

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )01-0014-04

## bcl-2 反义寡核苷酸对肾癌细胞 Bcl-2 蛋白表达抑制及诱导凋亡作用

高江平, 杨素霞, 陈 萍, 董 隽, 洪宝发, 李炎唐 ( 解放军总医院泌尿外科, 北京 100853 )

[ 摘 要 ] **目的:** 评价 bcl-2 反义寡核苷酸对肾细胞癌细胞 Bcl-2 蛋白表达抑制及诱导凋亡作用。**方法:** 合成与已知人类基因无同源性的 bcl-2 反义寡核苷酸( AS1 与翻译起始端互补, AS2 与编码区互补 ), 以阳离子脂质体 Lipofectin 为转染载体, MTS 比色实验测定细胞活率, 反转录-聚合酶链反应( RT-PCR )测定 bcl-2 mRNA 的表达, Western 杂交法测定 Bcl-2 蛋白表达, 碘化丙啶( PI )染色流式细胞术测定凋亡细胞。**结果:** 所测定的 5 个肾癌细胞株均有稳定的 bcl-2 mRNA 表达; 转染的反义寡核苷酸对 ACHN 细胞 Bcl-2 蛋白的表达有明显抑制作用, 而正义寡核苷酸无明显影响, AS2 的抑制作用大于 AS1; 反义寡核苷酸可诱导 ACHN 细胞的凋亡, AS1 和 AS2 的诱导率分别为 32.1% 和 43.2%。**结论:** bcl-2 反义寡核苷酸可抑制肾癌细胞 Bcl-2 蛋白的表达, 并进而诱导细胞的凋亡。

[ 关键词 ] 肾癌; bcl-2; 反义寡核苷酸; 凋亡

[ 中图分类号 ] R737.11 [ 文献标识码 ] A

## Inhibition of Bcl-2 Protein Expression and Induction of Apoptosis in Renal Cell Carcinoma Cells by Antisense Oligodeoxynucleotide Targeting the bcl-2 Gene

GAO Jiang-ping, YANG Su-xia, CHEN Ping, DONG Jun, HONG Bao-fa, LI Yan-tang ( Department of Urology, General Hospital of PLA, 100853, Beijing, China )

[ Abstract ] **Objective:** To evaluate the effects of antisense oligodeoxynucleotides ( ODNs ) ( AS1 complementary to the translation initiation region and AS2 complementary to the coding region ) targeted to bcl-2 oncogene on Bcl-2 protein expression and apoptosis of human renal cell carcinoma ( RCC ) cells. **Methods:** Expression of bcl-2 mRNA in RCC cell lines was analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction ( RT-PCR ). The ODNs were transfected with Lipofectin into RCC cell lines. The expression of Bcl-2 protein in ACHN tumor cells was examined by Western blot analysis, and the apoptosis of those cells was determined by flow cytometric analysis. **Results:** Expression of bcl-2 mRNA was detected in all five RCC lines. Transfected bcl-2 antisense ODNs, but not sense ODNs, inhibited Bcl-2 protein expression in ACHN cells. The AS2 antisense ODN showed a superior effect compared with AS1 ODN. The apoptosis of ACHN cell could be induced by bcl-2 antisense ODNs, and percentage of apoptotic cells was noted 32.1% and 43.2% treated with AS1 and AS2, respectively. **Conclusions:** Treatment of human RCC cells with antisense ODNs targeting bcl-2 gene inhibits expression of Bcl-2 protein and induce apoptosis.

[ Key words ] renal cell carcinoma; bcl-2; Antisense oligodeoxynucleotide; apoptosis.

\* 肾细胞癌( renal cell carcinoma, RCC )是泌尿生殖系统发病率第二位的恶性肿瘤,其发病率还有上升的趋势,约 30% 的病人在初诊时已有远处转移。对于残留性、转移性或复发性肾癌,目前尚无有效的治疗方法,放射线治疗不敏感,化疗总有效率仅为 6%,免疫治疗总有效率约 20%,以致于转移性肾癌 5 年存活率仅为 11%<sup>[1]</sup>。

疗成为可能。bcl-2 是原癌基因的一种,所翻译的蛋白可抑制细胞凋亡而促进肿瘤进展。通过向肿瘤内转染反义寡核苷酸,封闭 bcl-2 mRNA 的功能区域,降低 Bcl-2 蛋白的表达,可望达到抑制肿瘤生长的目的。本研究以肾癌细胞株为对象,以阳离子脂质体 Lipofectin

