DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.009
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0763-04

论著

利用核酶技术下调人胆管癌细胞 *bcl*-2 表达水平

范毓东[1],李开宗[1],赵永同[2] (第四军医大学:[1]西京医院肝胆外科;[2]生物技术中心,西安 710032)

提 要:目的 研究切割 *bcl*-2 mRNA 核酶降低人胆管癌细胞 *bcl*-2 表达水平的作用。方法 将合成的切割 *bcl*-2 mRNA 核酶基因与真核细胞表达载体重组,并用重组后的载体转染人胆管癌细胞,通过免疫细胞化学、流式细胞仪等手段,观察转染后的胆管癌细胞 *bcl*-2 的表达水平。结果 转染切割 *bcl*-2 mRNA 核酶基因的胆管癌细胞内 *bcl*-2 的表达水平较对照组明显下降;部分细胞出现自发性凋亡现象。结论 切割 *bcl*-2 mRNA 核酶可明显降低胆管癌细胞内 *bcl*-2 的表达水平,并能够诱导其出现自发性凋亡。

关键词:核酶;胆管癌;*bcl*-2
中图法分类号:R657.4;Q522.2;R730.23;R735.8 文献标识码:A

Down-regulation of the *bcl*-2 expression level in a human cholangiocarcinoma cell line using ribozyme

FAN Yu-dong, LI Kai-zong, ZHAO Yong-tong (Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Objective** To study the role of down-regulation of *bcl*-2 expression of human cholangiocarcinoma cells with *bcl*-2 mRNA-cleaving ribozyme (RZ). **Methods** Synthetic gene of *bcl*-2 mRNA-cleaving RZ was recombined with the expression vector of eukaryotic cells. The recombined vector was used to transfect human cholangiocarcinoma cells. The expression of *bcl*-2 in human cholangiocarcinoma cells was observed by immunocytochemistry and flow cytometry. **Results** The expression of *bcl*-2 in human cholangiocarcinoma cells transfected with RZ gene was lower than that of control group. Spontaneous apoptosis was observed in a few of the cells. **Conclusion** *bcl*-2 mRNA-cleaving RZ can down-regulate the expression of *bcl*-2 of cholangiocarcinoma cells notably and can also induce spontaneous apoptosis.

Key words: ribozyme; cholangiocarcinoma; *bcl*-2

核酶(Ribozyme, RZ)是一类具有酶样催化作用、可进行分子间剪切功能的 RNA 分子[1]。*bcl*-2 癌基因是一种抗凋亡基因,其蛋白的超表达可抑制多种因素诱导的细胞凋亡,延长细胞寿命[2]。胆管细胞癌(下称胆管癌)是一种起源于胆道上皮细胞的致命性恶性肿瘤,对目前的治疗手段均无满意疗效[3]。近年来研究表明胆管癌细胞的 Bcl-2 蛋白表达阳性率较高(57.1%~100%)[4~6]。因此推测可能与其不良的预后密切相关。由于 Bcl-2 蛋白在胆管癌细胞中高表达,为本研究提供了可行性的理论依据。本实验利用合成的切割 *bcl*-2 mRNA RZ 基因,通过与逆转录病毒载体重组,转染培养中的胆管癌细胞,观察转染 RZ 基因后胆管癌细胞 *bcl*-2 表达水平的变化,以及发生凋亡的可行性,为胆管癌的基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 HB 101 由第四军医大学免疫学教研室赠送;脂质体 Lipofectamine(GIBCOBRL 产品)、RPMI1640 和胎牛血清购自宝泰克公司;*bcl*-2 鼠抗人单克隆抗体购自北京中山生物技术公司;FITC 标记的羊抗鼠二抗和生物素标记的羊抗鼠二抗及 ABC 试剂盒购自华美生物技术公司;pDOR-*neo* 载体由欧阳为明博士惠赠;1.9 kb 的 *bcl*-2 cDNA 插入在 pBluescript-KS(-)中,形成 pBSKS-*bcl*-2,由美国 Korsmeyer 教授惠赠;缺口平移试剂盒及 pGEM-3Zf(-)质粒购自华美公司;胆管癌细胞 QBC_{939} 由第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所王曙光建株[7]。

