

硫代反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸对 BcaCD885 颊癌细胞凋亡及热敏感性的影响

何永文¹, 边莉², 梁新华³

(1. 昆明医学院口腔医学研究所, 云南 昆明 650032; 2. 昆明医学院第一附属医院, 云南 昆明 650032; 3. 四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科教研室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨硫代反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸 (AS-sODN) 对 BcaCD885 颊癌细胞凋亡及热敏感性的影响。方法 以脂质体 Lipofectin 为载体, 转染 AS-sODN 于 BcaCD885 细胞内, 倒置显微镜观察细胞形态学改变, TUNEL 原位末端标记检测细胞凋亡, 流式细胞技术 (FCM) 测定细胞凋亡率及 Bcl-xL 蛋白表达水平; 转染 AS-sODN 于 BcaCD885 细胞内, 再以 43, 40 min 加热细胞, FCM 检测细胞凋亡率。结果 AS-sODN 转染后, BcaCD885 颊癌细胞出现皱缩、呈浮起状, TUNEL 原位末端标记阳性, Bcl-xL 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$), 热诱导细胞凋亡率明显提高 ($P < 0.05$)。结论 硫代反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸能诱导 BcaCD885 颊癌细胞凋亡并能提高其热敏感性。

[关键词] 反义寡脱氧核苷酸; Bcl-xL; BcaCD885 细胞; 凋亡; 热敏感性

[中图分类号] R 782 **[文献标识码]** A

Effect of Phosphorothioate Antisense Bcl-xL Oligodeoxynucleotides on Apoptosis and Thermosensitivity of BcaCD885 Cells

HE Yong-wen¹, BIAN Li², LIANG Xin-hua³. (1. Dept. of Stomatology Institute, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 2. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of phosphorothioate antisense Bcl-xL oligodeoxynucleotides on apoptosis and thermosensitivity of BcaCD885 cells. **Methods** After phosphorothioate antisense Bcl-xL oligodeoxynucleotides were transfected into BcaCD885 cells. The characteristics of apoptotic cells were evaluated by morphological observation and TUNEL staining. Apoptotic rate and Bcl-xL protein expression were analyzed with flow cytometry. The influence of phosphorothioate antisense Bcl-xL oligodeoxynucleotides on apoptotic rate of BcaCD885 cells induced by hyperthermia with 43-40 min was also examined through flow cytometry. **Results** The BcaCD885 cells transfected with phosphorothioate antisense Bcl-xL oligodeoxynucleotides displayed apoptotic morphological features. The Bcl-xL protein expression level of these cells was down-regulated significantly compared with the controlled group ($P < 0.05$). The apoptotic rate of these cells induced by hyperthermia was increased significantly compared with the controlled group ($P < 0.05$). **Conclusion** Phosphorothioate antisense Bcl-xL oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and improve thermosensitivity of BcaCD885 cells.

[Key words] antisense oligodeoxynucleotides; Bcl-xL; BcaCD885 cells; apoptosis; thermosensitivity

笔者以往的研究^{1,2} 结果表明: 高温杀伤 BcaCD885 颊癌细胞存在细胞坏死和细胞凋亡两种方式, 治癌温度 (43, 40 min 加热) 是通过诱导细胞凋亡发挥作用, 凋亡率可作为判断热敏感性的指标; 热诱导颊癌细胞凋亡受 Bcl-2 家族成员的调控。本研究中, 笔者采用硫代反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, AS-sODN) 抑制细胞内 Bcl-2 家族重要成员 Bcl-xL 蛋白表达, 探讨其在治疗颊癌中的作用

及其对热敏感性的影响。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

Elite ESP 型流式细胞仪 (Coulter 公司, 美国); TUNEL 原位末端标记试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司, 德国); RPMI 1640 培养基 (GIBCO BRL 公司, 美国); Bcl-xL 特异的硫代反义寡脱氧核苷酸及对照的硫代无义寡脱氧核苷酸 (序列设计参阅文献报道³), AS-sODN: 5'-AAAGTATCCCA GCCGCCGTT-3', NS-sODN: 5'-CATATCACGCGCGCACTATG-3' (GIBCO BRL 公司, 美国); 脂质体 Lipofectin (GIBCO BRL 公司,

