DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.025

文章编号:1000-5404(2000)01-0057-03

论著

人膀胱癌 BIU-87/ADM 细胞中 Bcl-2 基因的原位表达

王祥卫,杨唐俊,何 斌,金欢胜,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:探讨人膀胱癌多药耐药机制。方法:应用原位杂交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 Bcl-2 基因及其产物的表达进行研究。结果:BIU-87/ADM 细胞 Bcl-2 基因表达呈强阳性(++),BIU-87 细胞呈弱阳性(+)。结论:凋亡抑制基因 Bcl-2 在人膀胱癌多药耐药细胞中的高表达,与人膀胱癌多药耐药的产生有关。

关键词 细胞凋亡;多药耐药;原位杂交
中图法分类号 R394.2;R737.14 文献标识码 A

In situ expression of Bcl-2 gene in human bladder cancer cell line BIU-87/ADM

WANG Xiang-wei, YANG Tang-jun, HE Bin, JIN Huan-sheng, ZEN Yi, LIU Su-ying (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of multidrug resistance in human bladder cancer. Methods: The expression of Bcl-2 gene in cell lines BIU-87/ADM and BIU-87 was detected with *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Results: The expression of Bcl-2 gene was strongly positive in BIU-87/ADM cells but poorly positive in BIU-87 cells. Conclusion: The overexpression of Bcl-2 gene, an apoptotic gene, in BIU-87/ADM cells might contribute to the development of multidrug resistance of human bladder cancer.

Key words apoptosis; multidrug resistance; *in situ* hybridization

耐药是肿瘤化疗失败的主要原因,多药耐药(Multidrug Resistance, MDR)是肿瘤细胞发生耐药的主要形式。深入研究其发生机制,不仅有重要的理论意义,而且有潜在的临床应用价值。目前,细胞凋亡的研究较多,但是,有关细胞凋亡与膀胱癌多药耐药的研究未见报道。因此,本课题试图从细胞凋亡的角度探讨膀胱癌多药耐药的发生机制。

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)。细胞置于含 5%CO_2、37℃、饱和湿度的孵箱中培养,每 3 d 换培养液 1 次;细胞长成单层后,用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。

1.2 试剂

含人 Bcl-2 cDNA 的质粒 pUC19/B_3(简称 pB_3 质粒)由日本大坂大学医学院生物医学研究中心 Tsujimot 教授惠赠。鼠源性抗人 Bcl-2 单克隆抗体 (Bcl-2-100),由 Dr. David Mason(John Radcliffe Hospital, Headington, 英国)惠赠。ABC 试剂盒(华美生物工程公司)。

1.3 原位杂交[1]

1.3.1 Bcl-2 cDNA 探针的合成 将含人 Bcl-2 cDNA 的质粒 pB_3 转化、提取、纯化、限制性酶切分析及回收探针。应用地高辛标记试剂盒进行探针标记。

1.3.2 原位杂交 原位细胞生长片,4%多聚甲醛固定 15 min,0.1 mol/L 盐酸作用 5 min,2.5 mg/L 蛋白酶 K,37℃,作用 15 min,70%甲酰胺/1×SSC,40℃,变性 15 min,冷乙醇梯度脱水。每片滴加 20 μl 杂交液(含变性 cDNA 探针 50 ng,10%甲酰胺,0.5 g/L 鲑鱼精 DNA,2.5× Danhardt 液,10%硫酸葡聚糖,0.05 mol/L DTT,2×SSC),盖硅化盖玻片,37℃孵育 24 h,依次用 2×SSC,1×SSC,0.5×SSC 及 PBS 漂洗,滴加 1∶1 000 Dig-Ab,37℃,30

作者简介:王祥卫(1969.3),男,山东省济南市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事人膀胱癌多药耐药方面的研究,发表论文 4 篇。电话:(023)65208809
收稿日期:1998-12-15;修回日期:1999-09-22

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

min，NBT/BCIP 显色。阴性对照杂交液不加探针。阴性不着色(－)，呈浅蓝色者为弱阳性(＋)，呈深蓝色或深紫色者为强阳性(＋＋)。

1.4 免疫细胞化学

应用 ABC 法。呈棕黄色为 Bcl-2 蛋白阳性，不着色为阴性；同时应用 PBS 代替一抗，作为阴性对照。

2 结果

2.1 Bcl-2 mRNA 的表达

2.1.1 Bcl-2 cDNA 片段的鉴定 含人 Bcl-2 cDNA 的质粒 pB4 转化经 *EcoR*I 酶切，电泳鉴定酶切片段长度为 0.95 kb，见图 1。

2.1.2 原位杂交 BIU-87/ADM 及 BIU-87 细胞内均有 Bcl-2 mDNA 阳性杂交信号，呈现为紫蓝色颗粒状着色，主要见于胞浆，以核周胞浆区更明显。BIU-87/ADM 细胞呈强阳性(＋＋)，BIU-87 细胞呈弱阳性(＋)，见图 2、3。

