

β -DG 过表达对结肠癌细胞系 SW620 细胞凋亡的影响

钱成¹ 徐涛² 潘林鑫³

摘要 目的 研究 β -肌营养不良蛋白聚糖 (β -DG) 在 HT29、HCT116、SW480、SW620 等 4 种常见的结肠癌细胞系中的表达情况,及其过表达后对 SW620 结肠癌细胞凋亡及相关蛋白表达变化的影响。方法 培养结肠癌细胞系,提取总蛋白进行免疫印迹,检测各细胞中内源性 β -DG 蛋白的表达情况;构建 pcDGFP- β -DG 真核表达质粒,瞬时转染至 SW620 细胞中,提取总蛋白进行免疫印迹或直接进行免疫荧光制片,检测 β -DG 的过表达和细胞定位情况;过表达 β -DG 后,利用流式细胞术检测 SW620 细胞凋亡的变化情况,并进一步检测细胞凋亡标志蛋白聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (PARP) 的表达变化情况。结果 与人胚肾上皮细胞 (HEK 293T) 相比,结肠癌细胞系中内源性 β -DG (43 ku) 的表达量均有所降低,以 SW620 细胞下降更为明显,且都检测到了不同表达程度的 β -DG 水解片段 (31 ku)。成功构建 pcDGFP- β -DG 真核表达质粒,在 SW620 细胞中能够有效表达,且主要定位在细胞质中靠近核膜的位置。过表达 β -DG 后,SW620 细胞的凋亡率为 0.167 ± 0.014 ,高于空白组 (0.075 ± 0.027) 和对照组 (0.084 ± 0.023),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且过表达 β -DG 后,完整型 PARP (113 ku) 的蛋白含量有所降低,而裂解型 PARP (89 ku) 的蛋白含量有所增高。结论 β -DG 在结肠癌细胞系中异常表达,主要表现在其异常的水解断裂。过表达 β -DG 能够促进 SW620 细胞凋亡及相关凋亡蛋白的表达,为进一步了解 β -DG 功能,及其与结肠癌之间的关系提供了细胞学基础。

关键词 结肠癌; β -肌营养不良蛋白聚糖; 过表达; 细胞凋亡

中图分类号 R 34; Q 28

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1491-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.003

结肠癌是常见的发生于结肠部位的消化道恶性肿瘤,可向肝、肺、脑、骨等脏器转移,晚期可出现贫血、消瘦、恶病质等表现,严重者危及生命。除了对

结肠癌的临床研究外,目前对其细胞生物学研究也越来越深刻^[1-2]。HCT116、SW620 等细胞系是从结肠癌患者中分离建立的恶性细胞,广泛应用于结肠癌的细胞学研究。人类的肌营养不良蛋白 (dystroglycan, DG) 是由位于染色体 3p21 上的 DAG1 基因编码的含有 895 个氨基酸残基的跨膜蛋白,在体内翻译修饰后发生多肽键断裂,最终水解成 α -DG 和 β -DG 2 个具有独立功能的蛋白。 α -DG 是位于细胞膜上的高度糖基化蛋白,并通过与多种细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白结合进行信号转导。而 β -DG 作为跨膜蛋白,其胞内区直接与抗肌萎缩蛋白 (dystrophin, Dys) 结合,从结构上分析, β -DG 主要由 2 个结构域组成,即 N 端 (654 ~ 750 aa) 和 C 端 (775 ~ 895 aa),它们通过跨膜结构域 (transmembrane domain, TM) 相连^[3]。 β -DG 的 N 端与 α -DG 的 C 端通过非共价键的方式交联,其 C 端的酪氨酸序列能够结合胞内的信号分子,并通过酪氨酸的磷酸化参与激活多条信号转导途径,发挥着调节细胞的分化、增殖、凋亡以及改变细胞的极性等功能,在癌症、遗传性疾病等疾病的发生发展中扮演着重要角色^[4-5]。该研究首先检测四株常见的人结肠癌细胞系中 β -DG 的内源表达情况,以确定 β -DG 低表达细胞系 SW620,然后构建 pcDGFP- β -DG 的真核表达质粒,并过表达于 SW620 细胞中,研究 β -DG 对其细胞凋亡及相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与细胞 pcDNA3.1-FLAG-DAG1 和 pcDGFP 真核表达载体质粒由安徽医科大学生物系范礼斌教授实验室惠赠, DH5 α 感受态菌株 HEK 293T 和 SW620 等结肠癌细胞株由校实验中心实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司; BamH I、Not I 内切酶以及 T4 连接酶购自上海生工生物公司; 胶回收、质粒小量抽提试剂盒购自美国 Axygen 公司; 细胞裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、一抗稀释液购自上海碧云天公司; GFP 抗体、 β -DG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; DMEM 培

