

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0248-04

单独及联合转染 survivin 和 bcl-2 反义寡核苷酸诱导胆囊癌细胞凋亡的研究

冯立民, 王建立, 乌新林, 姜希宏, 寿楠海(山东大学齐鲁医院普外科, 济南 250012)

[摘 要] **目的:** 探讨单独及联合转染 survivin、bcl-2 反义寡核苷酸(AsODN)对胆囊癌细胞系 GBC-SD 的凋亡促进作用。**方法:** 设计并合成特异性靶向 survivin 及 bcl-2 的 AsODN。免疫组织化学法观察胆囊癌细胞中 Survivin 及 Bcl-2 蛋白的表达情况;实验分为 4 组:空白对照组、survivin AsODN 转染组、bcl-2 AsODN 转染组、联合 survivin 及 bcl-2 AsODN 转染组。转染 24 h 后,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 survivin 基因表达的变化,电镜下观察细胞形态变化,流式细胞仪技术检测细胞凋亡率,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 AsODN 对细胞的生长抑制率。**结果:** Survivin 及 Bcl-2 蛋白在胆囊癌细胞中均有较高表达;单独及联合转染 survivin 及 bcl-2 AsODN 后,胆囊癌细胞内 survivin 基因 mRNA 表达下调 47.8% ;,电镜下胆囊癌细胞呈典型凋亡样改变;凋亡率分别为 11.38% ± 3.91%(survivin AsODN 组)、9.26% ± 4.15%(bcl-2 AsODN 组)、28.45% ± 6.34% (联合转染组);分别与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$),而联合转染组同单独转染 survivin AsODN 组及 bcl-2 AsODN 组相比差异也有显著性($P < 0.05$)。各转染组相对于空白对照组的 AsODN 抑制率分别为 54.3% ,47.6% ,76.5%。**结论:** Survivin 及 Bcl-2 蛋白在胆囊癌细胞中呈高表达,单独及联合转染 survivin 和 bcl-2 反义寡核苷酸可促进胆囊癌细胞凋亡,而联合转染更具显著性。

[关键词] 胆囊癌; survivin; bcl-2; 寡核苷酸类; 反义; 转染

[中图分类号] R735.8 [文献标识码] A

Inhibition of survivin and bcl-2 Antisense Oligodeoxynucleotides Combined Transfection on the Human Gallbladder Carcinoma Cell Line GBC-SD *in vitro*

FENG Li-min, WANG Jian-li, WU Xin-lin, JIANG Xi-hong, SHOU Nan-hai(Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effect of survivin and bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides (AsODN) combined transfection on the human gallbladder carcinoma cell line GBC-SD *in vitro*. **Methods:** Survivin and Bcl-2 protein expressions were detected by immunohistochemical method; Cultured cells were divided into 4 groups: Nomal control group, survivin antisense observed group, bcl-2 antisense observed group and combined group. After transfected for 24 h, the expression of survivin mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). Cell morphological changes were observed under electron microscopy. Apoptosis index (AI) was examined by flow cytometry; Inhibitory rate (IR) was determined by the colorimetri MTT cell viability and proliferation assay. **Results:** Survivin and Bcl-2 protein were highly expressed in gall bladder carcinoma cells; The expression of survivin mRNA was decreased 47.8%. Abnormal morphological changes of cells were observed in the three AsODN transfection groups; The AI in survivin antisense observed group, bcl-2 antisense observed group, and combined group was 11.38% ± 3.91% , 9.26% ± 4.15% , 28.45% ± 6.34% respectively and significantly higher than the nomal control group ($P < 0.01$), and that in the combined group was significantly higher than the other two observed groups($P < 0.05$). The IR was 54.3% ,47.6% ,76.5% respectively in the three AsODN transfection groups. **Conclusion:** Survivin and bcl-2 protein were highly expressed in gallbladder carcinoma cells. Survivin AsODN and bcl-2 AsODN can induce GBC-SD cell apoptosis and the effect was more markedly by combining the two AsODNs.

