DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.027
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1444 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1444-03

生长抑素类似物诱导人胆管癌SK-ChA-1细胞调亡及调亡相关基因表达的研究

陈 华[1],何振平[2],马宽生[2],杨 忠[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院普通外科;[2]附属西南医院全军肝胆外科中心、西南肝胆外科医院;[3]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨生长抑素类似物SMS201-995(SMS)抑制人胆管癌生长时对SK-ChA-1细胞调亡调控基因bcl-2和bax的作用。方法 用DNA凝胶电泳和流式细胞仪检测Annexin V标记凋亡细胞技术研究SMS诱导细胞凋亡的情况;用免疫组化和原位杂交分析SMS凋亡调控基因bcl-2和bax的影响。结果 SMS处理SK-ChA-1细胞后,Annexin V标记的凋亡细胞增多,DNA凝胶电泳显示典型的凋亡梯状图谱,同时SMS可使细胞bcl-2蛋白表达下降,使bax蛋白和mRNA表达升高。结论 SMS能诱导SK-ChA-1细胞发生凋亡,bax和bcl-2凋亡基因介导了SMS对SK-ChA-1细胞凋亡的发生。

关键词:生长抑素;人胆管癌SK-ChA-1细胞;细胞凋亡;基因表达
中图法分类号:R735.8 文献标识码:A

Apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line SK-ChA-1 induced by somatostatin analogues and its related gene expressions

CHEN Hua, HE Zhen-ping, MA Kuan-sheng, YANG Zhong (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of somatostatin analogue (SMS201-995, SMS) on apoptosis of human cholangiocarcinoma SK-ChA-1 cells and on apoptosis-regulated gene bcl-2 and bax since the analogue inducing the inhibition of human cholangiocarcinoma growth. Methods DNA gel electrophoresis, flow cytometry with Annexin V as marker were used to detect the apoptosis of SK-ChA-1 cells. The expressions of bcl-2 and bax were studied with SABC immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Results The annexin V-positive cells were increased after SMS treatment and showed a typical ladder pattern as apoptosis feature on gel. Besides, SMS inhibited bcl-2 protein expression and enhanced bax protein and mRNA expressions. Conclusion SMS can induce SK-ChA-1 cell apoptosis by means of affecting bcl-2 and bax gene expressions.

Key words: somatostatin; human cholangiocarcinoma SK-ChA-1 cells; apoptosis; gene expression

肿瘤细胞的凋亡在肿瘤的生长中具有重要的生物学意义。近年的研究发现,一些胃肠激素可促进胆管癌细胞的生长[1],而生长抑素及其类似物则抑制胆管癌的生长[2],但其作用的机制尚不清楚。本实验采用流式细胞分析、免疫组化和原位杂交等方法,观察生长抑素类似物对胆管癌细胞凋亡和凋亡调控基因的影响,以期阐明生长抑素对胆管癌抑制作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胆管癌细胞株SK-ChA-1细胞由Knuth教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 SMS201-995(SMS)由Suter教授惠赠。bcl-2和bax抗体;bax和bcl-2寡核苷酸探针;SABC免疫组化试剂盒和敏感型加强型原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司。DNA Markar、蛋白酶K和RNase A均购自成都华美公司。AnnexinV-FITC试剂盒购自晶美公司。

1.2 方法

1.2.1 Annexin V和PI双染的流式细胞检测方法 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为1×10^6/ml,接种于12孔培养板,每孔2 ml。药物处理:培养24 h,弃上清加新鲜培养液,加入SMS使培养液终浓度为100 ng/ml,培养0、6、12、24 h重复3次。消化收集细胞,PBS洗一遍,用结合缓冲液195 μl重悬细胞液,加5 μl Annexin V-FITC,混均,室温孵育10 min PBS洗后加190 μl结合缓冲液重悬细胞,加10 μl PI(20 μg/ml),上机检测。

1.2.2 DNA琼脂糖凝胶电泳 细胞处理同上,收集5×10^5个细胞,加300 μl细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 120 μg/ml蛋白酶, 10% SDS),37 ℃水浴过夜,离心,以等体积的苯酚/氯仿、苯酚/氯仿/异丙醇(25∶24∶1)和氯仿各抽提一次。加入1/10体积2 mol/L醋酸钠和2倍体积冷乙醇,于-20 ℃沉淀过夜。离心收集沉淀,加20 μl TE缓冲液及2 μl RNA酶,50 ℃保温3 h。加入4 μl样品缓冲液,加到含有0.4 μg/ml EB的1.8%的琼脂糖凝胶的样品孔中电泳2 h,紫外灯下照相。

