

文章编号:1005-6947(2005)11-0809-04

· 胰腺癌专题研究 ·

β1 整合素反义寡核苷酸对人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的治疗作用

黄涛, 高军, 冯延平, 常青, 胡均, 秦仁义, 裘法祖

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨 β1 整合素反义寡核苷酸 (ASODN) 对裸鼠人胰腺癌移植瘤生长和基因表达的影响。方法 建立裸鼠人胰腺癌皮下移植瘤模型, 随机分为 3 组: 对照组 (皮下注射脂质体和转染液)、非特异序列 (RODN) 组 (皮下注射 RODN、脂质体和转染液) 和 ASODN 组 (皮下注射 ASODN、脂质体和转染液)。治疗后计算抑瘤率和肿瘤缩小率, 检测肿瘤中 β1 整合素 mRNA 和蛋白表达。结果 RODN 组、ASODN 组抑瘤率分别为 4.75% 和 72.70%, ASODN 组肿瘤缩小 10.91%。与其他两组比较, ASODN 组裸鼠肿瘤中 β1 整合素 mRNA 和蛋白表达水平明显降低。结论 靶向 β1 整合素的反义寡核苷酸对人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的生长具有一定的抑制作用, 可能为胰腺癌治疗提供新的方法。

关键词: 胰腺肿瘤/治疗; 寡核苷酸类, 反义/治疗应用; 肿瘤移植

中图分类号: R735.9; Q555.7

文献标识码: A

Effect of integrin-β1 antisense oligodeoxynucleotides on human pancreatic carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice

HUANG Tao, GAO Jun, FENG Yan-ping, CHANG Qing, HU Jun, QIN Ren-yi, QIU Fa-zu
(Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of integrin-β1 antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on human pancreatic carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice. **Methods** The models of human pancreatic carcinoma transplanted subcutaneously were established in nude mice, then divided randomly into 3 groups and different treatment was given respectively (control group, random oligodeoxynucleotide group and ASODN group). After treatment, the weight of nude mice and tumor volume were observed, and the tumor growth inhibitory rate and the tumor response rate were calculated. The expressions of integrin-β1 mRNA and protein in tumor tissue were determined by RT-PCR and Western-blot. **Results** The tumor growth inhibitory rate in the random oligodeoxynucleotide group and the ASODN group was 4.75% and 72.70%, respectively. The tumor decrease rate of the ASODN group was 10.91%. The expression level of integrin-β1 mRNA and protein was decreased in the ASODN group compared with other 2 control groups. **Conclusions** Our findings suggest that integrin-β1 antisense oligodeoxynucleotides result in marked inhibition of human pancreatic carcinoma growth in nude mice. It may be a novel treatment approach for human pancreatic carcinoma.

Key words: Pancreatic Neoplasms/ther; Oligodeoxynucleotides, Antisense/ther use; Neoplasms Transplantation

CLC number: R735.9; Q555.7

Document code: A

整合素 (integrins) 是由 α 和 β 两个亚基组成的

异二聚体, 除介导细胞与细胞外基质 (ECM) 的黏附, 还参与细胞的多种生理功能和病理过程。β1 亚基分别与 α1, α5, αv 等亚基组合构成整合素分子, 与其配体 IV 型胶原蛋白、纤维黏素 (FN) 和层黏连蛋白 (LN) 等结合, 调节正常细胞及肿瘤细胞的凋亡、增殖、迁移及黏附。本研究旨在通过建立

收稿日期: 2005-05-16; 修订日期: 2005-10-24。

作者简介: 黄涛 (1968-), 男, 河南安阳人, 华中科技大学同济医学院附属同济医院主治医师, 博士, 主要从事胆胰肿瘤方面的研究。

通讯作者: 秦仁义 电话: 027-83663814; E-mail: ryqin@tjh.tjmu.edu.cn。

裸鼠人胰腺癌皮下移植瘤模型,观察靶向 $\beta 1$ 整合素的反义寡核苷酸 (ASODN) 在体内的抑瘤效果和对靶基因表达的影响,为进一步临床应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 $\beta 1$ 整合素反义寡核苷酸的合成

$\beta 1$ 整合素 ASODN 序列: 5' T* G* C AGT AAG CAT CCA T* G* T 3', 非特异序列 (RODN) 5' G* C* A ACG AGA GAG CCG T* C* G 3' (* 为硫代位点: 由硫原子取代磷酸基中一个氧原子, 形成硫代磷酸化寡核苷酸, 以阻止其被核酶降解), 由大连宝生物公司合成。

1.2 细胞培养及裸鼠胰腺癌皮下移植瘤模型的建立

高转移人胰腺癌细胞株 BXPC-3 购于上海生化所。细胞接种于含 10% 小牛血清 (Hyclone 公司)、DMEM 培养液 (Gibico 公司) 中, 在 37℃, 95% 湿度及 5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数期的细胞用 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液, 调节细胞浓度为 1×10^{10} /L。BALB/C (nu/nu) 裸小鼠 15 只 (购于湖北省疾病预防控制中心), 4~6 周龄, 体重 18~22 g, 雌雄不分, 饲养在 SPF 级无菌饲养室, 自由饮食。于每只裸鼠背部皮下接种 0.2 mL 细胞悬液。接种后每天观察注射点有无破溃红肿, 按规定时间测量肿瘤体积和裸鼠体重。

1.3 实验动物分组和给药

皮下接种 15 d 后, 15 只荷瘤鼠被随即分为 3 组, 每组 5 只, 称重并测量肿瘤体积。根据不同组别于瘤体周围皮下注射药物。(1) 对照组: 注射 DOSPER 脂质体 (Roche, USA) 10 μ g + 转染液 (无血清无抗生素 DMEM 培养液) 总量 500 μ L。(2) RODN 组: 注射 DOSPER 脂质体 10 μ g + RODN 32 μ g + 转染液总量 500 μ L。(3) ASODN 组: 注射 DOSPER 脂质体 10 μ g + ASODN 32 μ g + 转染液总量 500 μ L。每隔 5 d 注射 1 次, 共 3 次。注射前脂质体先室温下溶于转染液中 30 min, 再与寡核苷酸包裹并室温下静置 15 min。第 3 次注射后 5 d 处死裸鼠。每次注射前及处死裸鼠前均测量肿瘤体积及裸鼠体重。用游标卡尺测量肿瘤最长径 (L) 和横径 (S), 按 $V (\text{mm}^3) = 0.5 \times L \times S^2$ 换算出肿瘤的近似体积。处

死裸鼠, 取出肿瘤并称重。肿瘤组织储存在液氮中备用。肿瘤生长抑制率计算公式: 抑瘤率 (%) = $(1 - \text{治疗组平均瘤体积} / \text{对照组开始平均瘤体积}) \times 100\%$ 。肿瘤缩小率 = $(1 - \text{治疗前平均瘤体积} / \text{治疗后平均瘤体积}) \times 100\%$ 。

1.4 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测胰腺癌移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素 mRNA 的表达

取各组裸鼠的肿瘤组织在液氮中研磨后, 用 Trizol 试剂抽提总 RNA, 用逆转录酶和 oligo (dT) 按 37℃ 60 min, 95℃ 5 min 条件进行 cDNA 的合成。取 1 μ L 逆转录产物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95℃ 变性 5 min, 95℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s; 32 个循环, 72℃ 延伸 10 min。反应体系以 β -actin 作为内参照。 $\beta 1$ 整合素上游引物为 5'-AAT GAA GGG CGT GTT GGT AG-3'; 下游引物为 5'-CTG CCA GTG TAG TTG GGG TT-3'; 扩增产物为 290 bp。 β -actin 上游引物为 5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3'; 下游引物为 5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT TGC TG-3'; 扩增产物为 546 bp。

1.5 Western 印迹法检测胰腺癌移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素蛋白的表达

取 100 mg 肿瘤组织加入 1 mL 裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L aprotinin, 1% NP-40)。取 50 μ g 蛋白质, 行变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭; 加 $\beta 1$ 整合素一抗 (1:1 000), 4℃ 过夜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h; 采用 ECL (Pierce 公司) 试剂盒进行化学发光显影, 测定条带吸光度值。

1.6 统计学分析

结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 差异的显著性采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 ASODN 对裸鼠人胰腺癌皮下移植瘤的影响

