

bax 基因对人 BcaCD885 颊癌细胞凋亡的影响

边莉¹, 金克炜², 何永文³

Apoptosis of BcaCD885 Cell Mediated by Human bax Gene

BIAN Li¹, JIN Ke-wei², HE Yong-wen³

1. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 2. Department of Pathology, Kunming Medical College; 3. Department of Dental Research, Kunming Medical College

Abstract: Objective To study the change of apoptosis by bax gene in human buccal mucosa carcinoma BcaCD885 cells. **Methods** Transfected recombinant human Bax gene plasmid and control plasmid into BcaCD885 cells. The BcaCD885 cells were examined morphologically through haematoxylin-eosinophil (HE) staining. The apoptosis qualification of the BcaCD885 cells was examined through terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling technique (TUNEL). The apoptosis rate of the BcaCD885 cells was measured with flow cytometry. **Results** The bax gene transfected BcaCD885 cells had apoptosis morphological features. Many TUNEL positive red staining cells were found in the bax gene transfected BcaCD885 cells. There were significant differences in the apoptotic rates between the bax gene transfected BcaCD885 and the control BcaCD885 cells and the control plasmid transfected BcaCD885 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** The recombinant human bax gene plasmid pORF-h bax- can promote the apoptotic rate of the BcaCD885 cells.

Key words: bax gene; BcaCD885 cells; Apoptosis

摘要: 目的 探讨 bax 基因对人 BcaCD885 颊癌细胞凋亡的影响。方法 转染人 bax- 基因重组质粒及对照质粒于 BcaCD885 细胞中。通过 HE 染色光镜观察对细胞形态学进行检测; 通过 TUNEL 原位末端标记及流式细胞术对细胞凋亡进行定性、定量检测。结果 bax 质粒转染组 BcaCD885 细胞出现凋亡的形态学改变, TUNEL 阳性红染凋亡细胞数量增多, 凋亡小体出现, 其细胞凋亡率与空白对照组及对照质粒转染组之间存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

收稿日期: 2005-11-14; 修回日期: 2006-02-09

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (0112444)

作者单位: 1. 650032 昆明医学院第一附属医院病理科; 2. 昆明医学院病理学教研室; 3. 昆明医学院口腔医学研究所

作者简介: 边莉 (1976-), 女, 在读博士, 主治医师, 主要从事肿瘤分子病理研究

示, 有颈淋巴结转移的患者 gp96 的阳性表达率与无颈淋巴结转移的患者比较其差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

gp96 又称葡萄糖调节蛋白 (Glucose-regulated protein 94, GRP94), 正常情况下主要存在于细胞内质网内, 有研究表明在一些病毒感染、肿瘤等应激情况下, 可以同病毒或肿瘤的抗原肽形成复合物, 并与 MHC-1 类分子结合, 提呈给 CTL 细胞, 激发机体的特异性细胞免疫应答。有学者从肿瘤细胞中提取 gp96 抗原肽形成复合物, 证实这种复合物具有疫苗样作用^[1]。

有研究发现在黑色素瘤、结肠癌、宫颈癌、肝癌、乳腺癌中 gp96 表达增高^[2,3], Song^[4]认为 gp96 表达与肿瘤的侵袭性有关, 我们研究发现 gp96 在喉癌

中表达, 肿瘤临床 T 分期和病理分级低的患者表达高, 无淋巴结转移的患者表达高, 提示低表达可能与喉癌的发展、浸润和转移有关。本研究为应用抗原肽形成复合物进行免疫治疗提供一个实验依据。

参考文献:

- [1] Yedavelli SP, Guo L, Daou ME, et al. Preventive and therapeutic effect of tumor derived heat shock protein gp96 in an experimental prostate cancer model[J]. Int J Mol Med, 1999, 4(3): 243-248.
- [2] Missotten GS, Journee-de KJ, Wolff-Kouendaul D, et al. Heat shock protein expression in the eye and in uveal melanoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(7): 3059-3065.
- [3] 李承霖, 孟忻, 郎振为. gp96 热休克蛋白在原发性肝癌中的检测及其意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(9): 569-570.
- [4] Song JD. The expression of glucose regulated protein-94 in colorectal carcinoma cells treated by sodium butyrate[J]. Cell Res, 2000, 10(2): 115-125.

[编辑: 刘红武]

结论 bax⁻ 基因重组质粒能促进 BcaCD885 细胞发生凋亡。

关键词: bax 基因; BcaCD885 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R73-36⁺2; R739.81 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2006)12-0880-03

0 引言

细胞凋亡在肿瘤发生、发展及治疗中起重要作用,其发生过程受相关基因的调控。与 bcl-2 促细胞存活的作用相反, bax 促细胞凋亡。对某一特定的细胞来说,其对凋亡诱因的反应可能取决于 bcl-2 家族成员的表达及相对浓度水平^[1]。本研究采用基因转染技术,用 Lipofectamin 2000 将 bax⁻ 基因重组质粒 pORF-hBax⁻ 导入人颊癌细胞株 BcaCD885 细胞中,提高 bax 的表达水平,探讨其能否促进癌细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

重组人 bax 基因表达质粒 pORF-hBax⁻ (美国 Invivo Gen 公司);含 576bp 人 bax⁻ 基因;对照质粒 pORF-mcs (美国 Invivo Gen 公司);RPMI 1640 培养基 (美国 GIBCO BRL 公司);脂质体 Lipofectamine 2000 (1mg/ml) (美国 Invitrogen 公司);TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling technique) 原位末端标记试剂盒 (德国 Boehringer Mannheim 公司);碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) (美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 空白对照组: BcaCD885 细胞培养 24h,三蒸水代替质粒“转染”24h,培养 24h;对照质粒转染组: BcaCD885 细胞培养 24h, pORF-mcs 质粒转染 24h,培养 24h; bax 质粒转染组: BcaCD885 细胞培养 24h, pORF-hBax⁻ 质粒转染 24h,培养 24h。

1.2.2 细胞培养及转染 BcaCD885 细胞于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基、37[°] 5% CO₂ 条件下培养。质粒转染采用脂质体 Lipofectamine 2000 参照产品说明进行。

1.2.3 细胞形态学检测 常规 HE 染色,光镜观察。

1.2.4 TUNEL 原位末端标记细胞凋亡检测 培养细胞弃培养液,4% 多聚甲醛固定,40μg/ml 的蛋白酶 K 37[°] 消化 30min,0.3% Triton-X100 (含 3% 羊血清) 通透液 4[°] 处理 20min,10% BSA 封闭液室温处理 30min, TUNEL 反应混合液 (1 液 2μl, 2

液 18μl) 37[°] 孵 90min,抗荧光素抗体,37[°] 孵 60min,室温下快红显色 20min,光镜下观察。细胞核红染为阳性凋亡细胞。以 PBS 代替 TUNEL 反应混合液为阴性对照。

1.2.5 流式细胞术细胞凋亡率检测 收获细胞,75% 冷乙醇固定,加 PI 至终浓度为 50μg/ml,4[°] 避光 30min,Coulter 公司 Elite ESP 型流式细胞仪检测细胞 DNA 含量,以 G₀/G₁ 峰前亚二倍群为凋亡峰,计算凋亡率。

1.3 统计学分析

所得数据采用 SPSS10.0 进行分析。

2 结果

2.1 HE 染色细胞形态学检测结果

空白对照组及对照质粒转染组 BcaCD885 细胞密集生长,形态完整,呈圆形、多角形、大小不一,核浆比例倒置,呈恶性改变。bax 质粒转染组见大部分细胞核仁消失,核染色致密浓缩,核裂解,胞膜完整,呈现凋亡的形态学改变,见图 1~3。

2.2 TUNEL 原位末端标记细胞凋亡检测结果

空白对照组及对照质粒转染组随机观察 5 个高倍视野,每高倍视野仅见个别或无凋亡细胞。同法观察 bax 质粒转染组,每高倍视野见 5~8 个凋亡细胞,并见凋亡小体出现,见图 4~6。

2.3 流式细胞术细胞凋亡率检测结果

空白对照组及对照质粒转染组细胞凋亡率分别为 (1.03 ± 0.15)% 及 (2.38 ± 1.49)%。bax 质粒转染组凋亡细胞占 (15.93 ± 3.04)%。LSD 检验, bax 质粒转染组细胞凋亡率与空白对照组及对照质粒转染组存在极显著差异 ($P < 0.01$),而空白对照组与对照质粒转染组凋亡率无差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡过程受凋亡相关基因的调控,其中 bcl-2 基因家族倍受关注。根据其功能可分为两类:促进细胞生存组和促进细胞凋亡组。与 bcl-2 促细胞存活作用相反, bax 促细胞死亡^[2]。在上颌窦鳞状细胞癌中, bax 高表达与高凋亡率及预后良好有关^[3]。bax 的高表达能明显提高化疗药物及放疗杀伤肿瘤细胞的敏感性^[4,5]。本研究中,我们利用脂质体 Lipofectamin 2000 转染人 Bax⁻ 基因重组质粒 pORF-hBax⁻ 及对照质粒 pORF-mcs 于人颊癌细胞株 BcaCD885 细胞中,用 HE 染色、TUNEL 原位末端标记、流式细胞仪等技术对各组癌细胞凋亡情况进行检测。结果发现: pORF-hBax⁻ 能促进 BcaCD885 细胞凋亡的发生。bax 可能通过以下途

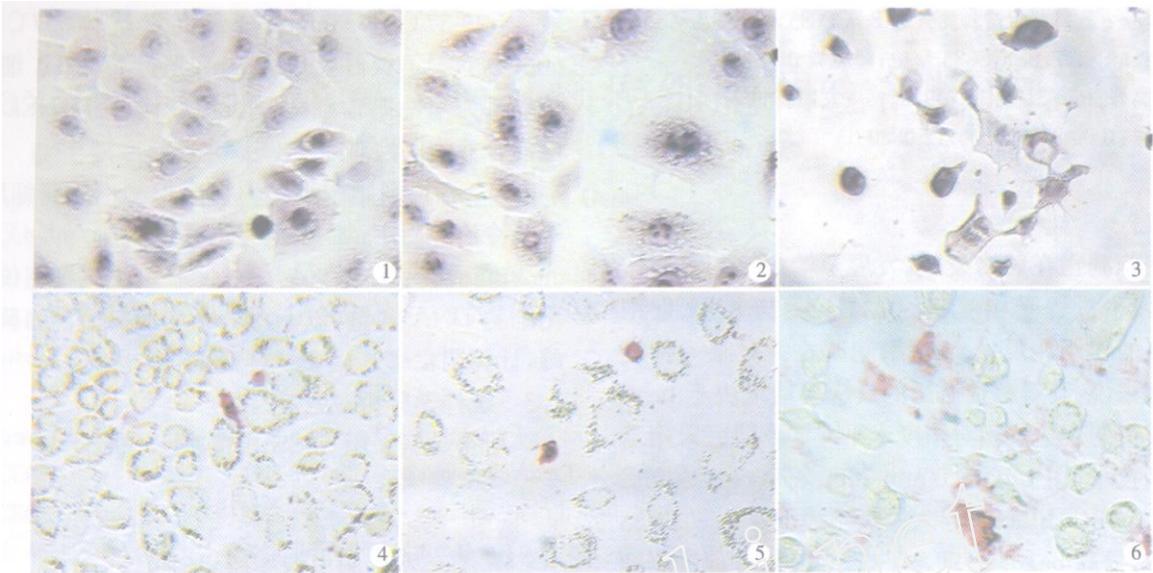


图 1 空白对照组 BcaCD885 细胞 (HE ×250)

图 2 对照质粒转染组 BcaCD885 细胞 (HE ×250)

图 3 bax 质粒转染组 BcaCD885 细胞 (HE ×250)

图 4 空白对照组 BcaCD885 细胞 (TUNEL ×250)

图 5 对照质粒转染组 BcaCD885 细胞 (TUNEL ×250)

图 6 bax 质粒转染组 BcaCD885 细胞 (TUNEL ×250)

径调节 BcaCD885 细胞凋亡的发生:提高 bax 蛋白的表达可能使得其同源二聚体形成增多,促进颊癌细胞凋亡的发生;bax 的过表达可能阻止促生存蛋白对 Caspase 的活化抑制,提高了 Caspase 的活性,催化核内的 DNase 抑制蛋白 ICAD 的裂解,而激活核酸内切酶 (Endonuclease) CAD,从而提高 BcaCD885 细胞的凋亡率;高表达 bax 蛋白可能通过升高细胞器膜通透性,促进 Ca^{2+} 外流,提高 BcaCD885 细胞的凋亡率;bax 蛋白高表达或同源二聚体形成能促进线粒体通透性转变或在线粒体外膜上打孔,诱发细胞凋亡;bax 还迁移到核膜上及核内,核膜 bax 水平的上升与核蛋白的降解呈正相关,在本研究中,我们也观察到 BcaCD885 颊癌细胞凋亡时,癌细胞的胞核内 bax 的表达明显升高;bax 还能与其他基因蛋白如 p53 相互作用,调节细胞凋亡^[1,6-8]。

bax 基因通过多种途径调节细胞凋亡的发生。在本研究中,我们从基因入手,提高 BcaCD885 细胞内 bax 基因的表达水平,促进 BcaCD885 细胞凋亡的发生,为利用 bax 基因治疗颊癌提供了实验基础和理论依据。

参考文献:

- [1] Gallo G, Giarnieri E, Bosco S, et al. Aberrant bcl-2 and bax protein expression related to chemotherapy response in neuroblastoma[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1B): 777-784.
- [2] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homology, bax, that accelerates programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.
- [3] Bandoh N, Hayashi T, Kishibe K, et al. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 94 (7): 1968-1980.
- [4] Xu ZW, Friess H, Buchler MW, et al. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49(6): 504-510.
- [5] Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, et al. Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis[J]. *Int J Cancer*, 1996, 67(1): 101-105.
- [6] Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326.
- [7] Shchepotin IB, Soldatenkov V, Wroblewski JT, et al. Apoptosis induced by hyperthermia and verapamil in vitro in a human colon cancer cell line[J]. *Int J Hyperthermia*, 1997, 13(5): 547-557.
- [8] McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, et al. Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53 dependent apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2345-2349.

[编辑:刘红武]