[ 作者简介 ] 高江平( 1960- ),男,河南省镇平县人,副主任医师,副教授,主要从事泌尿生殖系肿瘤研究

癌基因的发现,使得直接针对癌基因的抗肿瘤治

为转染载体,通过转染 bcl-2 mRNA 的反义寡核苷酸,研究反义基因对肾癌细胞株 bcl-2 基因和蛋白表达的抑制作用以及对肾癌细胞株的诱导凋亡作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

肾癌细胞株 ACHN, RCZ, RCW, Caki-1 和 OS-RC-2。用 ATCC 细胞库( <http://www.atcc.org> )推荐的培养液,加入 10% 灭活胎牛血清( FBS, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH ), 37°C, 5% 二氧化碳培养。在细胞对数生长期收获并用于后续实验。

### 1.2 反转录-聚合酶链反应( RT-PCR )测定 bcl-2 mRNA

使用 ISOGEN RNA Kit ( ISOGEN, Toyama, Japan )提取总 RNA。使用 Takara RNA LA PCR kit v1.1 ( Takara Shuzo, Otsu, Japan ),并按说明反转录合成 cDNA,然后稀释 1 倍。PCR 反应液含 5  $\mu$ l RT 产物, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\times$  RNA PCR 缓冲液, 10 mmol/L dNTP, 20 pM bcl-2 和  $\beta$ -actin 引物( Takara )和 2.5 U Taq ( Takara ),总体积为 50  $\mu$ l, 反应时间 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min 共 35 循环。PCR 产物行 3% 琼脂电泳。重复实验 1 次。

### 1.3 寡核苷酸

分别设计 bcl-2 mRNA 翻译起始端( ODNs-AS1, 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3' ), 编码区( ODNs-AS2, 5'-AATCCTCCCCAGTTCACCC-3' )互补的反义寡核苷酸,及相对应的正义寡核苷酸( S1, S2 ),合成、硫代修饰及纯化( Espec Oligo Inc., Japan )。应用 BLASTN 检索 GenBank, European Molecular Biology Laboratory ( EMBL ), DNA Data Bank of Japan( DDBJ )和 Protein Data Bank ( PDB )等基因库,所设计的反义寡核苷酸与已知的人类基因无同源性。

### 1.4 寡核苷酸转染

应用阳离子脂质体 Lipofectin( Life Technologies ),实验前以无血清的培养液稀释,终浓度为 10  $\mu$ g/ml,加入寡核苷酸室温下混合 15 min<sup>[2]</sup>。

### 1.5 Bcl-2 蛋白测定

采用 Western 杂交法测定,ACHN 细胞分别在加入 150 nmol/L AS1, S1, AS2 或 S2 寡核苷酸和 Lipofectin 10  $\mu$ g/ml 下培养,分别以未加入寡核苷酸及 Lipofectin,或仅加入 Lipofectin 的细胞为对照,48 h 收获细胞,加入溶解液,收获蛋白液,BCA 蛋白测定盒( Pierce Chemical Co., IL ),测定蛋白浓度。蛋白提取液( 20  $\mu$ g )行 12% SDS-多聚丙烯酰胺电泳,并转移至硝化纤维素膜( Millipore, Tokyo, Japan )。用含 10% 脱脂奶粉

的 PBS 4°C 过夜封闭,然后分别以 1:1 000 鼠抗人 bcl-2 单抗( Clone 124, DAKO, Denmark ),或 1:5 000 鼠抗人  $\beta$ -actin 单抗( Clone AC-74, Sigma )孵育 1 h。为测定一抗,用标记辣根过氧化酶的抗鼠 IgG( Santa Cruz Biotechnology )作为二抗,增强化学发光法( ECL kit, Amersham Life Science, England )测定免疫复合物,平板扫描测定蛋白的相对浓度, $\beta$ -actin 作为内参照。

