

文章编号:1005-6947(2007)02-0125-04

· 基础研究 ·

Bcl-2 反义寡核苷酸对 VP-16 抑制人胆管癌 细胞株增殖和诱导凋亡的影响

彭创¹, 汤恢焕², 吴金术¹

(1. 湖南省人民医院 肝胆外科, 湖南 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨 bcl-2 反义寡核苷酸 (ASODN) 对 VP-16 抑制人胆管癌 QBC939 细胞生长和诱导细胞凋亡的影响。方法 合成特异性靶向 Bcl-2 ASODN, 并将其转染 QBC939 细胞; 四甲基嘧啶蓝 (MTT) 试验检测 Bcl-2 ASODN 对 VP-16 抑制 QBC939 细胞增殖的影响; 流式细胞术观察 Bcl-2 ASODN 对 VP-16 诱导 QBC939 细胞凋亡的影响。结果 ASODN 组细胞的存活率显著低于无义寡核苷酸 (NSODN) 组 ($P < 0.05$); ASODN + VP-16 组细胞存活率显著低于 ASODN 组及 VP-16 组 ($P < 0.05$); ASODN 组、ASODN + VP-16 组和 VP-16 组细胞凋亡率显著高于对照组和 NSODN 组 ($P < 0.05$); ASODN + VP-16 组细胞凋亡率显著高于 ASODN 组及 VP-16 组 ($P < 0.05$)。结论 Bcl-2 ASODN 对 VP-16 抑制人胆管癌 QBC939 细胞生长和诱导细胞凋亡有促进作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(2): 125-128]

关键词: 胆管肿瘤; 基因, bcl-2; 寡脱氧核苷酸, 反义

中图分类号: R657.2

文献标识码: A

The effect of Bcl-2 ASODN on VP16-induced growth inhibition and apoptosis in QBC939 cells

PENG Chuang¹, TANG Hui-Huan², WU Jin-Shu¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China;

2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Bcl-2 ASODN on VP-16 induced growth inhibition and apoptosis in human bile duct carcinoma cell line QBC939. **Methods** Human cholangiocarcinoma cell line QBC939 was conventionally cultured. Specific target selective Bcl-2 ASODN, designed and artificially synthesized, was transfected to the cell line; MTT assay and flow cytometry (FCM) were used to study cell proliferation and apoptosis in cell line QBC939. **Results** MTT assay showed cell survival rate in ASODN group was significantly lower than that in NSODN group ($P < 0.05$). The survival rate in ASODN + VP-16 group was significantly lower than that in ASODN group and VP-16 group ($P < 0.05$). FCM analysis showed that apoptosis rates in ASODN group, VP-16 group and ASODN + VP-16 group were significantly higher than those in control groups ($P < 0.05$). The apoptosis rate in ASODN + VP-16 group was significantly higher than that in ASODN group and VP-16 group ($P < 0.05$). **Conclusions** Bcl-2 ASODN can enhance the effect of VP16-induced growth inhibition and apoptosis in QBC939 cell line.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(2): 125-128]

Key words: Bile Duct Neoplasms; Gene, bcl-2; Oligodeoxynucleotides, Antisense

CLC number: R657.2

Document code: A

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金资助项目 (B2004-168); 湖南省科技厅科技计划项目 (05SK3015)

收稿日期: 2006-05-31; **修订日期:** 2006-10-20。

作者简介: 彭创, 男, 湖南省益阳县人, 湖南师范大学第一附属医院 (湖南省人民医院) 副主任医师, 主要从事肝胆疾病方面的研究。

通讯作者: 彭创 E-mail: pengchuangcn@163.com

化疗药物治疗胆管癌效果不佳,主要是由于其对化疗剂存在多药耐药性(MDR)。如能克服其耐药性,有望提高胆管癌化疗效果^[1-2]。文献报道^[3], bcl-2 反义寡核苷酸(ASODN)能增强某些恶性肿瘤对化疗药物的敏感性,作者既往的实验^[4]显示,人胆管癌细胞株 QBC939 可高表达 bcl-2。本研究将 bcl-2 ASODN 作用于 QBC939 细胞株,旨在探讨反义抑制 bcl-2 表达对足叶乙甙(VP-16)抑制人胆管癌细胞株 QBC939 生长和诱导凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 bcl-2 ASODN 的设计与合成

