DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.015

阿霉素诱导人膀胱癌多重抗药性细胞凋亡的研究

王祥卫* 杨唐俊 汪泽厚 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: 研究阿霉素诱导的细胞凋亡,探讨人膀胱癌多重抗药性机制。方法: 用噻唑蓝 (MTT)法、光镜及电镜、DNA凝胶电泳和原位 DNA末端转移酶标记法,分别对耐药细胞株 BIU-87/ADM及敏感细胞株 BIU-87细胞进行了阿霉素诱导的细胞凋亡研究。结果: BIU-87/ADM细胞存活率明显高于 BIU-87细胞,光镜及电镜观察到凋亡细胞形态学改变,凋亡细胞 DNA凝胶电泳出现 DNA断片,但并无典型的梯形 (Ladder)改变, BIU-87细胞原位 DNA末端转移酶标记阳性率高于 BIU-87/ADM细胞。结论: ① 阿霉素可诱导人膀胱癌细胞凋亡,而且具有明显的剂量和时间效应。② 在相同条件下,与敏感细胞株 BIU-87相比,耐药细胞株 BIU-87/ADM中细胞凋亡明显受到抑制。③ 细胞凋亡对人膀胱癌多重抗药性的产生具有重要的意义。

关键词 多重抗药性;细胞凋亡;原位 DNA末端转移酶标记法
中图法分类号 R73-361

肿瘤细胞的多重抗药性 (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逆转途径具有重要的意义。我们应用阿霉素大剂量冲击结合低浓度诱导敏感细胞 BIU-87,已成功地建立了耐药细胞株 BIU-87/ADM[1],并进行了逆转的实验研究[2]。本研究应用原位 DNA末端转移酶标记法,分别对耐药细胞株 BIU-87/ADM及敏感细胞株 BIU-87中阿霉素诱导的细胞死亡形式进行了研究。

1 材料和方法

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。该细胞在取材前及建株过程中未接触任何抗癌药物。耐药细胞株 BIU-87/ADM由我室采用阿霉素大剂量冲击结合低浓度诱导敏感细胞 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天换液 1次。细胞融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

1.2 试剂

阿霉素 (Farmitalia,意大利)、MTT(噻唑蓝, Sigma生产)、原位 DNA末端转移酶标记试剂盒购自德国宝灵曼公司。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞毒性测定 采用 MTT法[3]。应用 DG-3022A酶联仪测定样品吸光度 (D_x)值 (570 nm),计算细胞存活率。

1.3.2 细胞形态学改变 台盼蓝拒染确定细胞的完整性;光镜及透射电镜观察凋亡细胞的形态学改变。

1.3.3 DNA断裂的检测 应用原位 DNA末端转移酶标记法 (*In situ* DNA nick end labeling, TUNEL)[4]。细胞生长片原位冷丙酮固定 10 min, PBS漂洗 5 min×3, 20 mg/L蛋白酶 K消化 30 min, PBS漂洗 5 min×3,甲醇、过氧化氢 (0.03%) 15 min, PBS漂洗 5 min×3,滴加 DNA末端转移酶及 FITC标记 dUTP, 37℃湿盒内孵育 1 h; PBS漂洗 5 min×3,滴加 HRP(辣根过氧化物酶)标记的抗 FITC抗体, 37℃湿盒内保温 1 h; DAB暗处显色 5 min,终止显色,脱水、封固,镜下观察、摄像。阳性细胞为胞核呈棕黄色,不着色为阴性。同时应用 PBS代替 DNA末端转移酶,作为阴性对照。