### 1.6 细胞凋亡的流式细胞测定

ACHN 细胞分别在加入 150 nmol/L AS1, S1, AS2 或 S2 寡核苷酸和 Lipofectin 10  $\mu$ g/ml 下培养,单纯培养液及 Lipofectin 10  $\mu$ g/ml 作为对照,培养 48 h。收获的细胞 PBS 洗涤,80% 甲醇 PBS 液 4°C 固定 30 min,含 RNase A 75 KU/ml 和 PI 50  $\mu$ g/ml ( Sigma )的染液染色,流式细胞仪( Becton Dickinson, Cell Quest V. 3.1 )测定,每一标本计数 2 万个细胞,以直方图分析,亚 G<sub>1</sub> 期细胞作为凋亡细胞,实验至少重复 2 次。

## 2 结果

### 2.1 肾癌细胞株 bcl-2 mRNA 的表达

ACHN, RCW, RCZ, Caki-1 和 OS-RC-2 5 种细胞均有稳定的 bcl-2 mRNA 表达,提示所测定的肾癌细胞株均有 bcl-2 mRNA 的表达( 图 1 )。因 ACHN 细胞株培养及 bcl-2 mRNA 和蛋白表达均较稳定,故选择 ACHN 细胞株进行后续实验。

图 1 反转录聚合酶链反应( RT-PCR )测定 bcl-2 mRNA: 5 种肾癌细胞株均有稳定的 bcl-2 mRNA 表达

**Fig. 1 Reverse transcription-polymerase chain reaction ( RT-PCR ) analysis of bcl-2 mRNA: Expression of bcl-2 mRNA readily in all five RCC cell lines**  
1: Marker; 2: OS-RC-2; 3: Caki-1; 4: RCW; 5: RCZ; 6: ACHN.  $\beta$ -actin as control

### 2.2 反义寡核苷酸对 Bcl-2 蛋白的抑制作用

转染的 AS1 和 AS2 对 ACHN 细胞 Bcl-2 蛋白的表达均有明显的抑制作用,而 S1 和 S2 对 Bcl-2 蛋白的表达无明显影响( 图 2 )。表明所设计的 bcl-2 mRNA 翻译起始端和编码区的反义寡核苷酸可抑制肾癌细胞株 Bcl-2 蛋白的表达。

### 2.3 反义寡核苷酸对肾癌细胞凋亡的诱导作用

在处理后的 48 h, AS1 和 AS2 分别诱导 32.1% 和 43.2% 的 ACHN 细胞凋亡, 而未处理或仅加入 Lipofectin 及 S1 和 S2 处理的细胞, 凋亡细胞仅占 5.7%, 6.6%, 5.9% 和 11.4% (图 3), 表明所设计的 bcl-2 mRNA 翻译起始端和编码区的反义寡核苷酸可诱导肾癌细胞的凋亡。

图 2 Western 杂交法测定 Bcl-2 蛋白的表达: 转染的 AS1 和 AS2 对 ACHN 细胞 Bcl-2 蛋白的表达均有明显的抑制作用, 而 S1 和 S2 对 Bcl-2 蛋白的表达无明显影响

Fig. 2 Western blot analysis of Bcl-2 protein: The Bcl-2 protein decreased in cells treated with transfected AS1 and AS2, but S1 and S2

1: Control; 2: Lipofectin; 3: AS1; 4: S1; 5: AS2; 6: S2

图 3 流式细胞术测定细胞凋亡: AS1 和 AS2 分别诱导 32.1% 和 43.2% 的 ACHN 细胞凋亡, 而对照组无明显变化

Fig. 3 FACS analysis of apoptosis: Transfected AS1 and AS2 induced apoptosis in 32.1% and 43.2% of the ACHN cells, respectively

### 3 讨论

Bcl-2 蛋白通过阻止细胞的凋亡而阻止细胞死亡。由于肿瘤是一种增殖和分化紊乱的疾病, 所以新的治疗策略之一就是诱导肿瘤细胞的凋亡。已有研究显示, 许多肿瘤, 如结肠癌、肾癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、神经母细胞瘤及淋巴瘤等, 表达高水平的 bcl-2。有关肾癌 Bcl-2 蛋白表达的免疫组化研究结果相差较大, 阳性表达率为 7% ~ 80%<sup>[3-4]</sup>。我们通过免疫组化染色发现, 肾癌 Bcl-2 蛋白的阳性率为 46.0% (52/113 例)<sup>[5]</sup>。另外本研究中 5 种肾癌细胞株均有 bcl-2 mRNA 的表达。还有研究显示, Bcl-2 的阳性表达有预后的不良的趋势<sup>[6]</sup>。

