

高温诱导颊癌细胞凋亡过程中 Bax 基因表达的动态变化

何永文 毛祖彝 边 莉 梁新华 高 志 左 晖 曹选平

摘要 目的:探讨 Bax 基因在热诱导 BcaCD885 细胞凋亡过程中的作用。方法:水浴加温诱导 BcaCD885 细胞产生凋亡。通过 FCM-DNA、FCM-抗体检测及 RT-PCR 技术,观测热诱导颊癌细胞凋亡过程中 Bax 基因蛋白及 mRNA 表达的动态变化。结果:凋亡率与 Bax 蛋白表达水平存在正相关关系;加热后,细胞 Bax mRNA 相对量明显升高。结论:高温作为一种外来刺激信号通过上调 Bax 基因的表达,诱导 BcaCD885 细胞凋亡的发生。

关键词 高温 BcaCD885 细胞 凋亡 Bax 基因

Relationship between the Expression of Bax and Apoptosis Induced by Hyperthermia in BcaCD885 Cells

He Yongwen, Bian Li

The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College

Mao Zuyi, Liang Xinhua, Cao Zhi, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: This study aimed to investigate the role of Bax gene in apoptosis induced by hyperthermia in BcaCD885 cells. **Methods:** After inducing apoptosis through hyperthermia, the expression of Bax protein and mRNA were examined with FCM antibody analysis and RT-PCR technique respectively. **Results:** Up regulation of Bax protein was noted after hyperthermia. The correlation coefficient *r* between the apoptotic rate and the expression Bax protein was 0.9240. The expression of Bax mRNA was also raised after hyperthermia. **Conclusion:** Hyperthermia acting as an external signal may up-regulates expression of Bax gene and then induces apoptosis in BcaCD885 cells.

Key words: hyperthermia BcaCD885 cells apoptosis Bax gene

Oltvai 等¹用 Bcl-2 基因蛋白产物 Bcl-2 特异性单克隆抗体免疫沉淀等方法,从人和鼠 B 细胞中发现与 Bcl-2 共沉淀的一种 12 kD 蛋白质,命名为 Bax (bcl-associated X protein),与 Bcl-2 促细胞存活作用相反,Bax 促细胞死亡。本研究笔者以 FCM-抗体检测及 RT-PCR 技术,观测热诱导颊癌细胞凋亡过程中 Bax 基因蛋白及 mRNA 表达的动态变化,以期

探讨其在细胞凋亡过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备

Shellab Model 2300 型自控式 CO₂ 孵箱 (Shellab 公司), Y-1450 型超净工作台 (苏州净化设备厂),低温高速台式离心机 (德国 5403 型),BS₂ 型电热恒温水浴箱 (北京医疗设备厂),Elite ESP 型流式细胞仪 (Coulter 公司,美国),UVP GDS-800 凝胶成像分析系统,PCR 扩增仪 (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler)。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基 (GIBCO BRL 公司,美国),2% 苕盼蓝染液,碘化丙啶 (PI) (Sigma 公司,美国),兔抗人 Bax 多克隆

本课题为云南省自然科学基金资助项目 (编号 1999C0007R)

作者单位:650032 昆明医学院第一附属医院 (何永文,边莉),四川大学华西口腔医学院 (毛祖彝,梁新华,高志,左晖,曹选平)

抗体 (Santa Cruz 公司),工作浓度 1:50 (用 5% Saponin 配制),异硫氰酸胍 (FITC) 标记的羊抗兔 IgG (Santa Cruz 公司),工作浓度 1:50 (用 5% Saponin 配制),0.5% Tween20 (用 0.01 mol/L PBS 配制),无 RNase 水 (0.01% DEPC 处理),引物 (GIBCO BRL 公司,美国):

Bax mRNA (538 bp) Forward 5'-CAGCTCTGACGAGATCATGAA GACA-3; Reverse 5'-GCCCATCTTCTTCCA GATGGT GACC-3

-actin mRNA (154 bp) Forward 5'-TCATCACCATTG GCAATGAG-3; Reverse 5'-GTGTTGCGGTACAGGF-3

TRIzol 总 RNA 提取试剂 (GIBCO BRL 公司,美国),RT-PCR 试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司,德国)。

1.3 细胞来源

人颊癌细胞系 BcaCD885 由四川大学华西口腔医学院提供。

1.4 实验方法

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 1 × 10⁶/ml,按实验分组,接种等量细胞于 50 ml 培养瓶内,24 h 后用于实验。

细胞加热: 43℃ 水浴 40 min,再置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h。对照组: 37℃ 水浴 40 min 后再置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 12 h。

