基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0680-04

Bcl-2 重组干扰质粒促进多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞凋亡实验研究

张福军[1],季 平[2],杨 凯[1],张劲松[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016;2.重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨表达重组干扰质粒沉默 Bcl-2 基因后对多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞凋亡的影响。方法:按 siRNA 设计原则构建针对 Bcl-2 基因表达重组 RNA 干扰质粒,脂质体转染多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞后分别行 MTT 试验、电子显微镜检查、AO/EB 荧光染色法检测,观察不同条件处理后各组细胞的凋亡情况有无差别。结果:MTT 试验见随着时间的延长,基因干扰组的 OD 值进行性降低,降低幅度在转染 48 h 时最大,至 72 h 时曲线明显较前变缓。电子显微镜检查结果显示,基因干扰组从转染后 24～72 h 出现进行性加重的细胞凋亡改变,各期凋亡细胞清晰典型。荧光染色法检测细胞凋亡结果显示,基因干扰组能明显促进 Acc-3/CDDP 细胞凋亡($P<0.05$)。结论:表达重组干扰质粒能有效地沉默多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞中 Bcl-2 基因表达,促进细胞凋亡。

【关键词】基因干扰;基因沉默;细胞凋亡;细胞周期

【中国图书分类法分类号】R739.87 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-10

Effect of recombined RNAi plasmids on apoptosis of cisplatin-resistant cell line Acc-3/CDDP

ZHANG Fu-Jun, et al

(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the effect of the silence of Bcl-2 oncogene on the apoptosis of cisplatin-resistant cell line Acc-3/CDDP.*Methods*:The recombined RNAi plasmids for Bcl-2 oncogene were constituted by the four successive steps-designing of Oligo DNAs, and were transfected into Acc-3/CDDP cells by culturing together. The apoptosis of each cells were evaluated by MTT test, electron microscope, and AO/EB fluorescent dyes respectively.*Results*:The OD value of RNAi group decreased with time last by MTT test, and dropped to the lowest at 48 h.The apoptosis of RNAi group were observable through electron microscope and fluorescent dyes.The apoptosis rate increased with time from 24 to 72 h after transfection.The apoptosis on each cell cycle were clear and classical.*Conclusion*:Recombined interfering plasmids can effectively silence the expression of Bcl-2 oncogenes, and the apoptosis of cisplatin-resistant cell line Acc-3/CDDP cells can be enhanced.

【Key words】RNA interference; Gene silence; Cell apoptosis; Cell cycle

多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是肿瘤的重要耐药机制,是肿瘤化疗失败的主要原因之一。人们对肿瘤多药耐药机制进行了深入的研究,认为肿瘤细胞的这种 MDR 是由多种因素造成的,耐药的机制主要涉及以下几个方面:膜糖蛋白介导的药物外排泵机制,酶介导机制,凋亡调控基因介导机制[1,2]。研究表明 Bcl-2 基因是细胞凋亡的重要抑制基因,其过度表达抑制细胞凋亡[3]。人们对 MDR 的逆转进行了多种尝试,随着对 MDR 机制的深入研究,探寻 MDR 与凋亡现象之间的内在联系,可从本质上揭示 MDR 和发现克服 MDR 的新靶标,为探索克服 MDR 新途径奠定关键基础[4]。近年来,RNA 干扰(RNA interference, RNAi)作为基因功能研究的一种有效方法已被学者们广泛接受[5,6],该技术为逆转肿瘤细胞多药耐药开辟了新思路,与其他基因阻断方法相比,具有经济、高效、高度特异性、操作简便、快速等优点。近期的体内外实验结果表明,应用 RNAi 技术逆转肿瘤细胞多药耐药取得了良好的效果[7]。以往研究发现抗凋亡基因 Bcl-2 在口腔癌的发生、发展中起重要作用[8],本研究拟通过 RNAi 技术沉默 Bcl-2 基因,观察对多药耐药口腔腺样囊性癌 Acc-3/CDDP 细胞生长的影响,为探