2020-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81700522); 安徽医科大学校科研基金 (编号: 2018xkj021)

作者单位: 安徽医科大学¹ 校科实验中心、² 药学院、³ 生命科学学院, 合肥 230032

作者简介: 钱成, 女, 助理实验师;

潘林鑫, 男, 助理实验师, 责任作者, E-mail: panlinxin@126.com

培养基购自澳洲 HyClone 公司; 胎牛血清购自美国 CLARK 公司; 脂质体转染试剂盒、Opti-MEM 低血清培养基购自美国 Invitrogen 公司。AL600RGB 凝胶成像系统购自美国 GE 公司; Axio Observer 3 倒置荧光显微镜购自德国卡尔蔡司公司; MoFlo XDP 超速流式细胞分选仪、CytoFlex 流式细胞分析仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建^[6] 设计并合成引物序列: F: CC GGAATTCGGGCCACCATGTCCATCGTGGTGGAA; R: AAGGAAAAAGCGGCCGCAAAAGGAAAACAGG TGGGACCATAGGGA, 以 pcDNA3.1-FLAG-DAG1 真核表达质粒为模板, PCR 扩增出 β -DG 的 CDS 序列, 将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并利用胶回收试剂盒进行回收, 得到其 PCR 纯化产物, 利用限制性内切酶 EcoR I 和 Not I 对 β -DG 的 PCR 纯化产物和 pcDGFP 空载体分别进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶将二者的酶切产物进行连接, 并将连接产物转化于 DH5 α 感受态细胞中, 37 °C 培养至单克隆生成(约 12 h), 分别挑取数个单克隆进行扩大培养(约 12 h), 并抽提菌液中的质粒进行双酶切鉴定(EcoR I 和 Not I), 选择鉴定正确的重组质粒送公司进行测序。

1.3.2 细胞培养 37 °C 水浴复苏冻存于液氮中的各细胞系, 并用完全培养基(90% DMEM 高糖 + 10% FBS + 青链霉素)进行培养, 培养环境为 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱。定时观察细胞, 及时更换完全培养基, 待细胞生长至 90% 以上密度时即可进行细胞传代, 将适量细胞重新接种至新的培养皿或培养瓶中, 用于后续实验。

1.3.3 质粒转染 本研究采用的转染方法为脂质体转染法, 步骤如下(以六孔板为例): 分别将适量 pcDGFP- β -DG(2~3 μ g) 或 pcDGFP 和 lip2000(4~6 μ l) 加到适量 Opti-MEM 转染液中(约 200 μ l), 并轻轻充分混匀, 室温静置 5 min 后将两者轻轻充分混匀, 室温静置 20 min 后, 将溶液加入待转染的细胞中, 培养 4~6 h 后更换为完全培养基, 继续培养 48 h, 用于后续蛋白表达实验。

1.3.4 Western blot 检测 转染 pcDGFP- β -DG 约 48 h 后, 分选并收集阳性细胞进行裂解(冰上或 4 °C), 30 min 后收集细胞裂解液进行高速冷冻离心(14 000 r/min, 10 min) 并收集上清液, 蛋白定量后取出适量上清液, 加入等量 2 \times SDS 上样缓冲液充分混合, 沸水浴 5 min, 冰浴 5 min 后取适量样本进

