

作用机制之一,为理想的温热治疗肿瘤的协同合并作用药物,但其使细胞内大量某 70kDa 蛋白堆积现象有待进一步探讨。

关键词:吐温 80 HeLa 细胞 HSP70
Western-blotting LPS PGE1

参 考 文 献

- [1] 宓容钦,1981,生物化学与生物物理学报,13:245.
- [2] 杨虎川等,1992,中华肿瘤杂志,14:179.
- [3] Wei-YQ. et al.,1995,*Cancer Immunol. Immunother.*,40:73.
- [4] Carmichael,J. et al.,1987,*Cancer Res.*,47:936.
- [5] Malek TR. et al.,1983,*Proc Natl Acad Sci UL. S. A.*,80:5694.
- [6] Davis LG. et al.,1994,*Basic Method in Molecular Biolog.*,P680-690.
- [7] Naik SP., Samsonoff WA. and Ruck RE. 1988,*Diagn-Microbiol-Infect-Dis.*,11:11-9.
- [8] Kaufmann S. H. E.,1990,*Immunol. Today*,11:29.
- [9] Tamura Y. et al.,1993,*Journal of Immunology*,151:5516.
- [10] Ohtsuka K. and Laszlo A.,1992,*Exp. Cell Res.*,202:507.

THE INHIBITIVE EFFECTS OF TWEEN80 ON THE HELA CELL LINE IN VITRO

PIAO Wen Ji YANG Hu Chuan YANG Yao Qin TAO Hui Hong CHEN Bin
(Tumor Cell Lab., Medical College, Shanghai Tiedao University, Shanghai 200070)

ABSTRACT

The inhibitive effects of Tween80 on the HeLa cell line in vitro were studied. The inhibition rates of the Tween80 in different concentrations, Lipopolysaccharide (LPS) and ProstaglandinE1 (PGE1) to the cultured HeLa cells were observed through the MTT cytobiological method and the Heat Shock Protein70 (HSP70) expression of the treated cell lysates was detected with the methods of SDS-PAGE and Western-blotting. The HeLa cells were killed by 0.02% Tween80 significantly, which had almost no expression of HSP70, while the HeLa cells in ordinary condition has a constitutive level of HSP70 expression, moreover, a certain unknown 70kD protein was accumulated in the Tween80-treated HeLa cells, implicating that the inhibitive effects of Tween80 to HSP70 expression cause the death of HeLa cells, with a kind of 70kD protein accumulating; LPS and PGE1 had no inhibitive or cytotoxic effects to the HeLa cells which had no changes of HSP70 expression and even no synergistic effects with Tween80. The significant inhibitive effects of Tween80 to the HSP70 expression may be the one of the cytotoxic mechanisms of Tween80 on the HeLa cell line. In combination with the other therapeutic method, especially the hyperthermia, Tween80 may play an important role in clinical anti-tumor therapy. But the phenomena of the accumulation of the 70kD protein in HeLa cell requires further investigation.

KEY WORDS: Tween80 HeLa cell HSP70 Western-blotting LPS PGE1

mdr-1 和 bcl-2 基因在 K562/ADM 多药耐药细胞中的共表达*

卢步峰** 朱正美 于丽敏 王淑婷 杨佩满

(大连医科大学辽宁省细胞分子生物学重点实验室 大连 116027)

肿瘤细胞对化疗药产生多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是临床肿瘤化疗失败的主要原因之一。已确认 mdr-1 基因及其编码

*国家自然科学基金资助项目 No. 39170853.

