

· 基础研究 ·

脉冲强磁场对膀胱肿瘤 BIU-87 细胞生长相关基因表达的影响

刘琦 马艳 李洁 许建丽 李祖虹 章志超

【摘要】目的 研究脉冲强磁场对人膀胱肿瘤 BIU-87 细胞生长相关基因表达的影响。**方法** 将体外培养的人膀胱肿瘤 BIU-87 细胞分为磁场组及对照组。磁场组细胞给予脉冲强磁场干预(磁场强度为 8 T, 频率为 15 Hz), 每天持续干预 2 h; 对照组细胞亦置于相同环境中, 但未给予曝磁处理。分别于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)技术检测各组细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2(Bcl-2)、促凋亡基因(Bax)及凋亡促进因子-3(caspase-3)mRNA 表达, 采用流式细胞仪检测 Bcl-2、Bax 及 caspase-3 蛋白表达。**结果** 实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后, 发现磁场组 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达在上述各时间点均较对照组明显降低, Bax mRNA 及蛋白表达均较对照组显著增强($P < 0.05$); caspase-3 mRNA 及蛋白表达在上述各时间点组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 脉冲强磁场能抑制膀胱肿瘤 BIU-87 细胞生长, 促其凋亡, 其机制可能与脉冲强磁场促进 Bax mRNA 及蛋白表达、抑制 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达有关。

【关键词】 脉冲强磁场; 膀胱肿瘤细胞; B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2; 促凋亡基因; 凋亡促进因子-3

Effects of a strong pulsed magnetic field on the growth-related gene expression of human bladder cancer BIU-87 cells LIU Qi, MA Yan, LI Jie, XU Jian-li, LI Zu-hong, ZHANG Zhi-chao. Department of Rehabilitation Medicine, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To estimate any influence of strong pulsed magnetic fields on the expression of growth-related genes in human bladder cancer BIU-87 cells. **Methods** Human BIU-87 cells were cultured in vitro and randomly divided into a magnetic field group and a control group. Each group was further divided into 24 h, 48 h and 72 h sub-groups. The magnetic field group cells were exposed to an 8 T magnetic field pulsed at 15 Hz for 2 h every day. The control group cells also placed on the same environment, but not exposed to any strong, pulsed magnetic field. The expression of B cell lymphoma/leukemia gene-2 (Bcl-2) mRNA, Bax mRNA and caspase-3 mRNA was measured with RT-PCR, and flow cytometry was used to evaluate the expression of the Bcl-2, Bax and caspase-3 genes of the tumor cells in vitro. **Results** The expression of Bax mRNA and protein was significantly higher in the cells exposed to the magnetic field than in the control groups. The expression of Bcl-2 mRNA and protein was significantly less. The expression of caspase-3 mRNA and protein in the two groups showed no significant differences. **Conclusions** A strong, pulsed magnetic field can inhibit the growth of bladder tumor BIU-87 cells and promote their apoptosis. The mechanism is probably related with the magnetic field promoting Bax mRNA and protein expression and inhibiting Bcl-2 mRNA and protein expression.

【Key words】 Pulsed magnetic fields; Bladder cancer; B cell lymphoma/leukemia gene-2; Bax; Caspase-3

脉冲磁场是近年来肿瘤学方面研究的热点内容, 其对许多在体及离体肿瘤细胞均表现出抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡等效应^[1-2]。目前大量研究多着重于脉冲强磁场对肿瘤细胞形态学方面的影响^[3-4], 而关于脉冲强磁场对肿瘤细胞生长相关基因表达的影响则鲜见报道。基于上述背景, 本研究采用脉冲强磁场作用于体外培养的人膀胱癌 BIU-87 细胞株, 并分别于磁场作用后不同时间点检测 B 细胞淋巴

瘤/白血病-2 基因(B-cell lymphoma/leukemia 2, Bcl-2)、Bax(bcl-2-associated protein X, Bax)及半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)3 种生长相关基因 mRNA 及蛋白的表达情况, 以探讨脉冲强磁场抑制人膀胱肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡的可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、主要实验试剂及设备

主要实验试剂包括:二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco

公司; Trizol 溶液购自美国 Invitrogen 公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 三种抗体购自美国 Santa Cruz 公司。主要实验设备为电容脉冲磁场仪, 由本院设备科自行设计研发, 磁极横截面积为 $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$, N-S 磁极间距 3 cm, 脉冲磁场峰值强度为 8 T, 脉冲宽度大于 10 ms, 重复频率为 15 Hz。

二、细胞培养

人膀胱移行细胞癌株 BIU-87 由北京医科大学泌尿外科研究所建系并提供, 常规配制培养液, BIU-87 细胞株采用含 10% 胎牛血清的 RMPI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 细胞复苏次日及以后每隔 2 d 更换培养液, 待细胞长至 80% 或接近完全融合成片时用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

三、实验分组及操作

将处于对数生长期的 BIU-87 细胞随机分为对照组及磁场组, 按每孔 200 μl(2×10^4 个/ml)种植于 96 孔细胞培养板上, 每组设 6 个复孔。将磁场组肿瘤细胞置于脉冲强磁场中进行干预, 磁场强度为 8 T, 频率为 15 Hz, 每天作用 2 h, 待磁场干预结束后将细胞重新置于 37 °C、5% CO₂ 环境中继续培养。对照组除不给予脉冲强磁场干预外, 其它操作均与磁场组相同。于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 时分别在倒置相差显微镜下观察各组细胞形态。

四、各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 检测

于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后, 选用实时定量多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达, 首先采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 按照试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA, 以逆转录产物 cDNA 作为 PCR 反应模板, 以人 β-actin 作为内参照, 取 10 μl PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳。Bcl-2 上游引物序列为: 5'-GCAGAGGGCTACGAGTGG-3', 下游引物序列为: 5'-TCAACAGAGGCCATG-3', 扩增片段长度为 561 bp; Bax 上游引物序列为: 5'-CCAGCTGCCTTG-GACTGT-3', 下游引物序列为: 5'-ACCCCTCAAGAC-CACTCTT-3', 扩增片段长度为 479 bp; Caspase-3 上游引物序列为: 5'-GGAGAAATTCAAAGGACGG-3', 下游引物序列为: 5'-AACAAAACAGAAACACGCC-3', 扩增片段长度为 271 bp; 内参照 β-actin 上游引物序列为: 5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3'; 下游引物序列为: 5'-CTCCTGCTGCTGATCCACAT-3', 扩增片段长度为 370 bp。PCR 产物经 Genefinder 染色, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 随后置于紫外灯下成像。采用凝胶扫描仪分析结果, 通过计算 Bcl-2/β-actin、Bax/β-actin 及 Caspase-3/β-actin 比值, 以表示 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3

基因 mRNA 的相对含量。

五、各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白检测

采用流式细胞仪检测各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白表达情况。于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后, 离心、收集磁场组及对照组细胞, 经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤、冷乙醇固定后, 加入 200 μl PBS 液稀释的抗人 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 单克隆抗体, 轻吹混匀, 于 4 °C 环境下孵育 30 min, 经 PBS 液洗涤 1 次, 加入 200 μl PBS 液稀释的荧光素标记的第二抗体, 轻吹混匀避光, 于 4 °C 环境下孵育 30 min, 经冷 PBS 液离心洗涤 2 次后细胞重新悬浮于 200 μl PBS 液中, 待混匀后上机检测, 以平均荧光值代表各组细胞 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 抗原表达量。

六、统计学分析

本研究所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 版统计学软件包进行方差分析及两两比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组细胞形态学观察

各组 BIU-87 肿瘤细胞于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后分别置于倒置相差显微镜下观察, 发现磁场组于实验进行 24 h 后即有部分贴壁细胞脱落, 悬浮于培养液中, 其中以实验进行 72 h 后该现象尤为显著, 可见 BIU-87 细胞体积明显缩小, 伴染色体固缩、碎裂, 出现大量脱落凋亡小体, 表现为典型的凋亡细胞形态, 细胞核染色质凝集, 胞质空泡化, 继而核固缩。对照组细胞则成片生长, 饱满舒展, 贴壁良好, 少有脱落, 细胞核较大, 核仁靠边。

二、磁场对各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 的影响

于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后对各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 检测后发现, 磁场组 Bcl-2 mRNA 在各时间点均较对照组明显降低, Bax mRNA 表达则显著增高, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 2 组细胞 Caspase-3 mRNA 表达在各时间点组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体数据详见表 1。

三、磁场对各组细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白的影响

于实验进行 24 h、48 h 及 72 h 后对各组细胞行 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白检测发现, 磁场组 Bcl-2 蛋白表达在各时间点均较对照组明显降低, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); Bax 蛋白表达在各时间点均较对照组明显提高, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且磁场组 Bax 蛋白表达量与磁场干预时间

具有明显时效关系;2 组细胞 Caspase-3 蛋白表达量在各时间点组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),具体数据详见表 2。

表 1 不同时间点 2 组 BIU-87 肿瘤细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	Bcl-2 mRNA 表达	Bax mRNA 表达	Caspase-3 mRNA 表达
磁场组			
实验进行 24 h 后	0.882 ± 0.036^a	0.754 ± 0.025^a	0.652 ± 0.023
实验进行 48 h 后	0.726 ± 0.028^a	0.886 ± 0.032^a	0.668 ± 0.029
实验进行 72 h 后	0.535 ± 0.031^a	1.108 ± 0.024^a	0.701 ± 0.032
对照组			
实验进行 24 h 后	1.033 ± 0.041	0.623 ± 0.036	0.689 ± 0.037
实验进行 48 h 后	1.098 ± 0.026	0.656 ± 0.021	0.674 ± 0.031
实验进行 72 h 后	1.104 ± 0.038	0.614 ± 0.034	0.681 ± 0.025

注:与对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$

表 2 不同时间点 2 组 BIU-87 肿瘤细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	Bcl-2 蛋白 表达	Bax 蛋白 表达	Caspase-3 蛋白 表达
对照组			
实验进行 24 h 后	5.83 ± 0.44	3.48 ± 0.28	3.94 ± 0.54
实验进行 48 h 后	6.11 ± 0.36	3.62 ± 0.35	4.25 ± 0.44
实验进行 72 h 后	6.33 ± 0.54	3.58 ± 0.42	4.12 ± 0.48
磁场组			
实验进行 24 h 后	5.43 ± 0.44^a	4.26 ± 0.54^a	4.18 ± 0.64
实验进行 48 h 后	4.92 ± 0.36^a	5.22 ± 0.35^a	4.24 ± 0.68
实验进行 72 h 后	4.25 ± 0.46^a	5.76 ± 0.16^a	4.66 ± 0.84

注:与对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$

讨 论

细胞凋亡发生过程受多种基因调控,如 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 基因就是其中较重要的凋亡调控基因^[5]。Bcl-2 基因最初从非霍奇金滤泡状 B 细胞淋巴瘤中分离得来,它是一种抗细胞凋亡基因,其表达的 Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 原癌基因的编码产物,是细胞存活促进因子,属膜整合蛋白,定位于线粒体、内质网和连续的核周膜部位,其 C 端的 21 个疏水氨基酸组成一个延伸的链状结构,能插入细胞膜结构中,该结构特点与 Bcl-2 调节细胞凋亡的方式及能力具有重要关系^[6]。Bcl-2 蛋白可与细胞线粒体膜通透性转运孔(permeability transition pore, PTP)的组成蛋白-腺苷酸转移酶(adenine nucleotide translocator, ANT)相互作用而阻止其通道形成,从而维持膜电位、稳定线粒体膜、抑制 PTP 开放^[7]。有研究显示,PTP 开放可引起一系列与细胞凋亡相关的事件发生,如细胞色素 C 及凋亡诱导因子释放入胞浆,激活 Caspase 蛋白,启动细胞凋亡程序等^[8];而 Bcl-2 基因及其表达蛋白能通过抑制细胞色素 C 及凋亡诱导因子释放,从而阻止细胞凋亡,延长细胞寿命^[9]。