反义寡核苷酸 5'-TCT CCC AGC GTG CGC CAT-3 是针对 bcl-2 mRNA 开放阅读框架起始 6 个密码子的序列,自行设计无义寡核苷酸(NSODN)作为反义序列特异性对照,序列为 5'-TAC CGT CTG CGA CGC CCT-3。经检索证实其与 bcl-2 基因以外的已知人类基因无同源性。设计合成的寡核苷酸均经硫代磷酸化修饰。由上海生物工程技术有限公司合成、修饰、纯化、分装, -20℃ 保存备用。使用前以 RPMI 1640 培养基配制所需浓度。

1.2 细胞培养、分组与转染

人胆管癌细胞株 QBC939 由第三军医大学西南医院王曙光等建株、北京大学附一院普外科惠赠。该细胞株用含 10% 灭活小牛血清 RPMI 1640 培养液,于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 0.25% 的胰蛋白酶 + 0.02% 的 EDTA (北京中杉生物技术有限公司)消化传代。实验设 6 组:(1) ASODN 组,以 1 μmol/L ASODN 转染 QBC939 细胞;(2) NSODN 组,以 1 μmol/L NSODN 转染 QBC939 细胞;(3) VP-16 组, VP-16 终浓度为 5 μg/mL;(4) NSODN + VP-16 组;(5) ASODN + VP-16 组;(6) 对照组,加等量无血清 RPMI1640 培养液。按 LipofectamineTM2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明进行细胞转染,每隔 6h 在倒置显微镜下观察细胞形态,24h 后收集各组细胞用于后续实验。

1.3 MTT 法检测化疗药物对 各 组 细胞 的 生 长 抑 制 率

根据文献^[5]选择化疗药物 VP-16 终浓度为 5 μg/mL;调整细胞浓度为 1 × 10⁴/mL;各组细胞

接种于 96 孔板内,均设药物实验孔和空白对照孔,每组设置 5 个复孔,每孔总体积为 200 μL(对照组加等体积无血清无抗生素的 RPMI-1640);常规条件下培养 44h 后,每孔加入 20 μL 的 MTT,浓度为 5 mg/mL;继续培养 4h,倾尽上清液;每孔加入二甲基亚砷 100 μL 摇床上摇动 15 min 充分溶解甲瓚;酶标仪波长 570 nm 处检测各孔光密度值(OD 值)。根据下列公式计算细胞存活率。存活率 = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

以 1 × 10⁶/well 将细胞分别接种于 6 孔板,实验分组与转染同 1.2。加终浓度为 5 μg/mL 的 VP-16,继续孵育 24h,收集细胞、离心(1 000 r/min × 5 min),用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)液重悬细胞、离心,洗涤 2 次;收集细胞用 4℃ 预冷的 70% 乙醇固定,冰盒送检。样本上机前作如下处理:洗涤、加 RNA 酶、加碘化丙啶(PI),300 目尼龙网滤过。上机检测,计数 10 000 个细胞,进行细胞凋亡分析。根据形态观察,低于 G1 期 DNA 含量的细胞为亚二倍体细胞,属于凋亡细胞。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.0 软件进行统计分析。组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 bcl-2 ASODN 对 VP-16 抑制 QBC939 细胞增殖的影响

ASODN 组细胞的存活率较 NSODN 组有显著下降($P < 0.05$), ASODN + VP-16 组与 ASODN 组及 VP-16 组比较,细胞存活率显著下降($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 MTT 法检测细胞的存活率

分组	OD 比值($\bar{x} \pm s$)
NSODN	0.894 ± 0.084
ASODN	0.553 ± 0.047 ¹⁾
VP-16	0.735 ± 0.060
NSODN + VP-16	0.725 ± 0.039
ASODN + VP-16	0.272 ± 0.032 ²⁾

