

AS-mCLB1 重组质粒体外抗肿瘤及化疗增敏作用

张 伶^{1,2} 魏于全² 宋 英¹ 蒋 磊¹ 陈 平² 陈县城² 李继承^{1*}¹浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310058; ²四川大学华西医院肿瘤生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

摘要 研究反义全长小鼠细胞周期蛋白B1重组质粒(pAS-mCLB1)体外抗肿瘤及化疗增敏作用。扩增后少量抽提并纯化pAS-mCLB1, 通过脂质体将其转染入小鼠露易丝肺癌(LL/2)细胞, RT-PCR和Western印迹测定细胞内细胞周期蛋白B1的表达, 观察转染后细胞形态变化, MTT法检测细胞增殖活性, 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。细胞转染48 h后, 用化疗药物健择(gemcitabine; 0.2 μmol/L)处理24 h, MTT法测定健择对细胞的杀伤作用。研究提示pAS-mCLB1转染后LL/2细胞形态明显异常, 细胞内细胞周期蛋白B1表达显著下调, 细胞周期阻滞于G1期, 增殖受抑, 凋亡增加; 健择对pAS-mCLB1转染后LL/2细胞的杀伤作用显著增强。重组质粒pAS-mCLB1体外具有明显的抗肿瘤作用, 并能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 估计上述作用与其下调肿瘤细胞内细胞周期蛋白B1表达, 从而诱导细胞周期阻滞及凋亡等作用相关。

关键词 反义全长cDNA; 细胞周期蛋白B1; 细胞周期阻滞; 凋亡; 化疗敏感性

细胞周期蛋白B1是有丝分裂期(M期)的细胞周期蛋白, 可促进细胞越过G₂/M限制点, 启动有丝分裂, 研究证实细胞周期蛋白B1在肿瘤组织中普遍高表达^[1,2]。反义技术是一种利用反义分子干预基因表达的技术^[3,4], 反义全长cDNA(AS-cDNA)是反义技术中一种较简便且作用持久的下调靶基因功能的方法^[5]。由此我们拟用AS-cDNA技术下调肿瘤细胞细胞周期蛋白B1表达, 作为一种基因疗法, 抑制细胞分裂增殖以达到抗肿瘤的目的。本研究将前期研究^[6]构建的pAS-mCLB1重组质粒体外转染LL/2细胞, 检测细胞内细胞周期蛋白B1的表达、增殖活性、细胞周期及凋亡, 观察细胞形态学改变, 分析该质粒体外抗肿瘤作用及其机制。另外, 有研究者证实不少基因疗法具有化疗增敏性^[7], 本实验将pAS-mCLB1与化疗药物健择联合用于肿瘤细胞, 研究其增敏作用, 为进行后续的体内研究进而寻求肿瘤基因治疗新途径提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

pAS-mCLB1质粒由作者构建(经上海博亚生物技术公司测序, 证实其内反向插入了小鼠细胞周期蛋白B1全长cDNA片段, 1.3 kb)^[6], LL/2细胞系来自美国细胞、菌种库(ATCC); *E. coli* XL1-blue由本实验室保存; Lipofectamine 2000为Life Technology公司产品; 质粒提取纯化试剂盒为Qiagen公司产品;

DMEM、标准胎牛血清(FBS)为Gibco BRL公司产品; MTT试剂为Sigma Chemical公司产品; 流式细胞检测的RNase I及碘化丙啶(PI)为Sigma-Aldrich公司产品。2.5%戊二醛原液为E.M.K进口分装; 钼酸为PGM Chemicals (Pty) Ltd产品; 健择(gemcitabine)为杭州法玛化学有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒pAS-mCLB1扩增及抽提 将前期实验保种的*E. coli* XL1-blue(pAS-mCLB1重组质粒阳性克隆菌株)接种到50 ml含100 μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37℃、240 r/min振摇培养12 h扩增质粒, 然后用试剂盒提取细菌中的pAS-mCLB1。分光光度计(SmartSpec 3000, Bio-Rad)测定抽提的质粒DNA浓度, 最后将其终浓度调至1 μg/ml。用同样方法获取空载体pcDNA3.1(+)质粒。

