

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0187-04

反义寡核苷酸抑制 survivin 基因表达及肝癌细胞生长的研究

陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良 (成都军区总医院全军普通外科中心, 成都 610083)

[摘要] 目的: 采用反义寡核苷酸抑制肝癌细胞中 survivin 基因的表达, 研究其对肝癌细胞生长的作用。方法: 采用脂质体介导 survivin 反义寡核苷酸转染人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞, Western blot 及原位杂交方法检测 survivin 蛋白及 mRNA 表达, 流式细胞仪检测凋亡细胞比率, 检测转染前后细胞贴壁率变化, 并绘制细胞生长曲线。结果: survivin 反义寡核苷酸转染后, 肝癌细胞 survivin 蛋白及 mRNA 表达均显著降低, 细胞贴壁率显著降低, 细胞增殖活性明显受抑, 细胞凋亡率显著增加。结论: survivin 反义寡核苷酸转染可以有效降低细胞内 survivin 基因的表达, 诱导细胞发生凋亡, 抑制肝癌细胞生长。

[关键词] 肝癌; survivin 基因; 反义寡核苷酸; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R720.23 [文献标识码] A

The Effect of Antisense Oligonucleotide on the Expression of Survivin Gene and Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line SMMC-7721

CHEN Tao, JIA Yu-rong, ZHAO Tie-jun, YIN Zhi-liang (Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of survivin antisense oligonucleotide (ASODN) on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. **Methods:** The 20 mer antisense oligonucleotide (ASODN) targeted to the promotor region of survivin mRNA was designed and synthesized. The expression of survivin gene in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 was blocked by means of ASODN transfection mediated by DOTAP liposomal reagent. The changes of survivin protein and mRNA expression after transfection were assessed by Western blot and in situ hybridization, respectively. The apoptotic rate was detected by flow cytometer. The changes of cell adherent rate, cell growth activity, and the inhibitory rate of cell growth were also studied. **Results:** The expression of survivin protein and mRNA were decreased markedly after survivin ASODN transfection. Meanwhile, the cell adherent rate also decreased markedly while the apoptotic rate increased markedly. **Conclusions:** Transfection of ASODN targeted to the promotor region of survivin mRNA by DOTAP liposomal transfection reagent could down-regulated the expression of survivin protein and mRNA significantly in 7721 cell line and inhibit the proliferation of cancer cells. Survivin could be an important target in the therapy of hepatocellular carcinoma.

[Key words] hepatocellular carcinoma; survivin; antisense oligonucleotide (ASODN)

* 我们在前期研究中发现, survivin 在人肝癌组织中的表达与肝癌细胞的增殖凋亡比及分化程度有关, 并可作为预后不良的重要指标^[1]。本研究中我们针对 survivin mRNA 设计的 ASODN, 通过脂质体介导转染人肝癌细胞 SMMC-7721, 进一步研究了封闭 survivin 的表达对肝癌细胞的生长抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本中心自存, 接种于 30 ml 培养瓶及铺有灭菌盖玻片的 6 孔培养板, 以含

10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液常规培养至 80% 汇片后进行转染。

1.2 脂质体介导寡核苷酸转染

硫代磷酸型寡核苷酸由上海生工生物工程公司合成, 序列如下: 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)的序列为: 5'GGGGCACCCATGCCGCCG CC3'; 正义寡核苷酸(sense oligonucleotide, SODN)的序列为: 5'GGCGGCGGCA TGGGTGCCCC3'。2 条序列均采用硫

[作者简介] 陈涛(1970-), 男, 医学博士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究

代磷酸型。按照 DOTAP 脂质体转染试剂盒(Roche, USA)说明进行转染。

1.3 实验分组

根据转染复合物浓度分为 6 组,分别为 I 组:以无血清 RPMI-1640 培养液代替转染复合物作为空白对照组; II 组:1 000 ng/ml SODN 转染作为正义对照组; III 组:400 ng/ml ASODN 转染组; IV 组:600 ng/ml ASODN 转染组; V 组:800 ng/ml ASODN 转染组; VI 组:1 000 ng/ml ASODN 转染组; 每组设 5 个平行组,转染进行 24 h 后结束,收集细胞进行检测。

1.4 Western blot 检测 survivin 蛋白表达

收集 5×10^6 个细胞,提取总蛋白质,紫外分光光度法蛋白定量。40 μ g survivin 蛋白进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(Bio-Rad, USA),以蛋白电泳转印仪(Bio-Rad, USA)将产物转至 PVDF 膜;依次加入 1:1 000 羊抗人 survivin(Santa-Cruz, USA),及加入 1:4 000 兔抗羊 IgG/HRP(Santa-Cruz, USA)孵育,LumiGLO 化学发光试剂反应 1 min,X 片暗室曝光,常规显影定影。图像以 Bio-Rad 图像分析系统分析,以相应蛋白条带的平均光强度值表示 survivin 表达的相对强度。

1.5 原位杂交检测 survivin mRNA 表达

survivin cDNA 载体质粒为 pcDNA3.1(invitrogen, USA),将质粒转化、扩增、抽提、纯化、线性化,按 Dig-RNA Labeling Kit (Boehring Mannheim, German)说明以地高辛标记探针;细胞铺片转染结束后,以地高辛标记探针进行杂交,加 NBT-BCIP 显色液 40 μ l 显色。随机选择 5 个 200 倍(20 \times 10 倍)视野,计数总细胞数及染色阳性细胞数,计算杂交阳性率(%)。杂交前用 RNase 100 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C 1 h 预处理细胞片作阴性对照。用不含 survivin 反义 cRNA 探针的杂交缓冲液检测作空白对照。

$$\text{杂交阳性率(\%)} = \frac{\text{杂交阳性细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

1.6 细胞增殖活性测定

1.6.1 细胞贴壁率测定

6 孔培养板内进行转染,转染结束后换新鲜培养液继续培养 24 h 后终止培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,每孔分别随机计数 5 个 20 \times 10 倍视野下贴壁细胞数及全部细胞数,根据公式计算细胞贴壁率。

$$\text{细胞贴壁率(\%)} = \frac{\text{贴壁细胞数}}{\text{全部细胞数}} \times 100\%$$

1.6.2 细胞生长曲线绘制

收集 ASODN 转染后的各组细胞,调整至 1.5×10^4 /ml,接种于 96 孔板,每孔 200 μ l,每组细胞接种 5 复孔,共接种 7 板,继续常规培养。每日取出 1 板,弃

去培养液,生理盐水漂洗 2 遍,0.5% 结晶紫溶液染色,PBS 冲洗,50 $^{\circ}$ C 烘干,加入 1% SDS 溶液振荡溶解,酶联免疫仪于 540 nm 读取 OD 值。以 OD 值为纵坐标,以时间(d)为横坐标绘制生长曲线。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡比率

收集 2×10^6 个细胞,预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h,细胞重悬于 0.4 ml PBS 中,加入 10 μ l 5 mg/ml 的 RNase A 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,1 g/ml 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI) 4 $^{\circ}$ C 染色过夜,流式细胞仪检测凋亡细胞的比率。multicycle 软件进行数据处理。

1.8 统计学分析

结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 软件进行 X^2 检验、方差分析和 q 检验分析。

2 结果

2.1 Survivin ASODN 转染对 SMMC-7721 细胞 survivin 表达的作用

Survivin 蛋白在人肝癌细胞 SMMC-7721 中高度表达,Western blot 检测表明,2 对照组间 Survivin 蛋白表达无显著差异;600 ~ 1 000 ng/ml ASODN 组转染后 survivin 蛋白表达较两对照组显著降低,其中 1 000 ng/ml 组转染结束后 Survivin 蛋白表达仅为空白对照组的 15.4%(见表 1)。

表 1 Survivin ASODN 转染后细胞内 survivin 蛋白及 mRNA 表达的变化

Tab. 1 Expression of survivin protein and mRNA after transfection with survivin ASODN

Groups	Survivin	Survivin mRNA(%)
Control	69.59	75.61 \pm 4.05
SODN	70.81	75.46 \pm 4.48
400 ng/ml ASODN	52.72	61.83 \pm 3.26
600 ng/ml ASODN	43.13	53.99 \pm 2.82
800 ng/ml ASODN	25.82	28.21 \pm 3.11 *
1000 ng/ml ASODN	10.71	22.94 \pm 2.46 *

* $P < 0.01$ vs control

Survivin mRNA 原位杂交阳性信号主要分布于细胞浆内,杂交产物呈蓝紫色。经 survivin ASODN 作用后 survivin mRNA 表达呈逐渐降低的趋势,在 800 及 1 000ng/ml ASODN 组 survivin mRNA 杂交阳性率分别为 28.21% \pm 3.11% 和 22.94% \pm 2.46%,较正常对照及 SODN 转染组显著降低(见表 1)。

