

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)01-0071-04

Survivin 反义寡核苷酸诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡及对白藜芦醇的增敏作用

张向阳¹, 卢启明² (¹ 兰州大学临床医学院, 兰州 甘肃 730000; ² 甘肃省人民医院消化科, 兰州 甘肃 730000)

Effects of survivin antisense oligonucleotide on gastric carcinoma cell apoptosis and cell sensitivity to resveratrol

ZHANG Xiang-Yang¹ LU Qi-Ming²

¹Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China, ²Department of Gastroenterology, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 AIM: To explore the effects of antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) of survivin gene on apoptosis and sensitivity to resveratrol in gastric carcinoma cells. **METHODS:** Antisurvivin phosphorothioated ASODN was synthesized and transfected into gastric carcinoma cells by lipofectin. MTT assay was used to detect cytotoxicity. Apoptosis was observed by fluorescence microscopy and flow cytometry. Survivin expression was determined by RT-PCR and immunohistochemistry. **RESULTS:** ① survivin ASODN inhibited the cell proliferation in a dose- and time-dependent manner. ② A higher apoptosis rate [(33.6 ± 1.2)%] could be induced in gastric carcinoma cells by survivin ASODN as compared with that induced by the sense oligodeoxynucleotide [(10.7 ± 0.8)%], $P < 0.05$. ③ The expression of survivin mRNA and protein significantly decreased in SGC7901 cells after treated with survivin ASODN. ④ There was a significant increase in the growth inhibition rate in SGC7901 cells after exposed to the combination of survivin ASODN and resveratrol as compared with resveratrol or survivin ASODN alone (both $P < 0.05$). **CONCLUSION:** Survivin ASODN can inhibit the proliferation of gastric carcinoma SGC7901 cells, induce their apoptosis, and enhance the cell sensitivity to resveratrol via specific down-regulation of survivin expression.

【Keywords】 antisense oligonucleotides; resveratrol; survivin gene; gastric neoplasms; apoptosis

【摘要】目的 观察 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)对胃癌 SGC7901 细胞的增殖、凋亡及对白藜芦醇敏感性的影响。方法 人工合成 survivin 硫代 ASODN 通过脂质体转染胃癌细胞株(SGC7901)后,用 MTT 法检测细胞毒作用,用荧光染色、流

式细胞术检测细胞凋亡,RT-PCR、免疫组化技术检测 survivin mRNA 及蛋白的表达。结果:① survivin ASODN 抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖呈时间和剂量依赖性;② survivin ASODN 处理组 SGC7901 细胞 24 h 后凋亡率为(33.6 ± 1.2)% 正义寡核苷酸(SODN)组为(10.7 ± 0.8)% 两组相比,差异有显著性($P < 0.05$);③ survivin ASODN 处理组 SGC7901 细胞 survivin 蛋白及 mRNA 的表达水平显著下降。④ survivin ASODN 和白藜芦醇联合处理组 SGC7901 细胞 24, 48, 72 h 生长抑制率,显著高于单用 survivin ASODN 组($P < 0.05$)和单用白藜芦醇组($P < 0.05$)。结论: survivin ASODN 能够抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖、诱导凋亡,并能增加胃癌细胞株 SGC7901 对白藜芦醇的敏感性,推测可能通过下调 survivin mRNA 及蛋白表达而起作用。

【关键词】 反义寡核苷酸;白藜芦醇;Survivin 基因;胃肿瘤;细胞凋亡

【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A

0 引言

Survivin 基因是继 bcl-2 之后发现的又一重要的凋亡抑制基因,可能是肿瘤治疗的一个分子靶点^[1]。一些体外研究表明抑制 survivin 的表达或功能可以促进凋亡,抑制肿瘤细胞生长^[2-3],说明 survivin 可作为抗肿瘤基因治疗的靶点,但在体内抑制 survivin 是否仍能抑制肿瘤生长,目前尚属未知。我们通过脂质体(Lip)介导 survivin 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASODN)转染胃癌 SGC7901 细胞,观察 survivin ASODN 对胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡和对化疗药物白藜芦醇(resveratrol)敏感性的影响如下。

1 材料和方法

1.1 材料 Lip 试剂为 Invitrogeco 公司产品,Trizol 试剂为 BBI 公司产品。RT-PCR 试剂盒购自上海生物工程公司,所用兔抗人 survivin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组织化学染色试剂盒(S-P 即用型)DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发公司。吖啶橙、白藜芦醇购自 Sigma 公司,胃癌细胞株 SGC7901 由兰州大学分子生物教研室提供,培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置 37℃ 50

收稿日期 2006-01-11; 接受日期 2006-03-28

作者简介 张向阳,硕士生(导师卢启明)。现在广东省惠州市惠阳区人民医院。Tel 13631917256 Email xyz_701@163.com

mL/L CO₂ 培养箱中培养. 选择对数生长期细胞进行实验. Survivin ASODN 序列为 5'-CCCAGCCTTC-CAGCTCCTTG-3', 正义寡脱氧核苷酸(SODN)序列为 5'-CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3'. 两种寡核苷酸均经全硫代修饰、纯化. Survivin 上游引物: 5'-GT-GAATTTTGAAGCTGGACAG-3', 下游引物: 5'-CCTTTCCTAAGACATTGCTAAG-3' 扩增产物 243 bp; 内参照 β -actin 上游引物: 5'-CTTCTACAATGAGCT-GCGTG-3', 下游引物: 5'-TCATGAGGTAGTCAGT-CAGG-3' 扩增产物 305 bp. ASODN, SODN 及引物均由上海生工合成. 细胞转染按照 LipofectamineTM 试剂说明书进行. 用无血清培养基分别溶解 ASODN 和 SODN 将 Lip 与核苷酸混合于聚苯乙烯试管中, 室温下静置 30 min 后, 分别设为 ASODN 作用组和 SODN 作用组.

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色法检测细胞毒作用 实验分为对照组、Lip 组、ASODN + Lip 组和 SODN + Lip 组. 寡核苷酸浓度为 100, 200, 300, 400 和 500 nmol/L. 各组均按每孔 5×10^3 细胞数接种 96 孔板, 每组设 4 个复孔. 分别于转染后 24, 48, 72 h 测定 570 nm 处吸光度 (A_{570}) 值. 细胞抑制率(%) = $(1 - A_{570} \text{处理组} / A_{570} \text{对照组}) \times 100\%$ 细胞凋亡率(%) = $A_{570} \text{处理组} / A_{570} \text{对照组} \times 100\%$. 选择 400 nmol/L 浓度进行后续实验.

1.2.2 细胞凋亡的检测 转染 24 h 后每孔取细胞培养液 30 μ L 滴于载玻片上, 另加入 10 μ L 吖啶橙, 盖上盖玻片, 置于荧光显微镜下观察细胞形态并拍照. 转染 24 h 后, 收集 2×10^6 个细胞, 700 mL/L 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定, PBS 洗涤 2 次, Rnase A 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h, 碘化丙啶避光孵育 10 min, 上机检测细胞周期及凋亡细胞所占的比率.

1.2.3 Survivin 表达的检测 ①survivin mRNA 的表达: 用 Trizol 提取细胞总 RNA, RT-PCR 为 MMLV 一步法. 反应总体积为 50 μ L, 其中细胞总 RNA 1 μ g, 37 $^{\circ}$ C 30 min 合成第一条 cDNA 链, 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 37 个循环. β -actin 退火温度为 59 $^{\circ}$ C. ②survivin 蛋白的表达: 取 1 cm² 玻片放入 6 孔板中, 然后加入稀释成 4×10^7 /L 细胞悬液 0.5 mL, 4 h 细胞贴壁后培养过夜, 移出玻片后, 950 mL/L 乙醇固定 30 min, 将盖玻片移置于载物片上, 并在盖玻片细胞面做标记. 采用常规 SP 法, 滴加 30 g/L 过氧化物酶阻断溶液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗, 滴加非免疫动物血清, 室温孵育 10 min, 倾去血清滴加 survivin 多克隆抗体(工作浓度为 1:100) 4 $^{\circ}$ C 过液, 室温复温 60 min, PBS 冲

洗, 加生物素化二抗, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗, 加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 自来水冲洗苏木素复染, 中性树胶封片. 用 PBS 替代一抗作为阴性对照, 用已知阳性胃癌切片作为阳性对照.

