

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000765

腺病毒介导人 ATF6 基因修饰对体外细胞增殖凋亡的实验研究

韩晓凤, 李美玲, 夏 飞, 张 鹏, 郭风劲

(重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室/发育生物学与模式动物平台, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建携带人活化转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)的重组腺病毒 Ad-ATF6 和 Ad-ATF6 siRNA, 并探讨内质网应激(ER Stress, ERS)时其对骨肉瘤细胞 SW1353 增殖凋亡的影响。**方法:**将 ATF6 基因序列与靶向 ATF6 的 siRNA 序列分别克隆到 pAdTrack-cmv 和 pSES-HUS 穿梭质粒上, 然后分别与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 感受态中同源重组, 得到腺病毒重组质粒 pAd-ATF6 和 pAd-ATF6 siRNA, 通过脂质体介导在 HEK293 细胞中进行包装和扩增。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测病毒效果。流式细胞仪法(flow cytometry, FCM)、MTT 法及 Western blot 检测 ERS 状态下 ATF6 对 SW1353 细胞增殖凋亡的影响。**结果:**成功获得了重组腺病毒 Ad-ATF6 和 Ad-ATF6 siRNA。RT-PCR 和 Western blot 结果表明, 重组腺病毒能有效的感染细胞。FCM 检测结果表明, ERS 条件下, ATF6 感染组 S 期细胞比例明显升高, 凋亡率明显降低($P=0.000$); Ad-ATF6 siRNA 感染组 S 期细胞比例明显降低, 凋亡率明显上升($P=0.000$)。MTT 与 Western blot 实验结果与 FCM 结果一致。**结论:**ERS 状态下, ATF6 能促进 SW1353 细胞的增殖, 抑制其凋亡。

【关键词】活化转录因子 6; 重组腺病毒; SW1353 细胞; 增殖和凋亡

【中图分类号】R394.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-01-08

Study on cell proliferation and apoptosis by human ATF6 gene adenovirus modification *in vitro*

Han Xiaofeng, Li Meiling, Xia Fei, Zhang Peng, Guo Fengjin

(Teaching and Research Section of Cell Biology and Genetics, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the adenovirus vector containing human activating transcription factor 6(ATF6) gene and to study the effects on the proliferation and apoptosis of SW1353 cells in the stress condition. **Methods:** The ATF6 gene and the siRNA sequence targeting ATF6 gene were respectively cloned into the shuttle plasmid pAdTrack-cmv and pSES-HUS, and then were homogenously recombined with the adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1 in Ecoli BJ5183 to generate the adenovirus vector pAd-ATF6 and pAd-ATF6 siRNA. The recombinant adenovirus vector was transfected into the 293 packing cells by lipofectamine-mediated transfection to amplify the recombinant adenovirus Ad-ATF6 and Ad-ATF6 siRNA. The SW1353 cells were infected with the adenovirus and the expression levels of ATF6 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot. The effects of the recombinant adenovirus on the proliferation and apoptosis of SW1353 in the stress condition were detected by FCM, MTT and Western blot. **Results:** The recombinant adenovirus Ad-ATF6 and Ad-ATF6 siRNA with high infection were successfully obtained. FCM analysis showed that under stress condition, the S phase of SW1353 cells in the Ad-ATF6 group was increased significantly ($P=0.000$), and the apoptosis rate was decreased significantly ($P=0.000$) as compared with those of control group. Meanwhile the results of siATF6

作者介绍:韩晓凤, Email: hanxf369@163.com,

研究方向: 细胞生物学与遗传学。现工作单位: 重庆市中医院皮肤科。

通信作者:郭风劲, Email: guo.fengjin@gmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 81371928, 81171697); 教育部优秀人才支持计划资助项目(编号: NCET-12-1090); 人力资源和社会保障部留学回国人员择优资助项目(编号: 2011-235)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150910.1826.016.html>

(2015-09-10)

groups were on the control. The MTT results and Western blot results were in accordance with that of FCM. **Conclusion:** Under stress condition, ATF6 may promote the proliferation of SW1353 cells and suppress its apoptosis.