Bax 基因是 Bcl-2 家族中另一个重要成员,Bax 是第一个被分离的 Bcl-2 同源基因,它是一种促细胞凋亡基因,其生理作用与 Bcl-2 基因相反,Bax 基因主要编码 21 kD 膜蛋白。当细胞凋亡时,Bax 从胞质中转移到线粒体膜上,并且形成一个由 Bax 分子组成的通道,引起细胞色素 C 等促凋亡因子释放,加速细胞凋亡。Bax 可与抗凋亡基因 Bcl-2 形成异源二聚体,具有抑制 Bcl-2 表达、促进细胞凋亡等作用。Bcl-2 与 Bax 两者间的比例决定了细胞命运,若 Bax 占主导,则 Bcl-2 被抑制,凋亡被诱导,细胞逐渐死亡;反之则 Bax 受到抑制,细胞得以继续生存^[10-11]。曹晓哲等^[12-13]采用场强为 6×10^4 V/m 的高能电磁脉冲对 GLC-82 肺癌细胞和 A549 肺癌细胞进行磁场干预,结果显示经脉冲电磁场干预后,肺癌细胞出现明显凋亡现象;免疫组化分析结果显示,肺癌细胞经脉冲电磁场作用后,均出现不同程度 Bcl-2 蛋白表达下调现象。强永乾等^[14]报道,将 Walker-256 肿瘤细胞株接种于 SD 大鼠右下肢部位,然后随机分为对照组与实验组,实验组分别给予不同强度(包括 0.15, 0.35, 0.50, 1.50 T)恒定磁场干预,于 14 d 后处死大鼠,检测肿瘤体积及 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况,结果显示实验组肿瘤体积明显小于对照组($P < 0.05$),并且该组 Bcl-2 蛋白表达明显低于对照组($P < 0.01$),而 Bax 蛋白表达则明显高于对照组($P < 0.05$)。以上研究结果均表明,Bcl-2 及 Bax 均与细胞凋亡具有密切联系。

Caspase-3 是 Caspase 家族重要成员之一,也是细胞凋亡效应分子之一。目前研究发现,大多数触发细胞凋亡的因素最终均需通过 Caspase-3 介导的信号传导途径实现细胞凋亡^[15-16]。郭鸿涌等^[17]采用工频磁场(磁场强度为 0.097 T, 频率为 50 Hz)对体外培养的人胃癌 SUN 细胞株进行干预,结果显示胃癌细胞经磁场干预后出现明显凋亡现象,细胞 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达量随磁场干预时间延长而逐渐增加,Bcl-2 蛋白表达则随磁场干预时间延长而逐渐降低。程婕等^[18]采用稳恒磁场(磁场强度为 10 mT)对体外培养的乳腺癌 MCF-7 细胞进行干预,结果显示 MCF-7 细胞经稳恒磁场干预后出现明显生长抑制及细胞凋亡现象,且 Caspase-3 蛋白表达量较对照组明显增强。

本研究采用峰值强度为 8 T、脉冲宽度大于 10 ms、频率为 15 Hz 的电容脉冲强磁场对体外培养的人膀胱肿瘤 BIU-87 细胞进行干预,发现经磁场干预 24 h 后即可镜下观察到部分贴壁细胞脱落;经磁场干预 72 h 后 BIU-87 细胞体积逐渐变小,出现染色体固缩、碎裂等典型凋亡细胞形态。通过 RT-PCR 检测发现,磁场组 Bcl-2 mRNA 表达在各时间点均较对照组明显降低,Bax mRNA 表达则较对照组明显增强,组间差异均具

