

# Ki67 反义肽核酸、反义寡核酸对肾癌细胞系增殖及凋亡影响的研究

曹敬毅<sup>1</sup>, 郑骏年<sup>1\*</sup>, 孙晓青<sup>1</sup>, 陈家存<sup>1</sup>, 孙亚峰<sup>2</sup>, 温儒民<sup>1</sup>, 李望<sup>1</sup>, 刘俊杰<sup>1</sup>

Effects of Peptide Nucleic Acids Targeting Ki67 on the Proliferation and Apoptosis of Human Renal Carcinoma Cell Line

CAO Jing-yi<sup>1</sup>, ZHENG Jun-nian<sup>1\*</sup>, SUN Xiao-qing<sup>1</sup>, CHEN Jia-chun<sup>1</sup>, SUN Ya-feng<sup>2</sup>, WEN Ru-min<sup>1</sup>, LI Wang<sup>1</sup>, LIU Jun-jie<sup>1</sup>

1. Department of Urology, Affiliated hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 2. Research center for Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical college( \* Corresponding author)

**Abstract :Objective** To investigate the effects of peptide nucleic acid targeting Ki67 gene (PNAs) on the proliferation and apoptosis of human renal carcinoma cell line cells. **Methods** Human renal carcinoma cell line 786-0 cells were treated with PNAs (10.0 μmol/L). The Ki67 expression of 786-0 cells was detected by immunohistochemical technique and Western blot method respectively. The proliferation of 786-0 cells was studied by cell growth curves and <sup>3</sup>H-thymidine uptake assay. The apoptosis of 786-0 cells was detected by TUNEL assay. The control group was treated with antisense oligonucleotides (ASODNs) of Ki67. **Results** The Ki67 expression rate of 786-0 cells treated by PNAs (16.9 ± 0.7) was lower than that of ASODNs treated group (28.6 ± 0.4) ( $P < 0.01$ ). The Ki67 protein rate of 786-0 cells treated by PNAs (42.1 ± 2.2) was lower than that of ASODNs treated group (83.6 ± 1.4) ( $P < 0.01$ ). The <sup>3</sup>H-thymidine incorporation rates of 786-0 cells treated by PNAs (20.7 ± 1.5) was lower than that of ASODNs treated group (58.6 ± 1.4) ( $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of 786-0 cells treated by PNAs (28.7 ± 2.3) was higher than that of ASODNs treated group (13.8 ± 1.0) ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** PNAs have both antisense and antigene effects. PNAs of Ki67 have more powerful effects on the proliferation and apoptosis of human renal carcinoma cells than ASODNs of Ki67 gene.

**Key words**: Renal cell carcinoma; Ki67 gene; Peptide nucleic acids; Antisense oligonucleotides

**摘要**:目的 探讨肿瘤增殖相关基因 Ki67 反义肽核酸(PNAs)、反义寡核酸(ASODNs)对人肾癌细胞增殖及凋亡的调控。寻找肾癌反义治疗的合适药物。方法 将 PNAs 转染人肾癌 786-0 细胞系,采用免疫组化、Western blot 技术检测 Ki67 表达,细胞生长曲线、<sup>3</sup>H-thymidine 掺入试验检测肾癌细胞增殖, TUNEL 法检测癌细胞凋亡。并与相同浓度的 ASODNs 进行对比。结果 PNAs 处理组(10 μmol/L) 786-0 细胞 Ki67 表达阳性率(%) (16.9 ± 0.7)降低, Ki67 蛋白(%) (42.1 ± 2.2)降低,与 ASODNs 处理组(28.6 ± 0.4) (83.6 ± 1.4)比较差异有显著性( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。PNAs 处理组<sup>3</sup>H-thymidine 掺入率(%) (20.7 ± 1.5)减少,与 ASODNs 处理组(58.6 ± 1.4)比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。PNAs 处理组凋亡细胞阳性率(%) (28.7 ± 2.3)增加,与 ASODNs 处理组(13.8 ± 1.0)比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。结论 PNAs 可在反义及反基因二个环节发挥抗肿瘤作用,与 ASODNs 相比,PNAs 有更强的抑制人肾癌 Ki67 基因表达、增殖及促进凋亡作用,是一种有前途的基因治疗药物。