[收稿日期 2002-11-20; 修回日期 2004-02-12]

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (0112444)

[作者简介] 何永文 (1971-), 男, 副教授, 博士

[通讯作者] 何永文, Tel: 0871-5338944

美国);碘化丙啶(Sigma公司,美国);一抗:兔抗人 Bcl-xL 多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国),工作浓度 1:50;二抗:异硫氰酸胍标记的羊抗兔 IgG(Santa Cruz公司,美国),工作浓度 1:50。

1.2 细胞培养

BcaCD885 颊癌细胞解冻复苏,于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基、37℃、5% CO₂ 条件下培养。取处于对数生长期的细胞,调整细胞浓度为每毫升 1×10^6 ,按实验分组,接种等量细胞于 50 ml 培养瓶内或放置有盖玻片的 60 mm 培养皿内,使细胞单层生长于盖玻片上,形成细胞爬片,24 h 后用于实验。

1.3 细胞形态学检测

倒置显微镜观察细胞的生长情况及形态变化。

1.4 TUNEL 原位末端标记

4% 多聚甲醛固定爬片细胞,PBS 洗,0.1% Triton-X-100(0.1% 柠檬酸配制)4 打孔 5 min,PBS 洗,加 50 μ l TUNEL 反应混合液(由末端脱氧核苷酸转移酶液和荧光素标记液按 1:1 配成),37℃ 孵 60 min,PBS 洗,加 50 μ l 碱性磷酸酶抗荧光素抗体,37℃ 孵 30 min,室温下 50 μ l 快红显色 10 min,PBS 洗后封片,光镜下观察。以 PBS 代替末端脱氧核苷酸转移酶液为阴性对照。

1.5 细胞转染⁴

50 ml 培养瓶内培养细胞达 60%~80% 融合。消毒无菌玻璃试管中配制溶液 A:加 40 μ l sODN (10^{-3} mol/L)至 360 μ l 无血清培养基中;溶液 B:加 240 μ l Lipofectin(1 g/L)至 160 μ l 无血清培养基中。合并溶液 A 和 B,轻轻混匀,室温放置 15 min。弃细胞培养液,用无血清培养基洗涤细胞 2 次。加 1.2 ml 无血清培养基至 Lipofectin-sODN 混合物中(sODN 的终浓度为 20 μ mol/L),混匀后,小心滴加于细胞上,轻轻混匀。37℃、5% CO₂ 孵箱培养 12 h。弃转染液,加含 10% 小牛血清完全培养基 37℃、5% CO₂ 继续培养。

1.6 FCM-DNA 检测

收获各组细胞,75% 冷乙醇悬浮细胞,4℃ 固定过夜,PBS 洗涤,加碘化丙啶染色,流式细胞仪检测,测出各组细胞 DNA 含量及各细胞周期所占百分比,以 G₀/G₁ 前期亚二倍体峰为凋亡峰,计算凋亡率。

1.7 FCM 蛋白质表达测定

收获各组细胞,3% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜,PBS 洗涤,加一抗 50 μ l 重悬细胞,4℃ 反应 30 min,PBS 洗涤,加 50 μ l 异硫氰酸胍标记的二抗 50 μ l,4℃ 避光反应 30 min,PBS 洗涤后,上机检测荧光强度。

1.8 实验分组

硫代反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸对 BcaCD885 颊癌细胞凋亡影响实验分组:三蒸水代替 sODN 转染