作者介绍:张福军(1970-),男,主治医师,硕士,研究方向:口腔颌面肿瘤的诊治。

通讯作者:杨 凯,男,教授,E-mail: cqfyyk@yahoo.com.cn。

索更为积极有效的口腔癌治疗方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

ACC-3 细胞株（武汉中国典型培养物保藏中心提供）。pSUPER RNAi System（美国 Ambion 公司）。Oligo 寡核苷酸（上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司合成）。阳离子脂质体 Lipofectin（美国 Sigma 公司）。质粒小量抽提试剂盒（Sigma 公司）。Trizol 、随机引物、SYBR I（申能博彩公司）。二硫代苏糖醇（DTT）（0.1M）、SSII（200U/μl）、5 × 1st Strand Buffer、脂质体（Lipafectamine2000）（Invitrogen 公司）。RNA 酶抑制剂（40U/μl）（Promega 公司）。dNTP（10 mmol/L）、HS ExTaq 酶及 10 × Buffer、DNaseI（5U/μl）、T4 DNA 连接酶试剂盒、DNA 分子量 DL2000Marker（Takara 公司）。DMEM 细胞培养基（GibcolBR 公司）。RPMI1640 培养基（美国 Hyclone 公司）。RT-PCR System（美国 Promega 公司）。MTT 、DMSO（sigma 公司，北方同正公司分装）。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与 Acc-3 细胞耐药性诱导 取 Acc-3 对数生长期细胞在 37℃、5% CO_2 条件下，置于 RPMI1640 培养液中（含 10%小牛血清，谷胺酰胺 300 mg/L，丙酮酸钠 110 mg/L，青霉素、链霉素各 200 U/ml）培养。在含 0.3 μg/ml CDDP 浓度的培养液中培养 3 d 后，更换正常培养液培养 7 d，待细胞生长成片，递增剂量，间歇性加药，连续诱导 10 月。直到 Acc-3 细胞能够维持在 7.5 μg/ml CDDP 浓度下正常生长即成为耐药的人腺样囊性癌细胞 Acc-3/CDDP。

1.2.2 设计、合成 Oligo DNA、构建表达重组 RNA 干扰质粒、转染多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞[5]

1.2.2.1 设计、合成 Oligo DNA 由上海中科开瑞生物芯片股份有限公司合成以下 6 条 Oligo DNA，各 2.0 OD，加 ddH_2O 配制成 3 mg/ml 溶液。-20℃保存。序列见表 1。

表 1 重组干扰质粒的干扰靶基因序列和 OligoDNA 序列

靶基因序列	名称	OligoDNA 序列
gCTgCACCTgACgCCCTTC	B1 正义链	5'-gATCCCCgCTgCACCTgACgCCCTTCTTCAAgAgAgAAgggCgTCAggTgCAgCTTTTTA-3'
	B1 反义链	5'-AgCTTAAAAAgCTgCACCTgACgCCCTTCTCTCTTgAAgAAgggCgTCAggTgCAgCggg-3'
CCgggAgATAgTgATgAAg	B2 正义链	5'-gATCCCCCCgggAgATAgTgATgAAgTTCAAgAgACTTCATCACTATCTCCCggTTTTTA-3'
	B2 反义链	5'-AgCTTAAAAACCgggAgATAgTgATgAAgTCTCTTgAACTTCATCACTATCTCCCggggg-3'
gACTCTgCTCAgTTTggCC	B3 正义链	5'-gATCCCCgACTCTgCTCAgTTTggCCTTCAAgAgAggCCAAACTgAgCAgAgTCTTTTTA-3'
	B3 反义链	5'-AgCTTAAAAAgACTCTgCTCAgTTTggCCTCTCTTgAAggCCAAACTgAgCAgAgTCggg-3'

