

瞬时转染CD44反义寡核苷酸抑制人胃癌MGC80-3细胞增生并诱导凋亡

荆雪宁, 张 玲, 王 芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛

荆雪宁, 张玲, 王芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛, 山东省医学科学院基础医学研究所免疫室 山东省济南市 250062
荆雪宁, 女, 1978-02-09 生, 山东省莱州市人, 汉族, 山东省医学科学院硕士研究生。
山东省医药卫生科研项目资助, No. 2003-139
项目负责人: 张玲, 250062, 山东省济南市经十路 89 号, 山东省医学科学院基础医学研究所免疫室, zhlnln@163.net
电话: 0531-2919933
收稿日期: 2004-07-12 接受日期: 2004-09-04

Inhibitory and apoptosis-inducing effects of CD44 antisense oligodeoxyribonucleotides on human gastric cancer cell line MGC80-3

Xue-Ning Jing, Ling Zhang, Yun Wang, Hai-Ting Mao, Pei-E Wen, Deng-Hua Li, Shu-Ling Cui, Hong-Tao Gu

Xue-Ning Jing, Ling Zhang, Yun Wang, Hai-Ting Mao, Pei-E Wen, Deng-Hua Li, Shu-Ling Cui, Hong-Tao Gu, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, Shandong Province, China
Supported by Shandong Medical Research Project, No. 2003-139
Correspondence to: Dr. Ling Zhang, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, 89 Jingshi Road, Jinan 250062, Shandong Province, China. zhlnln@163.net
Received: 2004-07-12 Accepted: 2004-09-04

Abstract

AIM: To study the role and mechanism of antisense oligodeoxyribonucleotides (ASODN) on proliferation and apoptosis of MGC80-3 cells.

METHODS: Flow cytometry was used to detect CD44, Fas expression and apoptosis of MGC80-3 cells. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to examine CD44 mRNA level; MTT assay was used to detect cell proliferation.

RESULTS: CD44 mRNA and CD44 protein expression in MGC80-3 cells was blocked and down-regulated after transfected with CD44ASODN (1.6 μ mol/L). CD44ASODN inhibited the growth of MGC80-3 cells with depression ratios of 31.0%, 46.3% ($P < 0.01$), and 49.6% ($P < 0.01$) at 48 h, 72 h, and 96 h respectively in a time-dependant manner. With the existence of hyaluronic acid, CD44ASODN improved Fas expression in MGC80-3 cells from 6.7% to 16.8% ($P < 0.01$). At the same time, it enhanced the susceptibility of MGC80-3 cells to Fas mAb and the apoptotic rate of the cells increased from 0% to 26.5% ($P < 0.01$).

CONCLUSION: CD44ASODN can down-regulate the expression of CD44 mRNA and protein, inhibit MGC80-3 cell pro-

liferation and promote apoptosis induced by Fas mAb.

Jing XN, Zhang L, Wang Y, Mao HT, Wen PE, Li DH, Cui SL, Gu HT. Inhibitory and apoptosis-inducing effects of CD44 antisense oligodeoxyribonucleotides on human gastric cancer cell line MGC80-3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2551-2554

摘要

目的: 研究 CD44 反义寡核苷酸(CD44ASODN)对人胃癌 MGC80-3 细胞的增生抑制和诱导凋亡的作用和机制。

方法: 设计并合成 CD44ASODN, 脂质体介导转入 MGC80-3 胃癌细胞, 采用流式细胞术(FACS)检测 CD44、Fas 的表达及细胞凋亡; RT-PCR 法检测 CD44mRNA 的表达; MTT 法检测细胞增生。