行 SDS-PAGE 电泳(80 V 约 0.5 h, 100 V 约 1.5 h), 200 mA 恒电流转 1 h, 取出 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1~2 h, TBST 溶液洗膜后加入 GFP 一抗(1:500)进行孵育(4 °C 过夜或室温 2 h), TBST 洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000)进行孵育(室温 1 h), TBST 溶液洗膜后用 ECL 试剂盒进行显色, 在蛋白成像仪上进行拍摄。

1.3.5 免疫荧光观察 转染 pcDGFP- β -DG 约 24 h 后, 取出 SW620 细胞爬片, 用预冷的 PBS 溶液清洗 3 次后进行固定(-20 °C 预冷甲醇 2 min + 70% 乙醇 5 min), 由于 GFP 能够自发绿色荧光, 因此无需进行一抗和二抗孵育, 固定后用预冷的 PBS 溶液清洗 3 次后进行细胞核染色(0.15 g/L DAPI 2 min), 弃 DAPI 溶液后用预冷的 PBS 溶液清洗 3 次后, 用荧光封片胶将盖玻片封于载玻片上, 4 °C 保存过夜后用荧光显微镜进行观察。

1.3.6 细胞凋亡 将转染了 pcDGFP- β -DG(实验组)和 pcDGFP 空载体(对照组), 以及未转染(空白组)的 SW620, 用不含 EDTA 的胰酶消化后低速收集(1 000 r/min, 3 min), 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次后, 加入 400 μ l \times Binding Buffer 重悬细胞(浓度大约为 1×10^6 /ml), 加入 5 μ l Annexin V-FITC 轻轻混匀后于 2~8 °C 避光条件下反应 15 min, 然后加入 10 μ l PI 轻轻混匀后于 2~8 °C 避光条件下反应 5 min, 混匀后放置于冰上, 样品在 1 h 内用流式细胞仪检测凋亡情况。凋亡图分为 4 个象限, 左下象限为细胞存活率(Q1-LL)、左上象限为细胞死亡率(Q1-UL)、右上象限为细胞晚期凋亡率(Q1-UR)、右下象限为细胞早期凋亡率(Q1-LR), 本次实验凋亡率为 Q1-UL、Q1-UR 和 Q1-LR 3 个象限数值之和。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 两个数据间以两单独样本 *t* 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌细胞系中 β -DG 的表达情况 培养 HT29、HCT116、SW480、SW620 等结肠癌细胞系以及 HEK293T 肾上皮细胞系, 并收集适量以上 5 种细胞进行裂解, 提取总蛋白, 定量分析后进行 Western blot 实验, 当用 β -DG 抗体进行免疫印迹时, 结果发现 5 种细胞蛋白样品在 43 ku 处均出现蛋白条带, 大小基本符合 β -DG 的分子量。但与正常上皮细胞

