

肝癌细胞凋亡相关基因分析

周 凡

天津医科大学 天津

【摘要】目的 探讨分析肝癌细胞的凋亡基因，并分析相应的基因序列，探讨三氧化二砷对肝癌细胞凋亡产生分子机制。**方法** 本次研究在实验时采用三氧化二砷对人肝癌 HCC-9204 细胞进行诱导凋亡，并采用抑制性消减杂交技术，对凋亡细胞中的差异性表达，cDNA 进行克隆，针对已知基因序列进行对比分析同源特点。**结果** 在本次研究结果中，克隆到 18 个与已知基因有高度同源性的 cDNA 序列其中的基因组控制类型包括抗氧化损伤、线粒体跨膜运输细胞骨架以及系统相关基因。**结论** 三氧化二砷诱导的肝癌 HCC-9204 细胞出现凋亡后，大量的基因表达出现上调的特征，而这些基因与三氧化二砷处理肝癌系细胞后的应激反应与细胞凋亡有密切的关联性，针对本次研究结果进行判断，提示细胞凋亡具有多基因参与的特征，受到诸多基因类型的调控是一个极为复杂的过程。

【关键词】 肝癌；细胞凋亡；基因类型；研究分析

Analysis of Apoptosis-Related Genes in Hepatocellular Carcinoma Cells

Fan Zhou

Tianjin Medical University, Tianjin

【Abstract】Objective To explore and analyze the apoptosis genes of liver cancer cells, analyze the corresponding gene sequence, and explore the molecular mechanism of arsenic trioxide on the apoptosis of liver cancer cells. **Methods** In this study, arsenic trioxide was used to induce apoptosis of human liver cancer HCC-9204 cells, and the differential expression in apoptotic cells was cloned by using inhibitory subtractive hybridization technology. Comparative analysis of homology characteristics. **Results** In this study, 18 cDNA sequences with high homology to known genes were cloned. The types of genome control include anti-oxidative damage, mitochondrial transmembrane transport cytoskeleton and system-related genes. **Conclusion** After arsenic trioxide-induced apoptosis of liver cancer HCC-9204 cells, a large number of gene expressions are up-regulated, and these genes are closely related to the stress response and apoptosis of liver cancer cells after arsenic trioxide treatment. Judging from the results of this study, it is suggested that apoptosis is characterized by the participation of multiple genes, and it is an extremely complex process that is regulated by many gene types.

【Keywords】 liver cancer; apoptosis; gene type; research analysis

肝癌的发生与多方面因素密切相关，这也是目前我国发病率较高的一个恶性肿瘤，在临床上针对肝癌进行治疗的相关研究，已经成为临床研究的一项重点内容。三氧化二砷是中药中砒霜的主要成分，而在我国的中医治疗理念中已经得到了千年的应用，近年来国内开始将三氧化二砷应用于急性早幼粒细胞白血病的治疗中，并且在临床基础研究和临床治疗等多个方面取得了引人注目的进展，大量临

床研究显示，诱导细胞分化和细胞凋亡是三氧化二砷针对急性早幼粒细胞白血病治疗的主要机制，而也有相关研究报道，显示三氧化二砷能够对多株肝细胞凋亡产生标王的作用，但相关研究中针对其作用机制还尚不明确。研究人员在近年来逐渐将抑制性消减杂交技术应用于其中，通过克隆凋亡肝癌 HCC-9204 细胞差异性表达，指在通过这一实验揭示将三氧化二砷应用于肝癌细胞凋亡诱导中的效果。

探讨分析肝癌细胞的凋亡基因，并分析相应的基因序列，探讨三氧化二砷对肝癌细胞凋亡产生分子机制。

1 资料和方法

1.1 一般资料

Polya tract system 1000 试剂盒为 Pro-mega 公司产品；PCR-select cDNA subtraction 试剂盒、50 x PCR enzyme mix，PT-Adv 质粒为 Clontech 公司产品，感受态大肠杆菌 JM109，EcoR I 为宝泰生物公司产品，氨苄青霉素，X-gal，IPTG 均为 Gibco 公司产品。人肝癌细胞株 HCC-9204 细胞，则由本实验室医务人员进行建株。

