

survivin 反义核酸增强 PANC-1 细胞对 5-Fu 敏感性的研究

樊海宁¹, 黄 韬²

Antisense RNA of survivin Enhances the Sensitivity of PANC-1 Cell to 5-Fu

FAN Hai-ning, HUANG Tao

1. Department of Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Chian; 2. Department of Surgery, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Abstract :Objective To explore the apoptosis of PANC-1 cells induced by antisense RNA of survivin and the increasing sensitivity effect to 5-Fu. **Methods** We transferred the construction recombination antisense RNA of survivin of eukaryotic vector into PANC-1 cells by electroporation. Expression of survivin mRNA was determined by RT-PCR. Cell Counting and MTT assay were performed to evaluate the sensitivity of transferred cells to 5-Fu. The rate of apoptosis was tested by FCM. **Results** Transfection of the antisense RNA of survivin can inhibit the expression of survivin mRNA and inhibit the growth of PANC-1 Cells. The sensitivity of PANC-1 cells to 5-Fu was enhanced after transfection. The rate of apoptosis increased after antisense RNA of survivin was transferred into PANC-1 cells. **Conclusion** Antisense RNA of survivin could enhance 5-Fu-induced apoptosis in PANC-1. Combination of Antisense RNA of survivin and 5-Fu could improve the treatment effect of pancreatic cancer.

Key words :surviving; Antisense RNA; 5-Fu; PANC-1 cells; Apoptosis

摘 要 :目的 研究 survivin 反义核酸诱导胰腺癌细胞株 PANC-1 的凋亡和增强对 5-Fu 敏感性的影响。方法 我们应用构建的 survivin 反义核酸真核表达载体电转染 PANC-1 细胞, RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达, 细胞计数和 MTT 实验测定转染后细胞对 5-Fu 敏感性, 流式细胞仪检测细胞凋亡。结果 survivin 反义核酸可抑制 PANC-1 细胞中 survivin mRNA 的表达, 并能抑制 PANC-1 细胞生长, 提高 PANC-1 对 5-Fu 敏感性, 流式细胞仪检测凋亡率明显增加。结论 survivin 反义核酸能增强 5-Fu 诱导的 PANC-1 细胞凋亡, 联合 survivin 反义核酸和 5-Fu 可以改善胰腺癌的治疗效果。

关键词 :survivin; 反义核酸; 5-Fu; PANC-1 细胞; 凋亡

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)05-0279-03

0 引言

研究证实 survivin 作为一种新近发现的凋亡抑制蛋白在人类众多恶性肿瘤中表达, 具有强烈的凋亡抑制功能和促细胞增殖活性^[1], 我们采用构建的 survivin 反义核酸真核表达载体 pcDNA3 电转染 survivin 阳性表达的 PANC-1 胰腺癌细胞株, 观察 PANC-1 细胞对 5-Fu 敏感性变化, 探讨 survivin 反义核酸对 5-Fu 诱导 PANC-1 细胞的凋亡作用, 为胰腺癌的靶向生物学治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

survivin 反义核酸真核表达载体由华中科技大学同济医学院免疫学系王晓娟博士惠赠, 人胰腺癌细胞株 PANC-1 由本室保存。逆转录试剂盒(晶美

公司 MBI 产品), MTT、RPMI 1640 培养基、TRIzol RNA 分离试剂(Gibco 公司), 胎牛血清(杭州四季青), 电穿孔仪(Eppendorf 公司), AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒为美国 Genzyme 公司产品, 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养

人胰腺癌细胞株 PANC-1 培养在含 10% 胎牛血清、双抗的 RPMI 1640 培养基中, 置 37℃、饱和湿度 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 4d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.3 电转染 PANC-1 细胞及筛选

收集 1×10^6 细胞加入 survivin 反义核酸 4μg 于电转杯中, 终体积 400μL, 参考《分子克隆实验指南》电转染方法操作, 应用含 G418 的 800μg/mL 培养基筛选, 5d 传代 1 次, 25d 后换含 G418 的 200μg/mL 的培养基维持培养 2 周, 同时转染 pcDNA3 空载体作对照, 筛选稳定转染的 PANC-1 细胞。同时