1.3.4 细胞凋亡指数 (Apoptotic index, AI) 每张玻片选取 5个阳性着色最明显的视野 (×400),计数 500个细胞中的阳性百分率。

1.3.5 DNA凝胶电泳[5] 分别收集不同浓度阿霉素作用的 BIU-87及 BIU-87/ADM细胞, PBS缓冲液冲洗 2遍,培养瓶中加入 1 ml细胞裂解液 (pH8.0, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCL 10 mmol/L, SDS 0.5%,蛋白酶 K 0.15 g/L), 50℃反应 3 h,酚/氯仿抽提,离心取上清,加入 1/10体积的 NaAc 0.01 mol/L $MgCl_2$,再加入等体积的无水乙醇沉淀过夜,离心沉淀 DNA, 75% 乙醇清洗, TE液重悬 DNA,加入 RNAase达到 200 mg/L (贮存液 10 mg/L),重新提取和沉淀 DNA。DNA沉淀溶解于 20 μl TE液 (pH8.0)中, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察、摄影。

1.4 统计方法

取 3次试验的平均值,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本率比较用 t检验。

2 结果

2.1 细胞存活率

应用 MTT法测定了相同时间内 (72 h)不同浓度的阿霉素对 BIU-87及 BIU-87/ADM细胞存活率的影响,见图 1,分别用阿霉素 0.1 mg/L和 1 mg/L作用 72 h, BIU-87细胞存活率分别下降为 65.28% 及 19.38%;而 BIU-87/ADM细胞存活率则为 93.95% 及 29.93% 两株细胞比较差异显著 ($P < 0.01$)。

* 王祥卫,男, 28岁,住院医师,硕士研究生

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

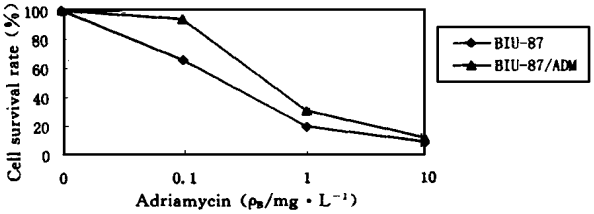


图 1　BIU-87/ADM和 BIU-87细胞生存率的比较
Fig 1　Cell survival rate to adriamycin in BIU-87 and BIU-87/ADM cells

2.2　凋亡细胞的形态学改变

相差显微镜下观察发现: BIU-87细胞经 0.1 mg/L阿霉素作用 6 h,细胞体积缩小、胞浆固缩、胞核变小,胞膜完整;而 BIU-87/ADM细胞改变明显。电镜显示: BIU-87细胞表面微绒毛消失、细胞核沿核膜内侧边缘固缩,部分细胞核膜消失,核染色质聚集。而 BIU-87/ADM细胞在 0.1 mg/L阿霉素作用下,未出现上述改变。只有在阿霉素浓度增加到 1 mg/L,始出现上述细胞凋亡改变,随阿霉素作用时间的延长(24 h)及剂量的增加(阿霉素为 10 mg/L),上述改变明显加重,并出现核碎裂、胞膜完整性的破坏。

2.3　细胞凋亡指数(AI)

图 2显示出 BIU-87及 BIU-87/ADM细胞在不同的阿霉素药物浓度作用(48 h)后,所诱导的凋亡细胞与阿霉素有明显的剂量依赖关系;而且在阿霉素作用的 2、12、24,两者的 AI差异显著($P < 0.01$)。

图 3显示了 1 mg/L阿霉素分别作用于 BIU-87及 BIU-87/ADM细胞不同时间所诱导的细胞凋亡指数。说明阿霉素诱导的细胞凋亡有明显的时间效应,而且在阿霉素作用的 2、12、24 h,两者的 AI差异显著($P < 0.01$)。

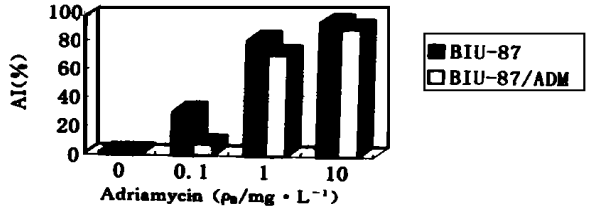


图 2　不同浓度阿霉素诱导的细胞凋亡指数(AI)
Fig 2　Apoptotic index(AI) induced by adriamycin at different concentrations

