



survivin反义寡核苷酸对肝癌耐药细胞的作用及与化疗的关系

肝癌患者对化疗药物产生耐药性是化疗效果降低、预后不良的重要原因。近年来的研究发现,肿瘤细胞凋亡的抑制不仅在恶性肿瘤的形成中有重要作用,而且使肿瘤细胞对多种化疗药产生耐药性[1]。survivin是近年新发现的一种细胞凋亡抑制基因,在人多数恶性肿瘤组织中表达,在正常成人分化成熟的组织中几乎不表达,这种选择性表达的特性使其成为目前肿瘤治疗研究的新靶点。作者将survivin反义寡核苷酸(ASODN)作用于人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM,并与阿霉素(ADM)联合化疗,观察其对耐药细胞增殖、凋亡和化疗药物敏感性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM由南方医科大学分校药理教研室饶进军教授提供;阳离子脂质体(LipofectamineTM2000)购自Invitrogen公司;兔抗人survivin多克隆抗体购自北京中山公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于Sigma公司;Trizol购于Gibcol公司。survivin正义寡核苷酸(SODN)链和survivin-A-SODN链,根据survivin的基因序列(Genbank Accession NumberU75285),应用primer5.0软件设计互补于survivin mRNA的232-251序列的20个碱基组成,ASODN链序列:5'-CCCAGCCTTCCAGCTC-CTTG-3',SODN序列:5'-CGCAGTAGCTGCGCT-GATTG-3',两条序列每端5个磷酸基采用硫代修饰,ASODN 5'端以绿色荧光蛋白标记,由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 水浴复苏人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM后接种于30ml培养瓶,在37℃、50ml/L CO₂培养箱中用含100 ml/L小牛血清的RPMI 1640培养液常规培养,胰蛋白酶消化细胞并计数,制成细胞悬液,分别用于接种30ml培养瓶、96孔培养板。

1.2.2 分组 脂质体转染组:以Lip-RPMI 1640转染混合物作为空白对照;ADM组:以RPMI 1640加ADM作为对照,ADM最终浓度为0.05 μg/ml;正义寡核苷酸转染组:400 ng/ml SODN/Lip-RPMI 1640转染混合物;正义寡核苷酸转染+ADM组:400 ng/ml SODN/Lip-RPMI 1640转染混合物加0.05 μg/ml ADM;400 ng/ml ASODN转染组:400 ng/ml ASODN/Lip-RPMI 1640转染混合物;400 ng/ml ASODN组+ADM:0.05 μg/ml ADM加400 ng/ml ASODN/Lip-RPMI 1640转染混合物。

1.2.3 转染 survivin反义寡核苷酸及对照序列的浓度设定为800 ng/ml,终浓度分别为400 ng/ml。按实验分组转染SMMC-7721/ADM培养的细胞。联合ADM化疗组各组分别加入ADM,使培养液中ADM最终浓度为0.05 μg/ml。37℃、5% CO₂常规培养24 h,弃去转染混合物,消化收集细胞进行各项检测。96孔板中的细胞用于检测细胞生长抑制率,培养瓶中细胞用于检测survivin mRNA和蛋白表达。

1.2.4 Western blot印迹法检测细胞survivin蛋白表达 按试剂盒操作步骤进行,蛋白电泳图像以Bio Rad图像分析系统分析,用蛋白条带的平均光强度值表示survivin蛋白表达的相对强度。

1.2.5 RT-PCR法检测细胞survivin mRNA表达 按试剂盒操作步骤进行。提取的总RNA，由紫外分光光度计检验纯度并定量。设GAPDH为内参照，对样品模板用量标准化，survivin和GAPDH分管扩增，引物由上海生工公司合成。设计survivin上游引物序列为5' CACCGCATCTCTACATTCAA3'，下游引物引物序列为5' CACTTTCTTCGCAGTTTCCT3'，扩增片段长度为191 bp；内对照基因GADPH上游引物序列为5' CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA3'，下游引物序列为5' ATGACTTGAGGCTGTTGTCATA3'，扩增片段长度为372 bp。采用一步法RT-PCR检测survivin mRNA的表达，50 °C、30 min完成反转录，94 °C预变性2 min后进入PCR循环，94 °C变性30 s，60 °C复性30 s，72 °C延伸1.5 min，共30个循环。PCR产物8 μl在琼脂糖凝胶上电泳，经凝胶图像分析仪分析结果，以survivin和GAPDH的比值作为survivin mRNA的相对含量。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞的凋亡率 按实验设计分别处理耐药肝癌SMMC-7721/ADM细胞，继续培养48h，收集细胞，制备含 5×10^5 个细胞的单细胞悬液。加入70%乙醇/PBS，0°C固定，加入RNA酶I 37°C孵育1 h和碘化丙啶(PI)4°C染色。流式细胞仪检测细胞凋亡率，重复3次，每次3个平行样本。按公式计算细胞凋亡率：细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

