DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.034

论著

文章编号:1000-5404(2004)12-1116-04

顺铂持续压力下 $HepG_2$ 存活细胞中 P^{53}、C-myc、Bax、Bcl-2 的变化及意义

陈伟庆,沈 薇,沈鼎明 (重庆医科大学第二临床学院消化内科,重庆 400011)

提 要:目的 动态观察 $HepG_2$ 细胞在顺铂压力下存活细胞中 P^{53}、C-myc、Bax、Bcl-2 等的变化,进一步探讨 $HepG_2$ 顺铂耐药的机制。方法 采用免疫组化法和 RT-PCR 法测定在顺铂压力下存活 $HepG_2$ 细胞内凋亡和抗凋亡因子 P^{53}、C-myc、Bax、Bcl-2、NF-κB 的变化。结果 在顺铂压力下存活 $HepG_2$ 细胞 P^{53}、C-myc 等凋亡相关因子无明显变化。Bcl-2 持续升高,Bax 逐渐下降,Bcl-2/Bax 的比率值呈进行性升高。NF-κB mRNA 在 7 d 后出现明显阳性。结论 在顺铂持续压力下 $HepG_2$ 细胞的存活机制与 Bcl-2 持续升高、Bax 逐渐下降有关,NF-κB mRNA 的阳性表达可能与细胞存活的后续事件有关。

关键词:$HepG_2$;顺铂;Bcl-2/Bax
中图法分类号:R73-354;R730.23;R979.19 文献标识码:A

Changes and significance of P^{53}, C-myc, Bax, and Bcl-2 in surviving $HepG_2$ cells under continuous stress of cisplatin

CHEN Wei-qing, SHEN Wei, SHEN Ding-ming (Department of Gastroenterology, Second Medical College, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400011, China)

Abstract: Objective To observe the dynamic changes of P^{53}, C-myc, Bax, Bcl-2, and NF-κB in surviving $HepG_2$ cells under the continuous stress of cisplatin for the investigation of the potential role in the resistance of $HepG_2$ cells to cisplatin. Methods The apoptosis of $HepG_2$ cells and changes of the apoptosis associated factors including P^{53}, C-myc, Bax, Bcl-2, and NF-κB in the surviving $HepG_2$ cells were detected by immunohistochemical and RT-PCR assays. Results No obvious change of P^{53} and C-myc was found in the surviving $HepG_2$ cells under cisplatin stress, but persistent increase of Bcl-2 and decrease of Bax and a continuous increase of Bcl-2/Bax ratio were found. Markedly positive expression of NF-κB mRNA was found at 7 d after the stress of cisplatin. Conclusion The mechanisms of the surviving $HepG_2$ cells under continuous stress of cisplatin may be associated with the increase in Bcl-2 and decrease in Bax, specially the continuous increase in Bcl-2/Bax ratio, while the positive NF-κB mRNA expression may be associated with the later events after $HepG_2$ cell survive.

Key words: $HepG_2$; cisplatin; Bcl-2; Bax

化疗的失败往往是由于细胞对化疗剂诱导的细胞凋亡产生抗性。产生耐药性的肿瘤细胞不仅对使用过的抗肿瘤药产生耐受,而且对多种未曾使用过的结构不同、作用机制迥异的药物也产生耐受,即多药耐药性(multidrug resistance, MDR)。这是肿瘤细胞免受化疗药物攻击的最重要的防御机制,也是肿瘤治疗急需解决的一大难题[1]。顺铂(cis-diaminedichloroplatinum, CDDP)是临床上治疗实体肿瘤的常用化疗药物。然而,常因耐药性的产生使其不能发挥应有的治疗作用,而导致化疗失败。本研究是观察 $HepG_2$ 细胞在 CDDP 持续压力下,存活的 $HepG_2$ 细胞在凋亡方面会发生哪些变化,为临床探索逆转顺铂耐药性的有效途径提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和试剂