收稿日期: 2004-02-26; 修回日期: 2004-04-06

作者单位: 1. 810001 西宁, 青海大学附属医院普外科;
2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科

将细胞分组,空白组:PANC-1 细胞;对照组:转染 pcDNA3 空载体的 PANC-1 细胞;实验组:转染 survivin 反义核酸 PANC-1 细胞。

1.4 survivin mRNA 表达的检测

将三组细胞常规培养 48h 后,分别收集 1×10^6 个细胞,用 TRIzol 提取细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA 后,进行 PCR 检测 survivin mRNA 的表达。引物序列为上游:5'-CA TGGGTGCCCGACGTT-3',下游:5'-TCAA TCCA TGGA GCCA GCT-3' (由上海博亚合成),以 β -actin(313bp) 为内参照。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 细胞生长曲线

每瓶接种 1×10^5 空白组、对照组、实验组的细胞,每种细胞接种 3 个复瓶,每瓶计数 3 次,台盼蓝染色后,计数活细胞,连续测定 6d,绘制生长曲线。

1.6 稳定转染 survivin 反义核酸 PANC-1 细胞对 5-Fu 敏感性

存活曲线:将 1×10^5 个空白组、对照组、实验组的细胞分别种入 24 孔板,并重复 3 孔,各孔加入终浓度 100mg/L 的 5-Fu,分别于 0、12、24、36、48、60h 后用台盼蓝染色,记数活细胞,绘制存活曲线。

MTT 法:于 96 孔培养板中分别加入 1×10^5 / ml 空白组、对照组、实验组的细胞,每孔设 6 个复孔,留不加 5-Fu 孔只加培养液做调零用孔,各孔加入终浓度 100mg/L 的 5-Fu,使终体积 200 μ L,37 培养 48h 后,每孔加入 MTT(10mg/ mL) 10 μ L,连续培养 4h,离心弃去培养液,每孔加入 150mL DMSO,振荡 10min,上分光光度计测定 OD 值(波长 490nm)。B 为对照孔(不加 5-Fu 孔)平均 OD 值,A 为实验孔(加 5-Fu 孔)平均 OD 值。5-Fu 抑制率 = $(1 - A/B) \times 100\%$ 。

1.7 流式细胞仪检测

按 AnnexinV-FITC/ PI 凋亡试剂盒说明配制染液及缓冲液,置于冰上备用。取经过 5-Fu(100mg/L) 处理 24h 的空白组、对照组、实验组细胞各 1×10^5 个,分别加入 100 μ L 染色液,4 避光放置 30min,加入 200 μ L 缓冲液轻轻振荡,混匀上机检测。

1.8 统计学处理

显著性检验用 *t* 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

应用琼脂糖凝胶电泳检测三组细胞 survivin mRNA 的表达(见图 1)。实验组细胞 survivin mRNA 表达明显下降,而在空白组、对照组细胞却维持不变,说明 survivin 反义核酸可以靶向抑制 PANC-1 细胞中的 mRNA 的表达。

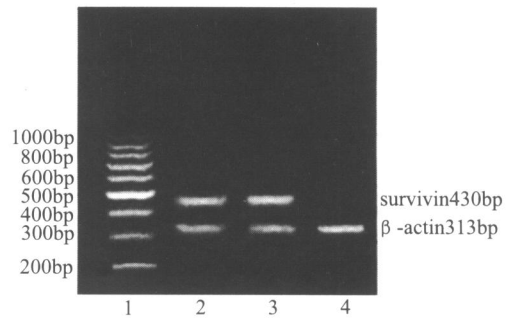


图 1 三组细胞 RT-PCR 显示 survivin mRNA 的表达

1. DNA Marker 2. 空白组 3. 对照组 4. 实验组

2.2 反义核酸对细胞增殖的影响

空白组和对照组细胞增殖能力相比差异无显著性,而转染 survivin 反义核酸的实验组细胞增殖则明显受抑并且随时间延长而增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2)。