1.2.3 bcl-2和bax蛋白表达的免疫组化检测 取对数生长期细胞,调整细胞浓度2×10^4/ml,接种于放有多聚赖氨酸预处理无菌盖玻片的24孔培养板,每孔1 ml。药物处理同上,于不同时相取出细胞爬片用4%多聚甲醛固定,-20 ℃保存,免疫组化(SABC法)染色。采用重庆大学设计生产的Tiger图像分析系统进行图像定量分析。每张片随机选5个视野测定阳性细胞光密度值。

1.2.4 bcl-2和bax mRNA检测 细胞处理同上,盖玻片经高温,RNA酶灭活和多聚赖氨酸预处理,细胞爬片经4%多聚甲醛,5% 乙酸和0.9%氯化钠室温固定30 min。按试剂盒说明

作者简介:陈 华(1962-),男,四川省达州市人,博士研究生,主要从事胆管癌方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752731

收稿日期:2001-06-05;修回日期:2001-08-23

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

进行原位杂交染色后做图像定量分析。

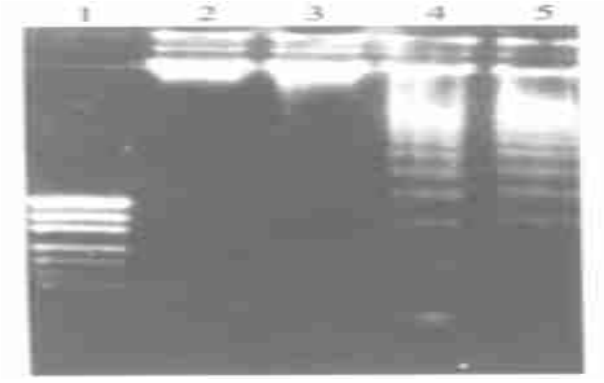
1.3　统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 进行 t 检验。

2　结果

2.1　SMS 诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡

DNA 凝胶电泳显示, SMS 作用 6 h, 未见梯形电泳带, 在 12～24 h 可见到明显的梯状电泳图谱, 基因组 DNA 显现凋亡细胞典型的梯状图谱, 这是 DNA 在核小体间形成 180～200 bp 整位断裂的结果。结果表明, SMS 可诱导 SK－ChA-1 细胞凋亡见图 1。Annexin V-FITC 和 PI 双标法显示, 未加 SMS 时细胞凋亡数为(2.5±0.7)%, SMS 作用 6 h 即见凋亡细胞开始上升为(22±5.2)%, 随时间延长而逐步升高, 12 h 凋亡细胞为(39±7.1)%, 24 h 达到最高值(58±9.6)%。



1: Marker; 2～5: 0、6、12、24 h after SMS treatment

图 1　SMS 诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡的 DNA 片段电泳图谱

Fig 1　Electrophoresis of SK-ChA-1 cell DNA fragments after SMS treatment

2.2　SMS 诱导凋亡过程中, bcl-2 和 bax 蛋白表达量的变化

bcl-2 阳性反应物呈棕黄色, 主要位于胞浆内。图像分析 bcl 表达变化, 显示SMS 作用 SK-ChA-1 细胞 6 h 后, bcl-2 阳性表达开始减弱, 12 h 和 24 h 两个时相点 bcl-2 阳性表达明显弱于 0 h 时相点。表明 bcl-2 表达降低与 SMS 诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡相关。bax 阳性反应物呈棕黄色, 主要定位于胞浆。图像分析 bax 表达变化, SMS 作用 SK-ChA-1 细胞 6 h 后, bax 阳性表达明显增强($P<0.05$), 以后逐步升高, 至作用 24 h 最强见表 1。

表 1　SMS 对 SK-ChA-1 细胞表达 bcl-2 和 bax 蛋白的影响

Tab 1　Expressions of bcl-2 and bax in SK-ChA-1 cells with SMS treatment

Group	Indicated time of 100 ng/ml SMS			
	0 h	6 h	12 h	24 h
Bcl-2	0.424±0.015	0.405±0.018	0.301±0.022 *	0.267±0.014 *
bax	0.213±0.023	0.491±0.032 *	0.514±0.021 *	0.657±0.037 *

*: $P<0.05$ *vs* 0 h

2.3　bcl-2 和 bax mRNA 水平在 SMS 诱导细胞凋亡过程中的变化

bcl-2 mRNA 在 SK-ChA-1 细胞有较强杂交信号, 阳性染色主要出现在胞浆。SMS 作用 SK-ChA-1 细胞 6 h, 12 h 和 24 h 后图像分析显示见表 2, bcl-2 杂交信号呈减弱趋势但无明显差异。bax mRNA 在 SK-ChA-1 细胞有弱杂交信号, 阳性染色主要出现在胞浆。SMS 诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡过程中, 6 h 信号即见明显增强, 24 h 信号最强, 此时阳性着色以胞浆为主, 同时见部分胞核着色。