**现在中科院上海细胞所。

蛋白 P-170 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的过度表达是肿瘤细胞产生 MDR 的主要机制之一^[1]。然而,也有报道指出,肿瘤细胞的耐药程度与 P-gp 的表达高低并无显著相关性^[2]。近年来,在肿瘤细胞凋亡的研究中已发现,很多肿瘤在以 *mdr-1* 及 P-gp 为特征的经典 MDR 形成后,其化疗药诱导该细胞凋亡的作用也相应受阻^[3],提示肿瘤细胞耐药形成与凋亡发生存在着密切的关系。本研究以人红白血病耐药细胞株 K562/ADM 作为实验模型,观察其在 *mdr-1* 过度表达时凋亡抑制基因 *bcl-2* 和促进基因 *bax* 及其编码蛋白是否可能共表达,旨在进一步探讨肿瘤细胞 MDR 形成的分子机理。

材料和方法

1. 药品和试剂

阿霉素 (adriamycin, ADM) (意大利爱宝大药厂产品); 四氮甲唑蓝 (MTT), β -巯基乙醇 (Merck 产品); 十二烷基肌氨酸钠, 焦碳酸乙二酯 (DEPC) (Sigma 产品); 异硫氰酸胍 (Serva 产品); AMV 逆转录酶, Taq 酶, 随机引物, 琼脂糖 (Promega 产品); PCR markers, RNA 酶抑制剂 (RNase), Triton X-100, dNTPs, 溴化乙锭 (EB), 饱和重蒸酚 (华美生物工程公司产品); 抗 Bcl-2 单抗 (鼠抗人) 和抗 Bax 多抗 (兔抗人) (Santa Cruz Biotechnol, Inc. 产品); FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 和抗兔 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. 产品); 抗 P-gp 单抗 (鼠抗人) (Zymed Laboratories, Inc. 产品); RPMI-1640 培养基 (Gibco-BRL 产品); 小牛血清 (杭州四季青生物材料工程公司产品)。其余试剂均为国产分析纯。

2. 细胞培养

人红白血病细胞株 K562 及其耐药株 K562/ADM 均由本室提供, K562/ADM 细胞是本室用逐渐提高 ADM 浓度的方法获得的 MDR 细胞株, 已证实其除对 ADM 耐药外, 对长春新碱、消瘤芥、顺氯氨铂也有交叉耐药性。K562 细胞常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基 (青霉素 100U/ml, 链霉素 100 μ g/ml, 谷氨酰胺 110 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 95%O₂/5%CO₂) 中 (SHEL · LAB 2300 型 CO₂ 培养箱)。K562/ADM 耐药细胞株的培养除上述条件外, 需加入 ADM (1.0 μ g/ml) 做维持培养。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。

3. MTT 法检测细胞药敏性: 按参考文献^[4]进行。

4. 间接免疫荧光法流式细胞术检测 P-gp 和 Bcl-2 蛋白表达

取对数生长期 K562 和 K562/ADM 细胞, PBS 洗 2 次, 70% 冰乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜。临测前, 取样品弃乙醇, PBS 洗 2 次, 加入含 0.2% BSA/0.05% NaN₃ (P-gp 检测) 或 0.5% Tween 20 (Bcl-2 和 Bax 检测)/PBS 稀释的第一抗体 (抗 P-gp 或抗 Bcl-2 单抗或抗 Bax 多抗, 1:40) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 湿盒作用 30min, PBS 洗 1 次, 将沉淀混匀, 加入含 0.2% BSA/0.05% NaN₃ (P-gp 检测) 或 0.5% Tween 20 (Bcl-2 和 Bax 检测)/1% 正常山羊血清/PBS 稀释的 FITC 标记的第二抗体 (1:5000) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 湿盒避光作用 30min, PBS 洗 1 次, 于流式细胞仪 (EPISXL, Coulter) 上进行荧光检测。每份样品作 3 管, 每次测定 10,000 个细胞, 并给出相应的阳性表达率。同时用正常山羊血清取代第一抗体, 作为阴性对照。

5. RT-PCR 检测 *mdr-1* 和 *bcl-2* 基因表达^[5]

总 RNA 提取: 取对数生长期 K562 和 K562/ADM 细胞, 采用异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA。从中取部分分别作甲醛变性电泳鉴定 RNA 质量和紫外分光光度计测定 RNA 含量, 分析 RNA 纯度。其余置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR 引物的设计与合成: PCR 引物由美国科罗拉多州大学生化系合成提供。其中 *mdr-1* 引物序列分别为: 上游 5'-CCCATCATTGCAATAGCA-3', 下游 5'-TTCAAACCTCTGCTCCTG-3' (2596-2751)^[6], 扩增片段为 166bp; *bcl-2* 引物序列分别为: 上游 5'-ACGACTTCTCCCGCCGCTA-3', 下游 5'-GGA-GAAATCAAACAGAGG-3' (305-609)^[7], 扩增片段为 335bp。

cDNA 合成: 取 4.0 μ g 总 RNA 合成 cDNA, 总反应体积 20 μ l, 内含 2.5mmol/L dNTPs 8 μ l, AMV 逆转录酶 20U, RNasin 20U, 5 \times 逆转录酶缓冲液 4 μ l, 随机引物 100ng, 42 $^{\circ}$ C 反应 60min, 95 $^{\circ}$ C 加热 10min 使逆转录酶灭活, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR: 在 50 μ l 反应体系中, 含上述逆转录产物 10 μ l, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ l, PCR 引物各 20pmol, Taq 酶 1.25U, 去离子水补足体积, 再加 50 μ l 液体石蜡覆盖, 置 DNA Thermal Cycler PCR 仪 (PERKIN ELMER CETUS) 中, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后, 再扩增 30 个循环, 条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 50 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min30S, 每个循环的延长时间增加 1S, 循环完毕后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, PCR 扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。取 10 μ l

扩增产物在 2.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5% $\mu\text{g/ml}$) 上电泳 1h (60V), 用 PCR markers 作 DNA 分子量参照, 以确定扩增产物片段的碱基数, F-501 型多功能紫外透射仪下观察照相。

结 果

1. K562 和 K562/ADM 细胞对 ADM 的药敏性

与 K562 细胞对 ADM 的 IC_{50} (0.055 \pm 0.02 $\mu\text{g/ml}$) 相比, K562/ADM 细胞对 ADM 具有明显的抗性 (IC_{50} 为 2.16 \pm 0.18 $\mu\text{g/ml}$), 抗性倍数约为 40 倍。

2. *mdr-1*、*bcl-2* 和 *bax* 基因及其编码蛋白在 K562/ADM 细胞中的共表达

采用间接免疫荧光法流式细胞术检测 K562/ADM 细胞中 P-gp、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达见表 1, 图 1。与 K562 细胞相比, 在 K562/ADM 细胞中, 在 P-gp 过度表达 (约 100 倍) 时, Bcl-2 的表达也呈强阳性 (约 11 倍); Bax 在两种细胞中均表达强阳性, 但无显著差异 ($P > 0.05$)。与此同时, 采用免疫酶细胞化学法对 Bcl-2 和 Bax 的定性检测所得结果相同 (未显示资料)。进一步, 在 *mdr-1* 和 *bcl-2* 的 mRNA 水平上, 采用 RT-PCR 进行研究显示, 相对于 K562/ADM 细胞中的过表达, K562 细胞中 *mdr-1* 表达完全呈阴性, 而 *bcl-2* 表达呈弱阳性 (图 2)。

表 1 P-gp、Bcl-2 和 Bax 蛋白在 K562 和 K562/ADM 细胞中的表达

蛋白	阳性率 (%)	
	K562	K562/ADM
P-gp	0.7 \pm 0.4	68.1 \pm 3.4**
Bcl-2	7.9 \pm 0.7	88.6 \pm 4.2**
Bax	80.2 \pm 4.8	81.4 \pm 2.9