1.2.2.2 构建表达重组 RNA 干扰质粒 （1）根据 Bcl-2 基因的 cDNA 序列中分别设计 3 个 siRNA 靶位点，合成 6 条寡核苷酸。（2）Oligo DNA 退火 各取正反义 Oligo DNA 1 μl，48 μl 退火缓冲液（100 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L HEPES pH 7.4）混匀，于 90℃ 4min、56℃ 10 min、30℃ 60 min，缓慢降温到 10℃。直接进行连接反应或 -20℃长期保存。（3）连接 用 *Hind* Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ限制性内切酶酶切 pSUPER.neo+gfp 载体，胶回收纯化。取上述退火后的 Oligo DNA 片段和纯化后的载体，按片段:载体=3:1 的摩尔比进行连接，混匀后于 42℃水浴 5 min，立即插入冰中，放置 5 min，于冰上加入 8 μl 快速连接酶混合液，连接总体积为 16 μl，混匀后于 16℃水浴 2 h。（4）转化 在转化前用 *Bgl* Ⅱ限制性内切酶酶切连接产物。取出 8 μl 连接产物加入 100 μl Top10F' 感受态菌中，轻弹混匀，冰浴放置 45 min，42℃水浴热休克 90 s，取出立即插入冰中 5 min，加入预热的无抗生素 LB 液 900 μl，轻轻颠倒混匀后于 37℃摇床复苏 1.0 h，转速 200 r/min，复苏后 6 000 r/min 离心 2 min，将细菌沉淀均匀涂布含有氨苄青霉素（100 μg/ml）和四环素（100 μg/ml）的 LB 琼脂平板，放于 37℃温箱中培养过夜。（5）筛选克隆 从转化平板上随机挑选细菌克隆各 6 个，分别命名为 B1-1、B1-2、B1-3、B1-4、B1-5、B1-6、B2-1、B2-2、B2-3、B2-4、B2-5、B2-6、B3-1、B3-2、B3-3、B3-4、B3-5、B3-6，接种于 3 ml LB 液体培养基（含氨苄青霉素 100 μg/ml 和四环素 100 μg/ml），37℃振摇（250 r/min）培养 16 h。

1.2.2.3 重组质粒的小量抽提 取 37℃振摇（250 r/min）培养过夜的菌液 1.5 ml，6 000 r/min 离心 2 min 收集菌体后，用质粒小量抽提试剂盒（Sigma 公司）进行质粒抽提。

1.2.2.4 重组质粒酶切鉴定 用碱变性法小量抽提质粒 DNA，取 10 μl 抽提的质粒用 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切鉴定重组质粒，重组质粒酶切后有 287 bp 大小片段产生者为阳性，重组质粒酶切后有 227 bp 大小片段产生者为阴性。

1.2.2.5 细胞脂质体转染 取 Bcl-2 和无关对照质粒各 2 μg 转染口腔腺样囊性癌多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞，因 pSUPER.neo+gfp 载体能够表达 GFP 绿色荧光蛋白，转染后在荧光显微镜下可见绿色荧光。

1.2.3 MTT 法检测细胞凋亡率 取对数生长期的细胞接种于 9 个 96 孔板，每孔 100 μl，密度为 10^5 个 /ml，设 24 h、48 h、72 h 3 个观察时间点，每个时间点 3 板。脂质体液为对照组，做好分组标志。脂质体液与重组质粒液各 10 μl 混合，使脂质体充分包裹重组质粒。用 100 μl 转染液清洗细胞表面 2 次。加 40 μl 转染液于混合的阳离子脂质体与重组质粒液中，终体积 60 μl，充分混匀，均匀覆盖于细胞表面。放入 CO_2 孵箱中转染 20 h。吸去上清液，加入 RPMI1640 培养液再分别培养 24 h、

48 h、72 h。培养 48 h 时换液 1 次。到相应终止时间，弃原培养液，每孔加入转染液 90 μl，再加入 MTT(5 mg/ml)10 μl，放入 CO_2 孵箱中孵育 4 h。去上清，每孔加入 DMSO 100 μl，震荡 10 min。酶联免疫检测仪 570 nm 波长比色检测不同时间点各标本的吸光度(OD 值)，绘制转染时间 -OD 值依赖曲线。

1.2.4　电子显微镜检查　取对数生长期的细胞用 0.25%胰酶消化后，制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 10^6 个 /ml。取 100 ml 玻璃培养瓶 7 个，每个接种细胞悬液 6 ml。做好分组标志。脂质体液与重组质粒液各 200 μl 混合，使脂质体充分包裹重组质粒。用 6 ml 转染液清洗细胞表面 2 次。加 4 600 μl 转染液于混合的阳离子脂质体与重组质粒液中，终体积 5 ml，充分混匀，均匀覆盖于细胞表面。放入 CO_2 孵箱中转染 20 h。去上清液，加入 RPMI1640 培养液再培养 72 h。培养 48 h 时换培养液 1 次。吸去上清液，常规消化细胞，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清。用 4℃ PBS 重悬细胞后，移至 EP 管中，1500 r/min 离心 10 min。4℃冰戊二醛固定细胞团块 2 h。弃固定液，冰 PBS 轻洗 2 次，保存于 4℃ PBS 液中。送标本到电镜室检查。

