DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.055

3 讨论

肠道是白色念珠菌感染、播散的中心器官，而白色念珠菌对肠粘膜的粘附和定植是感染和播散的重要生态学因素[1~3]。可见白色念珠菌感染播散机理的明确阐明有待于定植生态学基础研究的深入。为此我们首先对正常小鼠肠道白色念珠菌携带状况进行了调查，肠道真菌培养和电镜扫描检查结果均未发现有白色念珠菌粘附与定植，与文献[4]报道一致，表明在正常生理状态下，实验所用健康昆明种小鼠肠道无白色念珠菌定植，即白色念珠菌不是鼠体内的常居菌。为使白色念珠菌在小鼠肠道定植成为内源性菌而存活一段时间，我们先喂养成年小鼠白色念珠菌3 d，再用^{60}Co γ射线作不同剂量全身照射。辐照后第1、3、5、7、9天肠道白色念珠菌培养结果表明：各实验组均有白色念珠菌存在，且正处于增殖状态。肠道组织切片HE、PAS及扫描电镜(SEM)都同样证实了这一现象存在，尤其是电镜扫描更形象地展示了大量的白色念珠菌粘附于肠粘膜。裂区统计分析显示各小鼠间白色念珠菌定植无显著性异($P>0.05$)，认为本实验所采用的接种方法确保了小鼠间白色念珠菌的稳定定植。

生理状态下，肠道微生态之间、肠粘膜粘液层、肠上皮细胞及细胞间的紧密连接、上皮下基底膜及肠淋巴组织等共同构成肠道特有的抗感染屏障，一般不发生肠源性感染。γ射线辐射导致肠道机械屏障的损害、全小肠上皮内淋巴细胞数量减少和功能降低所造成的肠粘膜免疫功能的下降可能为白色念珠菌肠源性感染的发生提供了条件[5,6]。本实验观察到两辐射照组白色念珠菌肠道定植量随辐射后时点的延长和辐照剂量的增大而增多，而对照组却减少($P<0.01$)。可见，^{60}Co γ射线全身一次性照射削弱了小鼠对抗白色念珠菌肠道定植的能力，促进了白色念珠菌肠道粘附与定植。但具体机制有待深入探讨。

关键词：^{60}Co辐射；白色念珠菌；定植
中图法分类号：R379.4；R811.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] Kennedy M J, Rogers A L, Yancy R J. Environmental alteration and phonotypic regulation of Candida albicans adhesion to plastic[J]. Infect Immun, 1989, 57(12): 3 876—3 881.
[2] 郭 力，肖光夏，张雅萍，等. 烫伤和应用抗生素与肠道白色念珠菌移位的实验研究[J]. 中华创伤杂志，1991，7(4)：198—200.
[3] Skoutelis A, Lianou P, Marselou O, *et al*. Differences in adherence to buccal epithelial cells, in phagocytosis and killing by neutrophils between human and nonhuman strains of candida albicans[J]. J Infect, 1995, 30(1): 17—21.
[4] 陈 敏，朱 忠. 抗生素和抗癌药物对白色念珠菌定居小鼠肠道和播散的影响[J]. 中国人兽共患杂志，1992，8(6)：26—28.
[5] 艾国平，粟永平，刘晓宏，等. 放烧复合伤小鼠小肠粘膜免疫变化与肠源性感染关系的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，1999，19(1)：15—17.
[6] 徐 辉，程天民，粟永萍，等. 全辐射对小鼠小肠上皮内淋巴细胞功能影响的实验研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，1999，19(1)18—21.

(编辑 薛国文)

经验交流

文章编号：1000-5404(2002)02-0232-02

奥曲肽对SGC-7901细胞中Bcl-2和Bax基因的调控作用

Regulatory effects of octreotide on expressions of Bcl-2 and Bax genes in SGC-7901 cells

唐卓斌，刘为纹 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038)

我们以前研究发现奥曲肽可诱导人胃癌细胞株SGC-7901细胞凋亡，但其作用机制目前国内外未见报道。为此，我们就奥曲肽对SGC-7901细胞中Bcl-2和Bax基因的调控作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