[**Key words**] gallbladder carcinoma; survivin; bcl-2; oligonucleotide; antisense; transfection

* 细胞凋亡在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用,也为肿瘤的治疗提供了新的途径。凋亡抑制蛋白

[作者简介] 冯立民(1971-),男,吉林省四平市人,博士研究生,主要从事肝胆肿瘤方面的研究, E-mail: fengli-1971@163.com

(inhibitor of apoptosis protein, IAP) 是抑制细胞凋亡的重要成分, survivin 是最近新发现的一种 IAP 家族成员之一。Bcl-2 是最早发现的抑制细胞凋亡的蛋白。我们观察了 survivin 和 bcl-2 在胆囊癌细胞中的表达情况, 并分别及联合转染 survivin 和 bcl-2 靶向反义寡核苷酸, 以观察其对胆囊癌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

人胆囊癌细胞 GBC-SD 由本室构建并保存; 小牛血清及 RPMI-1640 培养基购自杭州四季青公司; 兔抗人 survivin 多抗及兔抗人 bcl-2 多抗购自武汉博士德公司; SABC 试剂盒购自武汉博士德公司; 脂质体 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司; 流式细胞仪: FACScan 型, 美国 BD 公司; JSM-T300 扫描电子显微镜: 日本 JEOL 公司; H-800 型透射电镜: 日本日立公司。

1.2 脂质体-反义寡核苷酸转染复合物

反义寡核苷酸由上海生物工程公司合成, 采用全硫代化修饰。survivin AsODN 序列: 5'-GGGGCACCCATGCCGCCGCC-3'; bcl-2 AsODN 序列: 5'-CAGCGTGCGCCATCCTTCCC-3'。

1.3 分组和转染

取对数生长期的胆囊癌细胞, 接种于 6 孔板, 约 80% 融合时开始实验。设置空白对照组、survivin AsODN 转染组、bcl-2 AsODN 转染组、联合转染组, 每组设 3 个复孔。按 Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明进行细胞转染, 24 h 后收集各组细胞并用于后续试验。

1.4 免疫组织化学染色

按试剂盒说明步骤进行免疫组化染色操作; 阳性结果判定为细胞质内出现棕黄色颗粒, 阳性细胞数 > 25%。

1.5 电镜对转染后胆囊癌细胞的形态学观察

生长在盖玻片上的细胞用 2.5% 戊二醛原位固定, 乙醇梯度脱水, CO₂ 临界点干燥, 真空镀金, 扫描电镜下观察; PBS 缓冲液冲洗细胞, 2.5% 戊二醛原位固定 2 h 后收集细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 1% OsO₄ 后固定 10 min, 乙醇梯度脱水, Epon812 树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 透射电镜下观察。

1.6 流式细胞仪观察凋亡率

收集 10⁶ 个细胞, 70% 乙醇 4℃ 固定。制备细胞悬液及碘化丙啶染色, 上机后收集 2 万个细胞, 流式细胞仪检测并分析数据。

1.7 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞的生长抑制效应

将各实验组细胞以 1 × 10³ 个分别接种于 96 孔培养板的每孔中, 继续培养, 接种后第 1、3、5 和 7 天取出培养板, 每孔加 MTT (5 g/L) 20 μl, 继续孵育 4 h, 小心析出上清液, 加 150 μl 二甲基亚砷 (DMSO) 充分振荡后, 在波长 490 nm 的 DG-5031 酶联检测仪上测定其 A 值, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组平均 A 值} - \text{转染组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值}} \times 100\%$$

1.8 RT-PCR 法检测 survivin mRNA 表达

收集 10⁶ 个细胞, 应用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 定量。RNA 样本经逆转录反应合成 survivin cDNA 第一链, 然后进行 PCR 扩增 (PCR 扩增仪为美国 Minicycler™)。RT-PCR 扩增 survivin 的引物上游序列: 5'-CTTTCTCAAGGACCACCGCATC-3', 下游序列: 5'-CAATCCATGGCAGCCAGCTGC-3', 扩增片段大小为 393 bp; β-actin 序列为 P₁: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', P₂: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3', 扩增片段大小为 539 bp。电泳鉴定, 并将凝胶电泳图像输入美国 Kodak 凝胶分析系统, 应用 1D Image Analysis Software 进行表达强度分析。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

