

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0183-04

## 肿瘤增殖基因 Ki67 反义寡核苷酸对人肾癌细胞增殖及凋亡的影响

郑骏年, 孙晓青, 陈家存, 蔡维奇, 李 望, 刘俊杰 (徐州医学院附属医院泌尿外科, 江苏 徐州 221002)

**[摘要]** 目的: 探讨肿瘤增殖基因 Ki67 反义寡核苷酸(Ki67-ASODNs)对人肾癌细胞增殖及凋亡的影响。方法: 将 Ki67-ASODNs 转染人肾癌细胞系 786-0 细胞, 采用免疫组化、Western blot 技术检测 Ki67 表达, 细胞生长曲线、<sup>3</sup>H-TdR 掺入试验等检测肾癌细胞增殖, 免疫组化 TUNEL 法检测肾癌细胞凋亡。结果: Ki67-ASODNs 处理组(10, 40 μmol/L)的 786-0 细胞 Ki67 表达阳性率(%) (29.9 ± 0.4, 24.5 ± 1.2)降低, Ki67 蛋白(%) (82.1 ± 2.2, 66.6 ± 4.2)降低, 分别与对照组(33.4 ± 0.8, 100)比较, 差异有显著性( $P < 0.01$ )。Ki67-ASODNs 处理组的<sup>3</sup>H-TdR 掺入率(%) (44.5 ± 4.4, 34.5 ± 3.2)与对照组(100)比较, 差异有显著性( $P < 0.01$ )。Ki67-ASODNs 处理组凋亡细胞阳性率(%) (12.7 ± 0.5, 23.1 ± 2.1)增加, 与对照组(9.3 ± 2.0)比较, 差异有显著性( $P < 0.01$ )。结论: 肿瘤增殖基因 Ki67 反义寡核苷酸能抑制人肾癌 786-0 细胞 Ki67 基因表达, 进而抑制其增殖, 促进其凋亡, 且有剂量依赖性。

**[关键词]** 肾癌; Ki67 基因; 反义寡核苷酸; 凋亡

**[中图分类号]** R737.11; Q524 **[文献标识码]** A

## The Effects of Antisense Oligoxydeonucleotides Targeting the mRNA of Ki67 Gene on the Proliferation and Apoptosis of Human Renal Carcinoma Cells

ZHENG Jun-nian, SUN Xiao-qing, CHEN Jia-cun, CAI Wei-qi, LI Wang, LIU Jun-jie (Department of Urology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of antisense oligoxydeonucleotides of Ki67 gene(Ki67-ASODNs) on the proliferation and apoptosis of human renal carcinoma cell line 786-0 cells. **Methods:** Human renal carcinoma cell line 786-0 cells were treated with Ki67-ASODNs(10, 40 μmol/L). The Ki67 expression of 786-0 cells was detected by immunohistochemical technique and Western blot respectively. The proliferation of 786-0 cells was studied by cell growth curves and <sup>3</sup>H-TdR uptake assay. The apoptosis of 786-0 cells was detected by TUNEL assay. **Results:** The Ki67 expression rates of 786-0 cells treated by Ki67-ASODNs(29.9 ± 0.4, 24.5 ± 1.2) were lower than that of the control group( $P < 0.01$ ). The Ki67 protein quantity rates of 786-0 cells treated by Ki67-ASODNs(82.1 ± 2.2, 66.6 ± 4.2) were reduced markedly( $P < 0.01$ ). The <sup>3</sup>H-thymidine incorporation rates of 786-0 cells treated by Ki67-ASODNs(44.5 ± 4.4, 34.5 ± 3.2) were lower than that of the control group( $P < 0.01$ ). The apoptosis rates of 786-0 cells treated by Ki67-ASODNs(12.7 ± 0.5, 23.1 ± 2.1) were higher than that of the control group(9.3 ± 2.0;  $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Antisense oligoxydeonucleotides of Ki67 could inhibit the proliferation and induce apoptosis by blocking Ki67 expression of human renal carcinoma 786-0 cells.

