

探讨 bcl-2 下调后对胶质瘤细胞系的增殖、凋亡和侵袭能力的影响

王天路, 孙涛, 陶轶

Effect of Bcl-2 Downregulation on Proliferation, Apoptosis and Invasion of Glioma Cell Lines

WANG Tian-lu, SUN Tao, TAO Yi

Department of Neurosurgery, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To study how bcl-2 downregulation influence on proliferation, apoptosis, and invasion of glioma cell lines. **Methods** bcl-2 siRNA was chemically synthesized and transfected into glioma cell line SHG44 and TJ905. The silencing of bcl-2 expression in two cell lines were checked by Western blot. The effect of bcl-2 suppression on proliferation, invasion, and apoptosis of two cells were evaluated via MTT, cell transwell assay and Flow cytometric method. **Results** bcl-2 siRNA were effectively inhibited the expression of bcl-2 gene in SHG44 and TJ905 glioma cell lines. Silencing bcl-2 gene expression leads to the growth suppression of both SHG44 and TJ905 cells at different time point. Similarly, two cells invasion abilities were significantly reduced. However, no apparent effect on apoptosis was observed. **Conclusion** Our results have indicated that bcl-2 gene silencing effectively inhibited growth, proliferation and invasion of glioma cells.

Key words: SiRNA; bcl-2; Glioma; Apoptosis; Gene

摘要:目的 研究下调 bcl-2 基因表达后对神经胶质瘤细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响。**方法** 利用小分子 RNA 干扰(Small interfering RNA, siRNA)技术人工合成 bcl-2 靶向 siRNA, 转染神经胶质瘤细胞系 SHG44 和 TJ905 细胞, 特异性沉默神经胶质瘤细胞 SHG44 和 TJ905 细胞 bcl-2 基因表达。通过蛋白质印迹(Western blot)分析、噻唑蓝(MTT)实验、Transwell 实验和流式细胞仪(FCM)检测, 观察 bcl-2 siRNA 对转染细胞 bcl-2 基因抑制效果、增殖能力的变化、侵袭能力的改变和细胞凋亡的影响。**结果** bcl-2 siRNA 可特异性下调神经胶质瘤细胞系 SHG44 和 TJ905 细胞 bcl-2 基因表达。bcl-2 下调的神经胶质瘤细胞增殖能力在不同时间点都受到抑制, 侵袭能力也明显下降, 但实验中未见细胞明显凋亡。**结论** 下调 bcl-2 基因表达可有效抑制神经胶质瘤细胞生长, 降低细胞增殖和侵袭能力。

关键词: siRNA; bcl-2; 神经胶质瘤; 凋亡; 基因

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)02-0095-05

0 引言

神经胶质瘤是一种颅内恶性肿瘤, 难治疗、易复发, 往往对化疗药物不敏感或者耐药。bcl-2 为一原癌基因, 在各级别神经胶质瘤中均呈现基因的易位和高表达特点, 与肿瘤的发生、发展以及不良预后密切相关。bcl-2 可抑制多种致凋亡因素诱导的凋亡, 从而为转移后的肿瘤细胞能够继续生存提供了条件。Reed 等^[1]研究发现, bcl-2 高表达的瘤细胞对化疗药物耐药性增加, 推测 bcl-2 与肿瘤耐药性的形成关系密切。目前, 国内外对 bcl-2 基因在多种肿瘤细胞系中进行单独下调表达或联合药物干预, 但在神经胶质瘤中通过单独下调 bcl-2 来探讨与多种神经胶质瘤细

胞关系研究未见报道。本实验将利用 siRNA 技术有效下调 bcl-2 基因表达, 观察对多种神经胶质瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭能力的影响, 以期能为神经胶质瘤的治疗提供进一步的基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人神经胶质瘤细胞系 SHG44 和 TJ905 细胞购于中科院上海细胞库。Lipofectamin™2000 (Invitrogen 公司); 总蛋白提取试剂盒, BCA 法蛋白定量分析试剂盒, MTT 试剂盒(南京凯基公司); Annexin V FITC/PI 试剂盒 (Bender MedSystems 公司); Transwell 小室(美国 Corning Costar 公司); bcl-2 一抗(武汉博士德公司), 抗鼠二抗(Cell Signal 公司)和 superECL 发光液(北京普利莱公司); bcl-2 siRNA 根据胡海燕等^[2]筛选序列设计, 委托上海吉玛公司合成。