活细胞计数: 培养细胞,弃培养液,0.25% 胰蛋白酶 1 ml 消化 10 min,弃消化液,加 Hank's 液终止消化,吹打制成细胞悬液,取 20 μl 细胞悬液,加 20 μl 2% 萘酚蓝染液,混匀后行活细胞计数,拒染细胞为活细胞,蓝色细胞为死亡细胞。

按常规作 FCM-DNA 测定: FCM 蛋白质表达测定及 RT-PCR 测定。

1.5 统计学分析处理

组间差异分析采用 *t* 检验,相关分析采用直线相关分析,计算相关系数 *r*。

2 结果

2.1 凋亡率动态变化

43℃ 水浴 40 min 后,细胞周期发生明显改变,并在 G₁ 峰前出现“亚 G₁ 峰”,即凋亡峰。其凋亡率在加热结束时,与对照组无明显差别 (*P* > 0.05),但 37℃ 孵育后,凋亡率快速升高,6 h 时高达 73.75%,与对照组相比,有显著性差异 (*P* < 0.05),而此时萘酚蓝拒染实验证实相应的活细胞数为 88.25%。之后,凋亡率缓慢恢复,48 h 后降至 27.975% (表 1)。

2.2 Bax 蛋白表达的动态变化

43℃ 40 min 加热 BcaCD885 颊癌细胞后,FCM 分析 Bax 蛋白表达情况,发现其表达量上升,于 6 h

时达高峰 (*P* < 0.05),维持至 12 h 开始下降 (表 2)。

表 1 43℃ 40 min 加热后不同时间 BcaCD885 细胞 DNA 含量 ($\bar{x} \pm s$, %, n = 4)

项目	对照	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
活细胞	93.3750 ± 1.523	97.650 ± 3.414	90.7550 ± 8.321	88.2500 ± 7.950	87.4650 ± 3.563	92.3450 ± 4.347	90.6340 ± 9.377
凋亡率	3.7750 ± 0.670	5.9750 ± 1.497	52.2000 ± 5.307*	73.7500 ± 8.180*	69.5000 ± 7.601*	58.7500 ± 2.589*	27.9750 ± 5.417*

* 与对照组相比 *P* < 0.05

表 2 43℃ 40 min 加热后不同时间 BcaCD885 细胞 Bax 基因蛋白表达的荧光强度 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

项目	对照	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Bax 表达 荧光强度	2.8975 ± 0.978	2.5225 ± 0.497	11.2750 ± 1.548*	30.0750 ± 3.002*	25.2250 ± 3.848*	14.8750 ± 3.303*	6.4450 ± 3.222

* 与对照组相比 *P* < 0.05

2.3 Bax mRNA 表达的动态变化

43℃ 40 min 加热处理 BcaCD885 细胞后,经 RT-PCR 扩增检测 Bax 基因 mRNA 的相对表达量,发现其表达上升,加热后 3 h、6 h、12 h 其相对量都比对照组高 (*P* < 0.05) (表 3)。

表 3 43℃ 40 min 加热后不同时间 BcaCD885 细胞 Bax mRNA 相对量 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

项目	对照	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Bax mRNA 相对量	1.2066 ± 0.110	1.4147 ± 0.136	7.3367 ± 2.119*	8.3318 ± 1.563*	3.7296 ± 1.316*	1.6583 ± 0.296*	1.3890 ± 0.129

* 与对照组相比 *P* < 0.05

2.4 BcaCD885 细胞凋亡过程中凋亡率与 Bax 蛋白表达的相关性分析

线性相关分析发现: 43℃ 40 min 加热后, BcaCD885 颊癌细胞凋亡率与 Bax 蛋白表达存在正相关关系 (*r* = 0.9240) (图 1)。

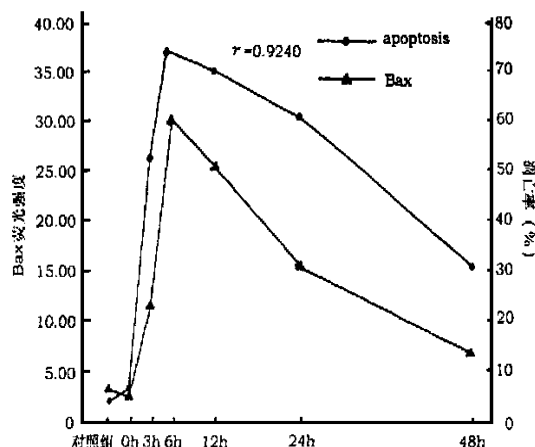


图 1 43℃ 40 min 加热后 BcaCD885 细胞凋亡率与 Bax 蛋白表达的关系

3 讨 论

Bcl-2 及其家族成员在细胞凋亡中起双重调节作用,根据其功能,可分为两类:促细胞生存组和促细胞凋亡组²,Bax 属后者¹。进一步的研究发现 Bax 基因在肿瘤组织中呈低表达或存在突变,并且这些细胞对凋亡具有抵抗性,对放疗、化疗反应不佳,而上调其表达,则能提高疗效。表明 Bax 能抑制肿瘤的生成,促进细胞凋亡^{3~6}。

