DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.023
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0053-04

论著

核酶对膀胱癌细胞系多药耐药性的逆转研究

何 斌[1],金锡御[2],杨唐俊[1],金欢胜[1],王祥卫[1],刘素英[1],曾 毅[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037;[2]附属西南医院泌尿外科,重庆 400038)

提 要 目的:探讨核酶对膀胱癌多药耐药性的逆转效应。方法:设计针对 mdr1 mRNA 1959位 GUC 的"锤头状"(Hammerhead)核酶(Ribozyme1, RZ1)基因,定点克隆于逆转录病毒载体 pLXSN 的 *BamH* I 和 *EcoR* I 位点上,重组出带有核酶基因的逆转录病毒质粒 pLXSN-RZ1。应用脂质体 DoTap 将 pLXSN-RZ1 导入到耐药的人膀胱癌细胞系 BHA-60 细胞中。结果:导入 pLXSN-RZ1 的细胞系耐药性显著降低,RT-PCR 结果显示,细胞内 mdr1 mRNA 显著减少。结论:本研究中设计的核酶能明显逆转膀胱癌细胞系多药耐药性。

关键词 核酶;多药耐药;肿瘤
中图法分类号 R73-361;R737.14 文献标识码 A

Reversal of multi-drug resistance of bladder cancer cell line with hammerhead ribozyme

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

Abstract Objective: To explore the effects of ribozyme on the reversal of multi-drug resistance of bladder cancer. Methods: A hammerhead ribozyme designed to cleave the GUC sequence at codon 1959 of mdr1 mRNA was recombined to retroviral vector pLXSN named as pLXSN-RZ1. The recombinant retroviral vector pLXSN-RZ1 was transfected into the multi-drug resistant bladder cancer cell line BHA-60 with liposome DoTap. Results: The transfected cell line showed significant decline of mdr1 mRNA level as revealed by RT-PCR and decrease of multi-drug resistance. Conclusion: The designed ribozyme is an effective tool for multi-drug resistance reversal of bladder cancer.

Key words ribozyme; multi-drug resistance; tumor

肿瘤细胞的多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)是影响肿瘤化疗效果的重要因素,我们曾应用体外转录 mdr1 mRNA 的方法证明核酶能切割 mdr1 mRNA[1],但是,由于细胞内 mdr1 mRNA 较体外转录的 mdr1 mRNA 长,结构也复杂得多,尚不能肯定所设计的核酶也能在细胞内切割 mdr1 mRNA,所以,我们将带有核酶(RZ1)基因的重组逆转录病毒质粒导入到耐药的人膀胱癌细胞系 BHA-60 细胞中,检测所设计的核酶能否在细胞内切割 mdr1 mRNA,观察它们对 MDR 的逆转效应。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670824)
作者简介:何 斌(1964-3),男,安徽省贵池市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事膀胱癌的基因治疗方面的研究 发表论文17篇。电话:(023)68755624
收稿日期:1999-03-15;修回日期:1999-09-07

1 材料和方法

1.1 细胞模型的建立

1.1.1 BIU-87 人膀胱癌移行上皮细胞系,引自北京医科大学泌尿外科研究所[2]。该细胞取材前及建株过程未接触任何抗癌药物。

1.1.2 BHA-60 细胞 为本实验室应用转基因方法建立的多药耐药细胞系[3]。

1.2 主要试剂

质粒 pLXSN:美国 Miller 教授惠赠,为逆转录病毒载体,在其多克隆位点上游含 5′-LTR,在其多克隆位点下游含 SV-40 启动子和 Neo 基因。脂质体(DoTap)、TriPure™ RNA 提取试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。G418:美国 Gibercol BRL 公司产品,用 20 mmol/L 的 HEPES 稀释成 100 μg/ml,0.2 μm 过滤器过滤除菌,分装后保存于-20℃备用。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 细胞置于 37℃,饱和湿度,含 5%CO_2 的

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

孵箱中培养，培养液为含有 10%新生小牛血清的 RPMI 1640。

1.3.2 核酶逆转录病毒载体的构建 根据计算机模拟 mdr1 mRNA 二级结构，设计并合成核酶基因。质粒 pLXSN 经 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切，在 T4 DNA 连接酶作用下完成连接反应，导入 JM109 大肠杆菌，筛选出重组克隆。

1.3.3 重组逆转录病毒质粒 pLXSN-RZ1 对耐药细胞BHA-60的转染 按 DoTap 说明书操作。加入 G418(终浓度为 800 μg/ml)选择培养，定期更换新鲜培养液，共选择培养 14～16 d，长出肉眼可见克隆。该细胞系命名为 BHA-RZ1。

1.3.4 细胞对药物(阿霉素 ADM、秋水仙素 COL)半数抑制量(IC_{50})的测定 按文献[4]报道用 MTT 法测定。

$$细胞生长抑制率=\frac{对照孔\ D_A\ 值-加药孔\ D_A\ 值}{对照孔\ D_A\ 值}\times 100\%$$

$$Lg IC_{50}=\sum (X_i+X_{i+1})(P_{i+1}-P_i)/2$$

i 为组号，X_i+X_{i+1}为相邻两组对数剂量之和，$P_{i+1}-P_i$ 为相邻两组抑制率之差。

1.3.5 RT-PCR 检测细胞内 mdr1 mRNA 的表达量 按文献[5]进行。

1.4 统计学处理

取 5 次试验的平均值，所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两个样本比较用 t 检验。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒载体 pLXSN-RZ1 的酶切鉴定

RZ1 基因与 pLXSN 载体连接混合物，常规 CaCl₂ 方法导入大肠杆菌 JM109，得到 2 个转化子，提取质粒。经 *BamH* I 和 *EcoR* I 各酶切 6 h，然后加入等体积的甲酰胺，55 ℃× 5 min，8% PAGE-8M 尿素，电泳结果见图 1。双酶切后的片段长度为 48 bp。该逆转录病毒载体命名为 pLXSN-RZ1。

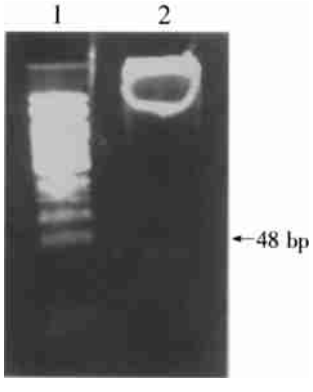


图 1 重组逆转录质粒 **pLXSN-RZ1** 的酶切分析(8%-PAGE)

Fig 1 Restrictive digestion analysis of pLXSN-RZ1

1 :pLXSN-RZ1+*BamH* I+*EcoR* I

2 :pGEM-7Zf(+)/*Hae* III marker

2.2 重组逆转录病毒质粒 pLXSN-RZ1 对 BHA-60 细胞的转染

加入 DoTap 及 DNA 混合液孵育后，未见细胞内出现异常颗粒或空泡化。加入 G418 后第 2 天即出现大量细胞死亡，第 7 天可见个别区域细胞呈岛状生长，细胞岛处细胞呈增生象，第 11 天散在的细胞几乎全部死亡(对照组细胞也全部死亡)，细胞岛处细胞密度进一步增高。第 14 天时 G418 减少为 600 μg/ml，继续维持 2 d，然后 G418 减少为 400 μg/ml，维持 1 d 后停用，说明 pLXSN-RZ1 已转染到 BHA-60 细胞内，该细胞命名为 BHA-RZ1。

2.3 细胞系多药耐药性的测定

2.3.1 细胞对 ADM 的半数抑制量(IC_{50}) 图 2 显示各细胞对 ADM 的 IC_{50}值。BHA-RZ1 与 BHA-60 细胞比较显著下降($P<0.05$)，但高于 BIU-87 细胞的 IC_{50}值。

