DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.006
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
260 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0260-04

bcl-2、c-myc基因表达在去甲二氢愈创木酸诱导人恶性胶质瘤细胞凋亡中的意义

郭德玉,陈意生,卞修武,史景泉,陈自强,辛 榕 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察bcl-2、c-myc在去甲二氢愈创木酸(NDGA)诱导恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞凋亡中的变化及意义。方法 利用光镜和电镜观察及TUNEL法检测培养细胞凋亡的情况,用免疫组织化学、原位杂交和图像分析等方法检测bcl-2、c-myc基因mRNA和蛋白的表达水平。结果 ①一定浓度的NDGA处理SHG-44细胞12~96 h,均可诱导SHG-44细胞发生凋亡,且随着作用时间的延长,凋亡细胞数增加越明显;②经NDGA处理细胞后,出现SHG-44细胞bcl-2、c-myc蛋白表达水平降低,且随着作用时间的延长,这种趋势更加明显,与细胞凋亡的发生密切相关;③原位杂交结果显示,NDGA处理细胞不同时间后,出现SHG-44细胞bcl-2、c-myc基因mRNA的表达水平降低,结果与免疫组化检测一致。结论 NDGA诱导SHG-44细胞的凋亡可能与其下调bcl-2、c-myc基因的表达有关,但其确切机制有待进一步深入研究。

关键词:去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;凋亡;bcl-2;c-myc
中图法分类号:R329.28;R730.264 文献标识码:A

Significance of bcl-2 and c-myc gene expression in nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis of a human malignant glioma cell line

GUO De-yu, CHEN Yi-sheng, BIAN Xiu-wu, SHI Jing-quan, CHEN Zi-qiang, XIN Rong (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes and their significance of bcl-2 and c-myc in nordihydroguaiaretic acid (NDGA)-induced apoptosis of human malignant glioma cell line SHG-44. **Methods** The apoptosis of SHG-44 cells was observed with light and electron microscopy and TUNEL method. The expression of bcl-2 and c-myc gene was measured with immunohistochemistry, in situ hybridization and image analysis. **Results** ① The SHG-44 cell apoptosis was induced by NDGA at a concentration lower than 200 μmol/L in a time-dependent manner. ② The expressions of bcl-2 and c-myc gene in SHG-44 cells were decreased after the treatment of 100 μmol/L NDGA with the elapse of time, indicating a close association with cell apoptosis. ③ The expressions of bcl-2 and c-myc mRNA in SHG-44 cells were decreased after the treatment with 100 μmol/L NDGA, which was apparently consistent with the immunohistochemical results. **Conclusion** The NDGA-induced apoptosis in human malignant glioma cells might be related with the down-regulated expressions of bcl-2 and c-myc gene. The exact mechanism needs further research.

Key words: nordihydroguaiaretic acid; glioma; apoptosis; bcl-2; c-myc

化疗是目前治疗恶性肿瘤的常用方法之一,但由于其副作用大,临床应用受到一定限制。寻找高效低毒的化疗药物是目前肿瘤化疗研究的重要课题。近年来发现脂氧化酶抑制剂去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)对多种肿瘤均有抑制生长、诱导分化作用,且对人体无毒性[1~3],是一种很有发展前景的抗癌新药。最近我们在动物体内和体外实验研究中发现,NDGA可诱导恶性胶质瘤细胞凋亡,但其分子机制尚不清楚。因此,本实验旨在探讨NDGA诱导恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞凋亡的可能机制,为深入认识NDGA的抗肿瘤作用奠定基础,也为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脑恶性胶质瘤细胞系SHG-44(第110代)引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室。细胞用含10%小牛血清(杭州四季青生物材料研究所)的RPMI-1640培养基(Gibco),另添加适量的HEPES、抗生素(100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素)和3%谷氨酰胺(10 μl/ml)置37 ℃、5% CO_2 混合气体的孵箱中培养,细胞换液时间为1~2 d,传代3~5 d,传代前用0.25%胰酶消化。

