维普资讯 http://www.cqvip.com

123-124,127

(5)

文章编号：0253-3626(2000)02-0123-03

核酶抑制神经母细胞瘤Bcl-2的表达及增强顺铂敏感性的实验研究

R730.264
R73-36

程 远[1]，王世波[1]，冯 涛[2]
（1.重庆医科大学第二临床学院神经外科 400010；2.重庆医科大学临床学院生化教研室 400016）

摘 要 目的：研究抗Bcl-2mRNA的锤头型核酶（Ribozyme RZ）基因抑制神经母细胞瘤（SK-N-SH)生长以及增强化疗药物顺铂的敏感性。方法：(1) 应用电穿孔法，分别将整合有抗Bcl-2 mRNA核酶的缺陷性逆转录病毒载体pDOR-RZ和空载体pDOR-neo导入SK-N-SH细胞。(2) 用免疫细胞染色法定性观察肿瘤细胞内Bcl-2蛋白的表达；用间接免疫荧光染色法和流式细胞仪(FCM)测定Bcl-2蛋白含量。(3)MTT 法检测化疗药物顺铂敏感性。结果：(1)转染RZ组Bcl-2蛋白合成受到抑制，(2)顺铂增敏试验表明顺铂对转RZ组杀伤作用增强。结论：将抗Bcl-2核酶基因转入神经母细胞内，(1)可明显抑制肿瘤细胞内Bcl-2蛋白的合成，促进瘤细胞死亡；(2)增强其对化疗药物顺铂的敏感性。

关键词 核酶；Bcl-2；化疗；基因治疗
中国图书分类法分类号：R739.41；R456 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-11-03

神经母细胞瘤 顺铂

Inhibitive effect of ribozyme gene and effect of cisplatin on the expression of Bcl--2 in SK-N-SH

CHENG Yuan, et al
Department of Neurosurgery, Second College of Clinical Medicine

Abstract **Objective**: To observe whether tumor cell can be inhibited and the sensitivity of SK-N-SH cell transferred to cisplatin can be increased through transducting a ribozyme against Bcl- 2 into neuroblastoma cell line (SH-N-SH). **Methods**: pDOR-RZ retroviral vector was transduced into neuroblastoma cell by electroporation. By immunocytochemistry dyeing methods, the changes of Bcl- 2 expression were observed; and the sensitivity of cisplatin to transferred cell was quantified by a modified 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. **Results**: (1) the synthesis of BCL-2 protein was inhibited; (2) the sensitivity of the cell with RZ to cisplatin was increased. **Conclusion**: The ribozyme gene against Bcl-2 can inhibit the synthesis of Bcl-2 protein and tumor growth, and increase the sensitivity of chemotherapeutic agent.

Key Words Ribozyme; Bcl-2; Genetherapy; Chemotherapeutant

对于中枢神经系统恶性肿瘤来说，手术难以全切，复发率高，放疗低敏感性以及肿瘤细胞产生的多药耐药是该类肿瘤治疗失败的主要原因。应用针对原癌基因Bcl-2进行的反义基因治疗已取得初步进展[1,2]。本实验以SK-N-SH细胞为对象，将带有抗Bcl-2mRNA的核酶基因的逆转录病毒载体转入瘤细胞内，通过切割Bcl-2mRNA，降低Bcl-2蛋白的合成，促进瘤细胞死亡，增强化疗药物的敏感性，为探讨核酶治疗中枢神经系统恶性肿瘤提供一定的实验依据。

作者介绍：程 远(1958-02出生)，男，副主任医师，硕士

1 材料与方法

1.1 材料

pDOR-RZ和pDOR-neo质粒由第四军医大学生物化学教研室和重庆医科大学生物化学教研室共同构建并提供。大肠杆菌JM109由重庆医科大学肝研所提供。Bcl-2单抗，FITC-Ig(抗鼠)购自北京中山生物技术公司。MTT购自周正公司。SK-N-SH细胞购自中科院上海细胞生物所。

1.2 方法

1.2.1 质粒的转化、扩增、提取见分子克隆[3]。

1.2.2 体外RZ基因的转染：取对数生长期瘤细胞，分成三组，每组约10^7细胞，第一组为正常对照组，第二组为pDOR-neo组，第三组为pDOR-RZ组。转染采用电穿孔法，转染质粒约20ng，电压220V，电容950nf，时限20ms，细胞贴壁48h