1.2.2 重组质粒酶切鉴定 选用*EcoRV*及*PstI*分别单酶切pAS-mCLB1和pcDNA3.1(+), 以对重组质粒进行鉴定。酶切片段和提取的质粒用1%琼脂糖凝胶电泳, 90 V, 30 min。

1.2.3 重组质粒pAS-mCLB1转染LL/2细胞 重悬LL/2细胞于含10% FBS的DMEM培养基中, 在6孔板中每孔接种2×10⁵个活细胞(苔盼蓝染色确定活细胞数)。5% CO₂、37℃培养箱中培养24 h, 细胞达到50%~70%汇合后进行转染, 具体操作方法参照

收稿日期: 2007-01-18 接受日期: 2007-05-24

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

Lipofectamine 2000 细胞转染说明书进行, 其中 Lipofectamine 与质粒 DNA[pcDNA3.1(+), pAS-mCLB1] 以(4~5):1(V/M)的比例混匀。细胞分为空白脂质体(E-Lip)、pcDNA3.1(+)及 pAS-mCLB1 三组。

1.2.4 MTT 法检测 LL/2 细胞体外增殖活性 转染后 48 h 重悬上述三种 LL/2 细胞, 分别接种 96 孔板, 每孔 5×10^3 个活细胞, 5% CO₂, 37 °C 再培养 24 h。MTT 实验参照文献^[8]方法进行, 重复 3 次独立实验, 取平均值。将 E-Lip 组细胞的增殖活性设定为 100%。

1.2.5 一步法 RT-PCR (1) 总 RNA 提取 转染后 72 h 按照 Trizol™ RNA 抽提试剂盒(Invitrogen)操作说明提取 pcDNA3.1(+)组及 pAS-mCLB1 组 LL/2 细胞总 RNA。总 RNA 经无 RNase 的 DNase I (Sigma) 消化去除总 RNA 中残留的 DNA, 紫外吸收定量后, 取 50 ng 的 RNA 样品用于后续的 RT-PCR 反应。(2) 一步法 RT-PCR 按照 One Step RNA PCR Kit (TaKaRa) 操作说明进行; 扩增小鼠细胞周期蛋白 B1 及看家基因小鼠 β 肌动蛋白基因片段的引物序列参照文献^[9]; 小鼠 β 肌动蛋白为内参照。

1.2.6 Western 印迹 转染后 72 h, 用 Western 印迹方法检测 pcDNA3.1(+)组及 pAS-mCLB1 组 LL/2 细胞小鼠细胞周期蛋白 B1 的表达。操作方法参照文献^[10], 一抗为兔抗人细胞周期蛋白 B1 抗体(Santan Cruz)及兔抗人 β 肌动蛋白抗体(博士德生物工程有限公司), 稀释度均为 1 : 300; 二抗为碱性磷酸酶 AP 标记的羊抗兔 IgG, 稀释度为 1 : 30 000; BCIP/NBT 显色; 小鼠 β 肌动蛋白为内参照。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 转染 72 h 后进行细胞周期和凋亡分析。收集上述三种 LL/2 细胞, 每种约 3×10^6 个, 分别加入 1 ml 50 μg/ml PI 染色液和 50 μl 1 mg/ml RNase I 原液重悬, 37 °C 温育 10 min; 然后用流式细胞仪进行检测。其中, 各种细胞的细胞周期分布应用 ModFit LT 软件合成的 DNA 柱状图进行分析; ELITE 软件分析亚二倍体 DNA 含量(即凋亡细胞)。

1.2.8 常规扫描电镜观察细胞形态 扫描电镜样品制备: 六孔板孔内放置盖玻片, 将 LL/2 细胞接种在玻片上, 加入培养液, 一组细胞转染 pcDNA3.1(+)质粒作为对照, 另一组转染 pAS-mCLB1 重组质粒, 转染后 72 h, 吸去培养液, PBS 洗涤 2 次, 然后两组细胞分别用 2.5% 戊二醛固定 2 h 和 1% 锇酸固定 1 h, 梯度酒精脱水, 醋酸异戊酯置换, Hitachi HCP-2 型 CO₂ 临界点干燥器干燥, IB-5 型离子溅射镀膜仪喷金,

Cambridge S260 型扫描电镜观察, 加速电压 20 kV。

1.2.9 MTT 法检测 pAS-mCLB1 的化疗增敏性 实验分为生理盐水组(1)、单用 pAS-mCLB1 质粒转染组(2)、单用化疗药物健择组(3)和 pAS-mCLB1 质粒转染 + 健择(4, 联合组)四组。第 2, 4 组质粒转染方法同 1.2.3, 其中第 4 组质粒转染 48 h 后用健择(0.2 μmol/L)^[11]处理细胞, 第 3 组单用健择, 剂量及用药时间同第 4 组, 然后各组细胞均置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 分别于 1 h、12 h 和 24 h 后用 MTT 法测定各组的吸光度 A 值(方法参照文献^[8]), 重复 3 次独立实验, 取平均值。按下列公式计算细胞的生长抑制率(IR): $IR = (1 - A_{\text{处理组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$, 2、3、4 组均以生理盐水组为对照。按金正均^[12]的方法评价联合方案的协同作用, 即根据金氏公式求 q 值进行判断: $q = E(a + b) / (Ea + Eb - Ea \cdot Eb)$ [E(a+b)为两种方法合用的抑制率; Ea 和 Eb 为各法单用时的抑制率], 当 q > 1 时, 表示表示两种方法合用有增效(协同)作用; 本实验“a 法”为: pAS-mCLB1 质粒转染 LL/2 细胞, “b 法”为: 化疗药物健择处理细胞。

1.2.10 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差分析法用于分析各组间的差异。P < 0.05 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒的鉴定、扩增和纯化

从大肠杆菌里扩增得到的质粒, 进行酶切、电泳。其中 pcDNA3.1(+)用 EcoRV 单酶切产生了约 5.4 kb (5 428 bp) 的单一一条带, 用 PstI 单酶切产生了约 1.4 和 4.0 kb (1 356 和 4 072 bp) 两条条带; pAS-mCLB1 用 EcoRV 单酶切产生了约 6.2 kb 和 550 bp 的两条条带, 用 PstI 单酶切产生了约 4.2 kb、1.4 kb、683 bp 及 467 bp 的 4 条条带(图 1)。上述酶切图谱中所有酶切片段的大小与预期一致, 提示小鼠细胞周期蛋白 B1 全长 cDNA 片段反向插入到 pcDNA3.1(+)载体上, 并证明所扩增的质粒合乎要求。

2.2 pAS-mCLB1 下调 LL/2 细胞小鼠细胞周期蛋白 B1 基因的 mRNA 水平

RT-PCR 检测显示以小鼠 β 肌动蛋白(片断长度约 1 100 bp)为内参照, pAS-mCLB1 组细胞周期蛋白 B1 基因的 RT-PCR 产物(片断长度约 1 300 bp)含量显著低于 pcDNA3.1(+)组(图 2); 提示 pAS-mCLB1 降低了 LL/2 细胞小鼠细胞周期蛋白 B1 基因的 mRNA 水平。

2.3 pAS-mCLB1 下调 LL/2 细胞小鼠细胞周期

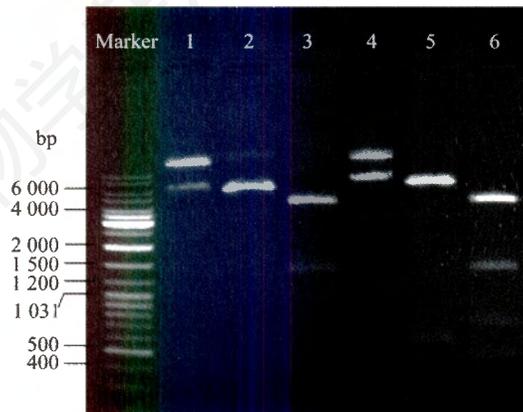


Fig.1 Identification of pAS-mCLB1 by restriction endonuclease

Marker, DNA molecular weight marker GeneRuler™ Ladder Mix; 1: undigested pcDNA 3.1(+); 2: digested fractions of pcDNA 3.1(+) by *EcoRV*; 3: fractions of pcDNA 3.1(+) by *PstI*; 4: undigested pAS-mCLB1; 5: digested fractions of pAS-mCLB1 by *EcoRV*; 6: fractions of pAS-mCLB1 by *PstI*.

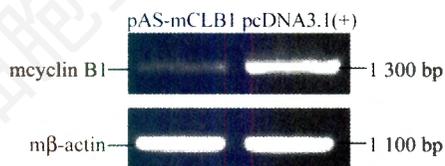


Fig.2 RT-PCR analysis of mcyclin B1 gene in LL/2 cell being transfected with pAS-mCLB1 or pcDNA3.1(+)

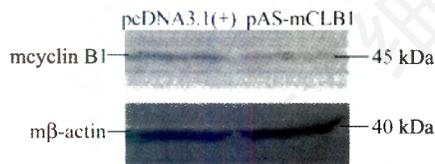


Fig.3 Western blot analysis of mcyclin B1 gene in LL/2 cell being transfected with pcDNA3.1(+) or pAS-mCLB1

蛋白 B1 基因的表达水平

Western 印迹分析显示转染 pAS-mCLB1 细胞的细胞周期蛋白 B1 基因的表达量明显低于 pcDNA3.1(+) 转染组细胞(图 3; 小鼠细胞内细胞周期蛋白 B1 印迹位于约 45 kDa 处, 小鼠 β 肌动蛋白位于约 40 kDa 处)。提示 pAS-mCLB1 有效抑制了细胞小鼠细胞周期蛋白 B1 基因的表达。

2.4 细胞异常形态学改变

2.4.1 倒置相差显微镜 倒置相差显微镜观察活细胞形态, 与 pcDNA3.1(+) 组(图 4A) 比较, pAS-mCLB1 组(图 4B) 存活力显著下降, 死细胞明显增多, 多数细胞贴壁能力下降, 出现皱缩、变圆、脱落, 高倍见不少细胞形态异常, 呈圆形或不规则形, 细胞体

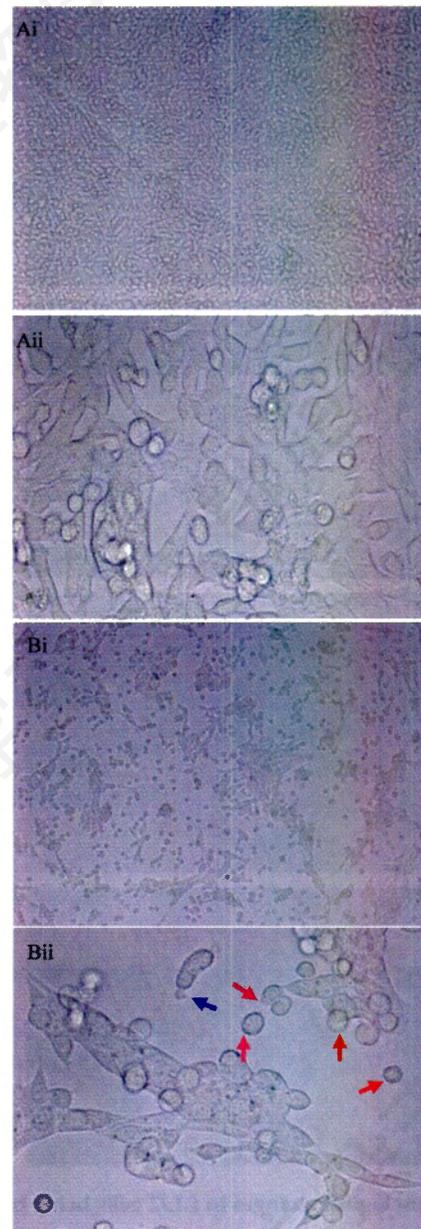


Fig.4; Morphological changes in LL/2 cells being transfected with pAS-mCLB1 as observed by inverted phase contrast microscope (i: 40 \times ; ii: 400 \times)

Compared with LL/2 cells transfected with pcDNA3.1(+) (A), the proliferation of cells transfected with pAS-mCLB1 (B) are inhibited obviously, many dead cells are found in the field of vision, the ability of adherent is weakened, a lot of cells are changed to round or abnormality in shape, and the membranes appear signs of "blebbing" (red arrow). The blue arrow hints an "apoptotic" body probably.

积缩小, 表面不光滑, 似有“出芽”或“起泡”现象(Bii, 红箭头所指处), 部分细胞似可见“凋亡小体”(Bii, 蓝箭头所指处)。

2.4.2 扫描电镜 pcDNA3.1(+) 组 LL/2 细胞有丰富的微绒毛和丝状伪足, 细胞之间的黏附性强(图 5

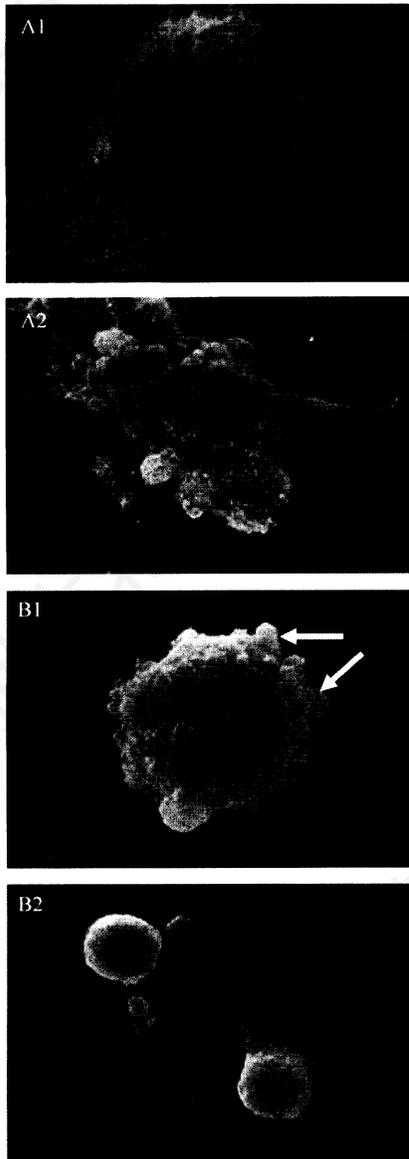


Fig.5; Morphological changes in LL/2 cells being transfected with pAS-mCLB1 as observed by scanning electron microscope (A) LL/2 cells being transfected with pcDNA3.1(+) have many microvilli and pseudopodia. A close connection between cells was shown (A1: 5150 \times ; A2: 1000 \times). (B) LL/2 cells being transfected with pAS-mCLB1 have few microvilli or pseudopodia on their surface and the membranes showed signs of blebbing (arrow). The connection between cells was incompact (B1: 4980 \times ; B2: 2290 \times).

A); pAS-mCLB1 转染组细胞伪足和微绒毛明显减少, 表面突出起泡(箭头), 部分脱落形成膜包裹的小体, 疑为凋亡小体, 细胞之间的黏附性明显降低(图 5 B)。

2.5 细胞增殖活性明显降低

MTT 检测结果显示转染 pAS-mCLB1 的细胞增殖活性比 pcDNA3.1(+) 及 E-Lip 两对照组均明显下降, 其中比 pcDNA3.1(+) 组下降了 44% ($P < 0.01$, 图 6),

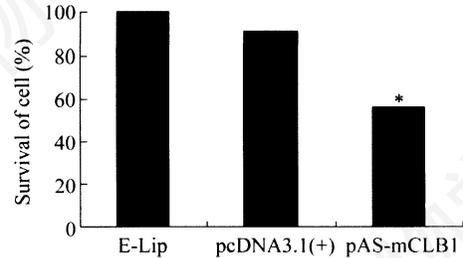


Fig.6 Inhibition of LL/2 cell proliferation by pAS-mCLB1 *in vitro* (* $P < 0.01$)

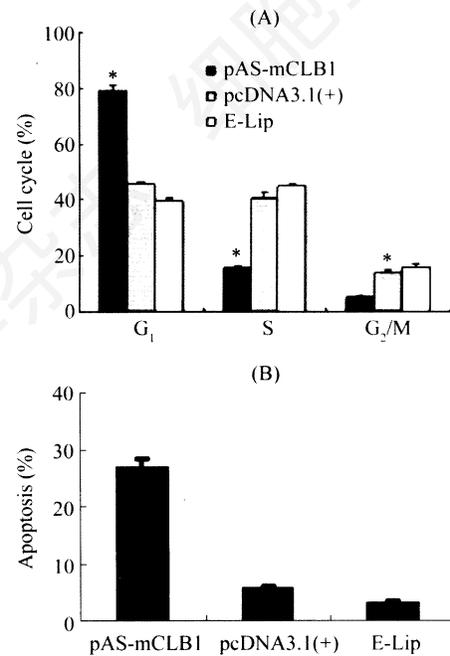


Fig.7 Flow cytometric analysis of cell cycle (A) and apoptosis (B) LL/2 cells being transfected with pAS-mCLB1 were induced G₁ arrest and cell apoptosis *in vitro* compared with cells being transfected with pcDNA3.1(+) and cells treated with E-Lip. * $P < 0.01$.

Table 1 DNA flow cytometric analysis of cell cycle and apoptosis (100%)

Group	G ₁	S	G ₂ /M	Apoptosis
pAS-mCLB1	79.0 \pm 2.2*	15.6 \pm 0.7*	5.4 \pm 0.2*	27.1 \pm 1.2*
pcDNA3.1(+)	45.5 \pm 0.7	40.6 \pm 2.1	13.9 \pm 0.8	5.7 \pm 0.4
E-Lip	39.7 \pm 0.6	44.6 \pm 1.0	15.6 \pm 1.3	3.2 \pm 0.4

∗ ∗ Compared with groups of E-Lip (Empty Lipofectamine 2000) and pcDNA3.1(+), * $P < 0.01$; Comparing between the group of E-Lip and the one of pcDNA3.1(+), $P > 0.05$.

提示 pAS-mCLB1 下调细胞周期蛋白 B1 基因表达后可使肿瘤细胞增殖活性显著下降。

2.6 流式检测提示细胞出现 G₁ 期阻滞及凋亡增加

流式细胞仪检测显示转染 pAS-mCLB1 的 LL/2 细胞, 其细胞周期发生变化, 出现 G₁ 期阻滞且细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$), 而 E-Lip 和 pcDNA3.1(+) 两对照组

Table 2 The inhibition of proliferation in LL/2 cells induced by the combination of pAS-mCLB1 and gemcitabine

Group	Inhibiting rate of cells (IR; %)		
	1 h	12 h	24 h
pAS-mCLB1	16.12±1.78	31.57±3.29	42.18±2.89
Gemcitabine	23.96±2.77	42.23±3.27	53.25±4.16
pAS-mCLB1+ gemcitabine	42.36±2.28*	69.56±2.58*	86.28±3.17*

Compared with groups of pAS-mCLB1 and gemcitabine, * $P < 0.05$.

在 G_1 期阻滞且细胞凋亡率方面无明显差异($P > 0.05$) (表 1, 图 7)。

2.7 pAS-mCLB1 增强 LL/2 细胞对健择的化疗敏感性

表 2 示 pAS-mCLB1 质粒转染 + 健择组 LL/2 细胞的生长抑制率显著高于单用 pAS-mCLB1 组($P < 0.05$)和单用健择组($P < 0.05$)。根据金氏法^[12]测定的各时间点的 q 值均大于 1, 表明 pAS-mCLB1 与健择联合具有协同作用, 即转染 pAS-mCLB1 后 LL/2 细胞对健择的敏感性提高, 也即健择对肿瘤细胞的杀伤作用增强, pAS-mCLB1 具有化疗增敏性。

3 讨论

细胞周期蛋白 B1 是有丝分裂期(M期)细胞周期蛋白, 可促进细胞越过 G_2/M 限制点, 启动有丝分裂, 在肿瘤组织中普遍高表达, 该蛋白质作为一种细胞周期进程调节剂在肿瘤细胞内的表达量是判断肿瘤恶性程度高低的指标之一, 目前已被视为癌基因^[1,2]。反义技术利用反义分子使特异基因的 mRNA 转录、前体剪接和 / 或蛋白质翻译受阻而干预基因的表达^[3,4]。反义技术中, 与反义寡核苷酸(AS-oligo)及 siRNA 不同, 反义全长 cDNA (AS-cDNA) 无需为获得有效靶序列而进行反复筛选, 是反义技术中一种较简便的下调靶基因功能的方法^[5]。另外, 如何提高肿瘤细胞化疗敏感性、降低化疗药物毒副作用是恶性肿瘤治疗上人们普遍关心的问题, 许多基因疗法都可以提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[7]。但应用细胞周期蛋白 B1 的 AS-cDNA 重组质粒(pAS-mCLB1)下调 LL/2 细胞中该蛋白质的表达, 观察其抗肿瘤作用, 进而分析其对肿瘤细胞化疗增敏性的研究尚未见报道。

由此本研究将前期研究^[6]构建的 pAS-mCLB1 质粒体外转染 LL/2 细胞, 检测细胞内细胞周期蛋白 B1 的表达、增殖活性、细胞周期及凋亡, 观察细胞形态学改变, 分析该质粒体外抗肿瘤作用及其机制, 同时用化疗药物健择处理 pAS-mCLB1 转染后的 LL/2 细

胞, 分析细胞化疗敏感性的变化, 为后续研究提供理论依据及实验基础。

研究提示 pAS-mCLB1 明显下调 LL/2 细胞的细胞周期蛋白 B1 表达(图 2, 图 3), 对 pcDNA3.1(+) 和 pAS-mCLB1 两组细胞的处理方法, 除 pAS-mCLB1 质粒含反义全长小鼠细胞周期蛋白 B1(AS-mCLB1)外, 其余均一致, 提示 pAS-mCLB1 对蛋白质表达的抑制作用是通过 AS-mCLB1 下调细胞周期蛋白 B1 基因 mRNA 水平而实现的。其表达下调导致细胞发生 G_1 期阻滞及凋亡(表 1, 图 7); 出现明显的形态学改变, 细胞存活力下降, 光镜下见细胞出现皱缩、变圆、脱落, 体积缩小, 表面不光滑, 似有“起泡”等现象, 部分细胞似可见“凋亡小体”, 扫描电镜也显示细胞伪足和微绒毛明显减少, 表面突出起泡, 部分脱落形成膜包裹的小体, 疑为凋亡小体, 细胞间的黏附性明显降低等异常表现(图 4, 图 5); MTT 检测提示 LL/2 细胞增殖活性下降(图 6)。可见, pAS-mCLB1 具有明显的肿瘤抑制作用。另外, 研究还提示 pAS-mCLB1 转染 LL/2 细胞后, 健择对细胞的杀伤作用显著增强, 根据金氏法^[12]评价其疗效, 表明二者联合具有协同作用, 即 pAS-mCLB1 具有化疗增敏性。

如上所述, 本研究中发现 pAS-mCLB1 下调 LL/2 细胞的细胞周期蛋白 B1 水平导致细胞出现 G_1 期阻滞及凋亡, 这一结果与其他有关下调细胞周期蛋白 B1 水平导致细胞发生 G_1 期阻滞的研究^[13]以及促使凋亡增加的研究^[14]结论一致。不少研究认为, 虽然细胞周期蛋白 B1 为 M 期细胞周期蛋白, 作用于 G_2/M 检验点以启动有丝分裂, 但其水平下调对细胞周期的影响, 与蛋白质功能改变产生的综合作用有关, 细胞有可能出现除 G_2/M 期以外的其他时期的周期阻滞^[14]; 也有研究者提出一些肿瘤细胞系可以出现细胞周期蛋白 B1 非计划性表达(unscheduled expression) 于 G_1 期, 而不仅仅局限于 G_2/M 期^[15], 故细胞周期蛋白 B1 除了启动有丝分裂这一功能外还可能具有促进细胞越过 G_1/S 限制点的作用, 因此一旦其功能发生障碍, 细胞即可能发生 G_1 阻滞; 本研究中 LL/2 细胞发生的 G_1 期阻滞可能与上述机制相关。而细胞周期蛋白 B1 水平下调与凋亡的关系, 不少学者提出其下调本身就能够促进细胞凋亡^[14], 机制可能为细胞周期蛋白 B1 除启动有丝分裂外, 在有丝分裂过程中仍具有其他重要生物学功能, 如促使细胞分裂顺利完成^[16]等, 如该蛋白质水平一定程度下调, 可能会抑制已经进入有丝分裂期的细胞进一步完成分裂, 进而触发凋亡^[14]; 同

样,本研究应用 pAS-mCLB1 下调 LL/2 细胞周期蛋白 B1 水平及功能,导致细胞出现了类似凋亡的异常形态学改变,细胞流式检测也提示凋亡增加。

由于 LL/2 细胞大多数被阻滞于 G₁ 期,不能越过 G₁ 检验点进行 DNA 合成,更无法进一步启动有丝分裂进行分裂增殖;已进入有丝分裂的 LL/2 细胞由于细胞周期蛋白 B1 功能下调,细胞难以完成分裂而触发凋亡,增殖进一步受抑。可见,诱导 G₁ 期阻滞及凋亡是 pAS-mCLB1 最可能的抗肿瘤机制。类似的是,化疗药物健择亦通过抑制细胞 DNA 合成而发挥其细胞毒作用,该药物在细胞内经过核苷激酶作用转化为其活性成分 dFdCDP 和 dFdCTP,并通过二者抑制 DNA 合成,故 pAS-mCLB1 可能通过诱导 G₁ 期阻滞,抑制细胞 DNA 合成等作用而增强健择的细胞毒性,实现其化疗增敏性。

总之,本研究揭示了应用 pAS-CLB1 进行肿瘤基因治疗的可行性,初步探讨了其抗肿瘤及化疗增敏机制,

为将其用于临床抗肿瘤研究提供了一定的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Soria JC *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 4000
- [2] Porter LA *et al. Blood*, 2000, **95**: 2645
- [3] Agrawal S *et al. Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2**: 519
- [4] Weiss B *et al. Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**: 334
- [5] Kornmann M *et al. J Clin Invest*, 1998, **101**: 344
- [6] 张 伶等. *华西口腔医学杂志*, 2005, **23**: 80
- [7] Lee WP *et al. Cancer Res*, 2003, **63**: 6229
- [8] 章静波等. *组织和细胞培养技术*, 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [9] 张 伶等. *细胞生物学杂志*, 2006, **28**: 701
- [10] 萨姆布鲁克等. *分子克隆实验指南*, 第 3 版, 北京: 科学出版社, 2002
- [11] 张 伶等. *四川大学学报医学版*, 2005, **36**: 464
- [12] 金正均. *中国药理学报*, 1980, **1**: 70
- [13] Maier TJ *et al. Biochem Pharmacol*, 2004, **67**: 1469
- [14] Yuan J *et al. Oncogene*, 2004, **23**: 5843
- [15] Darzynkiewicz Z *et al. Cytometry*, 1996, **25**: 1
- [16] Addinall SG *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 15939

Recombined Plasmid of Full-length Cyclin B1 Antisense cDNA Inhibits Lewis Lung Carcinoma Cell Proliferation and Renders Cells More Sensitive to Gemcitabine *in Vitro*

Ling Zhang^{1,2}, Yu-Quan Wei², Ying Song¹, Lei Jiang¹, Ping Chen², Xian-Cheng Chen², Ji-Cheng Li^{1*}

¹Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

²State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Study the effect of recombined plasmid of full-length mouse cyclin B1 antisense cDNA (pAS-mCLB1) inhibiting tumor cell proliferation and rendering cells more sensitive to gemcitabine *in vitro*. After being amplified and purified, pAS-mCLB1 was transfected into Lewis lung carcinoma (LL/2) cells using lipofectamine 2000. mRNA content of mCLB1 was semi-quantitatively assayed using RT-PCR. Morphological changes of cells were viewed through inverted phase contrast and scanning electron microscope. The inhibition of cell proliferation was estimated by MTT assay. Cell cycle and apoptosis of LL/2 cells were determined through flow cytometry. After 48 h being transfected with pAS-mCLB1, cells were treated with gemcitabine (0.2 μmol/L) for 24 h, and then the cytotoxicity of gemcitabine was measured by MTT assay. Prominent G₁ arrest and apoptosis were shown and abnormal morphology with inhibition of cell growth appeared in the cells transfected with pAS-mCLB1 in which evident down-regulation of mCLB1 was induced. Additionally, cytotoxicity of gemcitabine to LL/2 cells transfected with pAS-mCLB1 was more obvious than controls. pAS-mCLB1 could suppress tumor cell proliferation and increase cell sensitivity to gemcitabine *in vitro*, which may be associated with its ability to down-regulate the expression of mCLB1 and then induce G₁ arrest and cell apoptosis in tumor cells.

Key words antisense cDNA; cyclin B1; cell cycle arrest; apoptosis; chemosensitivity