表 2　SMS 对 SK-ChA-1 细胞表达 bcl-2 和 bax mRNA 的影响

Tab 2　Expressions of bcl-2 and bax mRNA in SK-ChA-1 cells with SMS treatment

Group	Indicated time of 100 ng/ml SMS			
	0 h	6 h	12 h	24 h
Bcl-2 mRNA	0.145±0.023	0.126±0.037	0.120±0.024	0.110±0.021
bax mRNA	0.125±0.022	0.263±0.031 *	0.292±0.022 *	0.324±0.031 *

*: $P<0.05$ *vs* 0 h

3　讨论

肿瘤细胞的恶性无限增殖、分化受阻和细胞凋亡受抑制是恶性肿瘤的重要发病机制。研究表明, 生长抑素具有广泛的抑瘤效应, 但多数研究都集中于观察生长抑素对肿瘤细胞生长和移植瘤生长的大小、重量、蛋白量及 DNA 合成速率等指标。近年人们已开始关注SMS 与肿瘤细胞凋亡的关系。Me 等[3] 研究发现, SMS 抑制结肠癌生长时, 其凋亡指数明显高于对照组。Rochaix 等[4] 通过转基因技术将生长抑素 2 型受体转入生长抑素受体(-)的胰腺癌细胞后, 可明显增加肿瘤细胞的凋亡, 表明生长抑素可直接导致肿瘤的凋亡。

本实验研究结果显示: SMS 作用于 SK-ChA-1 细胞后的 12、24 h 均可见清晰的梯条带形成。同时 Annexin V-FITC 染色流式细胞仪检测发现 SMS 作用于 SK-ChA-1 细胞 6 h 即可见凋亡细胞数明显增加, 而 DNA 电泳在 12 h 才出现凋亡改变, 表明 Annexin-V 染色流式细胞计数法能检测早期细胞凋亡的改变; 随着 SMS 作用时间的延长, Annexin-V 染色阳性依次增高, 凋亡细胞明显增多。表明 SMS 诱导细胞凋亡有一定的时效关系。

细胞凋亡不是可有可无的无序现象, 而是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。其中促进凋亡基因 bax 以及抑制凋亡基因 bcl-2 被证实与许多细胞凋亡的进程有关。Bcl-2 通常以二聚体的形式在细胞凋亡中发挥作用, Bcl-xL 与 bcl-2 结合抑制细胞凋亡, 而 bax 与 bax 或与 bcl-2 形成二聚体则促进细胞凋亡。有研究表明, Bcl-2 表达的降低和 bax 表达的上升可导致肿瘤中增殖活性较高的细胞首先出现凋亡[5,6]。本实验检测 SMS 在诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡过程中 bcl-2 和 bax 表达的变化, 发现 SMS 可抑制 bcl-2 蛋白的翻译以及促进 bax 的转录和翻译。图像分析结果显示, SMS 作用于 SK-ChA-1 细胞在 6、12、24 h 后 bax 出现明显表达上调, bcl-2 蛋白亦在 12、24 h 出现明显表达下调。而且这种变化在时间上与凋亡发生相一致, 提示 bax 和 bcl-2 在 SMS 诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡发生中起重要的调节作用。本结果还显示 bax 变化显著于 bcl-2 表达变

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

化，反映 bax 在此凋亡发生中是否起更重要的作用尚有待进一步的研究。

综上所述，SMS 能诱导 SK-ChA-1 细胞发生凋亡；此作用呈一定的时效关系。SMS 在蛋白水平有促进 bax 表达和抑制 bcl-2 表达作用，并在 mRNA 水平促进 bax 表达。表明 bax 和 bcl-2 凋亡基因介导了 SMS 对 SK-ChA-1 细胞凋亡的发生。