【Key words】activating transcription factor 6; RNA interference; recombinant adenovirus; SW1353 cells; proliferation and apoptosis

软骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤之一,在骨肉瘤中约占 25%,从缓慢生长的非转移性病灶到高度侵袭性转移性肉瘤,具有不同的特点和发展模式^[1-2]。其基质肿瘤的形成完全是软骨性质的,主要成分是软骨化、钙化软骨和骨肿瘤性软骨细胞。原发性软骨肉瘤可分为普通髓腔型、去分化型、透明细胞型、骨膜(皮质旁)型、黏液型和间充质型等几类亚型^[3]。近年来,软骨肉瘤的研究已经涉及到多个学科领域,包括分子生物学、分子遗传学和免疫病理学等^[4],越来越多的研究表明,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与软骨肉瘤有着密切的关系。

ATF6 是内质网膜上的非常重要的跨膜分子之一,当真核细胞处于 ERS 状态时,为了生存,细胞会产生未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),此时,ATF6 被激活而与葡萄糖调节蛋白(glucose regulated protein, GRP78)解离,在高尔基体中被蛋白酶 S1P 和 S2P 剪切成转录活性分子^[5-7],转移至细胞核进行调节,使细胞恢复正常。当细胞处于严重和持续的内质网应激时,前细胞凋亡因子 CHOP(C/EBP-homologous protein)被激活,最终诱导细胞凋亡^[8]。

本研究构建了重组腺病毒 Ad-ATF6 和 siATF6,研究衣霉素(tunicamycin, TM)诱导 ERS 状态下,ATF6 对人普通软骨肉瘤细胞系 SW1353 增殖和凋亡的影响,为进一步研究 ATF6 在人软骨肉瘤中的作用奠定了理论基础,也为软骨肉瘤的治疗提供了一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌、质粒和细胞 大肠杆菌 DH5 α 和 BJ5183、pcDNA3.1(-)-ATF6 质粒、穿梭质粒 pSES-HUS 和 pAdTrack-CMV、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 以及 HEK293 细胞、SW1353 细胞株均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Sfi* I、*Kpn* I、*EcoR* V、*Xho* I、*Hind* III、Taq 聚合酶、T4DNA 连接酶、dNTP、DNA Marker、RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I(美国 New England Biolab 公司);DNA 胶回收纯化试剂盒和质粒小量提取试剂盒(美国 Omega 生物技术公司);脂质体 Lipofectamine™ 2000 和 TRIZOL(Invitrogen 公司);衣霉素 TM(美国 Sigma 公司),Cleaved Caspase3 抗体、Chop 抗体和 ATF6 抗体(Santa Cruz 公司),鼠抗 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记的抗兔和抗鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物);DMEM 培

养基及胎牛血清(Hyclone 公司);SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究)。siRNA 序列由 Invitrogen 公司合成,测序由上海华大基因有限公司完成。

1.2 Ad-ATF6 与 si-ATF6 重组腺病毒的构建及鉴定

1.2.1 重组腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS-ATF6 siRNA 的构建 根据本研究室设计和构建的靶向 ATF6 的 siRNA 及抑制率检测与鉴定^[10],选择抑制率最高的 ATF6 siRNA 序列:正义链:5'-AGCACCCAAGACTCAAACAATTTT-3',反义链:5'-ATT-GTTTGAGTCTTGGGTGCTTTT-3'。将靶向 ATF6 的干扰序列退火成双链 DNA 片段后,克隆到经 *Sfi* I 酶切、纯化后的 pSES-HUS 穿梭质粒中,转化大肠杆菌 DH5 α ,在含卡那霉素抗性的 LB 平板上培养过夜,挑选阳性克隆,提质粒,用 *Kpn* I 和 *EcoR* V 双酶切鉴定,阳性克隆被 *Kpn* I 单酶切,而 pSES-HUS 空载则被双酶切成 1.8 kb 和 6.8 kb 左右的 2 个片段。将得到重组穿梭载体 pSES-HUS-ATF6 siRNA,送上海华大基因有限公司测序。另一种 ATF6 过表达重组腺病毒 Ad-ATF6 的构建已经由本实验室完成,其空白对照为绿色荧光腺病毒 Ad-GFP,见参考文献^[9]。

