

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0051- 03

bcl-xs 基因对卵巢癌的作用及其凋亡机制的研究

陈爱平¹, 刘 晖², 徐 冰¹, 戴淑真¹(1. 青岛大学医学院附属医院妇产科, 山东 青岛 266003; 2. 青岛大学医学院附属医院病理科, 山东 青岛 266003)

[摘 要] **目的:** 研究重组腺病毒 bcl-xs 基因(adv-bcl-xs)对卵巢癌细胞及其裸鼠移植腹水瘤的生长抑制作用和荷瘤裸鼠生存率的影响,同时探讨 bcl-xs 基因对于卵巢癌的作用机制。**方法:** 采用扩增后的 adv-bcl-xs 感染卵巢癌细胞 NUTU-19, 观察对 NUTU-19 细胞的生长抑制作用并检测其病毒滴度,再将 adv-bcl-xs 导入人卵巢癌裸鼠移植腹水肿瘤,观察对腹水的生长抑制作用,计算裸鼠荷瘤生存时间,免疫细胞化学染色测定 bcl-xs 基因表达情况。终末脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)计数凋亡细胞检测肿瘤细胞凋亡情况。**结果:** adv-bcl-xs 对 NUTU-19 有抑制和杀伤作用。在 NUTU-19 细胞和裸鼠体内过度表达,使裸鼠腹水形成时间和荷瘤裸鼠平均生存时间延长,有统计学意义。在 NUTU-19 细胞和裸鼠卵巢癌移植腹水肿瘤细胞中检测到凋亡细胞。**结论:** adv-bcl-xs 对卵巢癌细胞有抑制作用,而且可能是通过凋亡机制发挥的。

[关键词] 腺病毒 bcl-xs 基因; 人卵巢癌; 裸鼠移植; 腹水瘤; 基因治疗; 细胞凋亡

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Therapeutic Effects and Apoptosis Mechanism of bcl-xs Gene to the Human Ovarian Carcinoma

CHEN Ai-ping¹, LIU Hui², XU Bing¹, DAI Shu-zhen¹(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 2. Department of Pathology, the Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of adenovirus-bcl-xs gene on the inhibition of ascites tumor cells and survival rate of nude mice transplanted intraperitoneally with human ovarian carcinoma. **Methods:** By using of a reproduced adenovirus-bcl-xs gene infected in NUTU-19 cells, we transferred it intraperitoneally to ascites tumor model of human ovarian carcinoma transplanted in nude mice, detected the ascites formation, the survival time and survival rate of nude mice with the human ascites tumor. The weight and toxic-adverse systemically effects of nude mice were observed and the gene expression was detected by immunocytochemistry. The apoptotic cells were quantitatively determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results:** The adenovirus-bcl-xs gene had inhibitory potential on NUTU-19 cells. bcl-xs protein was expressed and apoptotic cells were observed. The survival time of nude mice was longer and the survival rate was higher, and the time of ascites formation was retarded. **Conclusions:** The results suggested that the transfer of adenovirus-bcl-xs gene to the ascites tumour of nude mice with human ovarian carcinoma could improve the survival rate of nude mice and retard the time of ascites formation. It may be a useful method of gene therapy in the treatment of ovarian carcinoma.

[**Key words**] adenovirus-bcl-xs gene; human ovarian carcinoma; nude mice model; ascites tumor; gene therapy; cell apoptosis

* 卵巢癌是女性生殖系统最常见的三大恶性肿瘤之一,死亡率居于首位,经过手术为主的综合治疗,其5年生存率未见明显提高。为进一步探讨卵巢癌的临床基因治疗,本研究应用以复制缺陷型腺病毒(adv)载体

[基金项目] 青岛大学自然科学基金资助基金(200124)

[作者简介] 陈爱平(1964-), 女, 山西人, 副主任医师, 博士, 主要从事卵巢癌的基因治疗。

与 bcl-xs 基因构成的重组腺病毒 bcl-xs 基因(adv-bcl-xs)感染大鼠卵巢癌细胞系 NUTU-19, 观察对 NUTU-19 细胞的生长抑制作用, 检测其病毒滴度后再将 adv-bcl-xs 导入人卵巢癌裸鼠移植腹水肿瘤, 观察 adv-bcl-xs 对裸鼠卵巢癌的作用及其机制。

1 材料与方

1.1 主要试剂

adv-bcl-xs, NUTU-19 由美国密西根大学肿瘤中心提供; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、细胞培养基等购自美国 Sigma 公司; 凋亡试剂为德国宝灵曼公司生产的原位末端标记试剂盒。

1.2 实验动物

BULB/c 小鼠, 由华西医科大学动物中心提供, 鼠龄 4 ~ 12 周, 雌鼠。实验鼠饲养于无菌室的净化空气层流架中进行。

1.3 实验方法

1.3.1 adv-bcl-xs 基因的扩增、病毒的纯化、提取、冻存及鉴定

见参考文献[1]。

1.3.2 adv-bcl-xs 基因对 NUTU-19 细胞的抑制作用

复苏后的 NUTU-19 细胞进行传代培养, 稀释计数, 加入 96 孔板, 再培养后依次加入按 1/10 浓度梯度递减稀释好的 adv-bcl-xs 病毒溶液, 换培养基, 于病毒感染 72 h 后观察 NUTU-19 细胞生长情况。