1.2.4 Survivin ASODN 对 SGC7901 细胞白藜芦醇敏感性的影响 取 200 nmol/L ASODN 转染后细胞实验, 分为对照组、白藜芦醇(100 μ mol/L)组、ASODN(200 nmol/L)组和白藜芦醇(100 μ mol/L) + ASODN(200 nmol/L)组(以上均为终浓度). 调整各组细胞数为 5×10^3 /孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 24 h, MTT 法检测细胞毒作用和细胞抑制率.

统计学处理: 利用统计软件 SPSS 10.0 分析, 多个样本均数比较采用方差分析, 两两比较用 SNK-*q* 检验, 组间方差不齐时采用秩和检验.

2 结果

2.1 Survivin ASODN 抑制 SGC7901 细胞的增殖 100 ~ 500 nmol/L survivin ASODN 对胃癌 SGC7901 细胞的增殖均有抑制作用, 呈时间和剂量依赖性, 以 500 nmol/L 抑制率最大, 500 nmol/L 作用 72 h 细胞抑制率为 79.9%. 400 nmol/L survivin ASODN 作用于胃癌 SGC7901 细胞 72h, 细胞抑制率为 78.4%, 与 SODN 组和 Lip 组相比均有明显差异 ($P < 0.05$, 表 1).

表 1 研究因素 SGC7901 细胞的抑制率作用

组别	细胞抑制率		
	24 h	48 h	72 h
(n=4, %, $\bar{x} \pm s$)			
ASODN(nmol/L) + Lip			
100	19.2 \pm 1.2	29.8 \pm 1.0	39.0 \pm 0.4
200	28.2 \pm 1.8 ^b	36.3 \pm 1.8 ^b	46.8 \pm 1.7 ^b
300	34.8 \pm 0.7	45.5 \pm 1.0	62.1 \pm 1.7
400	37.9 \pm 0.5	54.6 \pm 1.3	78.4 \pm 0.8
500	38.9 \pm 0.6	55.7 \pm 1.6	79.9 \pm 1.3
SODN(nmol/L) + Lip			
100	9.6 \pm 1.0 ^a	10.5 \pm 1.3 ^a	12.6 \pm 0.4 ^a
200	11.1 \pm 0.9 ^a	13.6 \pm 0.5 ^a	13.9 \pm 0.1 ^a
300	9.5 \pm 0.8 ^a	14.6 \pm 0.8 ^a	13.3 \pm 0.3 ^a
400	13.0 \pm 0.7 ^a	15.2 \pm 0.3 ^a	15.7 \pm 0.5 ^a
500	13.9 \pm 0.5 ^a	16.4 \pm 0.6 ^a	16.6 \pm 0.7 ^a
白藜芦醇	25.6 \pm 1.9 ^b	33.8 \pm 2.8 ^b	43.1 \pm 2.5 ^b
白藜芦醇 + ASODN	49.5 \pm 0.9	61.1 \pm 0.6	78.4 \pm 1.0
Lip	4.5 \pm 0.4 ^a	8.7 \pm 0.4 ^a	10.8 \pm 1.3 ^a
对照	0	0	0

^a $P < 0.05$ vs 同浓度 ASODN + Lip; ^b $P < 0.05$ vs 白藜芦醇 + ASODN.

2.2 Survivin ASODN 诱导 SGC7901 细胞的凋亡
在荧光显微镜下, 对照组细胞形态完整, 染色均匀一致。400 nmol/L ASODN 处理 24 h 后, SGC7901 细胞呈现典型的凋亡改变(图 1)。流式细胞术检测显示, 400 nmol/L ASODN 作用于 SGC7901 细胞 24 h 后, 凋亡率为 $(33.6 \pm 1.2)\%$, 明显高于 SODN 组的 $(10.7 \pm 0.8)\%$ 和对照组的 $(1.5 \pm 0.6)\%$, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

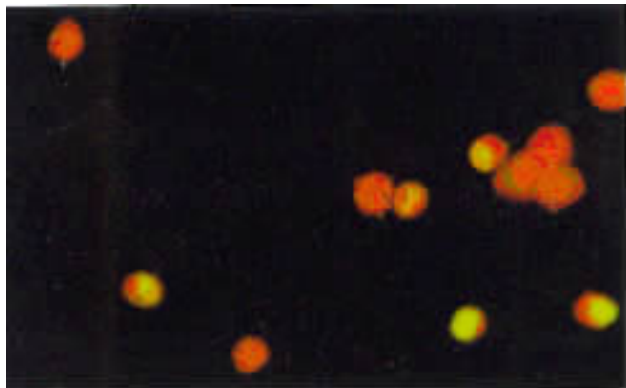


图 1 荧光显微镜下观察对照组 SGC7901 细胞凋亡 24 h $\times 200$

2.3 Survivin ASODN 下调 SGC7901 细胞 survivin mRNA 和蛋白的表达
胃癌 SGC7901 细胞株高表达 survivin mRNA。400 nmol/L ASODN 作用于胃癌 SGC7901 细胞 24 h 后, survivin mRNA 表达明显下调, 而对照组和 SODN 组 survivin mRNA 水平无明显变化。survivin 阳性染色主要在胃癌 SGC7901 细胞的胞中, 少数细胞核中也见 survivin 阳性染色(图 2)。对照组 survivin 蛋白呈高表达, 经 ASODN 作用后表达水平明显下降。

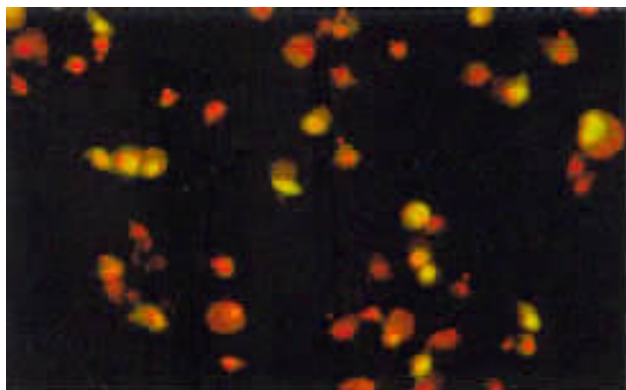


图 2 荧光显微镜下观察 Survivin ASODN 处理组 SGC7901 细胞凋亡 24 h $\times 200$

2.4 ASODN 增加胃癌 SGC7901 细胞对白藜芦醇

的敏感性。200 nmol/L ASODN 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇联合作用组 SGC7901 细胞 24 h 生长抑制率, 显著高于单用 survivin ASODN 组 ($P < 0.05$) 和单用白藜芦醇组 ($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

Survivin 是近来发现的一种结构特殊的 IAP 家族蛋白, 已被发现于肺癌、前列腺癌、胃肠道肿瘤、淋巴瘤等多种肿瘤组织中, 而在成人各正常器官中(除胸腺、胎盘外)检测不到^[4]。作为一种新的抗凋亡因子, survivin 在多种肿瘤组织中广泛表达, 与肿瘤的发生、发展和预后密切相关, 并可能是导致肿瘤细胞耐药性的因素^[5-7]。