人肝癌细胞株 $HepG_2$ 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。CDDP 注射液由云南昆明第二制药厂生产,每瓶 2 ml、10 mg。抗 P^{53}、Bax、Bcl-2、C-myc S-2000 (ABC)试剂盒等一抗均购自北京中山生物有限公司。Tripure isolation reagent 和逆转录试剂盒均购自美国 Roche 公司。

1.2 细胞毒性测定[2]

采用 MTT 法。体外常规培养 $HepG_2$,MTT 法测定 $HepG_2$ 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 值[2]。

作者简介:陈伟庆(1962—),男,江苏省无锡市人,博士,主治医师,主要从事慢性肝病诊治方面的研究。电话:(023)63849075-2332

收稿日期:2004-02-16;修回日期:2004-05-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　测定顺铂对 $HepG_2$ 凋亡的影响

体外常规培养 $HepG_2$, MTT 法测定 $HepG_2$ 细胞对顺铂的 IC50 值. 取对数生长期 $HepG_2$ 细胞制成 10^6 个/ml 的细胞悬液, 接种至内铺小玻片的 12 孔培养板内。待细胞贴壁生长, 为便于观察和检测, 取 CDDP IC_{50}值 1/5 浓度加入。培养 0、24、48、72 h、5 d 和 7 d 后取出小玻片待测。TUNEL 检测按说明书进行。采用固定区计数法测定细胞计算凋亡率(每个玻片取 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞)。

1.4　细胞培养、分组及免疫组化

取对数生长期 $HepG_2$ 细胞制成 10^6 个/ml 的细胞悬液, 接种至内铺小玻片的 12 孔培养板内。培养于含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 置 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养。待细胞贴壁生长, 加入 CDDP(1/5 IC_{50}), 持续培养 0、24、48、72 h、5 d 和 7 d。PBS 反复冲洗后, 尽量冲掉凋亡或死亡细胞。然后按试剂盒说明书进行染色, 各抗体工作浓度 1∶100～1∶200。同时用 PBS 代替一抗作阴性对照。显色晾干后, 中性树胶封片, 光镜下观察、摄像。结果判断: 各组在生物医学图像分析系统(BM2000, 北航)下记录 3 个视野的显色强度, 计算平均灰度值。

1.5　细胞 RNA 提取及 RT-PCR

取 CDDP 处理后不同时间的细胞。调整细胞数为 10^6 个/ml, 1 ml Tripure 分离试剂注入培养皿, 抽吸数次后移入 5 ml 离心管中; 加入 0.2 ml 氯仿, 加盖用力摇 15 s, 室温孵育 10 min; 4 ℃ 12 000× g 离心 15 min; 吸取上层无色液相到 Eppendorf 管中; 加入 0.5 ml 异丙醇, 加盖后倒转几次使之充分混匀, 室温放置 10 min; 4 ℃ 12 000× g 离心 10 min; 弃上清, 加入－20 ℃ 预冷的 75% 乙醇 1 ml, 涡旋洗 RNA 沉淀; 4 ℃ 7 500× g, 离心 5 min; 弃上清, 吹干 RNA; 将 RNA 沉淀重悬于 20 μl DEPC-ddH_2O 中, 吹吸数次助溶, 55～60 ℃ 10～15 min; 取 1 μl, 测定、计算总 RNA 量。－70 ℃保存备用。RT-PCR 按照 Roche 公司产品说明书进行。NF-KB 引物: 5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′, PCR 产物 306 bp。β-actein(Roche)为内参。其 PCR 产物长度 243 bp。反应条件为: 变性 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 30 s→56 ℃ 30 s→68 ℃ 45 s × 10 次循环; 94 ℃ 30 s→56 ℃ 30 s→68 ℃ 45 s～3 min(每次循环延长 5 s)× 25 次循环; 68 ℃ 7 min。RT-PCR 产物鉴定: 取 RT-PCR 产物β-actin 和不同时间处理后的 MDR 产物, 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下观察并照相。

