文章编号:1000-5404(2006)02-0107-04

论著

视黄酸依赖 Fas/RARα 融合基因诱导 MCF-7 细胞凋亡的分子机制研究

杨志祥[1],糜漫天[2],王 东[1],王 阁[1],郎海滨[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042,[2]军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨视黄酸协同融合基因 Fas/RARα 诱导 MCF-7 细胞凋亡效应及其分子机制。**方法** 以流式细胞仪、DNA 梯形带检测 MCF-7 细胞凋亡效应,经 RT-PCR 和蛋白免疫印迹等方法观测视黄酸处理后 caspase-8、bcl-2 及 bax 基因表达变化。**结果** 一定剂量视黄酸可诱导转染 Fas/RARα 融合基因的 MCF-7 细胞凋亡,caspase-8 和 bax 基因表达上调,而 bcl-2 基因表达下降。**结论** 视黄酸及其依赖的融合基因表达可联合诱导 MCF-7 细胞凋亡,caspases 和 bcl-2 家族成员表达变化可能是其作用的主要分子机制。

关键词:融合基因;视黄酸;细胞凋亡;MCF-7
中图法分类号:R329.24;R730.23;R737.9 **文献标识码**:A

Apoptosis of MCF-7 cells induced by retinoic acid and fusion gene of Fas/RARα

YANG Zhi-xiang[1], MI Man-tian[2], WANG Dong[1], WANG Ge[1], LANG Hai-bin[2] ([1]Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the molecular mechanism of apoptosis of MCF-7 cells induced by retinoic acid (RA) after the vector of Fas/RARα fusion gene was transfected into MCF-7 cells. **Methods** In the MCF-7 cells transfected of fusion gene vector pRARE-Fas/RAR alpha and the untransfected MCF-7 cells, after treated with RA, the cell cycle distribution and the apoptotic rate were measured with flow cytometry, the apoptotic changes were measured with DNA ladder, the expressions of bcl-2, bax and caspase-8 genes were detected with RT-PCR and Western blotting. **Results** After treated by RA, the apoptotic rate and the DNA fragmentation rate were increased in MCF-7 cells transfected of the vector of Fas/RARα fusion gene. The DNA ladder was detectable in RA-treated cells. The expressions of bax and caspase-8 were increased but bcl-2 decreased after treated with RA. These changes were of significant difference in pRARE-Fas/RAR alpha transfected tumor cells than untransfected tumor cells. **Conclusion** RA and the exogenous fusion gene could cooperate in apoptosis of MCF-7 cells, in which the caspases and bcl-2 might play an important role in the molecular mechanism.

Key words: fusion gene; retinoic acid; apoptosis; MCF-7

视黄酸可诱导肿瘤细胞分化成熟和凋亡,但因抗性和毒副作用限制其广泛应用[1]。本研究应用 Fas/RARα 融合基因真核表达载体(pRARE-Fas/RARα)转染实体瘤——MCF-7 乳腺癌细胞,以较低剂量(如 1×10^{-7} mol/L)ATRA 处理一定时间后,检测 RA 和外源性融合基因表达联合诱导的细胞凋亡效应,并结合 caspases 和 bcl-2 家族成员表达变化探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与 RA 处理

转染有 pRARE-Fas/RARα 表达载体的 MCF-7 细胞命名为 MCF-7^{FP},以含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液培养未转染的 MCF-7 和 MCF-7^{FP}细胞,37 ℃,5% CO_2常规培养传代[2]。全反式视黄酸(ATRA)处理细胞终浓度选用 1×10^{-7} mol/L,分别处理 1、2、3 d。

1.2 流式细胞仪检测细胞周期相分布及细胞凋亡率

ATRA 处理各组细胞 2 d,收获后以 70% 冷乙醇固定,RNase 消化,碘化丙啶(PI)染色,采用流式细胞仪检测细胞周期相分布和细胞凋亡率变化。

1.3 DNA 梯形带检测

收获各时相点细胞(约 10^6 个),PBS 洗涤细胞 2 次,加 150 μl NP-40 细胞溶破液(1% NP-40, 20 mmol/L EDTA, 50

