

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.011

· 基础研究 ·

乙酰肝素酶反义寡核苷酸对肺癌 A549 细胞黏附、侵袭和凋亡的影响

陈志涛¹, 李晓华¹, 田辉², 朱良明¹, 尹立国¹, 刘海波¹ (1. 山东大学附属济南市中心医院 胸外科, 山东 济南 250013; 2. 山东大学 齐鲁医院 胸外科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 探讨乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE) 反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, ASODN) 对人肺癌 A549 细胞黏附、侵袭和凋亡的影响。方法: 设计并合成 HPSE 特异性 ASODN (HPSE-ASODN), 脂质体介导转染 A549 细胞。Western blotting 检测 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达。黏附实验和侵袭实验检测 HPSE-ASODN 对 A549 细胞黏附和侵袭的影响, Hoechst 3222 染色法检测 HPSE-ASODN 对 A549 细胞凋亡的影响。结果: 与对照组和脂质体组相比, HPSE-ASODN 转染下调 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达, 且显著抑制 A549 细胞的黏附和侵袭 ($P < 0.01$); HPSE-ASODN 转染可诱导 A549 细胞凋亡, 凋亡率明显高于未转染组和脂质体组 ($44.7 \pm 18.9\%$ vs $1.2 \pm 3.3\%$ 、 $5.8 \pm 20.1\%$, $P < 0.01$)。结论: HPSE-ASODN 能下调肺癌 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达, 抑制 A549 细胞的黏附和侵袭, 诱导其凋亡。

[关键词] 肺肿瘤; 乙酰肝素酶; 反义寡核苷酸; 黏附; 侵袭; 凋亡; 基因治疗

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0400-04

Effect of heparanase antisense oligodeoxynucleotide on adhesion, invasion and apoptosis of lung cancer A549 cells

CHEN Zhi-tao¹, LI Xiao-hua¹, TIAN Hui², ZHU Liang-ming¹, YIN Li-guo¹, LIU Hai-bo¹ (1. Department of Thoracic Surgery, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250013, Shandong, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of heparanase antisense oligodeoxynucleotide (HPSE-ASODN) on adhesion, invasion and apoptosis of human lung cancer A549 cells. **Methods:** HPSE specific ASODN was designed, synthesized, and transfected into A549 cells by lipofectin assay. HPSE protein expression was detected by Western blotting analysis in A549 cells, and the effects of HPSE-ASODN on adhesion and invasion of A549 cells were measured by adhesion and invasion assays, respectively. Hoechst 3222 staining was used to detect the effect of HPSE-ASODN on apoptosis of A549 cells. **Results:** Compared with control and lipofectin, HPSE-ASODN transfection inhibited HPSE protein expression, adhesion and invasion of A549 cells ($P < 0.01$). HPSE-ASODN transfection induced apoptosis of A549 cells, with the apoptotic rate being significantly higher than those in the control and lipofectin groups ($44.7 \pm 18.9\%$ vs $1.2 \pm 3.3\%$, $5.8 \pm 20.1\%$, $P < 0.01$). **Conclusion:** HPSE-ASODN can inhibit HPSE protein expression, adhesion and invasion in lung cancer A549 cells; it can also induce the apoptosis of lung cancer A549 cells.

[Key words] lung neoplasms; heparanase; antisense oligodeoxynucleotide; adhesion; invasion; apoptosis; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 400-403]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30571844); 山东省自然科学基金资助项目 (No. 2009ZRB14005)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. 2009ZRB14005)

[作者简介] 陈志涛 (1978 -), 男, 山东省昌乐市人, 博士生, 主要从事肺癌基因治疗方面的研究。E-mail: weihaichina@163.com

[通信作者] 田辉 (TIAN Hui, corresponding author), E-mail: tianhuiy@sohu.com

乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE) 是迄今为止发现的唯一能够降解细胞外基质和基底膜中硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 的酶, 对于肿瘤细胞的侵袭和转移具有重要作用^[1-2]。HPSE 在多种恶性肿瘤中均高表达, 已成为抗肿瘤侵袭、转移研究的新靶点^[3-6]。肺癌的传统治疗方法包括手术、放疗和化疗, 由于肺癌早期诊断较为困难, 确诊时约 80% 的患者已失去手术机会, 且目前放、化疗有效率低, 毒性作用大, 发展新的治疗策略和方法已成为肺癌临床治疗的迫切需求^[7]。反义核酸技术是近年来新发展起来的一项生物技术, 根据碱基互补的原理, 特异性抑制靶基因的表达。针对 HPSE 基因的肿瘤反义核酸治疗可抑制肿瘤的生长和转移, 显示出诱人前景^[8-11]。为探讨以 HPSE 为靶标进行肿瘤反义基因治疗的可行性, 本研究采用 HPSE 反义寡核苷酸 (HPSE antisense oligodeoxynucleotide, HPSE-ASODN) 转染人肺癌 A549 细胞, 观察其对 A549 细胞黏附、侵袭和凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人肺癌细胞株 A549 购自中科院上海细胞所, 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中。根据 HPSE 基因序列 (GenBank accession number: AF155510) 设计互补于 HPSE mRNA 起始密码区的 ASODN 序列, 其序列为 5'-GGCTTCGAGCGCAG-CAGCA1-3', 由上海生工生物工程公司合成、纯化, 并行硫代磷酸化修饰, 同时以 FITC 标记 HPSE-ASODN 末端碱基。

1.2 HPSE-ASODN 转染 A549 细胞

采用阳离子脂质体 Lipofectin 介导转染 HPSE-ASODN。将 A549 细胞接种于 6 孔板, 培养至约 70% 覆盖率, 以温热无血清 RPMI 1640 漂洗细胞 2 次。将 HPSE-ASODN 溶于 100 μ l 无血清 RPMI 1640 中, 另取 10 μ l Lipofectin 溶于 90 μ l 预暖的无血清 RPMI 1640 中, 分别置室温 30 min 后将两者轻柔混合, 室温孵育 15 min。以 800 μ l 无血清 RPMI 1640 稀释 Lipofectin-HPSE-ASODN 后, 轻铺于 A549 细胞上, 不加抗生素, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱孵育 6 h。

1.3 黏附实验检测 HPSE-ASODN 对 A549 细胞黏附的影响

实验分为未转染对照组、脂质体组 (仅加脂质体, 不加 HPSE-ASODN) 和 HPSE-ASODN 组 (转染时加脂质体和 HPSE-ASODN)。将 96 孔板用 Matrigel 5 μ g 包被, 2% BSA 封板处理。每孔加入 5×10^4 个不同预处理的 A549 细胞, 分别于 30、60、90、120 min

各时间点弃去培养液, PBS 冲洗除去未黏附的细胞。每孔加 MTT 20 μ l, 以及无血清 RPMI 1640 200 μ l, 孵育 4 h; 吸弃上清液, 加 DMSO 200 μ l 振荡 10 min, 自动酶标仪 570 nm 测各孔光密度值 (D)。细胞黏附率 (%) = (实验组 D_{570} / 对照组 D_{570}) \times 100%。每组设 6 个复孔, 实验重复 3 次。

1.4 侵袭实验检测 HPSE-ASODN 对 A549 细胞侵袭力的影响

采用 BD 公司 24 孔基质凝胶小室, 上下室间滤膜孔径为 8 μ m, 滤膜的上室面覆有细胞外基质凝胶。取转染后继续培养 24 h 的 A549 细胞, 以无血清 RPMI 1640 制成 2×10^5 / ml 单细胞悬液, 取 200 μ l 移入上室内, 下室内加入 500 μ l 含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640, 孵育 48 h 后取出, 以棉签小心刮除滤膜上室面的细胞, 侵袭到下室面的细胞以甲醛固定 (H-E 染色), 在 400 倍光镜下随机取 6 个视野计数细胞数, 以其均值表示侵袭细胞数。

1.5 Western blotting 检测 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达

收集各组 1×10^6 A549 细胞, PBS 漂洗, 加入预冷裂解缓冲液, 冰浴 20 min, 离心 (11 180 $\times g$), 取上清进行蛋白定量。以 40 μ l (64 μ g) 每道上样, 10% SDS-PAGE 分离, 转移至 NC 膜, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 加入 1:250 稀释的兔抗人 HPSE 多克隆抗体, 室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (1:2 000) 孵育 2 h。TBST 洗 3 次, 加 ECL 化学发光剂, X 线片暗室曝光, 常规显影、定影。将胶片用凝胶成像仪扫描, 用 Quantity One 4.0 软件分析。

1.6 Hoechst 3222 凋亡检测试剂盒检测 HPSE-ASODN 对 A549 细胞凋亡的影响

操作过程按照 Hoechst 3222 凋亡检测试剂盒说明书进行。在激光共聚焦显微镜下观测胞核变化, 激发波长 346 nm, 发射波长 460 nm。分别取 5 个高倍镜视野, 计数凋亡细胞数, 取平均值, 计算凋亡率。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS Version 13.0 软件包, 两样本间均数比较行独立样本 t 检验, 多个样本间比较行单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPSE-ASODN 转染下调 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达

实验结果 (图 1) 显示, 与未转染组和脂质体组

组相比,HPSE-ASODN 组 A549 细胞中 HPSE 蛋白表达水平明显下降(0.14 ± 0.01 vs 0.49 ± 0.03 、 0.47 ± 0.01 , $P < 0.01$),而未转染组和脂质体组之间比较无差异($P > 0.05$)。

