

反义 IGF-I 寡核苷酸转染对人肝癌细胞生长的抑制作用

王季堃, 乔世峰

王季堃, 辽宁省锦州医学院附属第一医院肿瘤诊治中心
辽宁省锦州市 121000
乔世峰, 北京市铁路总医院普外科 北京市 100038
辽宁省教委项目, No. 200071172
项目负责人: 王季堃, 121000, 辽宁省锦州市人民街5段2号, 锦州医学院
附属第一医院肿瘤科. wangjik@sohu.com
电话: 0416-8999766
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 利用反义核酸技术, 研究体外胰岛素样生长因子-I (IGF-I)反义寡核苷酸转染对肝癌细胞增生、分化及凋亡的影响, 探讨寡核苷酸转染治疗肝癌的可行性。

方法: 合成针对IGF-I的寡核苷酸片段, 利用脂质体包裹反义IGF-I寡核苷酸片段瞬时转染人肝癌细胞系BEL-7402细胞, MTT法检测细胞增生; 放免法检测培养细胞上清中AFP, CEA的分泌量; 免疫组化法检测转染细胞AFP, PCNA表达的变化; 采用末端标记(Tunel)法检测细胞凋亡的变化。

结果: MTT法检测转染反义IGF-I寡核苷酸的人肝癌细胞系BEL-7402 A值由 0.44 ± 0.09 下降为 0.30 ± 0.07 ($P < 0.01$), 上清液AFP和CEA水平分别由 $12.5 \pm 2.2 \mu\text{g/L}$ 和 $6.8 \pm 2.3 \mu\text{g/L}$ 下降为 $2.5 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$ 和 $2.2 \pm 1.5 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 凋亡阳性细胞数由 $16.4 \pm 2.3\%$ 增加至 $23.1 \pm 3.7\%$ ($P < 0.05$)。

结论: 反义IGF-I寡核苷酸转染人肝癌细胞系BEL-7402细胞可以降低细胞增生, 减少细胞去分化并诱导肝癌细胞凋亡。

王季堃, 乔世峰. 反义 IGF-I 寡核苷酸转染对人肝癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1962-1964
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1962.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子-I (Insulin like growth factor I, IGF-I)是一种多效的生长因子, 在肿瘤的生长、分化和转移过程中起重要作用^[1]. 肿瘤细胞通过自分泌方式过度产生IGF-I, 激活IGF-I受体, 使自身不断生长, 因此IGF-I成为反义核酸治疗的良好靶分子. 利用反义寡核苷酸(ASON)技术人工合成IGF-I寡核苷酸片段, 脂质体包裹并转染人肝癌细胞系BEL-7402细胞, 可以通过特异性结合靶基因, 干扰基因的复制、转录和翻译过程. 抑制肿瘤细胞IGF-I的过度表达, 观察转染细胞增生、分化及凋亡的变化, 进而为IGF-I反义核苷酸治疗肝癌细胞提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株BEL-7402(购自北京市肿瘤防治研究所); 脂质体Lipofectin及RPMI1640培养基(美国GIBCO公司); 正、反义IGF-I寡核苷酸片段(上海博亚生物技术有限公司合成); AFP检测试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司); CEA检测试剂盒(天津市千叶生物技术有限公司); AFP, PCNA免疫组化试剂盒(北京市中山生物技术有限公司); Tunel凋亡检测试剂盒(美国Promega公司)。

1.2 方法 反义IGF-I寡核苷酸的合成根据IGF-I cDNA序列, 按编码人IGF-I第11到第20氨基酸编码序列设计反义IGF-I寡核苷酸, 两端硫代修饰以增强其稳定性, 并以正义寡核苷酸作为对照. Antisense 5' TCC ACA CAC GAA CTG AAG AGC ATC CAC CAG 3' Sense 5' CTG GTG GAT GCT CTT CAG TTC GTG TGT GGA 3'. BEL-7402细胞经消化后计数, 以 1.5×10^8 个/L接种96孔板, 每孔200 μL , 100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养基, 50 mL/L CO₂, 37 °C孵箱中培养12 h. 培养细胞分为4组: (1)脂质体包裹反义IGF-I寡核苷酸链组(反义IGF-I+LP组); (2)脂质体包裹正义IGF-I寡核苷酸链组(正义IGF-I+LP组); (3)单纯脂质体组(LP组); (4)空白对照组: 无血清RPMI1640组, 每组设3个平行孔. 按产品说明书进行脂质体包裹寡核苷酸片段及瞬时转染, 改为普通培养基培养12h后进行各指标检测. (1) MTT法检测活细胞群体总数培养细胞加入MTT(5 g/L) 50 μL /孔, 继续孵育4 h, 加入DMSO 100 μL /孔, 轻摇10 min后检测波长490 nm的吸光度. (2)放射免疫法测定培养细胞上清中AFP、CEA含量按试剂盒方法进行, FT-6B γ 计数器测量放射计数率. (3)培养细胞经甲醇丙酮(1:1)固定5-7 min, 0.5 g/L Tween-20/PBS洗后, 10 g/L BSA/PBS 37 °C封闭1 h, 加AFP/PCNA单抗作为一抗, 室温孵育1 h, PBS洗3次, 加生物素标记羊抗小鼠IgG(1:300)37 °C室温孵育1 h, PBS洗3次, 加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素37 °C 40 min, DAB显色. (4)原位末端标记DNA片段(TUNEL)检测细胞凋亡按说明书进行。