1.2 NDGA溶液配制

用蒸馏水先配制0.01 mol/L pH 7.2的PBS液,用孔径0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,作为对照液。NDGA(Sigma公司)液用上述PBS液配制,浓度为5 mmol/L,37 ℃水浴并调整pH值直至完全溶解为止(溶液呈浅棕黄色),过滤除菌,备用。

1.3 凋亡细胞的形态观察

生长旺盛的SHG-44细胞按10^5个/ml密度接种于预先置有干净消毒盖玻片的6孔培养板中,待细胞完全贴壁(3~5 h)后加入NDGA液,使其终浓度为100 μmol/L,药物作用12、24、48、72和96 h后取出盖玻片,常规光镜、电镜制样、观察。

1.4 TUNEL法检测细胞凋亡

细胞经上述NDGA处理后取出盖玻片,按In Situ Cell Death Detection Kit, POD试剂盒(Boehringer Mannheim产品)说明操作,实验设有用无末端转移酶的标记液代替TUNEL复合物的阴性对照和标本先用DNase 1(10 μg/ml)室温处理10 min的阳性对照。以细胞核呈明确的棕黄色为阳性染色,每张切片选择5个阳性染色最明显的中倍视野(×100),计算每个中倍视野中阳性细胞的平均数目。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670296)
作者简介:郭德玉(1967-),男,湖南省冷水江市人,博士,副教授,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文13篇,电话:(023)68752246
收稿日期:2001-01-05;修回日期:2001-03-04

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

1.5　探针 cDNA 的制备和标记

人 c-myc 探针 cDNA 购自中山公司, 片段长为 1.4 kb, 内切酶为 *EcoR* Ⅰ。bcl-2 探针 cDNA 的制备过程如下: pB4(Amp+)质粒载体为含有 910 bp 的人 bcl-2 cDNA 的 pUC19 重组质粒[4], 该质粒含有编码人 bcl-2 蛋白的完整开放阅读框。以大肠杆菌 *E. coli* DH5α 株为宿主菌进行 bcl-2 cDNA 质粒的转化、扩增、抽提和纯化, 用限制性内切酶 Pst1 进行质粒酶切鉴定, 并按琼脂糖凝胶 DNA 提取(回收)试剂盒(Boehringer Mannheim 产品)说明操作进行酶切探针片段的回收。采用 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit 1 (Boehringer Mannheim 产品)进行探针 cDNA 的标记与有效性的检测。

1.6　原位杂交

经上述 NDGA 处理的细胞, 用 PBS 洗涤两次, 95% 乙醇固定 30 min 后, 进行原位杂交, 其操作步骤参照文献[5] 方法进行, 并在杂交前, 将切片用 20 mg/ ml RNase A, 37 ℃处理 30 min, 或在预杂交液中不加核酸探针作为对照实验。杂交结果用德国 Leica 公司 MD20 型真彩色图像分析仪进行图像分析。测定条件: 物镜放大倍数 16×, 随机测定 100 个细胞, 测出阳性反应细胞的积分光密度(IOD)。

1.7　免疫组化染色

细胞经上述 NDGA 处理后取出盖玻片, 用 PBS 洗涤两次, 95% 乙醇固定 30 min, 常规免疫组化染色(S-P 法)。一抗 bcl-2(C-124)、c-myc 单抗购自 Dako 公司, 抗体稀释度分别为 1∶25 和 1∶20, S-P 试剂盒购自 Zymed 公司, DAB 显色。结果处理同原位杂交。

1.8　数据统计学处理

所得计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用本校数理统计教研室提供的统计程序包 SPMR, 进行两样本均数间显著性检验。

2　结果

2.1　pB4(Amp+)质粒酶切鉴定和琼脂糖凝胶 DNA 回收结果

用限制性内切酶 *Pst*1 进行 pB4(Amp+)质粒酶切, 发现 bcl-2 酶切完全后可见到约 0.6 kb 和 3.0 kb 处各有一条清晰带, 前者为 bcl-2 cDNA 的一部分, 后者为载体 pUC19 部分, 并将前者进行回收, 结果见图 1。