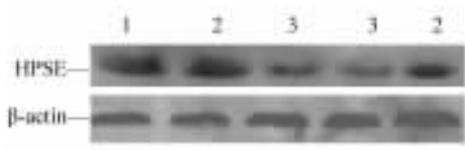


图1 HPSE-ASODN 转染下调 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达

Fig.1 HPSE-ASODN transfection inhibited HPSE protein expression in A549 cells

1: Control; 2: Lipofect; 3: HPSE-ASODN

2.2 HPSE-ASODN 转染抑制 A549 细胞的黏附

黏附实验结果显示,随着时间的延长,HPSE-ASODN 转染组 A549 细胞的黏附能力增加;各不同时间点 HPSE-ASODN 组 A549 细胞黏附率较未转染

组和脂质体组均明显降低($P < 0.01$),而未转染组和脂质体组间无差异($P > 0.05$,表 1)。

2.3 HPSE-ASODN 转染抑制 A549 细胞的侵袭

侵袭实验结果(图 2)显示,48 h 时 HPSE-ASODN 转染组 A549 细胞侵袭数明显少于未转染组和脂质体组(58.6 ± 9.2 vs 132.5 ± 15.6 、 129.7 ± 16.1 , $P < 0.01$),未转染组和脂质体组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。由此表明,HPSE-ASODN 抑制 A549 细胞的体外侵袭能力。

2.4 HPSE-ASODN 转染促进 A549 细胞的凋亡

转染 48 h,HPSE-ASODN 组部分 A549 细胞已经呈现了细胞凋亡的特征,染色质致密浓染呈粗大的颗粒状、边集,或整个核呈辐轮状;有些细胞已有凋亡小体出现(图 3)。HPSE-ASODN 转染组 A549 细胞的凋亡率为(44.7 ± 18.9)%,明显高于未转染组的(1.2 ± 3.3)%和脂质体组的(5.8 ± 20.1)%(均 $P < 0.01$)。结果说明,HPSE-ASODN 转染可促进 A549 细胞的凋亡。

表 1 HPSE-ASODN 转染抑制 A549 细胞的黏附

Tab.1 HPSE-ASODN transfection inhibited adhesion of A549 cells

Group	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	0.33 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.95 ± 0.03
Lipofect	0.28 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.94 ± 0.02
HPSE-ASODN	$0.14 \pm 0.01^{**}$	$0.28 \pm 0.02^{**}$	$0.43 \pm 0.02^{**}$	$0.67 \pm 0.01^{**}$

** $P < 0.01$ vs control or lipofect group



图2 HPSE-ASODN 转染抑制 A549 细胞的侵袭能力($\times 400$)

Fig.2 HPSE-ASODN transfection inhibited invasive ability of A549 cells($\times 400$)

A: Control; B: Lipofect; C: HPSE-ASODN

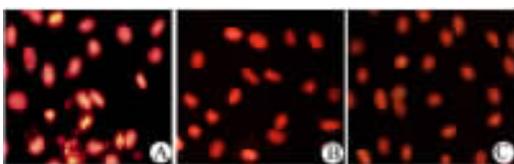


图3 HPSE-ASODN 转染促进 A549 细胞的凋亡($\times 400$)

Fig.3 HPSE-ASODN transfection promoted apoptosis of A549 cells($\times 400$)

A: HPSE-ASODN; B: Control; C: Lipofect

3 讨论

肺癌的发病率及病死率不仅在欧美国家位居首位,在我国也成为城市居民恶性肿瘤病死率的第一位。目前各种治疗方案的疗效均不够理想,发展新的治疗方法已迫在眉睫。随着分子生物学技术的不断提高,针对特异靶分子的基因治疗显示出良好前景。以 HPSE 基因为靶标进行的反义核苷酸治疗正成为近期的研究热点。肿瘤细胞侵袭、转移是肺癌患者治疗失败和死亡的主要原因。在这一过程中肿瘤细胞对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜(basement membrane, BM)的侵袭破坏以及新生血管的形成是两个关键步骤^[12-13]。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proglycan, HSPG)是 ECM 和 BM 的主要结构成分,由一个核心蛋白和数个与之共价连接的线性 HS 侧链组成。HS 侧链通过特殊的结合位点与 ECM 和 BM 结合,形成牢固的网状结构^[14-15]。

HPSE 是体内唯一降解 HSPG 的酶,在肺癌的侵袭和转移过程中发挥着重要作用,以 HPSE 基因为靶标的反义核苷酸治疗成为近期的研究热点。反义核苷酸通过碱基互补原理,与目的基因 mRNA 的特定序列特异性结合,形成 DNA-RNA 杂合双链,诱导内源性 RNA 降解酶对 mRNA 链进行水解,并通过空间位阻效应抑制 mRNA 剪切加工、转运和蛋白质的翻译,达到基因治疗的目的^[16-18]。