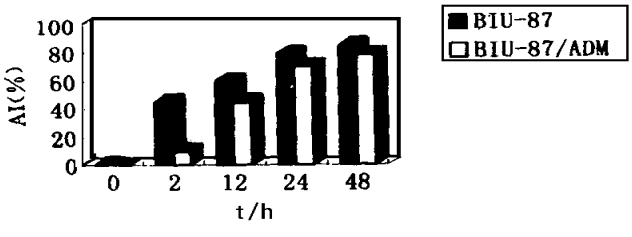


图 3　1 mg/L阿霉素诱导的细胞凋亡指数(AI)
Fig 3　Apoptotic index(AI) induced by 1 mg/L adriamycin

2.4　DNA电泳

0.1 mg/L阿霉素作用于 BIU-87细胞 48 h即出现 DNA断片,阿霉素为 1 mg/L及 10 mg/L,上述改变明显。而 BIU-87/ADM细胞只有在 1 mg/L及 10 mg/L阿霉素作用下,始有 DNA改变出现,见图 4、5。

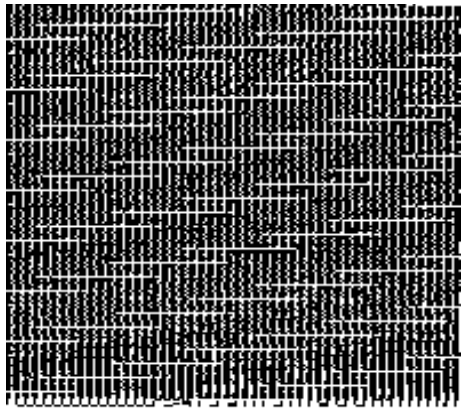


图 4　BIU-87细胞总 DNA电泳结果
Fig 4　Gel electrophoresis of BIU-87 cells total DNA

1. Marker: λDNA/EcoRI+ Hinder Ⅲ　2. 10 mg/L adriamycin for 48 h　3. 1 mg/Ladriamycin for 48 h　4. 0.1 mg/L adriamycin for 48 h　5. Total DNA of untreated BIU-87 cells

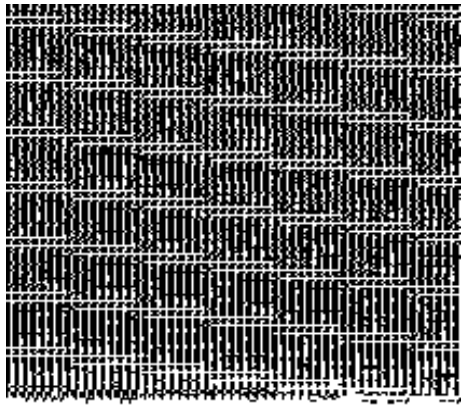


图 5　BIU-87/ADM细胞总 DNA电泳结果
Fig 5　Gel electrophoresis of BIU-87/ADM cells total DNA

1. 10 mg/L adriamycin for 48 h　2. 1 mg/L adriamycin for 48 h　3. Marker: λDNA/EcoRI+ Hinder Ⅲ　4. 0.1 mg/L adriamycin for 48 h

3　讨论

近年来,有关多重抗药性的发生机制研究较多,主

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

要有: mdr1基因表达增强;拓扑异构酶Ⅱ (TopoⅡ)含量及活性下降;细胞内谷胱甘肽硫转移酶增多,细胞解毒功能增强等[5]。鉴于上述机制大多只能解释部分肿瘤细胞多重抗药性的产生,本研究则试图从细胞凋亡的角度探讨膀胱癌多重抗药性的发生机制。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(DNA Ladder),但并非所有的凋亡细胞均有 DNA 梯形改变[6]。

