

反义 Survivin 诱导食管鳞癌细胞凋亡

赵 晶, 刘铁夫, 董春燕, 博挽澜

赵晶, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院消化内科

黑龙江省哈尔滨市 150086

刘铁夫, 博挽澜, 哈尔滨医科大学附属第一临床医学院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150001

董春燕, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科上海市 200433

通讯作者: 赵晶, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院消化内科, qiaoxiao0451@126.com
电话: 0451-86605143

收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 研究 Survivin ASODN 联合三氧化二砷(As_2O_3)对食管鳞癌细胞系 EC109 凋亡的影响。

方法: 设计合成特异性 Survivin 反义寡核苷酸(ASODN). 细胞分成 6 组: 空白对照组、空脂质体转染对照组、正义链转染对照组、160、200、240 nmol/L 反义链转染组. 以阳离子脂质体为载体转染至 EC109 细胞内, 用 Western blot 法检测各组细胞 Survivin 蛋白表达情况; TUNEL 法检测细胞凋亡情况; MTT 法检测 As_2O_3 和 5-氟尿嘧啶(5-Fu)对转染前后细胞的生长抑制情况。

结果: 各浓度 ASODN 转染组癌细胞 Survivin 蛋白表达有不同程度减少, 而各对照组细胞 Survivin 蛋白表达无明显变化. 各 ASODN 转染组细胞凋亡指数明显高于各对照组(5.48 ± 1.56 , 6.04 ± 1.95 , 11.92 ± 1.76 vs 1.52 ± 0.73 , $P < 0.05$), 以 240 nmol/L 转染组明显高于 160 和 200 nmol/L 组($11.92 \pm 1.76\%$ vs $5.48 \pm 1.56\%$, $6.04 \pm 1.95\%$, $P < 0.05$). 240 nmol/L 转染组中 As_2O_3 对肿瘤细胞生长抑制率明显高于 5-Fu 组($56.40 \pm 1.27\%$ vs $43.49 \pm 0.83\%$, $P < 0.05$).

结论: Survivin ASODN 转染食管鳞癌细胞能下调 Survivin 蛋白的表达, 诱导食管鳞癌细胞凋亡, 抑制细胞增值, 增加食管鳞癌细胞对化疗药物 As_2O_3 的敏感性。

赵晶, 刘铁夫, 董春燕, 博挽澜. 反义 Survivin 诱导食管鳞癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2005;13(12):1447-1449

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1447.asp>

0 引言

Survivin 是新近发现的一种抗凋亡因子^[1], 针对此基因的反义核酸能够诱导细胞自发性凋亡和明显抑制肿瘤的生长, 为肿瘤的基因治疗提供了新的靶位. As_2O_3 是我国传统中药砒霜的主要成分, 近年 As_2O_3 用于急性早幼粒白血病 (APL) 临床治疗收到良好的疗效, 其在治疗实体瘤方面的研究也取得了一定的成果^[2]. 为探讨靶向 Survivin 在食管鳞癌治疗中的意义和价值以及 As_2O_3 在食管鳞癌化

疗方面的应用, 我们设计合成 Survivin 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASODN), 将 Survivin ASODN 转染至食管鳞癌细胞株 EC109 中, 观察不同浓度的 ASODN 对食管鳞癌细胞凋亡的影响, 以及转染后食管鳞癌细胞对 As_2O_3 敏感性的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞株 EC109 购自中科院上海细胞所, 用含 10 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液常规条件下培养. 阳离子脂质体 (Oligofectamine Reagent) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 根据 Survivin 的 mRNA 序列^[3], 设计合成 Survivin mRNA 232-251 序列的 20 个碱基组成的 ASODN 链, 序列为: 5'-CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3', 并同时合正义链, 均全程硫代修饰, 反义链 5' 端以荧光蛋白标记. 全部寡核苷酸均由上海生工公司合成. 取对数生长期的食管鳞癌 EC109 细胞, 分设对照组和 160、200 和 240 nmol/L ASODN 转染组. 转染过程按照转染试剂盒说明书进行, 24 h 后收集各组细胞用于后续实验。

1.2.2 Western blot 法检测食管鳞癌细胞系 Survivin 蛋白表达 各组细胞胰酶消化离心后裂解, SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 一抗 (兔抗人 Survivin 抗体) 和二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG) 的稀释浓度分别为 1:500 和 1:1 000, 用 DAB 染色法染色, 观察结果。

1.2.3 TUNEL 法检测食管鳞癌细胞系的凋亡情况 用多聚赖氨酸处理玻片, 转染后各组细胞爬片, 检测方法按照说明书进行. 光学显微镜下分析结果, 凋亡指数 (AI) 计算方法: 数 5 个高倍镜 >500 个细胞, 分别计数凋亡细胞和总细胞数. 凋亡指数 (AI) = 凋亡细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 MTT 法检测三氧化二砷对各组细胞的生长抑制率 取对数生长期的待检各组细胞, 胰酶消化后用 1640 培养液配成 1×10^7 /L 细胞悬液, 接种于 96 孔板内, 每孔 200 μ L 上述细胞悬液, 每组细胞均设化疗药物 As_2O_3 (2 μ mol/L) 实验孔、5-Fu (1 mg/L)^[4] 实验孔和空白对照孔, 每组设置 4 个平行孔. 常规条件下培养 48 h, 每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L, 继续培养 4 h, 去上清液, 每孔加入 DMSO 0.2 mL, 振荡 10 min. 用酶标仪在 570 nm 处检测各孔光密度 (A) 值, 计算细胞生长抑制率 (IR) = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

统计学处理 实验结果用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表

示,用SPSS 12.0统计软件进行分析,其中凋亡指数结果采用单因素方差分析,生长抑制率结果用单变量双因素方差分析。

2 结果

2.1 ASODN转染后食管鳞癌EC109细胞Survivin蛋白表达情况(Western blot法) 各浓度ASODN转染组Survivin蛋白表达有不同程度的下调,以240 nmol/L转染组最明显。各对照组之间Survivin蛋白表达无明显变化(图1)。

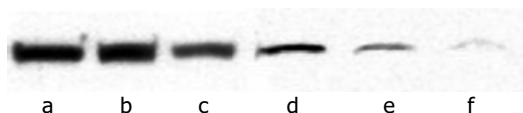


图1 Western blot法检测转染后各组细胞Survivin蛋白表达情况。a:空白对照组; b:空脂质体转染对照组; c:正义链转染对照组; d:160 nmol/L ASODN组; e:200 nmol/L ASODN组; f:240 nmol/L ASODN组。

2.2 TUNEL法检测转染后各组细胞凋亡情况 各浓度ASODN转染可不同程度诱导EC109细胞凋亡,各ASODN转染组细胞凋亡指数明显高于各对照组($P<0.05$),以240 nmol/L ASODN组最为明显($P<0.05$),而各对照组间比较差异无显著性($P>0.05$)(表1)。

2.3 ASODN转染后食管鳞癌细胞对化疗药物敏感性变化情况 各组化疗药物对各浓度组ASODN转染的EC109细胞生长抑制率明显高于各对照组($P<0.05$)(表1)。

表1 转染后各组细胞的凋亡情况及生长抑制率

细胞分组	AI(%)	IR(%)	
		5-Fu	As ₂ O ₃
空白对照组	1.52 ± 0.73	25.44 ± 3.39	36.51 ± 5.45
空脂质体转染			
对照组	1.84 ± 0.89	24.48 ± 2.55	33.35 ± 2.04
正义链转染			
对照组	2.16 ± 0.74	25.01 ± 3.11	35.46 ± 0.67
160 nmol/L			
ASODN转染组	5.48 ± 1.56 ^a	33.14 ± 1.98 ^e	43.92 ± 1.23 ⁱ
200 nmol/L ASODN			
转染组	6.04 ± 1.95 ^a	36.42 ± 1.32 ^e	46.37 ± 0.50 ⁱ
240 nmol/L ASODN			
转染组	11.92 ± 1.76 ^{ac}	43.49 ± 0.83 ^{eg}	56.40 ± 1.27 ^{ikl}

^a $P<0.05$ vs 三组对照组, ^e $P<0.05$ vs 160, 200 nmol/L ASODN转染组, ⁱ $P<0.05$ vs 三组对照组, ^a $P<0.05$ vs 160, 200 nmol/L ASODN转染组, ⁱ $P<0.05$ vs 三组对照着组, ^k $P<0.05$ vs 160, 200 nmol/L ASODN转染组, ^l $P<0.05$ vs 240 nmol/L ASODN 5-Fu组。

3 讨论

细胞凋亡是生物机体清除受伤细胞或无用细胞的一种生理机制,是在进化上非常保守的细胞死亡程序,而执行细

胞凋亡的核心物质是一组半胱氨酸-天冬氨酸蛋白水解酶(caspase),又称胱冬肽酶。机体在行使凋亡抑制作用时,凋亡抑制蛋白发挥着极为重要的作用,他主要包括Bcl-2家族中抗凋亡成员,死亡受体阻断分子和凋亡抑制蛋白(IAP)家族。Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族的新成员,正常人主要见于胚胎和发育的胎儿组织,但不见于终末分化的成人组织(胸腺和生殖腺除外),当细胞发生转化或者细胞恶变时又重新获得表达,在大多数肿瘤组织内均可检测到Survivin有不同程度的表达^[5-6]。Survivin与细胞周期调控和细胞凋亡的关系已经被大多数实验所证实^[7-10]。

目前国内外就反义核酸Survivin诱导肿瘤细胞凋亡的研究正在逐渐展开,主要集中在白血病、胃癌^[11]、肝癌^[12]和胰腺癌^[13]上,而对食管鳞癌的研究尚未见报道。As₂O₃用于肿瘤治疗的研究是近几年开展起来的,在治疗血液系统肿瘤中取得了良好的疗效。目前认为,其可能的作用机制是通过线粒体依赖途径诱导肿瘤细胞凋亡^[14]。在实体瘤治疗方面的研究显示其对肺腺癌GLC-82,胃腺癌MGC-803和SGC-7901、肝癌HepG-2, BEL-7402等肿瘤细胞系比较敏感,而对食管鳞癌EC109敏感性稍差^[15],限制了As₂O₃在食管鳞癌治疗方面的应用。

我们将不同浓度的Survivin ASODN转染至食管鳞癌EC109细胞内,观察转染后癌细胞的Survivin基因表达,癌细胞凋亡情况和癌细胞对化疗药物As₂O₃的敏感性变化。Western Blot法结果显示各浓度ASODN转染组Survivin蛋白表达有不同程度的下调,以240 nmol/L转染组最明显,说明Survivin ASODN封闭了Survivin基因,抑制了Survivin基因的表达。用TUNEL法检测转染后癌细胞的凋亡指数,结果显示各浓度ASODN转染组癌细胞凋亡指数均增高,和对照组比较有显著性差异,并与ASODN浓度成正相关。由此可见,封闭Survivin基因,可减少Survivin蛋白的表达,解除Survivin对凋亡的抑制作用,从而在一定程度上恢复癌细胞的凋亡机制,使癌细胞凋亡增多,抑制了肿瘤的发展。

食管鳞癌细胞对As₂O₃不敏感,限制他在食管鳞癌治疗方面的应用。本实验用Survivin ASODN转染食管鳞癌细胞后,使癌细胞的凋亡机制在一定程度上有所恢复,再给予化疗药物As₂O₃,结果显示转染后食管鳞癌细胞对As₂O₃的敏感性增高,与5-Fu组对比,对肿瘤细胞的生长具有更显著的抑制作用,这提示我们封闭Survivin基因表达和As₂O₃在诱导癌细胞凋亡方面具有协同作用,但Survivin ASODN和As₂O₃在诱导肿瘤细胞凋亡方面的协同作用机制还有待于进一步的研究。

总之,本实验的研究结果显示以Survivin作为靶位的基因治疗具有可行性,并为As₂O₃在食管鳞癌治疗方面的应用奠定了一定的实验基础。

4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expression in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997;3:917-921
- 2 高虎, 赵治华, 杨峰. 三氧化二砷诱导细胞凋亡治疗消化道肿瘤的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:710-711
- 3 Xia C, Xu Z, Yuan X, Uematsu K, You L, Li K, Li L, McCormick F, Jablons DM. Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2002;1:687-694
- 4 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术. 第一版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:447-448
- 5 Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-19
- 6 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-584
- 7 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000;19:3225-3234
- 8 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320
- 9 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-1085
- 10 Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40:1117-1123
- 11 Yang JH, Zhang YC, Qian HQ. Survivin antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1121-1124
- 12 Cheng SQ, Wang WL, Yan W, Li QL, Wang L, Wang WY. Knockdown of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *World J Gastroenterol* 2005;11:756-759
- 13 王亚利, 宋天保, 王西京, 王中卫, 宋淮, 郝小静. Survivin mRNA 反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2004;12:1872-1874
- 14 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 15 林晨, 邓友平, 郑杰, 付明, 陈洁平, 肖培根, 吴旻. 三氧化二砷诱导人肿瘤细胞凋亡和 G2+M 期阻滞但引起人永生化宫颈上皮细胞 G1 期阻滞. *中国医学科学院学报* 2000;22:124-129

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗预防大肠癌术后肝转移的实验

杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 乔伟伟, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越

杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 上海市华东医院普外科 上海市 200040

乔伟伟, 复旦大学动物实验部 上海市 200032

张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越, 上海市华东医院消化科 上海市 200040

通讯作者: 杜卫东, 200040, 上海市华东医院普外科.

收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-04-20

摘要

目的: 观察血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗对预防大肠癌术后肝转移的作用。

方法: RT-PCR 克隆血管抑素基因, 建立重组腺病毒载体. 建立人结肠癌 LoVo 肝转移种植模型, 给予血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗. 观察其对大肠癌细胞肝转移的影响。

结果: 血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗治疗组肝转移发生率明显低于其他各组($P < 0.05$), 肝转移瘤数少于其他各组($P < 0.05$), 荷瘤生存时间长, 治疗组肿瘤组织中血管抑素基因表达为阳性, MVD 明显低于其他各组。

结论: 血管抑素的基因治疗与传统的腹腔化疗联合应用, 对预防裸鼠人 LoVo 结肠癌细胞肝转移有一定的作用。

杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 乔伟伟, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越. 血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗预防大肠癌术后肝转移的实验. *世界华人消化杂志* 2005;13(12):1449-1451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1449.asp>

0 引言

大肠癌术后肝转移的发生率甚高^[1], 大剂量腹腔化疗对防治术后肝转移有重要的临床意义^[2]. 我们用裸鼠人 LoVo 结肠癌肝转移模型, 观察血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗对预防大肠癌术后肝转移的作用, 为血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗在大肠癌患者的应用提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、M-MLV 逆