1.2.2 重组腺病毒质粒 pAd-ATF6 siRNA 的构建 用 *Pme* I 酶切重组穿梭质粒 pSES-HUS-ATF6 siRNA,胶回收纯化后,与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 通过电转法共同转化大肠杆菌 BJ5183 感受态,卡那霉素培养基筛选阳性克隆,提质粒,再用 *Pac* I 酶切鉴定。将鉴定正确的质粒转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆扩增,提取质粒,获得 pAd-ATF6 siRNA,备用。该 siRNA 腺病毒的空白对照为红色荧光腺病毒 Ad-RFP。

1.2.3 重组腺病毒 si-ATF6 的包装扩增与病毒滴度测定 将生长良好的 HEK293 细胞按 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5% CO_2 条件下培养。待细胞融合度达到 60%~70%,根据 Lipofectamine™ 2000 Reagent 转染试剂的说明书,将 *Pac* I 酶切回收后的 pAd-ATF6 siRNA 质粒转染到 HEK293 细胞中,于孵箱中继续培养 10~12 d,待大部分细胞变圆脱落,收集细胞,-80 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次,收集重组病毒原液。用病毒原液继续感染 HEK293 细胞,重复上述步骤进行病毒扩增,将获得的第 3 代病毒置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。病毒滴度的测定:将病毒液进行对数稀释,感染融合度为 60%~70%左右的 HEK293 细胞,参照 Kaneto 等^[11]的阳性细胞计数法计算病毒滴度。

1.2.4 重组腺病毒感染 SW1353 细胞 将 SW1353 细胞接种于 24 孔板,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养,待细胞融合度达到 70%左右时,加入不同滴度的红色荧光腺病毒 Ad-RFP 作对照。48 h 后观察细胞荧光,确定最佳感染复数(multi-plicity of infection, MOI)。将重组腺病毒 si-ATF6 以合适的 MOI 感染 SW1353 细胞,并设置空白对照组(NC 组)和红色荧光腺病毒对照组(Ad-RFP 组)。48 h 以后,检测 ATF6 基因的表达。

1.2.5 RT-PCR 检测 SW1353 细胞 ATF6 mRNA 水平的变化 将 SW1353 细胞接种于 6 孔板上,分别加入感染复数为 100

的 si-ATF6 腺病毒液及对照 Ad-RFP 病毒液,48 h 后提取细胞总 RNA,相同处理的细胞收集在同一个管中,并逆转录成 cDNA。然后以 cDNA 为模版,进行 PCR 反应,扩增 ATF6 基因和内参 GAPDH。ATF6 的上下游引物分别是:5'-GAAA-CCAAACCAGCACCT-3'和 5'-TGACCCACAGAACCAACA-3',扩增片段长度 334 bp。内参 GAPDH 的上下游引物分别是:5'-TGAAGGTCTCGGAGTCAACGGATTGGT-3'和 5'-CAT GT-GGGC CAT GAG GTC CAC CAC-3',扩增片段的大小为 983 bp。

1.2.6 Western blot 检测 SW1353 细胞中 ATF6 蛋白水平的变化 si-ATF6 腺病毒感染 SW1353 细胞 48 h 后,RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白,进行 10%SDS-PAGE 分离电泳,湿转法转到 NC 膜上(100 V,1 h),5%的脱脂奶粉封闭 1 h,ATF6 一抗(1:1 000)4 ℃孵育过夜,次日以 TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,于暗室中曝光 5 min。

1.3 检测 ERS 状态下 Ad-ATF6 对 SW1353 细胞增殖和凋亡的影响

1.3.1 FCM 检测 ATF6 对 SW1353 细胞增殖和凋亡的影响 将对数期的 SW1353 细胞接种于 6 孔板,待细胞融合率达 70%左右时,分别感染 si-ATF6、Ad-ATF6 重组腺病毒 24 h,然后加入 2 μg/ml 的 TM 处理 24 h,收集细胞,送往重庆医科大学生命科学院流式检测中心,检测病毒对细胞增殖和凋亡的影响。

1.3.2 MTT 检测 ATF6 对 SW1353 细胞增殖的影响 将生长良好的 SW1353 细胞制成密度为 2×10^4 个/ml 的细胞悬液,以每孔 100 μl 接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,分别感染 si-ATF6 和 Ad-ATF6 24 h,然后用 2 μg/ml 的 TM 处理 24 h,加入 10 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,然后加入 100 μl 溶解液,放入培养箱中继续孵育 4 h 左右,显微镜下观察,待结晶全部溶解于 570 nm 测吸光度(absorbance,A)值。每个样品做 3 个复孔,并设置对照孔和调零孔。