Survivin 及 Bcl-2 蛋白均在胆囊癌细胞中有表达, 主要分布在细胞浆内, 呈棕黄色 (图 1)。

2.2 电镜观察细胞形态

对照组 GBC-SD 细胞线粒体肿胀, 粗面内质网丰富, 核浆比例高, 核膜皱折样凹陷, 核内染色质丰富, 核仁大; 脂质体 + AsODN 转染后细胞质浓缩, 细胞内出现空泡变性, 细胞核缩小, 核仁消失, 染色质聚集并向核膜靠拢; 有些细胞产生凋亡小体 (图 2)。

2.3 流式细胞仪检测凋亡率

对照组胆囊癌细胞的凋亡率为 0.55%, 脂质体 + survivin AsODN 转染后的凋亡率为 (11.38 ± 3.91)%, 与对照组相比有显著的差异 (P = 0.006); 脂质体 + bcl-2 AsODN 转染后的凋亡率为 (9.26 ± 4.15)%, 与对照组相比也有显著的差异 (P = 0.007); 而联合转染 survivin 和 bcl-2 AsODN 后的凋亡率为 (28.45 ± 6.34)%, 同单独转染 survivin 或 bcl-2 AsODN 组相比有显著差异 (P = 0.021 和 P = 0.016)。从细胞周期分析可以看出; 转染后 G0/G1 期细胞的比例增加, 分别由对照组的 41.25% 升至 58.45% 及 69.57% 凋亡峰明

显升高(图3)。

2.4 AsODN 对 GBC-SD 细胞的生长抑制作用

AsODN 对胆囊癌细胞有明显的抑制作用,作用后第3天各转染组相对于空白对照组的抑制率分别为 54.3% ,47.6% ,76.5% 。

2.5 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达情况

本研究采用半定量 RT-PCR 检测 GBC-SD 人胆囊癌细胞、LIP + SODN 转染后以及 2 种不同浓度 AsODN + LIP 转染后胆囊癌细胞的 survivin mRNA 表达情况(图4)。与对照组相比,正义寡核苷酸转染组 survivin 基因表达无明显变化;反义寡核苷酸转染组 survivin mRNA 表达平均下调了 47.8% 。

3 讨 论

肿瘤的发生和发展不仅同肿瘤细胞的增殖和分化异常有关,而且同细胞凋亡的变化有关。已证实细胞凋亡的减少可引起肿瘤的发生,且通过逃逸凋亡而促进肿瘤细胞恶性转化及演进。因此,诱导肿瘤细胞凋亡的策略成为近年来肿瘤治疗方面的重点。在恶性肿瘤发生的癌基因研究中,不少学者提出了多基因协同作用的假设,认为在肿瘤发生发展的各阶段,至少有两个或两个以上功能不同的异常激活的癌基因各自发挥

图1 免疫组织化学法检测 Survivin 及 Bcl-2 蛋白在胆囊癌细胞中的表达

Fig. 1 Expression of Survivin and Bcl-2 protein in gall bladder carcinoma cells

A: Expression of Survivin; B: Expression of Bcl-2 (×400)

图2 电镜观察反义寡核苷酸转染后胆囊癌细胞形态的变化

Fig. 2 Cell morphological changes under electron microscopy

A: Control group(×6 400); B: After transfection(×6 400); C: Apoptotic body(×10 000)

图3 流式细胞学检测 survivin 反义寡核苷酸、bcl-2 反义寡核苷酸及联合转染后胆囊癌细胞的凋亡率

Fig. 3 Flow cytometry analysis of apoptosis iudexand the cell cycle

A: Survivin antisense observed group; B: bcl-2 antisense observed group; C: Combined group
Apo: Apoptotik peak; G0/G1, S, G2/M: The different phases of the cell cycle

图4 RT-PCR检测 survivin的 mRNA表达**Fig. 4 Expression of survivin mRNA by RT-PCR**

1: Control; 2: LIP + SODN; 3: LIP + AsODN;
4: LIP + AsODN; β : β -actin; M: Marker

