



bcl-2基因表达与小细胞肺癌对抗机体免疫所致细胞凋亡的关系

小细胞肺癌中bcl-2基因的表达较高[1],这可能与其逃避机体的免疫攻击机制有关。我们用bcl-2硫代反义寡核苷酸对小细胞肺癌细胞系的bcl-2基因表达进行抑制,并与从肺癌组织中分离出来的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)共同培养,通过JAM试验观察TIL对癌细胞的凋亡诱导作用,以探讨bcl-2表达与小细胞肺癌逃避机体免疫监控的机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

小细胞肺癌新鲜标本取自我院接受肺癌切除的病人共10例,其中男5例、女5例,年龄34~62岁。所有病例术前未接受放疗、化疗等特殊治疗,术后病理检查证实为小细胞肺癌。

1.2 TIL的分离及培养

每例取肺癌新鲜标本 $10\sim 30$ g,剪成 1 mm^3 碎块,置于RPMI 1640培养液中,加入终浓度为0.05%的I型和IV型胶原酶、0.001%的V型透明质酸酶和I型DNA酶(Sigma公司)。室温搅拌4 h,先后用80目和200目滤网滤过,细胞悬液用RPMI 1640离心洗涤,重悬于含5%小牛血清的RPMI 1640培养液中。用Ficoll不连续密度梯度离心,分别收取75%与100% Ficoll-Hypaque界面层的TIL细胞,调整细胞浓度为 $1\times 10^9/\text{L}$,加入IL-2 1000×10^3 U/L(军事医学科学院),每孔1 ml分置于24孔板中。培养板置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,每隔3~4 d调整细胞浓度,并各加入IL-2 1000×10^3 U/L维持培养浓度。

1.3 靶细胞系

小细胞肺癌细胞株NCI-H69和NCI-H82均由美国Minnesota州大学谢志东博士赠送,均传代培养于含10%小牛血清的DMEM培养基中。文献证实NCI-H69为bcl-2基因高表达,而NCI-H82则不表达bcl-2基因[2]。

1.4 合成硫代寡核苷酸

bcl-2硫代寡核苷酸(SON)的正义链和反义链序列分别为:5'-GGGTGAACTGGGGGAGGATT-3'(正义);5'-AATCCTCCCCAGTTCACCC-3'(反义),分别与bcl-2 cDNA前3个密码子及其上游部位3个密码子碱基序列互补与一致。随机链由20个碱基随机组合,其碱基成分比例与反义链相同,序列为5'-ACACCCCAATTCTCCTGCCC-3',经基因库检索不与已有的已知编码序列相互补。3组寡核苷酸从DNA自动合成仪上由逐步法硫磷修饰合成SON,由中国科学院北京微生物研究所合成。

1.5 脂质体包裹SON转染靶细胞

SON/脂质体复合物在聚苯乙烯管中配制,脂质体(Sigma公司)和SON的浓度分别为 $400\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $24\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。进行SON转染的靶细胞系NCI-H69培养于低血清的OptiMEM培养基中(Sigma公司),处于对数生长。吸去培养液,洗1次,直接在培养细胞上加SON/脂质体复合物,至终浓度为 $1.2\text{ }\mu\text{mol/L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 CO_2 培养箱中孵育5 h,加入1 ml OptiMEM完全培养液继续孵育48 h,弃去OptiMEM/SON/脂质体复合物,加入2 ml新的DOMEM培养液,继续孵育48 h。对照组为不含SON培养液处理靶细胞系NCI-H69和NCI-H82。

1.6 Western印迹法检测靶细胞bcl-2蛋白

裂解经SON转染和对照组的靶细胞，提取细胞溶解液的蛋白质，每例取50 μg 样品与等体积加样缓冲液混和，煮沸5 min，12%SDS-PAGE电泳，然后电转移至NC膜上。用鼠抗人抗bcl-2单克隆抗体(Santa 公司)作 I 抗体，HRP标记的兔抗鼠IgG(Santa公司)作 II 抗体，ECL(Santa公司)荧光显色。

1.7 混合细胞培养DNA片段化检测(JAM试验)

