

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.005

bcl-2、IL-6、IL-6R 反义寡脱氧核苷酸对小细胞肺癌细胞作用的比较

祝亮方, 陈鑫基, 胡建达*, 林振兴, 陈英玉, 黄绿叶(福建医科大学 附属协和医院 福建省血液病研究所, 福建 福州 350001)

[摘要] 目的: 比较 bcl-2、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-6受体(interleukin-6 receptor, IL-6R)反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(antisense phosphorothiate oligodeoxynucleotide, AS-PS-ODN)对小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 细胞增殖及诱导凋亡的作用, 初步探讨反义核苷酸技术治疗中靶基因的选择策略。方法: 合成反义寡脱氧核苷酸 bcl-2 AS-PS-ODN、IL-6 AS-PS-ODN、IL-6R AS-PS-ODN, 分别作用于 NCI-H446 细胞株, 通过细胞克隆形成实验检测细胞增殖活性的变化, 细胞凋亡线粒体流式检测及 DNA 倍体分析检测细胞凋亡, 半定量 RT-PCR 检测相关基因表达水平的变化。结果: (1) bcl-2 AS-PS-ODN、IL-6 AS-PS-ODN、IL-6R AS-PS-ODN 均能够抑制肺癌细胞增殖活性和诱导细胞凋亡, 其中以 IL-6 AS-PS-ODN 抑制作用最强, bcl-2 AS-PS-ODN 次之, IL-6R AS-PS-ODN 作用最弱。(2) 3 种反义寡脱氧核苷酸均能下调肺癌细胞相应基因的表达水平, 其中以 IL-6 下调幅度最大, 达(84.1 ± 5.01)%; bcl-2 和 IL-6R 基因下调幅度相近, 分别为(62.6 ± 3.42)%和(60.3 ± 4.45)%。(3) 反义核苷酸作用后除了引起自身基因表达下调外, 还伴对其他基因表达的调节作用, 如 IL-6 AS-PS-ODN 作用使 bcl-2 基因表达下调(32.2 ± 0.20)%; 而 bcl-2 AS-PS-ODN 作用使 IL-6 基因表达上调(74.3 ± 4.13)%。结论: IL-6 AS-PS-ODN 较 bcl-2 AS-PS-ODN 和 IL-6R AS-PS-ODN 能更有效地诱导小细胞肺癌细胞凋亡, IL-6 是 NCI-H446 小细胞肺癌反义核苷酸治疗较为合适的靶基因。

[关键词] 小细胞肺癌; 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸; IL-6; bcl-2; IL-6R; 凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)03-0232-06

Comparison of effects of antisense bcl-2, IL-6 and IL-6R oligodeoxynucleotides on small-cell lung cancer NCI-H446 cells

ZHU Liang-fang, CHEN Xin-ji, HU Jian-da*, LIN Zhen-xing, CHEN Ying-yu, HUANG Lu-ye (Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Institute of Hematology of Fujian Province, Fuzhou 350001, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of antisense (AS) bcl-2, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor phosphorothioate oligodeoxynucleotides (PS-ODN) on the proliferation and apoptosis of small-cell lung cancer NCI-H446 cells, and to explore strategies of target genes selection in antisense oligodeoxynucleotides therapy. **Methods:** Bcl-2 AS-PS-ODN, IL-6 AS-PS-ODN and IL-6R AS-PS-ODN were synthesized and were used to treat NCI-H446 cells. Proliferation and viability of NCI-H446 cells were measured by cell clone formation assay after treatment; apoptosis of NCI-H446 cells was detected by DNA content analysis and MitoCapture detection kit; and the expression of bcl-2, IL-6 and IL-6R mRNA was examined by RT-PCR. **Results:** (1) All the three antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides IL-6, bcl-2, IL-6R AS-PS-ODN inhibited proliferation and viability of lung cancer NCI-H446 cells, and induced NCI-H446 cells apoptosis, with the inhibitory effect of IL-6 AS-PS-ODN more effective than those of bcl-2 AS-PS-ODN and IL-6R AS-PS-ODN. (2) All the three kinds of AS-PS-ODN decreased the corresponding gene expression, with gene expression decreased by (84.1 ± 5.01)%, (62.6 ± 3.42)% and (60.3 ± 4.45)% in IL-6, bcl-2 and IL-6R AS-PS-ODN group, respectively. (3) AS-PS-ODN not only inhibited the expression of its target gene, but also regulated expression of other genes. IL-6 AS-PS-ODN decreased bcl-2 expression by (32.2 ± 0.20)% and bcl-2 AS-PS-ODN increased IL-6 expression by (74.3 ± 4.13)%. **Conclusion:** IL-6 AS-PS-ODN is more effective than bcl-2 and IL-6R AS-PS-ODN in inducing apoptosis of small-cell lung cancer NCI-H446 cells, so IL-6 may be used as a target gene in antisense oligodeoxynucleotide therapy of small-cell lung cancer.