统计学处理 结果均以mean \pm SD表示, 不同组别的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 活细胞群体总数 脂质体包裹反义IGF-I寡核苷酸链转染组细胞增生明显受到抑制, 与其他组相比较有显著性差异($P < 0.01$), 其他组间比较无显著性差异($P > 0.05$)(图1)。

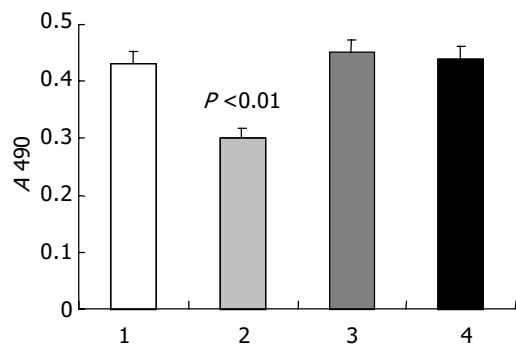


图1 MTT法检测 IGF-1 转染 BEL-7402 细胞增生的变化. 1: 脂质体包裹正义 IGF-1 寡核苷酸链组; 2: 脂质体包裹反义 IGF-1 寡核苷酸链组; 3: 单纯脂质体组; 4: 空白对照组.

2.2 培养细胞上清液 AFP 和 CEA 水平 反义 IGF-1+LP 组 AFP 变化差异有显著性意义($P < 0.01$), CEA 变化差异有显著性意义($P < 0.05$), 正义 IGF-1+LP 组, LP 组 AFP 及 CEA 变化差异无显著性意义($P > 0.05$)(表 1).

表 1 反义 IGF-1 寡核苷酸对肝癌细胞分泌 AFP 和 CEA 的影响(mean \pm SD μ g/L)

分组	AFP	CEA
反义 IGF-1+LP	2.5 \pm 0.3 ^b	2.2 \pm 1.5 ^a
正义 IGF-1+LP	10.3 \pm 1.2	5.4 \pm 1.3
LP	13.2 \pm 2.1	5.8 \pm 1.5
空白对照	12.5 \pm 2.2	6.8 \pm 2.3

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 空白对照组.

2.3 细胞化学检测结果 人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞与 AFP 及 PCNA 单抗染色均有反应, 阳性细胞染色为棕色, AFP 染色部位在细胞质, PCNA 染色部位在细胞核; 同一反应条件下反义 IGF-1+LP 组的 AFP 及 PCNA 染色与其他组比较显色明显减弱.

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 转染细胞培养后原位末端标记法观察细胞凋亡现象, 细胞核呈棕褐色着染者即为凋亡细胞, 反义 IGF-1+LP 组阳性细胞为 23.1 \pm 3.7%, 正义 IGF-1+LP 组为 17.4 \pm 3.5%, LP 组为 15.9 \pm 2.7%, 空白对照组为 16.4 \pm 2.3%, 反义 IGF-1+LP 组与其他组比较凋亡细胞明显增多($P < 0.05$).

3 讨论

反义寡核苷酸(ASON)技术是根据碱基互补原则通过人工合成一段与靶基因及其 mRNA 互补的寡核苷酸片段, 与相应靶基因或 mRNA 特异性结合, 干扰基因的复制、转录和翻译过程, 从而达到削弱或抑制该基因功能的目的^[2]. 胰岛素样生长因子 -I(IGF-I) 是许多肿瘤细胞赖以生长的细胞因子, 实验表明多种肿瘤细胞 IGF-I 异常表达, 在肿瘤的发生、发展中起重要作用, 它具有促进细胞有丝分裂、维持肿瘤细胞恶性转化和逃逸凋亡作用^[3-4]. 肿瘤细胞通过自分泌方式过度产生 IGF-

I, 从而激活 IGF-I 受体, 而使自身不断生长, 因此 IGF-I 成为反义核酸治疗的良好靶分子. 本结果表明, 抑制 IGF-I 的表达可以抑制肝癌细胞的增生, 并与肝癌细胞的分化相关. AFP 和 CEA 是与肝癌细胞生长相关的肿瘤标记物^[5-6], 可以作为反义 IGF-I 寡核苷酸转染后肿瘤细胞生物学变化的指标, 评价其对肿瘤细胞的影响. 我们通过 IGF-I 反义寡核苷酸转染肝癌细胞后, 肿瘤细胞分泌 AFP 及 CEA 水平明显降低, 分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$, 表明 IGF-I 与肝癌细胞的恶性程度相关, 反义 IGF-I 基因可能通过调控这两种肿瘤标记物的分泌而在改变肿瘤恶性程度中起到一定的作用.