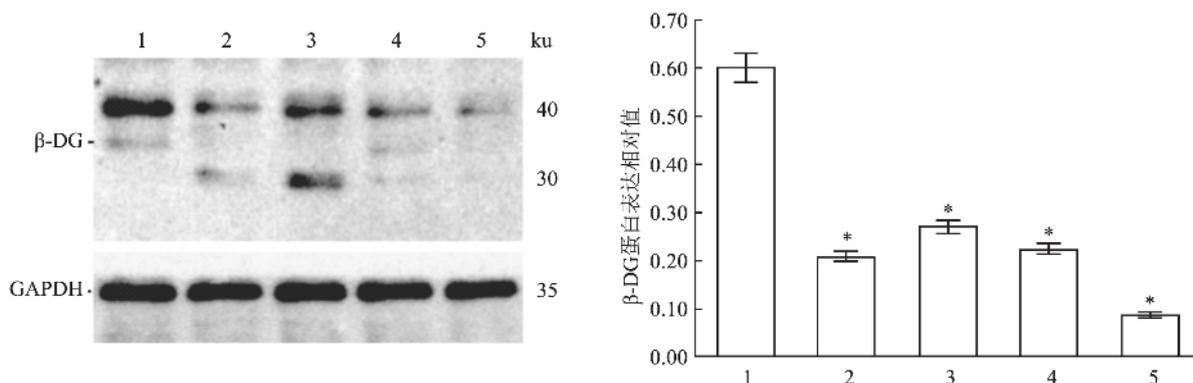


图1 结肠癌细胞系中β-DG的表达情况

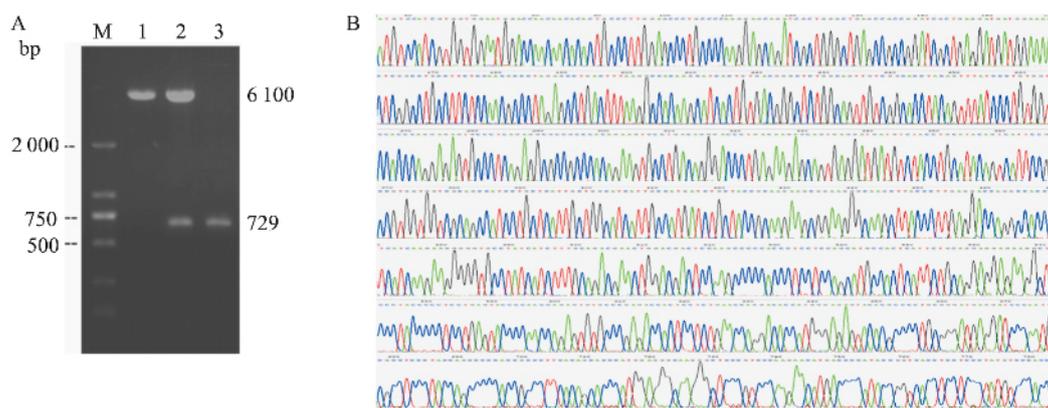
1: HEK 293T; 2: HT29; 3: HCT116; 4: SW480; 5: SW620; 与 HEK 293T 比较: * $P < 0.05$ 

图2 pcDGFP-β-DG重组质粒的酶切鉴定与测序结果

A: pcDGFP-β-DG 酶切鉴定图; B: pcDGFP-β-DG 测序图; M: Marker; 1: β-DG 的 PCR 产物; 2: pcDGFP-β-DG 的酶切产物; 3: pcDGFP 的酶切产物; 碱基 A: 绿色峰; 碱基 T: 红色峰; 碱基 G: 黑色峰; 碱基 C: 蓝色峰

相比,各结肠癌细胞系中β-DG的表达量都有不同程度的减少,其中SW620细胞的β-DG表达量最少,适合用于后续β-DG的过表达实验,见图1。

2.2 β-DG 真核表达载体的构建 通过PCR扩增、双酶切、酶连、质粒转化与抽提后拟得到pcDGFP-β-DG重组质粒,利用EcoR I和Not I进行双酶切鉴定,琼脂糖电泳结果如图2A所示,重组质粒被切出两条亮带,通过DNA Marker、PCR产物和空载体的横向比较,发现一条亮带大小约为6100 bp,与pcDGFP空载体的大小基本一致,另一条亮带大小约为720 bp,与β-DG的片段大小基本一致。将此重组质粒送生物公司进行测序,并将测序结果与β-DG的CDS序列(729 bp)进行比对,碱基序列完全一致,表明pcDGFP-β-DG重组质粒构建成功,见图2B。

2.3 β-DG 在 SW620 细胞中的过表达和荧光定位情况 将pcDGFP-β-DG瞬时转染至SW620细胞中,收集、裂解细胞后进行Western blot检测,当用GFP抗体进行免疫印迹时,结果显示空载体对照组、

β-DG过表达组分别在25 ku和70 ku左右的位置出现条带,即为GFP和GFP-β-DG(27+43 ku)融合蛋白的蛋白表达,而空白对照组未见任何条带,表明pcDGFP-β-DG重组质粒能够在SW620细胞中过表达,见图3。另外,制作SW620细胞爬片,过表达GFP-β-DG后进行免疫荧光制片,并在荧光显微镜下进行观察,结果显示GFP-β-DG自发绿色荧光,主要定位在细胞质中,细胞核内未见显著表达,且在细胞质中靠近核膜一侧的定位更加明显,见图3。