** $P < 0.01$, 与 K562 组相比较。 $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 3$ 。

讨 论

MDR 形成是肿瘤细胞免受化疗药物攻击的最重要的细胞防御机制, 其形成机制十分复杂, 其中研究较深入并普遍被接受的是 *mdr-1*

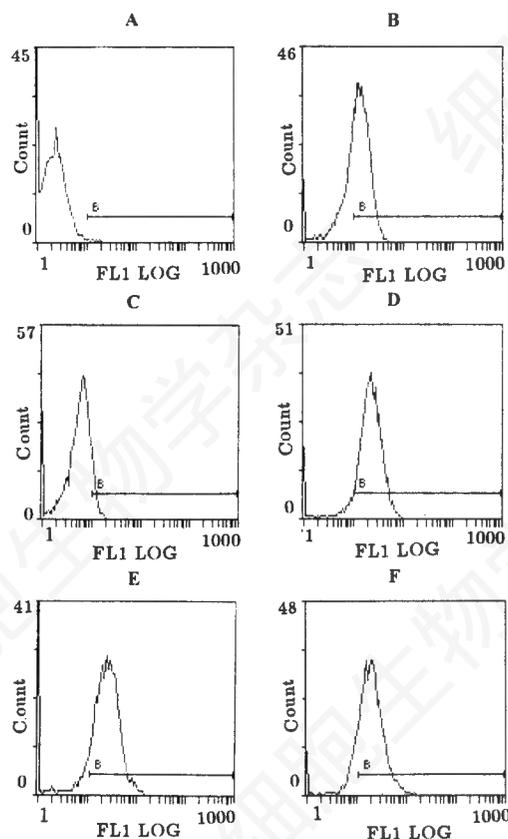


图 1 P-gp (A, B) Bcl-2 (C, D) 和 Bax (E, F) 蛋白在 K562 和 K562/ADM 细胞中的表达
图中 B 的组别分别代表各蛋白表达的阳性率 (见表 1)。

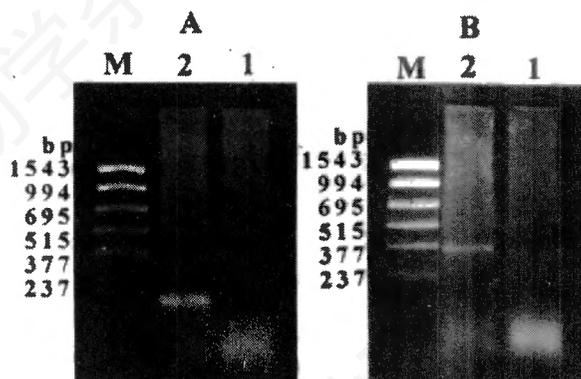


图 2 *mdr-1* (A, 166bp) 和 *bcl-2* (B, 335bp) 基因在 K562 和 K562/ADM 细胞中的表达
M. PCR markers; 1. K562 细胞; 2. K562/ADM 细胞。

及其编码蛋白 P-gp 的过度表达^[1]。然而,也有报道指出,肿瘤细胞的耐药程度与 P-gp 的表达高低并无显著相关性^[2]。胡讯等^[9]用可完全抑制 P-gp 药泵功能的钙通道抑制剂异博定(verapamil, Ver)观察 MDR 细胞内药物浓度恢复与其耐药逆转的相关性,也证明 P-gp 的过度表达不能完全解释 MDR 细胞株的抗药性,提示肿瘤细胞产生 MDR 的机制尚未完全阐明。

细胞凋亡是目前细胞生物学的研究热点之一。已发现作为一种细胞内源性基因调控下的生理性细胞死亡方式,其过程发生障碍不仅是肿瘤发生的主要机制之一,而且也与肿瘤治疗和耐药性的形成密切相关。目前认为,各种化学结构不同、作用机制各异的抗肿瘤药物均可能诱导细胞凋亡,肿瘤细胞 MDR 形成与凋亡受阻存在着密切的关系。本室研究也证实,经 ADM 诱发人红白血病细胞株 K562 产生的以 *mdr-1* 及 P-gp 过度表达为特征的耐药株 K562/ADM,在其对 ADM 抑制细胞生长的作用产生抗性时,对 ADM 诱导细胞凋亡的作用也明显耐受(资料未显示)。