维普资讯 http://www.cqvip.com

后，加入G418筛选。

1.2.3 克隆细胞的筛选：G418筛选第八天,见抗性克隆生长、滤纸消化,接种 6 孔板，扩增后，转入100ml培养瓶，G418筛选浓度减半。

1.2.4 克隆细胞Bcl-2蛋白测定：(1)免疫细胞化学染色法检测细胞中Bcl-2表达见分子克隆[3]，(2)间接免疫荧光法：每组10^6细胞中加多聚甲醛固定。加入Bcl-2单抗,37℃，30min，PBS 洗涤，加入FITC标记的抗鼠IgG，37℃30min，用FCM分析。

1.2.5 MTT法检测转染RZ细胞对化疗药物顺铂的敏感性：培养细胞分三组，对照组、空载体组和转RZ组。取待测转染细胞 5×10^4/孔，接种于96孔板，加入10ng/ml顺铂于培养基中，37℃48h；倒去培养基，加200ul 640及MTT 20nl，37℃6h，加入PMSO 200 nl。酶标仪上读数(600nm波长OD值)。

2 结 果

2.1 免疫细胞染色 可见Bcl-2蛋白阳性表达产物主要位于胞浆，呈棕黄色细颗粒状。根据着色强度分为四级：阴性(-),弱阳性(+),阳性(++)和强阳性(+++)。结果显示：对照组和pDOR-neo组为强阳性和阳性表达；pDOR-RZ组以弱阳性为主。

2.2 免疫荧光间接标记 通过FCM定量检测Bcl-2蛋白表达,pDOR-neo组相对荧光值为79.25%，pDOR-RZ组的相对荧光值22.30%，比pDOR-neo组下降56.96%。说明SK-N-SH细胞经RZ处理后，细胞Bcl-2蛋白的表达受到明显抑制。(见表1)

表1 免疫荧光间接标记法检测Bcl-2蛋白表达

	正常对照组	PDOR-neo组	PDOR-RZ组
相对荧光值	85.19%	79.25%	22.30%

注：PDOR-RZ组与PDOR-neo比较，P<0.01

2.3 转染RZ细胞对顺铂的敏感性 细胞存活率=处理组光密度/对照组光密度×100%。对照组、空载体组和转RZ组的细胞存活率分别为78.2%、80.2%和49.5%。说明转染RZ细胞加顺铂处理，对SK-N-SH细胞的抑制和杀伤作用明显优于单用顺铂。(见表2)。

表2 MTT法检测转染RZ细胞对化疗药物顺铂的敏感性

		正常对照组	PDOR-neo组	PDOR-RZ组
OD值	A	0.7852±0.1196	0.7126±0.1196	0.7597±0.0770
	B	0.6363±0.0441	0.5575±0.0900	0.3760±0.0821
存活率(%)		78.20	81.00	49.50

注：A 为对照组，B 为10μg/ml顺铂处理组

细胞存活率=处理组光密度值/对照组光密度值×100%

PDOR-RZ组与PDOR-neo比较，$P<0.01$

3 讨 论

Bcl-2作为一种细胞凋亡的拮抗基因，已被公认为是第三类致癌基因[4]。一些研究发现某些肿瘤细胞存在Bcl-2mRNA和蛋白的高表达，表明Bcl-2参与肿瘤的发生发展[5,6]。另有研究发现，高表达Bcl-2的瘤细胞对化疗药物耐药性增加[7]。因此，降低或消除Bcl-2基因在肿瘤细胞中的过度表达，可解除Bcl-2对肿瘤细胞凋亡的抑制作用，促进肿瘤细胞死亡和增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

应用核酶技术治疗肿瘤是近年基因治疗的一个热点，并已在某些肿瘤的体外实验中取得初步成效。但对神经系统恶性肿瘤的治疗尚未见报道。核酶是一类具有酶活性的RNA 分子，具有反义RNA的优点，可序列特异性地与靶RNA 分子配对、切割，促使mRNA的降解，从基因转录和翻译水平封闭异常基因的表达，阻断肿瘤细胞内异常信号传导，最终诱导肿瘤细胞凋亡。

实验中由于pDOR-RZ和pDOR-neo载体中已整合有neo基因，经G418筛选，获得抗G418转基因阳性细胞克隆，表明转染RZ成功，并能在神经母细胞瘤中表达。通过测定核酶切割Bcl-2mRNA导致的Bcl-2蛋白含量下降，间接反应核酶在细胞内的表达及活性水平。实验结果显示对照组和空载体组，Bcl-2蛋白以阳性表达为主，FCM 定量检测，相对荧光值为85.19%和79.26%；而转RZ组Bcl-2蛋白以弱阳性为主。FCM 定量检测为22.30%，其Bcl-2蛋白表达水平比转空载体组减少56.96%，提示经转染RZ，瘤细胞中不断表达的RZ能有效地抑制Bcl-2蛋白表达和翻译，从而减少Bcl-2蛋白合成，最终达到延缓肿瘤生长的目的。

(下转第127页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

中，存在轻判为中，中判为轻，中判为重，重判为中这样4种情况：

轻判为中的一主要是一、两个指标较重，症状轻的病例。

中判为轻的一主要是一、两个指标符合、其他指标较轻，症状相对较重的病例。

中判为重的一主要是多数指标较重，而症状非严重者。

重判为中的一主要是多数指标不太重，而症状严重者。

因此，在判别模型的实际运用中，应根据判别结论，结合病例各指标的情况，并参照临床表现、病史等因素，必要时可根据条件作其他检查，进行综合判断。轻、中型间要参考病史及临床表现。一般中型的临床表现比轻型为重。重型肝炎的临床表现及并发症多有：原发性腹膜炎，肝性脑病，上消化道出血，肝肾综合征，腹水，肝臭，脑水肿，电解质紊乱等。凝血酶原活动度PTA[6]，是区别重肝和非重肝的一个敏感、有价值的指标。当肝实质细胞严重而广泛坏死时，PTA明显下降。国内外学者公认，PTA<40%为重肝。由于PTA只在病情较重时才检测，因此当发现病情较重时，检测PTA具有特别重要的意义。所以对于模型判出的病例，再结合病史，临床症状并根据实际情况和条件作其他指标分析，特别是对于由模型判为重型而症状非严重者，以及由模型判为中型而症状较重者，建议检测PTA，这样可进一步提高判别准确率，从而有利于预后判断并指导临床治疗。

肝功能指标在临床肝病病情诊断中是很重要和必不可少的，它关系到病人的治疗和预后。对肝功能指标进行多元统计分析以往未见有报道，本文就其中的一个方面作了一些有益的探讨。

参 考 文 献

[1] 叶维法，钟振义. 肝炎学大典[M]. 天津科学技术出版社，1996;520~600

[2] 黄正南. 医用多因素分析[M]. 第三版. 湖南科学技术出版社，1995; 84~138

[3] Richard A, Dean W. Applied multivariate statistical analysis. New Jersey:Prentice-Hall Inc.1982;177.

[4] Bermuan J,et al.Multivariate analysis of prognotic factors in fulminant hepatitis B.Hepatology 1986;6:64

[5] SAS Institute Inc.SAS/STAT Guide for personal Computer [M]. Version 6 Edition, North Carolina: SAS Institute Inc. 1988.

[6] 高寿征. 病毒性肝炎防治研究[M]. 北京出版社. 1993; 179~181

(上接第124页)

有研究发现Bcl-2除参与肿瘤的发生外，还与肿瘤细胞的多药耐药有关，并认为它是一种耐药基因[8]。Hame证实旁观者细胞发生凋亡时，抗凋亡基因Bcl-2的过度表达可抑制旁观者细胞的凋亡，所以他提出治疗恶性肿瘤的系统中，最优化的组合应包括抗Bcl-2的调节，并将其与化疗、放疗等手段相结合。本实验以10ng/ml顺铂作用于对照组、空载体组和转染RZ细胞，其细胞存活率分别为78.2%、80.2%和49.5%，表明顺铂对转染RZ组有明显的杀伤作用，其结果进一步证明核酶对化疗药物杀伤肿瘤细胞有一定增敏作用.

参 考 文 献

[1] Webb A, Cunningham D, Cotter F et al. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-hodgkin lymphoma .Lancet,1997; 349(9059):1137

[2] 赵永同，王剑波，朱 峰，等. 抗Bcl-2核酶在HL-60 细胞中的表达及促进其凋亡的研究. 中华血液学杂志，1996;17 (12):619

[3] 金冬雁，黎孟枫，等译. 分子克隆. 北京:科学出版社 1996

[4] Korsmeyer SJ .Bcl-2 initates a new category of oncogenes: Regulates of cell death.Blood,1992;80(4):879

[5] Bareton GB, Piebold J, Christotforis G et al. Apoptiosis and immunohistochemical Bcl-2 expression in colorectal adenommas and carcinomas, aspects of carinogensis and prognostic signifcance. Cancer, 1996;77:255

[6] Gregory Y, Lauwres MD, Gregory V et al. Immmunohistochemical evatuation of Bcl-2 protein expression in gastric adenocarainomas. Cancwe, 1995;75:2209

[7] Dole M . Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. Cancer-Res. 1944;54(12):3253

[8] Miyashita T,Reed JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.1 lymphoidcells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiplechemotherapeutic drugs. Canaer Res. 1992;54:5407