

PKC- 反义核酸提高 SMMC-7721 细胞对化疗药物的敏感性研究

陈涛¹, 蒋建伟¹, 黄志宏², 严玉霞¹, 陈超¹, 张小鹰¹

PEI Delivered PKC- ASODN Enhancing Chemotherapeutic Sensitivities on SMMC-7721 Cell Line

CHEN Tao¹, JIANG Jian-wei¹, HUANG Zhi-hong², YAN Yu-xia¹, CHEN Chao¹, ZHANG Xiao-ying¹

1. Department of Biochemistry, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital of Jinan University

Abstract :Objective To investigate if the PKC- ASODN delivered by polyethyleneimine (PEI) can enhance the drug-sensitivities of 5-fluorouracil (5-Fu), arsenic trioxide (As₂O₃) and (HCPT) on human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 Cell line. **Methods** SMMC-7721 cell incubated with different concentration of 5-Fu, As₂O₃ and HCPT alone or combing with ASODN or PEI-ASODN, the inhibitory rate of cell proliferation was tested by using a cell counting kit (WST-8 method) and IC₅₀ was calculated. **Results** Three chemotherapeutic drugs combined with PEI-ASODN (0.25 μmol/L) reduced their IC₅₀ to 3.9 μg/ml, 2.67 μmol/L, 1.46 μg/ml respectively, and their chemotherapeutic sensitivities was enhanced 2.86, 1.84 and 4.01 times compared with the pure chemotherapeutic drug group. **Conclusion** PEI-ASODN can enhance the chemotherapeutic sensitivity on SMMC-7721 cell line, and HCPT gets the best combined effect of all.

Key words: Protein kinase C; ASODN; Tumor of liver; Chemotherapy; Polyethyleneimine

摘要:目的 探讨蛋白激酶 C (protein kinase c) 反义核酸 (antisense oligonucleotides, ASODN) 联合 5-Fu、HCPT、As₂O₃ 三种化疗药物对肝癌 SMMC-7721 的体外高效抑制作用。方法 以聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 为载体转染 PKC- ASODN, 用 WST-8 法检测单纯使用 5-Fu、As₂O₃、HCPT 三种化疗药物以及其联合 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用, 并分别计算抑制率和 IC₅₀。结果 5-Fu、As₂O₃、HCPT 与 PEI-ASODN 物联合使用后, 其 IC₅₀ 分别降低到 3.9 μg/ml、2.67 μmol/L、1.46 μg/ml, 化疗药物的敏感性分别提高到单用化疗药物的 2.86、1.84 和 4.01 倍。结论 PEI 介导的 PKC- ASODN 与化疗药物 5-Fu、As₂O₃、HCPT 联合使用, 可提高肝癌细胞对化疗药物的敏感性, 通过与化疗药物的相加或协同作用, 减少化疗药物的用量。

关键词: 蛋白激酶 C; 反义核酸; 肝肿瘤; 化学治疗; 聚乙烯亚胺

中图分类号: R735.7; R730.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)02-0081-03

0 引言

原发性肝癌是一种对化疗药物不敏感的恶性肿瘤^[1]。有报道在肝细胞癌变过程中, 细胞信号转导异常起到了关键的作用, 其中 PKC- 表达异常与肝癌的发生发展密切相关^[2,3]。反义寡脱氧核苷酸可以通过转录后抑制来抑制肝癌细胞增殖、诱导凋亡, 但是细胞摄取率低、易被核酸酶水解, 且使用剂量过大, 费用昂贵。阳离子聚合物 PEI 作为 ASODN 载

体可以显著提高其转染效率^[4]。临床常规抗肿瘤药物虽然抗肿瘤效果肯定, 但是其毒副作用大, 易产生耐药性, 病人耐受差, 同样难以起到令人满意的效果^[5-7]。因此, 本实验研究旨在探讨用聚乙烯亚胺作为载体, PKC- ASODN 联合 5-Fu、HCPT、As₂O₃ 等常规抗肿瘤药物作用于肝癌细胞, 增强常规化疗药物的抗肿瘤作用, 降低用药剂量, 从而提高病人的生存时间和生活质量, 减轻病人的经济负担。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人肝癌 SMMC-7721 细胞由中山大学生物化学教研室惠赠; 用含 10% 新生牛血清, RPMI1640 培养。

1.2 试剂 CCk-8 (Cell Count Kit-8) 试剂 (日本同

收稿日期: 2007-02-01; 修回日期: 2007-03-26

基金项目: 广州市科技计划资助项目 (2002J1-C0361); 暨南大学科研项目专项培育基金 (暨一临 2005-03)

作者单位: 1. 510632 广州暨南大学医学院生物化学系; 2. 广州暨南大学第一临床学院

作者简介: 陈涛 (1979-), 男, 硕士在读, 主要从事肝肿瘤基因治疗方面的研究

仁化学研究所);新生牛血清(天津 TBD-广州展晨);PKC- ASODN(北京塞百盛基因技术有限公司),全硫代修饰,PAGE 纯化,-20 冻存,使用前用无酚红 RPMI 1640 培养液溶解。PKC-a antisense:5'-GTTCTCGCTGGTGA GTTTC A-3'。

1.3 WST-8 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期、苔盼兰拒染率 > 95 % 的细胞,调整浓度为 5×10^4 / ml,每孔 100 μ l,接种于 96 孔板,设 3 复孔,培养 4 h,待贴壁达 40 % ~ 50 % 后,加入药物。设空白对照组、单纯 ASODN 组、单纯化疗药物组、ASODN 联合化疗药物组和 PEFASODN 联合化疗药物组,各组 PKC- ASODN 浓度均为 0.25 μ g/ml;PEI 与 PKC 质量比为 3 : 4,见表 1 ~ 3;培养 48 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ l,继续培养 1 h,多功能酶标仪(Bio-Rad)测定吸光度 A_{450nm} (激发波长 450 nm,参比波长 655 nm),计算增殖抑制率及各组 IC_{50} ;增殖抑制率 = $[A_{(对照组)} - A_{(实验组)}] / A_{(对照组)} \times 100\%$;各化疗药增敏倍数 = 单纯用药组的 IC_{50} / 联合用药组的 IC_{50} 。

1.4 统计学方法 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用统计软件 SPSS 13.0。

1.5 金正均 Q 值法^[8]判断化疗药物与反义核酸联合使用的效果 $Q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$, E_a 和 E_b 分别为单用反义核酸和单用化疗药物的抑制率, E_{a+b} 为合并用药的抑制率。式中分子代表“实测合并效应”,分母是“期望合并效应”,Q 值是两者之比, $Q < 0.85$ 为拮抗, $0.85 < Q < 1.15$ 为相加, $Q > 1.15$ 为协同。

2 结果

2.1 5-Fu 与 PEFASODN 联合使用效果 单用 5-Fu 的 IC_{50} 为 15.64 μ g/ml;5-Fu 与 ASODN 联合使用,表现为拮抗作用($Q < 0.85$), IC_{50} 为 26.74 μ g/ml;5-Fu 与 PEFASODN 联合使用,表现为协同作用($Q > 1.15$), IC_{50} 为 3.9 μ g/ml,增敏倍数为 4.01,见表 1、4。

2.2 As_2O_3 与 PEFASODN 联合使用效果 单用 As_2O_3 的 IC_{50} 为 4.93 μ mol/L; As_2O_3 与 ASODN 联合使用,表现为拮抗作用($Q < 0.85$), IC_{50} 为 5.33 μ mol/L; As_2O_3 与 PEFASODN 联合使用,表现为相加作用($0.85 < Q < 1.15$), IC_{50} 为 2.67 μ mol/L,增敏倍数为 1.84,见表 2、4。

2.3 HCPT 与 PEFASODN 联合使用效果 单用 HCPT 的 IC_{50} 为 4.18 μ g/ml; HCPT 与 ASODN 联合使用,表现为相加作用($0.85 < Q < 1.15$), IC_{50} 为 3.1 μ g/ml,增敏倍数为 1.34; HCPT 与 PEFASODN 联合使用,表现为协同作用($Q > 1.15$), IC_{50} 为 1.46 μ g/ml,增敏倍数为 2.86,见表 3、4。

3 讨论

蛋白激酶 C 已经成为肿瘤研究领域的热点之一。研究发现,PKC- 磷酸化后活化多种蛋白分子,引起分化、增殖、胞膜转运、基因表达等一系列细胞反应。药物或反义技术封闭 PKC- 表达和活性,可以抑制肿瘤细胞的生长、促进凋亡、抑制侵袭转移,以及增强对化疗药物的敏感性^[9]。研究表明 PKC- 反义核酸可以抑制胰腺癌、宫颈癌等肿瘤的

表 1 不同浓度的 5-Fu 及其联合 ASODN 或 PEFASODN 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用的比较(μ g/ml)

5-Fu		5-Fu 联合 ASODN		5-Fu 联合 PEFASODN		Q 值
5-Fu 浓度	抑制率 (%)	5-Fu 浓度	抑制率 (%)	5-Fu 浓度	抑制率 (%)	
0	0	0	12.4 \pm 4.1	0	18.4 \pm 1.4	
2	25.1 \pm 0.9	2	26.8 \pm 3.4	0.1	14.6 \pm 3.1	
4	34.7 \pm 6.0	4	31.4 \pm 5.6	0.5	33.8 \pm 10.8	
8	40.9 \pm 2.4	8	34.4 \pm 1.5	1	30.7 \pm 2.1	
16	50.8 \pm 1.4	16	42.8 \pm 3.1	2	36.0 \pm 3.4 *	0.93
32	76.1 \pm 2.7	32	55.4 \pm 7.5	4	54.8 \pm 1.9 *	1.17

* 与单用 5-Fu 组比, $P < 0.01$ (所有 ASODN 终浓度为 0.25 μ mol/L)

表 2 不同浓度的 As_2O_3 及其联合 ASODN 或 PEFASODN 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用的比较(μ mol/L)

单纯 As_2O_3		As_2O_3 联合 ASODN		As_2O_3 联合 PEFASODN		Q 值
As_2O_3 浓度	抑制率 (%)	As_2O_3 浓度	抑制率 (%)	As_2O_3 浓度	抑制率 (%)	
0	0	0	10.4 \pm 4.1	0	13.6 \pm 3.8	
2	53.2 \pm 1.2	0.5	- 7.6 \pm 2.8	0.05	- 0.5 \pm 7.6	
4	63.4 \pm 1.6	1	- 7.0 \pm 3.4	0.1	2.8 \pm 7.6	
8	74.5 \pm 1.3	2	1.3 \pm 4.2	0.5	25.9 \pm 5.7	
16	61.0 \pm 5.7	4	28.9 \pm 1.2	1	53.1 \pm 2.5 *	
32	71.8 \pm 6.5	8	47.3 \pm 16.6	2	64.6 \pm 1.2 *	1.08

* 与 0 组比, $P < 0.01$ (所有 ASODN 终浓度为 0.25 μ mol/L)

表 3 不同浓度的 HCPT 及其联合 ASODN 或 PEFASODN 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用的比较(μg/ml)

单纯 HCPT		HCPT 联合 ASODN			HCPT 联合 PEFASODN		
HCPT 浓度	抑制率 (%)	HCPT 浓度	抑制率 (%)	Q 值	HCPT 浓度	抑制率 (%)	Q 值
0	0	0	11.8 ±2.3		0	16.5 ±0.5	
0.5	23.4 ±1.1	0.5	29.2 ±2.1*	0.90	0.05	14.1 ±1.3	
1	25.3 ±3.1	1	43.9 ±8.6*	1.29	0.1	22.5 ±5.8	
2	40.4 ±1.9	2	45.9 ±0.3*	0.97	0.5	37.2 ±1.7*	1.03
4	56.1 ±2.1	4	58.8 ±5.2*	0.95	1	46.3 ±1.5*	1.23
8	68.6 ±0.8	8	72.4 ±2.2*	1.01	2	50.2 ±2.9*	1.0

*与单用 HCPT 组比, P<0.01(所有 ASODN 终浓度为 0.25 μmol/L)

表 4 不同化疗药物联合反义核酸的 IC₅₀及增敏倍数

组别	As ₂ O ₃		5-Fu		HCPT	
	IC ₅₀ (μg/ml)	增敏倍数	IC ₅₀ (μg/ml)	增敏倍数	IC ₅₀ (μg/ml)	增敏倍数
单用化疗药物	4.923	-	15.64	-	4.18	-
化疗药物 + AS	5.333	-	15.47	-	3.10	1.34
化疗药物 + P-A	2.676	1.84	3.9	4.01	1.46	2.86

AS 为 ASODN;P-A 为 PEFASODN

增殖^[10-12]。因此,我们针对蛋白激酶 C mRNA 的 SD 序列上游非编码区设计合成反义核酸,阻断与 PKC- 相关的信号通路来抑制肿瘤生长、促进其凋亡。

本实验选用肝癌常用药物 5-Fu、As₂O₃ 及 HCPT 分别与 PEFASODN 联合使用。结果表明:化疗药物与 PEFASODN 联合使用组的 IC₅₀ 最低,分别将 SMMC-7721 细胞对 5-Fu、As₂O₃、HCPT 的敏感性分别提高到单用化疗药物 4.01、1.84、2.86 倍,这是由于 ASODN 和化疗药物通过不同的机制共同作用于肝癌细胞,提高了肝癌细胞对化疗药物的敏感性所致。金正均 Q 值法^[8]分析化疗药物与反义核酸的相互作用表明:PEF-ASODN 与 5-Fu、HCPT 联合使用,均表现为协同作用;与 As₂O₃ 联合使用,仅表现为相加作用,联合作用效果不如 5-Fu、HCPT 明显,原因可能是带负电荷的 ASODN 增加了细胞膜外的电负性,影响了细胞对 As₂O₃ 的摄入。而线性 PEI 作为一种高效、低毒的阳离子聚合物,能和 DNA 形成中性或者带正电的复合物,即 PEI³⁺/ASODN,不仅介导 ASODN 的摄入,而且通过中和部分细胞膜外的负电荷来促进化疗药的摄入,通过不同的机制共同作用肝癌细胞,抑制生长、促进凋亡。

肝癌属于对化疗敏感性差、耐药性强的恶性肿瘤,而肝癌患者常患肝硬化和慢性肝炎,肝功能差,不易耐受长期、大剂量的化疗。本实验通过联合使用化疗药物和 PEFASODN,既能减少反义核酸的使用量,又可减少化疗药物的剂量,对于肝癌治疗中减少药物的毒副作用,增强化疗药物的疗效有很好的效果。

参考文献:

- [1] 林芷英. 原发性肝癌的化疗及研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2004, 4(1):50-51.
- [2] Caponigro F, French RC, Kaye SB. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? [J]. anticancer Drugs, 1997, 8(1):26-33.
- [3] Tu C, Chou K, Chen C, et al. Protein kinase C mediated tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires cytoskeletal integrity and is uncoupled to mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells [J]. J Biomed Sci, 2001, 8(1):184-190.
- [4] Yr-Hsien Hsieh a, Trang-Tiau Wu b, Jen-Hsiang Tsai c, et al. PKC- expression regulated by Elk-1 and MZF-1 in human HCC cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 339(1):217-225.
- [5] Chu F, Chen LH, O'Brian CA. Cellular protein kinase C isozyme regulation by exogenously delivered physiological disulfides-implications of oxidative protein kinase C regulation to cancer prevention [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(4):585-596.
- [6] 祝葆华, 姚榛祥, 江黎明, 等. 蛋白激酶 C- 反义核酸对人肝癌细胞 Hep G2 体外增殖及凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(6):678-680.
- [7] Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches [J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(5):181-187.
- [8] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. 中国药理学报, 1980, 1(2):70-71.
- [9] Lahn M, Paterson BM, Sundell K, et al. The role of p protein kinase C-alpha (PKC-a) in malignancies of the gastrointestinal tract [J]. Eur J Cancer, 2004, 40(1):10-20.
- [10] 吴孝杰, 庞江琳, 孙显斌. PKC- 反义核酸对子宫颈癌 HeLa 细胞增殖及 c-myc, c-jun 表达的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2004, 12(4):291-293.
- [11] 黄涛, 冯延平, 高军, 等. 蛋白激酶 C- 反义寡核苷酸对人胰腺癌 BXP-3 细胞体外侵袭力的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(5):892-894.
- [12] Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily [J]. Biochem J, 1998, 332(2):281-292.

[编辑:贺文;校对:杨卉]