1.2 方法

1.2.1 RZ 基因的重组 把切割 *bcl*-2 mRNA 的 RZ 基因插入 pDOR-*neo* 逆转录病毒载体中,重组后的载体命名为 pDOR-RZ。

作者简介:范毓东(1962-),男,河南省修武县人,博士,副主任医师,主要从事胆管癌基因治疗方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68754486

收稿日期:2002-03-12;修回日期:2002-07-22

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

1.2.2 重组后载体扩增 转化感受态大肠杆菌，筛选阳性克隆，摇菌扩增，碱裂解法提取质粒。

1.2.3 DNA 和总 RNA 的提取 采用酚和氯仿抽提法。

1.2.4 QBC_{939}细胞的转染 处于对数生长期的 QBC_{939}细胞分为3组：①空白对照组；②空载体 pDOR-*neo* 转染对照组；③pDOR-RZ 实验组。采用脂质体 Lipofectamine 介导的 DNA 转染法，将 pDOR-RZ 或 pDOR-*neo* 导入 QBC_{939}细胞内。

1.2.5 *bcl*-2 正义 RNA 探针标记（随机引物法） [α-^{32}P] UTP 标记 591 bp 长的 *bcl*-2 mRNA 单链正义探针，用于 Northern 斑点杂交。该探针能与 RZ 的两翼形成特异性杂交体，可监测 RZ 基因的转录情况。

1.2.6 *bcl*-2 mRNA Northern 斑点杂交 硝酸纤维素膜斑点印迹法。

1.2.7 免疫细胞化学检测 ABC 法检测 QBC_{939}细胞中 *bcl*-2 的表达水平。光镜下观察并用彩色图谱分析仪进行测定。

1.2.8 Bcl-2 蛋白测定 收集 2×10^6 个 QBC_{939}细胞，经多聚甲醛固定、山羊血清＋1 g/L Triton X-100、鼠抗人 Bcl-2 单抗、FITC 标记羊抗鼠 IgG 处理后，流式细胞仪分析。

1.2.9 流式细胞仪细胞周期检测 收集 2×10^6 个 QBC_{939}细胞，经乙醇固定、PI 染液后，流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.10 形态学观察 光镜检查：收集 QBC_{939}细胞，常规 HE 染色后光镜观察；透射电镜观察：收集 5×10^6 个 QBC_{939}细胞，常规戊二醛固定，经脱水、包埋、超薄切片、醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色后观察；扫描电镜观察：贴有单层细胞的盖玻片，经戊二醛和锇酸固定后，脱水干燥，电子镀膜后观察。

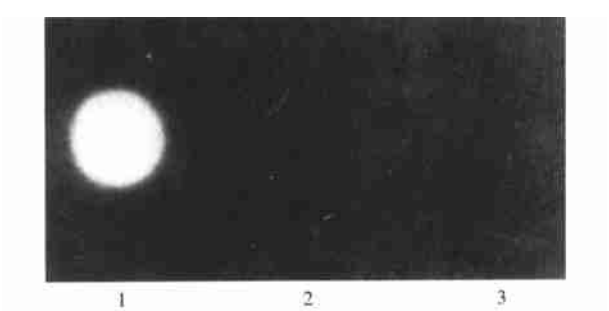
1.3 统计学方法

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 *bcl*-2 mRNA 单链探针 Northern 斑点杂交