[基金项目] 福建省卫生厅青年科研基金(No. 200403)。Supported by the Research Foundation for Young Scholars of Fujian Province(No. 200403)

[作者简介] 祝亮方(1974-),男,湖北省应城市人,硕士研究生,主要从事恶性血液病基础与临床方面研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: jdhu@medmail.com.cn

[**Key words**] small-cell lung cancer; antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide; IL-6; bcl-2; IL-6R; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 232-237]

反义核苷酸技术是肿瘤基因治疗的一种重要方法。反义核苷酸单独对肿瘤的抑制作用比较有限,但可以增加肿瘤对化疗药物的敏感性,降低耐药的发生率^[1-3];具有选择性高、毒性作用小的优点。bcl-2 在许多肿瘤中都有表达,抑制 bcl-2 的表达可抑制肿瘤的进展,目前针对小细胞肺癌的反义 bcl-2 治疗已进入临床试验阶段^[4-5]。本课题组前期研究^[6]发现,反义 bcl-2 能诱导小细胞肺癌细胞凋亡之外,还伴有 IL-6 mRNA 表达的上调。IL-6 是一种炎症介质,它可以提供有利于肿瘤生长的微环境^[7];研究^[8]显示肺癌患者血清 IL-6 水平与疾病进展相关。因此可推测 bcl-2 和 IL-6 可能都参与肺癌的发生和发展,而 IL-6R 是 IL-6 通过信号转导发挥其生物学作用的一个环节。本研究选择 bcl-2、IL-6、IL-6R 的 3 种反义寡脱氧核苷酸,观察、比较它们对小细胞肺癌细胞的增殖、细胞活力、凋亡及相关基因表达的影响,并初步探讨反义核苷酸治疗中靶基因选择的策略。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 引自中国科学院上海细胞生物研究所。10% 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。RPMI1640 培养基购自 Gibco BRL 公司。MitoCapture™ 线粒体凋亡检测试剂盒(MitoCapture™ Apoptosis Detection Kit)购自 Biovision 公司, Kenesis 50 试剂盒购自 Bio-Rad 公司,反转录试剂盒购自 Promega 公司。TRIzol 购自 Life Technology 公司。Taq DNA 聚合酶购自华美公司。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。2400 型 PCR 仪购自美国 PE 公司。

1.2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸合成

bcl-2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, AS-PS-ODN)和 bcl-2 无义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(nonsense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, NS-PS-ODN)由本所 392-05 型 DNA/RNA 合成仪(美国 PE-ABI 公司)合成, IL-6 AS-PS-ODN 和 IL-6R AS-PS-ODN 及其正义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(sense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, S-PS-ODN)由上海生工生物工程有限公司合成。bcl-2 AS-PS-ODN 是针对 bcl-2 mRNA 开放阅读框起始 6 个密码子的序列,其