2.4 β-DG 过表达对 SW620 细胞凋亡的影响 分别将pcDGFP-β-DG和pcDGFP(作为对照)瞬时转染至SW620细胞中,约24 h后收集细胞,分别进行Annexin V-FITC/PI双染,然后利用流式细胞术检测凋亡情况,共进行3次重复实验,结果如表1所示,统计分析后发现,空白组(未转染)和对照组(转染pcDGFP空载体)细胞凋亡率的差异无统计学意义($P > 0.05$),与对照组相比,实验组(转染pcDGFP-β-DG)细胞的凋亡率升高($P < 0.05$),差异有统计

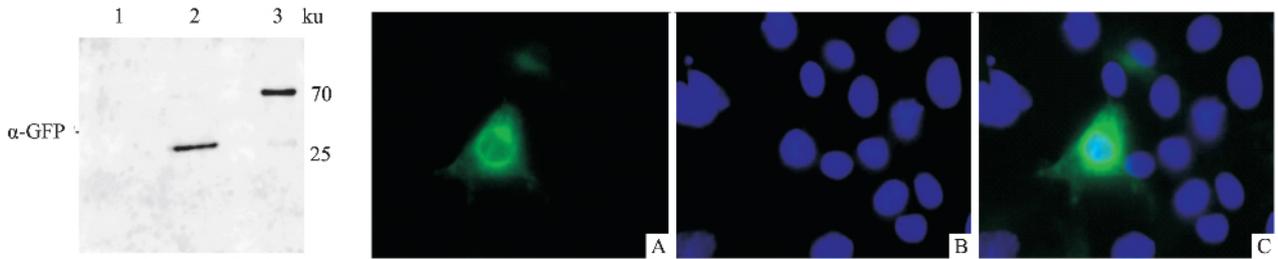


图3 β -DG 在 SW620 细胞中的过表达和荧光定位图 $\times 630$

1: 未转染的 SW620 细胞裂解液; 2: 转染 pcDGFP 的 SW620 细胞裂解液; 3: 转染 pcDGFP- β -DG 的 SW620 细胞裂解液; A: GFP- β -DG 在 SW620 细胞中的绿色荧光定位; B: DAPI 染色示细胞核; C: A 和 B 2 个图像的叠加

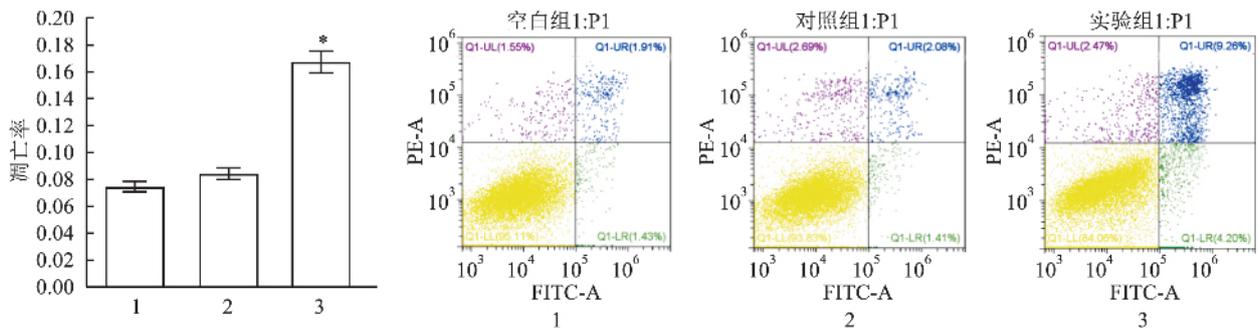


图4 β -DG 过表达后 SW620 细胞的凋亡图

1: 未转染的空白组; 2: 转染了 pcDGFP 空载体的对照组; 3: 转染了 pcDGFP- β -DG 的过表达组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