1.2 方法

在进行细胞培养时，研究人员采用 100ml/L 牛血清的 RPMI1640 培养液进行培养，在 37 摄氏度的环境下，将 HCC-9204 细胞在培养箱中进行常规培养。在培养时培养肝癌细胞脂质细胞发育为对数，生长期在这一时期内加入含有 1umol/L 的三氧化二砷的培养基对其进行继续培养，培养时间控制在 48 小时，由医务人员在培养过程中诱导细胞凋亡。

在进行数据处理时，研究人员收集未进行处理的 HCC-9204 细胞以及接受凋亡处理的 HCC-9204 细胞共 1×10^8 ，并在进行处理时按照 Polya tract System 1000 试剂盒的说明书对开展 mRNA 的提取，在获得 mRNA 后，通过反转录的形式进一步合成双链 cDNA，在进行实际处理时，按照未凋亡的肝癌细胞 ds cDNA 作为参与方而凋亡的肝癌细胞，则作为实验方进行抑制消减杂交。研究人员在进行实际处理时，需要按照相应的说明书和文件做出对应的调整。

1.3 统计学处理

在本次研究中研究人员采用 FoxPro 建立数据库后采用软件 SAS6.12 进行数据统计分析，记录结果。

2 结果

在本次研究结果中显示研究人员对杂交产物转化大肠杆菌进行消减后，本次研究结果中出现 250 个白色克隆以及 40 个蓝色克隆，在结果中显示克隆结果清晰饱满，并且研究人员在结果中随机挑选 200 个白色克隆作为研究对象，提取其中的质粒 DNA。采用酶切处理方式发现 167 个克隆结果中，大小大约为 100~600bp，插入片段在研究结果中与理论设

计基本一致。在进行处理后，随机将 30 个片段插入其中，并根据最终结果作出相应的调整。进行 Reverse northern blot，21 个被证实为三氧化二砷处理肝癌细胞后上调表达的 cDNA 序列。经基因库检索发现其中 18 个与已知基因序列高度同源（Tab 1）。

3 讨论

肝癌在目前临床上属于一种较为常见的恶性肿瘤，肝癌泛指发生于肝脏的恶性肿瘤，其中包含原发性肝癌和转移性肝癌两种不同的类型，就目前来说，全世界每年新发肝癌患者数量达到 60 多万，居恶性肿瘤的第 5 位，肝癌在我国属于一种高发疾病，一般情况下，男性患者数量相较于女性患者来说明显更高，目前我国的肝癌发病人数占到全球总发病人数的一半以上。这已经成为威胁我国普通居民生活和身体健康的一大危险，需要引起相关工作人员的高度重视，尤其是肝癌这种疾病，在初发病期并不会出现明显的症状，所以当患者有明显的症状时，患者的疾病已经进入中晚期，如何在肝癌早期发现并对患者进行有效的治疗，成为了现代医务研究人员的研究热点。原发性肝癌的发病几率以及死亡率都在呈现出不断上升的趋势，对于肝癌患者的早期诊断和预防之上都具有十分重要的意义。原发性肝癌的发病原因和机制并没有完全说明，相关学者调查表明，可能与饮酒和食物以及饮水、病毒性肝炎、遗传因素等有关，基本病因：原发性肝癌的致病危险因素严重影响肝细胞的 DNA，进而导致细胞异常生长，引起癌症，其中 HBV 与 HCV 感染就是常见的危险因素。在进行研究时，通过消减杂交技术构建了肝癌细胞凋亡表达呈现的 cDNA 差异文库，研究结果中发现三氧化二砷所诱导的肝癌细胞，在出现凋亡后大量基因表达出现上升，在已经测序的 cDNA 中约有 18 个与已知基因呈现高度同源的特征，目前在进行研究时结果包括抗氧化损伤相关蛋白基因、与线粒体有关的基因以及溶酶体 ATP 基因和细胞骨架相关蛋白基因。

研究发现通过三氧化二砷针对肝癌 HCC-9204 细胞进行处理后，血红素氧化酶 1 金属硫蛋白 2A 等相关的基因表达出现上升的特征。血红素氧化酶 1 是一个 Mr 为 32000 的微粒体酶。催化亚铁血红素将其转变为胆绿素，在这一过程中会释出一氧化碳。