肿瘤组织中 PCNA 阳性细胞数可反映肿瘤组织增生的速度, 因此 PCNA 成为研究肿瘤细胞分裂增生的有利工具^[7]. 本实验中反义 IGF-I 寡核苷酸转染的肝癌细胞 PCNA 染色强度明显低于其他组, 进一步证明 IGF-I 基因与肝癌细胞的增生相关. 一般认为肿瘤细胞分化程度越低, 增生力越强, 恶性程度越高, 其 PCNA 表达越强^[8-9], 我们认为肝癌细胞中 IGF-I 的高表达导致 PCNA 的表达改变, AFP 及 CEA 作为肝细胞癌分化水平的指标, 可以说明 IGF-I 基因不仅与细胞增生相关, 也与细胞的分化程度相关. 反义 IGF-I 寡核苷酸的封闭可能是靶细胞分泌 CEA 和 AFP 减少的原因, 确切机制尚待进一步的研究. 肿瘤细胞凋亡说明机体可通过自主地清除恶变的或可能恶变的细胞来对抗肿瘤的发生和发展^[10]. 我们发现, 应用反义 IGF-I 寡核苷酸转染可以使凋亡的阳性细胞数量增加, 诱导肝癌细胞凋亡. 细胞凋亡对肿瘤起着负调控作用, 肿瘤的发生发展不仅是由于细胞增生速率升高, 而且与细胞死亡速率下降有关. 本实验中凋亡阳性细胞的 CEA 和 AFP 分泌降低, 表明肝癌细胞凋亡阳性率与肿瘤分化程度有密切关系.

4 参考文献

- Shen WH, Yin Y, Broussard SR, McCusker RH, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Tumor necrosis factor alpha inhibits cyclin A expression and retinoblastoma hyperphosphorylation triggered by insulin-like growth factor-I induction of new E2F-1 synthesis. *J Biol Chem* 2004;279:7438-7446
- Gleave M, Nelson C, Chi K. Antisense targets to enhance hormone and cytotoxic therapies in advanced prostate cancer. *Curr Drug Targets* 2003;4:209-221
- Price JA, Kovach SJ, Johnson T, Koniaris LG, Cahill PA, Sitzmann JV, McKillop IH. Insulin-like growth factor I is a comitogen for hepatocyte growth factor in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;36:1089-1097
- Ellouk-Achard S, Djenabi S, De Oliveira GA, Desauty G, Duc HT, Zohair M, Trojan J, Claude JR, Sarasin A, Lafarge-Frayssinet C. Induction of apoptosis in rat hepatocarcinoma cells by expression of IGF-I antisense c-DNA. *J Hepatol* 1998;29:807-818
- Kato M, Shinozawa T, Kato S, Terada T. Aberrant expression of a fetal glycoprotein 68 in hepatocellular carcinoma: a comparative study on the expression of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen. *Histol Histopathol* 2004;19:701-706
- Torzilli G, Makuuchi M, Ferrero A, Takayama T, Hui AM, Abe H, Inoue K, Nakahara K. Accuracy of the preoperative determination of tumor markers in the differentiation of liver mass lesions in surgical patients. *Hepatogastroenterology* 2002;49:740-745

- 7 Sever-Chroneos Z, Angus SP, Fribourg AF, Wan H, Todorov I, Knudsen KE, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor protein signals through inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity to disrupt PCNA function in S phase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4032-4045
- 8 Usnarska-Zubkiewicz L, Maryniak R, Podolak-Dawidziak M, Wozniak Z, Jelen M, Ramlau R, Poreba M, Kuliczowski K. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and of nucleolar organizer regions (AgNORs) correlates with the morphological type of bone marrow plasma cells in multiple myeloma (MM). *Pol Arch Med Wewn* 2003;109:257-263
- 9 Tong Q, Zeng F, Lin C, Zhao J, Lu G. Growth inhibiting effects of antisense eukaryotic expression vector of proliferating cell nuclear antigen gene on human bladder cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1203-1206
- 10 Tabs S, Avci O. Induction of the differentiation and apoptosis of tumor cells in vivo with efficiency and selectivity. *Eur J Dermatol* 2004;14:96-102