1.6　统计学方法

采用 SAS 统计软件进行对照组与处理组间的方差分析。

2　结果

2.1　MTT 测定 $HepG_2$

IC_{50}值 CDDP 约 67 μmol/L。

2.2　$HepG_2$ 细胞的凋亡(表 1)

表 1　顺铂(13.4 μmol/L)处理 $HepG_2$ 凋亡阳性率(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Positive rate of apoptosis in $HepG_2$ treated with CDDP (%, $\bar{x}\pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d
Control	1.3±0.33	15.2±2.5	19.4±0.5	10.2±4.5	9.2±1.5
CDDP	5.6±0.35	20.9±4.3	67.2±3.0 **	40.9±5.3 **	46.7±3.8 **

F= 78.9, P=0.008;　**: P< 0.01, *vs* control

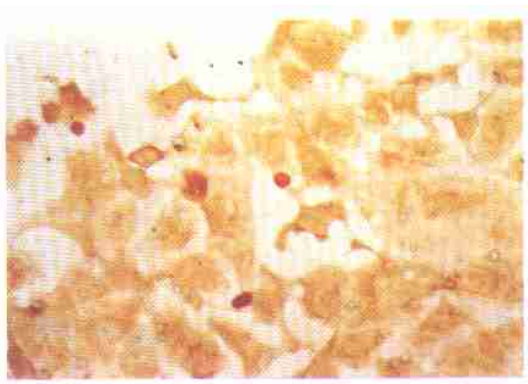
以上结果提示较低浓度的 CDDP 也能导致 $HepG_2$ 细胞的凋亡。尤其是在 72 h 时。

2.3　免疫组化

2.3.1　Bcl-2 和 Bax 的表达　　表 2 所示, Bcl-2 在经 CDDP 处理后升高, 虽有一定波动, 但仍然明显升高。Bax 在 $HepG_2$ 细胞经 CDDP 处理后逐渐下降。$HepG_2$ 细胞在不改变外部培养条件时, Bcl-2/Bax 的比率值对照组、24、48、72 h、5、7 d 时分别为: 1、11.88、9.30、16.13、23.6、39.18。Bcl-2/Bax 的比率值逐渐升高。Bcl-2 和 Bax 蛋白呈黄-棕黄颗粒, 定位于细胞浆和细胞膜。Bax/Bcl-2 的表达及 Bcl-2/Baxr 的比率值与细胞的凋亡/抗凋亡能力关系密切(图 1、2)。

2.3.2　C-myc、P^{53}的表达(表 3)　　存活 $HepG_2$ 细胞内 C-myc 的表达无明显变化。P^{53}的表达在 48 h 和 7 d 时有明显升高。C-myc、P^{53} 蛋白呈黄-棕黄颗粒, 定位于细胞核和细胞核膜(图 3、4)。

2.3.3　NF-κB mRNA 的表达　　NF-κB mRNA 在 24 h 至 5 d 以前均未见明显改变, 第 5 天后出现明显条带, 以 7 d 时最明显。提示 $HepG_2$ 细胞在 CDDP 处理中, 5 d 以后 NF-κB mRNA 明显增加(图 5)。



Expressions of Bcl-2 by CDDP on the 7th day

图 1　Bcl-2 经 CDDP 处理的 $HepG_2$ 细胞中的表达　(S-P × 400)

Fig 1　Expressions of Bcl-2 in $HepG_2$ treated by CDDP　(S-P × 400)

表 2　Bcl-2、Bax 经 CDDP 处理的 $HepG_2$ 细胞中的表达($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expressions of Bcl-2 and Bax in $HepG_2$ treated by CDDP ($\bar{x}\pm s$)

Group	Control	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d
Bcl-2	0.009 088±0.020 5	0.088 44±0.017 2△	0.064 054±0.055 9△	0.055 7±0.036 6△	0.075 12±0.046 0△	0.060 55±0.038 8△
Bax	0.130 5±0.03	0.106 8±0.045△	0.099 4±0.054△	0.049 10±0.026△	0.045 9±0.023△	0.021 88±0.019△