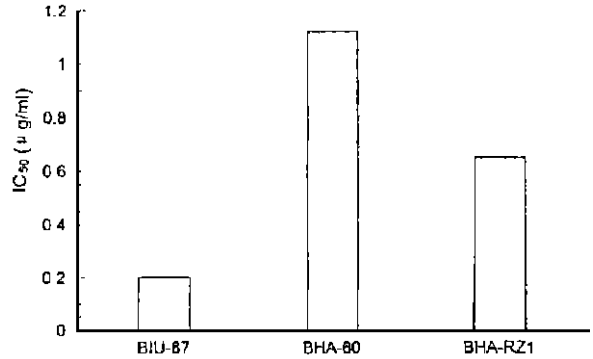


图 2 细胞对 **ADM** 的 **IC_{50}**值

Fig 2 Value of cell IC_{50} to ADM

2.3.2 细胞对 COL 的半数抑制量(IC_{50}) 图 3 显示各细胞对 COL 的 IC_{50}值，BHA-60 是 BIU-87 细胞的 5.3 倍($P<0.01$)，BHA-RZ1 较 BHA-60 细胞显著下降($P<0.01$)。

2.4 RT-PCR 检测细胞内 mdr1 mRNA 表达

图 4 显示不同细胞在相同条件下 RT-PCR 的结果，β-actin 作为内对照，在总 RNA 相同量的条件下 β-actin 的扩增条带基本相同(长度为 587 bp)，mdr1 157 bp 条带出现明显差异，以 BHA-60 细胞扩增条带最为明显，BHA-RZ1 的扩增条带较 BHA-60 细胞弱。

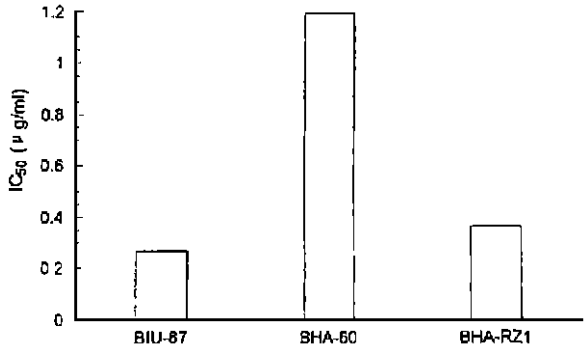


图 3 细胞对 **COL** 的 **IC_{50}**值

Fig 3 Value of cell IC_{50} to COL

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

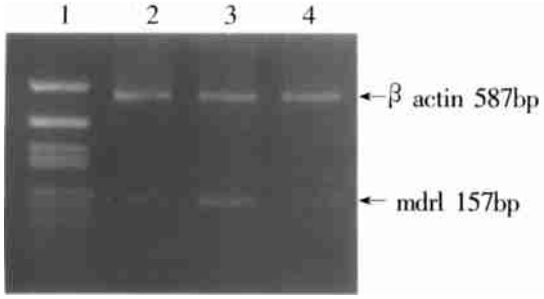


图 4　不同细胞 RT-PCR 结果(2%琼脂糖凝胶)

Fig 4　Agarose gel analysis of RT-PCR products for mdrl mRNA

1: pGEM-7zf(+)/*Hae* Ⅲ marker
2: BIU-87 cells
3: BHA-60 cells
4: BHA-RZ1 cells

3　讨论

MDR 的发生机制较多，目前认为 P-GP 是形成 MDR 的最主要机制。因此,有关 MDR 的逆转研究也主要集中于对这一机制上。最早人们试图用药物来逆转 MDR, Tsuruo[6] 用非细胞抑制剂量的异博定(Verapemil, VPL)能明显降低肿瘤细胞对长春新碱(Vincristine, VCR)的耐药性。尽管很多药物都有不同程度的逆转 MDR 作用,但是这些药物均只是在较高浓度条件下才能发挥作用,由于毒副作用,临床上不可能达到如此高的血药浓度,使应用药物逆转 MDR 受到限制。随着 P-GP 机制的进一步明确以及 mdr1 基因的成功克隆,使得用转基因方法逆转 MDR 成为可能。Elsa 等[7] 报道,化疗药物 Rhadamine123(R-123)在正常人肾系膜细胞(Human mersangial cell, HMC)中的半衰期为(25±3) s,将人工合成的 mdr1 mRNA 反义寡核苷酸(aODN) 20 μg/ml 与 HMC 共同孵育 3 d, R-123 在 HMC 中的半衰期延长达(304±53) s, aODN 显著地减少了 P-GP 在细胞膜上的表达量。