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

FHIT 基因蛋白表达与结直肠癌及癌前期病变的临床关系

任建林, 施华秀, 王琳, 洪东旭, 陈建民, 刘明, 叶震世, 董菁, 卢雅丕, 林辉, 潘金水, 林逊汀

任建林, 施华秀, 王琳, 洪东旭, 陈建民, 刘明, 叶震世, 董菁, 卢雅丕, 林辉, 潘金水, 林逊汀, 厦门大学中山医院消化内科 福建省厦门市 361004
项目负责人: 任建林, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学中山医院消化内科.
jianlinr@msn.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2004-04-22 接受日期: 2004-05-09

任建林, 施华秀, 王琳, 洪东旭, 陈建民, 刘明, 叶震世, 董菁, 卢雅丕, 林辉, 潘金水, 林逊汀. FHIT 基因蛋白表达与结直肠癌及癌前期病变的临床关系. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1964-1966
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1964.asp>

摘要

目的: 探讨脆性组氨酸三联体(fragile histidine trail, FHIT)蛋白在 45 例结直肠癌、36 例结直肠腺瘤和 23 例正常对照组中的表达情况。

方法: 标本经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 采用免疫组化 SP 法检测 FHIT 在结直肠癌、结直肠腺瘤和正常对照组中的表达。

结果: 在 45 例结直肠癌中 28 例 FHIT 蛋白表达显著减少或缺失, 5 例表达减弱, 12 例表达阳性; 其中结直肠癌 Dukes A、B 和 C 期 FHIT 蛋白表达阴性比例分别为 6/11, 5/12 和 17/22。在 36 例结直肠腺瘤中 7 例 FHIT 蛋白表达显著减少或缺失, 4 例表达减弱, 25 例表达阳性; 其中结直肠腺瘤伴轻、中和重度不典型增生 FHIT 蛋白表达阴性比例分别为 2/16, 1/7 和 4/13。FHIT 蛋白阴性表达在结直肠癌和正常对照组(62.2% vs 4.4%, $\chi^2=25.33$, $P<0.01$)、结直肠癌和结直肠腺瘤(62.2% vs 19.4%, $\chi^2=14.19$, $P<0.01$)、结直肠癌未伴淋巴转移的 Dukes A+B 期和已伴淋巴转移的 C 期(47.8% vs 77.3%, $\chi^2=4.28$, $P<0.05$)间均有显著性差异, 而在结直肠腺瘤伴轻度不典型增生和中和、重度不典型增生(12.5% vs 25.0%, $\chi^2=0.84$, $P>0.25$)、结直肠腺瘤和正常对照组(19.4% vs 4.4%, $\chi^2=3.51$, $P>0.05$)中无显著性差异。

结论: FHIT 蛋白在结直肠癌中呈低表达或缺失, 且 FHIT 低表达与转移状况有相关关系, 提示该基因可能与结直肠癌的发生发展有关。

0 引言

FHIT 基因最近在国外成功分离并定位于染色体 3p14.2, 该基因具有不稳定性^[1-2], 在多种肿瘤中, 包括食管癌^[3]、胃癌^[4]、结肠癌^[5-7]、肺癌^[8-9]、肝癌^[10]、头颈癌^[11]、乳腺癌^[12]、胰腺癌^[13]和肾癌^[14]中, 均有改变, 以缺失为主, 包括外显子和/或内含子的缺失, 还有外源序列的插入^[15]。国外已有少量有关结直肠癌中 FHIT 基因或表达异常的报道, 对其在结直肠癌发生和发展中的作用尚有争议。我们采用免疫组化 SP 法检测结直肠癌和结直肠腺瘤中 FHIT 蛋白表达情况, 探讨 FHIT 基因与结直肠癌和结直肠腺瘤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 厦门大学医学院第一临床学院病理科 2003-01/2003-10 存档石蜡块, 男 43 例, 女 61 例, 年龄 16-80(平均 59.5 岁)。其中结直肠癌 45 例, 结直肠腺瘤 36 例和正常对照组 23 例。结直肠癌 Dukes A 期 11 例, B 期 12 例和 C 期 22 例。FHIT 抗体为 Santacruz 公司产品, 购自北京中山生物工程公司。

1.2 方法 所有标本均经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 切片, 切片脱蜡至水, 在 30 mL/L 过氧化氢-甲醇中浸泡 10 min 以灭活内源性过氧化氢酶, 采用枸橼酸-微波-SP 法在 10 mmol/L 枸橼酸(pH 6.0)中煮沸 5 min, 保温 10 min, 100 mL/L 羊血清封闭。加入兔抗人多克隆 FHIT 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 免疫组化染色按 SP 试剂盒推荐方法进行。观察 FHIT 蛋白的分布、阳性强度和阳性率。参照文献标准^[16], 先按染色强度评分: