

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0175-04

E-selectin 和 ICAM-1 反义寡核苷酸对内皮细胞黏附肝癌细胞的影响

唐南洪, 陈燕凌, 王晓茜, 李秀金, 杨焕星, 朱金海 (福建医科大学附属协和医院省肝胆外科研究所, 福州 350001)

[摘要] **目的:** 探讨反义寡核苷酸(ASODN)对内皮细胞表达 E-selectin 和 ICAM-1 的抑制及黏附肝癌细胞的影响。**方法:** 应用 ASODN 转染内皮细胞,通过流式细胞技术测定 TNF- α 诱导后内皮细胞膜 E-selectin 和 ICAM-1 的表达,RT-PCR 半定量测定 E-selectin 和 ICAM-1 mRNA 的表达,细胞黏附实验测定肝癌细胞与内皮细胞的黏附率。**结果:** 裸 ASODN 和脂质体-ASODN 均降低了内皮细胞 E-selectin 和 ICAM-1 分子及其 mRNA 的表达,后者尽管浓度低,作用更为明显;E-selectin 的 ASODN 显著降低了内皮细胞黏附肝癌细胞的黏附率。**结论:** ASODN 能竞争性地抑制内皮细胞黏附分子的表达,在一定程度上减少了肝癌细胞的黏附。

[关键词] E-选择素; 细胞间黏附分子-1; 反义寡核苷酸; 内皮细胞; 肝癌细胞

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A

The Effects of E-Selectin and ICAM-1 Antisense Oligodeoxy Nucleotide on the Adhesion of Endothelial Cell to Hepatocarcinoma Cell

TANG Nan-hong, CHEN Yian-ling, WANG Xiao-qian, LI Xiu-jin, YANG Huan-xing, ZHU Jin-hai (Hepato-Biliary Surgery Institute of Fujian Province, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[**Abstract**] **Objective:** To explore the inhibition of E-selectin and ICAM-1 expression in endothelial cells and the effects on adhesion of endothelial cells to hepatocarcinoma cells by antisense oligodeoxynucleotide(ASODN). **Methods:** With treatment of ASODN, the changes of E-selectin and ICAM-1 protein expression in endothelial cells induced by TNF- α were examined by flow cytometry, E-selectin and ICAM-1 mRNA expression by RT-PCR, and the adhesion rate of endothelial cells to hepatoma cells by cell adhesion experiment. **Results:** Both nude ASODN and liposome-ASODN apparently brought down the expression of E-selectin and ICAM-1 protein, as well as mRNA, and the latter worked better for all that lower dosage. E-selectin ASODN significantly decreased the adhesion rate of endothelial cells to hepatocarcinoma cells. **Conclusion:** These data demonstratel that ASODNs were capable of selectively inhibiting the expression of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells and thereby, to a certain extent, reducing the adhesion between endothelial cells and hepatocarcinoma cells.

[**Key words**] E-selectin; ICAM-1; antisense oligodeoxynucleotide; endothelial cell; hepatocarcinoma cell

* 既往研究表明,肿瘤的复发、转移与癌细胞-内皮细胞之间的黏附密切相关,抑制黏附的药物研制正成为热点。随着近年来反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)药物的开发成功,利用 ASODN 来阻断黏附分子 mRNA 的表达可能是一种新途径。本文分别选用早期和晚期表达的两种黏附分子 E-选择素(E-selectin)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的 ASODN,探讨黏附分子类

ASODN 对内皮细胞黏附肝癌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

* [基金项目] 福建省教育厅基金(K99054)资助

[作者简介] 唐南洪(1967-),男,福州市人,副主任检验师,主要从事肝胆肿瘤研究。

人内皮细胞株 ECV304 及人肝癌细胞株 HepG2, BEL7404 购自中科院上海细胞生物学研究所; 细胞转染试剂盒 TransFast™, Taq 酶为 Promega 公司产品; 鼠抗人单克隆抗体 ICAM-1, E-selectin 为 Lab Vision 公司产品, 购自福州迈新公司; Trizol 为 GIBCO 公司产品; RT-PCR 试剂盒及 Marker 为 MBI 公司产品; 人 TNF- α 购自深圳晶美生物工程公司; $^3\text{H-TdR}$ 购自上海原子能研究所。FACS 流式细胞仪(Brite HS 型, BID-RAD), PCR 仪(480 型, PE), 凝胶成像系统(Alpha Imager™ 2200 宝莱公司), β -液体闪烁计数仪(Tri-Carb 2300TR, Packard Co Lit)。