近年来,核酶用于基因治疗已取得很大进展,特别是在 AIDS 研究中的成果更是让人们对基因治疗的前景充满信心。核酶用于 MDR 的逆转研究近年来才有报道。Kobayashi[8] 合成两个核酶基因,分别切割 mdr1 mRNA 196 位和 179 位密码子,将切割 mdr1 mRNA 196 位密码子的核酶构建于 pHβ APr-1 neo 载体上,电穿孔法导入到耐药的人急性淋巴母细胞白血病细胞系(Human acute lymphoblastic leukemia cell line) MOLT-3/TMQ800 中,转染核酶后 MOLT-3/TMQ800 对 VCR 的耐药性由原来的 700 倍(与其母细胞 MOLT-3 比较)下降至 20~30 倍。我们应用体外转录 mdr1 mRNA 等方法也证明,在无细胞环境下,本实验室设计的针对 mdr1 mRNA 1959 位 GUC 的 RZ1 对 mdr1 mRNA 的切割达 90%[1]。本研究进一步将 RZ1 基因构建于逆转逆转录病毒载体上,然后再导入到 MDR 细胞系 BHA-60 中,多药耐药性测定结果表明 RZ1 能显著逆转 BHA-60 细胞的耐药性。RT-PCR 结果也显示,导入 RZ1 基因的细胞 mdr1 mRNA 水平较母细胞 BHA-60 细胞低,说明本研究中所构建的核酶基因能明显逆转膀胱癌细胞系的 MDR。

但是,本研究所构建的核酶的逆转作用并不完全,我们认为可能与下列因素有关:①核酶与 mdr1 mRNA 比例不平衡。体外切割实验表明核酶与靶 RNA 比例是影响核酶切割活性的因素之一[9], mdr1 mRNA 在 BHA-60 细胞中处于高表达状态,而直接用脂质体导入的核酶基因受限制,细胞内表达的核酶不足以完全切割 mdr1 mRNA,因而转染核酶基因后的细胞仍具有一定的耐药性[10]。②细胞内 mdr1 mRNA 二、三级结构的变化影响核酶与靶 RNA 的结合,导致核酶活性下降。因此,如何更有效地应用核酶达到完全逆转 MDR 的作用,尚有待于进一步探讨。

参考文献

[1] 何　斌,金锡御,杨唐俊,等 . 核酶对 mdr1 mRNA 的体外切割[J] . 中华泌尿外科杂志, 1998, 19(4): 195—198.

[2] 俞莉章,黄雅丽,顾方六,等 . 人膀胱癌细胞系 BIU87 的建立及其生物学特征[J] . 中华泌尿外科杂志, 1989, 10(3): 131—133.

[3] 何　斌,金锡御,杨唐俊,等 . 转基因方法建立一种新的多药耐药细胞系[J] . 中华泌尿外科杂志, 1999, 20(7): 403—405.

[4] 陈　鹏, 刘叙仪,赫 复生 . 耐顺铂人肺腺癌细胞系 A549/cDDP 的建立及耐药机制[J] . 中国肿瘤临床, 1995, 22(8): 582—587.

[5] Noonan K E, Beck D, Holzmayer T A. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18) :7 160—7 164.

[6] Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, *et al*. Overcoming of VCR resistance in P338 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of VCR and VDS by VPL[J] . Cancer Res, 1981, 41(5) :1 967—1 972.

[7] Elsa B R, Ernest S. Expression and function of P-glycoprotein in human mesangial cells[J] . Am J Physiol, 1994, 267(5) : C1 351—1 358.

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

[8] Kobayashi H, Dorai T, Holland J F, *et al*. Reversals of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1(PGY1) ribozyme[J]. Cancer Res, 1994, 54(5):1 271—1 275.

[9] Bertrand E, Pictet R, Grange T, *et al*. Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function[J]? Nucleic Acids Res, 1994, 22(3):293—300.

[10] Scanlon K J, Ishida H, Kashani-Sabet M. Ribozyme-mediated reversal of the multidrug-resistant phenotype(drug resistance/ovarian carcinoma)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(23):11 123—11 127.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号:1000-5404(2000)01-0056-01

糜蛋白酶直流电导入治疗慢性声带水肿的疗效观察

Effect of importing chymotrypsin by direct current on treating chronic edema of vocal cord

吴 涛[1],程雪云[1],姬长友[2] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]理疗科;[2]耳鼻咽喉科:重庆 400042)

我们采用糜蛋白酶直流电导入治疗慢性声带水肿42例,取得了较好的效果,报道如下。

1 临床资料与方法

42例病人中,男17例,女25例。年龄最小者14岁,最大者61岁。病程最短者1.5月,最长者23年。个体从业者14例,教师12例,干部12例,其他职业14例。双侧声带水肿29例,其中弥漫性水肿8例,局限性水肿21例;单侧声带水肿13例,均为局限性水肿。多数病人均经中西药物及其他方法治疗无效,又不能坚持声休或不适合手术治疗者。

取上海生物化学制药厂生产的糜蛋白酶注射液5 mg,将其溶于pH 7.2~8.4的1%碳酸氢钠缓冲液7 ml,使用时临时配制。直流电导入法常规操作,用72 cm^2衬垫,内层放入两层浸有配制好的糜蛋白酶溶液的纱布,贴敷在颈前以喉结为中心的皮肤上与阴极相连为主极;辅极以96 cm^2衬垫置于颈后与阳极相连。电流强度6~12 mA,每天1次,每次20 min。根据时律生物学原理,治疗尽量选在上午进行。10次为1疗程。治疗前后由专人用间接喉镜、电子闪光喉镜或纤维喉镜检查观察。

疗效判定:①痊愈:声功能恢复,声带水肿消失。②显效:声功能基本恢复,声带水肿基本吸收。③有效:声功能改善,声带水肿部分吸收。④无效:声功能及声带水肿与治疗前无变化。

2 结果

部分病人治疗后表面可有散在点状突起,微痒,治疗结束后5~7 d自行消失。痊愈19例(45.3%);显效14例(33.3%);有效9例(21.4%);总有效率为100%。42例中随访最长4年,最短5个月,1年以上者36例,5个月至1年6例。其中6例声带水肿复发,但比治疗前轻。5例呈息肉样变,手术治疗后已痊愈。

3 讨论

糜蛋白酶直流电导入治疗慢性声带水肿的作用原理是依据糜蛋白酶溶于弱碱性缓冲液中,由直流的阴极导入组织后与病变区带正电荷的作用物部分相互作用而起催化作用,使作用区组织变性,蛋白分解为多肽或氨基酸,从而达到解聚以改善作用区组织的功能,使其减轻致密度,增强组织通透性,改善微循环,因而有利于消炎及水肿消退[1]。

在物理治疗中,也存在着"生物钟"现象[2],即治疗时间如果与机体生物节律相结合,在最佳时刻进行治疗,就可取得最佳疗效。所以,我们采用糜蛋白酶直流电导入的时间尽可能在上午进行治疗。

慢性声带水肿常见于演员、教师及一切以噪音为职业的工作者,近期个体从业者发病率上升。多同体质因素,变态反应,用声过度,声带运动疲劳及全身健康状况有关。当前治疗方法虽多,但效果欠佳。糜蛋白酶直流电导入治疗声带水肿是一种较好的治疗方法,无创,无痛,经济,简便,不失为一种较为理想的治疗方法。

关键词 声带水肿;糜蛋白酶;直流电导入
中图法分类号 R767.12 文献标识码 B

参考文献

[1] 王淑英译. 酶制剂导入的某些看法[J]. 中华理疗杂志, 1980,(2):119—120.

[2] 陈瑞珠. 直流电药物导入时刻的优选观察[J]. 中华理疗杂志, 1987,(3):138—140.

(编辑 张大春)

作者简介:吴 涛(1955.5),女,四川省岳池县人,主管护师,发表论文1篇。电话:(023)68757346

收稿日期:1998-11-07;修回日期:1999-06-02

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