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970321)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970321)
作者简介:杨志祥(1973-),男,河北省沙河市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)68757699
收稿日期:2005-07-21;修回日期:2005-11-04

mmol/L Tris · Cl pH 7.5)溶破细胞 5 h,离心收集上清,用 150 μl NP-40 细胞溶破液重复抽提沉淀 1 次,上清置于等体积 1% SDS 溶液中,混匀,加 RNase A 至终浓度为 2 μg/ml,56 ℃孵育 2 h,加蛋白酶 K 至终浓度为 2 μg/ml,37 ℃水浴 2 h,加 1/2 体积的 10 mol/L 醋酸铵和 2 倍体积的冰冷无水乙醇,-20 ℃过夜,离心,75% 冰冷乙醇漂洗沉淀(此时可在 -20 ℃放置较长时间),20 μl TE 缓冲液溶解 DNA。取 3 μl DNA 上样进行 2% AGE 分析。

1.4 RT-PCR 分析 caspase-8、bcl-2、bax mRNA

引物设计与合成如下。

1.4.1 caspase-8 引物 参照文献[3]方法,RT-PCR 产物长度为 463 bp。Caspase-8 FP1:5′- GCATTAGGGACAGGAATGGA -3′; Caspase-8 RP2:5′-TTATTCACAGTGGCCATCCC -3′。

1.4.2 bax 引物 参照文献[4]方法,RT-PCR 产物长度为 257 bp。bax FP1:5′-TCCACCAAGAAGCTGAGCGA -3′; bax RP2:5′-GTCCAGCCCATGATGGTTCT -3′。

1.4.3 bcl-2 引物 参照 GenBank DNA 序列,RT-PCR 产物长度为 282 bp。bcl-2 FP1:5′-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′; bcl-2 RP2:5′-TCACTTGTGGCTCAGATAGG-3′。

1.4.4 内参照 β_2-microglubulin (β_2-MG)引物 产物长度为 120 bp。β_2-MG FP1:5′-ACCCCCACTGAAAAAGATGGA-3′; β_2-MG RP2:5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′。

引物由上海生物工程服务有限公司合成提供。参照 RT-PCR 试剂盒操作说明进行 RT-PCR。

1.5 免疫印迹分析 bcl-2、bax 蛋白

常规行 12% 聚丙烯酰胺电泳,电转移 85 mA 18 ~ 20 h,取膜用含 1% BSA 的 PBST 室温封闭 1 h,弃去封闭液,加用封闭液1∶400稀释的一抗,室温振摇孵育 1 h,4 ℃过夜;用 PBS 洗膜 10 min,3 次;加入 1∶20 稀释的生物素化二抗工作液,室温振摇 1 h;PBS 洗膜 10 min 后,用 Tris · Cl 洗膜 2 次,10 min/次;加入 1∶20 稀释辣根过氧化酶标记的链酶卵白素工作液,振摇1 h;Tris · Cl 洗膜 10 min,3 次;用含 0.05% DAB、0.03% H_2O_2 的 10 mmol/L Tris · Cl(pH 7.4)室温避光显色。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 RA 对 MCF-7 细胞周期相分布影响

细胞经 RA 处理 2 d 后,收获细胞,流式细胞仪分析细胞周期相分布和细胞凋亡百分率,结果显示:RA 处理后 G_1/G_0 期细胞增多,S 期和 G_2/M 期细胞减少,细胞凋亡率增加(表 1)。RA 处理的 MCF-7^{FP}细胞较 RA 处理的 MCF-7 细胞变化更为明显($P<0.01$)。