结果以均数 \pm 标准差表示。采用SPSS 11.0统计软件进行单向方差分析，组间多重比较方差齐时采用LSD法，方差不齐时采用Dunnett'S法。

2 结果

2.1 MTT法检测人耐药肝癌SMMC-7721/ADM细胞生长抑制率

空脂质体组、ADM组、正义寡核苷酸组、正义寡核苷酸+ADM组之间比较无统计学差异($P > 0.05$)；反义寡核苷酸组和反义寡核苷酸+ADM组与上述4组比较，细胞生长受到明显抑制($P < 0.001$)；单独应用survivin反义寡核苷酸治疗组与应用ADM联合survivin反义寡核苷酸组比较，ADM联合survivin反义寡核苷酸组细胞生长受到更明显的抑制($P < 0.001$)。

2.2 人耐药肝癌SMMC-7721/ADM细胞survivin mRNA表达情况

凝胶成像仪对RT-PCR扩增产物进行分析，所有实验组在191 bp处均出现特异性survivin条带(图1)。脂质体转染对照组、ADM组、正义寡核苷酸转染对照组、正义寡核苷酸转染对照+ADM组之间比较survivin mRNA表达无统计学差异($P > 0.05$)。400 ng/ml survivin ASODN组和400 ng/ml ASODN+ADM组survivin mRNA较其他4组差异有统计学意义($P < 0.001$)，但两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表1。

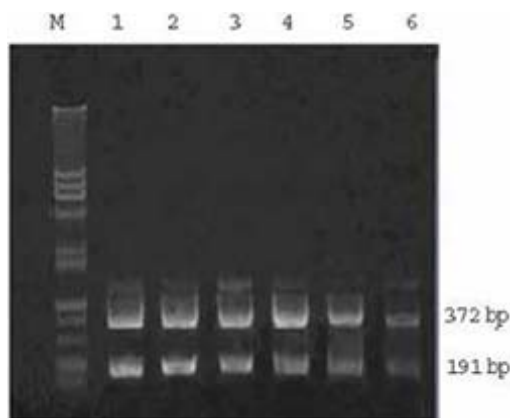


图1 RT-PCR检测各组细胞survivin mRNA表达

Fig.1 Expression of survivin mRNA detected by RT-PCR

M: 100 bp DNA marker; Lane 1: Liposome group; Lane 2: ADM group; Lane 3: SODN group; Lane 4: SODN+ADM group; Lane 5: 400 ng/ml ASODN group; Lane 6: 400 ng/ml ASODN+ADM group

表 1 各组细胞 survivin mRNA 和蛋白表达强度

Group	survivin mRNA	survivin protein expression
Liposome	0.84±0.07*	73.54±7.93*
ADM	0.85±0.07*	74.53±7.14*
SODN	0.84±0.07*	74.20±6.57*
SODN+ADM	0.84±0.07*	73.39±6.74*
400 ng/ml ASODN	0.37±0.10	36.87±6.60
400 ng/ml ASODN+ADM	0.37±0.09	36.52±6.50

*P<0.001 vs 400 ng/ml ASODN or 400 ng/ml ASODN+ADM group

2.3 各实验组耐药肝癌SMMC-7721/ADM细胞survivin蛋白表达情况

Western blot印迹法检测survivin蛋白在人耐药肝癌细胞SMMC-7721/ADM中有高度表达(图2)。蛋白电泳图像以Bio Rad图像分析系统分析蛋白表达的相对强度。结果表明,脂质体转染对照组、ADM组、正义寡核苷酸转染对照组、正义寡核苷酸转染对照+ADM组之间比较,survivin蛋白差异无统计学意义(P>0.05);400 ng/ml ASODN组和400 ng/ml ASODN+ADM组survivin蛋白较其他4组差异有统计学意义(P<0.001),但两组之间差异无统计学意义(P>0.05),见表1。

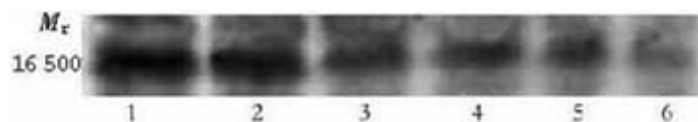


图2 Western blot检测各组survivin蛋白表达

Fig.2 Expression of survivin protein detected by Western blotting
Lane 1: Control group; Lane 2: Liposome group; Lane 3: SODN group; Lane 4: 200 ng/ml ASODN group; Lane 5: 400 ng/ml ASODN group; Lane 6: 600 ng/ml ASODN group

2.4 ASODN对细胞凋亡率的影响

脂质体转染对照组、ADM组、正义寡核苷酸转染对照组、正义寡核苷酸转染对照+ADM组之间比较凋亡率差异无统计学意义(P>0.05);400 ng/ml survivin ASODN组和400 ng/ml ASODN+ADM组survivin mRNA较其他4组差异有统计学意义(P<0.001),但两组之间差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

肝细胞癌在我国消化系统恶性肿瘤的发病中居第3位,其临床进展快,转移早,预后差,生存期短[3]。无论手术、放化疗的疗效均不理想,其中肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因。近年研究发现,导致肿瘤细胞发生多药耐药的机制,除了MPR、TopoII和GST/GSH等耐药蛋白和酶的改变之外,细胞凋亡调控机制的紊乱也可使肿瘤细胞对多种化疗药物产生交叉耐药[4][5]。肿瘤细胞凋亡机制的缺陷是耐药性产生的关键因素之一,对细胞凋亡机制的修复可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性、克服耐药性的产生。

survivin是近年来发现的IAP基因家族的新成员。正常情况下,它仅表达于胚胎和发育中的胎儿组织,在终末分化的成人组织中表达缺失,但在肿瘤组织中可检测到不同程度和频度的阳性表达,即survivin表达具有肿瘤选择性的特点[6]。Ikeguchi等[7]对survivin在肝癌中的表达及相关性进行了分析,发现survivin基因的表达与癌的细胞增殖、凋亡及预后明显相关,其阳性患者5年生存率明显低于阴性患者。所以,survivin基因的表达与肝癌的发生演变有着密切关系,故以survivin作为靶基因治疗具有重大意义。

ASODN是体外合成的小分子DNA。应用反义核酸技术治疗肿瘤是根据碱基互补原理,用人工合成的特定DNA

或RNA片段ASODN分子与靶RNA相结合,形成DNA-RNA复合物,从而抑制或封闭基因的表达,干扰致病蛋白质的产生,并增强耐药恶性肿瘤细胞对化疗的敏感性。反义核苷酸没有毒性且具有较强的特异性,已成为杀伤耐药肿瘤细胞并逆转耐药的一种新策略[8]。研究证明ADM最终浓度0.05 μg/ml为其最佳抗肝癌浓度[2],预实验证实,survivin-ASODN浓度为400 ng/ml为其作用最佳浓度,增加浓度不会增加其作用效果。本实验中,通过survivin-ASODN与ADM联合作用于人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM,发现survivin-ASODN能确实有效地封闭survivin蛋白及mRNA的表达。加入ADM和转染复合物后,与空白对照组、空脂质体组及正义寡核苷酸组比较,经survivin-ASODN作用后的细胞生长受到明显抑制(P<0.05)。与单独应用survivin-ASODN治疗组比较,联合应用ADM和survivin-ASODN作用的细胞生长受到更明显抑制(P<0.05)。因此,认为survivin-ASODN能降低肝癌耐药细胞的survivin表达,增强人肝癌耐药细胞对ADM的化疗敏感性。

本研究通过ASODN下调survivin基因的表达,联合ADM作用人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM,证实survivin-ASODN能加强ADM诱导SMMC-7721/ADM细胞凋亡,其意义在于一方面能够减少ADM的药物临床用量,减轻ADM的毒副作用;另一方面加强了ADM的治疗作用,使其应用更加安全有效,有利于进一步扩大应用范围。将survivin-ASODN与传统的化疗药物联合应用,有望得到更好的临床治疗效果。

参考文献:

- [1]Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(5203): 1456-62.
- [2]韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 211-46.
- [3]周信达. 肝癌诊治的若干进展及展望[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(1): 5-7.
- [4]Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, et al. Survivin as a predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer patients[J]. Cancer Sci, 2004, 95(1): 44-51.
- [5]Griffith TS, Kemp TJ. The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/apo2L-induced apoptosis[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2003, 52(3): 175-84.
- [6]Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3: 917-21.
- [7]Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Diagn Mol Pathol, 2002, 11(1): 33-40.
- [8]Green DW, Roh H, Pippin J, et al. Antisense oligonucleotides: an evolving technology for the modulation of gene expression in human disease[J]. J Am Coll Surg, 2000, 191(1): 93-105.