RZ 基因已成功地在人胆管癌细胞内转录，见图1。



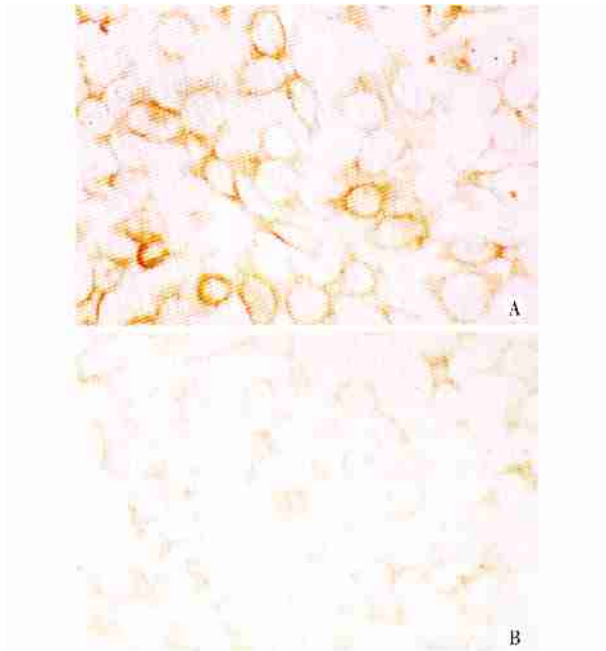
1：RZ group；2：Vector group；3：Blank control group

图1 各组 QBC_{939}细胞 RNA 斑点杂交结果

Fig 1 The results of dot blot hybridization of RNA in QBC_{939} cells

2.2 免疫细胞化学检测

RZ 组胆管癌细胞内的 *bcl*-2 表达水平明显下降；彩色图谱分析仪检测报告：实验组较空白对照组及空载体组下降约 8.9%，见图2A、B。



A：Blank control group；B：RZ group

图2 免疫细胞化学检测结果 （ABC× 400）

Fig 2 The result of immunocytochemistry （ABC× 400）

2.3 流式细胞仪 Bcl-2 蛋白测定结果

各组胆管癌细胞内 Bcl-2 蛋白表达阳性率经 χ^2 检验，RZ 组与空白对照组（$P<0.01$）和空载体组（$P<0.05$）间相差显著；空白对照组与空载体组间相差不显著（$P>0.05$），见表1。

表1 流式细胞仪 Bcl-2 蛋白测定结果

Tab 1 The results of Bcl-2 protein determined with flow cytometer

Group	Bcl-2 protein expression rate(%)
Non-specific binding control	1.8
Blank control	96.1
Vector	93.1
RZ	84.2

2.4 流式细胞仪细胞周期及凋亡检测结果

见表2。

表2 流式细胞仪细胞周期及凋亡结果

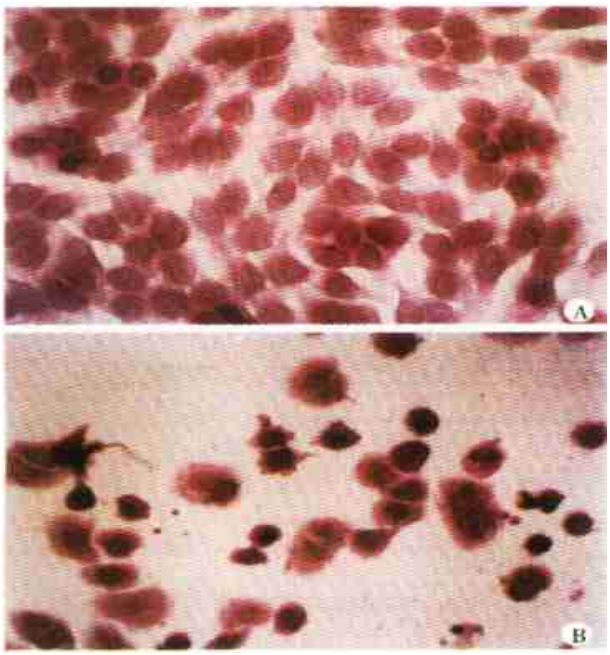
Tab 2 The results of cell cycle and apoptosis with flow cytometer

Group	Mean G_1	CV G_1	% G_1	Mean G_2	CV G_2	% G_2	% S	APOPTOT% Tot
Blank control	88.2	7.6	58.5	175.3	6.7	11.8	29.7	0
Vector	86.3	6.4	66.5	169.2	4.9	8.0	25.5	0
RZ	88.4	6.8	73.8	174.6	5.2	4.4	21.9	8.8

2.5 光镜

空白对照组及空载体组 QBC_{939}细胞形态正常，成梭形或多角形，见图3A；RZ 组部分细胞外形变圆，表面出芽，体积缩小，核固缩，染色加深，见图3B。

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



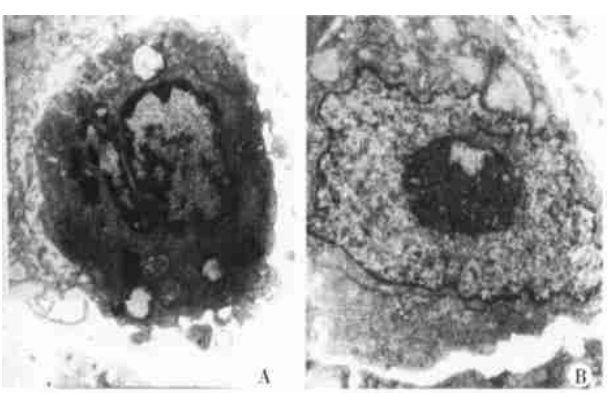
A: Blank control group; B: RZ group

图 3　光镜下 QBC_{939} 细胞形态　(HE× 400)

Fig 3　The configuration of QBC_{939} under light microscope　(HE× 400)

2.6　透射电镜

空白对照组及空载体组细胞形态正常, 可见细胞表面的微绒毛及胞浆内的分泌颗粒, 见图 4A; RZ 组细胞部分出现细胞核染色质边集, 色深, 微绒毛减少或消失, 见图 4B, 但未发现凋亡细胞。



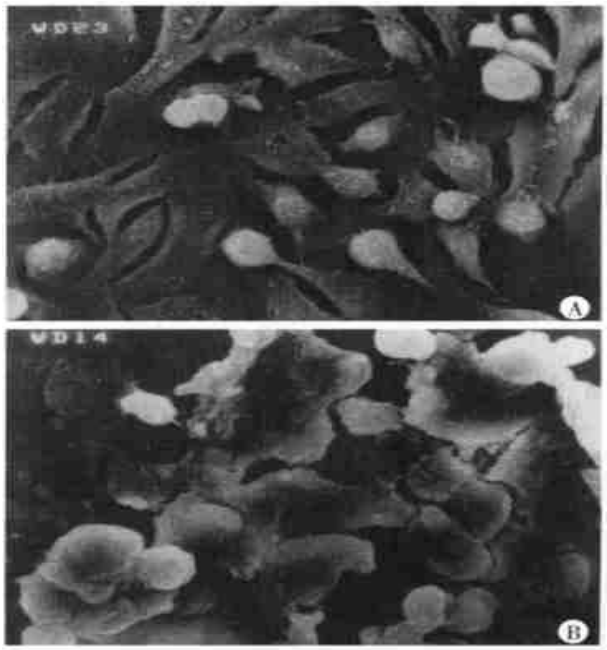
A: Blank control group; B: RZ group

图 4　透射电镜下 QBC_{939} 细胞形态　(TEM× 7 500)

Fig 4　The configuration of QBC_{939} under transmission electron microscope (TEM× 7 500)

2.7　扫描电镜

空白对照组及空载体组细胞形态正常, 见图 5A; RZ 组细胞表面微绒毛消失, 胞体变圆, 可见细胞表面出芽现象, 见图 5B。



A: Blank control group; B: RZ group

图 5　扫描电镜下 QBC_{939} 细胞形态　(SEM× 500)

Fig 5　The configuration of QBC_{939} under scanning electron microscope　(SEM× 500)