序列为 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3',并以无义序列(bcl-2 NS-PS-ODN)5'-TACCGTCTGCGACGCCCT-3'作为反义序列的特异性对照。IL-6 AS-PS-ODN 是针对 IL-6 基因第二外显子的序列,其序列是 5'-TCCTGGGGTACTGG-3',以其完全互补的正义序列(IL-6 S-PS-ODN)5'-CCAGTACCCCCAGGA-3'作为对照; IL-6R AS-PS-ODN 是针对 IL-6R mRNA 开放阅读框起始 5 个密码子的序列,其序列为 5'-GACG-GCCAGCATGCT-3',以其完全互补的正义序列(IL-6R S-PS-ODN)5'-AGCATGCTGGCCGTC-3'作为对照。合成产物经 OPC 柱或 HPLC 纯化,紫外分光光度仪定量分装冻干后, -20 °C 保存。使用时用不含血清的 RPMI1640(Gibco BRL 公司)培养液溶解。

1.3 细胞培养

小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。实验时要求细胞生长状况良好,融合约 80%。

1.4 细胞克隆形成实验检测细胞增殖活力的改变

收集细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基接种在 24 孔培养板,每孔含细胞数 2×10^2 个。实验共分为 3 组,即空白对照组、无义或正义药物对照组、反义药物组,其中空白对照组只含有培养基;药物对照组包括: bcl-2 NS-PS-ODN、IL-6 S-PS-ODN、IL-6R S-PS-ODN;反义药物组包括: bcl-2 AS-PS-ODN、IL-6 AS-PS-ODN、IL-6R AS-PS-ODN;后两组药物终浓度均为 10.0 μmol/L。每组设有 3 个复孔,每孔终体积 1 ml,培养至第 7 天时计数细胞克隆数,以大于或等于 20 个细胞者为 1 个克隆,克隆形成率(100%) = (克隆数 / 接种细胞数) × 100%。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡的改变

1.5.1 线粒体跨膜电位检测 收集细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基接种于 50 ml 培养瓶,每瓶接种细胞数为 1×10^6 。实验分组及药物浓度同前。培养 48 h 后收集细胞。按 MitoCapture™ 线粒体凋亡检测试剂盒说明书进行检测。实验重复 3 次。

1.5.2 DNA 倍体检测 细胞准备同线粒体跨膜电位检测,收集培养 48 h 的细胞,离心沉淀后用 1/15 mol/L 的 PBS 洗涤 2 次,加入 Kenesis 50 试剂盒(Bio-Rad 公司)中,置 18 ~ 25 °C 暗室孵育 30 min 后,用流式细胞仪行 DNA 倍体分析。

1.6 RT-PCR 检测肺癌细胞中相关基因表达的变化

RT-PCR 检测肺癌细胞 HCl-H446 中 bcl-2、IL-6 和 IL-6R 基因 mRNA 水平的表达,并以 β -actin 为

内参照,对各目的基因表达行半定量分析。重复 3 次。引物序列见表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列、扩增片段长度和退火温度
Tab. 1 Sequence, amplified fragment length and annealing temperature of RT-PCR primers

Primer	Sequence	Length of amplified fragment (bp)	Annealing temperature(t/°C)	Cycle
β -actin	5'-GGCATGGGTCAGAAGGATTCC-3' 5'-ATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'	500	Variable *	Variable *
IL-6	5'-TTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAG-3' 5'-GCCGAGAATGAGATGAGTTGTCA-3'	191	66	32
IL-6R	5'-CATTGCCATTGTTCTGAGGTTTC-3' 5'-AGTAGTCTGTATTGCTGATGTC-3'	250	60	29
bcl-2	5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3' 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'	318	66	35

* Variable means the annealing temperature changes according to target genes

收集培养 24 h 的细胞,提取总 RNA,分析其纯度和浓度后, -80 °C 保存备用。cDNA 合成按反转录试剂盒说明书进行,均行双重 PCR 扩增。着重对引物浓度、退火温度和循环数这 3 个参数进行 PCR 条件的优化。各参数尽可能地在同一条件下进行。PCR 总反应体系 25 μ l,其中 cDNA 2 μ l、 β -actin 引物浓度 0.05 μ mol/L、目的基因引物浓度均为 0.4 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶为 1.5 U。先 94 °C 预变性 5 min,再 94 °C 变性 30 s,退火 40 s,72 °C 延伸 40 s,最后 72 °C 延伸 5 min。

取 5 μ l PCR 产物上样电泳,经凝胶图像分析仪拍照并分析电泳条带的荧光强度,目的基因 mRNA 水平的相对表达量(F)为目的基因条带与 β -actin 条带荧光强度的比值,目的基因变化率 R(%) = (实验组 F - 空白组 F)/空白组 F \times 100%。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件, Levene 进行方差分析齐性检验,若方差齐,用单因素方差分析,组间及组内比较用 LSD 检验;若方差不齐,用 Games-Howell 法分析。

2 结果

2.1 AS-PS-ODN 对肺癌细胞 NCI-H446 克隆形成能力的影响

克隆实验结果显示:各组 AS-PS-ODN 均能不同程度地抑制 NCI-H446 细胞克隆形成(表 2)。浓度

为 10 μ mol/L 时,各组 AS-PS-ODN 的细胞克隆形成率分别是: bcl-2 AS-PS-ODN 组为 (13.25 \pm 5.58)% ,IL-6R AS-PS-ODN 组为(11.88 \pm 3.42)% ,而 IL-6 AS-PS-ODN 组无克隆形成。对照组(包括空白对照及无义或正义对照组)与各反义组之间比较差异均具有统计学意义(P < 0.01)。可见,IL-6 AS-PS-ODN 对细胞克隆形成的抑制作用最强,而 bcl-2 AS-PS-ODN 和 IL-6R AS-PS-ODN 的抑制作用相对较弱。

表 2 AS-PS-ODN 作用后 NCI-H446 细胞克隆形成率的变化(n = 3, %)

Tab. 2 Changes of clone formation rates of NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN(n = 3, %)

Group	Clone formation rate
Control	22.75 \pm 1.32
bcl-2 NS-PS-ODN	24.37 \pm 3.30
bcl-2 AS-PS-ODN	13.25 \pm 5.58** $\Delta\Delta$
IL-6 S-PS-ODN	23.50 \pm 3.54
IL-6 AS-PS-ODN	0.00 \pm 0.00** $\Delta\Delta$
IL-6R S-PS-ODN	24.88 \pm 2.72
IL-6R AS-PS-ODN	11.88 \pm 3.42** $\Delta\Delta$

** P < 0.01 vs control; $\Delta\Delta$ P < 0.01 vs NS-PS-ODN or S-PS-ODN

2.2 AS-PS-ODN 对 NCI-H446 肺癌细胞凋亡的影响 MitoCapture™ 线粒体凋亡检测试剂盒检测结果

(图1,表3)显示:各组 AS-PS-ODN 凋亡率均高于空白对照组及对应的无义或正义对照组 ($P < 0.01$), IL-6 AS-PS-ODN 组高于 bcl-2 AS-PS-ODN 组和 IL-6R AS-PS-ODN 组,其差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);而空白对照组与无义或正义对照组之间差异无统计学意义。

DNA 倍体分析与 MitoCapture™ 线粒体凋亡检

测的结果相一致,bcl-2 AS-PS-ODN 组细胞凋亡率为 (11.74 ± 0.24)%, IL-6 AS-PS-ODN 组为 (23.53 ± 1.43)%, IL-6R AS-PS-ODN 组为 (8.58 ± 0.16)%。空白对照组和相应的无义或正义药物对照组分别是: (5.23 ± 0.13)%、(6.38 ± 0.22)%、(6.87 ± 0.11)%、(4.63 ± 0.90)%。其中 IL-6 AS-PS-ODN 组诱导的凋亡率最高 ($P < 0.01$,图2)。

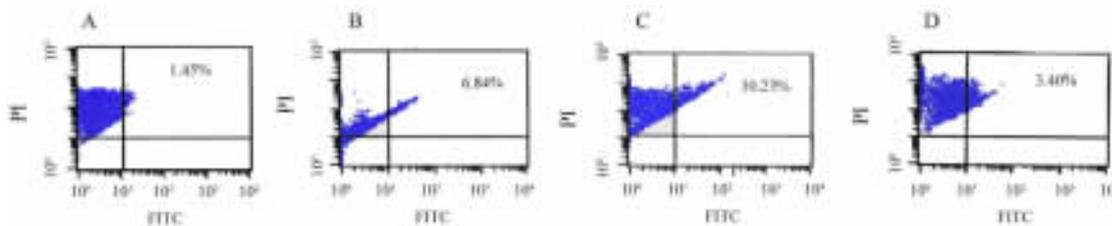


图1 流式细胞术检测 AS-PS-ODN 作用后肺癌细胞凋亡线粒体跨膜电位的变化

Fig.1 Changes of mitochondrial transmembrane potential in apoptotic lung cancer cells treated with AS-PS-ODN as detected by FACS

A: Control; B: bcl-2 AS-PS-ODN; C: IL-6 AS-PS-ODN; D: IL-6R AS-PS-ODN

表3 AS-PS-ODN 致 NCI-H446 细胞凋亡率的变化

Tab.3 Changes of apoptotic rates of NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN ($n=3$, %)

Group	Apoptotic rate (%)
Control	1.45 ± 0.10
bcl-2 NS-PS-ODN	1.24 ± 0.03
bcl-2 AS-PS-ODN	$6.84 \pm 0.41^{**}$
IL-6 S-PS-ODN	1.29 ± 0.05
IL-6 AS-PS-ODN	$30.23 \pm 2.55^{**\Delta\Delta}$
IL-6R S-PS-ODN	1.66 ± 0.04
IL-6R AS-PS-ODN	$3.40 \pm 0.27^{**}$

** $P < 0.01$ vs Control, NS-PS-ODN or S-PS-ODN;

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs bcl-2 AS-PS-ODN or IL-6R AS-PS-ODN

2.3 AS-PS-ODN 对肿瘤细胞中相关基因表达的影响

RT-PCR 结果(表4)显示:bcl-2、IL-6 和 IL-6R 基因在 NCI-H446 细胞中均有表达,分别为: 0.91 ± 0.04 、 0.45 ± 0.11 和 1.21 ± 0.15 ,表达量以 IL-6R 最高,IL-6 最低。bcl-2、IL-6 和 IL-6R 反义组均能下调相应基因的表达,其中以 IL-6 下调幅度最大,达 (84.1 ± 5.01)%,与相应的无义或正义对照组、空白对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$,图3、4、5)。另外,bcl-2 AS-PS-ODN 作用后,IL-6 表达上调 (74.34 ± 4.13)%,与空白对照组比较均 $P < 0.01$;

IL-6R 表达上调 (3.05 ± 0.28)%,与空白对照组比较无显著性差别;IL-6 AS-PS-ODN 作用后,bcl-2 表达下调 (32.17 ± 0.20)%,IL-6R 表达上调 (65.76 ± 3.15)%,与空白对照组比较均 $P < 0.01$;IL-6R AS-PS-ODN 作用后,bcl-2 及 IL-6 的表达与空白对照组比较均无显著性差别。可见,bcl-2 AS-PS-ODN 作用后,伴有 IL-6 表达的显著上调;IL-6 AS-PS-ODN 作用后则伴有 bcl-2 表达的显著下调;而 IL-6R AS-PS-ODN 作用对 bcl-2 和 IL-6 的表达无明显影响。

表4 AS-PS-ODN 作用后相关基因 mRNA 表达水平的改变

Tab.4 Changes of mRNA expressions of related genes in NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN

Group	mRNA expression (%)		
	bcl-2	IL-6	IL-6R
Control	0.91 ± 0.04	0.45 ± 0.11	1.21 ± 0.15
bcl-2 NS-PS-ODN	0.88 ± 0.03	0.46 ± 0.10	1.24 ± 0.17
bcl-2 AS-PS-ODN	$0.34 \pm 0.01^{**}$	$0.79 \pm 0.11^{**}$	1.25 ± 0.11
IL-6 S-PS-ODN	0.89 ± 0.02	0.43 ± 0.03	1.21 ± 0.10
IL-6 AS-PS-ODN	$0.62 \pm 0.02^{**\Delta}$	$0.07 \pm 0.02^{**\Delta\Delta}$	$2.01 \pm 0.20^{**\Delta}$
IL-6R S-PS-ODN	0.88 ± 0.05	0.47 ± 0.11	0.48 ± 0.09
IL-6R AS-PS-ODN	0.86 ± 0.06	0.50 ± 0.07	$0.48 \pm 0.04^{**}$

** $P < 0.01$ vs Control, NS-PS-ODN or S-PS-ODN; $\Delta P < 0.05$ vs

bcl-2 AS-PS-ODN or IL-6R AS-PS-ODN

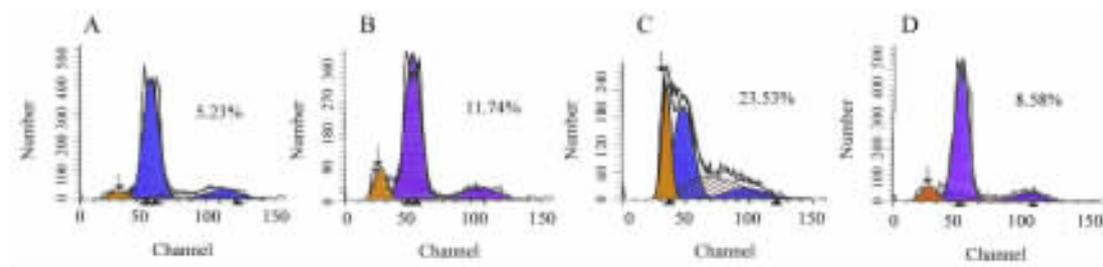


图2 DNA 倍体分析检测 AS-PS-ODN 作用后 NCI-H446 细胞凋亡的改变

Fig. 2 Changes of apoptotic NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN measured by hypodiploid DNA analysis

A: Control; B: bcl-2 AS-PS-ODN; C: IL-6 AS-PS-ODN; D: IL-6R AS-PS-ODN

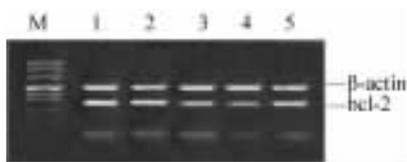


图3 AS-PS-ODN 作用后肺癌 NCI-H446 细胞 bcl-2 基因 mRNA 表达的变化

Fig. 3 Changes of bcl-2 mRNA expressions in NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN

M: PUC mix marker; Lane 1: Control; Lane 2: bcl-2 NS-PS-ODN; Lane 3: bcl-2 AS-PS-ODN; Lane 4: IL-6 AS-PS-ODN; Lane 5: IL-6R AS-PS-ODN

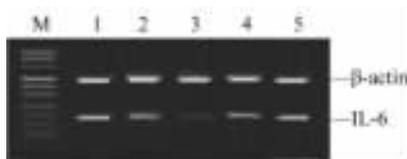


图4 AS-PS-ODN 作用后肺癌 NCI-H446 细胞 IL-6 基因 mRNA 表达的变化

Fig. 4 Changes of IL-6 mRNA expressions in NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN

M: PUC Mix marker; Lane1: Control; Lane 2: IL-6 NS-PS-ODN; Lane 3: IL-6 AS-PS-ODN; Lane 4: bcl-2 AS-PS-ODN; Lane 5: IL-6R AS-PS-ODN

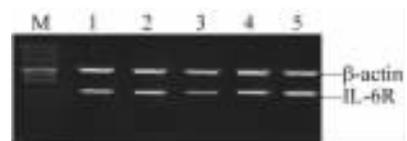


图5 AS-PS-ODN 作用后肺癌 NCI-H446 细胞 IL-6R 基因 mRNA 表达的变化

Fig. 5 Changes of IL-6R mRNA expressions in NCI-H446 cells treated with AS-PS-ODN