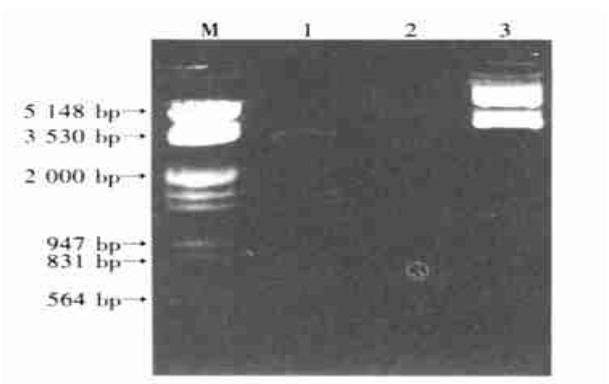


图 1　**pB4(Amp+)质粒酶切鉴定和琼脂糖凝胶 DNA 回收结果**

Fig 1　Identification of recombinant plasmid pB4 and recovered by DNA agarose gel electrophoresis

M: Marker (λDNA/ *EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ); 1: Plasmid pB4+ *Pst* 1; 2: Recovered 0.6 kb bcl-2 cDNA; 3: Plasmid pB4

2.2　细胞凋亡的形态学观察

光镜和电镜下观察发现, NDGA 处理不同时间后, SHG-44 细胞均出现凋亡细胞形态, 表现为光镜下细胞体积缩小, 内含高度浓缩核染色质的胞核, 染色质浓缩至核膜下形成块状或新月状, 部分成核碎片; 透射电镜下见凋亡细胞核染色质浓缩、边集至核膜下形成新月状或环状、块状, 并可见核碎裂现象, 胞膜完整, 胞浆内线粒体聚集, 其余细胞器减少或消失, 有的可形成凋亡小体。且随着作用时间的延长, 这种改变越明显。

2.3　TUNEL 法检测细胞凋亡的结果

TUNEL 法检测结果显示, 正常对照组的 SHG-44 细胞中可见少量凋亡细胞, 当 NDGA 处理后, SHG-44 细胞中凋亡细胞数明显增多, 处理 24 h 后凋亡细胞平均达 2.4 个/ 中倍视野, 且随着作用时间的延长, 凋亡细胞逐渐增加, 具体结果见表 1。

表 1　**NDGA 处理不同时间后细胞凋亡的检测结果**

Tab 1　Apoptosis cells with different duration of NDGA treatment

Group	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
NDGA	1.4±0.7	2.4±0.9 *	3.9±1.2 **	7.0±2.2 **	11.7±3.8 **
Control	1.1±0.7	1.3±0.7	1.8±0.9	2.7±1.1	4.1±1.3

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.4　免疫组化染色结果

免疫组化检测结果显示, NDGA 处理细胞 24 h 后, SHG-44 细胞 bcl-2 和 c-myc 蛋白表达明显减弱, 见图 2、3, 且随着作用时间的延长, 这种趋势更加明显。图像分析结果显示, NDGA 处理后, 该细胞 bcl-2 和 c-myc 蛋白表达的阳性反应的 IOD 值较对照组明显减少, 统计学差异显著($P<0.05$)。

2.5　原位杂交检测结果

mRNA 原位杂交检测结果显示, NDGA 处理细胞 24 h 后, SHG-44 细胞 bcl-2 和 c-myc 基因 mRNA 表达明显减弱, 见图 4、5, 且随着作用时间的延长, 这种趋势更加明显。图像分析结果显示, NDGA 处理后, 该细胞 bcl-2 和 c-myc 基因 mRNA 表达的阳性反应的 IOD 值较对照组明显减少, 统计学差异显著($P<0.05$)。结果与免疫组化检测一致。

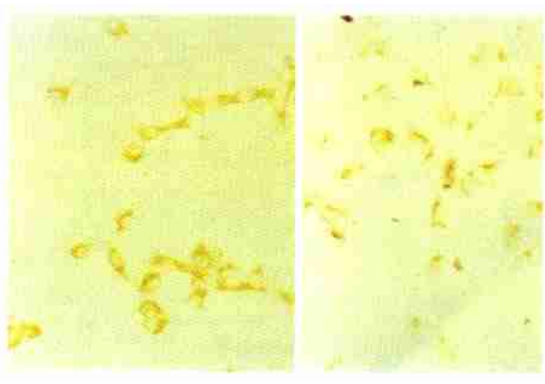


图 2　**SHG-44 细胞 bcl-2 蛋白的表达**　*左为对照组 24 h, 右为 NDGA 组 24 h*　(S-P× 200)

Fig 2　Protein expression of bcl-2 in SHG-44 cells　Left: Control group 24 h; Right: NDGA group 24 h　(S-P×200)

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

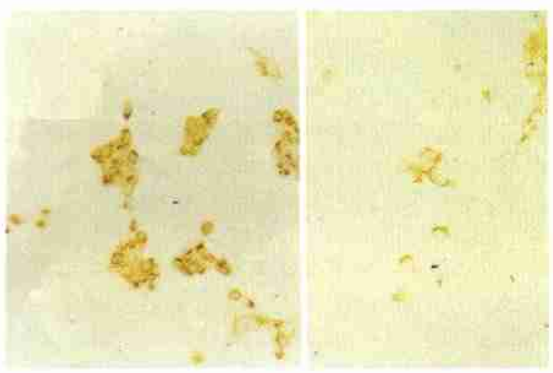


图 3 SHG-44 细胞 c-myc 蛋白的表达 左为对照组 24 h，右为 NDGA 组 24 h （S-P× 200）

Fig 3 Protein expression of c-myc in SHG-44 cells Left: Control group 24 h; Right: NDGA group 24 h （S-P× 200）

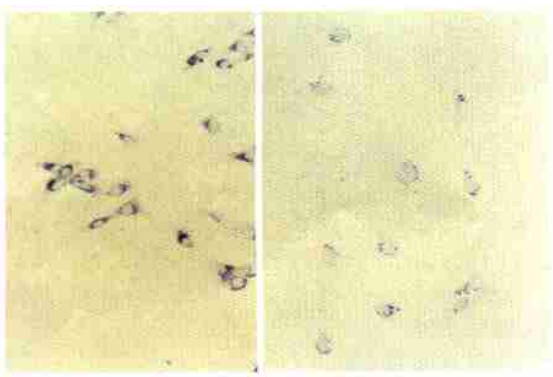


图 4 SHG-44 细胞 bcl-2 mRNA 的表达 左为对照组 24 h，右为 NDGA 组 24 h （ISH× 200）

Fig 4 mRNA expression of bcl-2 in SHG-44 cells Left: Control group 24 h; Right: NDGA group 24 h （ISH× 200）

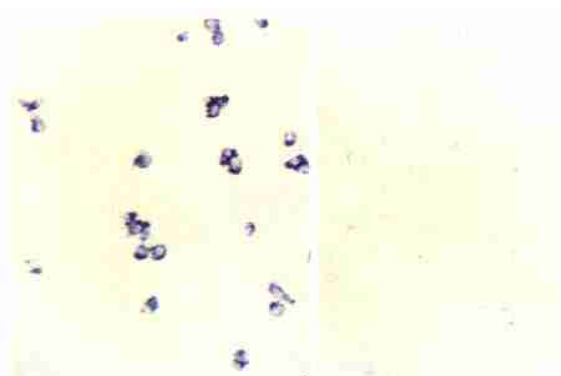


图 5 SHG-44 细胞 c-myc mRNA 的表达 左为对照组 24 h，右为 NDGA 组 24 h （ISH× 200）

Fig 5 mRNA expression of c-myc in SHG-44 cells Left: Control group 24 h; Right: NDGA group 24 h （ISH× 200）

3 讨论

自从 1972 年 Kerr 等提出细胞凋亡(Apoptosis)的概念以来，随着人们对细胞凋亡研究的不断深入，越来越多的资料显示与细胞恶性增殖和分化受阻一样，细胞凋亡异常在大多数恶性肿瘤的发病学上占有重要地位。因此人们有理由相信以选择性地诱导肿瘤细胞凋亡为目标的凋亡干预技术可能成为治疗恶性肿瘤的基本策略或成为肿瘤治疗的一个新模型靶。近年来研究表明，目前大多数化疗药物都是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡来清除肿瘤细胞的[6]。本实验结果表明，NDGA 也可诱导人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 细胞发生细胞凋亡，且凋亡发生程度与其处理细胞的时间呈正相关，即呈时间依赖性。