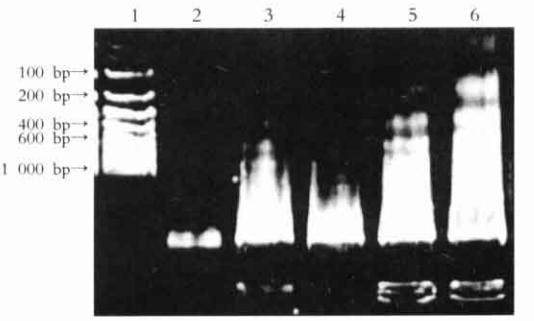
2.2 RA 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

pRARE-Fas/RARα 质粒转染和未转染的 MCF-7 细胞经 RA 处理后,细胞凋亡百分率增加(表 1),进一步分析 RA 处理的 pRARE-Fas/RARα 转染细胞和未转染细胞 DNA 梯形带检测也发现 MCF-7^{FP}细胞出现更为明显的 DNA 梯形带(图 1)。

表 1 RA 及其诱导的融合基因表达产物对细胞周期分布和细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞	细胞周期			凋亡率(%)
	G_1/G_0	S	G_2/M	
MCF-7	65.9 ± 4.6	31.5 ± 2.2	2.6 ± 0.2	0
MCF-7^{FP}	66.4 ± 9.8	30.1 ± 4.8	3.3 ± 1.2	1.2 ± 0.1
MCF-7 + RA	77.3 ± 11.2	20.5 ± 3.3	2.2 ± 0.9	5.4 ± 0.2
MCF-7^{FP} + RA	80.4 ± 7.7[a]	18.1 ± 2.5[a]	1.5 ± 0.6[a]	9.6 ± 0.3[a]

a: $P<0.01$,与 MCF-7 比较

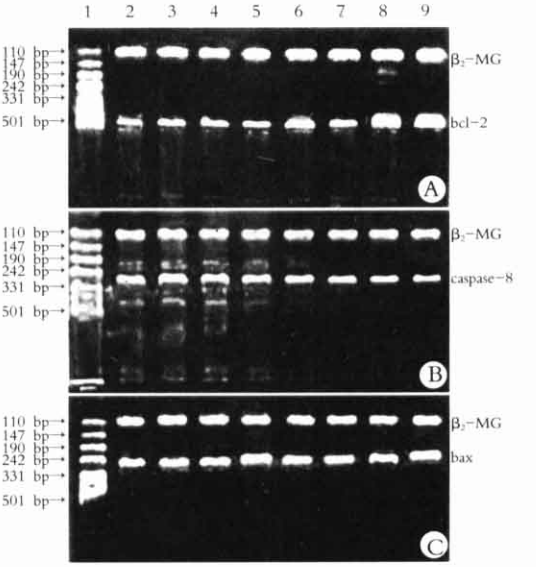


1:DNA 梯度标准; 2: MCF-7^{FP} 细胞; 3: MCF-7 + RA 2 d; 4: MCF-7^{FP} + RA 1 d; 5: MCF-7^{FP} + RA 2 d; 6: MCF-7^{FP} + RA 3 d

图 1 MCF-7 细胞 DNA 梯形带检测

2.3 RA 对 caspase-8、bcl-2 和 bax 基因 mRNA 表达的影响

RT-PCR 分析结果显示,RA 能上调 MCF-7 细胞 caspase-8、bax mRNA 的表达,而 pRARE-Fas/RARα 转染细胞经 RA 处理后 caspase-8、bax mRNA 表达增强最为显著。bcl-2 mRNA 变化呈 RA 依赖性表达下降,且 pRARE-Fas/RARα 转染的 MCF-7 细胞经 RA 处理后 bcl-2 mRNA 表达变化更甚(图 2)。