本实验以 FCM 测定 43 40 min 加热 BcaCD885 细胞后,Bax 基因蛋白的动态变化,结果发现,热诱导颊癌细胞凋亡过程伴随着 Bax 蛋白表达变化,表现为凋亡率升高,Bax 蛋白表达水平也升高,凋亡率与 Bax 蛋白表达水平间存在正相关关系($r=0.9240$)。表明 Bax 基因蛋白表达上升与热诱导细胞凋亡的发生有密切的关系,提示热诱导细胞凋亡可能通过上调 Bax 表达而实现。Bax 可能通过以下途径调节细胞凋亡的发生:当细胞中 Bax 蛋白高表达时形成 Bax 同源二聚体,加速细胞凋亡¹。当细胞接收到凋亡信号(如加热处理)时,促凋亡蛋白 Bax 能将 Apaf-1 从死亡抑制蛋白 Bcl-2 上游游离下来,参与半胱氨酸天冬氨酸酶的活化,凋亡发生²。细胞凋亡过程中,细胞色素 C 释放至胞浆内,加速 Apaf-1 结构的改变,使之与半胱氨酸天冬氨酸酶前体结合并激活之。Bax 蛋白高表达或同源二聚体形成则能促进线粒体通透性转变或在线粒体外膜上打孔诱发细胞凋亡^{2,7,8}。热诱导细胞凋亡中,核酸内切酶的活化可能依赖于胞内 $Ca^{2+9~11}$ 。Bax 通过升高细胞器膜通透性,促进 Ca^{2+} 外流调节细胞凋亡的发生。Bax 还能与其他基因蛋白如 P53 相互作用,调节细胞凋亡¹²。

笔者采用 RT-PCR 技术对其 mRNA 表达水平作进一步研究。发现 Bax mRNA 表达相对量在热诱导细胞凋亡过程中,发生了明显的改变,加热后 3 h 即升高至 7.3367,6 h 达高峰,之后开始下降。说明加热颊癌细胞能引起 Bax mRNA 表达水平的升高,进而促进 Bax 蛋白的表达。Colbert 等用糖皮质激素诱导大鼠胸腺细胞凋亡时发现 7 种 mRNA 表达增加,而放线菌酮或放线菌素等¹³ RNA 蛋白质大分子合成抑制剂,则可抵抗糖皮质激素诱导胸腺细胞发生细胞凋亡。Fuse 等¹⁴ 对胶质瘤细胞进行热诱导后,也发现细胞出现凋亡,并伴有 Bax 蛋

白及 mRNA 表达升高。笔者认为,热诱导颊癌细胞凋亡过程中,高温作为一种外来的刺激信号,可能通过上调促凋亡基因 Bax 的表达而促进细胞死亡。

参考文献

- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homology, Bax, the accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993,74(4):609~619
- Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998,281:1322~1326
- Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, et al. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low Bax expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer*, 1995,60(7):854~859
- Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, et al. Overexpression of Bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis. *Int J Cancer*, 1996,67(1):101~105
- Rampino N, Yamamoto H, Ikon Y, et al. Somatic frameshift mutations in the Bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator, phenotype. *Science*, 1997,275:967~969
- Yic C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, 1997,385:637~640
- Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 1998,60:533~573
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998,281:1309~1312
- Takano YS, Harmon BV, Kerr JFR. Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol*, 1991,163(4):329~336
- Shchepotin IB, Soldatenkov V, Wroblewski JT, et al. Apoptosis induced by hyperthermia and verapamil in vitro in a human colon cancer cell line. *Int J Hyperthermia*, 1997,13(5):547~557
- Shchepotin IB, McRae DA, Shabahang M, et al. Hyperthermia and verapamil inhibit the growth of human colon cancer xenografts in vivo through apoptosis. *Anticancer Res*, 1997,17(3c):2213~2216
- McCurrach ME, Connor TMF, Knudson CM, et al. Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53 dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,99:2345~2349
- Colbert RA, Young DA. Glucocorticoid-induced messenger ribonucleic acid in rat thymic lymphocytes: rapid primary effects specific for glucocorticoids. *Endocrinology*, 1986,119(6):2598~2605
- Fuse T, Yoon KW, Kato T, et al. Heat-induced apoptosis in human glioblastoma cell line 172. *Neurosurgery*, 1998,42(4):843~849

(1999-09-08 收稿)

(本文编辑 王 晴)