有统计学意义 ($P < 0.05$)；蛋白检测结果显示，磁场组 Bcl-2 蛋白表达在各时间点均较对照组明显降低，Bax 蛋白表达则较对照组明显增强，组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果均表明，脉冲强磁场能促进人膀胱肿瘤 BIU-87 细胞凋亡，其机制可能与脉冲强磁场促进 Bax mRNA 及蛋白表达、抑制 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达有关，提示脉冲强磁场能通过基因及蛋白水平调控、促进促凋亡因子释放，加速肿瘤细胞凋亡进程；另外本研究尚未发现脉冲强磁场对 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达有显著影响作用，提示脉冲强磁场的抗肿瘤机制可能与调节肿瘤细胞 Caspase-3 基因及蛋白表达无直接关系，其确切机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱杰, 张寅静. 不同类型磁场对肿瘤细胞的生物学作用研究. 磁性材料及器件, 2005, 36: 16-19.
- [2] 王鸿, 高建青, 张桂芬, 等. 脉冲电磁场的实验研究及其应用. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 182-183.
- [3] 胡大为, 王群, 范志民, 等. 脉冲强磁场对荷瘤小鼠生存期的影响. 中华理疗杂志, 1998, 21: 204-205.
- [4] 胡大为, 张洪存, 赵小明, 等. 脉冲强磁场对小鼠 H22 肝癌杀伤作用的形态学研究. 中华理疗杂志, 2001, 24: 355-357.
- [5] 孟潘庆, 胡国强. Bcl-2 基因研究进展. 山东医药, 2000, 40: 52-53.
- [6] 程东, 韩晓英. B 细胞淋巴瘤/白血病基因 2 蛋白抗凋亡机制研究进展. 预防医学文献信息, 2004, 10: 191-193.
- [7] 尹立国, 崔建忠. 线粒体通透性转换孔的研究现状. 华北煤炭医学学院学报, 2007, 9: 486-487.
- [8] 许川山, 王志刚, 吴士明, 等. 光动力作用对膀胱癌细胞线粒体相关调控蛋白 Bcl-2/Bax 表达的影响. 第三军医大学学报, 2005, 27: 2219-2222.
- [9] 郭剑英, 李英, 潘家强, 等. 线粒体通透性转换孔及其与细胞凋亡的关系. 动物医学进展, 2009, 30: 101-105.
- [10] 朱杰西. 稳恒磁场抑制肿瘤增殖的实验研究与理论探讨. 生物磁学, 2006, 6: 10-13.
- [11] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. bcl-2/bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展. 中国老年学杂志, 2008, 28: 1658-1660.
- [12] 曹晓哲, 赵梅兰, 王德文, 等. 电磁脉冲诱导肺癌细胞株 A549 凋亡的研究. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18: 285-289.
- [13] 曹晓哲, 赵梅兰, 王德文, 等. 高能电磁脉冲诱导肺癌细胞株 GLC-82 凋亡的研究. 癌症, 2002, 21: 929-933.
- [14] 强永乾, 郭佑民, 鱼博浪, 等. 恒定均匀磁场对肿瘤细胞凋亡 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的研究. 西安医科大学学报, 2000, 21: 100-103.
- [15] 谢庆祥, 林吓聪, 张闻峰. Caspase-3 在膀胱癌组织中的表达及意义. 中国医学工程, 2005, 13: 44-45.
- [16] 徐丽丽, 高世勇, 季宇彬. 细胞凋亡相关蛋白的研究进展. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29: 1361-1363.
- [17] 郭鸿涌, 郑末, 邢凌霄, 等. 工频均匀强磁场促进体外培养 SNU 细胞凋亡及其相关机理的研究. 中国生物医学工程学报, 2007, 26: 936-941.
- [18] 程婕, 徐巧玲, 申广浩, 等. 恒磁场对阿霉素杀伤人乳腺癌细胞的协同作用. 第四军医大学学报, 2009, 30: 3006-3008.

(修回日期: 2010-10-12)

(本文编辑: 易 浩)

· 消息 ·

2010 年肉毒毒素注射技巧交流会在杭州召开

2010 年肉毒毒素注射技巧交流会于 2010 年 12 月 18 日在杭州索菲特大酒店西湖厅召开，总共有 60 多位来自全国各地康复科及神经科的医师参加了本次会议。此次活动由中国康复医学会主办，葛兰素史克（中国）投资有限公司赞助，南京医科大学附属江苏省人民医院励建安教授为大会主席。

会议首先由励建安教授作开幕发言，随后杭州邵逸夫医院胡兴越教授就华东地区运动障碍疾病构成的调查结果做了专题报告，根据对华东地区六家医院的肉毒毒素门诊疾病构成情况的调查，显示面肌痉挛患者比例最高，在肌张力障碍患者中，以眼睑痉挛排在首位。北京协和医院万兴华教授与参会者分享了注射用 A 型肉毒毒素在神经科中的应用，她采用生动的形式将治疗前后案例对比，与各参会者分享了注射用 A 型肉毒毒素的疗效。各参会者均表现出浓厚兴趣，汇报结束后，均争先向万教授提问。来自上海华山医院的李放副教授就上运动神经元综合征及肉毒毒素疗效进行专题演讲，李放副教授总结了自身临床应用体会，与大家一同分享如何合理选择肉毒毒素治疗肌痉挛患者。来自葛兰素史克（日本）的金银珠博士分享了保妥适在日本治疗过程中的案例与常见注射问题，并告知大家日本在 2009 年已批准应用肉毒毒素治疗肢体痉挛适应证患者，目前已在康复治疗领域得到广泛应用；同时金银珠博士也介绍了日本推荐的肉毒毒素治疗部位及剂量标准。

在励建安教授主持下，会议讨论阶段各参会医师踊跃提问，专家教授则详细解答，并讨论了注射用 A 型肉毒毒素在小儿脑瘫、偏头痛、腰背痛中的应用。各参会代表均表示此次会议有助于了解注射用 A 型肉毒毒素在临床中的疗效，对其日后正确使用肉毒毒素具有重要意义。

(本刊编辑部综合整理)