1.3.3 Western blot 检测 ATF6 对 SW1353 细胞凋亡的影响 SW1353 细胞接种于 60 mm 的细胞培养皿,分别感染 si-ATF6 和 Ad-ATF6 重组腺病毒 24 h 后,加 2 μg/ml 的 TM 处理 24 h,提取细胞总蛋白,Western blot 检测与凋亡相关基因 Cleaved Caspase-3 与 Chop 蛋白的表达。

1.4 统计学分析

所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用法,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 pAd-ATF6 siRNA 重组腺病毒的构建和鉴定

Ad-ATF6 构建和鉴定已经完成,结果见参考文献^[9]。重组穿梭质粒 pSES-HUS-ATF6 siRNA 经 *Kpn* I 和 *Eco* R V 双酶切鉴定结果如图 1(A)。阳性克隆被 *Kpn* I 单酶切,而 pSES-

HUS 空载则被双酶切成 1.8 kb 和 6.8 kb 左右的 2 个片段。

重组腺病毒质粒 pAd-ATF6 siRNA 经 *Pac* I 酶切,结果如图 1(B),得到大小分别为 37.6 kb 和 3 kb 左右的 2 个片段,鉴定正确。经滴度测试得到 Ad-ATF6 siRNA 的滴度为 2.4×10^{11} pfu/ml。

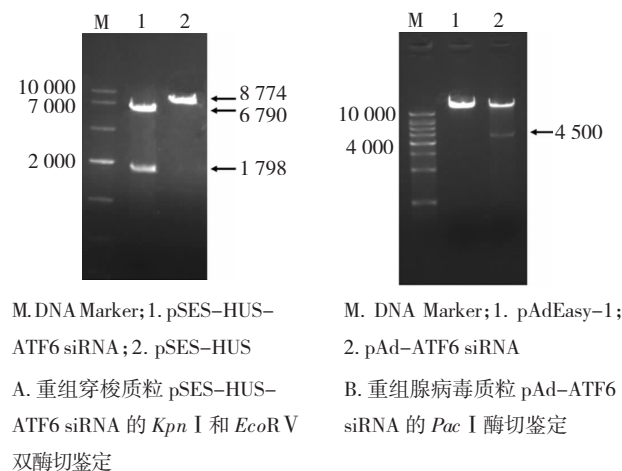
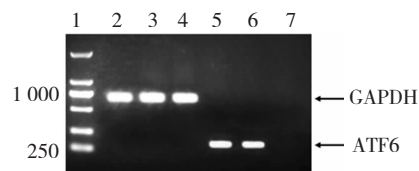


图 1 重组腺病毒质粒的构建

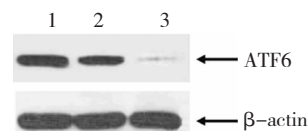
Fig.1 Construction of recombinant adenovirus vector

2.2 siATF6 在 SW1353 细胞中的抑制效果

SW1353 细胞中检测 siATF6 腺病毒的抑制效果,采用 Quantity One 软件对条带进行灰度分析。RT-PCR 结果显示,ATF6/GAPDH 分别为 NC 组 0.693 ± 0.021 ,Ad-RFP 组 0.691 ± 0.009 ,si-ATF6 组 0.020 ± 0.004 ,可见 si-ATF6 处理组细胞的 ATF6 mRNA 水平明显低于其他 2 组 ($F=2415.137, P=0.000$)。Western blot 结果显示,ATF6/ β -actin 分别为 NC 组 0.758 ± 0.092 ,Ad-RFP 组 0.575 ± 0.082 ,si-ATF6 组 0.049 ± 0.009 ,si-ATF6 处理组细胞的 ATF6 蛋白水平明显低于其他 2 组 ($F=80.034, P=0.000$)。说明 SW1353 细胞中 siATF6 腺病毒在转录水平和表达水平都能起到有效的抑制作用(图 2A 和图 2B)。