收稿日期: 2008-03-19; 修回日期: 2008-06-13

作者单位: 210009 南京, 江苏省肿瘤医院神经外科

作者简介: 王天路(1962-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事颅脑肿瘤基础和临床研究工作

1.2 细胞培养及处理

将 SHG44 和 TJ905 细胞接种于细胞培养皿, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养, 待细胞生长至对数生长期时用于实验。实验中分为实验组(转染 bcl-2 siRNA)、对照组(转染 negative control)和空白组(blank)。

1.3 bcl-2 siRNA 序列的设计和合成

引用已筛选出有效切割 bcl-2 mRNA 序列设计, 由上海吉玛公司合成。序列如下: bcl-2 siRNA: Sense 5'- AAC AGC TTA TAA TGG ATG TAC - 3'; Antisense 5'- AAG TAC ATC CAT TAT AAG CTG - 3'。

1.4 转染处理

对数生长期的神经胶质瘤细胞培养于 24 孔培养板中, 细胞铺满孔板 70%~80% 左右, 应用 Lipofectamin™2000 转染试剂, 按照 2:1 混合, 在无血清培养基中孵育 15 min 后, 加入到孔板中, 5% CO₂、37 °C 培养 6 h 后, 换液, 加入新鲜培养基, 继续培养 24 h。

1.5 MTT 实验分析

各处理组洗 3 次, 消化后以每孔 1 × 10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 加入培养液 100 μl/孔, 37 °C、5% CO₂ 培养。检测前 4 h 每孔加入 5 μl 的 MTT 溶液培养, 到达检测点时弃培养液, 每孔加入 150 μl DMSO 溶解蓝紫色结晶, 振动 10 min 后, 用酶标仪测定各孔的吸光度值, 取 5 孔的平均值。细胞存活率(%) = 处理组吸光度值/空白组吸光度值。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

各处理组转染 siRNA 24 h 后刮下细胞 1 900 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗 3 次, 重悬于加入 5 μl Annexin V FITC 和 10 μl PI 的 1 × Buffer 500 μl 流式管中, 应用 BD 公司流式细胞仪检测分析细胞凋亡情况。

1.7 Transwell 实验评价侵袭性

各处理组细胞消化后重悬于 0.1% 小牛血清培养基中, 按照每个小室 2 × 10⁵ 个细胞加入至 8 μm 孔

径 Transwell 小室的上室(实验前已铺 Matrigel 胶), 下室加入 20% 小牛血清培养基, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。取出 Transwell 小室 PBS 洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, PBS 洗 3 遍后用棉球轻轻擦去上室细胞, 显微镜下(×200)观察。

1.8 Western blot 分析 bcl-2 表达

提取各处理组总蛋白, BCA 法定量后, 加入上样缓冲液, 取等量蛋白上样, 15% SDS-PAGE 中电泳。125 mA 电流下 4 °C 转膜 90 min, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加 bcl-2 一抗(1:300)室温孵育 1.5 h 后, 漂洗 3 次, 每次 10 min, 室温孵育二抗(1:2 000) 1.5 h 后漂洗, 在暗室用 superECL 发光液显影, 凝胶成像仪成像。β-actin 检测作为内对照。

1.9 统计学方法

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用统计包 SPSS13.0 进行分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lipofectamin™2000 有效转染 siRNA

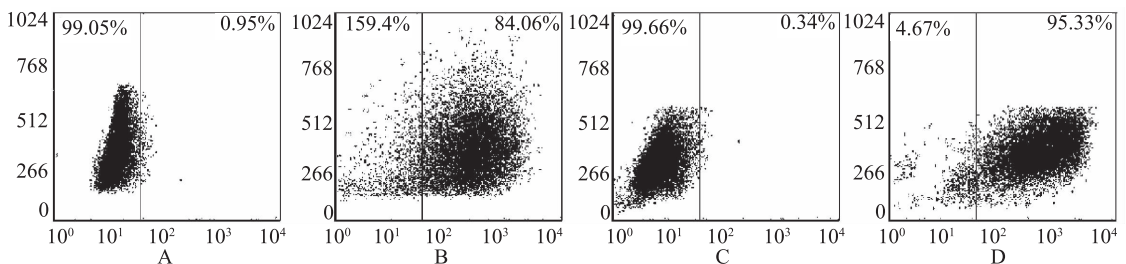
Lipofectamin™2000 与 FAM 标记的对照组按 2:1(W/W) 混合 15 min 后转染 SHG44 和 TJ905 细胞。转染后 24 h 后, 流式细胞仪检测转染效率, 见图 1。