F= 15.7, P=0.002;　△: P< 0.01, *vs* control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Expressions of Bax without CDDP; B: Expressions of Bax with CDDP at 24 h; C: Expressions of Bax with CDDP at 7 d

图 2 Bax 经 CDDP 处理的 $HepG_2$ 细胞中的表达 (S-P × 400)

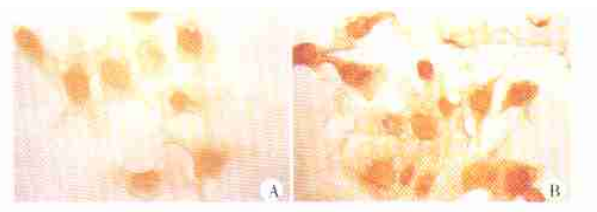
Fig 2 Expression of Bax in $HepG_2$ treated by CDDP (S-P × 400)

表 3 C-myc、P^{53} 经 CDDP 处理的 $HepG_2$ 细胞中的表达($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Expressions of C-myc and p53 in $HepG_2$ treated by CDDP ($\bar{x} \pm s$)

Group	Control	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d
C-myc	0.021 9±0.000 8	0.021 4±0.001 1	0.021 6±0.001 5	0.021 70±0.001 1	0.020 8±0.001 5	0.022 2±0.001 2
P^{53}	0.064 4±0.025 6	0.051 7±0.027 3	0.116 0±0.041 4*	0.039 74±0.041 9	0.042 2±0.009 6	0.087 4±0.02 6*

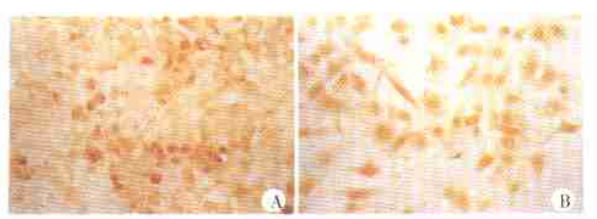
F= 11.2, P=0.008; *: P< 0.01, *vs* control



A: Expressions of P^{53} without CDDP; B: Expressions of P^{53} with CDDP at 7 d

图 3 P^{53} 经 CDDP 处理的 $HepG_2$ 细胞中的表达 (S-P × 200)

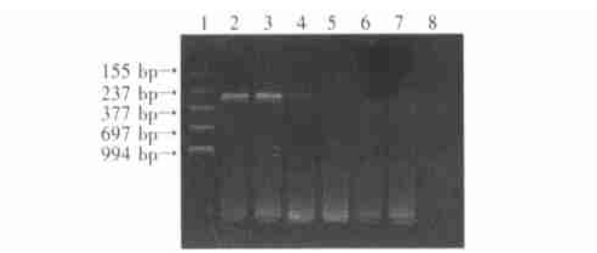
Fig 3 Expressions of p53 in $HepG_2$ treated by CDDP (S-P × 400)



A: Expressions of C-myc without CDDP; B: Expressions of C-myc with CDDP at 7 d

图 4 C-myc 经 CDDP 处理的 $HepG_2$ 细胞中的表达 (S-P × 200)

Fig 4 Expressions of C-myc in $HepG_2$ treated by CDDP (S-P × 200)