我们观察到, survivin ASODN 对 SGC7901 细胞增殖的抑制作用呈现时间-剂量依赖性, 应用流式细胞术检测凋亡细胞, 结果表明 survivin ASODN 能够诱导 SGC7901 细胞凋亡, 400 nmol/L ASODN 作用于 SGC7901 细胞 24 h 后, 凋亡率为 33.6%。我们还通过免疫组化和 RT-PCR 等方法证实 SGC7901 细胞高表达 survivin 蛋白及 mRNA。本组结果表明 survivin ASODN 能够下调 SGC7901 细胞 survivin 蛋白及 mRNA 的表达。ASODN 的作用机制可能是 mRNA-DNA 复合物激活核糖核酸酶 H (RNaseH) 导致 mRNA 降解; mRNA-DNA 复合物抑制 mRNA 的转录, 进而抑制蛋白产物的产生; ASODN 与氨酰 tRNA 竞争 mRNA 的结合位点, 封闭核糖体的阅读作用等。

白藜芦醇对多种细胞有很强的抗增生作用, 是因为其能抑制核糖核苷酸还原酶的活性。Sun 等^[8]报道, 白藜芦醇能抑制 DNA 多聚酶, 也能抑制鸟氨酸脱羧酶 (OD, 为多种氨基酸合成酶, 能促进肿瘤生长)。另外, 白藜芦醇通过选择性下调细胞周期蛋白 cyclinD1 的表达使星状细胞静止在 G1 期。survivin 的表达具有细胞周期依赖性, 在细胞周期的 G2/M 期表达。在有丝分裂的早期与纺锤体的微管蛋白相连, 干扰 survivin 与微管蛋白的作用可使抗凋亡功能丧失^[9-10]。本研究结果表明 survivin ASODN 与白藜芦醇联合应用, 可显著抑制 SGC7901 细胞生长, 增加其敏感性。原理可能是 survivin ASODN 与白藜芦醇二者合作用于细胞周期的不同环节, 抑制肿瘤细胞增殖, 增加抗癌疗效。二者联合有利于减少单药用量, 减少不良反应, 克服肿瘤的耐药性。我们利用已构建的 survivin ASODN 载体, 通过转染转入 SGC7901 细胞中, 可特异封闭 survivin 基因的表达, 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 增加 SGC7901 细胞对白藜芦醇的敏感性, 其作用机制可能与其下调 survivin 蛋白及

mRNA 的表达有关. 通过对 survivin 基因的深入研究, 必将有利于肿瘤病机制的阐明, 并为肿瘤的诊疗提供一种理想的肿瘤标记物和靶器.

【参考文献】

[1] Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer[J]. Med Electron Microsc, 2001, 34(4): 207-212.

[2] Coma S, Noe V, Lavarino C, et al. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumor angiogenesis[J]. Oligonucleotides, 2004, 14(2): 100-113.

[3] Ning S, Fuessel S, Kotsch M, et al. siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth[J]. Int J Oncol, 2004, 25: 1065.

[4] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[5] Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(12): 542-547.

[6] Trieb K, Lehner R, Stulnig T, et al. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival[J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(4): 379-382.

[7] 刘江伟, 李开宗, 樊科峰. Survivin 在胰腺癌组织中的表达及其与血管内皮生长因子的相关性研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 24(9): 486-488.

[8] Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, et al. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*[J]. J Nat Prod, 1998, 61: 362-366.

[9] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle check point by survivin[J]. Nature, 1998, 396(6711): 580-584.

[10] Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function[J]. Nat Cell Biol, 1999, 1(8): 461-466.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2796(2007)01-0074-01

手术治疗自发性气胸 105 例护理

康娟¹, 时丽丽² (解放军总医院南楼: ¹胸外科, ²消化科十三病室, 北京 100853)

【关键词】自发性气胸 外科手术 护理
【中图分类号】R541.5 【文献标识码】B

1 对象和方法

1.1 对象 1992-04/2005-03 收治自发性气胸(spontaneous pneumothorax, SP)患者 105 例, 治疗分为电视胸腔镜辅助手术(vidao-assisted thoracoscopic surgery, VATS) 66(男 52, 女 14)例, 年龄 29(15~74)岁; 常规开胸手术 39(男 32, 女 7)例, 年龄 32(15~78)岁。