**关键词**:肾癌; Ki67 基因; 肽核酸; 反义寡核酸

中图分类号:R737.11 文献标识码: 文章编号:1000-8578(2005)06-0350-04

## 0 引言

为寻找肾癌基因反义治疗药物,将肿瘤增殖相关基因 Ki67 反义肽核酸、反义寡核酸导入人肾癌 786-0 细胞,对比研究其对肾癌细胞增殖及凋亡的

调控作用,报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肾癌透明细胞株 786-0 购自中科院上海细胞研究所。Ki67 免疫组化试剂盒, Ki67 一抗、二抗,原位末端凋亡检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司, <sup>3</sup>H-thymidine 购自中国原子能研究院,脂质体 Li-

收稿日期:2004-08-13;修回日期:2004-10-26

基金项目:江苏省卫生重大课题资助项目(H2000153);江苏省教育厅资助项目(02KJD320030)

作者单位:1. 221002 徐州医学院附属医院泌尿外科;2. 徐州医学院分子生物学实验室(\*为通讯作者)

pofectin AMINE 购自 GIBCO 公司。

1.2 Ki67 反义肽核酸、寡核酸合成及转染

根据 Ki67 cDNA197-214 位置的碱基序列,设计出阻断翻译起始端的反义肽核酸(PNAs)、反义寡核酸(ASODNs),经 BLAST 确认与 Ki67 以外的人类已知基因序列无同源性。以随机 PNAs 作对照。PNAs 由美国 TAG Copenhagen 公司合成。ASODNs 由北京奥科生物技术公司合成, HPLC 纯化。PNAs 序列: Gly-GCGTCTCGTGGGCCA-CAT-Lys, ASODNs 序列: 5'-GCGTCTCGTGGGC-CACA T-3, 随机 PNAs 序列: Gly-GAGCA T-TACGCGA TACGC-Lys。以 1μL 脂质体 Lipofectin AMINE 包装 1nmol PNAs(ASODNs)的比例将二者分别用不含血清的培养基稀释、混匀,室温放置 45 分钟,生成 PNAs(ASODNs)-脂质体复合物,待用。

1.3 细胞培养及实验分组

2 × 10<sup>5</sup>/mL 786-0 细胞于含 10% FCS 的 RPMI1640 中培养 24~48 小时,待细胞密度 > 90% 以上时,0.25% 胰酶消化计数接种到培养板或瓶内,然后分对照组(培养基 + 脂质体)、随机 PNAs 组(10.0 μmol/L)、ASODNs 组(10.0 μmol/L)、PNAs (1.0、2.0、10.0 μmol/L)组分别加入不同试剂。每组设 3 复孔。

1.4 Ki67 抗原检测

采用免疫组化方法。将 1.0 × 1.0cm 的玻片经防脱片处理后置入 24 孔培养板孔内,每孔接种 3 × 10<sup>4</sup>/mL 786-0 细胞悬液 0.5mL,培养 24 小时。按实验分组加入不同试剂继续培养 48 小时,取出玻片固定、洗片后,滴加 Ki67 一抗(鼠抗人),湿盒中过夜,加二抗(兔抗鼠),DAB 染色,并经复染。在高倍镜下随机计数 5 个视野,细胞核内含棕色颗粒为阳性细胞,计算所占百分比。

1.5 Ki67 蛋白检测

采用 Western blot 技术。1 × 10<sup>6</sup>/mL 786-0 细胞加入 6mL 培养瓶中培养 24 小时,按实验分组加入不同试剂继续培养 72 小时,收集细胞。采用快速制备法提取核蛋白<sup>[1]</sup>,经电泳、转膜后杂交,一抗为鼠抗人 Ki67 单抗,二抗为碱性磷酸酶标记的兔抗鼠多抗,以 NBT/BCIP 显色。结果以图象处理仪(Gene Company)分析处理。

1.6 细胞生长曲线测定

将 3 × 10<sup>4</sup>/mL 786-0 单细胞悬液 100μL 接种于 96 孔板,48 小时后更换培养液,按实验分组加入试剂,每隔 24 小时取 3 孔作细胞计数,取平均值绘出生长曲线。

1.7 细胞增殖活性检测

采用 <sup>3</sup>H-thymidine 掺入试验。将 3 × 10<sup>4</sup>/mL 786-0 单细胞悬液 1mL 接种于 24 孔培养板,按分组加入试剂培养 48 小时。每孔分别加入 <sup>3</sup>H-thymidine 18.5kbq,24 小时后收集细胞,并吸附于玻璃纤维纸上,烘干后加入闪烁液,液闪计数仪测 cpm 值,结果以掺入率 = 实验组 cpm/ 对照组 cpm × 100% 表示。