对于 Bcl-2 过度表达肿瘤的治疗策略之一就是减少 Bcl-2 的水平。反义寡核苷酸是化学修饰的、与靶基因 mRNA 互补的单链 DNA, 通过形成 RNA:DNA 双链复合物, 减少靶基因产物的生成。已有研究显示 bcl-2 反义寡核苷酸可诱导肺癌、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及胆管癌等肿瘤细胞的凋亡, 抑制其生长。bcl-2 反义基因治疗已应用于复发性非何杰金淋巴瘤的临床治疗, 取得了令人鼓舞的结果<sup>[7]</sup>。

本研究中, 5 个肾癌细胞均表达 bcl-2 mRNA, 且 bcl-2 反义寡核苷酸可抑制其生长。Ziegler 等<sup>[8]</sup>测定了 13 个针对 bcl-2 不同区域的反义寡核苷酸对肺癌细胞的抑制效率, 发现与编码区互补的 ODN2009 (本研究中的 AS2) 抑制效率最强。已应用于淋巴瘤治疗的是与翻译起始点互补的反义寡核苷酸, 即本研究中的 AS1。

体外及体内实验表明, bcl-2 反义寡核苷酸与化疗药物合用, 对小细胞肺癌<sup>[8]</sup>及黑色素瘤细胞<sup>[9]</sup>的生长有协同抑制作用。体外和体内实验以及临床应用表明, bcl-2 反义寡核苷酸对多种肿瘤细胞有抑制 Bcl-2 蛋白表达、诱导凋亡和抑制生长的作用。本实验结果显示, bcl-2 反义寡核苷酸通过封闭 bcl-2 基因的功能区域, 抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 诱导肾癌细胞的凋亡, 进而抑制肾癌细胞的生长。

本研究为肾癌的反义基因治疗提供了实验基础。但仍有问题需要解决, 如脂质体的转染效率较低, 大量合成寡核苷酸的价格昂贵等。我们期待建立第三代寡核苷酸及更有效的转染系统, 以使反义基因治疗更好地应用于临床。

#### [参考文献]

[1] Guinan PD, Vogelzang NJ, Fremgen AM, et al. Renal cell carcinoma: Tumor size, stage and survival[J]. J Urol, 1995, 153: 901.

- [ 2 ] 高江平, 郝好杰, 宋涛, 等. 人肾细胞癌细胞阳离子脂质体的转染效率[ J ]. 生物技术通讯, 2000, 11(1): 26.
- [ 3 ] Lipponen P, Eskelinen M, Synjanen K, *et al.* Expression of tumor-suppressor gene Rb, apoptosis-suppressing protein Bcl-2 and c-Myc have no independent prognostic value in renal adenocarcinoma[ J ]. Br J Cancer, 1995, 71: 863-867.
- [ 4 ] Huang A, Fone PD, Gandour-Edwards R, *et al.* Immunohistochemical analysis of Bcl-2 protein expression in renal cell carcinoma. J Urol, 1999, 162: 610-613.
- [ 5 ] 何学西, 高江平, 宋勇, 等. 肾癌组织中 Bcl-2 和 P53 蛋白的表达及临床意义[ J ]. 中华泌尿外科杂志, 2000, 21(6): 377.
- [ 6 ] Vasavada SP, Novick AC, Williams BRG, *et al.* P53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma[ J ]. Urology, 1998, 57: 1057-1061.
- [ 7 ] Webb A, Cunningham D, Cotter F, *et al.* Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma[ J ]. Lancet, 1997, 349: 1137-1141.
- [ 8 ] Zieger A, Luedke GH, Fabbro D, *et al.* Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting Bcl-2 coding sequence[ J ]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89: 1027-1036.
- [ 9 ] Salomons GS, Brady HJ, Verwijs-Janssen M, *et al.* The bax alpha: Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly in childhood acute leukaemia[ J ]. Int J Cancer, 1997, 71: 959-965.