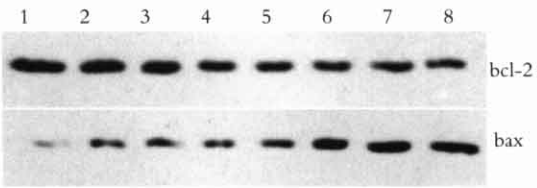
A: bcl-2; B: caspase-8; C: bax

1: PCR 标准; 2: MCF-7; 3: MCF-7^{FP}; 4: MCF-7 + RA 1 d; 5: MCF-7 + RA 2 d; 6:MCF-7 + RA 3 d; 7: MCF-7^{FP} + RA 1 d; 8: MCF-7^{FP} + RA 2 d; 9: MCF-7^{FP} + RA 3 d

图 2 RA 对 MCF-7 细胞 caspase-8、bcl-2 和 bax mRNA 表达的影响

2.4　RA 对 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响

免疫印迹结果表明，RA 能下调 MCF-7 细胞 bcl-2 蛋白表达，而经 RA 处理 MCF-7^{FP}细胞表达最低，与 RA 处理 MCF-7 细胞相比有较大差异。检测不同细胞 bax 蛋白表达结果显示，随 RA 处理时间延长，bax 表达上调，因 bcl-2 表达下降，bax 与 bcl-2比值增大（图 3）。



1：MCF-7；2：MCF-7^{FP}；3：MCF-7 + RA 1 d；4：MCF-7 + RA 2 d；5：MCF-7 + RA 3 d；6：MCF-7^{FP} + RA 1 d；7：MCF-7^{FP} + RA 2 d；8：MCF-7^{FP} + RA 3 d

图 3　RA 对 MCF-7 细胞 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

3　讨论

研究显示，RA 在体外对多种肿瘤细胞（包括白血病和实体瘤细胞）都具有增殖抑制、诱导分化和诱导凋亡作用，临床上以 RA 治疗白血病已取得明显的疗效，此外，在实体瘤治疗方面，RA 对头颈部鳞状上皮细胞癌、宫颈癌和肾癌的疗效较好[5,6]。但目前发现部分肿瘤对 RA 治疗出现抗性，且大剂量应用 RA 对病人有较明显的全身性毒副作用。RA 和化疗药物联合使用可部分减少视黄酸综合征的发生和提升肿瘤缓解率（ >90%），但对 RA 抗性和肿瘤复发无明显作用[7]。本研究中 RA 可调控 Fas/RARα 表达载体的成功构建，为克服上述难点提供了契机，与全身性应用 RA 单纯治疗肿瘤相比有以下优点：Fas 死亡区的高效表达受外源性 RA 精确调控，且局限于靶组织在肿瘤局部发挥作用；融合基因中野生型 RARα-LBD 片段可替代抗性肿瘤细胞中突变 RARα 的功能，保证了 RA 正常生理活性的发挥，此外通过融合基因和 RA 的协同促凋亡效应亦可最大限度地减少 RA 的用量，限制 RA 的体内毒副作用。

实验结果表明，我们构建的 pRARE-Fas/RARα 表达载体转染 MCF-7 细胞，筛选稳定表达后得到 MCF-7^{FP}细胞，流式细胞仪分析、DNA 梯形带检测等表明，1×10^{-7} mol/L RA 即可抑制 MCF-7 细胞的生长和诱导细胞凋亡，对 MCF-7^{FP}细胞的诱导凋亡作用更强。说明 RA 及其诱导的外源性融合基因产物能相互作用，共同诱导细胞凋亡。目前细胞凋亡机制中最主要的机制是 caspase 和 bcl-2 家族成员的参与，caspases 是一系列调控哺乳动物细胞凋亡的蛋白酶家族成员[8]，一旦被凋亡信号激活，就能通过从天冬氨酸残基处特异地水解以大小亚基形式形成异二聚体，并进一步酶切某些底物蛋白引起细胞凋亡。Caspase-8 的活化与凋亡效应的启动有关，而 bcl-2 家族成员主要通过调控细胞线粒体变化间接调节蛋白酶和核酸酶活性变化，双向调节细胞凋亡[9]。一般认为 bcl-2 和 bax 分别起抑制和促进凋亡进程作用。本研究采用 RT-PCR 和免疫印迹方法对相关基因表达进行分析，结果显示 RA 能上调 MCF-7 和 MCF-7^{FP}细胞 caspase-8 和 bax mRNA 的表达，下调 bcl-2 mRNA 表达，且以 RA 处理的 MCF-7^{FP}细胞表达变化最为显著，说明 RA 和外源性融合蛋白诱导细胞凋亡过程中上述基因发挥了重要作用，RA 下调 bcl-2 和上调 bax、caspase-8 的表达可能是 RA 依赖融合基因启动凋亡的重要分子机制之一，同时免疫印迹结果提示蛋白表达变化同转录水平变化相一致。Bax 和 bcl-2 蛋白比率亦是反映凋亡效应的重要指标[10]，结果中两者比率随 RA 处理明显增大，提示线粒体途径为产生凋亡的重要机制之一。