奥曲肽由瑞士Sandoz药厂惠赠，人胃癌细胞株SGC-7901由本科培养，逆转录试剂盒Asccess RT-PCR System(A1250)购自Promega公司，TripureTM Isolation Reagent kit购自德国宝灵曼公司，2400型PCR循环仪为美国Perkin-Elmer公司产品，紫外线凝胶成像系统为美国Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测Bax和Bcl-2 mRNA表达 选择对数生长期SGC-7901细胞，以4.5×10^8个/L浓度接种于6孔培养板中，每孔1.5 ml，待其生长至对数生长期，每孔加入终浓度为1×10^{-7} mol/L的奥曲肽，继续无血清培养6、12、24、48 h后提取RNA，按宝灵曼RNA提取试剂盒说明书操作，设未处理的胃癌细胞为空白对照。采用25 μl逆转录反应体积，内含RNA模板2 μl、5× Buffer 5 μl、dNTP 0.5 μl、$MgSO_4$ 1 μl、Bax、Bcl-2、GAPDH引物各1.5 μl、Tfl酶0.5 μl、AMV酶0.5 μl，用水补至25 μl，2400型PCR仪扩增反应参数为：48 ℃ 45 min→94 ℃ 2 min→94 ℃ 30 s，60 ℃ 40 s，68 ℃ 1 min(35 cycles)→68 ℃ 7 min。PCR扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.2 流式细胞仪检测Bax和Bcl-2蛋白表达 消化收集经1×10^{-7} mol/L奥曲肽作用12 h后的SGC-7901细胞，PBS清洗两次，加入1∶100稀释的一抗100 μl，在37℃恒温水浴中温育30 min，PBS洗2次，然后加入1∶20稀释的FITC标记的二抗100 μl，37℃水浴30 min，PBS洗两次，离心去上清，除去未结合的多余荧光抗体。加入1.0 ml PBS，经200目滤网过滤，上机检测。测量数据及图形输入计算机，应用相应程序软件进行资料处理，测定前以鸡血红细胞标准样品调整仪器的*CV*值在5%以

作者简介：唐卓斌(1966—)，男，河北省邯郸市人，博士，主治医师，主要从事胃癌的发病机制及其防治研究，发表论文10余篇。电话：(023)68754000-73055
收稿日期：2000-06-15；修回日期：2001-10-13

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

内。设未处理的胃癌细胞为空白对照。

1.2.3　流式细胞仪检测胃癌细胞凋亡　　消化收集经 1×10^{-7} mol/L 奥曲肽诱导 6、12、24 h 后的胃癌细胞, 细胞用 PBS 清洗 2 次, 加入 70% 冷乙醇固定 24 h 以上(4 ℃)。随后清洗细胞, 与含 0.1% RNA 酶的 PBS 缓冲液(pH 7.4)200 μl(含 4% Triton X-100)共同孵育(37 ℃)30 min。然后用碘丙锭(PI)400 μl 作细胞 DNA 染色, 暗处 15 min 或 4 ℃过夜。200 目尼龙膜过滤。应用流式仪细胞 FACS 420(美国 BD 公司)检测, 观察是否存在凋亡细胞并测定其含量, 设未处理的胃癌细胞为空白对照。所有资料均经 lysisⅡ软件收集, 储存和分析。

1.2.4　统计学方法　　实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较行 t 检验。

2　结果

奥曲肽作用于 SGC-7901 细胞 6、12、24 h, Bcl-2 mRNA 表达呈递减趋势, 48 h 后 Bcl-2 mRNA 表达无明显变化, 见图 1; 而 Bax mRNA 表达则呈递增趋势, 见图 2。

奥曲肽作用于 SGC-7901 细胞 12 h 时, Bcl-2 蛋白表达显著低于对照组($P<0.01$), 而 Bax 蛋白表达则显著高于对照组($P<0.05$ 及 $P<0.01$), 见表 1。

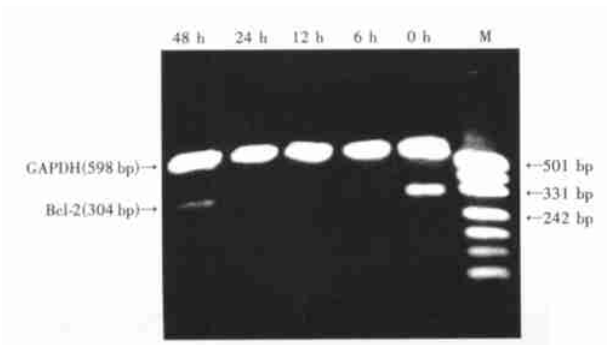


图 1　奥曲肽对 **SGC-7901** 细胞中 **Bcl-2 mRNA** 表达的影响

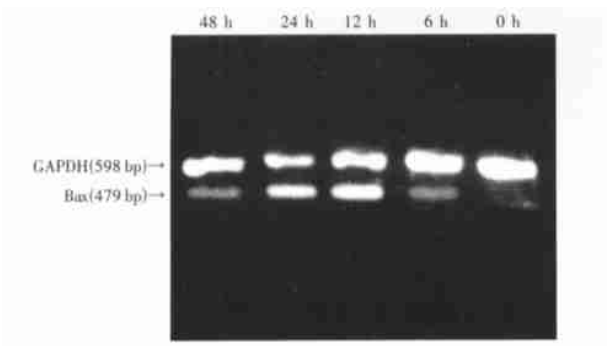


图 2　奥曲肽对 **SGC-7901** 细胞中 **Bax mRNA** 表达的影响

表 1　奥曲肽对 **SGC-7901** 细胞中 **Bcl-2**、**Bax** 蛋白表达的影响

组别	Bcl-2 蛋白		Bax 蛋白	
	阳性细胞数(%)	平均荧光强度	阳性细胞数(%)	平均荧光强度
对照组	64.2 ±5.8	3.59±0.13	66.13±4.96	3.46±0.22
奥曲肽组	33.93±3.62 **	4.33±0.2	87.23±8.18 **	4.58±0.43 *