[ 收稿日期 ] 2003 - 07 - 23

[ 修回日期 ] 2003 - 09 - 25

## · 研究简报 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X(2004)01-0017-01

# 应用组织芯片检测子宫颈癌组织中抗凋亡基因 bag-1 的表达

师建国<sup>1</sup>, 闫庆国<sup>1</sup>, 严晓昱<sup>1</sup>, 林雨冬<sup>2</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 王文勇<sup>1</sup>, 王文亮<sup>1</sup>(1. 第四军医大学病理学教研室, 西安 710032; 2. 第九十五医院外科, 福建 莆田 351100)

子宫颈癌是妇科比较常见的恶性肿瘤之一, 其病因及发病机制不清。近年来, 随着细胞分子生物学研究的深入, 发现肿瘤的发生发展不仅取决于细胞的增殖速率, 而且与细胞凋亡有一定关系, 本实验通过对宫颈癌组织芯片进行凋亡相关基因 bag-1 检测, 探讨宫颈癌的发病机制。Bag-1 是一种已经被确认的多功能结合蛋白, 具有抗细胞凋亡的能力, 该蛋白质为一种由 219 个氨基酸残基组成的酸性蛋白质。其中谷氨酸含量丰富, 提示它可能结合钙离子, 但是与其他钙结合蛋白间无明显同源性。转染实验发现, 单独高表达 bag-1 的人淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞不能有效阻止某些刺激剂, 如蛋白激酶抑制剂, 细胞毒性 T 细胞诱导的细胞凋亡, 但是若同时存在 bcl-2 的高表达, 则这些刺激诱导物诱导 Jurkat 细胞凋亡能力明显下降。结果提示, 在某些 bcl-2 非依赖的凋亡诱导途径中, 可能需要 bcl-2 与 bag-1 联合。但是 Bag-1 蛋白与 bcl-2 其它家族的成员间无明显序列同源性。因此 bag-1 并非是 bcl-2 家族中的一员。它代表一种新型的死亡凋亡蛋白。检测宫颈癌中 bag-1 在宫颈癌中的表达情况, 进一步研究宫颈癌细胞凋亡途径, 从而对揭示肿瘤发生、发展的机制有着十分重要的意义。我们应用免疫组化染色方法在组织芯片中检测子宫颈癌患者、慢性宫颈炎并黏膜上皮增生和正常宫颈组织中 bag-1 的表达情况。

子宫颈癌、慢性宫颈炎并黏膜上皮增生组织、正常宫颈组织芯片购自 Cybrdi 公司, 23 例患者, 共 63 块组织, 平均年龄在 49 岁。芯片直径 1.5 mm, 厚度 5.0  $\mu\text{m}$ 。包括鳞癌 20

例, 腺癌 3 例, 慢性宫颈炎并黏膜上皮增生组织 23 例, 正常组织 12 例。采用免疫组化 DAKO Envision 系统, 切片常规脱蜡至水, 过氧化氢封闭; 尿素消化; 滴加兔抗人 bag-1 多克隆抗体, 过夜后滴加抗兔 Envision 复合物, 阴性对照为 PBS 替代一抗和正常兔血清替代一抗的空白对照。

本实验结果表明, bag-1 经免疫组化 DAKO Envision 染色呈棕黄色颗粒状, bag-1 表达主要定位于阳性细胞的胞浆, 少数位于胞核中。在子宫颈癌组织中、慢性宫颈炎并黏膜上皮增生组织及正常子宫组织中存在 bag-1 的表达, 但表达程度不同, 子宫颈癌中 bag-1 的阳性率为 52.2%, 慢性宫颈炎并黏膜上皮增生组织阳性率为 13.0% 和正常宫颈组织阳性率为 8.3%, 3 种组织状态下 bag-1 的表达具有显著性差异 ( $X^2$  检验,  $P < 0.05$ ), 即 bag-1 在子宫颈癌组织中高表达; 而慢性宫颈炎并黏膜上皮增生组织与正常宫颈组织中 Bag-1 表达率没有显著性差异 ( $X^2$  检验,  $P > 0.05$ ), 在正常宫颈组织中只有很低的表达。结果提示 bag-1 蛋白可能通过抑制细胞凋亡而参与子宫颈癌的发生与发展, 子宫颈癌的发生发展可能与凋亡相关基因 bag-1 有关, 至于 bag-1 高表达的原因如何, 待做进一步研究。

[ 关键词 ] bag-1; 子宫颈癌; 细胞凋亡; 免疫组化; 组织芯片

[ 中图分类号 ] R737.9

[ 文献标识码 ] D

[ 收稿日期 ] 2003 - 12 - 12

[ 修回日期 ] 2004 - 02 - 08