2.2 bcl-2 siRNA 有效下调实验组细胞 bcl-2 表达

如图 2 显示, 实验组 bcl-2 条带明显减淡、变细, 对照组和空白组条带宽而深, 表明实验组加入 bcl-2 siRNA 后, 可有效下调 bcl-2 基因表达。

2.3 bcl-2 siRNA 有效抑制实验组细胞生长

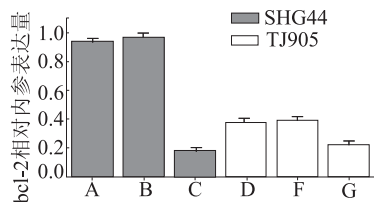
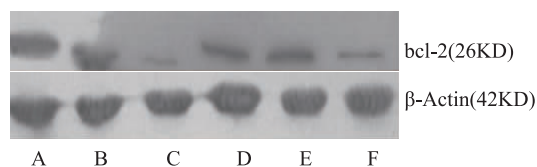
SHG44 和 TJ905 细胞于转染后不同时间点, 进行 MTT 法检测吸光度值代表细胞生长数目水平。研究结果显示实验组 SHG44 和 TJ905 细胞转染 bcl-2 siRNA 后, 细胞增殖水平在 24 h 后的不同时间点均显著低于对照组和空白组(P < 0.05), 见表 1、2。细胞存活率分析显示, SHG44 和 TJ905 细胞转染 bcl-2 siRNA 后存活率明显下降, 36 h 达到最低点, 见图 3。



A: SHG44 细胞空白组; B: SHG44 细胞 FAM 标记转染组; C: TJ905 细胞空白组; D: TJ905 细胞 FAM 标记转染组

图 1 FAM 标记寡核苷酸在 SHG44 和 TJ905 细胞转染效率

Fig 1 The transfection efficiency of FAM-oligonucleotide in SHG44 and TJ905 cells



A: SHG44 细胞空白组; B: SHG44 细胞对照组; C: SHG44 细胞实验组; D: TJ905 细胞空白组; E: TJ905 细胞对照组; F: TJ905 细胞实验组

图 2 bcl-2 siRNA 对 SHG44 和 TJ905 细胞 bcl-2 基因影响

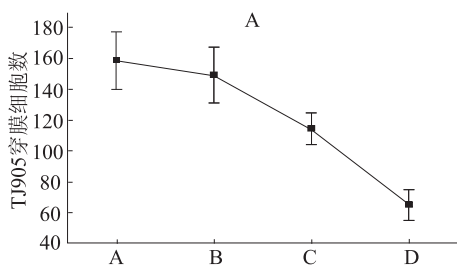
Fig 2 bcl-2 expression in bcl-2 siRNA transfected SHG44 and TJ905 cells

表 1 转染 TJ905 细胞后各时间点 MTT 法检测细胞增殖活性

Tab 1 Proliferation assay of bcl-2 transfected TJ905 cells at different time point via MTT method

Group	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
bcl-2 siRNA	0.310 ± 0.010	0.353 ± 0.021 *	0.396 ± 0.013 *	0.666 ± 0.037 *	0.972 ± 0.007 *
negative control	0.332 ± 0.003	0.490 ± 0.017	0.749 ± 0.013	1.062 ± 0.025	1.432 ± 0.012
blank	0.332 ± 0.015	0.493 ± 0.024	0.771 ± 0.020	1.072 ± 0.011	1.436 ± 0.009

* : $P < 0.05$ bcl-2 siRNA group vs. the negative control group or blank



A: TJ905 细胞空白组; B: TJ905 细胞对照组; C: TJ905 细胞实验组 1; D: TJ905 细胞实验组 2

图 4A bcl-2 siRNA 对 TJ905 细胞侵袭能力影响

Fig 4A Changes of TJ905 cells invasion abilities after bcl-2 siRNA transfection

表 2 转染 SHG44 细胞后各时间点 MTT 法检测细胞增殖活性

Tab 2 Proliferation assay of bcl-2 transfected SHG44 cells at different time point via MTT method

Group	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
bcl-2 siRNA	0.208 ± 0.011	0.225 ± 0.023 *	0.255 ± 0.030 *	0.402 ± 0.010 *	0.704 ± 0.012 *
negative control	0.232 ± 0.021	0.372 ± 0.017	0.537 ± 0.025	0.796 ± 0.015	1.163 ± 0.022
blank	0.231 ± 0.013	0.374 ± 0.024	0.539 ± 0.010	0.802 ± 0.021	1.172 ± 0.017