用 3.7×10^5 Bq/ml [^3H]TdR(Amersham)标记经SON转染和对照组的靶细胞核DNA[3]，PBS洗2次，按 5×10^3 /ml加入平底96孔板中，根据不同的E/T(E: 培养的TIL为效应细胞; T: 靶细胞系)比率加入效应TIL细胞。37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂培养箱中孵育5 h，收集细胞行放射性计数，推算靶细胞中片段化DNA百分含量，代表其凋亡的含量。计算公式为：片段化DNA(%)=100 \times (不加入效应细胞的完整靶细胞核DNA放射计数-加入效应细胞的完整靶细胞核DNA放射计数)/不加入效应细胞的完整靶细胞核DNA放射计数。

2 结果

2.1 TIL的分离培养效果

实验共收集小细胞肺癌手术标本10例，平均每例分离TIL数为 6.84×10^7 ，每克瘤组织分离TIL数为 4.3×10^6 。分离的TIL中淋巴细胞含量 $>70\%$ ，细胞活性 $>98\%$ 。TIL(IL-2 1000×10^3 U/L)在培养第3~4天开始聚集成团，1周左右数目明显增多，3周达到高峰，总数约 $10^9 \times 10^{10}$ 。

2.2 靶细胞bcl-2蛋白的Western blotting检测结果

未经bcl-2 SON转染的对照组小细胞肺癌NCI-H69细胞，经用抗bcl-2单抗Western blotting检测，在25 000处显示清晰的蛋白带(图1, Lane C)，与文献报道的bcl-2蛋白带位置相符[4]，而NCI-H82细胞和经bcl-2 SON转染的NCI-H69细胞则未见相应的蛋白带(图1, Lane B和A)，说明应用bcl-2 SON转染NCI-H69细胞后明显抑制了bcl-2基因的表达。

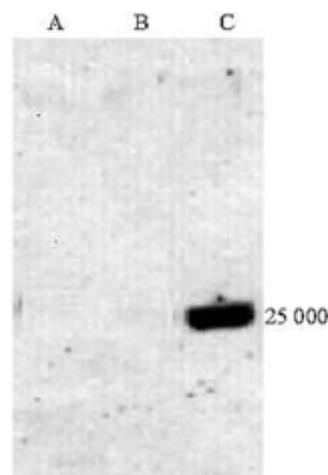


图1 小细胞肺癌细胞株bcl-2单抗Western blot免疫印迹法检测结果
Fig.1 Western blotting for bcl-2 expression in lung cancer cell line

2.3 混合培养的靶细胞DNA片段化含量

在不同效应细胞(TIL)与靶细胞比例(E/T)时，各例TIL诱导的靶细胞片段化DNA含量的平均值见表1。结果表明，随着E/T比例上升，H82细胞(无bcl-2表达)和经bcl-2 SON转染(抑制bcl-2表达)的H69细胞中片段化DNA含量也不断上升($P < 0.01$)，而未转染bcl-2 SON(bcl-2高表达)的H69细胞中片段化DNA含量则无显著改变($P > 0.05$)。另外，当E/T=1时，未经转染的H69细胞片段化DNA含量与经转染者和H82细胞无显著差异($P > 0.05$)，而随着E/T比例升高，前者与后两组片段化DNA含量间则呈明显差异($P < 0.01$)。

表 1 小细胞肺癌细胞株与各例 TIL 共同培养后片段化 DNA 的平均含量

Tab.1 Mean DNA content in lung carcinoma cell lines co-cultured with tumor-infiltrating lymphocytes

(%₀, n=10, Mean±SD)

Cell line	E/T:1/1	E/T:2/1	E/T:4/1	a E/T:8/1	P
<i>bcl-2</i> SON transfected H69	9.8±1.3	18.0±4.6	30.2±7.4	57.7±7.8	<0.01
Nontransfected H69	7.5±1.6*	7.7±1.0**	6.9±0.8**	8.1±1.5**	>0.05
Nontransfected H82	8.2±1.9	13.5±2.4	25.9±5.7	41.2±6.8	<0.01

*P>0.05, **P<0.01 vs another two groups

3 讨论

TIL是机体抵抗肿瘤的局部防御反应，体外研究证明TIL能通过穿孔素途径及Fas配基介导的途径诱导肿瘤细胞凋亡[5]。即使如此，TIL仍不能完全控制在体小细胞肺癌的生长，在有大量肿瘤淋巴细胞存在的情况下，仍不见肿瘤明显消退现象[6]。可见，小细胞肺癌可通过一定的机制逃避机体的免疫攻击作用。

临床上小细胞肺癌***bcl-2***蛋白的阳性表达率明显高于其他类型的肺癌，达75%以上[1]。多种体外培养的小细胞肺癌细胞株也呈***bcl-2***蛋白的过量表达[2]。***bcl-2***蛋白的表达被证实可以抑制程序性细胞死亡的过程，它能阻断细胞凋亡的最后共同通道。***bcl-2***可以阻断由多种化疗药物以及γ-射线照射造成的肺癌细胞程序性死亡[7][8]。但是，***bcl-2***表达与肺癌细胞免疫耐受的关系目前研究尚少。我们把从小细胞肺癌病人的肿瘤中分离出的浸润淋巴细胞分别与具有高***bcl-2***表达和无***bcl-2***表达的小肺癌细胞株进行共同培养，同时用***bcl-2*** SON处理高***bcl-2***表达的细胞株，并通过JAM试验检测不同TIL时各种肺癌细胞凋亡的情况。JAM试验的原理是通过先标记所要检测的靶细胞(小细胞肺癌细胞株)核DNA，与效应细胞共同培养后由于死亡细胞的片段化DNA被溶解洗脱，故通过检测剩余核DNA可推算片段化DNA的含量[3]。我们的研究发现，不同浓度TIL处理靶细胞后，具有***bcl-2***表达的肺癌细胞片段化DNA含量变化不大，也就是说这种肺癌细胞对TIL的免疫攻击不敏感。当该细胞株经***bcl-2*** SON处理后，Western免疫印迹法检测证实***bcl-2***蛋白的表达被明显抑制，此时可观察到随着共同培养时TIL浓度增加，靶细胞片段化DNA含量也不断上升。在无***bcl-2***表达的小肺癌细胞株中也有类似现象。这进一步证实***bcl-2***蛋白高表达可介导小肺癌细胞对机体免疫攻击的耐受性。研究证明，经***bcl-2*** SON阻断***bcl-2***表达后的肺癌细胞，在应用化疗药物后较易发生凋亡[9]。可见，***bcl-2*** SON可有效地抑制肺癌细胞的抗凋亡特性，使其在化疗或免疫攻击下发生凋亡，因而可作为有效的肺癌基因治疗手段。

参考文献:

[1]Kaiser U, Schilli M, Haag U, et al. Expression of *bcl-2* protein in small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 1996, 15: 31-40.

[2]Zangemeister-Wittke U, Schenker T, Luedke GH, et al. Synergistic cytotoxicity of *bcl-2* antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 1998, 78: 1035-42.

[3]Matzinger P. The JAM test: a simple assay for DNA fragmentation and cell death[J].

J Immunol Methods, 1991, 145: 185-92.

[4]Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, et al. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein[J]. Am J Pathol, 1994, 145: 1036-40.

[5]Hishii M, Kurnick JT, Ramirez-Montagut T, et al. Studies of the mechanism of cytolysis by tumour-infiltrating lymphocytes[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 116: 388-94.

[6]Pawelec G, Zeuthen J, Kiessling R, et al. Escape from host-antitumor immunity[J]. Crit Rev Oncog, 1997, 8:111-41.

[7]Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, et al. Expression of DNA topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5: 2048-58.

[8]Sirzen F, Zhivotovsky B, Nilsson A, et al. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in lung carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities[J]. Anticancer Res, 1998, 18: 695-9.

[9]欧阳能太, 邱志辉, 冉丕鑫, 等. bcl-2反义寡核苷酸增强顺铂诱导的肺癌细胞凋亡[J]. 临床与实验病理学杂志, 1998, 14: 125.

[回结果列表](#)