DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.041
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0205-02

论著

TopoⅡ与膀胱癌多药耐药性关系的实验研究

张远宁,杨唐俊,黄云剑,王祥卫,曾 毅,刘素英 (第三军医大学附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨DNA拓扑异构酶Ⅱ(Topo Ⅱ)与膀胱癌多药耐药性(MDR)的关系。方法 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫细胞化学技术,分别对人膀胱癌耐药细胞株(BIU-87/ADM)及敏感细胞株(BIU-87)中Topo Ⅱ基因及其产物的表达进行研究。结果 BIU-87/ADM细胞中Topo Ⅱ基因表达呈弱阳性,BIU-87细胞中呈强阳性。结论 TopoⅡ基因在人膀胱癌耐药细胞中表达的降低,与人膀胱癌多药耐药的产生有关。

关键词:DNA拓扑异构酶Ⅱ;多药耐药;逆转录聚合酶链式反应
中图法分类号:R394.3;R737.14 文献标识码:A

Investigation on relation between Topo Ⅱ and multidrug resistance in bladder carcinoma cells *in vitro*

ZHANG Yuan-ning, YANG Tang-jun, HUANG Yun-jian, WANG Xiang-wei, ZENG Yi, LIU Su-ying (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the relation between Topo Ⅱ and multidrug resistance (MDR) of human bladder cancer. Methods The expression and the products of Topo Ⅱ gene in cell line BIU-87/ADM and BIU-87 were detected with reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. Results The expression of Topo Ⅱ gene was poorly positive in BIU-87/ADM cells but strongly positive in BIU-87 cells. Conclusion The decreased expression of Topo Ⅱ gene in BIU-87/ADM cells might contribute to the development of multidrug resistance of human bladder cancer.

Key words: DNA topoisomerase Ⅱ; multidrug resistance; reverse transcriptase polymerase chain reaction

多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对一类结构和功能并不同的化疗药物产生的交叉耐受,是导致临床化疗失败的重要原因。以往对MDR的研究多集中于P-糖蛋白(P-gp)的过度表达,然而耐药的产生是多因素和复杂的,近几年来的资料表明,Topo Ⅱ基因表达的变化也是MDR产生的因素之一。目前,肿瘤组织中Topo Ⅱ表达的报道不多,有关Topo Ⅱ与膀胱癌MDR关系的研究未见报道。本课题通过检测膀胱癌耐药细胞中Topo Ⅱ的表达,探讨Topo Ⅱ与膀胱癌MDR的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养

人膀胱癌BIU-87细胞株引自北京医科大学泌尿外科研究所。耐药细胞株BIU-87/ADM,由我科应用阿霉素大剂量冲击结合低浓度诱导敏感细胞株BIU-87所建立(1994年)[1~2]。细胞置于37 ℃、饱和湿度、含5% CO_2的孵箱中培养。

1.2 引物与试剂

Topo Ⅱ引物[3]:5′-CTTGT ACTGC AGACC CACA-3′,5′-ATAAT AGAAT CAAGG GAATT CCCAA ACTCGA-3′,其特异性片段长度为233 bp;β-actin引物[4]:5′-TGAGA CCTTC AACAC CCCAG-3′,5′-GCCAT CTCTT GCTCG AAGTC-3′,特异性片段长度312 bp。以上引物由上海博亚生物技术有限公司合成。通用RT-PCR试剂盒为北京博大泰克公司产品。Topo Ⅱ抗体(Ab2)及SABC试剂盒购自武汉博士德公司。

1.3 RT-PCR反应

细胞总RNA的提取采用异硫氰酸胍一步法。逆转录反应体系为20 μl,其中dNTPs 1 μl、MMLV 1 μl、5× MMLV反转录酶反应缓冲液4 μl、Oligo(dT)$_{16}$ 1 μl、Rnasin 0.5 μl、RNA样品2 μl、用ddH_2O补足至20 μl,37 ℃水浴2 h,95 ℃热变性5 min。聚合酶链式反应体系50 μl,其中反转录产物(cDNA)1 μl、dNTPs 1 μl、Taq酶 0.5 μl、10× PCR反应缓冲液5 μl、15mmol/L $MgCl_2$ 5 μl、引物各1 μl、用ddH_2O补足至50 μl,上机反应。94 ℃,预变性5 min;94 ℃,变性50 s;55 ℃,退火50 s;72 ℃,延伸1 min。循环32圈。72 ℃再延伸8 min。PCR扩增产物行1.5%琼脂糖电泳,110 V,90 min。紫外灯下观察,摄影。

