

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)12-1115-04

诱骗寡核苷酸下调 MKN-45 细胞 OP18 基因表达及对细胞增殖的影响

林芳¹, 王锐¹, 高萍², 刘丽¹, 王希¹, 张惠中¹(第四军医大学唐都医院: ¹ 中心实验室, ² 妇产科实验室 陕西 西安 710038)**Inhibitory effects of E2F decoy ODNs on OP18 gene expression and proliferation in gastric cancer MKN-45 cells**LIN Fang¹, WANG Rui¹, GAO Ping², LIU Li¹, WANG Xi¹, ZHANG Hui-Zhong¹¹Central Laboratory, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To investigate the blocking effects of E2F decoy oligodeoxynucleotides (ODNs) in dumbbell shape on the op18 gene transcription and the gastric cancer MKN-45 cell proliferation. **METHODS:** E2F decoy ODNs were designed, chemically synthesized, annealed and ligated to form dumbbell shape, and then transfected into gastric cancer cell line MKN-45 using lipofectamine™ 2000 reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted by using TRIzol. The level of op18 mRNA in the transfected tumor cells was detected by RT-PCR. The proliferation of the transfected tumor cells was analyzed by MTT assay and the apoptosis of the tumor cells was detected by TUNEL staining. **RESULTS:** E2F decoy ODNs could be successfully transfected into tumor cells, and RT-PCR results indicated that E2F decoy ODNs decreased the expression of op18 gene in the transfected tumor cells. The proliferation of tumor cells was inhibited markedly by E2F decoy ODNs and morphological analysis showed positive staining identified by TUNEL assay. **CONCLUSION:** E2F decoy ODNs in dumbbell shape may specifically decrease the activity of transcription factor E2F and down-regulate op18 gene expression and inhibit MKN-45 cell proliferation, which demonstrates a potential strategy for cancer gene therapy.

【Keywords】 decoy ODNs; transcription factors; cell proliferation; gene therapy

【摘要】 目的: 探讨转录因子 E2F 哑铃形诱骗寡核苷酸(Decoy ODNs)对 MKN-45 细胞中 op18 基因转录调控的影响

收稿日期 2007-04-03 接受日期 2007-05-10

通讯作者 张惠中. Tel: (029)84777165 Email: zhz328@yahoo.com.cn

作者简介: 林芳. 硕士生(导师张惠中). Tel: (029)84777718

Email linfang168@hotmail.com

及对细胞增殖的抑制作用. 方法: 设计合成针对 op18 启动子上 E2F 的结合位点序列的哑铃形 Decoy ODNs, 然后将合成的序列进行退火、连接, 使其形成哑铃形的结构, 再应用阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000 将哑铃形 Decoy ODNs 转染 MKN-45 细胞中. TRIzol 法提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 方法检测细胞中 op18 mRNA 表达水平的变化. 通过 MTT 实验监测细胞的生长增殖状况并绘制生长曲线, 最后用 TUNEL 法观察细胞的凋亡的情况. 结果: 哑铃形 Decoy ODNs 被成功转染 MKN-45 细胞, 并成功提取了细胞总 RNA. RT-PCR 检测发现哑铃形 Decoy ODNs 转染后的 MKN-45 细胞中 op18 mRNA 表达水平明显低于空白对照组, MTT 实验所作的生长曲线显示转染细胞增殖速度与空白对照组相比较明显减慢, TUNEL 凋亡染色可见凋亡细胞. 结论: 哑铃形 Decoy ODNs 能特异性抑制 E2F 转录因子对 op18 基因的转录调控, 进而抑制 op18 基因表达及 MKN-45 细胞增殖.