1.2 ASODN 及引物的合成

根据文献[1, 2], 由上海生工生物工程公司合成 ICAM-1, E-selectin 和对照 ASODN 各一条并全硫代修饰, 扩增 ICAM-1, E-selectin 和内参对照 β -actin 的引物各 1 对, 产物分别为 458 bp, 509 bp 和 250 bp。序列如下: E-selectin ASODN: 5'-TTCCCCAGATGCACCTGTTT-3'; ICAM-1 ASODN: 5'-CCCCCACCCTCCCTCTC-3'; Control ASODN: 5'-GCCGAGGTCCATGTCGTACGC-3'; E-selectin Sense: 5'-AAAATGTTCAAGCCTGGCAGTTCC-3'; Atisense: 5'-GTGCTGATGGGTGTTGCGGTTTCA-3'; ICAM-1 Sense: 5'-CACAAGCCACGCCTCCCTGAACCTA-3'; Atisense: 5'-TGTGGGCTTTGTGTTTTGATGCTA-3'; β -actin Sense: 5'-CTGTCTGGCGCACCACCAT-3'; Atisense: 5'-GCAACTAAGTCATAGTCCGC-3'。

1.3 方法

1.3.1 ASODN 转染内皮细胞及 TNF- α 刺激

采用 36 代的内皮细胞 ECV304, 加入 24 孔培养板(5×10^4 /孔, 含 10% 小牛血清的 1640 培养液), 37°C , 5% CO_2 培养 2 d。转染按 TransFast™ 试剂盒说明操作。各实验孔经 PBS 洗后, 加入配好的脂质体-ASODN (ASODN 与脂质体按重量之比 1:1, 终浓度 $1 \mu\text{mol/L}$) 或裸 ASODN (终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$), 37°C 4 h, 更换含血清培养液。E-selectin 表达实验孔: 立即加入 TNF- α (终浓度 25 ng/ml), 37°C 4 h; ICAM-1 表达实验孔: 更换含血清培养液培养 4 h 后再加入 TNF- α , 并继续培养 16 h。同时, 设立本底和无 ASODN 处理的 TNF- α 诱导孔为对照。

1.3.2 流式细胞仪检测内皮细胞膜 E-selectin 和 ICAM-1 的表达

上述实验结束后经消化后, 制成细胞悬液, 每个样品分 5 份加入鼠抗人 E-selectin 和 ICAM-1 单克隆抗体(1:50), 4°C 30 min 后, 加入稀释 FITC 二抗, 流式细胞仪测定。

1.3.3 RT-PCR 观察 E-selectin 和 ICAM-1 mRNA 的表

达

用 6 孔培养板, 接种 ECV304 细胞(2.5×10^5 /孔) 按 1.3.1 流程结束后, 弃上清, 加入 Trizol 试剂提取细胞 RNA, 紫外分光光度计测定浓度; 取 RNA $2 \mu\text{g}$, 按试剂盒说明进行逆转录, 以产物 cDNA 为模板, 分别进行 E-selectin 和 ICAM-1 的半定量扩增, 反应体积均为 $25 \mu\text{l}$; E-selectin 的参数: 94°C 30 s, 64°C 45 s, 72°C 45 s, 30 个循环后, 72°C 延伸 7 min; ICAM-1 的参数: 94°C 30 s, 60°C 45 s, 72°C 45 s, 30 个循环后, 72°C 延伸 7 min; PCR 的产物分别作 2% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照并经凝胶成像系统扫描分析, 以 E-selectin 和 ICAM-1 的平均 IDV (integrated density value) 分别与 β -actin 的平均 IDV 之比值, 表示 E-selectin 和 ICAM-1 的相对表达强度。

1.3.4 细胞黏附试验

人肝癌细胞 HepG2 和 BEL7404 经传代培养 24 h, 更换为含 $^3\text{H-TdR}$ ($9 \mu\text{Ci/ml}$) 的培养液, 标记 12 h, 随后制成细胞悬液备用; 将 ECV304 细胞传至 96 孔板(1×10^4 /孔), 按 1.3.1 流程结束后, 分别加入标记的浓度为 2.5×10^5 /ml 的 HepG2 和 BEL7404 细胞($100 \mu\text{l}$ /孔), 设立对照, 每个样品 3 个复孔, 37°C 1 h 后, 倾去细胞, PBS 洗涤、消化, 将细胞吸至 49# 玻璃纤维纸上, 5% 三氯醋酸冲洗, 80°C 烘干, 计数闪烁值(cpm)。细胞黏附百分比 = (黏附细胞 cpm - 空白 cpm) / (总细胞 cpm - 空白 cpm)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 8.0 软件包进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 ASODN 对内皮细胞表达 E-selectin 和 ICAM-1 mRNA 的影响

由图 1 可见: TNF- α 诱导后, ①无 ASODN 组的 E-selectin 和 ICAM-1 表达率均较无 TNF- α 刺激组明显升高($P < 0.01$); ②与无 ASODN 组的表达率相比, 脂质体-对照 ASODN 组无明显下降($P > 0.05$), 裸 ASODN 组下降明显($P_E < 0.01$, $P_1 < 0.05$), 脂质体-ASODN 组亦下降显著($P < 0.01$); ③脂质体-ASODN 组比裸 ASODN 组有更好的抑制效果, 差异显著($P < 0.01$)。以上各组 $n = 5$ 。

2.2 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

加入 β -actin 内参引物的 RT-PCR 产物电泳结果(见图 2), ASODN 处理的 RT-PCR 产物电泳带亮度较无 ASODN 对照减弱。表达的相对值(见图 3)。

2.3 ASODN 对肝癌细胞与内皮细胞间黏附的影响

由(表 1)可见, 与无 ASODN 对照组比较, E-selectin

tin 的脂质体-ASODN 和裸 ASODN 组黏附率明显减弱 ($P < 0.01$), 表明 E-selectin ASODN 对 HepG2-ECV304

及 BEL7404-ECV304 之间的黏附有抑制作用; 而 ICAM-1 ASODN 对黏附的影响差别无意义 ($P > 0.05$)。

图1 ASODN 对内皮细胞表达 E-selectin 和 ICAM-1 的影响

Fig.1 Effects of AODN on the expression of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells

A: Basal; B: No ASODN; C: Lipo-control ASODN; D: Nude ASODN; E: Lipo-ASODN

图2 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

M: Marker; 1: I/basal; 2: E/basal; 3: I/no ASODN;
4: E/no ASODN; 5: I/lipo-control ASODN;
6: E/lipo-control ASODN; 7: I/nude ASODN;
8: Nude ASODN; 9: I/lipo-ASODN; 10: E/lipo-ASODN

图3 RT-PCR 检测 E-selectin, ICAM-1 与 β -actin 表达的相对值

Fig.3 Relative expression value of ICAM-1 and E-selectin to β -actin by RT-PCR

A: Basal; B: No ASODN; C: Lipo-control ASODN;
D: Nude ASODN; E: Lipo-ASODN

3 讨论

ICAM-1 的 cDNA 全长 2.98 kb, 由 57 bp 的 5' 非翻译区、1 598 bp 的连续开放阅读框和 1 330 bp 的 3' 非翻译区组成; E-selectin 的 cDNA 全长 3.85 kb, 由 116 bp 的 5' 非翻译区、1 830 bp 的连续开放阅读框和 1 898 bp 的 3' 非翻译区组成。Bennett 的研究结果显示^[1], 在其设计的多条 ASODN 中, 较有效的 ASODN 靶序列都位于各自的 cDNA 3' 非转录区。本文选用其中最佳抑制效果的 ICAM-1 和 E-selectin 的 ASODN 各一条, 并设立一条对照 ASODN (碱基的种类和数量上一致, 只是排列顺序不同且与目前已知的人任何基因产物均无同源性)。结果表明这一对照 ASODN 没有抑制表达作用, 而所用 ICAM-1 和 E-selectin 的 ASODN 分别抑制目的分子的表达约 40%, 证实它们的作用是序列特异的。这 2 条结合于 3' 端非转录区的 ASODN 所导致目的 mRNA 表达的下降, 可能的机制是 RnaseH 酶的认识并裂解 mRNA-ODN 双链结构, 而结合于 AUG 转录起始点或 5' 端非转录区的 ASODN 都不能有效降低 mRNA 的表达^[1]。

在提高细胞对 ASODN 的摄取效率方面, 本研究采用的 TransFast™ Reagent 是一种高分子阳离子脂质体与中性脂质体 DOPE 的复合物, 可提高 ASODN 与真核细胞膜融合进入细胞浆中与 mRNA 的结合能力, 增强生物活性^[3]。与裸 ASODN 相比, TransFast 脂质体包被 ASODN 的终浓度虽仅有其 1/10, 却有更高的抑制效率。

表1 E-selectin 和 ICAM-1 ASODN 转染的内皮细胞与肝癌细胞间的黏附率($\bar{x} \pm s$)%

Tab.1 The adhesion rate of endothelial cell transfected by E-selectin and ICAM-1 ASODN to hepatocarcinoma cell($\bar{x} \pm s$)%

Groups	I	II	III	IV	V
E-selectin/HepG2	17.7 ± 0.9*	80.4 ± 6.2	82.0 ± 3.8	52.0 ± 3.6*	38.0 ± 5.0*
E-selectin/BEL7404	8.1 ± 1.0*	75.9 ± 0.6	73.3 ± 3.5	62.8 ± 3.7*	26.7 ± 1.6*
ICAM-1/HepG2	5.0 ± 1.3*	71.0 ± 2.4	70.0 ± 4.6	68.4 ± 3.0	68.6 ± 1.8
ICAM-1/BEL7404	3.3 ± 0.9*	65.9 ± 4.1	64.9 ± 3.2	62.2 ± 3.0	63.6 ± 5.0

I :Basal; II :No ASODN; III :Lipo-control ASODN; IV :Nude ASODN; V :Lipo-ASODN; * $P < 0.01$, vs II group($n = 3$)

在癌细胞分泌的细胞因子如 IL-1 β , TNF- α 等刺激下,血管内皮细胞高表达各类黏附分子的时序为:刺激后 4 ~ 5 h 以 E-selectin 为主,此时相发生的黏附为早期黏附;12 ~ 48 h 主要表达 ICAM-1,次要表达整合素,此时相发生的黏附为晚期黏附。TNF- α 刺激前分别采用 E-selectin 和 ICAM-1 ASODN 处理内皮细胞,在不同时间相上均达到抑制目标分子表达的目的,但在黏附实验中仅 E-selectin ASODN 明显减少了肝癌细胞的黏附。原因在于:① HepG2 等肝癌细胞系高表达 E-selectin 的配体 sLe^xAg^[4],是介导直接黏附内皮细胞的主要分子;② ICAM-1 的配体是 LFA-1,在肝癌细胞表面不表达。但肝癌细胞本身也高表达 ICAM-1,在体内环境中凭借黏附白细胞表面的 LFA-1 而黏附到血管内皮细胞上^[5];③ HepG2 等肝癌细胞也表达丰富的 β_1 类整合素 $\alpha_2\beta_1$,也能直接介导癌细胞黏附于内皮细胞^[4], ICAM-1 ASODN 处理组的黏附情况可能是这类分子的作用结果。

本研究为抗黏附基因治疗提供实验依据,应用脂

质体包被 ASODN 的抗黏附有抑制肝癌高复发和高转移。

[参 考 文 献]

[1] Bennett CF, Condon TP, Grimm S, *et al.* Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides [J]. J Immunol, 1994, 152: 3530-3540.

[2] Zhang XP, Kelemen SE, Eisen HJ. Quantitative assessment of cell adhesion molecule gene expression in endomyocardial biopsy specimens from cardiac transplant recipients using competitive polymerase chain reaction[J]. Transplantation, 2000, 70(3): 505-513.

[3] Gao X, Huang L. Cationic liposome mediated gene transfer[J]. Gene Ther, 1995, 2: 710-716.

[4] Kawakami-Kimura N, Narita T, Ohmori K, *et al.* Involvement of hepatocyte growth factor in increased integrin expression on HepG2 cells triggered by adhesion to endothelial cells[J]. Br J Cancer, 1997, 75(1): 47-53.

[5] Tanabe K, Alexander JP, Steinbach F, *et al.* Retroviral transduction of intercellular adhesion molecule-1 enhances endothelial attachment of bladder cancer[J]. Urol Res, 1997, 25: 401-405.

[收稿日期] 2002 - 05 - 08 [修回日期] 2002 - 07 - 15

《实用肿瘤杂志》征订启事

《实用肿瘤杂志》是中华人民共和国教育部主管、浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊不仅连续入选《中文核心期刊要目总览》第1版、第2版,2000年6月又入选第3版,并被《中国科学引文数据库》及《中国生物医学文摘光盘数据库》收录,被《中国学术期刊光盘版(CAJ-CD)》、《中国期刊网》及《中国学术期刊综合评价数据库》选为全文收录来源期刊。1998年据《中国科学引文数据库》统计,本刊已进入全国科技期刊最高引用频率前500名。1999~2000年度本刊又被评为浙江省科学技术优秀期刊奖,并获得2000年度《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》优秀奖。这是对本刊创刊十多年来学术价值的肯定。本刊突出实用性,主要栏目有专题讨论,基础与临床研究,技术与经验,药物与临床,流行病学调查,综述与讲座,误诊分析,短篇报道与个案等,适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与教学工作阅读,参考。

《实用肿瘤杂志》为双月刊,大16开,72页,每逢双月10日出版。每期定价6.00元,全年36.00元。本刊刊号ISSN1001-1692 CN33-1074/R,邮发代号32-87,全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误,可汇款至杭州市解放路88号浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话:(0571)87783654,87783659 传真:(0571)87783659 邮编:310009