不同作用,并在时间和空间上相互配合,协同加强了细胞的癌变^[1]。survivin 基因位于染色体 17q25 上,它与以往的凋亡抑制基因不同,有其独有的特点,其编码的蛋白质仅 40 aa,是迄今为止最小的 IAP 蛋白。它主要通过下调凋亡酶 caspase-3 或 caspase-7 的活性,保护细胞在有丝分裂后期避免凋亡,顺利增值^[2]。其最大的特点为 survivin 只在胚胎组织细胞及未分化的组织细胞,及大部分肿瘤组织细胞中表达,而在成熟的组织及正常组织细胞中无表达^[3]。因此,survivin 基因已成为目前肿瘤治疗研究中的一个新的热选基因。bcl-2 表达可抑制细胞死亡,延长细胞寿命,增加细胞其他基因突变机会或使突变基因在细胞内积聚,导致细胞恶性转化,bcl-2 还可通过抑制细胞凋亡,增加肿瘤细胞数,导致肿瘤的发生和发展^[4]。

本研究结果显示,survivin 及 bcl-2 均在人胆囊癌细胞中高表达,提示 survivin 及 bcl-2 可能通过抑制胆囊癌细胞凋亡,在胆囊癌的发生及发展起重要作用。分别用 survivin AsODN 及 bcl-2 AsODN 转染胆囊癌细

胞,均可促进胆囊癌细胞的凋亡,但与单独应用相比,合用 AsODN 差异有显著性($P < 0.05$)。两者之间的协同作用可能和 2 个基因在凋亡抑制信号传导通路不同的作用环节有关。一方面,细胞凋亡信号传导的一个关键因素是 Caspase 家族的激活,survivin 直接抑制下游信号传导的效应 Caspase^[2]。另一方面,线粒体以及细胞色素 C 的释放在细胞凋亡过程的调节以及非 Caspase 调节的细胞死亡中起重要作用,位于线粒体的 bcl-2 则抑制细胞色素 C 的释放^[5]。因此,针对 2 个基因的 AsODN 很可能在胆囊癌的治疗中达到满意的结果。

[参考文献]

- [1] Gadd SL, Hobbs G, Miller MR. Acetaminophen-induced proliferation of estrogen-responsive breast cancer cells is associated with increases in c-myc RNA expression and NF-kappaB activity [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 66(2): 233-243.
- [2] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5315-5320.
- [3] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(1): 917-921.
- [4] Daido S, Tamiya T, Ono Y, et al. Expression of bcl-2, Bcl-x, and Bax protein in astrocytomas in relation to patient survival [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2001, 18(2): 123-129.
- [5] Gao G, Dou QP. N-terminal cleavage of Bax by calpain generates a potent proapoptotic 18kD fragment that promotes Bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 80(1): 53-72.

[收稿日期] 2004-05-27

[修回日期] 2004-09-20

《第三军医大学学报》(半月刊)征订启事

《第三军医大学学报》为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术刊物。先后被确定为《中国科技论文统计源期刊》和中国自然科学类核心期刊;并被《俄罗斯文摘杂志(AJ)》和《美国化学文摘(CA)》及国内所有相关收录机构所收录。2003年荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊。

本刊面向国内、外征集医疗、教学、科研工作者在医药科研领域及临床工作中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。主要栏目设有:专家论坛、基础医学、临床医学、军事医学、预防医学、综述、技术方法、经验交流与短篇等。

本刊为半月刊,铜版纸彩色印刷,大16开,96页,每期定价10.00元,全年240.00元。国内统一刊号:CN51-1095/R,国际标准刊号:ISSN 1000-5404,国内邮发代号:78-91,国外邮发代号:M6529。请及时向当地邮局订阅,漏订读者可直接汇款至我刊编辑部。

地址:重庆市高滩岩第三军医大学学报编辑部;邮编:400038

联系人:王红,曾颖;电话:(023)68752187;(023)68752189;电子信箱:aammt@mail.tmmu.com.cn