【关键词】 圈套寡核苷酸 转录因子 细胞增殖 基因疗法

【中图分类号】 R334.34 **【文献标识码】** A

0 引言

E2F 最初作为腺病毒(adenovirus, Ad)E2 启动子的活化因子被发现^[1], 它是细胞周期调控过程中起重要作用的转录因子, E2F 调控异常存在于多种肿瘤细胞中^[2]. 靶向 E2F 转录因子是肿瘤基因治疗的策略之一. 目前在治疗多种肿瘤的体内外动物实验中均取得了良好效果, 包括非小细胞肺癌、胃癌及乳腺癌等^[3-4]. op18(又称 oncoprotein18, stathmin)是一种高度保守的细胞内蛋白, 该蛋白在恶性肿瘤发生、发展及决定表型上具有重要作用及意义^[5]. Polzin 等^[6]发现 op18 基因启动子上有 E2F 的结合位点, 说明 op18 基因是转录因子 E2F 调控的靶基因, 但截至目前 E2F 对 op18 基因的具体调控机制仍未阐明. 本实验应用诱骗寡核苷酸(decoy oligodeoxynucleotides, Decoy ODNs)策略来研究转录因子 E2F 对 op18 基因表达及肿瘤细胞的生物学行为影响, 初步探讨 E2F 对 op18 基因的调控, 旨在为肿瘤的生物治疗寻找新的技术方法.

1 材料和方法

1.1 材料 MKN-45 细胞(人低分化胃癌细胞株)唐

都医院中心实验室保存; TRIzol, Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司); Taq DNA 聚合酶, DGL2000 DNA Marke(北京鼎国生物技术有限公司); DMEM 培养液, 1640 培养液(GIBCO 公司); T4 DNA 连接酶(Promega 公司) 所有 PCR 扩增引物及 E2F Decoy 序列均由上海英骏生物工程公司合成; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 E2F 基因 Decoy 寡核苷酸设计合成及实验分组 根据 Polzin 等^[6]提供的 op18 基因启动子上 E2F 的结合位点序列, 参考文献 [7] 的方法, 合成哑铃形 Decoy ODNs, 序列如下: EOP1 : 5'-GGATCC CTTTC-CCGCACAGG [AAAA] CCTGTGCGGAAAG-3', EOP2 : 5'-GGATCC TTTGGCGGG AGTT [AAAA] AACTCCCGC CAAA-3', EOPm(突变对照) 5'-GGATCC TTTGGCGG-AACGTT [AAAA] AACGTTGCCAAA-3'。斜体部分为 op18 基因启动子上 E2F 的结合位点, 框内部分为 loop, 下划线部分为 BamHI 酶切位点。EOPm 的序列是将 E2F 的结合位点序列进行了突变, 作为突变对照。应用梯度退火的方法使合成的序列形成哑铃形的结构。取退火产物 4 μL, 用 T4 DNA 连接酶做连接, 体系条件按该酶说明书(图 1)。根据实验要求分为五组: EOP1 组: 转染 EOP1 Decoy ODNs 的 MKN-45 细胞; EOP2 组: 转染 EOP2 Decoy ODNs 的 MKN-45 细胞; EOP1 + EOP2 组: 转染 EOP1 和 EOP2 Decoy ODNs 的 MKN-45 细胞; EOPm 组(突变对照): 转染 EOPm Decoy ODNs 的 MKN-45 细胞; 空白对照组: 为未作任何处理的 MKN-45 细胞。

EOP1 5' - GGATCCCTTTCCGCACAGG [AAAA] CCTGTGCGGAAAG - 3'

退为 5' - GGATCCCTTTCCGCACAGG A
3' - GAAAGGGCGTCTCC A
A

连接 A A
A CCTGTGCGGAAAG - 3' 5' - GGATCCCTTTCCGCACAGG A
A GCACAGCCCTTTCCCTAGG - 5' 3' - GAAAGGGCGTCTCC A
A A
A A
A CCTGTGCGGAAAGGGATCCCTTTCCGCACAGG A
A GCACAGCCCTTTC CCTAGGAAAGGGCGTCTCC A
A A

图 1 哑铃形 Decoy ODNs 的形成示意图

1.2.2 脂质体介导 E2F 基因 Decoy ODNs 的细胞转染 转染前 1 d, 在 100 mm 平皿中按 0.6 × 10⁵ 细胞/皿接种 MKN-45 细胞。脂质体转染操作步骤按 Lipofectamine™2000 说明书进行。于转染后 8 h 换为完全

DMEM 培养液继续培养 72 h, 分别收集各组的 MKN-45 细胞进行功能研究。

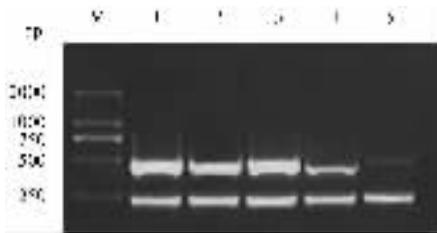
1.2.3 RT-PCR 检测转染细胞 op18 基因的表达 收集不同组的 MKN-45 细胞, 分别用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。取 5 μg 总 RNA, 加入 1 μL oligo(dT), 按照逆转录试剂盒操作说明, 合成 cDNA 第 1 链, 以反转录的 cDNA 为模版, 常规 PCR 扩增 op18 基因。op18 基因引物序列如下, 上游引物: 5'-TAC-CGAAGAAGACTATAGGT-3'; 下游引物: 5'-AAT-CAGTCGAAGTCAGAGCA-3' 片段大小 450 bp。用 β-actin 基因做为内参照, 引物序列如下, 上游引物为 (68-88): 5'-ATGGATGATGATATCGCCGCG-3'; 下游引物(310-330) 5'-TGGTGCCAGATTTTCTCCATG-3', 片段大小 263 bp。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。各取 10 μL 扩增产物, 1.5 g/L 的琼脂糖凝胶电泳 0.5 h, 凝胶图像分析仪分析结果。

1.2.4 MTT 检测 取对数生长期的 MKN-45 细胞, 按 0.6 × 10⁵ 接种 100 mm 培养板, 用阳离子脂质体转染上述细胞, 于转染后 8 h 换为完全 DMEM 培养液培养 48 h, 用胰酶消化细胞后, 接种于 24 孔板, 每孔细胞数为 6 × 10³ 个, 分别于培养后 1, 3, 5 和 7 d 进行 MTT 实验, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h, 吸除上清后加入 DMSO 150 μL/孔, 振荡数分钟, 使用酶联免疫分析仪 490 nm 波长处测 A 值, 按下列公式计算细胞相对抑制率: 细胞相对抑制率% = (1 - 实验孔 A 值/对照孔 A 值) × 100%。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 将 MKN-45 细胞接种于铺有盖玻片的 100 mm 培养皿, 分别于第 1, 3, 5, 7 和 9 d 收集细胞爬片, 40 g/L 多聚甲醛固定 25 min, 2 g/L Triton X-100 处理 5 min, 加 100 μL 平衡缓冲液 5 ~ 10 min, 100 μL TdT 酶反应液 37℃ 作用 60 min, 加 100 μL 2 × SSC 缓冲液终止反应, 3 mL/L 双氧水 5 min, 加 100 μL Streptavidin-HRP 溶液 5 min, 加 100 μL DAB 工作液显色并封片。空白对照不加 TdT 酶, 其余步骤同前。

2 结果

2.1 Decoy ODNs 对细胞中 op18 基因的表达的影响 RT-PCR 扩增产物电泳结果显示, op18 基因的 mRNA 表达水平在 EOP1 组降低最显著, EOP1 和 EOP2 共转染组次之, 其次是 EOP2 组, EOPm 组与未转染的 MKN-45 细胞中 op18 基因的 mRNA 表达水平未见下调(图 2)。



M :DGL2000 marker ;1 :MKN-45 cells ;2 :MKN-45 cells 转染 EOPm ;
3 MKN-45 cells 转染 EOP2 ;4 :MKN-45 cells 转染 EOP1 和 EOP2 ;
5 MKN-45 cells 转染 EOP1.

图2 RT-PCR 检测转染 MKN-45 细胞中 op18 基因表达结果

2.2 细胞增殖的变化 E2F Decoy ODNs 处理的 MKN-45 细胞与空白对照组比较可见生长受到明显抑制. EOP1 组在第 7 d 抑制作用最显著, 细胞相对抑制率为 65.7% ;EOP1 + EOP2 组次之, 细胞相对抑制率为 47.9% ;其次是 EOP2 组, 细胞相对抑制率为 32.3% ;EOPm 组与空白对照组结果一致(图 3).

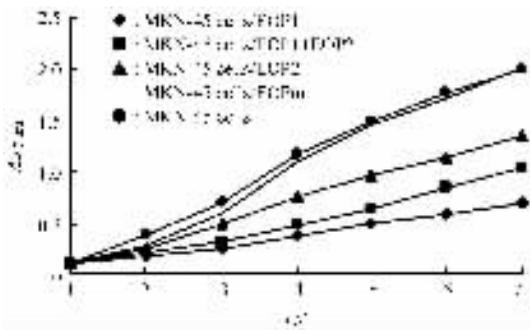


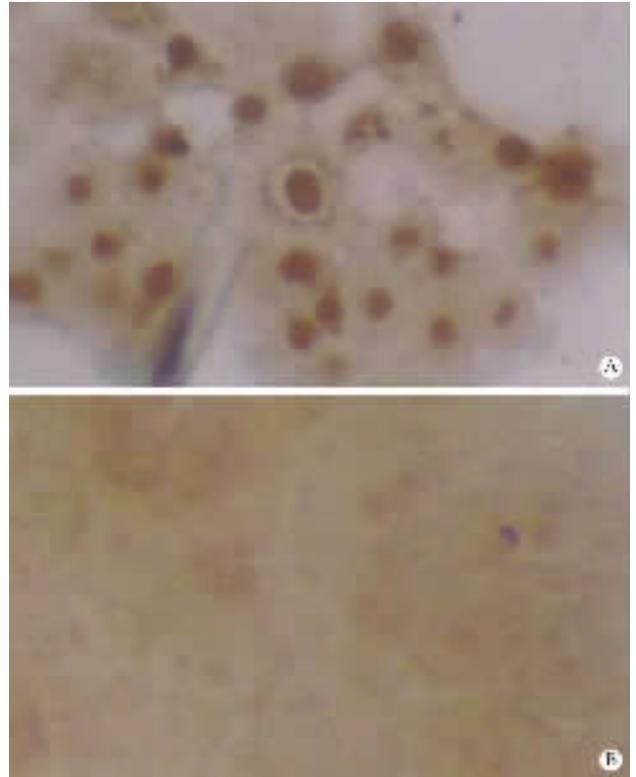
图3 E2F Decoy ODNs 对 MKN-45 细胞增殖的影响

2.3 肿瘤细胞凋亡检测结果 于转染后 1, 3, 5, 7 及 9 d 分别收集细胞爬片, TUNEL 法染色结果显示:于转染后 3 d E2F 圈套寡核苷酸处理 MKN-45 细胞开始出现凋亡, 至 7 d 凋亡达到高峰. 各实验组中, EOP1 组凋亡最显著, EOP1 + EOP2 组次之, 其次是 EOP2 组, EOPm 组与空白对照组未见明显阳性凋亡细胞(图 4).