1.2 方法 双腔气管插管全身麻醉, 健侧单肺通气。常规开胸组在第五肋间后外侧做切口。VATS 经第七肋间腋中线做一直径 1.5 厘米切口置入胸腔镜, 在其指引下另做两个直径 1.5 cm 操作孔, 多在第三、四肋间腋前线, 少部分病例采用在第四或五肋间腋前线辅助以 3~4 cm 小切口作操作孔。对于肺大疱 VATS 均采用直线切割吻合器(Endo-GIA)进行切除, 常规开胸组采用手工缝合。无论肺部有无病变, 关胸前均行胸膜摩擦术。

2 结果 VATS 和常规开胸手术并发症发生率分别 2.44% 和 7.69%。两种手术分别有 1 例和 3 例术后持续肺漏气超过 3 d, 经负压吸引处理分别在术后 4、5 和 8 d 后停止漏气, 拔除胸腔引流管。两种手术情况有一定差异(表 1), 随访别为 6.5(3.0~9.5)年和 5.8(0.3~13.0)年, 均未见复发病例。

3 护理和讨论

3.1 护理 包括心理护理和常规护理, 重点是专科护理^[1]。术前后护理按常规要求, 做好每一个护理细节。专科护理应做好如下几方面: 第一是保持呼吸道通畅。指导患者行有效咳嗽, 辅以超声雾化吸入以利排痰, 鼓励患者深呼吸, 增强肺泡张力和肺活量, 促进肺复张, 尽快排除胸腔残余气体; 第二是胸腔引流管的护理。由于 VATS 手术的切口小, 放置的引

流管较细, 易被压迫、扭曲或阻塞, 发生胸腔积液或积气, 应保持引流管连接及通畅。第三是遵医嘱合理应用抗生素, 维持水电解质平衡。此外, 还应防治并发症和进行出院指导。

表 1 自发性气胸手术治疗情况 [n(%), $\bar{x} \pm s$]

参数	常规开胸手术	VATS
大疱切除并胸膜摩擦术	32(82)	49(74)
单纯胸膜摩擦术	6(15)	14(21)
肺楔形切除术	1(3)	3(5)
手术时间(min)	112.7 ± 33.5*	82.8 ± 20.2
术中出血(mL)	52.7 ± 2.6*	45.6 ± 29.9
胸管引流时间(d)	5.0 ± 2.6*	3.2 ± 2.2
术后住院时间(d)	10.7 ± 2.6*	7.6 ± 2.4

*P < 0.05 vs VATS.

3.2 讨论 电视胸腔镜手术治疗自发性气胸是最佳选择之一, 它减少了开胸手术对患者活动和呼吸的影响, 创伤小、恢复快、出血少和术后住院日短等优点而在临床广泛应用^[2-3]。自发性气胸分特发性和继发性两种, 首次发作后约有半数复发, 其中继发性气胸复发率较特发性气胸更高^[2]。本组继发性气胸、复发性气胸在所有患者分别占 80% 和 74%。手术是自发性气胸有效的治疗方法, 常用的术式为肺大疱切除术和胸膜固定术。我们对于 VATS 和常规开胸手术结果进行对比, 在手术时间、术中出血量、拔管时间、术后住院天数等指标两组均有显著差异, 电视胸腔镜手术低于常规开胸手术^[3-4]。

【参考文献】

[1] 蔡焕英, 李杰. 电视胸腔镜治疗难治性气胸 26 例护理体会[J]. 齐鲁护理杂志, 2005, 11(4): 335.

[2] 孙玉鹏. 胸外科手术学[M]. 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2004: 108-109.

[3] Dumont P, Diemont F, Massard G, et al. Does a thoracoscopic approach for surgical treatment of spontaneous pneumothorax represent progress?[J]. Eur J Cardio-Thoracic Surg, 1997, 11: 27-31.

[4] Sawada S, Watanabe Y, Moriyama S. Video-assisted thoracoscopic surgery for primary spontaneous pneumothorax: evaluation of indications and long-term outcome compared with conservative treatment and open thoracotomy[J]. Chest, 2005, 127(6): 2226-2231.

编辑 许昌泰