M: PUC mix marker; Lane 1: Control; Lane 2: IL-6R NS-PS-ODN; Lane 3: IL-6R AS-PS-ODN; Lane 4: bcl-2 AS-PS-ODN; Lane 5: IL-6 AS-PS-ODN

3 讨论

Bcl-2 基因是调控细胞凋亡的重要基因,同时也是一种耐药基因。Bcl-2 蛋白的表达增加通过抑制细胞凋亡而延长细胞存活,但不促进细胞的生长。针对 Bcl-2 基因的反义治疗已有多项研究进入临床试验阶段^[9]。IL-6 是一种多功能细胞因子,它参与细胞增殖和凋亡的调控^[10],其异常分泌与多发性骨髓瘤的关系已得到确证^[11]。另外有研究表明,IL-6 与许多肿瘤,如胃癌、食管癌、垂体腺瘤、宫颈癌、肺癌、肾癌、乳腺癌、胆管癌等的发生发展均有密切关系^[12-19]。IL-6 受体(IL-6R)是 IL-6 发挥作用的下游信号环节之一。反义治疗是从基因水平对疾病进行调控,而肿瘤是一种多基因病变,因此在众多的异常基因中,如何选择靶基因进行基因治疗是值得深入研究的课题。

本研究将反义 bcl-2、IL-6、IL-6R 作用于同一种细胞株,观察它们对细胞增殖、细胞凋亡及基因表达的影响,并初步探讨反义治疗中靶基因的选择策略。本实验结果表明,反义 bcl-2、IL-6、IL-6R 均能抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,但反义 IL-6 的作用明显强于反义 bcl-2 和反义 IL-6R。考虑其可能的原因:第一、IL-6 表达水平低于 bcl-2 及 IL-6R。从理论上讲,IL-6R 作为 IL-6 信号转导的下游环节,阻断它的作用将会阻断所有来源的 IL-6 的生物学作用,包括外源性的以及自分泌和旁分泌的 IL-6 的生物学作用。Keller 等^[20]通过比较针对 IL-6 和 IL-6R 的两种反义寡核苷酸药物对体外骨髓瘤细胞增殖的不同影响,发现 IL-6R AS-PS-ODN 对细胞的抑制作用更强,且这种抑制作用不易被外源性的 IL-6 细胞因子抵消,因为 IL-6R AS-PS-ODN 不仅能阻断 IL-6 发挥作用,而且也抑制了 IL-6R 的上调。而本文研究中观察到的 IL-6R AS-PS-ODN 的作用甚微,远不及 IL-6 AS-PS-ODN。这种现象的原因可能是由于反义药物

的作用效果主要取决于其胞内浓度,较低水平的表达更易为反义药物所抑制。反义药物必须经过细胞摄取,与靶基因杂交等过程后方能发挥作用,药物到达靶位点的量会受到位阻和酶解等因素的限制。所以不难理解靶基因表达水平高的反义药物的作用效果反而不如靶基因表达水平低者。本研究用半定量 RT-PCR 检测到 IL-6R 和 bcl-2 两种基因在 NCI-H446 细胞株中的基础表达水平是 IL-6 的 2~3 倍,由于 IL-6R 在细胞株 NCI-H446 上的表达水平很高,可能远远超过了细胞因子 IL-6 所需要的结合量,尽管一定浓度的 IL-6R AS-PS-ODN 能从一定程度上减少细胞膜上 IL-6R 的表达,但这并不影响细胞因子 IL-6 发挥作用所需要的 IL-6R 的量;所以尽管 IL-6R AS-PS-ODN 能从一定程度上阻断 IL-6R 的表达,但并没有从根本上阻断 IL-6 的信号转导通路。第二,IL-6 处于调控链上游。在小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 中,IL-6 AS-PS-ODN 作用后,bcl-2 表达下调;而 bcl-2 AS-PS-ODN 作用后,IL-6 则明显上调。这说明在 NCI-H446 细胞株中,IL-6 与 bcl-2 有可能处于同一调控链上,且 IL-6 属于上游调控基因,能够调控 bcl-2 表达,同时 bcl-2 亦能通过负反馈方式调控 IL-6 的表达。bcl-2 AS-PS-ODN 作用后,IL-6 表达上调必将拮抗反义 bcl-2 的作用。因此可将 IL-6 这种表达量较低、且处于凋亡调控上游的基因称之为“关键”基因,选择此类基因作为反义治疗的靶基因,可能取得事半功倍之效。