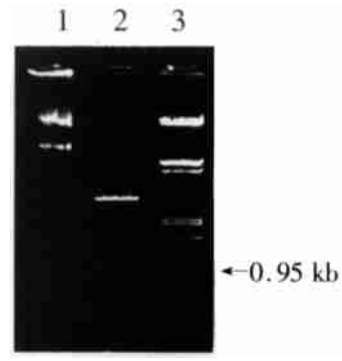


图 1 **Bcl-2 cDNA 酶切片段的鉴定**

1：pB4 质粒； 2：*EcoR*I 酶切质粒；

3：λDNA *EcoR*Ⅴ/*Hind* ⅢMarker

Fig 1 Identification of Bcl-2 cDNA fragment digested by *EcoR*I

1: pB4 plasmid; 2: pB4 plasmid digested by *EcoR*I;

3: λDNA *EcoR*Ⅴ/*Hind* ⅢMarker



图 2 **BIU-87 细胞 Bcl-2 原位杂交结果** (×400)

Fig 2 Results of *in situ* hybridization of Bcl-2 gene in BIU-87 cells (×400)

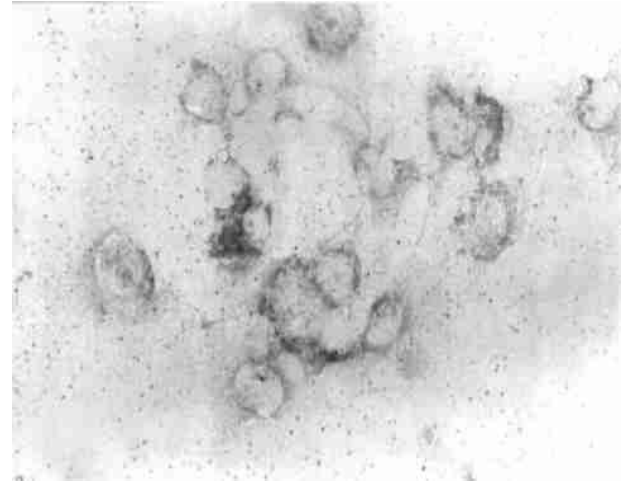


图 3 **BIU-87/ADM 细胞 Bcl-2 原位杂交结果** (×400)

Fig 3 Results of *in situ* hybridization of Bcl-2 gene in BIU-87/ADM cells (×400)

2.2 Bcl-2 蛋白的表达

BIU-87/ADM 及 BIU-87 细胞内均有 Bcl-2 蛋白的表达，Bcl-2 蛋白主要定位于胞浆，核膜亦有表达；耐药细胞 BIU-87/ADM 中 Bcl-2 蛋白表达强阳性(＋＋)，BIU-87 细胞呈弱阳性。

3 讨论

肿瘤细胞的多药耐药(Multidrug resistance，MDR)是临床肿瘤化疗的严重障碍，深入研究其发生机制及其逆转途径具有重要的意义。为此，我们曾应用阿霉素(Adriamycin，ADM)诱导人膀胱癌敏感细胞株 BIU-87，成功地建立了耐药细胞株 BIU-87/ADM[2]，并进行了逆转的实验研究[3]。

随着细胞凋亡研究的深入，人们发现许多化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗癌效应的。细胞凋亡是一种主动的细胞死亡形式，主要表现为形态学变化及 DNA 的断裂。前者包括胞浆固缩、体积变小、胞核致密以及形成凋亡小体；后者主要是由于细胞内核酸内切酶的激活，在核小体之间切断 DNA，形成大量 200 bp 倍数的 DNA 断片，电泳可出现梯形改变。原位 DNA 末端转移酶标记法可检测凋亡细胞，尤其是对早期凋亡细胞的检测敏感性强，结合细胞的形态学变化，特异性较强。我们应用该方法发现阿霉素可诱导人膀胱癌细胞凋亡；我们同时发现：在 BIU-87/ADM 细胞

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

中，细胞凋亡明显受到抑制[4]。由于 BIU-87/ADM 细胞的多药耐药性是应用阿霉素诱导 BIU-87 细胞形成的[2]，提示：BIU-87/ADM 细胞多药耐药现象的形成过程，可能是 BIU-87/ADM 细胞凋亡逐步受到抑制的过程。