近期研究提示，bcl-2 与 caspase 家族可相互作用，共同调控细胞凋亡的进程。如 bax 过表达导致线粒体释放凋亡蛋白激活因子（apoptosis protein-activated factor，Apaf），Apaf 与 caspase-9 酶原作用激活 caspase-9，引发下游效应性 caspases 和 CAD（caspase-activated DNase）活化[11]。bcl-2 一直作为凋亡抑制因子，但近年来研究发现 bcl-2 不仅作用于 caspase-3 的上游，亦是 caspase-3 的直接底物，酶解后形成的 bcl-2 片段反而具有促进凋亡的功效[12]。因此本研究中 RA 依赖融合基因 Fas/RARα 表达诱发 MCF-7 细胞的凋亡效应可能经 caspases 和/或 bcl-2 家族成员共同介导，因细胞凋亡调控网络极其复杂，分析也可能有其他分子事件参与调控。

参考文献：

[1] LIN C P, HUANG M J, CHANG I Y, *et al*. Successful treatment of all-trans retinoic acid resistant and chemotherapy naive acute promyelocytic patients with arsenic trioxide-two case reports[J]. Leuk Lymphoma, 2000, 38(1-2): 191-194.

[2] 杨志祥，糜漫天，郎海滨，等. 视黄酸依赖 Fas/RARa 融合蛋白表达及其定位研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：54-56.

[3] HORIUCHI T, HIMEJI D, TSUKAMOTO H, *et al*. Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 272(3): 877-881.

[4] 陈汉春，罗志勇，罗赛群，等. Hu联合GM-CSF对K562细胞生长-凋亡相关基因表达的影响[J]. 癌症，2000，19(7)：627-630.
[5] GOMEZ-VIDAL J A, CAMPOS J, MARCHAL J A, *et al*. Actual targets in cytodifferentiation cancer therapy[J]. Curr Top Med Chem, 2004, 4(2): 175-202.
[6] BUER J, PROBST M, DUENSING S, *et al*. Clinical and *in vitro* response to 13-cis-retinoic acid in interferon-alpha resistant renal cell carcinoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 1997, 12(3): 143-147.
[7] JIMENEZ-LARA A M, CLARKE N, ALTUCCI L, *et al*. Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells[J]. Trends Mol Med, 2004, 10(10): 508-515.
[8] AGGARWAL B B, BHARDWAJ A, AGGARWAL R S, *et al*. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies[J]. Anticancer Res, 2004, 24(5A): 2783-2840.
[9] ROSATO R R, DAI Y, ALMENARA J A, *et al*. Potent antileukemic interactions between flavopiridol and TRAIL/Apo2L involve flavopiridol-mediated XIAP downregulation[J]. Leukemia, 2004, 18(11): 1780-1788.
[10] QIAO J G, ZHANG Y Q, YIN Y C, *et al*. Expression of Survivin in pancreatic cancer and its correlation to expression of Bcl-2[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18): 2759-2761.
[11] BOYA P, PAULEAU AL, PONCET D, *et al*. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1659(2-3): 178-189.
[12] SHARMA H, SEN S, MATHUR M, *et al*. Combined evaluation of expression of telomerase, survivin, and anti-apoptotic Bcl-2 family members in relation to loss of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers[J]. Head Neck, 2004, 26(8): 733-740.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)02-0110-01