A. RT-PCR 检测 ATF6 的 mRNA 水平 1. DNA marker; 2 和 5. NC 组;3 和 6. Ad-RFP 组;4 和 7. siATF6 组



1. NC 组;2. Ad-RFP 组;3. si-ATF6 组

B. Western blot 检测 ATF6 的蛋白水平

图 2 siATF6 重组腺病毒抑制率的检测

Fig.2 Determination on the siATF6 inhibition ratio

2.3 ATF6 对 SW1353 细胞增殖的影响

2.3.1 FCM 检测 流式细胞仪检测各组细胞增殖周期结果如图 3,与 NC 组相比,TM 诱导组 S 期的细胞减少,说明细胞处于 ERS 状态。NC 组、TM 诱导组、TM+si-ATF6 处理组和 TM+Ad-ATF6 处理组处于 S 期的细胞比例分别为 47.143 ± 1.516 、 36.160 ± 0.606 、 23.023 ± 2.118 、 46.567 ± 0.760 ,4 组数据具有统计学意义($F=199.040$, $P=0.000$)。两两比较结果显示 TM+si-ATF6 处理组 S 期的细胞比例较 TM 单独处理组明显降低($P=0.000$),TM+Ad-ATF6 处理组 S 期的细胞比例较 TM 单独处理组明显升高($P=0.000$)。结果表明,ERS 状态下,增加 ATF6 可促进细胞的增殖。

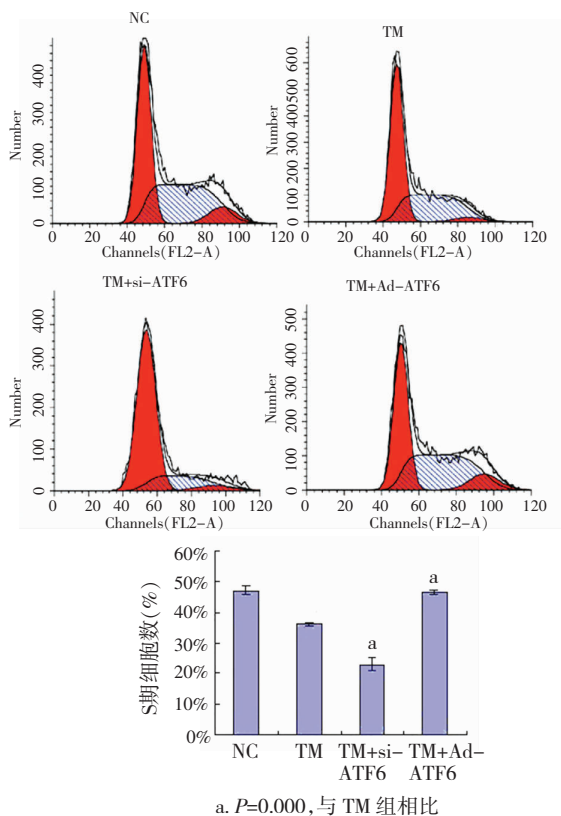


图 3 流式细胞仪检测腺病毒感染 SW1353 细胞后的周期分布

Fig.3 FCM results of SW1353 cell cycle distribution assay

2.3.2 MTT 检测 结果如图 4,NC 组、TM 诱导组、TM+si-ATF6 处理组和 TM+Ad-ATF6 处理组 OD 值分别为 0.659 ± 0.031 、 0.352 ± 0.018 、 0.213 ± 0.015 、 0.610 ± 0.020 。4 组数据具有统计学意义($F=280.825$, $P=0.000$)。与 TM 处理组相比,TM+si-ATF6 感染组 A 值明显降低($P=0.000$),TM +Ad-ATF6 组 OD 值明显上升($P=0.000$)。结果表明,ERS 时,ATF6 可促进 SW1353 细胞的增殖。

2.4 ATF6 对 SW1353 细胞凋亡的影响

2.4.1 FCM 检测 流式检测细胞凋亡结果如图 5 所示,NC 组、TM 诱导组、TM+si-ATF6 处理组和 TM+Ad-ATF6 处理组细胞的凋亡率分别为 6.417 ± 0.271 、 26.417 ± 2.410 、 53.110 ± 2.272 、 8.203 ± 0.480 。4 组数据差异具有统计学意义($F=500.677$, $P=0.000$)。与 TM 组相比,TM+si-ATF6 处理组凋亡率明显增