1: Marker; 2: β-actin; 3: 7 d; 4: 5 d; 5: 72 h; 6: 48 h; 7: 24 h; 8: Control

图 5 NF-κB mRNA 经顺铂处理的 $HepG_2$ 中的表达

Fig 5 Expressions of NF-κB mRNA in $HepG_2$ treated by CDDP

3 讨论

3.1 Bcl-2/Bax 的影响

我们前期实验已发现, CDDP 可导致 $HepG_2$ 细胞中 ROS 的显著增加[2]。而 Bcl-2 可通过减少 ROS 启动的信号传导, 抑制细胞凋亡[3]。Bcl-2 的过度表达还使肿瘤细胞明显增强了对化疗剂的毒性耐受, 同时过表达的 Bcl-2 改变了肿瘤细胞对抗癌反应中的死亡促进剂(death promoters)-从 Bak→Bax-表达的平衡[4]。Bax 的过度表达则可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡[5]。肿瘤复发灶或耐药细胞株中 Bcl-2、Bax 都可能是过度表达状态[6,7]。但 Bcl-2/Bax 的比值更能反映细胞内这对二聚体在决定细胞命运时的作用[8,9]。

本实验显示在 CDDP 持续作用下, 存活 $HepG_2$ 细胞中的 Bcl-2 在 24 h 时即明显增加, 随后虽有所下降, 但仍明显高于对照。同时 $HepG_2$ 细胞中的 Bax 逐渐下降。Bcl-2/Bax 的比率值逐渐升高, 且较 Bcl-2 升高的更明显(图 3)。提示存活 $HepG_2$ 细胞通过如此变化, 可显著增强细胞的抗凋亡能力, 有利于 $HepG_2$ 耐受 CDDP 的细胞毒作用。

3.2 NF-κB 与肿瘤耐药性

NF-κB 传递两个信号: 一是减少原癌基因 C-myc 和促增殖; 二是作为抗凋亡信号平衡 C-myc 的细胞毒性[10]。CDDP 和阿霉素的细胞毒能激活 SiHa 细胞 NF-κB 的表达, 示 NF-κB 活性的增加部分与肿瘤细胞的 CDDP 耐药有关[11]。NF-κB 活性的减损则将降低细胞的生存能力且促进凋亡产生[12]。我们在实验中发现 CDDP 处理 $HepG_2$ 细胞 5 d 以后 NF-κB mRNA 明显增

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加。这提示 CDDP 选择压力下 $HepG_2$ 细胞 NF-κB 的表达可能与后续的 MDR 表达有关。

3.3　c-myc 和 P^{53}

c-myc 具有促进增殖和凋亡的双重功能[13]。而 P^{53}作为 c-myc 作用的效应子之一, 与 c-myc 等因子共同调节细胞癌的增殖和凋亡[14]。本实验中, 在 CDDP 持续作用下存活 $HepG_2$ 细胞的 c-myc 表达未出现明显变化。P^{53}除在 48 h 和 7 d 时出现显著增高外, 其余各时间点未发现显著变化。据此我们认为在 CDDP 持续作用下影响细胞存活的因素与 c-myc/P^{53}无明显关联, 而是通过其它途径如前述的 Bcl-2、Bcl-2/Bax 比值、NF-κB、GSH 系统来调节细胞活动。

本实验中显示的在 CDDP 选择性压力下 $HepG_2$ 存活细胞内 Bcl-2 及 Bcl-2/Bax 比率值逐渐升高, Bax 逐渐下降, 以及随后 NF-κB mRNA 的明显增加等。提示可能是 CDDP 选择性压力下 $HepG_2$ 细胞存活——进而对 CDDP 产生耐受的机制之一。

参考文献:

[1] Bungo M, Fujiwara K, Kasahara K. Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(Ⅱ) in human non-small cell lung cancer cell lines: relation to DNA damage and repair[J]. Cancer Res, 1990, 50(9): 2549—2553.

[2] 陈伟庆, 沈　薇, 沈鼎明. 活性氧在顺铂致 $HepG_2$ 凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 957—959.

[3] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381): 1309—1312.

[4] Challdhary K S, Abel P D, Stamp G W, *et al*. Differential expression of cell death regulators in response to thapsigargin and adriamycin in Bcl-2 transfected DU145 prostatic cancer cells[J]. J Pathol, 2001, 193(4): 522—529.