3 讨论

op18 基因是从淋巴瘤中筛选出的特征性的表达基因, 其编码的蛋白为一种高度保守的细胞内蛋白, 在细胞周期中可被蛋白激酶磷酸化, 阻断 op18 磷酸化将使细胞分裂停止于 G₂/M 期. 细胞内微管相关蛋白磷酸化过程中 op18 是重要调节因子, 直接影响细胞分裂与增殖^[5]. Decoy ODNs 可以使转录因子的转录活性降低, 使其丧失与内源基因作用的能力, 导致基因表达受抑制, 最终达到基因治疗的目的. 根据结构的不同可以分为: 未被修饰的寡核苷酸双链, 磷酸

化的寡核苷酸双链, 哑铃形的寡核苷酸等等. 未被修饰的寡核苷酸在细胞和血清中易被降解, 作用时间短, 而磷酸化等修饰过的寡核苷酸将可能会丧失结合的特异性, 而且获得免疫原性, 使机体对它产生排斥. 哑铃形的寡核苷酸, 是闭合双链, 类似天然 DNA, 所以增加了对核酸外切酶的稳定性, 并且无因被修饰而引起毒副作用^[7-8]. 本实验中, 我们选用了哑铃形 Decoy ODNs 的结构来抑制转录因子 E2F 的活性, 通过哑铃形的结构能使寡核苷酸作用时间延长和特异性增加, 从而有利于观察转录因子 E2F 对下游靶基因 op18 的转录调控的情况和细胞增殖的影响.



A : MKN-45 cells/EOP1(阳性); B : MKN-45 cells(阴性).

图4 转染 EOP 的 MKN-45 细胞的凋亡检测结果

通过本实验, 我们初步验证了 E2F Decoy ODNs 可以特异性抑制 E2F 的活性, 从而使得其下游调控的 op18 基因表达下调. 细胞生长曲线及凋亡染色显示, 转染了 E2F Decoy ODNs 的肿瘤细胞增殖明显受到抑制, 说明通过调控 E2F 的转录活性下调 op18 基因表达, 进而抑制肿瘤细胞的生长并促进细胞凋亡. 尽管目前 E2F 转录因子与肿瘤发生机制的确切关系还不十分清楚, 但可以肯定的是, E2F 转录因子对细胞周期调控起着重要作用. 肿瘤细胞恶性表型多与控制细胞增殖及凋亡的信号网络中某一环节的失调密切相关, E2F 转录因子活性的改变参与了上述过程.

虽然各种与 E2F 转录因子相关的肿瘤基因治疗有着很大的临床应用和开发潜力,但是转录因子 E2F 在正常细胞生命周期中也发挥重要作用,所以,针对 E2F 活性的基因治疗手段有可能对正常组织产生副作用, E2F 作为生物治疗靶点应用于肿瘤基因治疗仍需要进一步的理论和实验研究。

【参考文献】

- [1] Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR, et al. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation[J]. Cell, 1986, 45: 219-228.
- [2] Nevins JR. The Rb/ E2F pathway and cancer[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 699-703.
- [3] Crowe DL, Nguyen DC. Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells[J]. Biochem Biophys Acta, 2001, 1518(122): 1-6.

- [4] Kuhn H, Liebers U, Gessner C, et al. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer in nonsmall-cell lung cancer induces cell growth arrest and apoptosis[J]. Eur Respir J, 2002, 20(3): 703-709.
- [5] 吴冰, 张立潮, 张惠中. Stathmin 蛋白的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(1): 71-73.
- [6] Polzin RG, Benlhabib H, Trepel J, et al. E2F sites in the Op18 promoter are required for high level of expression in the human prostate carcinoma cell line PC-3-M[J]. Gene, 2004, 341: 209-218.
- [7] Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y. Novel E2F decoy oligodeoxynucleotides inhibit in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and in vivo neointimal hyperplasia[J]. Gene Ther, 2002, 9(24): 1682-1692.
- [8] Lim CS, Jabrane-Ferrat N, Fontes JD, et al. Sequence-independent inhibition of RNA transcription by DNA dumbbells and other decoys[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(3): 575-581.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)12-1118-01

刺五加注射液治疗围绝经期失眠症 64 例疗效观察

张改芝 (西安运动创伤医院 陕西 西安 710068)