BcaCD885 细胞为对照组;20 μ mol/L NS-sODN 转染 BcaCD885 细胞为 NS-sODN 组;20 μ mol/L AS-sODN 转染 BcaCD885 细胞为 AS-sODN 组。培养条件皆为培养 12 h 后,37℃、5% CO₂ 继续培养 36 h。硫代反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸对 BcaCD885 颊癌细胞热敏感性影响实验分组:三蒸水代替 sODN 转染 BcaCD885 细胞为 43 组;20 μ mol/L NS-sODN 转染 BcaCD885 细胞为 NS-sODN 加 43 组;20 μ mol/L AS-sODN 转染 BcaCD885 细胞为 AS-sODN 加 43 组。培养条件皆为培养 12 h,37℃、5% CO₂ 继续培养 24 h,43℃ 水浴 40 min,37℃、5% CO₂ 培养 12 h。

1.9 统计分析

对数据采用 *t* 检验进行组间差异分析。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察 BcaCD885 细胞形态

BcaCD885 细胞经 AS-sODN 处理后,倒置显微镜下细胞皱缩、变圆,呈浮起状,核凝集,胞浆浓缩呈泡状;TUNEL 法标记见大量细胞红染,散在分布,并可见明显的凋亡小体。对照组及 NS-sODN 组 BcaCD885 颊癌细胞贴壁生长良好,呈圆形、多角形、大小不一;TUNEL 法标记仅个别细胞阳性着色(图 1~3)。



图 1 转染对照组 BcaCD885 细胞 TUNEL 染色 $\times 100$

Fig 1 BcaCD885 cells of control group TUNEL staining $\times 100$

2.2 AS-sODN 对 BcaCD885 细胞 Bcl-xL 蛋白表达及凋亡率的影响

AS-sODN 作用 BcaCD885 细胞后,与对照组相比,Bcl-xL 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$),同时凋亡率明显升高 ($P < 0.05$),而 NS-sODN 组 Bcl-xL 蛋白表达及凋亡率变化不大,与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。表明 20 μ mol/L AS-sODN 对颊癌细胞 Bcl-xL 蛋白表达具有明显抑制效应并能明显升高其凋亡率(表 1)。



图2 NS-sODN组 BcaCD885 细胞 TUNEL 染色 ×200

Fig 2 BcaCD885 cells transfected with NS-sODN TUNEL staining ×200

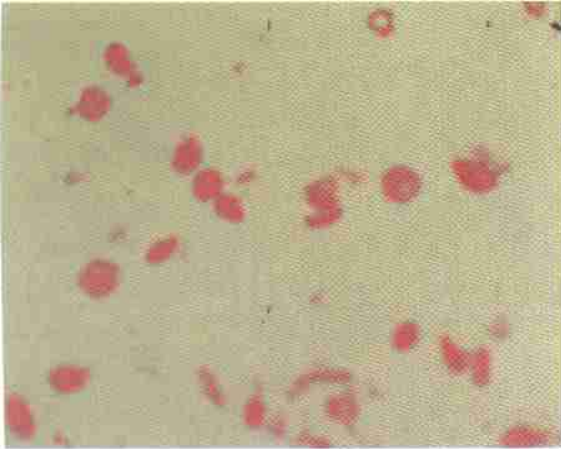


图3 AS-sODN组 BcaCD885 细胞 TUNEL 染色 ×100

Fig 3 BcaCD885 cells transfected with AS-sODN TUNEL staining ×100

表1 AS-sODN对 BcaCD885 细胞 Bcl-xL 蛋白表达及凋亡率的影响 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of AS-sODN on Bcl-xL protein expression and apoptotic rate of BcaCD885 cells (n=4, $\bar{x} \pm s$)

实验分组	Bcl-xL 蛋白荧光强度	凋亡率 (%)
对照组	5.02 ±2.10	2.96 ±0.72
NS-sODN 组	4.88 ±2.12	7.82 ±2.34
AS-sODN 组	0.34 ±0.05 *	29.75 ±6.28 *