1.2.5　AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡　取对数生长期的细胞，用 0.25%胰酶消化后，制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 10^5 个 /ml。取 6 孔板 4 个，每组 3 个平行孔。每孔预先放置无菌的小盖玻片 1 块，每孔接种细胞悬液 2 ml，即每孔细胞数为 2×10^5 个。脂质体液为对照组，做好分组标志。脂质体液与重组质粒液各 100 μl 混合，使脂质体充分包裹重组质粒。用 1 ml 转染液清洗细胞表面 2 次。加 800 μl 转染液于混合的阳离子脂质体与重组质粒液中，终体积 1 ml，充分混匀，均匀覆盖于细胞表面。放入 CO_2 孵箱中转染 20 h。去上清液，加入 RPMI1640 培养液再培养 72 h。培养 48 h 时换培养液 1 次。新鲜配制 AO/EB 混合液。AO(100 μg/ml)与 EB(100 μg/ml)按 1:1 混合即可。培养到 72 h 终止实验，从孵箱中取出 6 孔板，用棉垫包裹送到荧光显微镜室。用无菌小镊子轻轻地取出盖玻片，置于载玻片上，加 AO/EB 混合液 1 滴于盖玻片上，荧光显微镜下计数。在荧光显微镜下，可观察到 4 种细胞形态：活细胞(VN)—核染色质着绿色，呈现正常结构；早期凋亡细胞(VA)—核染色质着绿色，呈固缩/圆球状；晚期凋亡细胞(NVA)—核染色质着橘红色，呈固缩/圆球状；非凋亡的死细胞(NVN)—核染色质着橘红色，呈正常结构。细胞凋亡率的计算，随机选择 3 个不同的视野，重复 3 次，每组设 3 个平行孔。由以下公式计算：凋亡率(%)=(VA+NVA)÷(VN+NVN+VA+NVA)×100%。



图 2　转染后出现的凋亡小体(EM ×5000)

1.3　统计分析

用 SPSS 10.0 for windows 统计软件处理。检测数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，计数资料采用 χ^2 检验，计量资料采用 t 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　MTT 试验

转染后 24 h、48 h、72 h，MTT 检测，结果见图 1。

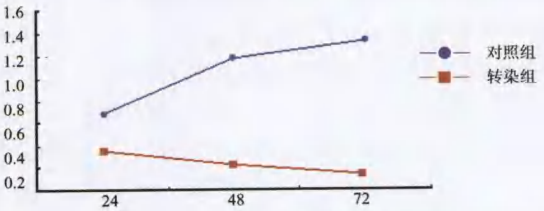


图 1　转染时间-OD 值依赖曲线

从图 1 可以看出，随着时间的延长，基因干扰组的 OD 值进行性降低，在转染后 24 h 细胞的生长即有明显的抑制作用，48 h 后细胞生长抑制率达 90.2%($P<0.01$)，至 72 h 时曲线明显较前变缓。

2.2　电子显微镜检查结果

结果显示，对照组细胞核大，核仁明显，有较多的核分裂相，胞浆内细胞器丰富、结构完整。基因干扰组从转染后 24 ~ 72 h 出现进行性加重的以下改变：胞浆内脂滴较多，出现髓样结构，线粒体肿胀崩解，溶酶体大量出现；细胞核内染色质边集、可见脂滴、空泡化改变；细胞核的固缩变形，凋亡小体和各期凋亡细胞清晰典型，见图 2。

2.3　荧光染色法检测细胞凋亡结果

荧光染色法检测细胞凋亡结果显示，对照组凋亡率 5.5% ± 3.5%，基因干扰组的细胞凋亡率 24.3% ± 2.6%，基因干扰组能明显促进 Acc-3/CDDP 细胞凋亡($P<0.05$)。见图 3、图 4。

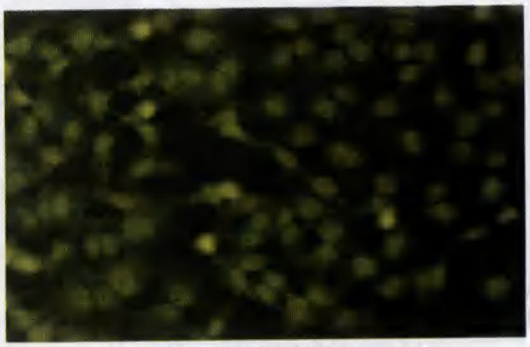


图 3　对照组 FM 结果(FM ×40)

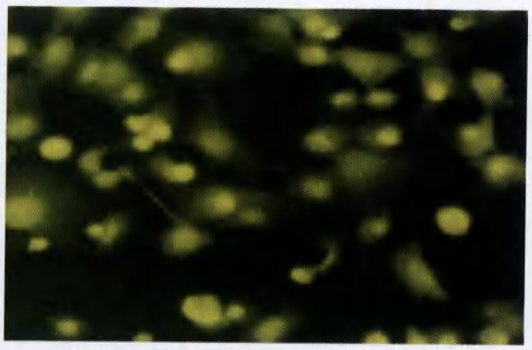


图 4 基因干扰组 FM 结果（FM ×40）

3 讨 论

化疗是肿瘤治疗的重要手段之一，由于耐药性的存在，使化疗效果不甚理想，故研究化疗耐药性具有重要的临床意义。MDR 是指肿瘤细胞对某种化疗药物产生耐药性后，它可同时对其它一些化学结构和作用机制不同的化疗药物产生耐药性。肿瘤细胞的 MDR 可分为本身固有的内源性耐药（即天然耐药性）和在化疗过程中由于化疗药物的诱导而出现的获得性耐药[9,10]。近年来，RNAi技术在多种肿瘤的基因治疗中被证实具有强大的基因沉默作用。与传统反义基因技术相比，RNAi 具有作用效果强大、持续时间长、技术简便等优势。因此，本研究通过 RNAi 技术采用表达重组干扰质粒沉默 Bcl-2 基因后，观察多药耐药 Acc-3/CDDP 细胞凋亡促进的影响。

据研究表明[11~14]：bcl-2 基因的表达对于肿瘤细胞的耐药性具有显著的影响，bcl-2 表达水平越高，肿瘤细胞的耐药性也越强，而且呈剂量依赖方式。本研究通过 RNAi 技术沉默 Bcl-2 基因表明，Bcl-2 基因干扰能有效地促进具有多药耐药性的口腔腺样囊性癌细胞的凋亡。该研究为基于 Bcl-2 基因对口腔腺样囊性癌进行有效治疗提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] 徐巧元，张幸平.肿瘤多药耐药机制的研究进展[J].重庆医学，2007，36(14)：1434-1436.

[2] 周晓冬，宋国祥.肿瘤细胞多药耐药研究进展与腺样囊性癌[J].中国医学文摘·肿瘤学，2006，20(3)：267-269.

[3] Cory S，Adams J M. The Bcl－2 family:regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nature reviews·Cancer，2002，2(9)：647－656.

[4] 沃兴德，俞 颖.细胞凋亡抑制与肿瘤多药耐药的研究进展[J].浙江中医药大学学报，2006，30(5)：578-580.

[5] 贺 娟.小分子干扰 RNA 在细胞凋亡调控中的应用研究进展[J].医学综述，2007，13(3)：172-174.

[6] Barik S. Silence of the transcripts: RNA interference in medicine[J]. Journal of Molecular Medicine.，2005，83(10)：764-773.

[7] 石小燕，陈 萍.肿瘤细胞多药耐药逆转的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志，2007，34(11)：822-825.

[8] 季 平，叶尚敏，李庆姝，等.人舌鳞癌 Tca8113 细胞株中 c-erbB-2、bcl-2 表达[J]. 重庆医学，2005，34(3)：332-334.

[9] Bilim V，Kasahara T，Hara N，et al. Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer(TCC) and the therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro [J]. International Journal of Cancer，2003，103(1)：29-37.

[10] 杨 凯，温玉明，王 莉，等.术前诱导化疗与口腔鳞癌多药耐药基因表达关系的研究[J]. 临床口腔医学杂志，2002，18(5)：332-333.

[11] Dole M，Nunez G，Merchant A K，et al. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma [J]. Cancer Research，1994，54(12)：3253-3259.

[12] LaCasse E C，Baird S，Korneluk R G，et al.The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer[J].Oncogene，1998，17(25)：3247-3259.

[13] Salvesen G S，Duckett C S.IAP proteins: blocking the road to deaths door[J]. Nature reviews·Molecular cell biology，2002，3(6)：401－410.

[14] Shangary S，Johnson D E.Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family [J].Leukemia，2003，17(8)：1470－1481.

（责任编辑：冉明会）

《重庆医科大学学报》

欢迎投稿，欢迎订阅

邮发代号 78-132