

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)03-0255-04

chk2 反义寡核苷酸对顺铂诱导卵巢癌 SKOV-3 细胞凋亡的影响

朱克修 李 玢 王 佳 韩晓兵 (西安交通大学医学院第一附属医院妇产科 陕西 西安 710061)

Influence of antisense oligodeoxynucleotide targeting *chk2* on apoptosis of SKOV-3 cells of ovarian cancer induced by DDP

ZHU Ke-Xiu, LI Bin, WANG Jia, HAN Xiao-Bing

Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To investigate the change of apoptosis of antisense oligodeoxynucleotide targeting *chk2* transfected ovarian cancer cells SKOV-3 induced by DDP. **METHODS:** The proliferation inhibition rate of SKOV-3 cells induced by DDP at different concentrations was measured by MTT assays. The expression of Chk2 protein in SKOV-3 cells was observed by Western Blot. The apoptosis rate of SKOV-3 cells induced by DDP was investigated by flow cytometry and TUNEL after transfection with antisense oligodeoxynucleotide targeting *chk2*. **RESULTS:** The growth inhibition rate of SKOV-3 cells increased in a DDP dosage and action time dependent manner. Western Blot demonstrated that the expression of Chk2 protein in SKOV-3 cells after transfection with antisense oligodeoxynucleotide targeting *chk2* was inhibited obviously. Flow cytometry demonstrated that the apoptosis rate of *chk2* transfected SKOV-3 cells induced by DDP was higher [(77.6 ± 1.7)%] than that in normal group [(24.7 ± 1.76)%], empty lipofectamine group [(35.6 ± 1.4)%] and the sense oligodeoxynucleotide targeting *chk2* transfected [(47.6 ± 1.2)%]. The result of TUNEL assay was similar to that of flow cytometry. **CONCLUSION:** *chk2* may be used as a therapeutic target for ovarian cancer.

【Keywords】 *chk2* gene; antisense nucleic acid technology; ovarian neoplasms; DDP

【摘要】目的 观察卵巢癌 SKOV-3 细胞转染 *chk2* 反义寡核苷酸后在顺铂作用下细胞凋亡的变化。方法 用 MTT 法检测不同浓度顺铂对 SKOV-3 细胞的抑制率, Western Blot 法检测 SKOV-3 细胞中 Chk2 蛋白的表达。流式细胞仪及 TUNEL 法检测转染 *chk2* 反义寡核苷酸后顺铂作用下 SKOV-3 细胞凋亡

情况。结果 顺铂对 SKOV-3 细胞的生长抑制率随浓度增高和时间延长而升高。Western Blot 法检测证实转染 *chk2* 反义寡核苷酸后 SKOV-3 细胞中 Chk2 蛋白表达受到明显抑制。流式细胞仪检测抑制 *chk2* 基因表达后 SKOV-3 细胞凋亡率为 (77.6 ± 1.7)% 明显高于正常组 (24.7 ± 1.76)%、空脂质体组 (35.6 ± 1.4)% 及转染正义寡核苷酸细胞组 (47.6 ± 1.2)%。TUNEL 法检测结果与流式细胞法一致。结论 *chk2* 可作为卵巢癌增敏治疗的有效靶点。

【关键词】 *chk2* 基因; 反义核酸技术; 卵巢肿瘤; 顺铂

【中图分类号】 R737.32 **【文献标识码】** A

0 引言

肿瘤细胞的多耐药性已成为恶性肿瘤化疗失败的重要原因^[1], 进行化疗增敏或寻找新的治疗手段具有重要意义。细胞周期检测点是增强肿瘤治疗敏感性研究的热点之一^[2]。肿瘤的耐药与肿瘤细胞逃避化疗诱导的肿瘤细胞凋亡有关, 因为放化疗作用下可使细胞周期检测点激活, 导致细胞周期停滞和细胞的损伤修复, 从而使肿瘤细胞避免凋亡。周期检测点激酶 1 2 (check point kinase 1 2, Chk1, Chk2) 是细胞周期检测点中最关键的效应蛋白酶^[3]。国外一些研究表明, 转染 *chk1/chk2* 反义寡核苷酸可明显提高一些肿瘤模型对抗肿瘤药物的敏感性, 说明 *chk1/chk2* 可能是一些肿瘤增敏治疗的有效靶点^[4]。本研究通过检测 *chk2* 反义寡核苷酸对顺铂诱导的 SKOV-3 细胞凋亡的影响, 以探讨 *chk2* 能否作为卵巢癌增敏治疗的有效靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 SKOV-3 细胞株由西安交通大学临床医学研究分子中心提供。RPMI 1640 购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 噻唑蓝 (MTT) 购自 Amresco 公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, 鼠抗人 Chk2 mAb 购自 NEOMARKERS 公司, 辣根酶标记羊抗鼠二抗购自博士德公司, 原位细胞凋亡检测试剂盒购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人卵巢癌细胞 SKOV-3 常规培养

收稿日期 2007-06-19; 接受日期 2007-09-07

作者简介 朱克修, 博士生(导师王珏), 副教授。Tel (029) 83069288

Email zhukexiu@126.com

在含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,培养条件为 37℃ 50 mL/L CO₂ 饱和湿度,待细胞长满瓶底时 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 MTT 法测定不同浓度顺铂在不同时间对 SKOV-3 细胞生长的抑制率 取对数生长期的 SKOV-3 细胞,调整细胞密度为 5×10^7 /L,接种于 96 孔板,200 μ L/孔 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加药,使顺铂终浓度为 10 20 40 80 160 μ mol/L,每个浓度设四个平行孔,并同时设不加药物的阴性对照和无细胞的空白对照,分别于作用 24 48 72 h 后加入 20 mmol 的 MTT 溶液 20 μ L/孔,继续培养 4 h 后,吸去上清,加入 DMSO 150 μ L/孔,振荡器震荡 10 min,使结晶溶解完全,用酶标仪(650 BIO-RAD 公司)在 490 nm 处测量 A 值,计算细胞增殖抑制率(inhibition rate, IR%)。绘制顺铂对 SKOV-3 细胞的生长抑制曲线。

1.2.3 脂质体介导寡核苷酸转染 SKOV-3 细胞株

1.2.3.1 寡核苷酸链的设计和合成 根据文献 [5] 合成 *chk2* 的反义寡核苷酸链(antisense oligodeoxynucleotide, Adosn: 5'-TCCACAGGCACCACTTCC-3')并合成其正义的寡核苷酸链(oligodeoxynucleotide, odn: 5'GGAAGTGGTGCCTGTGGA-3')作为对照。均采用全硫代修饰,其中部分寡核苷酸链的 5' 端以 FITC 标记。

1.2.3.2 实验分组与转染 细胞分 4 组, A: 正常组, 未经任何处理; B: 转染空脂质体组(LP); C: 转染 *chk2* 正义链组(*chk2* odn 组); D: 转染 *chk2* 反义链组(*chk2* Adosn 组)。B 至 D 两组在转染终止 10 h 后同样用 40 μ mol/L 顺铂处理细胞 24 h。

1.2.3.3 转染效率的测定 于转染前一日用无抗生素的含 10 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 调整细胞密度为 2.5×10^8 /L, 接种于 24 孔板, 500 μ L/孔。转染当天细胞密度达到 90% ~ 95%, 并换为 500 μ L 无抗生素无血清 RPMI-1640 培养。分别取不同量的荧光标记的寡核苷酸链(0.6 0.8 1.0 μ g) 加到 50 μ L 的 RPMI-1640 中, 混匀。再取 2 μ L 的 Lipofectamine2000 加到 50 μ L 的 RPMI-1640 中, 混匀。室温放置 5 min 后, 将分别混有寡核苷酸链和 Lipofectamine2000 的 RPMI-1640 混合, 室温放置 20 min (寡核苷酸链与脂质体比值分别为 0.6 μ g:2 μ L 0.8 μ g:2 μ L 和 1.0 μ g:2 μ L)。将上述混合物加入 24 孔板中, 轻轻混匀, 放 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中, 培养 6 h 后将培养基换为 500 μ L 含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640, 继续培养至 24 h, 荧光倒置显微镜下观察转染效率。

1.2.4 Western Blot 法检测 Chk2 蛋白的表达 用酶抑制剂法提取细胞总蛋白, 并用 Bradford 比色法作蛋白定量, 煮沸 5 min 使蛋白变性, 120 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 转膜, 加入 1:400 稀释的鼠抗人 Chk2 mAb, 室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 min 6 次。加入 1:3000 稀释的辣根酶标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 min 6 次。ECL(购自 Amersham bioscience) 显色, X 光胶片曝光, 洗片, 扫描存档。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集细胞, 调整细胞密度为 1×10^9 /L, 取 1 mL 细胞悬液, 离心, PBS 洗涤 3 次, 加 10 μ L Annexin-V-FITC, 轻轻混匀, 加入 5 μ L PI 避光室温反应 15 min, 上流式细胞仪(EPLCS ELITE COULTER CORPORATION 公司)检测。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡 将 SKOV-3 单细胞悬液接种于 24 孔培养板培养, 使细胞爬于盖玻片, 按前述分组处理细胞后捞出盖玻片, 多聚甲醛固定, 按 TUNEL 试剂盒说明进行操作。

统计学处理 实验结果均采用 SPSS13.0 软件进行方差分析及两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对 SKOV-3 细胞的生长抑制作用 对照组 SKOV-3 细胞体外生长良好, 10 20 40 80 160 μ mol/L 顺铂对 SKOV-3 细胞均有明显的抑制效应 (P < 0.05), 10 μ mol/L 顺铂作用 SKOV-3 细胞 24 48 72 h 后的抑制率分别为 29.1% 18.2% 50.4%, 160 μ mol/L 顺铂作用 SKOV-3 细胞 24 48 72 h 后的抑制率分别为 78.9% 78.5% 88.4%。随着时间延长和浓度增加, 其抑制作用越来越明显(图 1)。DDP 作用 24 h 的 IC₅₀ 值为 37.2 μ mol/L。

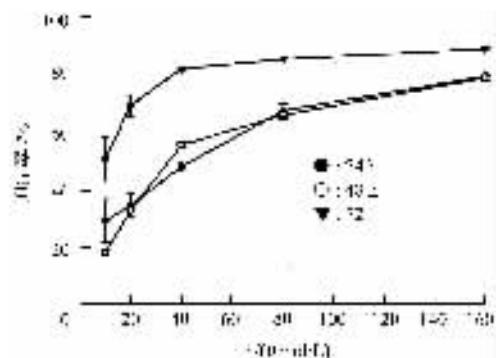
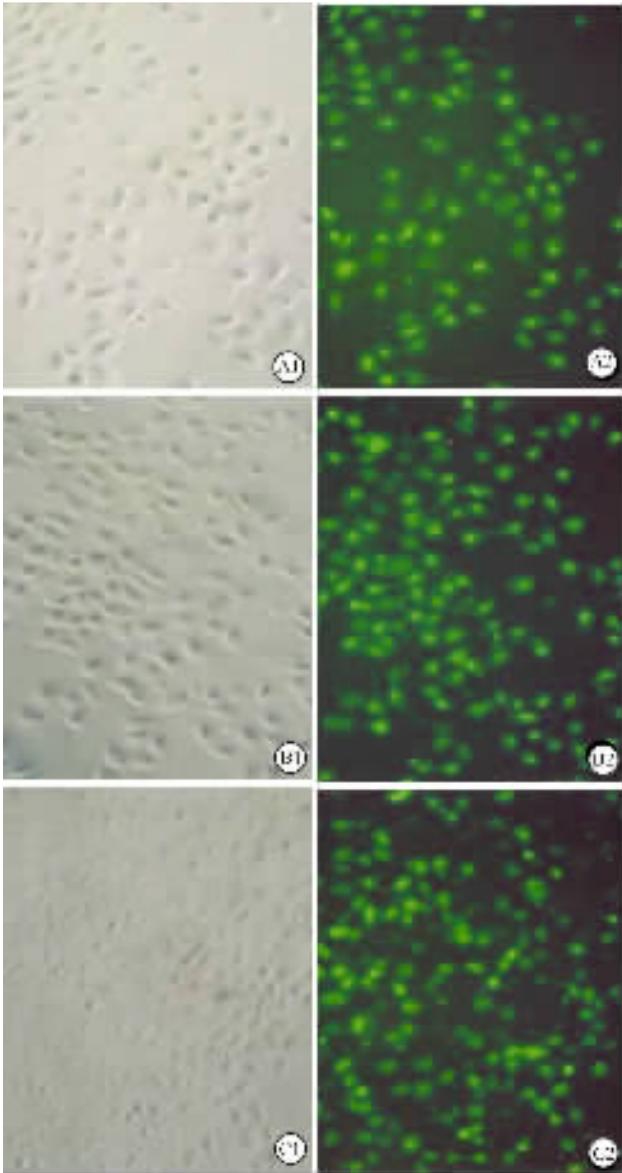


图 1 顺铂对卵巢癌 SKOV-3 细胞株生长抑制曲线

2.2 *chk2* 反义寡核苷酸转染 SKOV-3 细胞的效率 用 FITC 标记的寡核苷酸转染 SKOV-3 细胞, 24 h

后用荧光倒置显微镜观察转染效率,发现 DNA/Lipofectamine2000 脂质体比率为 0.6 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$ 、0.8 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$ 和 1.0 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$ 时的转染效率分别为 98.2%、98.9% 和 99.3%,其中 DNA/Lipofectamine2000 脂质体比率为 1.0 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$ 时转染效率最高(图 2)。

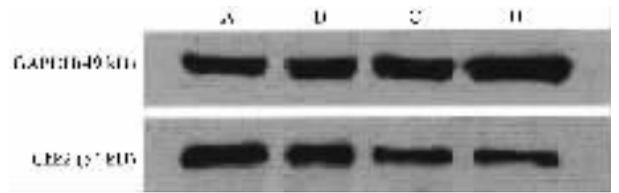


A : DNA/Lipofectamine 2000 脂质体比率为 0.6 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$ B : DNA/Lipofectamine 2000 脂质体比率为 0.8 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$ C : DNA/Lipofectamine 2000 脂质体比率为 1.0 $\mu\text{g}:2 \mu\text{L}$;A1 B1 C1 光镜检测 ;A2 B2 C2 荧光倒置显微镜检测。

图 2 不同比率的 DNA/Lipofectamine2000 脂质体转染效率 $\times 20$

2.3 转染 *chk2* 反义寡核苷酸对 Chk2 蛋白表达的影响 Western Blot 检测结果显示其灰度值分别为 1.26、0.76、0.29、0.06,可见转染 *chk2* 反义寡核苷酸可明显抑制 Chk2 蛋白的表达(图 3)。与空白对照组、空脂质体组和转染 *chk2* 正义链组比较差异有统

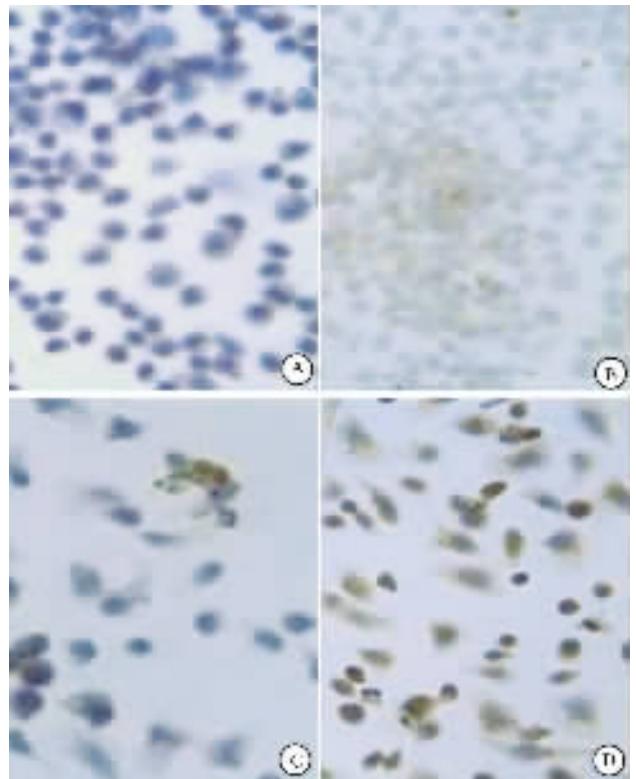
计学意义($P < 0.01$)。



A 正常组 B 转染空脂质体组(LP) C 转染 *chk2* 正义链组(*chk2* odn 组) D 转染 *chk2* 反义链组(*chk2* Asodn 组)。

图 3 *chk2* 反义寡核苷酸对 SKOV-3 细胞 Chk2 蛋白表达的影响

2.4 转染 *chk2* 反义寡核苷酸对 SKOV-3 细胞早期凋亡的影响 40 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理各组细胞 24 h 后,流式细胞仪检测转染 *chk2* 反义链组细胞凋亡率为 $(77.6 \pm 1.7)\%$,明显高于正常组 $(24.7 \pm 1.76)\%$,空脂质体组 $(35.6 \pm 1.4)\%$ 及转染正义寡核苷酸细胞组 $(47.6 \pm 1.2)\%$ ($P < 0.05$)。说明转染 *chk2* 反义寡核苷酸可诱导 SKOV-3 细胞的凋亡增加。TUNEL 染色后,转染 *chk2* 反义寡核苷酸链后 SKOV-3 细胞在顺铂作用下凋亡细胞数明显高于正常组,空脂质体组和转染 *chk2* 正义寡核苷酸链组凋亡细胞数(图 4)。检测结果与 Annexin V/PI 流式细胞仪检测法获得结果一致。



A 正常组 B 转染空脂质体组(LP) C 转染 *chk2* 正义链组(*chk2* odn 组) D 转染 *chk2* 反义链组(*chk2* Asodn 组)。

图 4 TUNEL 法检测顺铂处理 24 h 后各组细胞的凋亡 $\times 40$

3 讨论

由于对卵巢癌仍缺乏有效的早期诊断方法,多数患者确诊时已属晚期,卵巢癌亦成为死亡率最高的妇科恶性肿瘤。手术治疗后辅以化学治疗是目前卵巢癌的标准治疗方案,然而,肿瘤对化疗药物的耐药常导致治疗失败。有报道约 15% 的卵巢癌患者对化疗原发性耐药,至少 80% 的卵巢癌患者最终形成多种药物联合化疗的耐药。研究发现,肿瘤细胞的多耐药性以成为恶性肿瘤化疗失败的重要原因之一^[1],因而进行化疗增敏或寻找新的治疗手段具有重要意义。