【关键词】刺五加注射液 围绝经期失眠症 总黄酮

【中图分类号】R271.116 【文献标识码】B

0 引言 围绝经期是每个妇女生命过程中必然的生理过程。国外流行病学资料表明,33%~51%的围绝经期妇女存在睡眠障碍^[1-2],直接影响到患者正常的生活和工作质量。我们使用刺五加注射液治疗失眠症,为探讨该药对围绝经期失眠症的治疗效果提供依据。

1 临床资料 收集我院门诊及住院应用刺五加注射液治疗的围绝经期失眠症患者 64 例,年龄 46~59 平均(49.8±1)岁。其中未绝经者 46 例,绝经者 18 例。病程 35 d~3 a。随机分为治疗组和对照组,每组 32 例。患者在年龄、病情、病程等方面无明显差异。治疗组给予刺五加注射液 40~60 mL 加入 50 g/L 葡萄糖注射液(糖尿病患者改用生理盐水)250 mL 中静滴,1 次/d,10 d 为一个疗程。对照组给予谷维素片口服 20 mg,3 次/d,晚间睡前 0.5 h 口服安定片 5 mg,1 次/d,严重者给予阿普唑仑片 0.8 mg,1 次/d,伴有其他疾病的患者给予相应的对症治疗。疗效判定标准:采用国际统一睡眠效率值公式:睡眠率(%)=实际入睡时间/上床至起床总时间×100%。①痊愈:症状消失、睡眠正常,睡眠率 75%以上;②

显效:症状明显缓解,睡眠率 65%以上;③有效:症状改善,睡眠率 55%以上;④无效:症状不缓解,睡眠率 40%以下,依靠服用安眠药入睡。经过一个疗程的治疗,两组疗效比较,治疗组痊愈 19 例(59.4%),显效 9 例(28.1%),有效 3 例(9.4%),无效 1 例(3.1%),总有效率为 97%;对照组痊愈 4 例(12.5%),显效 8 例(25.0%),有效 6 例(13.75%),无效 14 例(43.75%),总有效率为 56.25%。两组组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2 讨论 现代医学认为围绝经期是由于卵巢功能衰退,雌性激素分泌逐渐减少,水平降低,致使应激反映增强,从而影响睡眠质量^[3]。刺五加注射液系由刺五加的茎、叶制成的灭菌水溶液,其主要成分为总黄酮、异嗪皮丁、丁香甙、刺五加多甙等^[4]。总黄酮是一类植物雌激素,其作用可能与大豆异黄酮相似,能够起到调节内分泌功能和免疫功能,发挥镇静、催眠、抑制自发活动、抗疲劳等作用。大豆异黄酮尤其是在改善潮热出汗和失眠上的作用更为突出。我们的结果显示,应用刺五加注射液治疗围绝经期失眠症效果显著,而且无依赖性,戒断症状和副作用。价廉易得,应用简便,值得临床推广。

【参考文献】

- [1] Bromberger JT, Cordal A, Kravitz HM, et al. Psychological distress and natural menopause: A multiethnic community study[J]. Am J Public Health, 2001, 91(9): 1435-1442.
- [2] Hsu HC, Lin MH. Exploring quality of sleep and its related factors among menopausal women[J]. J Nurs Res, 2005, 13(2): 153-163.
- [3] 卢男, 卢冰, 谈勇. 围绝经期睡眠障碍与心肾失济[J]. 四川中医, 2006, 24(1): 31.
- [4] 范丽静, 蒋晓江, 姚国恩, 等. 刺五加注射液对 80 例脑梗死患者神经功能缺损及睡眠的改善作用[J]. 中国临床康复, 2003, 7(5): 865.

编辑 杨湘华

收稿日期 2007-04-18; 接受日期 2007-05-16

作者简介:张改芝,副主任药师。Tel:(029)88409120 Email:zgz.0203@163.com