**[Key words]** renal cell carcinoma; Ki67 gene; antisense oligoxydeonucleotide; apoptosis

\* 肾癌恶性度极高, 且对放疗、化疗均不敏感, 免疫治疗效果亦不令人满意, 因此迫切需要寻找新的治疗方法。反义寡核苷酸(antisense oligoxydeonucleotids, ASODNs)能够通过抑制肿瘤基因表达发挥抗肿瘤作用, 目前已有十余种 ASODNs 进入临床试验。Ki67 为一肿瘤增殖相关基因, 我们研究发现其在肾癌组织高表达, 且与肾癌免疫逃避密切相关<sup>[1,2]</sup>, 因此可作为肾癌反义治疗的靶基因。近年国外研究发现 Ki67 反义

寡核苷酸可有效抑制膀胱癌、乳腺癌细胞增殖<sup>[3]</sup>, 但其对肾癌的影响未见报道。为此, 我们以 Ki67 基因反义寡核苷酸处理人肾癌 786-0 细胞系, 研究其对肾癌细胞生长及凋亡的影响。

**[基金项目]** 江苏省卫生厅资助课题(H2000153)

**[作者简介]** 郑骏年(1966-), 男, 江苏徐州人, 副教授, 主要从事肿瘤免疫研究

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、试剂

人肾癌透明细胞株 786-0 购自中科院上海细胞研究所。Ki67 免疫组化试剂盒、Ki67 一抗、二抗,原位末端凋亡检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司,<sup>3</sup>H-TdR 购自中国原子能研究院,脂质体 LipofectinAMINE 购自 GIBCO 公司。

### 1.2 Ki67 寡核苷酸合成及转染

根据 Ki67 cDNA197 ~ 214 位置的碱基序列,设计出阻断 Ki67 mRNA 翻译起始端的反义寡核苷酸(ASODNs)、错义寡核苷酸(RODNs),经基因库同源性检测确认与 Ki67 以外的人类已知基因序列无同源性。由北京奥科生物技术公司合成,HPLC 纯化。ASODNs 序列为 5'-GCGTGTCGTGGCCACAT-3',RODNs 5'-GAGCATTACGCGATAACGC-3'。以 1 μl 脂质体包装 1 nmol 寡核苷酸的比例,将脂质体和寡核苷酸分别用不含血清的培养基稀释、混匀,室温放置 45 min,形成寡核苷酸-脂质体复合物,待用。

### 1.3 细胞培养及实验分组

2 × 10<sup>5</sup>/ml 786-0 细胞于含 10% FCS 的 RPMI-1640 中培养 24 ~ 48 h,待细胞覆盖培养瓶 90% 以上时,用 0.25% 胰酶消化并调整到所需浓度,接种到培养板或瓶内,然后分设对照组(培养基)、脂质体组(培养基 + 脂质体)、RODNs 组(40 μmol/L RODNs)、ASODNs 组(1, 10, 40 μmol/L ASODNs)分别加入不同试剂,每组设 3 复孔。

### 1.4 免疫组化技术检测 Ki67 表达

将 1.0 cm × 1.0 cm 的玻片经防脱片处理后置入 24 孔培养板孔内,每孔接种 3 × 10<sup>4</sup>/ml 786-0 细胞悬液 0.5 ml,培养 48 h,换培养液,按实验分组加入不同试剂继续培养 48 h,取出玻片固定、洗片后,滴加 Ki67 一抗(鼠抗人),湿盒中过夜,加二抗(兔抗鼠),二氨基联苯(DAB)染色,并经复染。在高倍镜下随机计数 5 个视野,细胞核内含棕色颗粒为阳性细胞,计算所占百分比。

### 1.5 蛋白印迹技术检测 Ki67 表达

1 × 10<sup>5</sup>/ml 786-0 细胞 10 ml 加入 60 ml 培养瓶中培养至细胞贴壁,按实验分组加入不同试剂继续培养 72 h,收集细胞。采用快速制备法提取核蛋白<sup>[4]</sup>,经电泳、转膜后杂交,一抗为鼠抗人 Ki67 单抗,二抗为碱性磷酸酶标记的兔抗鼠多抗,以氮兰四唑/5-溴 4-氯 3-吡啶磷酸(NBT/BCIP)显色。结果以图象处理仪分析处理。