* : $P < 0.05$ bcl-2 siRNA group vs. the negative control group or blank

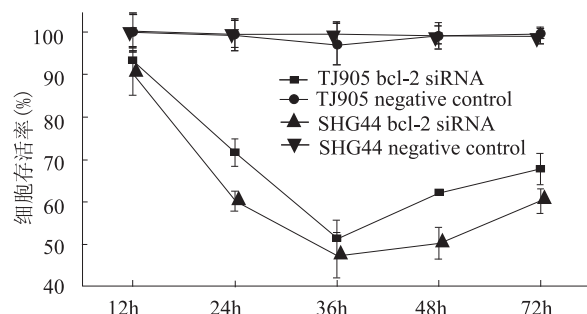
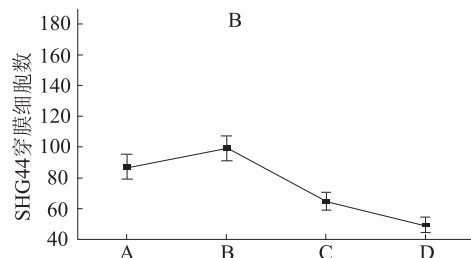


图 3 转染后各时间点 MTT 法检测细胞存活率

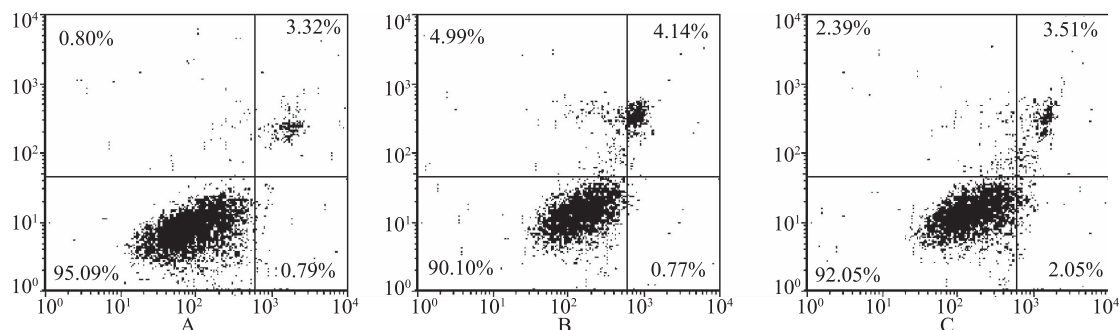
Fig 3 The cell viability after transfection at different time via MTT method



A: SHG44 细胞空白组; B: SHG44 细胞对照组; C: SHG44 细胞实验组 1; D: SHG44 细胞实验组 2

图 4B bcl-2 siRNA 对 SHG44 细胞侵袭能力影响

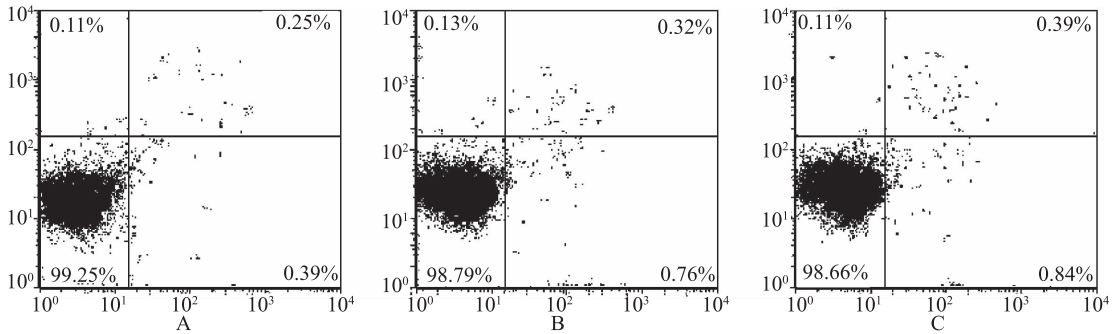
Fig 4B Changes of SHG44 cells invasion abilities after bcl-2 siRNA transfection