近来,许多实验已证明,凋亡抑制基因 *bcl-2* 是细胞凋亡的关键调控物。已证实包括约 20% 的急性粒细胞白血病(AML)和约 70% 的慢性淋巴细胞白血病(CLL)在内的许多肿瘤细胞存在 *bcl-2* 的高表达,并已发现这种 *bcl-2* 高表达的 AML 细胞对化疗药敏感性较差^[9]。在体外实验,用基因转染方法使 *Bcl-2* 在某些白血病或实体瘤株(含低水平 *Bcl-2* 蛋白)中过度表达,以及通过反义寡核苷酸途径在含 *Bcl-2* 基因从正常第 18 号染色体易位到第 14 号染色体 t(14;18)的淋巴瘤细胞株(含高水平 *Bcl-2* 蛋白)中降低 *Bcl-2* 水平的许多研究结果均显示,细胞内 *Bcl-2* 水平的高低直接影响到其对多种化疗药及 γ -射线的敏感性和耐受性,并且那些经转染使 *Bcl-2* 蛋白水平升高引发耐药形成的肿瘤细胞株本身并无 P-gp 过度表达,证明的确存在着不同于经典 MDR 形成的其他重要机制^[9]。由 *bax* 基因编码的 *Bax* 与 *Bcl-2* 具

21% 的氨基酸同源性,可自身形成同二聚体或多聚体而以某种尚不明确的途径促进细胞凋亡,也可与 *Bcl-2* 形成异二聚体以调节 *Bcl-2* 活性^[9]。因此常用两者相对之比(*Bcl-2/Bax*)代表细胞对凋亡诱导的调节。

如前所述,尽管众多研究已分别证明肿瘤耐药形成与 P-gp 或 *Bcl-2* 的过度表达均直接相关,但有关 P-gp 及 *Bcl-2* 在肿瘤细胞 MDR 中的关系及其相互作用的研究国内外均少有报道。本研究结果发现,在 K562/ADM 细胞中,与敏感株 K562 相比,伴随以 *mdr-1* 及 P-gp 过度表达为特征的 MDR 形成,其 *bcl-2* 及 *Bcl-2* 也呈过度表达,其中 *Bcl-2* 的表达阳性率均为相应敏感株 K562 的 11 倍,而 *Bax* 在两种细胞中均呈阳性表达,但无显著差异,其相应的 *Bcl-2/Bax* 比值仍是 K562/ADM 细胞远高于 K562 细胞,提示凋亡抑制基因 *Bcl-2* 及其编码蛋白 *Bcl-2* 的过度表达可能正是 K562/ADM 细胞 MDR 形成后细胞凋亡耐受的分子基础。与本研究结果类似,最近 Huang 等报道^[10]也发现,在由化疗药紫杉醇(*taxol*, TAX)和长春新碱(*vincristine*, VCR)分别诱发 HL-60 细胞(人急性粒细胞白血病细胞株)而产生的相应 MDR 细胞 HL-60/TAX1000 和 HL-60/VCR 中,伴随 P-gp 的过度表达,与敏感株 HL-60 相比,*Bcl-2* 在相应耐药株的表达增高 1.5—2.5 倍,而 *Bax* 的表达则与敏感株无显著差异。Kin 等^[11]和 Bosanquist 等^[12]则在临床人神经胚细胞瘤和人 CLL 及 AML 病人中分别观察到 *mdr-1* 和 *bcl-2* 在相同细胞中的共表达。从而进一步证明由 *bcl-2* 过度表达引发的细胞凋亡耐受可能参与了肿瘤细胞 MDR 的形成。

摘 要

为探讨肿瘤细胞多药耐药(MDR)形成的分子机理,本文观察了 *mdr-1*、*bcl-2* 和 *bax* 基因及其编码蛋白在人红白血病细胞株 K562/ADM 中的可能共表达。结果显示,在 K562/ADM 细胞中,在以 *mdr-1* 及 P-gp 过度表达为