参考文献：

[1] 马宽生，何振平，王曙光 等. 胆囊收缩素及胃泌素对体内生长胆管癌细胞增殖的影响[J]. 中华实验外科杂志，2000，17(6)：518－519.
[2] Tan C T，Podilla P V，Taylor J E，*et al*. Human cholangiocarcinomas Express Somatostatin Receptors and Respond to somatostatin with Growth Inhibition[J]. Gastroenterology，1995，108(6)：1 908－1 916.
[3] Me M G，Winczyk K，Pawlikowski M，*et al*. Somatostatin analogue octreotide and melatonin inhibit bromodeoxyuridine incorporation into cell nuclei and enhance apoptosis in the transplantable murine colon 38 cancer[J]. Anticancer Res，1998，18(5A)：3 615－3 619.
[4] Rochaix P，Delesque N，Saint Laurent N，*et al*. Gene therapy for pancreatic carcinoma：local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer[see comments][J]. Hum Gene Ther，1999，10(6)：995－1 008.
[5] Slootm H J，Clahsen P C，Dierendonck J H，*et al*. Expression of bcl-2 in node-begative breast cancer is associated with various prognostic factors，but dose not predict response to one course of perioperative chemotherapy[J]. Br J Cancer，1996，74(1)：78－85.
[6] Brinder，Marx D，Binder L，*et al*. Expression of bax in relation to bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer[J]. Ann Oncol，1996，7(2)：129－133.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)12-1446-01

桑毛虫污染生活用水致接触性皮炎暴发的报告

Report on fulminant contact stomatitis resulted from *Euproctis similis*-polluted living water

黄发林[1]，韦胜德[2] （[1]柳州铁路局卫生处，[2]桂林铁路防疫站，广西 柳州，545007）

2001 年 6 月至 7 月，柳州铁路局某站区职工及家属相继出现以皮肤搔痒为主要症状的皮炎。经流行病学调查、临床诊断证实为一起由桑毛虫及其毒毛污染生活用水引起的接触性皮炎的暴发流行。现报告如下。

1 临床表现

患者多在接触自来水后 10～30 min 出现皮肤红肿搔痒，继则出现绿豆或黄豆大丘疹或风团，色淡红或鲜红，多见于四肢、颈、背、胸部。症状重者可出现水肿性丘疹或风团增大，搔痒难耐，且洗澡后反复发病。患者经内服抗组织胺药，外用炉甘石洗剂及激素霜治疗后多在 3～5 d 内痊愈，无并发症发生。

2 流行病学资料

站区共有铁路居民 1210 户、3182 人使用站区供水所供水。病例最早出现于 6 月 25 日，至 7 月 27 日调查时已累计患者 2291 人次，累积发病率 72%，临床诊断为接触性皮炎。患者最小 2 岁，最大 63 岁，各年龄组和男女性别间发病率无显著性差异。但全体患者均有用该所所供自来水洗澡的历史。

供水所采用的供水工艺同当地自来水公司相同，符合国家供水要求。自 6 月以来其出厂水余氯量均在 0.5 mg/L。环境监测站对水源的水质监测报告表明自 4 月以来其各项监测指标均符合生活饮用水卫生标准，故可初步排除微生物和化学污染同本次皮炎暴发流行的关系。

水源地的流行病学调查发现，位于自来水水源上游的村庄桑毛虫灾害严重，村民中也有因接触桑毛虫或在被桑毛虫污染的水源水中洗澡、洗衣后出现的上述皮炎。而在未被桑毛虫污染的大口井或压水井洗澡、洗衣者未发生皮炎。教育职工家属停止用自来水洗澡，改用热水洗澡，8 月份以后患者明显减少。此外，途经该地换班的机务乘务人员 217 人采用热水洗澡后无一人发病，表明干预措施产生了明显的效果。

3 讨论

桑毛虫引起的接触性皮炎暴发和流行的报道较多[1,2]，主要因同毒毛接触导致四肢或裸露的皮肤发生过敏反应。上海曾在 1972 年发生大规模桑毛虫皮炎，罹患病人以 10 万计[1]。调查发现当地的桑毛虫灾为有史以来最大规模的虫灾，而河边柳树虫害尤其严重。桑毛虫每 7～10 d 脱皮 1 次，脱皮带着毒毛一起掉入水中，严重污染了水源，居民直接使用此种污染的自来水洗澡而导致接触性皮炎的暴发。避免用凉水洗澡，改用热水洗澡后发病率迅速下降，表明加热可有效地灭活桑毛虫毒毛的致病性。提示在某些桑毛虫流行的地区，在流行期用热水洗澡可能是一种控制和预防桑毛虫皮炎的有效方法。

关键词：桑毛虫皮炎；毒毛
中图法分类号：R757.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 苏德隆，钱宇平主编. 流行病学研究实例，桑毛虫皮炎流行病学调查[M]. 人民卫生出版社，1984. 24－29.
[2] 喻新民，李成海. 西沙某岛一起桑毛虫皮炎暴发流行的调查[J]. 解放军预防医学杂志，1999，17(3)：225.

（编辑 冷怀明）

作者简介：黄发林(1954－)，男，壮族，广西省桂林市人，主治医师，电话：(0772)3922531

收稿日期：2001-10-08；修回日期：2001-12-03

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