关于细胞凋亡发生的机制，目前研究发现细胞凋亡受一系列凋亡相关基因的调控，其中最重要的是 bcl-2 基因家族和 Caspases 基因家族。每个家族包括许多基因。bcl-2 基因是 bcl-2 基因家族中的重要一员，其在滤泡 B 细胞淋巴瘤中由于 t(14;18)染色体易位而活化，编码分子量为 26×10^3 的蛋白，位于线粒体膜、核膜和内质网上，它作为 GTP 连接蛋白在生长因子受体介导的信号传递途径中起重要作用。近年研究发现 bcl-2 基因是一个重要的凋亡抑制基因，其蛋白可能通过影响线粒体释放细胞色素 C 的过程来调节细胞凋亡[7]，并发现 bcl-2 蛋白能抑制多种抗肿瘤药物诱导的多种肿瘤细胞的凋亡[8]。本实验免疫组化结果表明，NDGA 处理 SHG-44 细胞后 24 h，bcl-2 基因蛋白表达水平降低，以后随作用时间延长，bcl-2 基因蛋白表达减弱更明显；原位杂交检测 bcl-2 基因 mRNA 表达情况与其蛋白表达水平基本一致，两者的变化趋势与细胞凋亡的发生正好相反，提示 bcl-2 基因表达改变与 NDGA 诱导的 SHG-44 细胞的凋亡有着密切关系。

c-myc 基因是一种控制细胞增殖和分化的原癌基因，具有调节细胞增殖和凋亡的双重作用，选择何种作用受其它调控因素的影响。在生长因子存在时，c-myc 基因表达主要与细胞增殖有关，当生长因子去除时，c-myc 基因的表达主要调节细胞凋亡。本实验原位杂交和免疫组化结果表明，NDGA 处理 SHG-44 细胞后，c-myc 基因 mRNA 和蛋白表达水平均降低，且随着作用时间的延长，这种变化更明显，这与多种癌分化诱导剂可导致多种肿瘤细胞系细胞 c-myc mRNA 表达降低[9]的报道相一致，且这种作用与细胞凋亡的发生呈负相关，说明 c-myc 基因表达水平降低在 NDGA 诱导的 SHG-44 细胞的凋亡中也起着重要作用。

综上所述，NDGA 诱导的 SHG-44 细胞的凋亡，可能是通过其下调 bcl-2、c-myc 基因的表达实现的，但其确切机制有待进一步深入研究。

（致谢：感谢本校生物化学与分子生物学教研室何凤田博士给予本实验的帮助。）

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

参考文献：

[1] Birkenfeld S, Zaltsmam Y A, Krispin M, *et al*. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors[J]. Dis Colon Rectum, 1987, 30(1): 43－46.

[2] Wilson D E, DiGianfilippo A, Orey F G, *et al*. Effect of nordihydroguaiaretic acid on culture rat and human glioma cell proliferation[J]. J Neurosurg, 1989, 71(4): 551－557.

[3] 郭德玉, 陈意生, 卞修武, 等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 增殖和分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 9－12.

[4] Tsujimoto Y, Croce C M. Analysis of the structure, transcription, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lyphoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(14): 5 214－5 218.

[5] 蔡文琴, 王伯[illegible]云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 404－409.

[6] 张四清, 郑德先, 刘士廉, 等. 8-氯腺苷诱导多种肿瘤细胞凋亡[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(2): 88－89.

[7] Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al*. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5 303): 1 129－1 132.

[8] Miyashita T, Reed J C. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line[J]. Blood, 1993, 81(1): 151－157.

[9] Stocker U, Schaefer A, Marquardt H. DMSO-like rapid decrease in c-myc and c-myb mRNA levels and induction of differentiation in HL-60 cells by the anthracycline antitumor antibiotic aclarubicin[J]. Leukemia, 1995, 9(1): 146－154.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2001)03-0263-01

经验与短篇

大鼠留置心导管术在抗菌抗内毒素多肽研究中的应用

Application of retention cardiac catheter method in the study of antibacterial/ anti-endotoxin peptides

秦孝建, 郑 江, 周 红, 夏培元, 刘晓禄, 肖光夏 （第三军医大学附属西南医院烧伤研究所, 重庆 400038）

抗菌抗内毒素多肽是本室采用计算机技术模拟设计的具有强大的杀灭 G^- 细菌和中和 LPS 的多肽分子[1], 对其体内活性研究过去多组动物各时相点处死的方法缺点是试剂、药品, 尤其是动物用量多, 各时相点组间差异较大, 重复性较差。本研究采用大鼠经颈外静脉留置心导管术进行抗菌抗内毒素多肽体内生物活性的研究, 试图解决过去存在的实验动物方法学问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

LPS(O111:B4)为 Sigma 产品; 抗菌抗内毒素多肽由我室合成, 用生理盐水配制为浓度分别为 1 mg/ml 备用; Wistar 大鼠 80 只, 清洁级, 雌雄各半, 体重 180～220 g, 由附属大坪医院动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 留置心导管术的方法 动物经腹腔 1%戊巴比妥钠 4 mg/ 100 g 体重注射麻醉后, 颈部皮肤经常规备皮、消毒后, 于颈外侧下颌至心脏的中点作一长约 0.5 cm 的横切口, 暴露颈外静脉后行静脉插管, 插管长度按颈部切口至心脏的距离确定, 导管固定后经皮下穿至颈后引出并固定, 管内注射 12 500 u/100 ml 肝素 0.2 ml 抗凝, 采用与导管内径大小的外置 T 形帽插入封闭导管。

1.2.2 留置心导管组大鼠的处理 8 只大鼠随机分为 2 组, 每组 4 只, 称重编号后, 留置心导管; 24 h 后, 于 0 h 经心导管注射抗菌抗内毒素多肽 5 mg/kg 和 LPS 10 mg/kg, 以后不同时相点经心导管采血 1.0 ml, 并于采血后立即补液: 0～4 h 内时相点经心导管注入采血量 1.5 倍的林格氏液, 6～24 h 注入 2 倍量林格氏液。同时做血培养, 以观察术后导管有无感染发生。

1.2.3 传统方法动物的处理 72 只大鼠随机分为对照与治疗 2 组, 每组动物 36 只, 每组每个时相点活杀大鼠 4 只, 取血测定 TNF-α 浓度。

1.2.4 观察指标 观察大鼠留置心导管术对动物一般情况的影响, 并于注药后 0、2、4、6、12、24、48 h 采血测定 TNF-α 浓度。

1.3 统计学处理

采用 *t* 检验进行均数比较。

2 结果

心导管术后动物与未进行手术的大鼠相似, 活动、进食等一般情况良好, 注射药物后各组动物活动明显减少, 不进食。

留置心导管术动物一次可抽血约 0.04～0.05 ml/g 体重, 当抽血至 5 ml 时动物出现燥动, 至 7～8 ml 后变为呆滞不动, 抽血 9～10 ml 时动物出现四肢发白、昏迷, 2～3 min 后若立即回输血液则动物恢复正常。注射药物的动物按传统方法取下腔静脉血, 一次可抽 0.02 ml/g 体重, 较留置心导管术动物取血量约少一半。

感染情况: 在整个实验过程中, 除 72 h 后血培养有细菌生长外(8 只动物有一只出现大肠杆菌感染), 其它血培养均无细菌生长。

基金项目: 国家新药基金资助项目

作者简介: 秦孝建(1957－), 男, 四川省达县人, 主管技师, 主要从事烧伤细菌感染和内毒素拮抗方面的研究, 发表论文 9 篇。电话: (023) 68753780

收稿日期: 2000-06-29; 修回日期: 2000-12-17

（下转 267 页）

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