2.2 Survivin ASODN 转染对 SMMC-7721 细胞增殖活性的作用

2.2.1 细胞贴壁率

倒置显微镜下观察,2 对照组细胞生长良好,接种 4 h 后大多数细胞已贴壁生长,形状舒展。survivin ASODN 转染后的细胞贴壁较晚,随时间推移,贴壁细胞减少,24 h 后多数细胞呈悬浮状态。细胞贴壁率变化见图 1,可见经 survivin ASODN 作用后细胞贴壁率呈逐渐降低的趋势,在 600 ~ 1 000 ng/ml ASODN 组细胞贴壁率分别为 74.88% ± 2.08%,51.48% ± 1.48% 及 33.16% ± 2.00%,较两对照组显著降低($P < 0.05$)。

图 1 细胞贴壁率的变化

Fig. 1 Changes of cell adherent rate after transfection with ASODN

1: Blank control groups; 2: SODN control groups;
3: 400 ng/ml ASODN; 4: 600 ng/ml ASODN;
5: 800 ng/ml ASODN; 6: 1000 ng/ml ASODN

2.2.2 细胞增殖活性测定

由图 2 可见,在转染后第 3 天细胞生长抑制率最高,其中 1 000 ng/ml 组在转染结束后第 3 天对肝癌生长抑制率最高可达 71.82%,其后逐渐缓慢下降,至第 7 天仍可保持一定的生长抑制作用;由图 3 可见,2 对照组细胞增殖活性较高,survivin ASODN 处理后各组细胞增殖活性随 ASODN 剂量不同均有不同程度降低(见图 2,3)。

图 2 转染后 SMMC-7721 细胞生长抑制率变化

Fig. 2 Changes of SMMC-7721 cell growth inhibitory rate after transfection

2.3 Survivin ASODN 转染对 SMMC-7721 细胞凋亡的

作用

流式细胞仪定量检测凋亡细胞,DNA 直方图见转染后细胞周期 G1 期细胞明显减少,G1 峰左侧出现明显的亚二倍体凋亡峰。I ~ VI 各组细胞凋亡率分别为 0.7%,0.76%,2.43%,7.82%,23.11% 及 31.35%,4 组实验组细胞凋亡率均较对照组有显著增加($P < 0.05$)。

图 3 转染后 SMMC-7721 细胞生长曲线

Fig. 3 SMMC-7721 Cell growth curve after transfection

3 讨论

3.1 Survivin ASODN 对肝癌 SMMC-7721 细胞 survivin 基因表达的作用

随着 DNA 自动化合成技术的发展,采用反义技术抑制和封闭特定基因的表达,已经成为研究基因功能的重要方法以及基因治疗的重要组成部分。本研究采用针对 survivin mRNA 翻译起始位点的寡核苷酸序列,特异地阻断 survivin 蛋白的合成,由于特异地封闭了 survivin mRNA 翻译的起始位点,因此使 survivin 蛋白的翻译过程无法启动,从而阻断了蛋白的合成。由实验结果可见,该 ASODN 能确实有效地抑制肝癌 SMMC-7721 细胞 survivin 基因蛋白及 mRNA 的表达,在 1 000 ng/ml 组,可将 survivin 蛋白的表达下调 84.6%,将其 mRNA 的表达下调 69.7%,故可用于特异地阻断 survivin 表达以研究其功能并进行反义治疗。

研究表明 ASODN 通过多种机制产生生物活性,主要与 RNaseH 介导的靶 mRNA 水解以及由于 mRNA-DNA 异源双核酸分子所产生的空间位阻导致翻译停止有关^[2]。本实验发现,经过 survivin ASODN 转染后,细胞内 survivin 蛋白和 mRNA 的表达都降低,较小剂量(600 ng/ml)的 ASODN 即可引起 survivin 蛋白表达的显著降低,而同样剂量的 ASODN 还不足以引起 survivin mRNA 表达的显著变化,当采用较大剂量(800 ng/ml 以上)的 ASODN 时才会引起 survivin mRNA 表达的显著降低,说明 survivin ASODN 至少在蛋白翻译

及 mRNA 转录两个水平发挥作用,其作用的差异可能与 ASODN 的设计有关,由于采用了针对 survivin mRNA 翻译起始位点的设计,ASODN 较易接近成熟的 mRNA,阻止蛋白合成的启动过程,从而阻断 survivin 蛋白的合成;而 RNaseH 介导的靶 mRNA 水解作用可能需要较大的 ASODN 与靶 mRNA 结合形成 mRNA-DNA 异源双核酸后才能够体现出来。