本研究结果对肿瘤反义基因治疗靶基因的选择具有一定的指导作用,对提高反义基因治疗的效果有一定的意义。

[参 考 文 献]

- [1] D'cunja J, Shalaby T, Rivera P, *et al.* Antisense treatment of IGF-IR induces apoptosis and enhances chemosensitivity in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumours cells[J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(10): 1581-1589.
- [2] Dai LC, Wang X, Yao X, *et al.* Antisense oligonucleotides targeting midkine induced apoptosis and increased chemosensitivity in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(12): 1630-1636.
- [3] Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, *et al.* Induction of apoptosis and enhancement of chemosensitivity in human prostate cancer LN-CaP cells using bispecific antisense oligonucleotide targeting Bcl-2 and Bcl-xL genes[J]. *BJU Int*, 2006, 97(6): 1300-1308.
- [4] Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6398-6406.
- [5] Rudin CM, Salgia R, Wang X, *et al.* Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(6): 870-876.
- [6] 陈鑫基,胡建达,陈志哲,等. IL-6 表达增高及 TNF- α 下调参与 bcl-2 反义寡脱氧核苷酸诱导的细胞凋亡的调控[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(6): 495-498.
- [7] Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(4): 221-233.
- [8] 黄芳,王香玲,耿燕,等. 非小细胞肺癌患者血清、支气管肺泡灌洗液中 IL-6 水平的测定及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(4): 507-509.
- [9] Kim R, Emi M, Matsuura K, *et al.* Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(1): 1-11.
- [10] Calò V, Migliavacca M, Bazan V, *et al.* STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 197(2): 157-168.
- [11] Gerlo S, Haegeman G, Vanden BW, *et al.* Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(8): 1489-1496.
- [12] Mouawad R, Rixe O, Meric JB, *et al.* Interleukin-6 concentrations as predictive factor of time to progression in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy: a retrospective study[J]. *Cytokines Cell Mol Ther*, 2002, 7(4): 151-156.
- [13] Leu CM, Wong FH, Chang C, *et al.* Interleukin-6 acts as an anti-apoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Oncogene*, 2003, 22(49): 7809-7818.
- [14] Borg SA, Kerry KE, Baxter L, *et al.* Expression of interleukin-6 and its effects on growth of HP75 human pituitary tumor cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(10): 4938-4944.
- [15] Srivani R, Nagarajan B. A prognostic insight on *in vivo* expression of interleukin-6 in uterine cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13(3): 331-339.
- [16] Kasuga I, Makino S, Kiyokawa H, *et al.* Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma [J]. *Cancer*, 2001, 92(9): 2399-2405.
- [17] 高江平,杨素霞,陈萍,等. bcl-2 反义寡核苷酸对肾癌细胞 Bcl-2 蛋白表达抑制及诱导凋亡作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(1): 14-17.
- [18] Knüpfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 102(2): 129-135.
- [19] Somoto H. Epigenetic alterations in cholangiocarcinoma-sustained IL-6/STAT3 signaling in cholangio-carcinoma due to SOCS3 epigenetic silencing[J]. *Digestion*, 2009, 79(Suppl 1): 2-8.
- [20] Keller ET, Ershler WB. Effect of IL-6 Receptor antisense oligodeoxynucleotide on *in vitro* proliferation of myeloma cells[J]. *Immunology*, 1995, 154(8): 4091-4098.

[收稿日期] 2009 - 02 - 11

[修回日期] 2009 - 04 - 28

[本文编辑] 韩丹