表1 β -DG 过表达达对 SW620 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)			平均凋亡率	t_1 值	P_1 值	t_2 值	P_2 值
	1	2	3					
空白	4.89	10.21	7.33	0.0748 \pm 0.0266	0.4425	$P > 0.05$	5.385	$P < 0.05$
对照	6.17	10.77	8.20	0.0838 \pm 0.0231				
实验	15.94	18.27	15.97	0.1673 \pm 0.0137				

t_1/P_1 : 对照组与空白组比较; t_2/P_2 : 实验组与对照组比较

学意义,见图4,表明过表达 β -DG 能够有效促进 SW620 结肠癌细胞凋亡。

2.5 β -DG 过表达对细胞凋亡相关蛋白的影响

分别将 pcDGFP- β -DG 和 pcDGFP(作为对照)瞬时转染至 SW620 细胞中,约 24 h 后收集细胞,提取总蛋白后进行 Western blot 检测,共进行 3 次重复实验,当用 PARP 抗体进行免疫印迹时,结果显示空白组、空载体对照组、 β -DG 过表达组均在 113 ku 左右的位置出现条带,即为完整的 PARP 蛋白,相对而言, β -DG 过表达组的 PARP 蛋白含量有所降低,且在约 90 ku 的位置还出现了另一条带,即为 PARP 的裂解片段,见图 5。表明过表达 β -DG 能够有效促进细胞凋亡蛋白 PARP 裂解,即促进 SW620 结肠癌细胞凋亡。

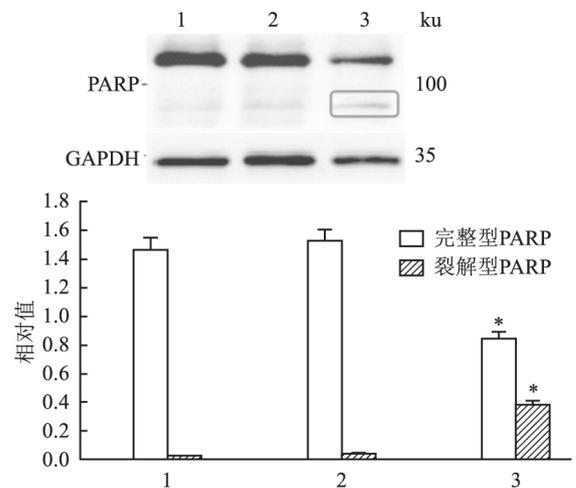


图5 β -DG 过表达对细胞凋亡蛋白 PARP 的影响

1: 未转染的空白组; 2: 转染了 pcDGFP 空载体的对照组; 3: 转染了 pcDGFP- β -DG 的过表达组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

DG 是一种跨膜的糖蛋白, β -DG 作为其水解衍生物, 是组成细胞表面的重要成分, 广泛分布于脊椎动物的骨骼肌和其他组织中^[7]。 β -DG 的 N 端存在着潜在的 N-连接糖基化位点, 在其 C 末端存在一个 PPXY 序列, 该序列又与一个含有两个高度保守色氨酸残基的 WW 结构域相结合, 构成了蛋白质相互作用的一种模式, 此结合的稳定性取决于抗肌萎缩蛋白的 EF-手形结构域。此外, β -DG 的胞质尾区能够与包括细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、丝裂原激活的蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)、生长因子受体结合蛋白 2(growth factor receptor-bound protein 2, GRB2) 等在内的众多信号分子充分结合, 进而起到稳定神经肌肉接头, 传递细胞信号转导的功能。DG 的异常表达是癌症发生的一个重要特征, 与肿瘤的发展和转移密切相关^[8], 这种异常除了与 α -DG 糖基化水平改变有关外, 还与 β -DG 的异常表达有关。在人类的乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、舌鳞状细胞癌中都发现了 β -DG 的异常^[9-11], 这种异常主要表现在其非正常裂解导致的表达量下降。本研究首先利用免疫印迹技术检测了 HT29、HCT116、SW480、SW620 等常见的结肠癌细胞系中内源性 β -DG 的表达情况, 结果发现各癌细胞系中正常分子量 β -DG(43 ku) 的表达量均有不同程度的下降, 其中 SW620 下降的最为明显, 另外, 这些结肠癌细胞系在约 31 ku 的位置均出现了蛋白条带, 这可能是正常 β -DG 蛋白水解后的胞外结构域, 它的产生是由于膜相关基质金属蛋白酶的活化, 破坏了 DG 复合物的结构, 最终导致癌症的发生。