二小松鼠又属于一种可诱导蛋白,在细胞受到外界刺激的情况下会消除,可能对细胞产生毒性作用的亚铁血红素。金属硫蛋白属于一种富含半胱氨酸的小分子蛋白,并且在使用时能够在一定程度上避免细胞受到氧化损伤的情况。再进行本次研究时,研究人员在处理的过程中所使用的三氧化二砷整体浓度较低,并且作用时间相对较长,但在这一过程中细胞始终处于氧化损伤的刺激之中,而为了对抗这一损伤的产生,细胞会在整个过程中启动自我保护机制,在这一过程中,细胞始终处于氧化损伤的整个刺激中,而为了对抗这一损伤的产生细胞,会在这一过程中自我保护机制,血红素氧化酶 1 金属硫蛋白 2A 从蛋白基因的表达量会出现明显的上升,所以在研究时推测,细胞在受到外界的氧化损伤时,第一反应会主动通过自身的机制消除这一损伤,因此相关的蛋白,例如本文中提到的血红素氧化酶 1 金属硫蛋白 2A 等基因都会大量表达,与此同时在损伤的不断累积下,细胞的清除能力则会逐渐消除这种现象,会导致其朝着凋亡或者死亡的方向发展。

在研究中,通过针对克隆所获得的 cDNA 片段进行评价,ATP 合成为基因与线粒体外膜受体的 Tom20 基因与线粒体具有密切的功能关联性,虽然通过这一调查,基本没有明确细胞凋亡的整个过程与信号传导的过程,但通过这一研究已经基本发现了两个不同的路径。分别为线粒体依赖路径以及线粒体非依赖路径。线粒体非依赖路径,在凋亡控制时,主要通过死亡受体进行激活,进而导致细胞凋亡,而线粒体依赖性路径则是通过线粒体释放细胞质中。一种不同的凋亡刺激都会在一定程度上引发 cytc 的释放。

综上,在本次研究结果中显示细胞色素 P4501 A1 突变型、基因型是肺癌的一个重要易感因素,相关研究人员可通过基因诊断的方式确定患者是否存在肺癌高危情况对于患者的后续治疗以及日常生活的管理来说,有十分积极的指导作用,对于提高人群的健康水平来说不可忽视。

参考文献

[1] 鞠宝玲,海艳洁,鄂志野,张红军. miRNA - 193a - 3p 靶向

TGF - β 2 基因诱导肝癌细胞凋亡的分子机制研究[J]. 中国现代医生,2022,60(20):1-5.

- [2] 陈科彦,何海洪,柯娟玉,余惠君,张立俊,王静,周义文. Survivin 基因在肝癌细胞增殖、凋亡过程中的表达及意义[J]. 海南医学,2021,32(04):409-412.
- [3] 鲁斌,程敏,周凡. Bad 联合 Caspase-8 促凋亡基因共表达对 SK-HEP-1 肝癌细胞体外增殖、凋亡、迁移和体内成瘤影响的实验研究[J]. 实用医学杂志,2020,36(08):1030-1034.
- [4] 冯桂银,张庚,王海伦,梁东启,袁媛,樊艳. SOX7 基因对肝癌细胞凋亡、氧化应激及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2019,44(07):846-849+854.
- [5] 王浩南,李康,闫融,陈威,孙团鹤,王璇,朱琨,党诚学. 通过 Crispr-cas9 介导抑制 KIAA0101 基因可诱导肝癌细胞凋亡[J]. 山西医科大学学报,2019,50(06):709-714.
- [6] 张俊,薛新波,申铭,郑建伟,肖朝文. lmda-7/IL-24 基因致肝癌细胞凋亡及增强其对 ADM 化疗敏感性的机制研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(84):3-5+13.
- [7] 李波,刘峰舟,刘明莉,李嘉琦,杨懿,宋子煜,张洪新,牟佼. NPAS2 基因敲除的 HepG2 细胞系构建及其对肝癌细胞凋亡的影响[J]. 现代生物医学进展,2017,17(29):5618-5622.
- [8] 肖朝文,王从俊,李明杰,蔡常春,郑建伟,申铭. 携带人黑色素瘤分化相关基因-7/白细胞介素-24 基因的溶瘤腺病毒 SG600-IL24 选择性促进肝癌细胞凋亡和增殖阻滞[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(07):1091-1094.

收稿日期: 2021 年 11 月 12 日

出刊日期: 2021 年 12 月 12 日

引用本文: 周凡, 肝癌细胞凋亡相关基因分析[J]. 国际遗传前沿杂志, 2021, 2(1):1-3

DOI: 10.12208/j.ijgf.20210001

检索信息: 中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2021 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS