 assay revealed that VP-16 can inhibit the proliferation of Raji significantly at the concentration of 100 µg/mL. Typical morphologic changes of cell apoptosis were observed under transmission electronic microscope. Flow cytometry results showed that the apoptotic rates of drug groups were significantly higher than the control groups ($P<0.01$), indicated that the apoptotic rate was enhanced after treated with VP-16. The apoptotic rates of HGF gene transfection groups were significantly lower than the non-transfected group ($P<0.05$) and empty vector transfected group ($P<0.05$), indicated that HGF gene transfection can significantly protect Raji cells from apoptosis induced by VP-16. The results of acridine orange (AO) fluorescent staining and HE staining indicated that HGF can decrease the apoptotic rate of Raji cells induced by VP-16.

Key words hepatocyte growth factor; gene transfection; apoptosis

Received: December 7, 2011 Accepted: February 10, 2012

This work was supported by the Research Assistance Fund of Zhejiang Medical Science Technology Project (No.2007A175) and Ningbo Medical Science Technology Project (No.2007C10065, No.2010A610031)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87418703, E-mail: cendong2002@163.com