chk1/chk2 在细胞周期检测点中起重要作用。国外一些研究表明通过阻断 *chk1/chk2* 可以明显增加肿瘤细胞的凋亡^[6-8]。大量研究表明, *chk1* 2 主要在 G2/M 期检测点发挥作用^[9]。DNA 受损后,活化的 *chk1/2* 磷酸化 CDC25 上的 Ser216,使其形成与 14-3-3 蛋白质结合的位点,从而阻止 CDC25 的去磷酸化作用。如此 *cdc2* 因未脱磷酸化不具活性最终影响 *cdc2* 与 CyclinB 构成的活性复合体而引起 G2-M 期阻滞^[10-11]。卵巢癌细胞对化疗药物的耐药是治疗失败的重要原因。为了证明 *chk2* 是否是卵巢癌增敏治疗的有效靶点,通过反义寡核苷酸杂交技术,合成 *chk2* 反义寡核苷酸链,经过杂交,用 Western Blot 法检测 Chk2 蛋白在肿瘤细胞中的表达情况。并用顺铂处理杂交后细胞,通过流式细胞术检测,比较其与其他对照组肿瘤细胞凋亡率的改变情况。我们的实验结果表明,通过阻断 *chk2*,可明显增加卵巢癌细胞对顺铂的敏感性。

本研究首先用 MTT 法检测不同浓度的顺铂在不同时间点对卵巢癌 SKOV-3 细胞的抑制率的变化。通过本试验,我们了解到顺铂对 SKOV-3 细胞的抑制率随时间和浓度的增加上升。并计算出 DDP 作用 24 h 的 IC_{50} 值为 37.2 $\mu\text{mol/L}$ 。所以我们在后面的实验中均选择用 40 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 SKOV-3 细胞 24 小时。并通过检测 *chk2* 反义寡核苷酸转染细胞的效率,获得一个最佳的寡核苷酸和脂质体的比例,使实验结果更加稳定可靠。以上结果表明 DNA/Lipofectamine 2000 脂质体比率为 0.6 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$, 0.8 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ 和 1.0 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ 时的转染效率均接近 100%。我们选择寡核苷酸/Lipofectamine 2000 脂质体比率为 0.8 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ 来转染 SKOV-3 细胞。转染后,用 West-

ern Blot 法检测各组 SKOV-3 细胞的 Chk2 蛋白表达情况,发现转染 *chk2* 反义寡核苷酸链组 *chk2* 蛋白的表达明显降低。用 40 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 SKOV-3 细胞 24 h 后,用流式细胞仪及 TUNEL 法检测显示转染 *chk2* 反义寡核苷酸链组 SKOV-3 细胞的凋亡率明显增加($P < 0.05$)。证明了阻断 *chk2* 来增加宫颈癌对顺铂敏感性的有效性。

综上所述,采用反义寡核苷酸可以有效地抑制 Chk2 蛋白的表达,并增加顺铂诱导的 SKOV-3 细胞的凋亡。因此,本试验结果可以证明 *chk2* 可以作为卵巢癌增敏治疗的有效靶点。

【参考文献】

- [1] 王世闻. 卵巢疾病[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:329-333.
- [2] Melo J, Toczyski D. A unified view of the DNA damage checkpoint[J]. *Curr Opin in Cell Biol*, 2002, 14: 237-245.
- [3] Walworth NC. DNA damage: Chk1 and Cdc25, more than meets the eye[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001; 11: 78-82.
- [4] Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. Abrogation of the Chk1-mediated G2 checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5843-5849.
- [5] Hu BC, Hou XY, Wang X, et al. The radioresistance to killing of A125 cells derives from activation of the Chk1 pathway[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(21): 17693-17698.
- [6] Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage[J]. *Science*, 2002, 297(5581): 547-551.
- [7] Caporali S, Falcinelli S, Starace G, et al. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: Role of the mismatch repair system[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66(3): 478-491.
- [8] Zhu W, Chen Y, Dutta A. Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(16): 7140-7150.
- [9] Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase[J]. *DNA Repair*, 2004, 3(8-9): 1039-1047.
- [10] Matsuoka S, Huang MX, Elledge SJ, et al. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase[J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1893-1897.
- [11] Buscemi G, Savio C, Zannini L, et al. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(15): 5214-5122.

编辑 王雪萍