*与对照组相比 $P < 0.05$

2.3 AS-sODN 对 BcaCD885 细胞热敏感性的影响

AS-sODN 对 BcaCD885 细胞热敏感性的影响结果为:43 组凋亡率为 (54.40 ±6.32) % ,NS-sODN 加 43 组为 (59.73 ±4.62) % ,AS-sODN 加 43 组为 (84.64 ±7.56) % 。统计分析表明,与 43 组相比, BcaCD885 细胞经 AS-sODN 预处理后,对热杀伤的敏感性显著增强 ($P < 0.05$),而 NS-sODN 预处理无类似效应 ($P > 0.05$)。

3 讨论

Bcl-xL 蛋白因作为半胱氨酸天冬氨酸酶活化及

线粒体功能的调控点而成为细胞凋亡信息传递的共同通路,Bcl-xL 能促进细胞存活,抑制凋亡发生。细胞在未受到凋亡信号刺激时,Bcl-xL 与凋亡活化因子 Apaf-1 结合,抑制 Apaf-1 与半胱氨酸天冬氨酸酶前体结合,阻止酶活化及凋亡发生。当细胞接受到凋亡信号时,促细胞凋亡蛋白如 Bik 与 Bcl-xL 结合形成二聚体,阻止 Bcl-xL 与 Apaf-1 结合,Apaf-1 游离,结构改变,同时线粒体膜去极化通透性升高,细胞色素 C 释放至胞浆内,促使 Apaf-1 与半胱氨酸天冬氨酸酶前体结合并激活之,活化的半胱氨酸天冬氨酸酶裂解 DNA,引起细胞凋亡⁵。Bcl-xL 过表达与肿瘤发生有密切关系,并能抑制化疗等引起的凋亡,而下调其表达则能促进凋亡发生⁶。

本研究中,笔者发现 20 μmol/L 硫代反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸能封闭 BcaCD885 细胞内 Bcl-xL 蛋白表达,并且细胞发生典型的凋亡形态学改变。表明反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸能诱导颊癌细胞的凋亡。流式细胞术研究进一步发现,凋亡率与对照组间存在明显差异 ($P < 0.05$)。而 20 μmol/L 正义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸处理组与对照组相似,在形态学上未见明显的凋亡细胞出现,流式细胞术检测两者凋亡率不存在明显差异 ($P > 0.05$)。进一步观察反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸阻断 BcaCD885 细胞内源性 Bcl-xL 蛋白表达后,其对热诱导细胞凋亡的影响,发现热诱导细胞的凋亡率得到了明显提高 ($P < 0.05$),即封闭细胞内 Bcl-xL 蛋白表达,增加了细胞对热诱导凋亡反应的敏感性,提高了热杀伤细胞的效率。以上结果从反面证实了 Bcl-xL 作为促细胞生存蛋白,能抑制颊癌细胞凋亡的发生;高水平 Bcl-xL 蛋白可能致使颊癌细胞对热产生抗拒性。从而为进一步研究反义 Bcl-xL 寡脱氧核苷酸在治疗颊癌中的应用奠定了基础。

[参考文献]

- 1] 王升志,何永文,毛祖彝,等. 高温诱导 BcaCD885 颊癌细胞凋亡及检测 J. 口腔颌面外科杂志,2000,10(3):239-242.
- 2] 何永文,赵德萍,刘流,等. 高温诱导颊癌细胞凋亡的相关机理研究 J. 口腔医学纵横,2001,17(1):12-14.
- 3] Simes-Wust AP, Olie RA, Gautschi O, et al. Bcl-xL antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells J. Int J Cancer, 2000, 87(4): 582-590.
- 4] 姜泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法 M. 北京:人民军医出版社,1996:157-158.
- 5] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis J. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- 6] Leech SH, Olie RA, Gautschi O, et al. Induction of apoptosis in lung-cancer cells following Bcl-xL anti-sense treatment J. Int J Cancer, 2000, 86(4): 570-576.

(本文编辑 汤亚玲)