1.3.3 免疫细胞化学染色检测 bcl-xs 基因表达

取 6 孔板首先放入消毒盖玻片, 加入 NUTU-19 细胞, 感染病毒后继续培养, 3 d 后取出盖玻片, 丙酮固定 10 ~ 15 min 后。血清封闭 30 min, 逐次加入 bcl-xs 抗体作一抗, 过夜后加入生物素标记的二抗、链亲和素-AB 复合物。DAB 显色, 自来水终止。苏木素复染。充分水洗, 氨水固定, 脱水、透明、封片, 光镜下观察结果。同时设阴性对照和空白对照。

1.3.4 细胞凋亡的检测

接种细胞于置盖玻片的 24 孔培养板内, 实验组按照不同浓度加入 2 组稀释好的 adv-bcl-xs, 浓度分别为 100, 10 000 pfu/cell, 每组各设 8 个平行孔。培养 72 h 后取出盖玻片, 4% 多聚甲醛固定, 按 TUNEL 试剂盒说明进行操作, 光学显微镜下观察凋亡细胞。细胞核呈棕褐色着色者为阳性凋亡细胞, 阴性者细胞核呈兰色。根据阳性细胞凋亡数的多少分为, 每低倍视野中阳性细胞凋亡数少于 1/3 者为(+), 1/3 ~ 2/3 者为(++), 大于 2/3 者为(+++)。并计算各组凋亡细胞的阳性率(凋亡细胞的阳性率为阳性凋亡细胞/总孔数)。

1.3.5 动物体内实验

取已建立的人卵巢癌裸鼠移植腹水瘤模型^[2], 取第六代进行转基因实验, BULB/c 雌鼠, 13 只, 鼠龄 8 ~ 12 周, 测体重和腹围, 接种第五代鼠的腹水 0.5 ml, 含细胞数(3 ~ 4) × 10⁷ 个。取实验鼠 7 只进行 adv-bcl-xs 基因转移, 于腹水接种第 3 天腹腔内注入 adv-bcl-xs 悬液, 滴度为 3 × 10¹⁰ pfu/只, 3 d 后重复注射 1 次。对照组 6 只, 同一时期腹腔内注入同等量的 PBS。定期测定裸鼠体重和腹围, 观察腹水生长情况, 记录裸鼠死亡日期, Kaplan-Meier 法计算生存率, 绘制生存率曲线。同时进行 bcl-xs 基因表达及细胞凋亡的测定, 观察基因产物表达情况及对细胞凋亡的影响。

1.4 统计学分析

2 组裸鼠生存率的比较用对数秩检验计算 X² 值进行统计学分析。

2 结果

2.1 adv-bcl-xs 对 NUTU-19 细胞的杀伤和抑制作用

结果显示, 当病毒滴度在 500 ~ 1 000 pfu/cell 时, 连续培养 3 d 能杀死 50% ~ 80% 的 NUTU-19 细胞, 未加病毒的对照组 NUTU-19 细胞培养 5 d 后细胞仍然生长良好。通过倒置显微镜观察细胞脱落状态, 可以区分病毒效价。显示 adv-bcl-xs 对 NUTU-19 细胞有杀伤和抑制作用。

2.2 adv-bcl-xs 在 NUTU-19 细胞中的表达

电镜观察在经过氯化铯离心后的上清液中见到 20 面体含有蛋白质外壳的病毒颗粒, 证实 adv-bcl-xs 扩增成功。感染 adv-bcl-xs 后的 NUTU-19 细胞免疫细胞化学染色显示 bcl-xs 蛋白强阳性表达, 细胞染成棕黄色, 对照组为淡黄色。表明在腺病毒扩增成功的同时, 其所携带的 bcl-xs 基因得到了相应的表达。

2.3 adv-bcl-xs 对细胞凋亡的影响

表 1 TUNEL 检测的细胞凋亡结果

Tab. 1 TUNEL results of the apoptotic cells expression

Groups	Parallel hole	Positive apoptotic cells				Positive rate(%)
		-	+	++	+++	
Control	8	8	0	0	0	0
Advbclsx 100 pfu/cell	8	4	2	2	0	50
Advbclsx 10000 pfu/cell	8	2	1	2	3	75

2.4 adv-bcl-xs 对裸鼠卵巢癌移植腹水瘤细胞的生长抑制作用

2.4.1 adv-bcl-xs 对荷瘤裸鼠生存率的影响

实验组和对照组接种腹水后的腹水生长潜伏期对照组为 5~10 d, 实验组为 11~23 d。两者比较 $P < 0.05$, 有统计学差异。各组荷瘤裸鼠生存时间如下: 对照组为 14, 18, 23, 28, 30, 32 d, 平均 24 d, 实验组为 30, 36, 39, 40, 43, 43, 44 d, 平均 39 d。对数秩检验(log-rank test)卡方值 $X^2 = 6.2124$ ($P < 0.05$), 2 组裸鼠荷瘤生存时间有统计学意义。

图 1 卵巢癌荷瘤裸鼠 bcl-xs 腺病毒基因治疗的 Kaplan-Meier 生存率曲线

Fig.1 Survival rates curve of nude mice induced by adv-bcl-xs

2.4.2 adv-bcl-xs 在裸鼠体内的表达以及裸鼠腹水瘤细胞凋亡的测定

腹腔细胞免疫化学染色结果表明, 未接受 adv-bcl-xs 治疗的裸鼠腹水瘤细胞 bcl-xs 阴性表达。接受 adv-bcl-xs 治疗的裸鼠腹水瘤细胞 bcl-xs 为强阳性表达。而且在腹水细胞中查到凋亡细胞。

3 讨论

3.1 bcl-xs 基因及其促细胞凋亡机制

细胞转化是一种复杂的细胞内机制, 需要几种遗传基因的异常参与。bcl-2 基因家族成员众多, 分为抑制细胞凋亡和促进细胞凋亡两类基因。bcl-2 与 bcl-x1 是多种凋亡通路的调节剂, 可以抑制包括癌基因、抑癌基因、生长因子撤退、及外界损伤信号引起的凋亡。对其功能的抑制可能对许多肿瘤细胞是致死性的^[3,4]。

bcl-xs 是 bcl-2 基因家族成员 bcl-x 小片段 mRNA 产物, 是 bcl-2 和 bcl-x1 的逆向调节剂。能够促进细胞凋亡^[5]。研究表明, 重组腺病毒载体携带 bcl-xs 基因能有效导入许多类型肿瘤细胞, 高表达时诱导肿瘤细胞发生凋亡而致死, 低表达时增加对化疗和放疗的敏感性。并且 bcl-xs 只对肿瘤细胞的生长有特异性抑制

作用, 而对机体正常细胞无抑制作用^[6]。

3.2 adv-bcl-xs 对卵巢癌 NUTU-19 细胞的抑制作用及其促凋亡作用

adv-bcl-xs 在体外可以感染卵巢癌 NUTU-19 细胞并引起 NUTU-19 细胞的生长抑制和死亡。免疫细胞化学染色表明感染了 bcl-xs 的 NUTU-19 细胞出现 BCL-XS 蛋白强阳性表达; 表明在病毒扩增的基础上, 其携带的 bcl-xs 基因也得到了过表达。进一步研究证明 adv-bcl-xs 对卵巢癌细胞株 NUTU-19 有杀伤和抑制作用。能够引起卵巢癌细胞 NUTU-19 的凋亡。且随病毒浓度的增加, 病毒携带的 bcl-xs 基因浓度的增加, 其对 NUTU-19 细胞的抑制作用及促凋亡作用也越明显。

3.3 adv-bcl-xs 对人卵巢癌裸鼠移植腹水瘤的作用

Ealovega^[7]等研究表明, 体外实验病毒滴度为 100 pfu/cell 时可以对细胞产生毒性, 引起肿瘤抑制, 用于体内实验时病毒作用相对减弱, 一方面增加体内病毒用量, 同时增加注药次数。结果表明, 4 次注药后, 肿瘤小于对照组 52%, 单次注药仅缩小 37%, 证明多次重复注射可以引起明显而持久的肿瘤抑制。

本研究用 2 次重复注射 adv-bcl-xs 对卵巢癌裸鼠移植腹水瘤进行转基因治疗, 记录实验组和对照组死亡时间, 采用 Kaplan-meier 生存率曲线分析发现, 用 adv-bcl-xs 治疗的实验组裸鼠腹水生成潜伏期延长, 生存时间明显长于对照组, 生存率高, 对数秩检验两者差异有显著性。而且 adv-bcl-xs 引起人卵巢癌裸鼠移植腹水瘤细胞的凋亡, 表明其抑肿瘤作用是通过凋亡机制发挥的。

[参考文献]

- [1] 陈爱平, 彭芝兰, 王和, 等. 重组腺病毒 bcl-xs 基因对人卵巢癌裸鼠移植瘤作用的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 36: 165-167.
- [2] 陈爱平, 王和, 彭芝兰, 等. 人卵巢癌裸鼠移植瘤和腹水瘤模型的建立及形态学观察[J]. 肿瘤, 2001, 21: 82-84.
- [3] Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, et al. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL[J]. Nature, 1995, 374: 811-813.
- [4] Rao L, White E. Bcl-2 and ICE family of apoptosis regulators: Making a connection[J]. Curr Opin Genet Dev, 1997, 7: 52-56.
- [5] Clarke MF, Apel IJ, Benedict MA, et al. A recombinant bcl-xs adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 11024-11028.
- [6] Sumantran VN, Ealovega MW, Nunez G, et al. Overexpression of bcl-xs sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy induced apoptosis[J]. Cancer Res, 1995, 55: 2507-2510.
- [7] Ealovega MW, McGinnis PK, Sumantran VN, et al. bcl-xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumours in nude mice[J]. Cancer Res, 1996, 56: 1965-1969.

[收稿日期] 2002-03-18

[修回日期] 2003-01-01