特征的 MDR 形成时,其 bcl-2 及产物 Bcl-2 也过度表达,其中 Bcl-2 的表达阳性率约为相应敏感株 K562 的 11 倍;而 Bax 在二种细胞中均呈阳性表达,但无显著差异($P > 0.05$),提示 bcl-2 基因在 mRNA 和蛋白水平上的过度表达可能是 K562/ADM 细胞 MDR 形成时细胞凋亡耐受的分子基础。

关键词:多药耐药性 人红白血病细胞 mdr-1
bcl-2

参 考 文 献

- [1] Juliano, R. S., et al., 1976, *Biochim. Biophys. Acta.* 455:152-162.
[2] Huet, S., et al., 1992, *Br. J. Cancer*, 65:538-544.

- [3] Bourgeois, S., et al., 1993, *Mol. Endocrinol.*, 7:840-851.
[4] Hu, X. and W. Y. Chen, 1994, *Acta, Pharmacol. Sin.*, 3:275-279.
[5] 萨姆布鲁克等, 1996, 分子克隆实验指南(第二版), 科学出版社, 北京.
[6] Chen, C. J., et al., 1986, *Cell*, 47(7):381-389.
[7] Tsujimoto, Y. and C. M. Croce, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5214-5218.
[8] 胡汛等, 1995, 中华肿瘤杂志, 17(2):85-88.
[9] 卢步峰等, 1998, 解剖科学进展, 4(1):54-59.
[10] Huang, Y., et al., 1997, *Leukemia*, 11:253-257.
[11] Kim, C. J., et al., 1995, *Pathol. Res. Pract.*, 191(10):1010-1015.
[12] Bosanquet, A. G., et al., 1996, *Leuk. Lymphoma*, 24(1-2):141-147.

CO-EXPRESSION OF MDR-1 AND BCL-2 GENES IN A MULTIDRUG RESISTANCE CELL VARIANT K562/ADM

LU Bu Feng ZHU Zheng Mei YU Li Min WANG Shu Ting YANG Pei Man

(Key Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Liaoning Province,
Dalian Medical University, Dalian 116027)

ABSTRACT

To explore the molecular mechanisms of P-glycoprotein(P-gp)-mediated multidrug resistance (MDR), co-expression of mdr-1, bcl-2, bax genes and their protein products in a MDR human erythroleukemia cell variant K562/ADM was observed respectively. The results show that accompanied by overexpression of mdr-1 gene and its protein product P-gp (about 100-fold), bcl-2 gene and its protein product Bcl-2 (about 11 fold) also overexpress in K562/ADM cell as compared with K562 cell line. However, there is an expression of Bax protein in K562 and K562/ADM cell lines, but no significant difference between above both cell lines ($P > 0.05$). These results suggest that overexpression of bcl-2 gene in both mRNA and protein levels may be the molecular basis of the resistance of MDR K562/ADM cell line to apoptosis induced by ADM.

Key words: Multidrug resistance Human erythroleukemia cell mdr-1 bcl-2

大肠癌相关抗原 LEA 的血清学诊断*

王曾蕴 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室 沈阳 110001)

大肠癌是常见的恶性高发肿瘤之一。在我国,据预测到 2000 年,大肠癌的发病率可能仅次于肺癌和胃癌,居恶性肿瘤第三位^[1]。早期大肠癌治疗的效果较好,进展期的大肠癌预后很差,其生存率的提高有赖于二级预防,即检出可治疗的癌前病变或早期癌。因此寻找特异性,敏感性高的大肠癌标记物是提高防治的重要手段

之一。目前,CEA 是大肠癌诊断中常用的蛋白类标志物,但其灵敏度、特异性、早期诊断阳性率尚不理想,多用于大肠癌的术后复发和转移的判断,不能用于无症状病人的普查和恶性肿瘤的早期发现。LEA (large external antigen) 是

* 国家“八五”科技攻关项目, 85-722-18-02。