

survivin反义寡核苷酸对肝癌耐药细胞的作用及与化疗的关系

高鹏^{1,2},方驰华¹,张刚庆²,颜政¹(¹南方医科大学珠江医院肝胆外科,广东广州510282;²广东省第二人民医院普外科,广东广州510317)

摘要:目的 研究 survivin反义寡核苷酸对人肝癌耐药细胞株的增殖和凋亡情况,以及对阿霉素化疗敏感性的影响。方法 将人肝癌耐药细胞系 SMMC-7721/ADM 分为脂质体转染组、阿霉素组、正义寡核苷酸转染组、正义寡核苷酸转染+阿霉素组、反义寡核苷酸转染组、反义寡核苷酸转染+阿霉素组共6组。MTT法检测细胞相对存活率,流式细胞仪分析细胞凋亡率变化,RT-PCR和Western blot印迹法检测细胞 survivin mRNA和蛋白表达。结果 survivin-ASODN作用后的人肝癌耐药细胞 SMMC-7721/ADM 的细胞凋亡率明显增高($P<0.05$)。survivin mRNA和 survivin蛋白表达:脂质体转染对照组、阿霉素组、正义寡核苷酸转染对照组、正义寡核苷酸转染对照+阿霉素组之间 survivin蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。400 ng/ml survivin-ASODN组和400 ng/ml ASODN+阿霉素组 survivin mRNA较其他4组显著降低($P<0.05$),但其两组之间表达无明显差异($P>0.05$)。结论 survivin反义寡核苷酸能降低肝癌耐药细胞 survivin表达,增强人肝癌耐药细胞对阿霉素的化疗敏感性。

关键词: 肝肿瘤; survivin基因; 反义寡核苷酸; 阿霉素; 凋亡

中图分类号: R735.7 文献标识码: 文章编号: 1673-4254(2006)11-1644-04

Antisense oligonucleotide against survivin induces apoptosis and enhances adriamycin sensitivity of SMMC-7721/ADM cells

GAO Peng^{1,2}, FANG Chi-hua¹, ZHANG Gang-qing², YAN Zheng¹

¹Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Department of General Surgery, Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, China

Abstract: Objective To explore the effects of survivin-specific antisense oligonucleotide (ASODN) delivered via liposome on the growth and apoptosis of drug-resistant human hepatic cancer cell line SMMC-7721/ADM and the sensitivity of the cells to adriamycin (ADM). **Methods** SMMC-7721/ADM cells were divided into 6 groups and treated with liposome, ADM, sense oligonucleotide (SODN), SODN+ADM, 400 ng/ml ASODN, and 400 ng/ml ASODN+ADM group, respectively. MTT assay was used to calculate the relative survival rates of the cells, and the changes in cell apoptosis and cycle were detected with flow cytometry. RT-PCR and Western blotting were performed to detect the expressions of survivin mRNA and protein, respectively. **Results** The apoptotic rate of ASODN-treated cells was much higher than that of the control cells. survivin protein expression showed no significant variation between cells treated with liposome, ADM, SODN, and SODN+ADM ($P>0.05$), whereas compared with these 4 groups, cells treated with 400 ng/ml ASODN and 400 ng/ml ASODN+ADM had significantly lowered survivin mRNA expression ($P<0.05$), without significant differences between the latter two groups ($P>0.05$). SMMC-7721/ADM cells cultured in the presence of ASODN and adriamycin showed significant growth inhibition in comparison with ASODN group and ADM group. **Conclusion** survivin-specific ASODN can enhance the sensitivity of SMMC-7721/ADM cells to ADM by depressing survivin expression in the cells, thus improves the effect of ADM chemotherapy for liver cancer.

Key words: liver neoplasms; survivin; antisense oligonucleotides; apoptosis; adriamycin

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,在大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

收稿日期:2006-03-20

作者简介:高鹏,男,博士研究生,现工作单位为广东省第二人民医院普外科

通讯作者:方驰华,电话:020-61643211,E-mail: fch58520@sina.com

体 (Lipofectamine™2000) 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 Gibco 公司。 *survivin* 正义寡核苷酸 (SODN) 链和 *survivin*-ASODN 链, 根据 *survivin* 的基因序列 (Genbank Accession Number U75285), 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'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3', SODN 序列: 5'-CGCAGTAGCTGCGCTGATTG-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 30 ml 培养瓶, 在 37℃、50 ml/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 30 ml 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 BioRad 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

5CACCGCATCTCTACATTCAA3', 下游引物引物序列为 5CACTTTCTTCGCAGTTTCCT3', 扩增片段长度为 191 bp; 内对照基因 GAPDH 上游引物序列为 5CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA3', 下游引物序列为 5ATGACTTGAGGCTGTTGTCTATA3', 扩增片段长度为 372 bp。采用一步法 RT-PCR 检测 *survivin* mRNA 的表达, 50℃、30 min 完成反转录, 94℃ 预变性 2 min 后进入 PCR 循环, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 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 48 h, 收集细胞, 制备含 5×10⁵ 个细胞的单细胞悬液。加入 70% 乙醇/PBS, 0℃ 固定, 加入 RNA 酶 I 37℃ 孵育 1 h 和碘化丙啶 (PI) 4℃ 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 × 100%。