A: TJ905 细胞空白组; B: TJ905 细胞对照组; C: TJ905 细胞实验组

图 5A bcl-2 siRNA 对 TJ905 细胞凋亡影响

Fig 5A Apoptosis rate of TJ905 cells after bcl-2 siRNA transfection



A: SHG44 细胞空白组; B: SHG44 细胞对照组; C: SHG44 细胞实验组

图 5B bcl-2 siRNA 对 SHG44 细胞凋亡影响

Fig 5B Apoptosis rate of SHG44 cells after bcl-2 siRNA transfection

2.4 bcl-2 siRNA 降低实验组细胞侵袭能力

各处理组在转染 24 h 后进行 Transwell 实验评价细胞侵袭能力。如图 4A 和 4B, 实验组细胞穿膜细胞数明显减少; 实验组 2 转染 2 倍 bcl-2 siRNA, 其穿膜细胞数较实验组 1 更少 ($P < 0.05$)。实验表明 bcl-2 siRNA 可有效降低实验组细胞侵袭能力, 并且这种效应可能与 bcl-2 下调程度成正比。

2.5 bcl-2 siRNA 不诱导实验组细胞凋亡

转染 24 h 后进行流式细胞仪检测各组细胞凋亡。各处理组细胞均无明显凋亡, 见图 5A、5B。实验组、对照组和空白组凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 bcl-2 基因表达下调不能诱导细胞凋亡。

3 讨论

bcl-2 基因最初发现常易位于 B 细胞滤泡性淋巴瘤重链基因座, 通常呈过度表达状态^[3]。研究表明在淋巴瘤中 bcl-2 可抑制多种致凋亡因素和 Fas 途径诱导的凋亡, 发挥着抑制细胞凋亡和延长细胞寿命的功能。近年, Fels 等^[4]报道 bcl-2 这种抗凋亡基因在 III、IV 级神经胶质瘤及其胶质瘤细胞系中也呈明显过度表达, 并且这种过度表达状态与治疗的耐药性直接相关。研究表明在胶质瘤中 bcl-2 的作用方式与其表达水平相关; Shinoura 等^[5]构建 bcl-2 过表达腺病毒转染胶质瘤细胞, 结果显示胶质瘤细胞中相对低表达的 bcl-2 发挥着抗凋亡作用, 过度表达 bcl-2 可直接诱导胶质瘤细胞的凋亡, 后者可能是通过 Fas 通路实现的。为了进一步深入探讨 bcl-2 基因在神经胶质瘤中过低表达的作用, 本实验构建下调 bcl-2 基因的特异性 siRNA, 来研究 bcl-2 基因沉默后对神经胶质瘤的影响。

bcl-2 基因作为一种抗凋亡基因, 沉默后可抑制肺癌等多种肿瘤细胞生长^[6], 但目前对于神经胶质瘤中 bcl-2 基因表达是否与胶质瘤细胞增殖相关仍

存在争论, 一些研究者如 Nakasu 和 Krishna 等^[7-8]认为 bcl-2 基因的表达与神经胶质瘤生长无关, 而 Holle 等^[9]研究得出与之相反的结果。我们转染 bcl-2 siRNA 沉默 Bcl-2 基因表达后研究发现, 实验组 SHG44 和 TJ905 细胞增殖数目明显减少, 增殖能力明显受到抑制。研究结果与 Holle 等^[9]报道 Bcl-2 基因对胶质瘤细胞增殖能力的维持发挥重要作用的结论一致。我们进一步研究发现, bcl-2 基因沉默后, 实验组 SHG44 和 TJ905 细胞未见明显凋亡发生。相关研究如在白血病中, He 等^[10]研究指出 bcl-2 siRNA 可诱导急性早幼粒细胞白血病细胞 NB4 细胞凋亡; 在宫颈腺癌中, Futami 等^[11]研究表明下调宫颈腺癌 HeLa 细胞 bcl-2 后凋亡明显增加。在神经胶质瘤中, Jiang 等^[12]报道白藜芦醇, 3', 4', 5'-三羟(基)芪通过下调 bcl-2 表达诱导神经胶质瘤 U251 细胞凋亡; Lytle 等^[13]报道维胺酯通过下调 bcl-2 途径诱导神经胶质瘤 U87、U251 和 U138 细胞凋亡。根据我们的研究结果, 认为在神经胶质瘤 SHG44 和 TJ905 细胞中仅单独沉默 bcl-2 基因表达并不能直接诱导神经胶质瘤细胞凋亡, Jiang 和 Lytle 等^[12-13]研究的药物干预引起的伴随 bcl-2 下调的凋亡可能是由其他凋亡途径共同参与。经典线粒体凋亡途径, 线粒体在受到凋亡刺激信号后, 细胞色素 c 被释放, 在存在 dATP 时, 细胞色素 c 激活 Apaf-1; 活化的 Apaf-1 又激活 Caspase-9; 后者引起 Caspase 级联反应, 最终导致 Caspase-3 的激活, 完成细胞凋亡途径^[14]。bcl-2 可通过阻止细胞色素 c 从线粒体释放抑制凋亡。由此, 我们认为, bcl-2 基因沉默不直接诱导神经胶质瘤细胞凋亡发生, 但可能可以增加细胞对凋亡刺激的敏感性。

Wick 等^[15]报道 bcl-2 可通过依赖 furin 样蛋白酶诱导胶质瘤细胞侵袭性增加。我们的研究发现相似结论。bcl-2 siRNA 沉默 bcl-2 基因表达后, 实验组 SHG44 和 TJ905 细胞侵袭能力显著下降, 穿膜

细胞数较对照组和空白组明显减少。进一步分析发现这种侵袭能力的下降可能与 bcl-2 基因沉默效率成正比,增加转染 bcl-2 siRNA 的剂量可进一步抑制实验组 SHG44 和 TJ905 细胞侵袭能力。

通过实验我们认为下调 bcl-2 基因表达可有效抑制神经胶质瘤细胞增殖,降低其侵袭能力,但下调 bcl-2 基因表达并不能诱导神经胶质瘤细胞凋亡。同时我们推测 bcl-2 基因表达的下调可能可以增加细胞对凋亡刺激的敏感性,这为联合药物治疗中提高药物敏感性提供了理论基础,下一步将进行联合药物干预的处理,进一步论证该机制的可能性。

参考文献:

- [1] Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance [J]. *Hematol Clin North Am*,1995,9(2):451-473.
- [2] 胡海燕,张涓. siRNA 对神经胶质瘤细胞株 U251 bcl-2 基因表达的抑制[J]. *中国病理生理杂志*,2005,21(3):489-493.
- [3] Tsujimoto Y,Croce C. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(17):5214-5218.
- [4] Fels C,Schafer C,Huppe B, et al. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study[J]. *J Neurooncol*,2000,48(3):207-216.
- [5] Shinoura N,Yoshida Y,Nishimura M, et al. Expression Level of Bcl-2 Determines Anti- or Proapoptotic Function[J]. *Cancer Res*,1999,59(16):4119-4128.
- [6] 何冬梅,张涓. Bcl-2 反义寡核苷酸对人肺癌裸鼠移植瘤的抑制

作用[J]. *癌症*,2006,25(1):40-44.

- [7] Nakasu S,Nakasu Y,Nioka H, et al. bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 1994,88(6):520-526.
- [8] Krishna M,Smith TM,Recht LD. Expression of bcl-2 in reactive and neoplastic astrocytes: lack of correlation with presence or degree of malignancy[J]. *J Neurosurg*, 1995,83(6):1017-1022.
- [9] Holle L,Hicks L,Song W, et al. Bcl-2 targeting siRNA expressed by a T7 vector system inhibits human tumor cell growth in vitro[J]. *Int J Oncol*,2004,24(3):615-621.
- [10] He D,Zhang Y, and Liu G. Bcl-2 siRNA Induces Apoptosis and Enhances the Sensitivity to Arsenic Trioxide in NB4 Cells[J]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*,2005,106(4):4441.
- [11] T Futami,M Miyagishi,M Seki, et al. Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*,2002,2(3):251-252.
- [12] Jiang H,Zhang L,Kuo J, et al. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells[J]. *Mol Cancer Ther*,2005,4(4):554-561.
- [13] Lytle RA,Jiang Z,Zheng X, et al. Retinamide-induced apoptosis in glioblastomas is associated with down-regulation of Bcl-xL and Bcl-2 proteins[J]. *J Neurooncol*,2005,74(3):225-232.
- [14] Kwon KB,Kim EK,Han MJ, et al. Induction of Apoptosis by Radix Paeoniae Alba Extract through Cytochrome c Release and the Activations of Caspase-9 and Caspase-3 in HL-60 Cells [J]. *Biol Pharm Bull*,2006,29(6):1082-1086.
- [15] Wick W,Wild-Bode C, Frank B, et al. BCL-2-induced glioma cell invasiveness depends on furin-like proteases[J]. *J Neurochem*,2004,91(6):1275-1283.

[编辑校对:贺文]