替硝唑糊剂局部治疗牙周炎的临床疗效

游古莲，谭颖徽，袁松波 （第三军医大学新桥医院口腔科，重庆 400037）

自2003年来，我科门诊采用替硝唑糊剂置入牙周袋内治疗牙周炎，并与传统法比较，疗效满意，现报告如下。

1 材料与方法

病例选择：29例（男性11例，女性18例），年龄25-70岁，120牙，符合轻中度成人牙周炎诊断标准[1]，且全身健康状况良好，近1个月内未用抗生素，3个月内未行牙周治疗和手术者。每一患者均有实验牙和对照牙，各组60牙。药物配制：替硝唑、地塞米松、磨香草酚研磨成粉，分别置入消毒瓶中备用。使用时将上述药物按4∶1∶0.2的比例加0.4%替硝唑液、少量甘油调匀成糊状，现配现用。实验方法：常规龈上、下洁治后，生理盐水反复冲洗。实验组在牙周袋内置入替硝唑糊剂，对照组牙周袋内置入2%碘甘油[2]；两组均为每周放药2次，共4次为1疗程。检测指标：于治疗前、后，停药后2周分别在同一部位测量牙龈指数[3]（GI）、牙周袋深度（PD）、松动度、龈出血指数[3]，用龄同时记录疼痛程度。疗效判断标准：显效：症状消失或明显减轻，牙龈点彩明显，PD减少2 mm，GI下降2/3。有效：出血停止，但仍有红、牙龈充血水肿好转，点彩恢复，触及龈缘不出血，PD减少1 mm。无效：症状和体征均无改善。

2 结果

治疗前后各观测指数（GI、PD、松动度、龈出血指数、疼痛程度等）下降程度明显低于对照组，相差显著。实验组显效53例（88.33%），有效5例，无效2例；对照组显效36例（60%），有效14例，无效10例。经χ^2检验，两组有显著性差异（$P<0.05$）。

3 讨论

牙周炎是一种多种厌氧菌混合感染引起的炎症性疾病[1]。替硝唑[1]是继甲硝唑后的另一新型的抗厌氧菌药物，抗菌效能强、血药浓度高、性能稳定、药效持久、毒副作用小且无其他配伍禁忌的一种硝基咪唑类新药。地塞米松对牙龈黏膜上皮细胞的破坏起治疗作用，且本身具有较强的抗炎、抗毒、抗过敏和免疫抑制作用，联合应用能增强药效，无配伍禁忌。因此，本实验有88.33%的显效效率。

将药物放置于牙周龈袋内，药物直接作用于有病变的牙周组织，局部药液浓度高，有效浓度维持时间长，利于对龈下菌斑的控制和消除。局部给药用药量较小，避免了药物的全身反应及并发症的发生。尤其对妊娠及哺乳期牙周炎，或伴全身疾病患者提供了新的治疗方法。

关键词：牙周炎；替硝唑糊剂
中图法分类号：R781.420.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张举之，樊明文. 口腔内科学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，1997：190-316.
[2] 张志荣，黄秋琴，徐丽娟. 牙周灵膜剂治疗成人牙周炎38例的疗效观察[J]. 口腔医学，2001，21(2)：88-90.
[3] 杨 一，薛月琴. 局部应用替硝唑治疗冠周炎的临床疗效观察和评价[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，1998，8(2)：83.

（编辑 陈聪连）

作者简介：游古莲（1963-），女，重庆市华蓥县人，主管技师，主要从事口腔内科学方面的研究。电话：(023)68774645

收稿日期：2005-04-11；修回日期：2005-09-06