1.3 统计学处理

结果以均数 ± 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。

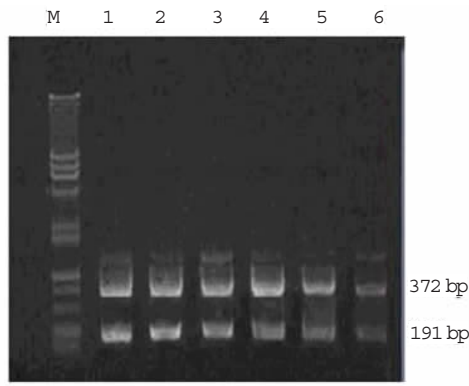


图 1 RT-PCR 检测各组细胞 survivin mRNA 表达

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

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。

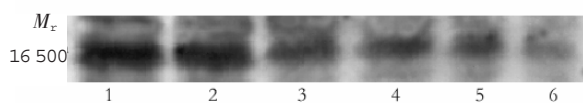


图 2 Western blot 检测各组 survivin 蛋白表达

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

表 1 各组细胞 survivin mRNA 和蛋白表达强度

Tab.1 survivin mRNA and protein expression in SMMC-7721/ADM cells with different treatments (n=9)

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

2.4 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 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 dis-

ease[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 and 5-fluorouracil 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 mRNA 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.

(上接 1643 页)

腺病毒因其具有安全性较好,感染能力强,可感染各细胞周期的细胞,蛋白表达量高,不整合到宿主的染色体中,没有插入性突变而成为基因转染和治疗常用的载体^[10-12]。目前,制备重组腺病毒主要方法是,同源重组产生能在包装细胞系(293 或 911 等)复制的缺陷型腺病毒,由包装细胞系提供其缺失的基因。然后通过包装细胞形成的噬斑筛选获得需要的重组病毒。虽然这种方法已被证明非常有效,但是存在着同源重组效率低下,需要多轮次的反复噬斑纯化和花费时间较长等缺点。为此,Bert Vogelstein 等开发了新的腺病毒重组系统—AdeasyTM 系统,它有如下特点:(1)骨架载体包含腺病毒以超螺旋形式存在的大部分基因组,无需酶切;(2)重组在大肠杆菌,而不是在哺乳细胞内进行;(3)利用细菌内的高效同源重组,不需连接步骤;(4)载体可以插入 10 kb 以上的基因序列和在同一病毒内允许表达多个目的基因;(5)将 GFP 基因并入腺病毒骨架质粒,可以直接地观察转染和感染的效率。这些特点使同源重组效率大为提高,简化了噬斑纯化,只需较短的时间就可以生产出有用的重组腺病毒^[12]。据此,我们利用 AdeasyTM 系统成功地构建了表达 Her2-ECDs, ECD 和 TM 基因蛋白的重组腺病毒,为进一步的免疫研究打下基础。

参考文献:

[1] Amici A, Smorlesi A, Noce G, et al. DNA vaccination with full-length or truncated neu induces protective immunity against the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice [J]. Gene Ther, 2000, 7 (8): 703-6.

- [2] Chen Y, Hu D, Eling DJ, et al. DNA vaccines encoding full-length or truncated Neu induce protective immunity against Neu-expressing mammary tumors [J]. Cancer Res, 1998, 58 (9): 1965-71.
- [3] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版, 北京: 科学出版社, 2002: 26-34.
- [4] DL 斯佩克特, RD 戈德曼, LA 莱因万德著. 黄培堂, 译. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 827-9.
- [5] Cheever MA, D'Isis ML, Bernhard H, et al. Immunity to oncogenic proteins [J]. Immunol Rev, 1995, 145: 33-59.
- [6] Kokai Y, Cohen JA, Drebin JA, et al. Stage- and tissue-specific expression of the neu oncogene in rat development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84 (23): 8498-501.
- [7] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer [J]. Science, 1989, 244 (4905): 707-12.
- [8] Wei W Z, Shi W P, Galy A, et al. Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA [J]. Int J Cancer, 1999, 81 (5): 748-54.
- [9] Bernards R, Destree A, McKenzie S, et al. Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a vaccinia virus vector [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84 (19): 6854-8.
- [10] Shen LZ, Wu W X, Xu DH, et al. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8: 270-5.
- [11] Wu HG, Zhou LB, Shi DR, et al. Morphological study on colonic ulcerative colitis treated by moxibustion [J]. World J Gastroenterol, 2000, 6: 861-5.
- [12] He TC, Zhou SB, Da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2509-14.

(责任编辑:陈望忠)