加($P=0.000$),TM+Ad-ATF6 处理组凋亡率明显降低($P=0.000$)。凋亡结果表明,增加 ATF6 在 ERS 状态下可抑制细胞的凋亡。

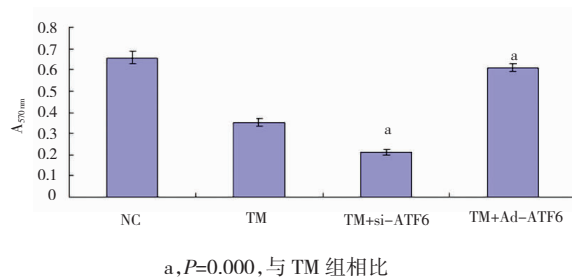


图 4 MTT 法检测 SW1353 细胞的增殖

Fig.4 MTT cellular proliferation assay

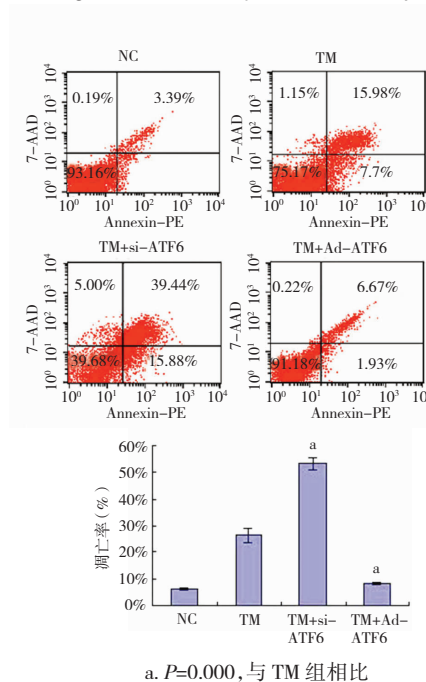
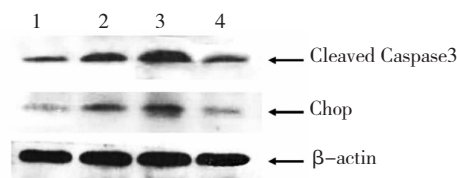


图 5 流式细胞仪检测 SW1353 细胞的凋亡

Fig.5 FCM assay on SW1353 cell apoptosis rate

2.4.2 免疫印迹检测 如图 6 所示,TM+siATF6 处理组 Cleaved Caspase-3 与 Chop 的蛋白水平相对于 TM 组明显增加,差异有统计学意义;而 TM+Ad-ATF6 处理组蛋白水平明显降低,差异具有统计学意义(见表 1)。说明 ERS 状态下,增加 ATF6 可抑制 SW1353 细胞的凋亡。



1. NC 组;2. TM 组;3. TM+siATF6 组;4. TM+Ad-ATF6 组

图 6 Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白的表达

Fig.6 Expression of apoptosis associated molecules in SW1353 cells influenced by Ad-ATF6 and siATF6

表 1 不同组别中凋亡相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)
Tab.1 Expression level of apoptosis-associated protein
in different groups ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

组别	Cleaved Caspase3	Chop
NC组	0.260 ± 0.024	0.152 ± 0.015
TM组	0.457 ± 0.026	0.307 ± 0.042
TM+siATF6组	0.741 ± 0.072 ^a	0.437 ± 0.060 ^c
TM+Ad-ATF6组	0.355 ± 0.042 ^b	0.173 ± 0.020 ^c
F 值	62.891	35.070
P 值	0.000	0.000

注:a. 与 TM 组比较, $P=0.000$; b. 与 TM 组比较 $P=0.025$; c. 与 TM 组比较, $P=0.003$

3 讨 论

内质网应激是指由于某种生理或病理原因使得细胞内质网功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程。凡是能影响内质网功能的因素,如低血糖症、细胞营养缺乏、机械损伤和氧化还原损伤等均能使细胞发生 ERS,并激活未折叠蛋白反应 UPR,以缓解内质网的压力。当 ERS 过强或持续存在时,超出了细胞自身处理的能力,细胞将启动凋亡程序。