本研究针对 HPSE mRNA 的起始密码区设计合成 HPSE-ASODN,通过硫代磷酸化修饰增强其稳定性和抗酶解能力。HPSE-ASODN 可通过被动扩散和细胞膜受体介导的胞吞作用进入细胞,阳离子脂质体在一定比例内能中和 HPSE-ASODN 的负电荷,使 HPSE-ASODN 更易于通过细胞膜,提高转染效率。通过黏附实验和侵袭实验发现,HPSE-ASODN 可显著降低肺癌 A549 细胞的黏附和侵袭,同时 Western blotting 发现,HPSE-ASODN 转染能够明显降低 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达。国外许多研究^[9,19]已证明,抑制 HPSE 蛋白的活性和表达量,可减缓肿瘤细胞的生长和侵袭。以上结果表明,HPSE 参与肺癌 A549 细胞的黏附和侵袭,提示 HPSE 可能成为肿瘤反义基因治疗的靶点。

为探讨 HPSE-ASODN 抑制肿瘤作用的机制,本实验采用 Hoecht 3222 染色法观察 HPSE-ASODN 对 A549 细胞凋亡的影响。与未转染组细胞相比,HPSE-ASODN 转染的 A549 细胞出现较明显的凋亡。已有研究^[20]表明,HPSE-ASODN 能够上调凋亡诱导基因 P53 的表达,下调凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达,诱导细胞凋亡。因此,诱导 A549 细胞凋亡可能是 HPSE-ASODN 抑制肿瘤细胞生长的机制之一。

总之,HPSE-ASODN 能下调肺癌 A549 细胞中 HPSE 蛋白的表达,抑制 A549 细胞的黏附和侵袭,并诱导细胞凋亡,有望成为肺癌治疗的一种新方法,具有较好的临床应用前景。

[参 考 文 献]

[1] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: Genecloning, expression and function in tumor progression and metastasis [J]. Nat Med, 1999, 5(7): 793-802.

[2] 陈泓, 李力, 张玮, 等. 乙酰肝素酶对卵巢癌细胞侵袭和黏附的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(6): 639-643.

[3] Shafat I, Pode D, Peretz T, et al. Clinical significance of urine heparanase in bladder cancer progression [J]. Neoplasia, 2008,

10(2): 125-130.

- [4] Cohen E, Doweck I, Naroditsky I, et al. Heparanase is overexpressed in lung cancer and correlates inversely with patient survival [J]. Cancer, 2008, 113(5): 1004-1011.
- [5] Roy M, Marchetti D. Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(2): 200-209.
- [6] 田辉, 刘贤锡, 王善政. 肺癌组织中乙酰肝素酶与血管内皮生长因子-C 的表达 [J]. 中华外科杂志, 2004, 42(16): 976-979.
- [7] 韩宝惠. 肺癌分子靶向治疗的现状与挑战 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(2): 83-85.
- [8] Tamm I, Dörken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: New hope for an old idea [J]? Lancet, 2001, 358(9280): 489-497.
- [9] Roy M, Reiland J, Murry BP, et al. Antisense-mediated suppression of heparanase gene inhibits melanoma cell invasion [J]. Neoplasia, 2005, 7(3): 253-262.
- [10] Uno F, Fujiwara T, Takata Y, et al. Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells [J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7855-7860.
- [11] Science news staff. Break through of the year. The runners-up [J]. Science, 2009, 326(5960): 1600-1607.
- [12] Steeg PS. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges [J]. Nat Med, 2006, 12(8): 895-904.
- [13] Nyberg P, Salo T, Kalluri R. Tumor microenvironment and angiogenesis [J]. Front Biosci, 2008, 13(1): 6537-6553.
- [14] Paschos KA, Canovas D, Bird NC. Enzymatic function of multiple origins regulates the progression of colorectal cancer and the development of metastases [J]. Hippokratia, 2009, 13(1): 23-31.
- [15] Raman K, Kuberan B. Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans [J]. Curr Chem Biol, 2010, 4(1): 20-31.
- [16] 中华人民共和国科学技术部社会发展科技司. 2009 中国生物技术发展报告 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [17] 林静. 反义核酸技术及其应用 [J]. 黄石理工学院学报, 2010, 26(2): 46-48.
- [18] 毛建平. 基因治疗 20 年 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(9): 124-129.
- [19] Nasser NJ, Avivi A, Shafat I, et al. Alternatively spliced Spalax heparanase inhibits extracellular matrix degradation, tumor growth, and metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(7): 2253-2258.
- [20] 汪素文, 周世庆, 真岩波, 等. 乙酰肝素酶反义寡核苷酸诱导胃癌细胞凋亡的实验研究 [J]. 山东大学学报, 2005, 43(6): 520-524.

[收稿日期] 2011-04-15

[修回日期] 2011-06-10

[本文编辑] 王莹