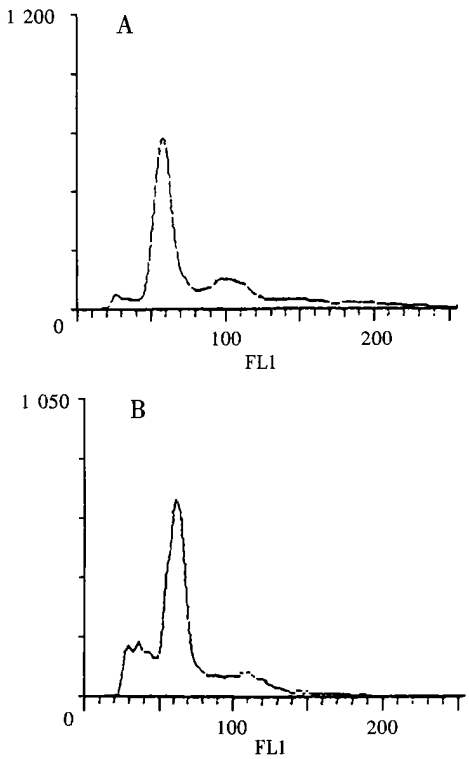
*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ 与对照组相比

经奥曲肽处理的胃癌细胞, 用流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布, 显示典型的凋亡细胞群, 即 DNA 含量明显低于 G_1 期的亚 G_1 期细胞时, 其数量呈现奥曲肽作用时间依赖性增强, 即随奥曲肽处理时间延长, 凋亡细胞数量显著增加。见表 2、图 3。

表 2　奥曲肽诱导胃癌细胞凋亡

组别	凋亡细胞数(%)		
	6 h	12 h	24 h
对照组	—	2.57±0.27	—
奥曲肽组 (1×10^{-7}mol/L)	5.24±0.61	15.57±0.97 #	19.23±1.16 △

#: $P<0.001$ 与对照组相比; △: $P<0.001$ 与 6 h 相比



A: 对照组; B: 奥曲肽组

图 3　奥曲肽诱导胃癌细胞凋亡的流式细胞仪检测结果

3　讨论

诱导细胞凋亡可能是某些药物杀伤肿瘤细胞的途径之一, Bcl-2 和 Bax 是调控细胞凋亡的一对基因, Bax 是编码 Bcl-2 相关蛋白 X 的基因, Bax 蛋白与 Bcl-2 有 21% 的同源性, 具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用[1]。Bcl-2 和 Bax 蛋白不仅仅限于淋巴系, 在非淋巴系组织中也均有表达[2-5]。我们以前研究结果表明奥曲肽可通过诱导 SGC-7901 细胞凋亡, 以抑制其生长, 但其抑癌机制尚不清楚。我们研究结果表明, 奥曲肽可诱导 SGC-7901 细胞凋亡, 并且呈现作用时间依赖性增强。奥曲肽不仅可使 SGC-7901 细胞中的 Bax mRNA 和蛋白表达增加, 而且还可使 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达显著减少。我们认为, 奥曲肽有可能通过上调 Bax 基因和下调 Bcl-2 基因的 mRNA 和蛋白表达以诱导 SGC-7901 细胞凋亡。这可能是奥曲肽抑癌机制之一, 为奥曲肽应用到临床治疗胃癌提供了新的思路和实验依据。

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

关键词：奥曲肽；胃肿瘤；Bcl-2；Bax；细胞凋亡
中图法分类号：R735.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved hemology, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609－619.
[2] Chresta C M, Masters J R W, Hickman J A. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax: Bcl-2 ratio[J]. Cancer Res, 1996, 56(8): 1 834－1 841.
[3] Krajewska M, Krajewski S, Epstein I J, *et al*. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-x, and mcl-1 expression in prostate Cancer[J]. Am J Pathol, 1996, 148(5): 1 567－1 576.
[4] Sierra A, Lloveras B, Castellsague X, *et al*. Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma[J]. Int J Cancer, 1995, 60(1): 54－60.
[5] Baretton G B, Diebold J, Christoforis G, *et al*. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas[J]. Cancer, 1996, 77(2): 255－264.