注:1 与 NSODN 组比较, $P < 0.05$;2 分别与 ASODN 组和 VP-16 组比较, $P < 0.05$

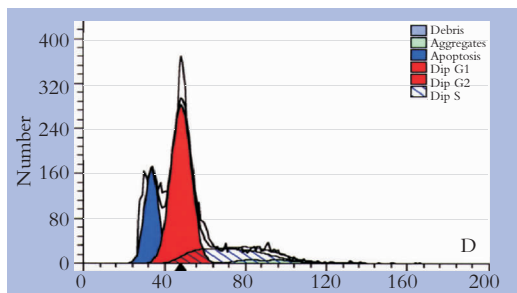
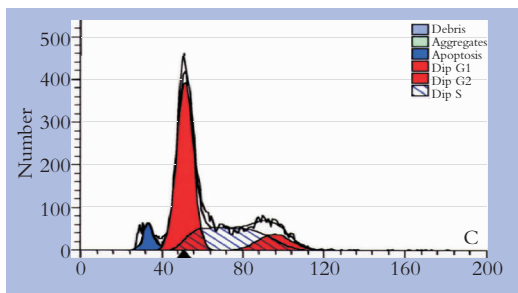
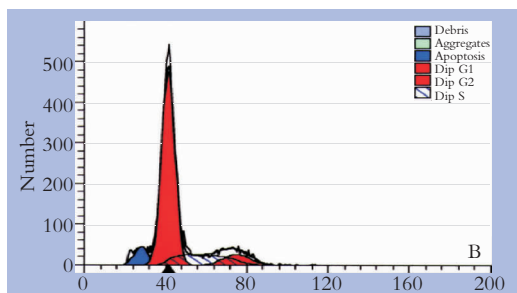
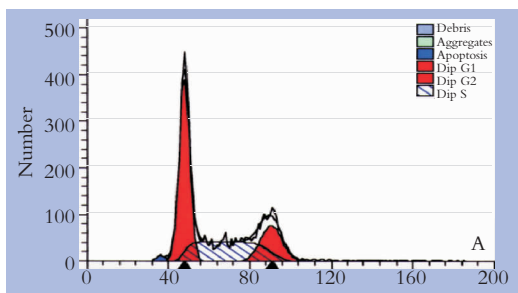
2.2 bcl-2 ASODN 对 VP-16 诱导 QBC939 细胞凋亡的影响

ASODN 组细胞凋亡率较对照组和 NSODN 组均有显著升高 ($P < 0.05$), ASODN + VP-16 组细胞凋亡率与 ASODN 组及 VP-16 组比较,有显著上升 ($P < 0.05$) (表 2)(附图)。

表 2 流式细胞术检测细胞凋亡率

分组	凋亡率 (%)
对照	1.08 ± 0.43 ¹⁾
NSODN	1.51 ± 0.62 ¹⁾
ASODN	6.75 ± 1.31 ²⁾
VP-16	11.81 ± 2.07 ²⁾
NSODN + VP-16	12.25 ± 2.23
ASODN + VP-16	20.38 ± 2.65

注:1)与 ASODN 组比较, $P < 0.05$;2)与 ASODN + VP-16 组比较, $P < 0.05$



附图 流式细胞术检测细胞凋亡率 A:对照组; B:ASODN 组; C:VP16 组; D:ASODN + VP16 组

3 讨论

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因。不同肿瘤细胞对化疗敏感性的差异,主要由于各种肿瘤细胞凋亡的阈值不同。修复凋亡机制,可望能克服耐药性、诱导肿瘤细胞凋亡和增强化疗药物的敏感性。文献报道^[6], bcl-2 基因通过抑制细胞凋亡,诱导肿瘤细胞产生对化疗药物的耐药性,是一种耐药基因。而胆管癌细胞中 bcl-2 高表达,因此设想能否通过抑制抗凋亡基因 bcl-2 的表达,增加细胞凋亡,从而提高胆管癌化疗效果。

VP-16 为拓扑异构酶 II 抑制剂的一种,直接作用于拓扑异构酶 II;当其药物与 DNA 酶共价中间物结合时,干扰拓扑异构酶 II 解旋功能而发挥

抗肿瘤效应,包括启动凋亡^[7]。Nahta 等^[8]研究显示,bcl-2 ASODN 可下调乳腺癌细胞 bcl-2 蛋白表达,诱导乳腺癌细胞凋亡,增加其对化疗药物的敏感性。本实验用 MTT 法分析 VP-16 与 bcl-2 ASODN 联合应用对人胆管癌细胞株 QBC939 生长的影响,根据细胞存活率判断两种药物的相互作用。结果显示,ASODN 组细胞存活率较 NSODN 组显著降低 ($P < 0.05$),且 ASODN + VP-16 组细胞存活率较之 ASODN 组及 VP-16 组亦显著降低 ($P < 0.05$),可见 Bcl-2 ASODN 可能通过降低 Bcl-2 蛋白表达,降低细胞凋亡阈值,从而提高 QBC939 细胞对化疗药物 VP-16 的敏感性。国内也有学者^[9-10]报告,通过反义抑制 bcl-2 表达能增强白血病、乳腺癌等恶性肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,而不增加化疗的副作用。推测 bcl-2 蛋白