1.8 细胞凋亡检测

采用免疫组化 TUNEL 法。细胞处理同 1.4 所述,玻片固定后与通透液 Triton-100 共同孵育,然后滴加 TUNEL 反应混合液,在湿盒中 37℃ 孵化 1 小时,PBS 洗 3 次,DAB 染色,在高倍镜下随机计数 5 个视野,细胞核呈现黄褐色即为阳性,计算所占百分比。

1.9 统计学处理

States 统计软件处理,采用成组设计 t 检验。

2 结果

2.1 Ki67-PNAs 对人肾癌 786-0 细胞的 Ki67 表达的影响

浓度为 10μmol/L 的 PNAs 可显著抑制肾癌 786-0 细胞的 Ki67 表达阳性率及蛋白水平 (P < 0.01),且高浓度 PNAs 的抑制作用大于低浓度 PNAs (P < 0.01),而 10μmol/L ASODNs 与 1.0μmol/L PNAs 对 786-0 细胞的 Ki67 表达作用差异不显著 (P > 0.05),见表 1、图 1。

表 1 各处理组 786-0 细胞 Ki67 表达结果

组别	免疫组化	Western blot
	Ki67 阳性率 (%)	Ki67 蛋白量比 (%)
对照组	34.8 ± 1.6	100.0
随机 PNAs	33.2 ± 1.3	98.7 ± 0.3
ASODNs	28.6 ± 0.4 #	83.6 ± 1.4 #
PNAs(1.0 μmol/L)	28.1 ± 0.5 ∇#	81.9 ± 8.4 ∇#
PNAs(2.0 μmol/L)	23.5 ± 1.8 ∇	57.7 ± 5.0 ∇
PNAs(10.0 μmol/L)	16.9 ± 0.7 ∇	42.1 ± 2.2 ∇

注: 与对照组比较 P > 0.05; 与对照组比较 P < 0.01; # 二组之间比较 P > 0.05; ∇ 三组之间两两比较 P < 0.01

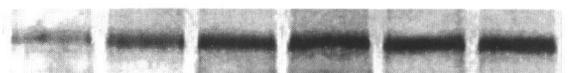


图 1 各处理组 786-0 细胞 Ki67 蛋白表达

2.2 Ki67-PNAs 对人肾癌 786-0 细胞生长曲线的影响

浓度为 10μmol/L 的 PNAs 可显著抑制肾癌

786-0 细胞生长,且高浓度 PNAs 的抑制作用大于低浓度的,而 10 $\mu$ mol/L ASODNs 与 1.0 $\mu$ mol/L PNAs 对 786-0 细胞生长抑制作用无显著差异,见图 2。

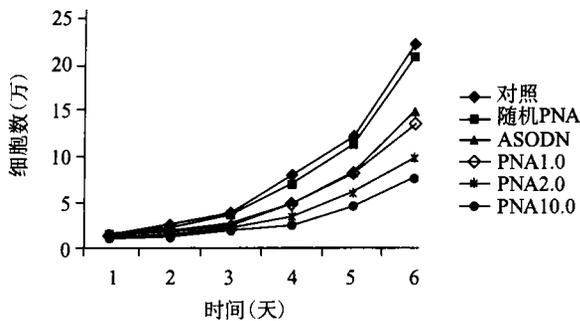


图 2 各处理组 786-0 细胞生长曲线

### 2.3 Ki67-PNAs 对人肾癌 786-0 细胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入的影响

浓度为 10 $\mu$ mol/L 的 PNAs 可显著抑制肾癌 786-0 细胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入率,且高浓度的抑制作用大于低浓度的( $P < 0.01$ ),而 10 $\mu$ mol/L PNAs 与 1.0 $\mu$ mol/L PNAs 对 786-0 细胞的<sup>3</sup>H-TdR 掺入率影响无显著差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 各处理组 786-0 细胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入结果

组别	增殖抑制率(%)
对照组	0
随机 PNAs	98.5 $\pm$ 3.9
ASODNs	58.9 $\pm$ 2.8 #
PNAs(1.0 $\mu$ mol/L)	54.2 $\pm$ 4.3 $\nabla$ #
PNAs(2.0 $\mu$ mol/L)	31.0 $\pm$ 1.4 $\nabla$
PNAs(10.0 $\mu$ mol/L)	20.7 $\pm$ 1.5 $\nabla$

注:与对照组比较  $P > 0.05$ ;与对照组比较  $P < 0.01$ ;#二组之间比较  $P > 0.05$ ; $\nabla$ 三组之间两两比较  $P < 0.01$