（编辑 陈聪连）

经验交流

文章编号：1000-5404(2002)02-0234-01

乌三颗粒抗肺癌细胞的实验研究

Inhibitory effects of Wusan granule on lung carcinoma *in vivo* and *in vitro*

石锦萍[1]，钟柏松[2]，黄秀凤[2]，雷佩琳[2]（[1]第三军医大学成都军医学院人体结构教研室，成都 610083；成都中医药大学，成都 610072）

以何首乌、三七等研制而成的乌三颗粒于 2001 年获国家药品监督管理局新药临床研究批准，本课题通过体内外试验，观察了该方药对小鼠移植性 Lewis 肺癌的抑制和对人巨细胞肺癌株(A-2)^{3}H-TdR 掺入的影响，同时观察了对植物血凝素(PHA)诱导小鼠淋巴细胞转化作用的影响，以探讨该方药对肺癌的抑制作用以及对免疫功能的调整作用，结果报告如下。

1 实验材料及方法

1.1 体内抑瘤实验

Lewis 肺癌瘤株，由四川省抗菌素工业研究所药理研究室提供。乌三颗粒，由重庆华森制药有限公司提供。C_{57}/6 纯种小鼠 50 只，体重(20±2)g，由华西医科大学实验动物中心提供，分为肿瘤模型组，5-氟脲嘧啶(5-Fu)阳性药物组，中药高、中、低剂量组，每组 10 只。每只 C_{57}/6 纯种小鼠右前腋皮下接种 Lewis 肺癌组织匀浆 0.2 ml。接种次日，阳性药物组腹腔注射5-Fu(25 mg/kg)，隔日 1 次，中药组按 16.2、8.1、2.7 g/kg 的高、中、低剂量等体积(0.4 ml/次)灌服；模型组予灌服等容积生理盐水。10 d 后，脱颈处死动物，剥离肿瘤，计算肿瘤抑制率。

1.2 体外抑瘤实验

人巨细胞肺癌瘤株(A-2)，由北京医科大学北京市肿瘤研究所提供。1640 培养基由美国 GIBCO 公司提供。A-2 细胞培养于含 20%小牛血清的 RPMI-1640 的培养液内。采用对数生长期细胞，稀释成 1×10^6个细胞/ml，接种于 24 孔板中，分别按表 2 分组加入测试药物，每个剂量复孔，重复 3 次。

1.3 淋巴细胞转化实验

昆明种小鼠 50 只，分为正常对照组，阳性药物组(鱼腥草素片)，中药高、中、低剂量组，每组 10 只。连续给药 8 d。前 3 d 同时每只小鼠肌肉注射 PHA 10 mg/kg，末次给药 24 h 后，由尾静脉采血涂片观察，计算出 200 个淋巴细胞中母细胞及过渡态细胞的百分率。

2 结果

2.1 对小鼠移植性 Lewis 肺癌的抑制作用

实验结果显示，5-Fu 和中药组对小鼠体内 Lewis 肺癌均有明显抑制作用，其中中药高、中剂量组与肿瘤模型组比较其抑瘤率达 40%～57%，见表 1。

表 1 对小鼠体内 Lewis 肺癌的抑制作用

组别	n	瘤重(g)	抑瘤率(%)
中药(16.2 g/kg)	10	0.87±0.53	57.6 *
中药(8.1 g/kg)	10	1.14±0.47	44.4 *
中药(2.7 g/kg)	10	1.39±0.55	22.2
5-Fu(25 mg/kg)	10	0.58±0.40	71.7 **
对照	10	2.05±0.61	

*：P<0.05，**：P<0.01 与对照组比较

2.2 对体外人巨细胞肺癌株(A-2)^{3}H-TdR 掺入的影响

表 2 显示，5-Fu、长春新碱(VCR)、顺铂(DDP)及中药在 0.5～8 mg/ml 均可明显抑制人巨细胞肺癌株(A-2)^{3}H-TdR 掺入含量，与对照组比较有显著差异(P<0.01)。

表 2 对人巨细胞肺癌株^{3}H-TdR 掺入的影响

组别	n	cpm	相当率(%)
对照	6	6 326.17±337.19	100
5-Fu(24 μg/ml)	6	3 805.83±777.98	60.2 **
VCR(0.5 μg/ml)	6	4 161.67±840.00	65.8 **
DDP(5 μg/ml)	6	2 149.67±356.30	34.0 **
中药(0.5 mg/ml)	6	2 797.33±823.59	43.2 **
中药(1 mg/ml)	6	2 812.17±454.53	44.5 **
中药(4 mg/ml)	6	954.00±50.42	15.1 **
中药(8 mg/ml)	6	260.67±99.12	4.1 **

*：P<0.05，**：P<0.01 与对照组比较

作者简介：石锦萍(1963－)，女，四川省雅安市人，博士研究生，副教授。主要从事中药抗肿瘤研究，发表论文 10 余篇。电话：(028)7717450

收稿日期：2000-06-08；修回日期：2000-12-10

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