3.2 Survivin ASODN 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用

ASODN 于 1992 年开始应用于肿瘤的治疗,也是目前最有可能应用于临床的基因疗法^[3,5]。由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织,在正常成人组织几乎不表达,使得应用 survivin 特异性抗体免疫治疗以及反义 survivin 基因治疗具有良好的靶向性、特异性及安全性,这是其特有的优点^[6,7]。但以封闭 survivin 的表达抑制肝癌细胞生长的研究尚无文献报道,在本实验中我们进行了初步的研究。采用针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 20 聚 ASODN 转染人肝癌细胞 SMMC-7721 后,我们发现细胞贴壁率呈逐渐降低的趋势,细胞的增殖活性受到了明显的抑制,在 600 ~ 1 000 ng/ml ASODN 各组细胞贴壁率较正常对照及 SODN 转染组显著降低。此外,反义药物作用的持续性对于评价药物作用,特别是对于给药方案具有重要的参考价值。实验结果表明, survivin ASODN 转染后的作用具有一定的持续性,转染结束后,各组细胞增殖活性均有不同程度降低,在转染后第 3 天细胞生长抑制率最高,其后逐渐缓慢下降,至第 7 天对细胞生长仍保持了一定的抑制作用。这一结果初步说明采用 ASODN 封闭 survivin 的表达能确实地抑制肝癌细胞的增殖活性, survivin 基因有望成为肝癌治疗中的靶点。

在调控凋亡的基因中, survivin 的抑凋亡作用在肿瘤发生发展中的作用是十分重要的。在发现 survivin ASODN 对肝癌细胞的生长抑制效应后,我们进一步研究了 survivin ASODN 对肝癌细胞凋亡的作用,结果发

现,在各 ASODN 转染组凋亡细胞比率呈剂量依赖性增加,较 2 对照组有显著差异。说明 survivin ASODN 抑制肝癌细胞生长的效应能够通过诱导细胞凋亡来实现,而且单独抑制细胞中 survivin 基因的表达即可诱导细胞凋亡显著增加,这一效应是 survivin 所独有的,因为在其它一些抑凋亡基因中并无此种情况发生,如采用反义技术抑制 bcl-2 基因的表达可以增加细胞对凋亡的敏感性,但并不足以引起细胞死亡^[8],这也为 survivin 基因在肝癌细胞中发挥抑凋亡作用提供了新的证据。

[参 考 文 献]

- [1] 陈 涛, 贾玉容, 田伏洲, 等. 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(4): 411-414.
- [2] Minshull J, Hunt T. The use of single-stranded DNA and RNase H to promote quantitative hybrid arrest of translation of mRNA/DNA hybrids in reticulocyte lysate cell-free translations[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(16): 6433-6451.
- [3] Giles RV, Spiller DG, Clark RE, et al. Antisense morpholino oligonucleotide analog induces missplicing of C-myc mRNA[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1999, 9(2):213-220.
- [4] Good PD, Krikos AJ, Li SX. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei[J]. Gene Ther, 1997, 4(1): 45-54.
- [5] Julianna L, Daisy S, Frank F, et al. Antisense oligodeoxy-nucleotide phosphorothioate complementary gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type1 in human peripheral blood cell[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(17): 7942-7946.
- [6] Olie RA, Simoes-Wust AP, Zangemeister W, et al. A novel anti-apoptosis oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2805-2809.
- [7] Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth[J]. Neoplasia, 2000, 2(3): 235-241.
- [8] Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, et al. Bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice[J]. Nat Med, 1998, 4: 232-234.

[收稿日期] 2004 - 01 - 04 [修回日期] 2004 - 05 - 20

《 中国肿瘤生物治疗杂志 》征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》创刊于 1994 年,经国家科委和国家新闻出版署正式批准,由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家正式医学期刊(刊号为 CN31 - 1725/R)。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用,主要刊登与肿瘤生物治疗有关的基础理论与临床的研究论文、新实验技术及其研究成果等。《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价: 8.00 元,全年定价: 32.00 元,邮发代号: 4 - 576,请通过邮局订阅。也可从本刊编辑部订阅,请将 40.00 元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码,本刊编辑部将负责如期寄至您的手中。

联系地址: 上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼 《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人: 王 莹; 邮政编码: 200433

联系电话: 021 - 55620605 × 22; 021 - 25070316 × 22