目前，已证实 Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要基因，是决定肿瘤预后的重要指标，该基因表达增强能显著抑制细胞凋亡。将该基因转入对化疗敏感的细胞，则能产生抗药性[5]。我们对该基因在 BIU-87/ADM 细胞中的表达进行了研究。原位杂交及免疫细胞化学结果表明：BIU-87/ADM 细胞 Bcl-2 mRNA 表达呈强阳性（++），BIU-87 细胞呈弱阳性（+）。提示：Bcl-2 基因在耐药细胞 BIU-87/ADM 中的高表达是导致其细胞凋亡受抑制的重要原因。目前，对 Bcl-2 抑制细胞凋亡有以下假说：①Bcl-2 抑制细胞凋亡可能与其直接或间接影响内质网中 Ca^{2+} 有关；②Bcl-2 可活化 R-ras，同时 ras 又把 raf 激酶活化（抑制细胞凋亡），从而控制细胞信号传递；③Bcl-2 能阻断过氧化脂类累积而实现其抑制细胞凋亡的作用，同时 Bcl-2 过表达可保护细胞免受自由基损伤；④Bcl-2 过表达抑制了 Bax 的促细胞凋亡，导致细胞凋亡受到抑制[6]。因此，Bcl-2 基因可能通过抑制化疗药物诱导的细胞凋亡，参与了人膀胱癌多药耐药现象的产生。

我们曾检测 BIU-87/ADM 及 BIU-87 细胞中 P-糖蛋白的表达，发现 BIU-87/ADM 细胞中 P-糖蛋白高表达，而 BIU-87 细胞表达阴性，提示：BIU-87/ADM 多药耐药的产生与 P-糖蛋白高表达有关[2]。结合本研究，说明 Bcl-2 蛋白与 P-糖蛋白均表达于多药耐药的 BIU-87/ADM 细胞中。这就产生了一个疑问，Bcl-2 蛋白与 P-糖蛋白在功能上是否存在着相互影响。有关两者的研究未见报道，有待进一步探讨。

参考文献

[1] 蔡文琴，王伯[illegible]．实用免疫细胞化学和核酸分子杂交技术[M]．成都：四川科学技术出版社，1995．406－430．
[2] 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．
[3] 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．
[4] 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．
[5] Miyashite T，Reed J C．Bcl-2 gene transfer increase relative resistance of X49．1 and WEHI 7．2 lymphoid cells to death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs[J]．Cancer Res，1992，52(19)：5407－5411．
[6] 王　雪．细胞凋亡及其调控机制[J]．国外医学：肿瘤学分册，1997，24(增刊)：63－65．

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2000)01-0059-01

经验与短篇

择时吸氧对冠心病疗效的影响

Effect of oxygen therapy at different times on coronary heart

王叶丽　（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所心血管内科，重庆 400042）

冠心病的基本病理生理是心肌供血不足，心肌缺氧。氧疗可以提高血氧饱和度，保证心脏的氧需求，减轻心肌损伤，缓解心绞痛，减少心律失常。但是不同吸氧方式，对冠心病的治疗效果有何影响呢？本研究对这一方面进行探讨。

1　对象和方法

1.1　研究对象

根据 WHO 标准确诊的冠心病稳定型心绞痛[1] 120 名。其中男 80 名，女 40 名，年龄 42～65(56.7±3.5)岁。

作者简介：王叶丽(1964.4)，女，山西省人，主管护师，主要从事冠心病的临床护理方面的研究，发表论文 7 篇。　电话：(023)68757246

收稿日期：1999-06-11；修回日期：1999-11-22

1.2　方法

选择的患者药物治疗方案一致，均采用消心痛、恬尔心、美多心安治疗按住院顺序编号，分为：①高压氧疗组：每次 2.5 h，10 d 1 次。②指定吸氧组：在每日三餐前、大便前、睡眠前给予低流量(2～3 L/min)吸氧 30 min。③随意吸氧组：患者可根据自己的意愿随便低流量吸氧。④对照组(不吸氧组)。疗程为 30 d。以上各组心律失常(房早、室早、短阵心动过速等)发生的例数分别为 48、48、47、45。

1.3　观察指标及统计学处理

观察每组 30 例患者中，心绞痛消失，心绞痛改善，心电图 T 波恢复正常，S-T 段恢复正常，心律失常消失的例数。然后应用 χ^2 检验，进行统计学处理。

（下转 67 页）

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