所有裸鼠成瘤并在治疗过程中存活, 接种点无红肿破溃。治疗前肿瘤体积和裸鼠体重均无统计学差异。治疗期间对照组和 RODN 组肿瘤体积进行性增大, 两组肿瘤体积比较差异无统计学意义 (*P*

> 0.05); ASODN 组治疗 5 d 时肿瘤体积略有增大,但随着时间的延长,肿瘤开始进行性缩小,至第 10 d 和第 15 d 时,与同期其他两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。ASODN 组、RODN 组抑瘤率分别为 4.75% 和 72.70%, ASODN 组肿瘤缩小 10.91%。治疗期间各组裸鼠生长状态良好,无肉眼可见毒副反应,各组体重比较无统计学差异 ($P > 0.05$) 并呈增长趋势(表 1~4)。

表 1 不同时间裸鼠肿瘤体积比较

| 组别 | 肿瘤体积(mm^3) | | | |
|-------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 0d | 5d | 10d | 15d |
| 对照 | 99.34 ± 6.53 | 136.56 ± 5.46 [†] | 211.42 ± 8.59 [†] | 328.98 ± 16.82 [†] |
| RODN | 98.36 ± 5.91 | 132.96 ± 6.29 [†] | 204.18 ± 14.04 [†] | 313.34 ± 11.64 [†] |
| ASODN | 99.62 ± 7.12 | 113.90 ± 8.54 | 101.00 ± 5.72 | 89.82 ± 2.23 |

注:†与 ASODN 比较 $P < 0.01$

表 2 不同时间抑瘤率

| 组别 | 抑瘤率(%) | | |
|-------|--------|-------|-------|
| | 5d | 10d | 15d |
| 对照 | - | - | - |
| RODN | 2.64 | 3.42 | 4.75 |
| ASODN | 16.59 | 52.23 | 72.70 |

表 3 治疗后肿瘤缩小率比较

| 组别 | 治疗前肿瘤体积 | 治疗后肿瘤体积 | 肿瘤缩小率 |
|-------|-------------------|-------------------|-------|
| | (mm^3) | (mm^3) | |
| RODN | 98.36 ± 5.91 | 313.34 ± 11.64 | - |
| ASODN | 99.62 ± 7.12 | 89.82 ± 2.23 | 10.91 |

表 4 治疗前后裸鼠体重变化

| 组别 | 裸鼠体重(g) | |
|-------|--------------|--------------|
| | 治疗前 | 治疗后 |
| 对照 | 20.36 ± 1.40 | 21.88 ± 1.38 |
| RODN | 20.94 ± 1.59 | 22.10 ± 1.74 |
| ASODN | 20.36 ± 1.44 | 21.72 ± 1.52 |

2.2 胰腺癌移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素 mRNA 和蛋白的表达

3 组裸鼠移植瘤组织中均有 $\beta 1$ 整合素 mRNA 和蛋白的表达,但 ASODN 组两指标表达水平明显低于其他两组 ($P < 0.05$);RODN 组与对照组相比, $\beta 1$ 整合素 mRNA 和蛋白水平无统计学差异 ($P > 0.05$)。ASODN 在裸鼠体内能有效地阻止 $\beta 1$ 整合素靶基因的转录,并抑制其蛋白的翻译和表达,该作用具有序列特异性(图 1,2)。

A: ASODN 组; B: RODN 组; C: 对照组; M: DL2000 marker

图 1 ASODN 对胰腺癌移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素 mRNA 表达的影响

1: ASODN 组; 2: RODN 组; 3: 对照组

图 2 ASODN 对胰腺癌移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素蛋白表达的影响

3 讨论

近年来,由于 DNA 合成技术的改进和合成仪器的研制成功,反义寡核苷酸作为药理学工具和治疗制剂的研究已经取得实质性进展。反义寡核苷酸与 mRNA 上特定的靶序列互补或“反义”,可