高表达所引起的肿瘤细胞凋亡机制的缺陷,可能参与了胆管癌细胞对化疗药物耐药性的产生;而转染 bcl-2 ASODN 部分封闭 bcl-2 表达,在一定程度上使细胞耐药性逆转。

从细胞动力学角度上分析,其作用原理可能是:由于 bcl-2 蛋白高表达使细胞隐退于 G_0 期, bcl-2 ASODN 降低 bcl-2 表达时,细胞从 G_0 期进入增殖期,与影响细胞增殖期的 VP-16 联合产生协同作用^[11-12]。本实验显示:ASODN 组细胞凋亡率显著高于对照组和 NSODN 组 ($P < 0.05$),且 ASODN + VP-16 组细胞凋亡率又显著高于 ASODN 组及 VP-16 组比较显著上升 ($P < 0.05$)。提示经 bcl-2 ASODN 能诱导人胆管癌细胞株 QBC939 凋亡,并能增强 VP-16 诱导细胞凋亡的作用,其机制可能与细胞周期调节有关。随着研究的深入,如将化疗药物的作用机制,同药物敏感性及癌基因表达状态改变所引起的细胞凋亡联系起来,可能对提高胆管癌的化疗药物疗效有一定意义。

参考文献:

- [1] Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, *et al.* Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma [J]. *Oncologist*, 2004, 9(1):43-57.
- [2] Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy [J]. *Hepatology*, 2005, 41(1):5-15.
- [3] Sharma H, Sen S, Muzio LL, *et al.* Antisense-mediated down-regulation of anti-apoptotic proteins induces apoptosis and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(7):720-727.
- [4] 彭创,汤恢焕,黄平,等.脂质体介导 Bcl-2 反义寡核苷酸对胆管癌细胞株 QBC939 的作用 [J]. *中南大学学报医学版*, 2005, 30(5):536-539.
- [5] 李占飞,邹声泉,裘法祖.联合应用 9-顺式维甲酸和化疗药物对人胆管癌细胞系 QBC939 的作用 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2003, 9(12):748-750.
- [6] Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1995, 9(2):451-473.
- [7] Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10):1514-1521.
- [8] Nahta R, Esteva FJ. Bcl-2 antisense oligonucleotides: a potential novel strategy for the treatment of breast cancer [J]. *Semin Oncol*, 2003; 30(5 Suppl 16):143-149.
- [9] 郑志宏,陈志哲,吕联煌,等. bcl-2 反义寡核苷酸对白血病细胞药物敏感性的影响 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, 38(1):46-48.
- [10] 刘方欣,李晓愚,张玉诺. Bcl-2 基因反义寡核苷酸对乳腺癌细胞株药物敏感性的影响 [J]. *中国药业*, 2004, 13(9):25-27.
- [11] Vairo G, Innes KM, Adams JM. bcl-2 has a cell cycle inhibitory function departable from its enhancement of cell survival [J]. *Oncogene*, 1996, 13(7):1511-1519.
- [12] 左石,邹声泉,陈勇军,等.反义调控 DNA 甲基转移酶 3b 基因对人胆管癌细胞 QBC939 生长的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(3):190-194.

《中华临床医师杂志(电子版)》征稿启事

《中华临床医师杂志(电子版)》拟于 2007 年 1 月正式出刊(月刊),本刊是新闻出版总署(新出音[2006]817 号)“十一五”国家重点出版规划立项的电子连续出版物之一。杂志由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办,中华医学电子音像出版社出版的专业医学学术期刊,面向全国公开发刊。

《中华临床医师杂志(电子版)》以 CD-ROM 光盘附导读形式出版发行,实现了传统纸质媒体与电子媒体的结合。主要栏目有:论著、综述、述评、临床研究、经验与发明、病例报告、疑难病例分析、会议报道和继续医学教育等。

本刊编委会郑重承诺:将以最快的速度组织专家对来稿进行评审,保证快速、高效发表学术成果。欢迎医学界同行积极投稿并订阅杂志!

投稿地址:北京市 100035-50 信箱,邮编:100035,电话:010-62234701,传真:010-62234701

电子信箱:lcdactor@163.com,网址:www.clinicmed.net / www.clinicmed.cn