### 1.6 细胞生长曲线测定

将 3 × 10<sup>4</sup>/ml 786-0 单细胞悬液 100 μl 接种于 96 孔板,48 h 后更换培养液,按实验分组加入试剂,每隔 24 h 取 3 孔作细胞计数,取平均值绘出生长曲线。

### 1.7 细胞增殖活性检测

采用<sup>3</sup>H-TdR 掺入试验。将 3 × 10<sup>4</sup>/ml 786-0 细胞悬液 1 ml 接种于 24 孔培养板,按实验分组加入试剂培养 48 h。每孔分别加入<sup>3</sup>H-TdR 18.5 kb,24 h 后收集细胞,并吸附于玻璃纤维纸上,烘干后加入闪烁液,液闪计数仪测 cpm 值,结果以 cpm 值和掺入率 = 实验组 cpm/对照组 cpm × 100% 表示。

### 1.8 免疫组化 TUNEL 法检测 786-0 细胞凋亡

细胞处理同 1.4 所述,经固定、洗片后,与通透液 Triton-100 共同孵育后,滴加 TUNEL 反应混合液,在湿盒中 37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,DAB 染色,洗片后封片,在高倍镜下随机计数 5 个视野,细胞核呈现黄褐色即为阳性,计算阳性细胞所占百分比。

### 1.9 统计学处理

States 统计软件处理,采用成组设计 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 Ki67-ASODNs 对人肾癌 786-0 细胞的 Ki67 表达的影响

浓度为 10, 40 μmol/L 的 ASODNs 可显著抑制肾癌 786-0 细胞的 Ki67 表达阳性率及 Ki67 蛋白水平 ( $P < 0.01$ ),且高浓度 ASODNs 的抑制作用大于低浓度 ASODNs ( $P < 0.01$ ),而 1 μmol/L ASODNs 与 RODNs 对 786-0 细胞的 Ki67 表达无抑制作用 ( $P > 0.05$ , 表 1,图 1)。

表 1 Ki67 反义寡核苷酸对人肾癌 786-0 细胞的 Ki67 表达的影响

Tab. 1 The effects of Ki67-ASODNs on the Ki67 expression of human renal carcinoma 786-0 cells

Groups	Immunohistochemistry	Western blot
	Ki67 expression positive rate(%)	Ki67 protein quantity rate(%)
Control	33.4 ± 0.8	100.0
Lipid	32.3 ± 0.8 <sup>▲</sup>	99.0 ± 1.3 <sup>▲</sup>
RODNs	32.9 ± 1.8 <sup>▲</sup>	99.6 ± 0.6 <sup>▲</sup>
ASODNs(1.0 μmol/L)	32.6 ± 1.1 <sup>▲</sup>	96.5 ± 1.9 <sup>▲</sup>
ASODNs(10.0 μmol/L)	29.9 ± 0.4 <sup>#</sup>	82.1 ± 2.2 <sup>#</sup>
ASODNs(40.0 μmol/L)	24.5 ± 1.2 <sup>#</sup>	66.6 ± 4.2 <sup>#</sup>

▲  $P > 0.05$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs control group;

\*  $P < 0.01$  vs each other

图1 Ki67反义寡核苷酸对人肾癌786-0细胞的Ki67蛋白表达的影响

Fig. 1 The effects of Ki67-ASODNs on the Ki67 protein expression of human renal carcinoma 786-0 cells

2.2 Ki67-ASODNs 对人肾癌786-0细胞生长曲线的影响

浓度为10, 40 μmol/L的ASODNs可显著抑制肾癌786-0细胞生长,且高浓度ASODNs的抑制作用大于低浓度ASODNs,而1 μmol/L ASODNs与RODNs对786-0细胞生长无抑制作用(见图2)。

图2 Ki67反义寡核苷酸对人肾癌786-0细胞的生长曲线的影响

Fig. 2 The effects of Ki67-ASODNs on the growth curves of human renal carcinoma

2.3 Ki67-ASODNs 对人肾癌786-0细胞<sup>3</sup>H-TdR掺入的影响

浓度为10,40 μmol/L的ASODNs可显著抑制肾癌786-0细胞的<sup>3</sup>H-TdR掺入率,且高浓度ASODNs的抑制作用大于低浓度ASODNs( $P < 0.01$ ),而1 μmol/L ASODNs与RODNs对786-0细胞的<sup>3</sup>H-TdR掺入率无影响( $P > 0.05$ ,表2)。

2.4 Ki67-ASODNs 对人肾癌786-0细胞的凋亡的影响

浓度为10,40 μmol/L的ASODNs可促进肾癌786-0细胞的凋亡,且高浓度ASODNs的作用大于低浓度ASODNs( $P < 0.01$ ),而1 μmol/L ASODNs与RODNs对786-0细胞的凋亡无影响( $P > 0.05$ ,表3)。

3 讨论

随着分子生物学技术的发展,近年来国外已有

表2 Ki67反义寡核苷酸对人肾癌786-0细胞的<sup>3</sup>H-TdR掺入的影响

Tab. 2 The effect of Ki67-ASODNs on the <sup>3</sup>H-thymidine incorporation of human renal carcinoma 786-0 cells

Groups	cpm	<sup>3</sup> H-thymidine incorporation rate (%)
Control	13296.7 ± 923.6	100
Lipid	13098.0 ± 1558.3 <sup>▲</sup>	99.0 ± 8.9 <sup>▲</sup>
RODNs	13046.3 ± 382.6 <sup>▲</sup>	98.1 ± 1.6 <sup>▲</sup>
ASODNs(1.0 μmol/L)	12978.3 ± 458.5 <sup>▲</sup>	97.6 ± 2.8 <sup>▲</sup>
ASODNs(10.0 μmol/L)	5912.3 ± 119.4 <sup>#*</sup>	44.5 ± 1.2 <sup>#*</sup>
ASODNs(40.0 μmol/L)	4597.0 ± 162.2 <sup>#*</sup>	34.5 ± 1.4 <sup>#*</sup>

▲  $P > 0.05$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs control group; \*  $P < 0.01$  vs each other

表3 Ki67反义寡核苷酸对人肾癌786-0细胞的凋亡的影响  
Tab. 3 The effect of Ki67-ASODNs on the apoptosis of human renal

Groups	Apoptosis rate(%)
Control	9.3 ± 1.0
Lipid	9.7 ± 1.0 <sup>▲</sup>
RODNs	9.9 ± 1.6 <sup>▲</sup>
ASODNs(1.0 μmol/L)	10.6 ± 1.2 <sup>▲</sup>
ASODNs(10.0 μmol/L)	12.7 ± 0.5 <sup>#*</sup>
ASODNs(40.0 μmol/L)	23.0 ± 2.1 <sup>#*</sup>

▲  $P > 0.05$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs control group; \*  $P < 0.01$  vs each other

项肿瘤反义治疗研究进入临床I期试验<sup>[5]</sup>。肿瘤反义治疗是将一段与靶基因mRNA序列互补的寡核苷酸转入肿瘤细胞,使之与靶基因mRNA特异结合,通过阻断

翻译、抑制转录后加工、激活 RnaseH 特异降解 mRNA 发挥阻止靶基因表达作用<sup>[6]</sup>。

选择合适的靶基因是反义治疗的关键。肿瘤细胞增殖由多种信号途径介导,因此阻断某个或几个癌基因效果并不理想,若能直接阻断肿瘤细胞增殖相关基因更为合理。曾甫青报道<sup>[7]</sup>,增殖细胞核抗原(PCNA)基因的反义核酸可阻断由多种信号诱导的膀胱癌细胞增殖。但 PCNA 仅在肿瘤细胞 S 期表达,而 Ki67 这一较晚发现、与肿瘤细胞增殖关系更为密切的抗原则在 G1, G2, S, M 期均有表达,因此阻断 Ki67 基因较之阻断 PCNA 更有意义。Sawhney<sup>[8]</sup>报道 Ki67 基因编码的 Ki67 蛋白为一 DNA 结合蛋白,是肿瘤细胞增殖的必需组份。Schluter<sup>[9]</sup>首次克隆出 Ki67 基因,并使用其反义核酸对人骨髓瘤细胞 IM-9 进行封闭,结果骨髓瘤细胞增殖完全被抑制。Kausch<sup>[3]</sup>报道 Ki 67 反义寡核苷酸可有效抑制膀胱癌、乳腺癌细胞在体内外的增殖。

Mangili<sup>[10]</sup>报道正常肾组织无 Ki67 表达,肾癌组织 Ki67 表达阳性率 93.5%。我们既往研究发现,肾癌组织 Ki67 表达增强,且与肾癌分期、分级、预后密切相关<sup>[2]</sup>。我们的另一项研究发现肾癌 Ki67 表达与其免疫逃避关系密切<sup>[3]</sup>。由于翻译起始部位重要且易于形成互补双链,本研究采用针对 Ki67mRNA 翻译起始部位反义核酸封闭靶基因。结果发现 Ki67-ASODNs 可显著抑制 Ki67 基因表达,表现为 Ki67 阳性细胞数减少, Ki67 蛋白表达量下降。Ki67 基因表达受抑后,肿瘤细胞增殖下降, DNA 合成减慢,同时细胞凋亡增加。本研究还发现 Ki67-ASODNs 的这些作用具有剂量依赖性。

综上所述,肿瘤增殖基因 Ki67 反义治疗能有效抑制肾癌 Ki67 基因表达,进而抑制细胞增殖、诱导细胞

凋亡发挥治疗作用, Ki67 反义治疗有望成为肾癌基因治疗的有效策略。

[参考文献]

- [1] 姜福金, 孙晓青, 郑骏年, 等. 细胞增殖抗原 Ki67 在肾癌细胞中的表达及检测[J]. 徐州医学院学报, 2001, 4: 167.
- [2] 郑骏年, 孙晓青, 陈家存, 等. 肾癌免疫逃避机制探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 24-26.
- [3] Kausch I, Lingnau A, Endl E, et al. Antisense treatment against Ki67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Cancer, 2003, 105: 710-716.
- [4] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 3-4.
- [5] Persidis A. Antisense therapeutics[J]. Nat Biotech, 1999, 17: 403-404.
- [6] 帅晓明, 王国斌. 反义寡核苷酸作用机制研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23: 232-240.
- [7] 曾甫清, 朱朝晖, 林晨, 等. PCNA 反义寡核苷酸抑制人膀胱癌 EJ 细胞增殖活性的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2000, 1: 213-215.
- [8] Sawhney N, Hall PA. Ki67-structure, function, and new antibodies[J]. J Path, 1992, 168: 161-162.
- [9] Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins [J]. J Cell Biol, 1993, 123(5): 513-514.
- [10] Mangili F, Hirokawa N, Setou M, et al. Cancer-related serological recognition of human colon cancer[J]. Pathologica, 1997, 89(4): 384-389.

[收稿日期] 2003-10-27

[修回日期] 2004-01-20

· 书讯 ·

《英汉遗传学词典》(新加坡 World Scientific 出版公司, 1998) 作者 George P. Rédei, 译者许宝孝, 印木泉, 余应年, 蔡武城, 校译薛京伦。

本词典收录 1.8 万多个概念, 涉及遗传学及相关学科的新理论、新概念和新术语, 提供 1000 余篇参考文献和 100 多个有关数据库的网址, 具有极强的专业性、系统性、新颖性、实用性和权威性。本词典内容以词条的形式排列, 利于查找, 而且图文并茂, 深入浅出, 不失为从事遗传、生物、医学、农业以及多种生物学相关领域专业人士的工具书。同时, 亦可供爱好遗传及生物学的广大非专业人士的查阅和使用。精装大 16 开本, 825 面。定价: 180 元。

联系地址: 上海科学技术出版社 科学编辑部

上海瑞金二路 450 号

电话: 64669159, 64736055 转 2111 或 2140 分机

邮政编码: 200020