阻断 mRNA 的翻译,调节基因到蛋白质的信息传递,抑制蛋白质的表达。硫代修饰的反义寡核苷酸因其具有水溶性、核酶裂解稳定性以及易于大量人工合成的优点而成为最成功的第一代寡核苷酸替代物。目前,除反义药物福米韦生(fomivir-

en) 在欧美上市外, 还有 30 多种反义药物进入临床试验。其中针对肿瘤相关基因 bcl-2, H-ras, PKC α , Raf-1 和 c-myc 等设计的反义寡核苷酸药物已取得一定的疗效^[1]。随着肿瘤相关基因作用机制的深入研究, 将会有更多的反义药物应用于肿瘤治疗中。

$\beta 1$ 整合素表达上调是肿瘤恶性表型的分子学改变之一^[2]。肿瘤侵袭性生长与肿瘤细胞的增殖、凋亡等密切相关。整合素受体和生长因子受体之间“crosstalk”激活下游的整合素相关激酶(integrin-linked kinase, ILK)、局灶黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)和 c-Src 等信号传导分子, 通过细胞周期调控肿瘤细胞的增殖^[3~7]。凋亡抑制是肿瘤细胞生物学特性之一。破坏正常上皮细胞上整合素与 ECM 的相互作用, 将会促使凋亡的发生, 这一过程即失巢凋亡(anoikis)^[8]。 $\beta 1$ 整合素可能通过激活有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)、蛋白激酶 B/丝苏氨酸激酶(PKB / AKT)抑制凋亡的发生^[9,10]。研究表明^[11], $\beta 1$ 整合素在胰腺癌的侵袭转移中具有重要作用, 调节其表达或活性可能成为治疗胰腺癌的一种新策略。

本研究建立裸鼠人胰腺癌皮下移植瘤模型, 采用脂质体体内转染部分硫代修饰的 $\beta 1$ 整合素的 ASODN, 观察抑瘤效果和对靶基因表达的影响。结果表明, 正常对照组和 RODN 组的肿瘤体积进行性增大, 而 $\beta 1$ 整合素 ASODN 组肿瘤体积进行性缩小, 与正常对照组和 RODN 组相比差异有统计学意义; 采用 RT-PCR 和 Western 印迹方法, 检测到 ASODN 组胰腺癌移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素 mRNA 表达明显受到抑制, 翻译的蛋白产物, 即 $\beta 1$ 整合素蛋白表达水平显著下降, 而正常对照组和 RODN 组移植瘤组织中 $\beta 1$ 整合素表达水平无明显改变。表明脂质体转染硫代修饰 ASODN 在体内对 $\beta 1$ 整合素具有较好的选择性、特异性阻断效果。3 组治疗过程中裸鼠的体重均呈增长趋势, 生长状态良好, 无肉眼可见的毒性反应。有关 $\beta 1$ 整合素

ASODN 抑制胰腺癌生长的机制尚待进一步探讨。

本研究结果提示, $\beta 1$ 整合素的 ASODN 在体内对胰腺癌具有一定的抑瘤效果和安全性, $\beta 1$ 整合素 ASODN 可能成为一种有效的抗肿瘤药物。

参考文献:

- [1] Pirollo KF, Raita A, Sleerb LS, *et al.* Antisense therapeutics: from theory to clinical practice [J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 99(1): 55-77.
- [2] Skubitz AP. Adhesion molecules [J]. *Cancer Treat Res*, 2002, 107: 305-329.
- [3] Wang F, Hansen RK, Radisky D, *et al.* Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(19): 1494-1503.
- [4] Dedhar S, Williams B, Hannigan G. Integrin-linked kinase (ILK): A regulator of integrin and growth-factor signalling [J]. *Trends Cell Biol*, 1999, 9(8): 319-323.
- [5] Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase [J]. *Bioessays*, 1997, 19(2): 137-145.
- [6] Howe A, Aplin AE, Alahari SK, *et al.* Integrin signaling and cell growth control [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 220-231.
- [7] Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, *et al.* FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(5): 249-256.
- [8] Berman AE, Kozlova NI. Integrins: structure and functions [J]. *Membr Cell Biol*, 2000, 13(2): 207-244.
- [9] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, *et al.* Transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis is blocked by beta 1-integrin-mediated mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(11): 878-886.
- [10] Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20(36): 4995-5004.
- [11] Shuichi A, Akihide M, Makoto O. Beta 1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells [J]. *Pancreas*, 2000, 20(2): 129-137.