维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0026-02

LAMS对肝癌细胞株Bcl-2、BaX基因蛋白的影响

董浦江，姚檬祥，涂 刚
（重庆医科大学临床学院器官移植研究室 重庆 40016）

【摘 要】目的：研究LAMS对肝癌细胞株的Bcl-2、BaX基因蛋白影响。方法：用MTT法测定不同浓度LAMS对肝癌细胞株增殖的抑制作用；用TUNEL法和免疫组化法测定不同抑制程度下凋亡细胞量和Bcl-2、Bax基因蛋白的变化。结果：LAMS浓度与肝癌细胞增殖的抑制程度、凋亡细胞数、Bcl-2基因蛋白表达减少及BaX基因蛋白表达增加呈正相关。结论：LAMS可通过影响Bcl-2、BaX基因蛋白的表达促使肝癌细胞凋亡。

【关键词】肝肿瘤；基因蛋白
【中国图书分类法分类号】Q546 R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-01-18

Effects of LAMS on Bcl-2、BaX gene protein of liver cancer cells

DONG Pujiang, et al
(Research Laboratory of Transplantation, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*:To study the effects of LAMS on Bcl-2、BaX gene protein of liver cancer cells. *Methods*: MTT was used to determine the inhibiting action of the different concentrations of LAMS on liver cancer cells. TUNEL method was used to determine the percentage of apoptosis cells. Immunohistochemical stainings were used to analyse the changes of Bcl-2、BaX gene protein.*Results*: With the increase of LAMS concentration, the inhibiting effects on multiplication of liver cancer cells were decreased and the number of apoptosis cells were increased, the expression of Bcl-2 gene protein was decreased and the expression of BaX gene protein was increased. *Conclusion*: LAMS can influence the expression of Bcl-2、BaX gene protein of liver cancer cells.

【Key words】 Hepatic cancer; Gene protein

细胞凋亡受到许多基因调控，Bcl-2、BaX是其中重要的一对调控基因。Bcl-2为抗凋亡基因，可阻止各种刺激导致的细胞凋亡。BaX为Bcl-2相关X基因，能促进各种因素导致的细胞凋亡，并抑制Bcl-2的作用。细胞胞浆中的该两种基因蛋白含量间接反应出它们的表达程度。本文在昆布多糖硫酸酯（Laminarin sulphate,LAMS）使肝癌细胞增殖处于不同抑制状态下，检测相应Bcl-2、BaX基因蛋白含量变化及凋亡细胞量。以探讨LAMS对肝癌细胞Bcl-2、BaX基因蛋白的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

SMMC-7721、HepG2细胞株由本室常规传代培养。

1.2 LAMS

按文献[1]制备，多糖含量30%。使用前用1640培养液配成40μg/ml，0.22μm滤膜过滤。

1.3 主要试剂

Bcl-2、BaX鼠抗人单抗，美国Santa Craze公司产品。Bcl-2、BaX免疫组化SP试剂盒，北京中山生物技术有限公司产品。TUNEL(POD)试剂盒，德国Boehtinger Mannheim公司产品。

1.4 LAMS对肝癌细胞株增殖抑制试验

取对数生长期HepG2、SMMC-7721细胞以含10%新生小牛血清的1640培养液稀释成1×10^5/ml，置96孔培养板每孔200μl。37℃、5%CO_2培养24h。实验孔分别加40μg/ml LAMS 2μl、4μl、6μl，一式三份。再培养24h。每孔吸弃上清液20μl，加5mg/ml MTT液20μl，继续培养24h。小心吸弃上清液200μl，加二甲亚砜200μl，震荡5min，600nm测A值。

1.5 凋亡细胞测定

肝癌细胞前处理同LAMS对肝癌细胞Bcl-2、BaX基因蛋白影响，取出盖玻片按TUNEL(POD)试剂盒操作说明书进行细胞固定、标记、显色。中性树脂封片后，光镜四百倍放大，取染片上、中、下、左、右五个视野，连续记数100个细胞中，细胞核呈棕黄色者所占数，计算均数。

1.6 LAMS对肝癌细胞Bcl-2、BaX基因蛋白影响

作者介绍：董浦江（1953- ），男，主管技师。
主要研究方向：肿瘤免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 LAMS对肝癌细胞增殖的抑制（OD）

细胞株	对照孔	加LAMS(μl)		
		2	4	6
HepG2细胞	0.72 ± 0.10	0.52 ± 0.07*	0.31 ± 0.09**	0.10 ± 0.08**
SMMC-772细胞	0.78 ± 0.12	0.63 ± 0.08	0.50 ± 0.10*	0.25 ± 0.11**

*与对照孔比较$P<0.05$ **与对照孔比较$P<0.01$

表2 LAMS使肝癌细胞凋亡数（x）

细胞株	对照孔	加LAMS(μl)		
		20	40	60
HepG2细胞	6	15*	45*	50*
SMMC-772细胞	5	5	18*	45*

*与对照孔比较$P<0.01$

表3 LAMS对肝癌细胞Bcl-2基因蛋白表达的影响（积分指数）

细胞株	对照孔	加LAMS(μl)		
		20	40	60
HepG2细胞	115 ± 17	80 ± 11*	53 ± 13**	29 ± 8**
SMMC-772细胞	182 ± 18	172 ± 16	132 ± 15*	50 ± 17**

*与对照孔比较$P<0.05$ **与对照孔比较$P<0.01$

表4 LAMS对肝癌细胞BaX基因蛋白表达的影响（积分指数）

细胞株	对照孔	加LAMS(μl)		
		2	4	6
HepG2细胞	21 ± 7	31 ± 8*	58 ± 9**	81 ± 11**
SMMC-772细胞	11 ± 6	10 ± 6	28 ± 7*	52 ± 9**

*与对照孔比较$P<0.05$ **与对照孔比较$P<0.01$

以含10%新生小牛血清的1640培养液将HepG2、SMMC-7721细胞稀释成1×10^5/ml，置内放盖玻片的6孔培养板，每孔2000μl、37℃、5%CO_2培养24h。分别加40μg/ml的LAMS 20μl、40μl、60μl。继续培养24h。取出盖玻片，按Bcl-2、BaX免疫组化试剂盒操作说明书进行染色、固定。

结果判断 400倍放大视野下，Bcl-2、BaX基因蛋白表达阳性的细胞胞浆中可见棕黄色颗粒或不规则块状物。计数染片的上、中、下、左、右五区域各100个细胞，求出平均阳性百分率。反应强度根据细胞胞浆中棕黄色颗粒或不规则块状物量及颜色深度分为强阳性（+++）、阳性（++）、弱阳性（+）及阴性（-）四级，分别计数为3，2，1及0分。求积分指数（积分指数=阳性细胞百分率×强度计分）。

2 结 果

2.1 LAMS对肝癌细胞增殖的抑制程度，见表1。

随LAMS浓度增加，实验孔的光密度（OD）降低。说明LAMS对该两株肝癌细胞增殖的抑制程度与其浓度成正比。

2.2 LAMS对肝癌细胞凋亡效果，见表2。

肝癌凋亡细胞数量随LAMS浓度增加而增多。

2.3 LAMS对肝癌细胞Bcl-2、BaX基因蛋白的影响

分别见表3、表4。随LAMS浓度增加，两种肝癌细胞胞浆中Bcl-2基因蛋白减少；BaX基因蛋白增加。显示LAMS对这两种基因蛋白的影响力度与其浓度相关。

3 讨 论

LAMS是一具有多种生物功能的多糖酯。有文献[2]报导体内、外实验证实LAMS具有抑制肿瘤细胞增殖的作用，但其分子机制未见报道。作者在不同剂量LAMS造成的肝癌细胞增殖抑制状态下，检测其凋亡细胞数量变化，Bcl-2、BaX基因蛋白表达变化。探讨LAMS调控肝癌细胞Bcl-2、BaX基因表达与促使其凋亡及抑制其增殖的关系。

Bcl-2是抗凋亡基因，且与肿瘤的发展密切相关[3]。它通过其转录产物Bcl-2基因蛋白，参与细胞内抗氧化作用和抑制钙离子跨膜运动而调控细胞凋亡[4]。BaX是Bcl-2的相关X基因，它通过与Bcl-2形成异二聚体而发挥其抑制作用[5]。肿瘤细胞的永生性与Bcl-2基因过度表达，BaX基因表达下调有关。逆向调控肿瘤细胞该组基因的表达是促使其凋亡的重要途径。

本实验显示LAMS可导致两株肝癌细胞Bcl-2基因蛋白表达减少、BaX基因蛋白表达增加，且变化程度随LAMS剂量增加而加大，与此同时两株肝癌细胞株凋亡细胞数量增加，增殖受抑制程度加大。说明LAMS使该两株肝癌细胞凋亡和增殖受抑制与逆向调控其Bcl-2、BaX基因表达有关。

参 考 文 献

[1] 范曼芳，陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉酯的制取、分析及生物活性比较[J]. 中国药科大学学报，1988;19(1):30-34.

（下转第31页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

害，尤其是来自于纹状体内的逆行性6-OHDA细胞毒性，也可以损伤多巴胺能神经元。提示除黑质之外，纹状体区损伤可以作为PD的动物模型原发病变部位。

6-OHDA与多巴胺竞争摄取位点，可以产生氧自由基，造成线粒体呼吸链NADH脱氢酶，细胞色素C氧化酶的阻滞，引起细胞凋亡或坏死。国内有人在6-OHDA注射造成的PD模型中发现DA能神经元缺失后，才有胶质细胞增生，所以6-OHDA动物模型的病理特点与人类PD病理相似。

6-OHDA注入动物大脑一侧纹状体通路中，能造成注射侧纹状体区内多巴胺丧失[13]及D_2受体超敏[14]。本实验发现，在黑质致密部组PD动物模型鼠，黑质多巴胺神经元缺失只有达90%以上时阿扑吗啡才可诱导旋转行为出现，而在黑质旁部和纹状体部组PD鼠未能引出其旋转行为，说明阿扑吗啡诱导的旋转行为与黑质多巴胺细胞损害程度有关。苯丙胺诱导的旋转行为在各种损伤程度的PD鼠均出现，表明苯丙胺诱导旋转行为的产生与黑质多巴胺损伤程度关系不明显，只要黑质多巴胺神经元缺失50%以上时既可产生。实验结果显示黑质致密部组PD动物模型鼠的黑质多巴胺神经元缺失达96%，阿扑吗啡与苯丙胺诱导的旋转行为均为阳性，相当重度损伤模型。黑质致密体旁部组PD模型鼠的黑质多巴胺神经元缺失达84%，苯丙胺诱导的旋转行为阳性，相当中度损伤模型。纹状体区组PD模型鼠的黑质多巴胺神经元缺失达62%，苯丙胺诱导的旋转行为阳性，相当轻度损伤模型。

应用6-OHDA不同部位及剂量的注射，可以建立不同程度损伤的帕金森病动物模型鼠，为帕金森病的药物及毒性机制研究提供了条件。且为黑质细胞，转基因细胞移植治疗及研究黑质纹状体系统在接受促生长因子及神经保护介质治疗后，其神经元再生和功能恢复提供了实验模型。

参 考 文 献

[1] 史玉泉. 实用神经病学[M]. 第二版，上海：上海科学技术出版社，1994;749-759.

[2]Glinka Y, Gassen M, Youdim MBH. Meachanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. [J]. J Neural Transm, 1997;50 (S):55-66.

[3] 包新民，舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京：人民卫生出版社，1991;50-57.

[4] Stella M, Engber T M, Kask AM, et al. Motor fluctuations in levodopa treatment parkinonian rats: relation to lesion extent and treatment duration [J]. Brain Res, 1994; 662: 69-74.

[5] Carman L S, Gage F H, Shults CW. Partial lesion of the substantial nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior [J]. Brain Res. 1991;553: 275-283 .

[6] Kirk D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrstriatal 6-hydroxydopamine in the rat [J]. Exper neurol, 1998;152: 259-277.

[7] 周明付，张 华，吴金良. 帕金森病动物模型的建立 [J]. 河南医科大学学报，1994;29(4):4-5.

[8] 张 哲，陈 辉. 实用病理组织染色技术 [M]. 辽宁：辽宁科学技术出版社，1998;96.

[9] Ungerstedt U. 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons [J].Eur J Pharmacol, 1968;5: 107.

[10]. Decker DE, Althaus JS, Buxser SE, et al. Competrativve irreversi ble inhbition of dopamine up take by 6-hydroxydopamine [J]. Res Comman Chem Pathol Pharmacol, 1993;79: 195-208.

[11]. Cerrati C, Drian M J, Kamenka J M, et al. Protection by B T C P of cultured dopaminergic neurons exposed to neurotoxins [J]. Brain Res, 1993; 617:138-142.

[12]. Glinka Y, Youdim MBH. Inhibition of mitchondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine [J]. Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol, 1995;292: 329-332.

[13] 王 尧，杜子威. 神经生物化学与分子生物学[M]. 北京：人民卫生出版社，1997;142-151.

[14] 邹 冈. 基础神经生理学[M]. 北京：科学出版社，1988;171-176.

(上接第27页)

[2] Holfman R, Paper D H, Donaldson J,et al. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate [J].B J Cancer,1996;73(10):1183-1186.

[3] Bareton G B, Piebold J, Christotforis G,et al. Apoptosis and immunohistochemical Bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas, aspects of carinogensis and prognostic significance[J]. Cancer, 1996; 77(2):255-264.

[4] Hockenbery DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis[J]. Cell Sci,1994,18(s):51-59.

[5] Huang Y, Ray S, Reed JC, et al. Estrogen increases intracellular p26 to p21 BaX ratos and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 1997;42(1):73-81.