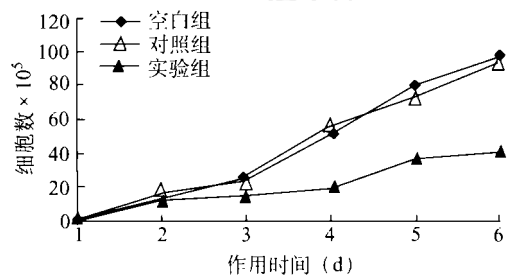


图 2 三组细胞生长曲线

2.3 survivin 反义核酸增强 PANC-1 细胞对 5-Fu 的敏感性

活细胞计数(见图 3):5-Fu 作用于三组细胞,随时间延长空白组、对照组细胞存活率缓慢下降,实验组细胞则下降非常明显 ($P < 0.05$)。

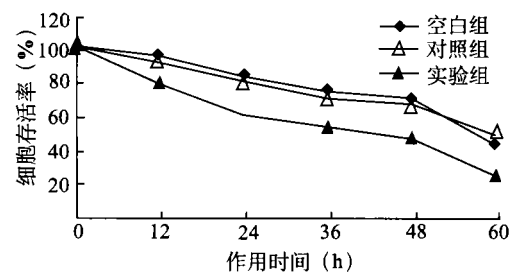


图 3 三组细胞在 5-Fu 作用下的生存曲线

MTT 实验(见图 4):三组细胞在 5-Fu 作用下培养 48h 的抑制率分别是 $(29.1 \pm 3.9)\%$ 、 $(32.8 \pm 2.4)\%$ 、 $(52.9 \pm 2.1)\%$,其中实验组的 5-Fu 抑制率最高,说明转染 survivin 反义核酸提高 PANC-1 细胞对 5-Fu 的敏感性,与空白组及对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$),而空白组与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.4 流式细胞仪测定凋亡结果

早期凋亡细胞 AnnexinV (+) PI (-),空白组、对照组、实验组细胞在 5-Fu 作用下凋亡率分别为

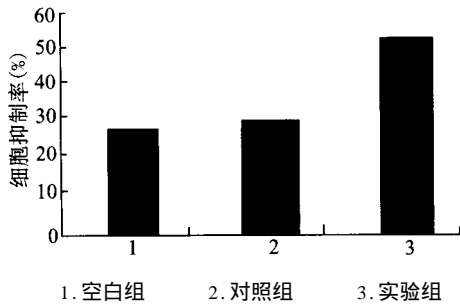


图 4 5-Fu 作用下三组细胞增殖抑制的影响

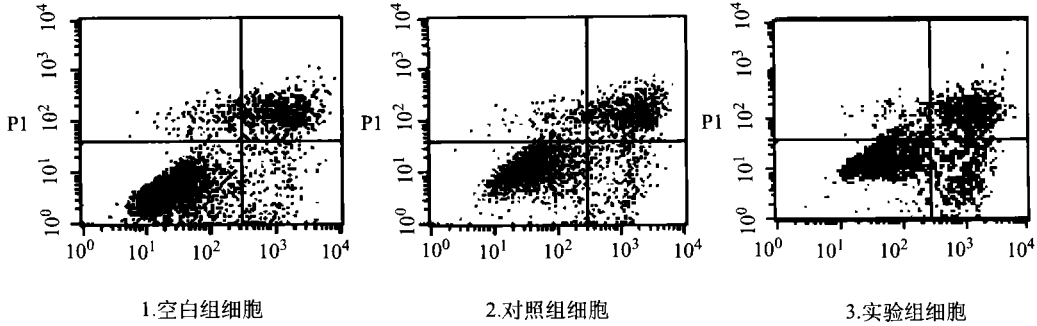


图 5 流式细胞仪测定各组细胞的凋亡分析

5 年生存率不足 1%^[2]。尽管 5-Fu 是胰腺癌的首选化疗药物, Cullinan 等^[3]对 187 例晚期胰腺癌患者进行研究表明化疗药 5-Fu 反应率仅为 7%。随着分子生物学及相关学科不断发展, 基因疗法被认为是继手术、放疗、化疗等传统疗法之后的崭新领域。因此, 寻求新的有效的治疗方法是基础研究者和临床医生共同努力的方向。

细胞凋亡受抑制为基因改变的异常细胞提供生存之机, 使细胞的转化突变得以保存、积蓄, 最终导致细胞癌变^[4]。survivin 是新近发现的一个凋亡蛋白抑制因子(Inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的独特成员, 表达于胚胎组织和多种癌组织, 但不见于正常组织, survivin 可抑制多种凋亡刺激因子引起的凋亡, 而且是迄今发现的最强的凋亡抑制因子^[5]。Sarela 等^[6]研究 survivin 在 76.9% 的胰腺导管腺癌和 50.6% 的胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤中表达, 并表明 survivin 在胰腺癌的早期和进展期表达上调, 抑制癌细胞的凋亡, 同时在研究中也发现癌细胞 survivin 表达增强与其增殖指数的增加有关。通过反义核苷酸封闭细胞凋亡抑制基因的表达以增强化疗药物的敏感性已成为肿瘤学研究的一个重要课题。反义核酸技术可以特异性的抑制癌基因的表达或者抑制肿瘤细胞特异蛋白质的表达, 诱导肿瘤细胞发生凋亡, 使肿瘤消退或彻底消失。survivin 在多种肿瘤表达的普遍性及作为肿瘤特异性的抑制因子, 使得 survivin 可以作为基因治疗的靶基因, 从而使靶向 survivin 的抗肿瘤疗法成为可能。

我们在本实验中, 利用已构建的 survivin 反义

7.6%、8.1%、14.3%, 实验组早期凋亡细胞的比例明显高于空白组及对照组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。空白组、对照组细胞早期凋亡比例相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 由此可见, survivin 反义核酸能增强 5-Fu 诱导的 PANC-1 细胞发生的凋亡。

3 讨论

胰腺癌是一种恶性程度极高、预后极差的消化道常见肿瘤。据统计胰腺癌 1 年生存率不足 10%,

核酸真核表达载体, 通过电转染转入胰腺癌细胞株 PANC-1 中, 可特异封闭 survivin 基因的表达, 抑制细胞增殖, 增加胰腺癌细胞株 PANC-1 对化疗药 5-Fu 的敏感性, 逆转 survivin 对抗化疗药物诱发的凋亡作用, 同时也提示 survivin 与胰腺癌细胞株 PANC-1 细胞耐药存在相关性。总之 survivin 反义药物与传统的化疗药物联合使用会增强 survivin 抗凋亡基因高表达的胰腺癌细胞对化疗药物的敏感度, 提高 5-Fu 的疗效。这将为临床中胰腺癌患者提供了基因治疗的方向, 并有可能成为一种新的治疗方法。

参考文献:

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, et al. A novel anti-apoptosis gene, survivin expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8):917-921.
- [2] 李平, 李兆坤, 王雅杰, 等. GP 方案与 FLEP 方案治疗晚期胰腺癌的比较[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(1):71-72.
- [3] Cullinan S, Moertel CG, Wieand HS, et al. A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma. Evaluations of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin, and cisplatin[J]. Cancer, 1990, 65(10):2207-2212.
- [4] Rohayem J, Diestelkoeller P, Weigle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients[J]. Cancer Res, 2002, 62(6):1731-1739.
- [5] Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, et al. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukemia: survivin is an important determinant for prognosis[J]. Br J Haematol, 2001, 114(1):63-69.
- [6] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2002, 86(6):886-892.

[编辑: 刘红武; 校对: 杨 卉]