### 2.4 Ki67-PNAs 对人肾癌 786-0 细胞的凋亡的影响

浓度为 10 $\mu$ mol/L 的 PNAs 可促进肾癌 786-0 细胞的凋亡,且高浓度 PNAs 的作用大于低浓度 PNAs ( $P < 0.01$ ),而 10 $\mu$ mol/L ASODNs 与 1.0 $\mu$ mol/L PNAs 对 786-0 细胞的凋亡影响无差异( $P > 0.05$ ),见表 3。

## 3 讨论

肾癌恶性度高,且对放疗、化疗不敏感,因此需要寻找新的治疗方法。近年来随着分子生物学技术的发展,多种肿瘤基因反义治疗研究进入临床期试验<sup>[2]</sup>。利用第一代反义核酸即反义寡核苷酸(ASODNs)封闭癌基因治疗肿瘤取得一定效果,但由于 ASODNs 结构上的固有缺陷使得反义治疗抗

表 3 各处理组 786-0 细胞凋亡结果

组别	凋亡
对照组	7.1 $\pm$ 0.8
随机 PNAs	8.4 $\pm$ 0.6
ASODNs	13.8 $\pm$ 1.0 #
PNAs(1.0 $\mu$ mol/L)	14.6 $\pm$ 1.8 $\nabla$ #
PNAs(2.0 $\mu$ mol/L)	22.4 $\pm$ 1.4 $\nabla$
PNAs(10.0 $\mu$ mol/L)	28.7 $\pm$ 2.3 $\nabla$

注:与对照组比较  $P > 0.05$ ;与对照组比较  $P < 0.01$ ;#二组之间比较  $P > 0.05$ ; $\nabla$ 三组之间两两比较  $P < 0.01$

肿瘤效果并不令人满意。1991 年 Nielsen<sup>[3]</sup>设计并合成出第三代反义核酸即反义肽核酸(PNAs),PNAs 特有的结构使其既能与癌基因 mRNA 结合发挥反义治疗作用,又能与癌基因 DNA 双链结合发挥反基因治疗作用,有望给肿瘤基因治疗带来突破。

肽核酸是以 2-氨基乙基甘氨酸为骨架的 DNA 结构类似物,在肽键骨架上有相应的碱基连接。这一结构使得 PNA 链既能与靶基因 mRNA 结合又能与 DNA 结合,因此 PNAs 具有反义及反基因双重治疗作用。此外,PNAs 与靶基因结合特异性及生物活性均优于 ASODNs, PNA 与 DNA 结合时一个 PNA 碱基的错配平均使其  $T_m$  值降低 15,因此 PNA 与 DNA 的非特异结合得到很好排除;而 PNA 能耐受核酸酶及蛋白酶的特征使其生物活性优于 ASODNs,其使用浓度较 ASO 低 10~100 倍<sup>[5-6]</sup>。Norton<sup>[7]</sup>将针对端粒酶基因的 PNAs 转入人乳腺癌细胞,结果发现肿瘤细胞端粒酶活性明显受抑,其抑制效率比 ASODNs 强 10~50 倍。

Ki67 基因是一肿瘤细胞增殖相关基因,其编码的 Ki67 蛋白,在肿瘤增殖 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、S、M 期均有表达,是肿瘤细胞增殖的必需组分<sup>[8]</sup>。我们既往研究发现,肾癌组织 Ki67 表达增强,且与肾癌分期、分级、预后密切相关<sup>[9]</sup>。我们的另一项研究发现肾癌 Ki67 表达与其免疫逃避关系密切<sup>[10]</sup>。本研究发现 10.0 $\mu$ mol/L 浓度的 ASODNs 可显著抑制肾癌细胞 Ki67 基因表达,进而抑制其增殖、促进其凋亡。而浓度仅为 ASODNs 1.0 $\mu$ mol/L 的 PNAs 即可发挥同样作用。同时发现 PNAs 的这些作用具有浓度依赖性,10.0 $\mu$ mol/L 浓度的 PNAs 其作用是 1.0 $\mu$ mol/L PNAs 的 2 倍。

综上所述,PNAs 可在反义、反基因二个环节阻断肾癌细胞 Ki67 基因表达,其抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡作用均优于 ASODNs,有望成为肾癌基因治疗的有力工具。

参考文献:

[1] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2001.3-4.

[2] Persidis A. Antisense therapeutics[J]. Nat Biotech, 1999, 17(4):403-404.

[3] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a Thymine-substitute polyamide[J]. Science, 1991, 254(5037):1497-1500.