3　讨论

胆管细胞癌事实上是一种不可治愈性的恶性肿瘤, 早期诊断率低, 目前的多种治疗手段, 包括外科手术、化疗和放疗等疗效均不理想[8]。胆管癌的治疗仍是胆道外科亟待解决的课题。目前, 有关胆管癌发生及发展的细胞、分子和生化机制尚不清楚。*bcl*-2 癌基因是一种抗凋亡基因, 在肿瘤的发生和发展中起着非常重要的作用。近年来一些研究结果证实, *bcl*-2 基因在胆管癌细胞中高表达。Harnois 等[3] 的研究显示, 胆管癌细胞中 Bcl-2 蛋白阳性率是正常胆管上皮细胞的 15 倍。他们利用反义核酸技术降低胆管癌细胞中 *bcl*-2 表达水平后, 大大增加了其对 beauvericin 诱导凋亡作用的敏感性。胆管癌细胞中 *bcl*-2 表达水平较高可能与其不良的预后密切相关, 依靠 *bcl*-2 的超表达对抗凋亡作用可能是该细胞的特征之一[9]。

我们利用合成的切割 *bcl*-2 mRNA RZ 基因, 通过与逆转录病毒载体重组, 转染培养中的胆管癌细胞, 使 RZ 基因进入该细胞内; 发生转录后, 对 *bcl*-2 mRNA 进行切割, 使其失去生物学功能, 因而无法进一步完成 Bcl-2 的翻译和合成。对转染后的 QBC_{939} 细胞进行 *bcl*-2 mRNA 单链探针 Northern 斑点杂交, 证明 RZ 基因在人胆管癌细胞内发生转录; 免疫细胞化学和流式细

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

胞仪Bcl-2蛋白测定及细胞周期和凋亡检测结果显示：RZ基因转录后降低该细胞内的*bcl*-2表达水平及其抗凋亡作用，并诱导胆管癌细胞发生凋亡。扫描电镜和透射电镜也观察到QBC939细胞出现较典型的凋亡形态学改变。本研究结果显示：*bcl*-2癌基因在人胆管细胞癌的抗凋亡机制上起着十分重要的作用，而降低该基因的表达可明显降低其抗凋亡作用，同时可诱导胆管癌细胞出现自发性凋亡。关于该核酶在体内的生物效应如何，有待于进一步的研究证实。

参考文献：

[1] Gibbons A. Molecular scissors: RNA enzymes go commercial[J]. Science, 1991, 251(1): 521.

[2] Kemohan N M, Cox A L. Regulation of apoptosis by Bcl-2 and its related proteins: immunochemical challenges and therapeutic implications[J]. J Pathol, 1996, 179(1): 1—3.

[3] Harnois D M, Que F G, Celli A, *et al*. Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis cholangiocarcinoma cell line[J]. Hepatology, 1997, 26(4): 884—890.

[4] Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, *et al*. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver[J]. Am J Pathol, 1994, 144(3): 460—465.

[5] 王万忠，王家耀，杜德利. *bcl*-2癌基因在肝肿瘤的表达[J]. 中华医学杂志，1996, 76(6): 470—471.

[6] Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Alexopoulou V, *et al*. Topographical immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in human liver lesions[J]. Anticancer Res, 1996, 16(2): 975—978.

[7] 王曙光，韩本立，段恒春，等. 肝外胆管癌细胞系的建立[J]. 中华实验外科杂志，1997, 14(2): 67—68.

[8] Pederson L C, Buchsbaum D J, Vickers S M, *et al*. Molecular chemotherapy combined with radiation therapy enhances killing of cholangiocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Res, 1997, 57(19): 4325—4332.

[9] Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, *et al*. Bcl-2 expression in cholangiocellular carcinoma is inversely correlated with biologically aggressive phenotypes[J]. Oncology, 2000, 59(1): 63—67.

（编辑 陈聪连）

（上接762页）

2.3 华法林用量与PT INR允许范围的关系

见表3。

表3 华法林用量对**PT INR**值的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	PT INR允许范围
＜2.5 mg/d	21	1.83±0.52
2.5～5.0 mg/d	83	1.91±0.56
＞5.0 mg/d	4	2.24±0.65

3 讨论

华法林为双香豆素类抗凝剂，其化学结构与维生素K相似，可竞争性抑制维生素K依赖性凝血因子Ⅱ，Ⅶ，Ⅸ，Ⅹ的合成而抑制体内凝血系统，属外源性凝血系统的功能，它的生物半衰期为44 h，抗凝作用最强是在24～48 h。由于不同的凝血因子生物半衰期不同，所以持续作用时间可维持3～5 d。治疗以小剂量开始逐渐增加剂量，第1天剂量一般在2.5～5.0 mg/d。由于发生出血并发症的机会较多，据国内报道出血发生率在0.8%～9.2%病人/年[2]。因此，使用该药过程中常用PT进行检测。PT的时间延长到正常对照的1.5～2.5倍，就应当采用维持剂量。在经过大约2～4周的调整，最终将华法林的维持剂量确定下来，使INR值达到一个合理的范围，即抗凝治疗的允许范围。

文献[3]报道机械性瓣膜置术患者口服抗凝剂的INR为2.5～3.5作为治疗允许范围，以减少出血发生率。有人建议采用更低值的INR值作为治疗控制范围更为安全，提出机械瓣膜置换术后的抗凝强度以INR值1.85～2.85为宜[4]。

本组一般心脏瓣膜置换术患者使用的华法林用量为2.5～5.0 mg/d（108例中有83例，占76.8%），INR值维持范围为（1.89±0.63），比国外报道的范围要低。研究发现女性患者的PT检测INR允许范围要比男性患者小，应引起临床医生的注意。虽然，不同服药时间和服药剂量组之间在PT检测INR允许范围上无明显差异，但随着服药时间的延长和服药剂量加大，PT检测INR允许范围也略有增加，这点提示要注意PT检测INR允许范围的个体化。

华法林主要抑制Ⅶ因子和Ⅹ因子的生成。由于Ⅶ因子和Ⅹ因子的生物半衰期不同，因此在服用华法林后，作用的时间不同。在服用华法林后首先是半衰期短的Ⅶ因子的活性迅速减低，再是Ⅹ因子活性的减低，最后才是凝血酶原活性减低。因此，当PT开始延长时，仅反映Ⅶ因子活性的变化，不能反映其他几个凝血因子的变化。即开始治疗时，PT在"治疗范围"内，不一定表示达到了真正的抗凝目的。此外，使用小剂量华法林时，PT检测不够敏感，往往达不到真正的"治疗范围"。数据表明，华法林治疗用1～3 mg/d和用3～5 mg/d，PT的INR允许范围基本一致。这对合理使用小剂量华法林，是否能达到真正的抗凝目的提出怀疑。由于这方面的工作做得较少，还没有一个成熟的结论，需进一步研究。

关键词：瓣膜置换术；华法林；血浆凝血酶原时间；国际标准比值

中图法分类号：R969.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] International Committee for Standardization in Haematology. International Committee on thrombosis and haemostasis ICSH/ICTH recommendations for reporting prothrombin time in oral anticoagulant control[J]. Thromb Haemost, 1985, 53(2): 155—156.

[2] 徐志去，张宝仁，朱家麟，等. 国产侧倾碟瓣二尖瓣替换10年以上随访[J]. 中华胸心血管外科杂志，1995, 11(2): 135.

[3] Hirsh J, Dalen J E, Anderson D R, *et al*. Oral anticoagulants-mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range[J]. Chest, 1998, 114(5): 445—469.

[4] Carr J M, Horowitz G. Variation in the prothrombin time ratio during oral anticoagulation[J]. Nengl J Med, 1994, 330(4): 509.

（编辑 张大春）

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