

Ki-67 反义寡核苷酸抑制人肝癌细胞株 HEPG7402 生长的体外试验

郑雷, 韩跃武

Antisense Oligodeoxyribonucleotide Target Ki-67 Inhibits Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cell HEPG7402 in Vitro

ZHENG Lei, HAN Yue-wu

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lanzhou Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate phosphorothioated antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) target Ki-67 decreasing the antigen's expression and inhibiting proliferation of HEPG7402 cell in vitro. It will show us a new method to cure hepatocellular carcinoma by genetherapy in the future. **Methods** We treat HEPG7402 cells with ASODN and observe changes of cells proliferation by the way of MTT. ICC technique was used to find the change of cells Ki-67 labeling index (LI). RT-PCR method was used for detecting Ki-67 mRNA's change. **Results** HEPG7402 cells growth was inhibited, Ki-67 labeling index was decreased, and the expression of Ki-67 mRNA was decreased in ASODN group. **Conclusion** ASODN target against Ki-67 can inhibit the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell HEPG7402 in vitro.

Key words: Ki-67; Antisense oligodeoxyribonucleotides; Ki-67 labeling index; Hepatocellular carcinoma

摘要:目的 通过观察硫代磷酸化修饰的 Ki-67 抗原反义寡核苷酸(antisense oligodeoxyribonucleotide, ASODN)抑制 Ki-67 抗原表达,从而抑制 HEPG7402 细胞体外增殖,为今后肝癌的基因治疗提供新的手段。方法 将 Ki-67 反义寡核苷酸(ASODN)作用于 HEPG7402 细胞,MTT 比色法测细胞增殖活性;免疫细胞化学(Immunocellulercchemistry ICC)方法检测 Ki-67 标记指数(Labeling index LI)、RT-PCR 方法观察 Ki-67 mRNA 水平的改变。结果 Ki-67 ASODN 作用组 HEPG7402 细胞增殖受到明显抑制;Ki-67 标记指数(LI)下降,Ki-67mRNA 合成减少。结论 针对 Ki-67 的反义寡核苷酸能抑制人肝癌细胞株的体外生长。

关键词: Ki-67; 反义寡核苷酸; Ki-67 标记指数;肝癌

中图分类号:R73-76; R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)12-0862-03

0 引言

肝癌是我国消化道常见肿瘤之一,常规手术治疗根治率低,其他治疗手段效果一般。基因治疗是目前肿瘤治疗中一种较有前景的治疗方法。反义核酸技术是利用一断人工合成的寡核苷酸与异常表达或过度表达的目的基因或目的基因 mRNA 互补结合,可以在复制、转录、翻译等多个水平上抑制目的基因的表达,达到治疗的目的。肿瘤的发生与细胞的过度增殖有关,本实验通过将一段针对细胞核增殖相关抗原 Ki-67 翻译起始区的反义寡核苷酸片断,作用于人肝癌细胞 HEPG7402,观察对肝癌细

胞 HEPG7402 增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞 HEPG7402 购自中科院上海细胞研究所;Ki-67 免疫组化试剂盒、SP 试剂盒购自福州迈新试剂公司;Trizol RNA 抽提试剂盒、AMV RT-PCR 扩增试剂盒为上海生工公司产品。针对 Ki-67 的反义链(ASODN)序列:5' ACC AGG CGT CTC GTG GGC CAC AT-3';随机链(ROND)序列:5' AGT ACT CAG TAA CGC CTA CGG TAA G-3';上述序列 3'端 3 个碱基硫代磷酸化修饰,HLPC 纯化处理。寡脱氧核苷酸的合成及纯化由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组

收稿日期:2005-11-23;修回日期:2006-04-14

作者单位:730000 兰州大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室

作者简介:郑雷(1973-),男,硕士,主治医师,主要从事基因治疗研究

人肝癌细胞 HEPG-7402 在含 10% 小牛血清、100U/L 青霉素/链霉素的 RPMF1640 培养基, 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度下培养。实验分组根据加入药物的不同分为反义核酸作用组 (ASODN 组)、随机寡核苷酸组 (RODN 组) 和对照组。

1.2.2 MTT 法^[1] 检测细胞增殖活性

将 ASODN 作用于 HEPG-7402, 分别于 24、48、72、96h 加入 0.5% MTT 20μl, 孵育 4h 后吸弃培养基, 加入 DMSO 150μl, 紫色结晶完全溶解后, 用酶标仪检测各组细胞的 490nm 吸光度值。

1.2.3 免疫细胞化学法检测标记指数 (LI)

制备细胞爬片, 经药物处理培养 48h 后取出玻片, 采用免疫细胞化学 SP 法, 根据试剂说明操作。以细胞核呈棕红色为阳性; 单纯细胞浆着色而细胞核无着色, 或细胞核、细胞浆均无着色为阴性。通过计算 Ki-67 标记指数 (LI) 反映 Ki-67 抗原表达量的改变。

1.2.4 RT-PCR 观察 Ki-67 mRNA 水平的改变

收集各组细胞, 用 Trizol 柱式总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 按照 AMV 一步法 RT-PCR 扩增试剂盒说明操作。Ki-67 mRNA 上游引物 5'-TTT GGG TGC GAC TTG ACG A³/₃'; 下游引物 5'-TGA TAG TAA CCA GGC GTC TCG T³/₃', 产物 181bp。内参 GAPDH 上游引物 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA³/₃'; 下游引物 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC³/₃', 产物 598bp。由上海生物工程公司合成。

1.2.5 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件分析, 多组均数间的比较, 检验方差齐性后行方差分析。

2 结果

2.1 ASODN 对 HEPG-7402 细胞生长曲线的影响

ASODN 作用组, 24~72h 细胞增殖受到抑制, 抑制作用与对照组相比有统计学意义 $P < 0.05$, 96h 以后抑制作用减弱, 见图 1。

2.2 ASODN 作用下 Ki-67 LI 改变

ASODN 作用组, 当 ASODN 浓度为 2.5μmol/L 时, LI 改变与对照组无明显区别 ($P > 0.05$), 随 ASODN 浓度增加, Ki-67 LI 明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 RT-PCR 观察 Ki-67 mRNA 水平改变

空白对照组和 RODN 组中可见一条清晰的 181bp 的 Ki-67 基因片段, ASODN 处理组 Ki-67 基因表达下降, 表明 Ki-67 mRNA 基因的表达明显被

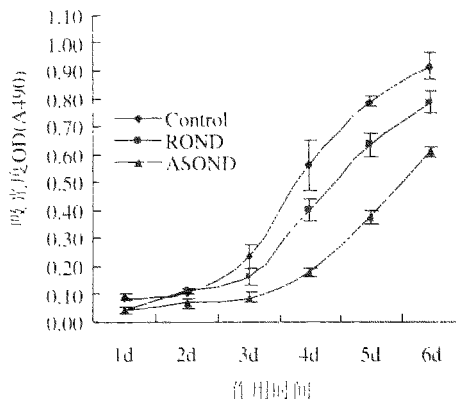


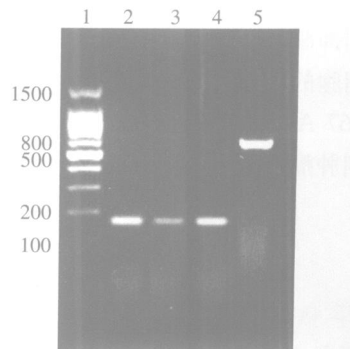
图 1 各组药物对 HEPG-7402 细胞生长曲线的影响

表 1 ASODN 对 HEPG-7402 细胞 LI 的影响

Groups	LI (labeling index)
Control	0.468 ± 0.02
RODNs	0.450 ± 0.03
ASODNs (2.5μmol/L)	0.432 ± 0.04
ASODNs (5μmol/L)	0.329 ± 0.04
ASODNs (10μmol/L)	0.261 ± 0.02
ASODNs (20μmol/L)	0.215 ± 0.001

vs control group $P > 0.05$; vs control group $P < 0.01$; vs each other $P < 0.05$

抑制, 见图 2。



1: Marker; 2: Control; 3: ASODN; 4: RODN; 5: GAPDH

图 2 RT-PCR 法观察 ASODN 对 HEPG-7402 细胞 Ki-67 mRNA 水平的影响

3 讨论

Ki-67 抗原是一种增殖细胞标记抗原, 其具体功能至今仍未阐明^[2]。Ki-67 抗原的表达随细胞周期的不同而发生改变, 在 G₁ 中期到晚期出现, S 期和 G₂ 期逐渐增加, M 期达到最高值, G₀ 期细胞阴性^[3], 是一项反应细胞增殖水平的常用指标。也是目前已知的增殖抗原中较具增殖能力代表性的指标。肿瘤细胞与正常细胞的主要区别在于前者的细胞周期发生紊乱、细胞异常增殖。大量实验证明 Ki-67 抗原与多种肿瘤细胞的增殖活性、细胞周期以及肿瘤的生长方式、复发、转移等多种生物学行为

相关。临床上常用一种反映 Ki-67 抗原表达水平的指标是 Ki-67 标记指数(LI), Yoshimoto 等^[4]利用 Ki-67 单克隆抗体免疫组化方法观察到肝细胞癌(HCC)组织中 LI 明显高于慢性肝炎(CH)、肝硬化(LC)和正常肝组织,说明肝癌细胞中 Ki-67 抗原呈高表达。

本实验将一段序列特异性反义寡核苷酸(ASODN)作用于人肝癌细胞 HEPG7402 Ki-67 mRNA 翻译起始区,抑制 Ki-67 抗原的表达,来观察对该细胞增殖特性的影响。结果显示 ASODN 作用组细胞增殖受到明显抑制,抑制程度呈剂量依赖性(数据未列出)。以 10 μ mol/L ASODN 作用于 HEPG7402,发现 48h 细胞抑制程度最明显,细胞抑制率存在时间依赖性,但 96h 以后抑制率降低,可能与寡核苷酸半衰期短以及受细胞内核酶降解有关。经 ASODN 作用后 Ki-67 LI 明显下降,说明 ASODN 抑制了 Ki-67 抗原表达。同时 RT-PCR 方法观察到 ASODN 作用组 Ki-67 mRNA 表达水平下降,说明反义寡核苷酸通过与 Ki-67 翻译起始区结合,通过抑制 Ki-67 mRNA 水平,使其 Ki-67 抗原表达下降,细胞增殖受到抑制。

Kausch 等^[5]将 Ki-67 ASODN 作用于 RT4 细胞后发现 Ki-67 蛋白表达量明显下降,肿瘤细胞的增殖受到抑制。用上述寡核苷酸注射皮下植有膀胱间皮瘤细胞的 C57B6 小鼠后观察到肿瘤体积缩小。提示 Ki-67 ASODN 无论在体外或体内都能起到明显的抑制肿瘤细胞增殖的效果。Zheng 等^[6]以 Ki-

67 抗原为靶点反义肽核酸(PNA)作用于 786-0 细胞,观察到该肿瘤细胞增殖受到抑制。上述实验证明,肿瘤细胞由于呈现高增殖的特点,而 Ki-67 抗原是一种与增殖密切相关的抗原,抑制 Ki-67 抗原蛋白的表达可以明显抑制肿瘤细胞的增殖,达到治疗肿瘤的目的。我们在本实验中发现反义 Ki-67 寡核苷酸(ASODN)能使体外培养的 HEPG7402 细胞增殖受到抑制,是否对体内的肝癌细胞有抑制作用有待于今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 郝新保,张利朝,殷纛,等. MTT 比色法测定细胞生长曲线[J]. 第四军医大学学报,1997,18(4):309-391.
- [2] Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function[J]. *Exp Cell Res*, 2000 (257): 231-237.
- [3] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67[J]. *Journal of Immunology*, 1984 (133): 1710-1715.
- [4] Yoshimoto J, Iwata T, Takamori S, et al. Usefulness of monoclonal antibody Ki-67 as a prognostic factor of hepatocellular carcinoma[J]. *International Hepatology Communications*, 1997 (6): 209-218.
- [5] Kausch I, Lingnau A, Endl E, et al. Antisense treatment against the Ki-67-mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo[J]. *Int J Cancer*, 2003 (105): 710-716.
- [6] Jun-Nian Zheng, Ya-Feng Sun, Dong-Sheng Pei, et al. Anti-Ki-67 peptide nucleic acid affects the proliferation and apoptosis of human renal carcinoma cells in vitro[J]. *Life Sci*, 2005, (16): 1873-1881.

[编辑:刘红武]