本研究首先确定了 β -DG 在各结肠癌细胞系中呈现低表达状态, 接下来选择了低表达程度最高的 SW620 细胞进行 β -DG 的过表达研究。利用基因重组技术构建了 pcDGFP- β -DG 真核表达质粒, 并将其转染至 SW620 细胞中, 利用 Western blot 技术检测了其表达情况, 结果发现 β -DG 能够成功过表达。同时还利用了免疫荧光技术对 β -DG 在 SW620 中的细胞定位进行了检测, 结果发现 GFP- β -DG 蛋白主要定位在细胞质中, 而且在细胞质中靠近核膜的一周表达量更多, 此结果与之前研究的 FLAG- β -DG 在 COS7 细胞中的定位结果基本一致^[12]。而且根据位置推测, β -DG 蛋白定位可能与高尔基体或内质网有着密切的联系, 所以在接下来的研究中, 可以

选择高尔基体或内质网的标志染料麦胚凝集素或刀豆球蛋白 A 与 β -DG 进行共定位研究, 进一步确定 β -DG 蛋白的具体亚定位。

本研究旨在探索 β -DG 对结肠癌细胞系细胞凋亡的影响, 细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象, 是由基因控制的细胞自主有序的死亡, 在生物体的进化、内环境的稳定以及组织系统的发育中起着重要的作用。而细胞凋亡的抑制或减弱与癌症的发生发展有着密切的联系, 许多化疗药物发挥作用的机制就是诱导癌细胞的凋亡^[13]。因此本研究在确定结肠癌细胞系和 β -DG 的过表达效果后, 便利用流式细胞术检测过表达 β -DG 对 SW620 细胞凋亡的影响, 结果发现 β -DG 过表达后能够提高 SW620 细胞的凋亡率, 表明 β -DG 具有促凋亡功能。为了进一步确定这个结果, 又检测了过表达 β -DG 后 SW620 细胞中二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP) 蛋白水平的变化, PARP 为一种依赖锌离子(Zn^{2+}) 的真核 DNA 结合蛋白, 可特异性地识别 DNA 断裂末端并结合, 是一种重要的 DNA 修复酶, 在细胞凋亡发生的早期, PARP 是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶家族(如 caspase 3 和 caspase 7) 的作用底物, 后者可使 PARP 的 DNA 修复功能丧失, 并将 113 ku 的 PARP 水解为 89 ku 的片断。因此 PARP 可以作为细胞凋亡早期的标志物, 许多研究便是通过 Western blot 检测 PARP 的完整蛋白(113 ku) 及其裂解片断(89 ku) 的表达量来观察细胞凋亡效果^[14]。本研究检测发现 β -DG 过表达后 PARP 的完整蛋白(113 ku) 含量下降, 且裂解片断(89 ku) 的表达量升高, 同样表明过表达 β -DG 具有促凋亡功能。

综上所述, β -DG 在结肠癌细胞系中异常表达, 主要表现在其异常的水解断裂。过表达 β -DG 能够显著促进 SW620 细胞凋亡及相关凋亡蛋白的表达, 为进一步了解 β -DG 功能, 及其与结肠癌之间的关系提供了细胞学基础。

参考文献

- [1] 张志谦, 张广星, 彭小东. miR-143-3p 靶向 MAPK1 对人结肠癌细胞增殖、凋亡和侵袭的调节作用[J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(3): 292-8.
- [2] Szeder B, Tárnoki-Zách J, Lakatos D, et al. Absence of the Tks4 scaffold protein induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in human colon cancer cells[J]. Cells, 2019, 8(11): E1343.
- [3] Winder S J. The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin[J]. J Muscle Res Cell Motil, 1997, 18(6):

- 617 - 29.
- [4] Aggelis V ,Craven R A ,Peng J et al. VHL-dependent regulation of a β -dystroglycan glycoform and glycogene expression in renal cancer[J]. *Int J Oncol* ,2013 ,43(5) : 1368 - 76.
- [5] Palmieri V ,Bozzi M ,Signorino G et al. α -Dystroglycan hypoglycosylation affects cell migration by influencing β -dystroglycan membrane clustering and filopodia length: A multiscale confocal microscopy analysis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* ,2017 , 1863(9) : 2182 - 91.
- [6] 何叶,潘林鑫,张永等. Sedlin 突变体的表达及其与 RB1 在细胞中的共定位[J]. *安徽医科大学学报* ,2019 ,54(10) : 1526 - 30.
- [7] Henry M D ,Campbell K P. Dystroglycan inside and out[J]. *Curr Opin Cell Biol* ,1999 ,11(5) : 602 - 7.
- [8] Leonoudakis D ,Huang G ,Akhavan A ,et al. Endocytic trafficking of laminin is controlled by dystroglycan and is disrupted in cancers [J]. *J Cell Sci* 2014 ,127(Pt 22) : 4894 - 903.
- [9] Jing J ,Lien C F ,Sharma S et al. Aberrant expression ,processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas [J]. *Eur J Cancer* 2004 ,40(14) : 2143 - 51.
- [10] 景捷,赵磊,靳晓晔,等. TIMPs 对舌鳞状细胞癌异常 β -DG 的作用[J]. *现代口腔医学杂志* 2010 ,24(6) : 448 - 52.
- [11] 郝艳梅,马佳,司晨晨,等. 金属蛋白酶组织抑制剂对涎腺腺样囊性癌表达 D 肌营养不良蛋白聚糖的影响[J]. *华西口腔医学杂志* 2013 ,31(2) : 118 - 21.
- [12] 钱成,王蓓华,徐雪琴,等. 肌营养不良蛋白及其衍生物的表达与定位的研究[J]. *安徽医科大学学报* 2015 ,50(9) : 1207 - 10.
- [13] 宋柳全,周毅,文晓君,等. 培美曲塞联合顺铂通过 TRAIL 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡发挥抗癌效果的研究[J]. *中国医院药学杂志* 2019 ,39(14) : 1430 - 4.
- [14] 王淑荣,申存周. ATP、PARP、Caspase-3 与细胞凋亡和胀亡[J]. *中国微循环* 2009 ,13(6) : 638 - 40.

Effect of β -DG overexpression on apoptosis of colon cancer cell line SW620

Qian Cheng¹ , Xu Tao² , Pan Linxin³

(¹Center for Scientific Research ,²School of Pharmacy ,

³School of Life Sciences , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To research the expression of β -dystrophin (β -DG) in colon cancer cell lines (HT29 , HCT116 , SW480 , SW620) , and the effect of its overexpression on apoptosis and the expression of apoptosis related proteins in SW620. **Methods** Colon cancer cell lines were cultured , total protein was extracted for Western blot to detect the expression of endogenous β -DG protein in each cell. The eukaryotic expression plasmid of pcDGFP- β -DG was constructed and transfected into SW620 cells , total protein was extracted for Western blot or immunofluorescence directly to detect the overexpression and localization of β -DG. After overexpression of β -DG , the apoptosis of SW620 cells was measured by flow cytometry , and the expression of apoptotic marker protein PARP was further detected. **Results** Compared with normal epithelial cells HEK 293T , the expression of endogenous β -DG (43 ku) was decreased in colon cancer cell lines , especially in SW620 cells , and different levels of β -DG hydrolysis fragments (31 ku) were detected. The eukaryotic expression plasmid pcDGFP- β -DG was constructed successfully , which could be effectively expressed in SW620 cells and mainly located in the cytoplasm near the nuclear membrane. After overexpression of β -DG , the apoptotic rate of SW620 cells was (0.167 ± 0.014) , significantly higher than that of blank group (0.075 ± 0.027) and control group (0.084 ± 0.023) ($P < 0.05$) . After overexpression of β -DG , the protein content of complete PARP (113 ku) decreased , and the fragment of PARP (89 ku) increased. **Conclusion** The abnormal expression of β -DG in colon cancer cell lines is mainly manifested in its abnormal hydrolytic breakdown. Overexpression of β -DG can significantly promote apoptosis of SW620 cells and expression of apoptotic protein , which provides a cytological basis for further understanding the function of β -DG and its relationship with colon cancer.

Key words colon cancer; β -DG; overexpression; cell apoptosis