UPR 有 3 条途径:ATF6 通路、IRE1 通路和 PERK 通路,本研究主要探讨 ATF6 通路。ATF6 是定位于细胞内质网膜上的 II 型跨膜蛋白,属于 ATF/CREB 转录因子家族。正常情况下,ATF6 与分子伴侣 GRP78 结合,以酶原形式存在于内质网膜。当细胞发生 ERS 时,GRP78 从 ATF6 上解离下来,转而与错误折叠的蛋白结合,ATF6 则转移至高尔基体,被蛋白酶 S1P 和 S2P 水解成活性形式,进入细胞核,调控转录因子 X-盒结合蛋白 1(X-box binding protein 1, XBP1)以及各种酶的表达,以调节细胞恢复正常。

当细胞处于严重或持续存在的 ERS 时,前细胞凋亡因子 CHOP 将被激活,它是一种内质网相关促凋亡因子,参与调控和生存、死亡相关的基因表达,细胞凋亡最终由 Caspase3 蛋白水解酶来执行^[12-13]。因此本实验通过 Western blot 检测 Chop 和 Cleaved Caspase-3 的蛋白水平,Ad-ATF6 处理组蛋白的表达较 TM 组明显下调,而 Ad-ATF6 siRNA 组较 TM 组增加,说明 ERS 状态下,增加 ATF6 能减少 SW1353 细胞的凋亡。

据文献报道^[14-15],衣霉素 TM 和毒胡萝卜素(thapsigargin, Tg)是常用的 ERS 诱导剂,本实验采用 TM

来进行诱导。2 $\mu\text{g/ml}$ 的 TM 处理 SW1353 细胞 24 h,建立 ERS 模型。FCM 结果显示,与 NC 组相比,TM 诱导组细胞凋亡明显增加,说明 ERS 模型构建成功。ERS 状态下,Ad-ATF6 处理组凋亡降低,而 Ad-ATF6 siRNA 处理组凋亡增加,说明 TM 诱导的 ERS 状态下,ATF6 能够抑制 SW1353 细胞的凋亡。同时,FCM 结果还显示,Ad-ATF6 组 SW1353 细胞的增殖率高于 TM 对照组,Ad-ATF6 siRNA 实验组 SW1353 细胞的增殖率则低于 TM 对照组,表明 ATF6 可在 ERS 持续状态下促进 SW1353 细胞从 G1 期进入 S 期,从而促进细胞的增殖,MTT 实验得到的结果与 FCM 一致。表明 ERS 状态下,ATF6 可促进 SW1353 细胞的增殖。

骨肿瘤是一种常见的肿瘤疾病,常发生于骨骼或其附属组织,如骨髓、神经、血管等,在人群中的发病率约为 0.01%,其中恶性骨肿瘤占 40%左右,多为软骨肉瘤和骨肉瘤^[16]。恶性骨肿瘤发展迅速,预后不佳,死亡率高,至今尚无满意的治疗方法。随着研究的深入,越来越多的研究表明 ERS 与骨肿瘤密切相关。SW1353 是一种人软骨肉瘤细胞株,被广泛用于软骨细胞功能及相关疾病的研究,如风湿性关节炎^[17]和恶性肿瘤引起的骨关节炎^[18]等的研究。

本实验构建了 ATF6 的腺病毒,将 ERS 中的 ATF6 信号通路与软骨肉瘤细胞 SW1353 的增殖和凋亡联系起来,在体外验证了 ATF6 在 ERS 状态下对 SW1353 细胞的作用。其作用在人体的复杂环境中是否发生改变尚不清楚,ATF6 基因与骨肉瘤细胞其他生物学特征之间的关系,也还有待进一步的研究。在今后的实验中将探究更深一层的机理,为进一步研究 ATF6 在软骨肉瘤中的作用奠定了理论基础,也为软骨肉瘤的治疗提供了一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Papachristou DJ, Papachristou GI, Papaefthymiou OA, et al. The MAPK-AP1-Runx signalling axes are implicated in chondrosarcoma pathobiology either independently or via up-regulation of VEGF[J]. Histopathology, 2005, 47(6): 565-574.
- [2] Lake AC, Castellot JJ Jr. CCN5 modulates the antiproliferative effect of heparin and regulates cell motility in vascular smooth muscle cells [J]. Cell Commun Signal, 2003, 1(1): 5.
- [3] Aigner T. Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton: biochemistry and cell biology of