[5] Oliver L, Cordel S, Barlieux I, *et al*. Resistance to apoptosis is increased during metastatic dissemination of colon cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(2): 175—180.

[6] Violette S, Poulain L, Dussault E, *et al*. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and bcl-X(L) in addition to Bax and P^{53} status[J]. Int J cancer, 2002, 98(4): 498—504.

[7] Pepper C, Thomas A, Hoy T, *et al*. Flavopiridol circumvents bcl-2 family mediated inhibition of apoptosis and drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2001, 114(1): 70—77.

[8] Schuyer M, van der Burg M E, Henzen Logmans S C, *et al*. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP^{53}, P21, BAX and Bcl-2[J]. Br J Cancer, 2001, 85(9): 135—167.

[9] Koukourakis M I, Corti L, Skarlatos J, *et al*. Clinical and experimental evidence of Bcl-2 involvement in the response to photodynamic therapy[J]. Anticancer Res, 2001, 21(1B): 663—668.

[10] Romashkova J A, Makarov S S. NF-κB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling[J]. Nature, 1999, 401(6748): 86—90.

[11] Kuo M T, Liu Z, Wei Y, *et al*. Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling[J]. Oncogene, 2002, 21(13): 1945—1954.

[12] Vendlitti M, Iwasiow B, Orr F W, *et al*. C-myc gene expression alone is sufficient to confer resistance to antiestrogen in human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 2002, 99(1): 35—42.

[13] Funato T, Kozawa K, KaKu M, *et al*. Modification of the sensitivity to cisplatin with c-myc over-expression or down-regulation in colon cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2001, 12(10): 829—834.

[14] Liu J R, Opipari A W, Tan L, *et al*. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance[J]. Cancer Res, 2002, 62(3): 924—931.

（编辑　王　红）

（上接 1115 页）

最高的三大疾病之一[1]。目前治疗效果并不理想, 其原因在于脑细胞耐缺氧性差和不可再生的特性, 一旦出现脑动脉栓塞, 数分钟内脑细胞即开始进入不可逆通道, 留给临床医生进行治疗的时间非常少。各种原因引起的脑供血障碍是造成脑梗死的根本原因。脑梗死后其有关区域的脑组织发生严重的脑缺血, 引起电压依赖性和受体调控的 Ca^{2+} 通道开放, 兴奋性氨基酸(EAA)增加, 结果导致细胞内 Ca^{2+} 超载, 由此触发花生四烯酸代谢瀑布式反应及活化氧化酶系统, 产生大量自由基造成脑细胞损伤, 使梗死脑组织发生细胞中毒性脑水肿, 引起颅内高压, 导致一系列的病理生理改变, 进而导致脑疝死亡[2,3]。脑栓塞可采用溶栓、动脉内膜切除术、颅内外血管吻合术、经皮腔内血管成形+支架置入术及脑保护等方法治疗。但在临床实践中注意综合治疗的同时, 更要重视个体化的治疗。本组病例为急性大片脑梗死, 已发生脑疝, 治疗的当务之急是降低颅内压, 解除脑干的受压, 挽救生命。手术采用开颅减压术, 术中见脑组织软化, 脑沟回消失, 内外减压术后解除了脑干受压, 挽救了生命, 术后效果良好。因此, 脑梗死的治疗总原则是抢救生命、抢救缺血脑组织、防治脑缺血的扩展和复发, 同时还要注意个体化的治疗。

关键词: 减压术; 脑梗死
中图法分类号: 743.330.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 李铁林, 刘亚杰, 刘振华. 重视缺血性脑血管病的外科治疗与介入治疗[J]. 中华神经医学杂志, 2003, 2(1): 6—7.

[2] 陈汝兴. 脑中风救治的若干进展[J]. 大连医学院学报, 1999, 8(1): 67—71.

[3] 中华医学会神经学分会. 急性缺血脑卒中患者处理建议[J]. 中华神经科杂志, 1998, 31(5): 305—306.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net