[4] Nielsen PE, Egholm M. Strand displacement recognition of mixed adenine cytosine sequences in double stranded DNA by thymine-guanine PNAs(peptide nucleic acid) [J]. Bioorg Med Chem, 2001, 9(9):2429-2434.

[5] Jesen KK, Orum H, Nielsen PE, et al. Kinetic for hybridization of peptide nucleic acids(PNAs) with DNA and RNA studied with BIAcore technique[J]. Biochemistry, 1997, 36(16):5072-5077.

[6] Demidov VV, Yavnilovich MV, Beio-tserkovskii BP. Kinetics and mechanism of polyamide("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(7):2637-2641.

[7] Norton JC, Piatyszek MA, Wright WE, et al. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(5):615-619.

[8] Wiley J, Sons. Ki67-structure, function and new antibodies[J]. J Path, 1992, 168(3):161-162.

[9] 姜福金, 孙晓青, 郑骏年, 等. 细胞增殖核抗原 Ki67 在肾癌组织中的表达及意义[J]. 徐州医学院学报, 2001, 21(5):361-362.

[10] 郑骏年, 孙晓青, 陈家存, 等. 肾癌免疫逃避机制探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1):24-26.

[编辑校对:贺文]

· 短篇 · 个案 ·

# 肝左叶纤维板层型肝细胞癌 1 例

韩晓辉, 刘岩然, 王 旷

关键词:肝;纤维板层型肝细胞癌;病理  
中图分类号:R735.7 文献标识码:D  
文章编号:1000-8578(2005)06-0353-01

## 1 临床资料

患者,男性,31岁,两个月前无诱因自觉上腹部不适,与进食无关,发现上腹部有一肿物,约鸡蛋大小,未治疗。近两个月来,肿物逐渐增大,约手拳大小,伴上腹疼痛,呈阵发性隐痛,向双侧肋缘放散,进食后伴上腹胀感,遂就诊。查体:上腹部剑突下可触及一包块,大小约为10×8×8cm,有轻度触痛。B超示肝左叶巨大占位。CT示肝左叶占位性病变。实验室检查:肝功正常,CEP(-)、AFP(-)、Fer(+), $\alpha$ -MG(-)。2000年11月3日行左半肝切除术。

病理检查:巨检 肝左叶切除标本,其内见大小为12×10×10cm的肿物,表

面呈结节状,界清,包膜较完整,切面实性,淡黄褐色,质较软。镜检:癌细胞呈多角形,聚集成团或梁状排列。胞浆丰富,颗粒状,伊红染色深,见图1、2。胞核多形,染色质集中于核周,成囊泡样,核仁明显,核分裂相可见。癌巢间可见大量平行排列,富含血管,呈板层排列的纤维组织<sup>[1]</sup>,见图3,癌细胞侵犯肿瘤包膜。

病理诊断:肝左叶纤维板层型肝细胞癌。

## 2 讨论

肝脏的纤维板层型肝细胞癌是一种特殊类型的肝细胞癌,此型肝细胞癌发病率在西方国家相对较多,在我国和日

本及南非洲少见<sup>[2]</sup>。男女发病率基本相等(男女1:1.07),好发于年轻人,40岁以下占一半以上,平均为23岁。患者血清HbsAg常阴性,AFP也阴性。肿瘤生长较缓慢。该类型癌治疗以手术为主,预后较好,5年生存率63%<sup>[3]</sup>。在病理检查中本病主要与硬化型肝细胞癌相鉴别,从高度嗜酸性的瘤细胞及平行板层状的纤维基质以及患者的临床症状、CT、B超等检查,诊断该类型癌并非困难。本例患者术后随访近4年仍健在。

(本例经中国人民解放军总医院病理科于国教授会诊特此致谢)

(本文图见封3)

## 参考文献:

[1] 钱利华,郭铃新.肝[A].见:回允中,阿克曼外科病理学[M].第8版.沈阳:辽宁教育出版社,1999.908-910.

[2] 朱大和,杨述祖.肝及胆管肿瘤[A].同济医科大学病理学教研室,中山医科大学病理学教研室.外科病理学[M].第2版.武汉:湖北科学技术出版社,1999.208.

[3] 朱世能.肝胆肿瘤[A].见:刘复生,刘彤华.肿瘤病理学[M].第1版.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997.927-928.

[编辑:刘红武;校对:周永红]

收稿日期:2004-08-16;修回日期:2005-01-24  
作者单位:122000 辽宁朝阳市第二医院病理科