结果发现:① 阿霉素可诱导人膀胱癌细胞凋亡,且具有明显的剂量和时间效应。② 在相同条件下,与敏感细胞株 BIU-87相比,耐药细胞株 BIU-87/ADM 中细胞凋亡明显受到抑制。DNA 凝胶电泳出现 DNA 断片,但并无典型的 DNA Ladder。据 Dong[7]等报道淋巴瘤来源的细胞系(B细胞和 T细胞)凋亡出现典型的 DNA Ladder,而上皮细胞系(Hela和 AA8)发生细胞凋亡后,其 DNA 凝胶电泳无典型的 DNA 梯形改变,而是出现 DNA 涂片样改变(Smearing)。原因在于激活细胞的 Ca^{2+}、Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶,从而产生典型的 DNA Ladder是非必需的,认为凋亡的上皮细胞 DNA 电泳改变不同于其它细胞类型。Hagimoto 等[8]在观察肺损伤上皮细胞凋亡的研究中亦发现凋亡细胞 DNA 电泳出现 DNA Smearing改变,而无典型的 DNA Ladder。DNA 电泳对早期细胞凋亡的观察价值不大,因为只有在凋亡细胞达到一定数量才能检出 DNA 改变,而且无法定位,仅能定性。作者应用原位 DNA 末端转移酶标记法可将 FITC标记的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)掺入到 DNA 断片的 3′羟基末端,可以检测凋亡细胞。该方法定位准确,亦可定量检测凋亡细胞,尤其是对早期凋亡细胞的检测阳性率高,敏感性强,结合细胞的形态学变化,特异性较强。TUNEL 阳性细胞胞核黄染,提示 DNA 的断裂,并见核固缩,胞浆不着色。比较同样条件下阿霉素诱导的敏感细胞株 BIU-87及耐药细胞株 BIU-87/ADM 的凋亡指数(AI)发现:后者的 AI明显低于前者。提示:细胞凋亡在耐药细胞株 BIU-87/ADM 中明显受到抑制。

阿霉素是蒽环类抗生素的一种,属于拓扑异构酶Ⅱ抑制剂。阿霉素可抑制拓扑异构酶Ⅱ的催化作用,与拓扑异构酶Ⅱ-DNA 形成拓扑异构酶Ⅱ-DNA 药物共价复合物,抑制 DNA 断点的重接,造成 DNA 不可逆的断裂[9]。本研究发现,阿霉素是通过诱导人膀胱癌细胞凋亡来发挥抗癌效应的,其作用有明显的剂量及时间效应。由此推测阿霉素造成的 DNA 不可逆的断裂可能是诱发细胞凋亡的重要契机。而且,我们发现在 BIU-87/ADM 细胞中,细胞凋亡明显受到抑制。BIU-87/ADM 细胞的多重抗药性是应用阿霉素诱导形成的,本研究已证实阿霉素可诱导 BIU-87细胞凋亡,推测 BIU-87/ADM 细胞多重抗药性的形成过程可能是 BIU-87/ADM 细胞凋亡逐步受到抑制的过程。BIU-87/ADM 细胞凋亡明显受到抑制,是否与某些凋亡相关基因的表达发生改变有关尚有待进一步研究。

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.中华泌尿外科杂志,1996;17(9):527

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.中华泌尿外科杂志,1997;18(5):278

3 Sargent J M, Taylor C G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia. Br J Cancer, 1989; 60: 206

4 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. T Cell Biol, 1992; 119: 403

5 Kamesaki S, Kamesala H, Jorgensea T J. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects or events subsequent to topoisomeraseⅡ-induced DNA strand breaks and their repair. Cancer Res, 1993; 53: 4251

6 Arends M J, Morris R G, Smith A L. Apoptosis: the role of the endonuclease. Am J Pathol, 1990; 136: 593

7 Dong X Y, Schimke R T. Bcl-2 expression delays drug induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in hela cells. Cancer Res, 1995; 55: 4922

8 Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997; 16: 91

9 Kaufman S. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin and other anticancer drugs: a cautionary note. Cancer Res, 1989; 49: 5870

(收稿:1997-11-15;修回:1998-03-18)

(编辑 仇玉福)

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

Induction of apoptosis by adriamycin in multi-drug resistant human bladder cancer cell lines

Wang Xiangwei, Yang Tangjun, Wang Zehou, He Bin, Jin Huansheng, Zen Yi, Liu Suying (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To study the induction of apoptosis and explore the mechanism of multi-drug resistance of human bladder cancer. Methods: MTT assay, optical microscopy, electron microscopy, DNA agarose gel electrophoresis and *in situ* DNA nick end labeling were used to detect the apoptosis in BIU-87/ADM and BIU-87 cells. Results: Cell survival rate was significantly higher in BIU-87/ADM cells than in BIU-87 cells. Classical apoptotic morphological changes were found in both cell lines and DNA fragmentation was shown by agarose gel electrophoresis. Apoptotic index detected by *in situ* DNA nick end labeling was higher in BIU-87 cells than in BIU-87/ADM cells. Conclusion: ① In both cell strains, apoptosis is induced by adriamycin in a dose- and time-dependent manner. ② Apoptosis is apparently inhibited in BIU-87/ADM cells as compared to BIU-87 cells. ③ Apoptosis may play an important role in the development of multi-drug resistant human bladder cancer.

Key words multi-resistance; apoptosis; *in situ* DNA nick end labeling

静脉留置针在肝硬化腹水引流中的应用

Retaining needle of the vein for drainage of ascites due to cirrhosis

张晓荣* (第三军医大学附属大坪医院消化内科) 重庆, 400042

腹腔穿刺排液是一种古老的治疗腹水的方法[1]。以往腹腔穿刺均用金属针头接橡皮管进行引流,不易固定,术者操作麻烦,且需多次穿刺,增加患者痛苦及医源感染的机会。我科自1995年以来,对32例肝硬化顽固性腹水患者,采用静脉留置针头进行腹腔穿刺,取得较好效果,现将操作方法介绍如下。

1 一般资料

本组32例中,男性28例,女性4例,年龄25~70岁。均选用德国贝朗公司产一次性浅静脉留置针(内径1.2 mm/18 GOD,长45 mm)。

穿刺部位选择及方法:嘱患者排空尿液,取半卧位,背部垫橡皮巾。向患者讲解配合方法,嘱其均匀呼吸;穿刺点多选在左侧,脐与髂前上棘连线的内2/3与外上1/3交界处[2]。常规皮肤消毒,术者戴无菌手套,铺无菌巾,直接取留置针接空针。抽取麻药行局部麻醉达腹膜壁层,待进入腹腔,回抽注射器可抽出腹水后,左手固定套针,取掉空针,抽出针芯,留置套管柄接1次性引流袋,胶布固定好套针柄,进针处覆盖无菌纱布;调节引流速度,放液不易过快,1次性放液量不易过多,不超过3000 ml[3]。注意观察患者面色、血压、脉搏、呼吸变化。放液完毕后,消毒针柄及连接处,取掉引流袋,用肝素帽封口,无菌纱布包扎连口固定。可定时放腹水。本组32例患者,留置套管时间最长12 d,最短3 d。

2 讨论

对顽固性腹水,需多次引流的患者,用常规穿刺引流,会造成患者痛苦,增加医源性感染的机会。用此法留置套管时间长,引流通畅,便于腹腔用药,能迅速解除患者的腹胀不适,改善心功能,明显缩短住院时间,减少住院费。对继发性食道静脉曲张破裂出血的张力性腹水患者,做腹水引流后,可使门脉压力暂时降低,有助于预防再出血[1]。此法便于固定,对于能下床活动患者,不影响其自主活动,深受患者欢迎。操作中应严格无菌技术,每日消毒进针部位,更换敷料。打开肝素帽后应严格消毒,方接引流袋,肝素帽用75%酒精浸泡,引流结束后,肝素帽可继续使用。此法安全可靠,无一例并发症发生,值得推广。

关键词 静脉留置针;肝硬化;腹水
中图法分类号 R575.2; R473.5

参考文献

1 徐克成 主编.消化病现代治疗.南京:江苏科学技术出版社,1993. 262~263
2 楼方岑 主编.医疗护理技术操作常规.第3版.北京:人民军医出版社,1987. B39~40
3 李仲存 主编.消化和系危重急症的诊断与治疗.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1993. 129~130

(收稿:1997-06-21;修回:1998-01-14)
(编辑 刘 鹏)

* 张晓荣,女,42岁,主管技师,大专

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