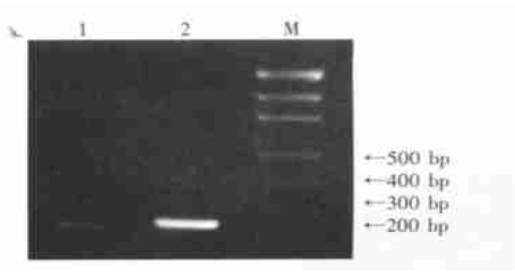
1.4 免疫细胞化学

应用SABC法。细胞核呈棕黄色为Topo Ⅱ蛋白阳性,不着色为阴性。

2 结果

2.1 Topo Ⅱ mRNA的表达

PCR产物经琼脂糖电泳检测,可见BIU-87细胞特异性条带(233 bp)要明显强于BIU-87/ADM细胞,见图1,表明在耐药的BIU-87/ADM细胞中Topo Ⅱ mRNA的表达弱于敏感的BIU-87细胞。



M: DNA marker; 1: BIU-87/ADM cells; 2: BIU-87 cells

图1 RT-PCR检测BIU-87、BIU-87/ADM细胞Topo Ⅱ mRNA

Fig 1 Topo Ⅱ mRNA analysis of the BIU-87 and BIU-87/ADM cell lines by RT-PCR

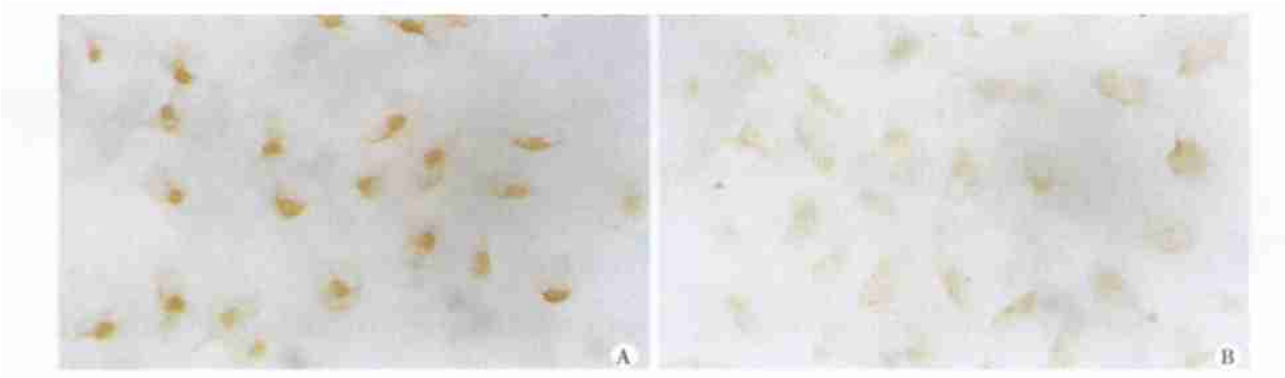
作者简介:张远宁(1973—),男,山东省泰安市人,硕士研究生,医师,主要从事人膀胱癌多药耐药方面的研究。电话:(023)65224292

收稿日期:2001-03-15;修回日期:2001-06-07

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

2.2 Topo Ⅱ蛋白的表达

BIU-87/ADM 细胞及 BIU-87 细胞均有 Topo Ⅱ蛋白的表达，Topo Ⅱ蛋白主要定位于细胞核；耐药细胞 BIU-87/ADM 中 Topo Ⅱ蛋白的表达弱阳性，BIU-87 细胞呈强阳性，见图 2。



A: BIU-87 cells; B: BIU-87/ADM cells

图 2 **Topo** Ⅱ蛋白的表达 (SABC× 400)

Fig 2 Expression of Topo Ⅱ **protein** (SABC× 400)

3 讨论

肿瘤细胞的多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是导致临床化疗失败的重要原因。在 MDR 的发生机制中，Topo Ⅱ的改变起到了重要作用。

调节 DNA 空间结构的拓扑酶有两种，即拓扑异构酶Ⅰ(Topo Ⅰ)和拓扑异构酶Ⅱ(Topo Ⅱ)。其中 Topo Ⅱ作用 DNA 的效能大于 Topo Ⅰ。Topo Ⅱ是真核细胞生存所必不可少的。它的作用涉及到核酸代谢的许多方面，包括 DNA 复制、mRNA 的加工、染色体的分离及浓缩、核基质的组织等[5]。临床化疗中使用的许多抗癌药物正是通过干扰 DNA 的正常代谢而发挥抗肿瘤作用的，大量事实说明 Topo Ⅱ是肿瘤化疗的重要靶点，其作用是促使酶-DNA 易解离复合物形成，最终引起细胞死亡或凋亡。研究表明 Topo Ⅱ表达水平的高低与抗癌药物的活性有密切关系，高水平的 Topo Ⅱ的表达是药敏的基础。

在本实验中使用的耐药细胞系 BIU-87/ADM 是利用阿霉素药物诱导的方法建立的。阿霉素是蒽环类抗生素的一种，其抗癌作用的重要机制之一是：可抑制 Topo Ⅱ的催化作用，与 Topo Ⅱ DNA 形成药物-Topo Ⅱ DNA 共价复合物，抑制 DNA 断点的重接，造成 DNA 不可逆的断裂[6]。由此推测 Topo Ⅱ在 BIU-87/ADM 的 MDR 机制中占有很重要的地位。

在本实验中运用 RT-PCR 及免疫细胞化学的方法，从 mRNA 和蛋白两个水平检测了 Topo Ⅱ在 BIU-87/ADM 中的表达，发现 Topo Ⅱ在 BIU-87/ADM 中的表达明显弱于敏感的 BIU-87 细胞。提示：Topo Ⅱ的表达降低，参与了人膀胱癌多药耐药现象的产生。

在我们以往的实验中检测了 BIU-87/ADM 及 BIU-87 细胞中 P-gp 的表达，发现在耐药的 BIU-87/ADM 细胞中 P-gp 过度表达，而 BIU-87 细胞表达阴性。说明 BIU-87/ADM 多药耐药的产生与 P-gp 的过度表达有关[3]。结合本实验，提示：BIU-87/ADM 多药耐药的产生因素是多方面的，因此在多药耐药性的逆转中要也应考虑到的 Topo Ⅱ的影响，以更好的克服 MDR。

参考文献：

[1] 杨唐俊，范立新，杨清浩. 人膀胱癌 BIU-87 细胞系多重抗药性的形成[J]. 中华泌尿外科杂志，1996，17(9)：527－529.

[2] 杨清浩，杨唐俊，范立新. 人膀胱癌多重抗药性逆转的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志，1997，18(5)278－279.

[3] Danks M K, Warmoth M R, Friche E, *et al*. Single－strand conformational polymorphism of the Mr 170 000 isozyme of DNA topoisomerase Ⅱ in human tumor cells[J]. Cancer Res, 1993, 53(6): 1 373－1 379.

[4] 李 杰，许良中，何开玲，等. 甲诺孕酮和屈洛昔芬对 K562/A02 细胞株多种耐药机制的调节[J]. 中华血液学杂志，1999，20(6)：288－291.

[5] 陆东东. DNA 拓扑异构酶与肿瘤药物治疗研究[J]. 医学研究通讯，1999，28(9)：24－25.

[6] 王祥卫，杨唐俊，何 斌，等. 阿霉素诱导人膀胱癌多药耐药细胞凋亡的观察[J]. 第三军医大学学报，1998，20(2)：128－130.

(编辑 郭建秀)

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