结果: CD44ASODN(1.6 μ mol/L)明显地抑制 MGC80-3 细胞 CD44mRNA 和蛋白表达水平。CD44ASODN 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后, 细胞的增生呈现明显的抑制作用, 其抑制率为 31.0%, 72, 96 h 的抑制率分别为 46.3%、49.6% ($P < 0.01$), 其增生抑制作用呈时间依赖效应。在 CD44 配体低分子质量透明质酸存在的环境中, CD44ASODN 能显著增高细胞表面 Fas 分子的表达, 表达率从 6.7% 提高为 16.8% ($P < 0.01$), 并显著地增加 MGC80-3 细胞对 Fas mAb 诱导凋亡的敏感性, 凋亡率从 0 增加到 26.5% ($P < 0.01$)。

结论: CD44 反义寡核苷酸通过抑制 MGC80-3 细胞 CD44mRNA 和蛋白表达, 抑制 MGC80-3 细胞的增生, 增高细胞表面 Fas 的表达及 MGC80-3 细胞对 Fas mAb 诱导凋亡的敏感性, 逆转胃癌细胞的免疫逃逸作用。

荆雪宁, 张玲, 王芸, 毛海婷, 温培娥, 李登华, 崔树龄, 顾洪涛. 瞬时转染 CD44 反义寡核苷酸抑制人胃癌 MGC80-3 细胞增生并诱导凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2551-2554

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2551.asp>

0 引言

黏附分子 CD44 以细胞特异性的方式表达于许多细胞表面, 在细胞黏附、信号传导及调节细胞迁移等过程中发挥重要作用。肿瘤细胞表面的 CD44 表达显著增高, 或表达 CD44 异构体的独特模式, 与肿瘤的发生、发展与远处侵袭转移关系密切, 是人类肿瘤转移和预后不良的标志。最新研究表明, CD44 与其细胞外基质配

体低分子质量透明质酸结合后,促进肿瘤细胞的增生,降低肿瘤细胞表面 Fas 的表达,通过 Fas/FasL 途径降低肿瘤细胞对 CTL 的敏感性,进而使肿瘤逃脱 Fas 介导的 CTL 杀伤^[1]. 我们通过设计合成 CD44 反义寡核苷酸(ASODN),封闭和抑制人低分化黏液腺胃癌 MGC80-3 细胞 CD44 表达,阐明 CD44ASODN 对 MGC80-3 细胞增生能力、Fas 的表达及 FasmAb 诱导凋亡的影响,为 CD44 基因的肿瘤生物治疗,提供新的理论和实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 MGC80-3 细胞株,由本室保存;RPMI1640、胰蛋白酶,为 GIBCO 产品;鼠抗人 CD44(HCAM)、兔抗人 Fas 多克隆抗体,为 Santa Cruz 公司产品;FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体、兔抗鼠 IgG 抗体购自华美生物公司;PI, HA, MTT 为 Sigma 公司产品;鼠抗人 FasmAb (AM01L)为 Oncogene 公司产品;脂质体(OligofectamineTM)为 Invitrogen 公司产品;TRIZOL Reagent 为 Invitrogen 公司产品;oligo(dT)18, Rnasin 为上海生工生物工程技术有限公司产品. 逆转录试剂为 Promega 公司产品;PCR 试剂,为宝生物工程有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 反义寡核苷酸合成、脂质体介导和转染 MGC80-3 细胞^[2-3] CD44 反义寡核苷酸序列与 CD44 mRNA 的 5' 端非编码区互补. CD44 正反义寡核苷酸序列:反义(ASODN): 5' -GCGCGGGCGAAAGG- AGCT-3', 正义(SODN)5' - TCCGGACACCATGGACAAG-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成,并进行了硫代化修饰. 采用脂质体(OligofectamineTM, Invitrogen 公司产品)介导法,形成 CD44ASODN、SODN 脂质体复合物(CD44A/SODN-OF). 取对数生长期的 MGC80-3 细胞 5×10^5 /孔接种 6 孔板,待细胞密度增至 30-50% 时,加入不同浓度 CD44A/SODN-OF 转染,实验分组: (1)对照组, (2)ASODN 处理组(0.8, 1.2, 1.6×10^{-3} mmol/L), (3)SODN 处理对照组(0.8, 1.2, 1.6×10^{-3} mmol/L), 37 °C, 50 ml/L CO₂ 培养 4 h 后弃转染液,加入新鲜培养液继续培养 24 h, 48 h, 72 h.

1.2.2 流式细胞术检测 MGC80-3 细胞 CD44 分子表达 收集处理 72 h 的对照组, ASODN 组(1.6×10^{-3} mmol/L), SODN 组(1.6×10^{-3} mmol/L) MGC80-3 细胞($>10^6$), 参照文献[4-5]进行检测.

1.2.3 RT-PCR 法检测 MGC80-3 细胞 CD44mRNA 表达^[6] 收集处理 48 h 的 1.2.2 述各组 MGC80-3 细胞($>10^6$), 按 TRIZOL Reagent 说明,提取总 RNA,定量后进行 RT-PCR. DNA 扩增产物以 β -actin 基因作内参照,采用 Gel Dos1000 凝胶分析仪扫描分析并相对定量.

1.2.4 流式细胞术检测 Fas 分子的表达^[7-8] 和细胞凋亡^[9-11] 实验分组中另设未处理对照(对照 1)组,在上述对照(对照 2)组、处理组细胞 24 h 转染后,加入 CD44 配体低分子质量透明质酸(简称 HA)终浓度为 0.1 g/L,刺

激 24 h 后收集细胞,检测 Fas 分子的表达. 向转染和加入 HA 刺激 24 h 后的各组 and 对照 1 组中加入鼠抗人 FasmAb 终浓度为 2 mg/L,继续作用 24 h 后收集细胞,检测细胞凋亡.

1.2.5 MTT 法检测细胞增生^[12-13] 取对数生长期的 MGC80-3 细胞 5×10^7 /L 接种于 96 孔板, 37 °C, 50 ml/L CO₂ 孵育过夜,各组细胞转染和加入 HA 后,继续培养 24, 48, 72, 96 h. 终止培养前 4 h 加入 MTT(5 g/L), 4 h 后置酶标仪下测定.

统计学处理 采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件进行 χ^2 检验、*t* 检验,确定 $P < 0.05$ 为差异有显著性统计学意义.

2 结果

2.1 MGC80-3 细胞 CD44 分子的表达 0.8, 1.2, 1.6×10^{-3} mmol/L CD44ASODN 作用于 MGC80-3 细胞 72 h 后,细胞表面 CD44 蛋白的表达较对照组和 SODN 对照组显著下降($P = 0.0001 < 0.01$, 表 1), 1.6×10^{-3} mmol/L 作用后,自 48 h, 72 h 后 CD44 蛋白表达显著下降($P = 0.0001 < 0.01$, 表 2),呈现出剂量和时间依赖效应.

表 1 不同剂量 CD44A/SODN-OF 处理后 MGC80-3 CD44 分子阳性细胞的变化

Dose ($\times 10^{-3}$ mmol/L)	CD44 ⁺ cell (/10 000)	CD44 expression (%)
Control	8 680	86.80
ASODN 0.8	5 345	53.45 ^b
SODN 0.8	9 449	94.49
ASODN 1.2	3 897	38.97 ^b
SODN 1.2	9 523	95.23
ASODN 1.6	3 439	34.39 ^b
SODN 1.6	8 205	82.05

^b $P < 0.01$ vs Control.

表 2 CD44A/SODN-OF 处理 MGC80-3 细胞后不同时间 CD44 分子阳性细胞的变化

Time (h)	CD44 ⁺ cell (/10 000)	CD44 expression (%)
Control 24	8 996	89.96
ASODN 24	9 551	95.51 ^b
SODN 24	9 876	98.76
Control 48	8 949	89.49
ASODN 48	4 419	44.19 ^b
SODN 48	9 824	98.24
Control 72	8 680	86.80
ASODN 72	3 837	38.37 ^b
SODN 72	9 529	95.29

^b $P < 0.01$ vs Control.

2.2 MGC80-3 细胞 CD44mRNA 表达水平 在 2, 3,

4泳道中清晰可见位于318 bp处的 β -actin和482 bp处的CD44片段(图1), 与对照组和SODN对照组相比, ASODN组的CD44基因表达下降, 相对定量值由1.09降至0.14, 表明CD44mRNA基因的表达受到抑制。

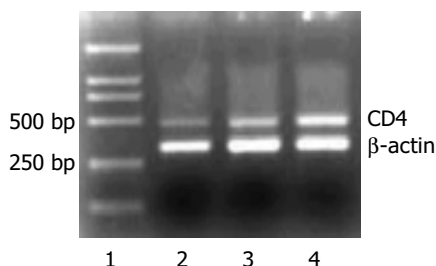


图1 CD44基因的RT-PCR扩增片段电泳结果。1: Marker; 2: ASODN; 3: SODN; 4: Control。

2.3 MGC80-3细胞Fas分子的表达 在HA的刺激下, MGC80-3细胞表面Fas分子表达下降, 由对照1组的21.7%降至对照2组的6.7%($P=0.0001<0.01$), CD44ASODN作用后, 与SODN组和对照2组相比, ASODN组Fas分子表达率显著增高, 由6.7%升至16.8%($P=0.0001<0.01$). 表明用CD44ASODN封闭CD44的表达后, 可显著地提高由HA诱导下降的Fas分子的表达(表3)。

表3 CD44A/SODN-OF处理48 h后MGC80-3细胞Fas阳性细胞的变化

Group	Dose($\times 10^{-3}$ mmol/L)	Fas ⁺ cell number/(10 000)	Fas expression(%)
Control 1		2 169	21.7
Control 2		669	6.7 ^b
ASODN	1.6	1 681	16.8 ^d
SODN	1.6	1 143	11.4

^b $P<0.01$ vs Control 1组; ^d $P<0.01$ vs Control 2组。

2.4 Fas单抗诱导MGC80-3细胞凋亡 对照组未检测到凋亡, 而48hASODN处理组细胞的凋亡率为26.6%, 显著高于SODN组(10.4%)和对照组(0)。

2.5 MGC80-3细胞增生活性 CD44ASODN处理48 h后的MGC80-3细胞, 在HA存在下, 与SODN组和对照组相比, 生长明显受到抑制, 48, 72和96 h的抑制率分别为31.0%、46.3%、49.6%($P=0.0001<0.01$), 并呈时间依赖效应(图2)。

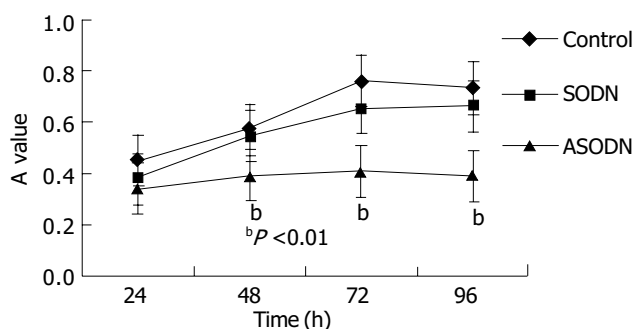


图2 CD44A/SODN-OF对MGC80-3细胞增生的影响。

3 讨论

肿瘤细胞表面常发生CD44表达显著增高, 或表达CD44异构体的独特模式, 与肿瘤的发生、发展与远处侵袭转移关系密切, 是人类肿瘤转移和不良预后的标志。最新研究表明, CD44可以通过多种途径参与肿瘤的免疫逃逸, 其中最重要的就是抑制肿瘤细胞凋亡和促进肿瘤细胞增生。Yasuda *et al*发现肺癌细胞过表达的CD44与其细胞外基质配体低分子质量透明质酸结合后, 降低肺癌细胞表面Fas的表达, 通过Fas/FasL途径降低肺癌细胞对CTL的敏感性, 进而使肺癌细胞逃脱CTL细胞通过FasL/Fas介导的凋亡^[1]。我们在实验中用CD44配体低分子质量HA刺激24 h后, 人低分化黏液腺胃癌MGC80-3细胞Fas分子表达率由21.7%降至6.7%, 采用体外Fas/FasL途径诱导凋亡的研究发现, 用FasmAb作用24 h后, MGC80-3细胞不出现凋亡, 同时细胞的增生活性高, 在体外观察到了胃癌细胞的免疫逃逸作用。为了抑制胃癌细胞增生和诱导凋亡, 我们设计合成CD44ASODN, 转入高表达CD44的人低分化黏液腺胃癌MGC80-3细胞中。结果表明, CD44ASODN封闭和抑制了MGC80-3细胞CD44 mRNA和蛋白表达, 且抑制作用呈时间和剂量依赖效应。用CD44ASODN处理MGC80-3细胞后, 加入HA作用, 细胞的Fas表达显著增高, 由下降的6.7%上升到16.8%。同时, 体外Fas/FasL途径诱导凋亡的研究发现, 加入鼠抗人FasmAb作用24 h后, CD44ASODN处理组细胞出现细胞凋亡, 其凋亡率为26.6%, 显著高于未处理对照组。可见, 用CD44ASODN抑制CD44基因的表达后, 可以显著地提高由HA诱导下降的Fas分子的表达, 并显著增加FasmAb诱导凋亡的敏感性。

大量研究表明, 在肿瘤组织中, 随着肿瘤的进展, CD44表达强度明显增加^[14-16]。因此, CD44的表达强度可以作为肿瘤预后不良的标志^[17-18]。在良性肿瘤中, CD44的表达呈现同质性, 而在恶性黑素瘤中, CD44主要集中于肿瘤的边缘, 促进肿瘤的增生和扩散^[19-20]。CD44分子的高表达促进肿瘤细胞的增生^[21], 增生能力的提高又促进CD44分子的表达^[22-23]。CD44与其配体HA结合之后, 引发细胞间 Ca^{2+} 流动, 促进细胞的增生^[24-26]。我们用 1.6×10^{-3} mmol/L CD44ASODN作用于MGC80-3细胞24 h后, 向培养液中加入HA继续作用24, 48, 72, 96 h, 发现CD44ASODN处理组较对照组具有明显的增生抑制作用, 且呈时间依赖性, 与CD44ASODN显著抑制CD44mRNA和蛋白的表达相一致, 因此表明, MGC80-3细胞的增生抑制可能是反义基因封闭CD44基因的表达所致。肿瘤细胞最基本的特征是无限制增生和凋亡抵抗。我们发现, 用CD44反义寡核苷酸阻断CD44的表达后, 一方面抑制MGC80-3细胞的增生能力, 另一方面增加MGC80-3细胞表面Fas的表达, 增加MGC80-3细胞对FasmAb诱导凋亡的敏感性, 提示CD44基因有可能成为肿瘤生物治疗的靶点。

4 参考文献

- 1 Yasuda M, Tanaka Y, Fujii K, Yasumoto K. CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol* 2001;13:1309-1319
- 2 Weil D, Garcon L, Harper M, Dumenil D, Dautry F, Kress M. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques* 2002;33:1244-1248
- 3 Beale G, Hollins AJ, Benboubetra M, Sohail M, Fox SP, Benter I, Akhtar S. Gene silencing nucleic acids designed by scanning arrays: anti-EGFR activity of siRNA, ribozyme and DNA enzymes targeting a single hybridization-accessible region using the same delivery system. *J Drug Target* 2003;11:449-456
- 4 Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. *J Clin Invest* 2003;111:1563-1570
- 5 Sheehy MR. A flow-cytometric method for quantification of neuropilofuscin and comparison with existing histological and biochemical approaches. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34:233-248
- 6 刘宇宏, 刘敬忠, 肖白, 王世鑫. CD₄₄ 在胃癌中异常表达的临床意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:89-90
- 7 Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett* 2002;528:101-108
- 8 王咏梅, 吴宗贵, 李莉, 张玲珍, 仲人前. 透明质酸酶和透明质酸对血管内皮细胞增生及 CD44 表达的影响. *第二军医大学学报* 2001;22:144-147
- 9 Li Y, Raffo AJ, Drew L, Mao Y, Tran A, Petrylak DP, Fine RL. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. *Cancer Res* 2003;63:1527-1533
- 10 Meli M, D'Alessandro N, Tolomeo M, Rausa L, Notarbartolo M, Dusonchet L. NF-kappaB inhibition restores sensitivity to Fas-mediated apoptosis in lymphoma cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:232-236
- 11 Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Wiedner T, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* 2003;22:9131-9141
- 12 Brun P, Panfilo S, Daga Gordini D, Cortivo R, Abatangelo G. The effect of hyaluronan on CD44-mediated survival of normal and hydroxyl radical-damaged chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:208-216
- 13 Luan X, Diekwisch TG. CP27 affects viability, proliferation, attachment and gene expression in embryonic fibroblasts. *Cell Prolif* 2002;35:207-219
- 14 Terpe HJ, Storkel S, Zimmer U, Anquez V, Fischer C, Pantel K, Gunthert U. Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive correlation to tumor differentiation. *Am J Pathol* 1996;148:453-463
- 15 Zagorianakou N, Stefanou D, Makrydimas G, Zagorianakou P, Briasoulis E, Karavasilis B, Agnantis NJ. CD44s expression, in benign, borderline and malignant tumors of ovarian surface epithelium. Correlation with p53, steroid receptor status, proliferative indices (PCNA, MIB1) and survival. *Anticancer Res* 2004;24:1665-1670
- 16 Lewy-Trenda I, Omulecka A, Janczukowicz J, Papierz W. CD44 expression in human meningiomas: an immunohistochemical analysis. *Pol J Pathol* 2004;55:33-37
- 17 Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, Kubota A, Furukawa M, Miyagi Y, Tsukuda M. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:35-41
- 18 辛彦, 赵凤凯, 张素敏, 吴东瑛, 王艳萍, 徐蕾. CD44v6 基因编码蛋白表达与胃癌转移和预后的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7:210-214
- 19 Serra M, Rabanal RM, Miquel L, Domenzain C, Bassols A. Differential expression of CD44 in canine melanocytic tumours. *J Comp Pathol* 2004;130:171-180
- 20 Bockhorn M, Roberge S, Sousa C, Jain RK, Munn LL. Differential gene expression in metastasizing cells shed from kidney tumors. *Cancer Res* 2004;64:2469-2473
- 21 Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, Yang DZ, Shi JS, Liang AL, Liu NN, Wang XM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D. *World J Gastroenterol* 2003;9:1482-1486
- 22 Rioux-Leclercq N, Epstein JJ, Bansard JY, Turlin B, Patard JJ, Manunta A, Chan T, Ramee MP, Lobel B, Moulinoux JP. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:1209-1215
- 23 Zolota V, Tsamandas AC, Melachrinou M, Batistatou A, Scopa C. Expression of CD44 protein in renal cell carcinomas: association with p53 expression. *Urol Oncol* 2002;7:13-17
- 24 Singleton PA, Bourguignon LY. CD44 interaction with ankyrin and IP3 receptor in lipid rafts promotes hyaluronan-mediated Ca(2+) signaling leading to nitric oxide production and endothelial cell adhesion and proliferation. *Exp Cell Res* 2004;295:102-118
- 25 Termeer C, Averbek M, Hara H, Eibel H, Herrlich P, Sleeman J, Simon JC. Targeting dendritic cells with CD44 monoclonal antibodies selectively inhibits the proliferation of naive CD4+ T-helper cells by induction of FAS-independent T-cell apoptosis. *Immunology* 2003;109:32-40
- 26 Singleton PA, Bourguignon LY. CD44v10 interaction with Rho-kinase(ROK) activates inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-mediated Ca2+ signaling during hyaluronan (HA)-induced endothelial cell migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002;53:293-316