

文章编号:1005-6947(2006)04-0291-04

· 简要论著 ·

survivin 反义寡核苷酸对 MCF-7 乳腺癌细胞的生长抑制作用

杨策尧¹, 段体德², 刘德权³

(昆明医学院第一附属医院 1. 临床医学实验研究中心 2. 普通外科, 云南 昆明 650032; 3. 昆明医学院第三附属医院 乳腺病科, 云南 昆明 650106)

摘要:为研究 survivin 反义寡核苷酸对 MCF-7 乳腺癌细胞的生长抑制作用,以脂质体介导反义寡核苷酸组(ASODN/lip)、无义寡核苷酸组(NODN/lip)及 RPMI 1640 培养液的空白对照组(lip)转染人乳腺癌 MCF-7 细胞系。用 Hoechst 33258/PI 双重染色观察 MCF-7 细胞的形态学改变;透射电镜观察细胞超微结构;流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的变化;DNA 凝胶电泳观察凋亡情况。结果示:转染后的细胞结构呈凋亡样改变;转染后细胞凋亡显著增加,并出现 G₂/M 期阻滞现象;在 600 ng/mL 和 800 ng/mL ASODN/lip 组的电泳图谱上呈现明显的“梯状”条带。提示反义核酸技术能使乳腺癌细胞中的凋亡抑制基因 survivin 表达下调,诱导乳腺癌细胞发生凋亡;这可为 survivin 靶向治疗提供理论依据。

关键词:乳腺肿瘤/遗传学;细胞凋亡抑制基因;反义寡核苷酸

中图分类号:R737.9; Q343.1 **文献标识码:**B

survivin 是近年来发现的一个新的细胞凋亡抑制基因,能抑制肿瘤细胞凋亡,使肿瘤得以生存。本实验通过转染 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)技术抑制乳癌细胞 survivin 的表达,诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生凋亡,为乳腺癌的基因治疗提供理论依据。

收稿日期:2006-02-14; **修订日期:**2006-03-01。

作者简介:杨策尧,女,广东梅州人,昆明医学院第一附属医院博士研究生,主要从事胃肠、乳腺癌实验方面的研究。

通讯作者:段体德 E-mail:tdduan@163.com。

值得一提的是已有研究报道,通过构建表达 ODC 反义 RNA 的腺病毒载体,体外感染前列腺癌细胞系,可以明显观察到其对前列腺癌细胞增殖的抑制作用^[8],这对利用 ODC 作为靶标进行肿瘤的基因治疗打下了基础。

参考文献:

- [1] Love RR, Astrow SH, Cheeks AM. Ornithine decarboxylase (ODC) as a prognostic factor in operable breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 79(3): 329-334.
- [2] Manni A, Washington S, Griffith JW. Influence of polyamines on in vitro and in vivo features of aggressive and metastatic behavior by human breast cancer cells [J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(2): 95-105.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

MCF-7 人乳腺癌细胞株由中国科学院上海细胞研究所提供。将 MCF-7 乳腺癌细胞加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液,镜下计数;调节细胞至约 1×10^6 个/mL,分别将 MCF-7 接种于 30 mL 培养瓶、96 孔培养板及铺有盖玻片的 6 孔培养板中,37℃ 5% CO₂,常规培养至 80% 汇片

- [3] 孙爱华,刘贤锡. 大肠癌鸟氨酸脱羧酶的表达和临床意义研究 [J]. 中国普通外科进展, 2004, 6(3): 150-152.
- [4] 栗世方. 多胺代谢、ODC 在脑胶质瘤研究中的进展 [J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2003, 30(1): 36-39.
- [5] 蒋滢,黄美英. 多胺代谢与癌肿的研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 32-34.
- [6] 刘贤锡,赵春华. 良性增生前列腺组织中 ODC 活性及多胺含量的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 1996, 12(2): 138.
- [7] 黄宝俊,徐惠绵,李凯等. 联合检测多基因在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4): 247-252.
- [8] 张岩,刘贤锡,张冰等. 鸟氨酸脱羧酶基因反义 RNA 对前列腺癌细胞生长的抑制作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 128-133.

后进行转染。

1.2 脂质体介导 survivinASODN 转染 MCF-7 细胞

1.2.1 寡核苷酸的设计及合成 采用 survivin mRNA 231-251 设计互补 ASODN。ASODN 序列为 5' CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG3'; 对照无义寡核苷酸 (NODN) 序列为 5' CGCAGTAGCTGCGCTGATTG3'。对照序列经基因库 (GeneBank) 比对无相关基因。两条序列每端 5 个磷酸基采用硫代磷酸型 (即在合成时用硫基取代寡核苷酸片段磷酸上的羟基), 部分 ASODN 5FAM 荧光素标记, 由上海生物工程公司提供。

1.2.2 转染混合物的制备及配制 A 液: survivin ASODN 及对照序列的浓度设定为 200, 400, 800, 1200, 1600 ng/mL, 用不含血清及抗生素的 RPMI 1640 将 ASODN 配成上述浓度溶液。B 液: 将 lipofectin; RPMI 1640 (不含血清及抗生素) = 4: 100 μ L 的比例配成 B 液。混合等体积的 A 液与 B 液, 室温下放置约 40 min, 使脂质体与寡核苷酸充分包裹。寡核苷酸的终浓度为 100, 200, 400, 600, 800 ng/mL。

1.2.3 转染 将不同浓度的 ASODN-RPMI 1640 转染混合物加入培养瓶或培养板中。设 6 组: (1) lip 组以 RPMI 1640 培养液代替转染混合物作为空白对照 (加入 lip); (2) NODN 组, 以 NODN/lip-RPMI 1640 转染细胞作为无义对照; (3) 200 ng/mL ASODN 转染组; (4) 400 ng/mL ASODN 转染组; (5) 600 ng/mL ASODN 转染组; (6) 800 ng/mL ASODN 转染组。各组分别在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 常规培养 24 h 后, 弃去转染混合物, 胰酶消化收集细胞。96 孔板中的细胞用于检测细胞贴壁率、细胞生长抑制率以及绘制细胞生长曲线。

1.3 透射电镜观察 MCF-7 细胞超微结构

转染接种于 30 mL 培养瓶的细胞 48 h, 以 0.25% 胰蛋白酶/0.02 EDTA 消化, 戊二醛原位固定, 琼脂包埋沉淀细胞, 梯度丙酮系列脱水, Epon812 系列包埋固定, 超薄切片用醋酸铀及柠檬酸铅染色, 电镜下观察、拍照。

1.4 Hoechst 33258 与碘化丙啶 (PI) 染色细胞形态学观察

荧光显微镜下观察细胞核形态及颜色改变以区分天然细胞、凋亡细胞及坏死细胞。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期

细胞转染结束后培养 48 h 每组收集 2×10^6 个细胞, 预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 细胞重悬于 0.4 mL PBS 中, 加入 10.15 mg/mL 的 PnaseA37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 1 g/mL PI 4 $^{\circ}$ C

染色过夜, 流式细胞仪检测凋亡细胞的比率和细胞周期。资料经 ModFit 软件分析。

1.6 DNA 抽提及电泳

1.6.1 凋亡细胞的 DNA 抽提 收集 2×10^6 /mL 的实验组和对照组细胞, 800 r/min 离心洗涤后, 按凋亡 DNA 提取试剂盒说明书实验。收取 DNA, 弃去无水乙醇后, 用 70% 乙醇混匀漂洗 3 次; 开盖室温放置 15 min 让乙醇挥发, 加入含 1 mmol EDTA, 10 mmol Tris-HCl (pH 7.8) TE 缓冲液, 使 DNA 溶解, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.6.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳 取 10 μ L 提取的 DNA 样品 (含 1 μ g DNA 量) 与 0.25% 溴酚蓝和 40% 蔗糖溶液混匀后, 加入琼脂糖凝胶样品槽内, 在由 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 45 mmol/L Tris - 硼酸缓冲液配制的内含 0.5 μ g/mL 溴乙锭染料的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压稳定在 50 V。电泳 1.5 h 后, 取出标本在紫外灯下观察 DNA 阶梯状条带形成。结果用紫外透射仪观察, 拍照。

1.7 统计学处理

本实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS11.0 软件包进行方差分析。检验标准 $\alpha = 0.05$; $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

处理后的 MCF-7 细胞表现为细胞体积缩小, 细胞完整、细胞膜皱缩、染色质浓缩边聚呈新月形、细胞核固缩与断裂、核仁消失; 细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒状荧光即为早期凋亡细胞 (图 1)。

1: 坏死细胞; 2: 正常细胞; 3: 凋亡细胞

图 1 MCF-7 细胞经 Hoechst 33258/PI 染色后在荧光显微镜下的形态 ($\times 400$)

2.2 DNA 电泳结果

600, 800 ng/mL ASODN 在 lip 介导下处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 在电泳图谱上呈现明显的“梯状”条带 (图 2)。推论 ASODN 在 lip 介导下能诱导 MCF-7 细胞凋亡。

M: marker; 1~6: lip 组, NODN/lip 组及 200, 400, 600, 800 ng/mL ASODN/lip 组

图2 处理 MCF-7 细胞 48 h 后凋亡 DNA 凝胶电泳图

2.3 转染前后细胞周期的变化

细胞周期分析可见转染后各组 G₁ 期细胞分别为 72.62% , 68.26% , 62.38% , 54.65% , 12.98% 及 7.01%。各转染组 G₁ 期细胞显著减少, S 期细

胞无明显变化; 转染后各组 G₂/M 期细胞分别为 5.83% , 4.98% , 7.12% , 12.28% , 40.18% 及 43.82% ; 各转染组 G₂/M 期细胞显著增加, 出现 G₂/M 期阻滞现象。说明 survivin ASODN 能以剂量依赖的方式诱导乳癌细胞阻滞于 G₂/M 期; 随着 ASODN 浓度的增加, 凋亡峰值增大, 200 ng/mL 组凋亡峰值为 (2.38 ± 0.10)% ; 当浓度达到 800 ng/mL 时, 凋亡峰值为 (30.16 ± 1.68)% , 此时 G₂/M 期细胞所占的比例随之增加。ASODN 组不同浓度间差异有显著性 (P < 0.05), 与 lip 组和 NODN/lip 组比较差异亦有显著性 (P < 0.05)。这种差别均见于 G₁ 期、S 期和 G₂/M 期(图 3, 表 1)。

图3 转染 survivin ASODN 前后凋亡峰及细胞周期的变化

表1 转染 24 h 后细胞周期的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	n	凋亡峰	细胞周期		
			G ₁	S	G ₂ /M
lip	4	0.71 ± 0.04	72.62 ± 1.84	20.84 ± 0.74	5.83 ± 0.43
NODN/lip	4	0.78 ± 0.04	68.26 ± 1.43	25.98 ± 0.89	4.98 ± 0.45
200ng/mL ASODN/lip	4	2.38 ± 0.10 ^{1),2)}	62.38 ± 1.42 ^{1),2)}	28.12 ± 1.07 ^{1),2)}	7.12 ± 0.61 ²⁾
400ng/mL ASODN/lip	4	7.83 ± 0.48 ^{1),2)}	54.65 ± 1.57 ^{1),2)}	25.24 ± 0.65 ¹⁾	12.28 ± 0.76 ^{1),2)}
600ng/mL ASODN/lip	4	22.71 ± 0.35 ^{1),2)}	2.98 ± 0.88 ^{1),2)}	24.13 ± 0.77 ^{1),2)}	40.18 ± 0.26 ^{1),2)}
800ng/mL ASODN/lip	4	30.16 ± 1.68 ^{1),2)}	7.01 ± 0.21 ^{1),2)}	19.01 ± 1.02 ^{1),2)}	43.82 ± 1.48 ^{1),2)}

注:1)与 lip 组比较 P < 0.01; 2)与 NODN/lip 组比较 P < 0.01

2.4 透射电镜观察

经反义核酸作用后 48 h, 600 ng/mL ASODN/lip

组发现大量凋亡细胞, 表现为细胞核边聚, 核浓缩, 核碎裂等(图 4, 5)。

示凋亡细胞染色质凝集成团块状, 部分附着在核膜上

图4 透射电镜(×3 000)

示凋亡细胞染色质边聚, 形成新月状

图5 透射电镜(×3 000)

3 讨论

目前肿瘤的生物治疗已成为乳腺癌治疗的重要辅助手段,在肿瘤细胞内导入凋亡活化基因或灭活凋亡抑制基因已经构成肿瘤基因治疗中最诱人的策略之一。本实验发现, survivin 的表达对促进乳腺癌细胞完成有丝分裂具有重要作用。采用 survivin ASODN 转染乳腺癌细胞后,出现了 G₂/M 期阻滞现象,表现为转染后 G₂/M 期细胞较对照组显著增加而 G₁ 期细胞减少;随着 survivin ASODN 浓度的增加,转染后 G₂/M 期细胞逐步增加而 G₁ 期细胞迅速减少。此结果与 Kobayashi 等^[1]的报道一致。由于 survivin 仅特异地表达于细胞周期的 G₂/M 期,故可推测 survivin 基因可使细胞顺利地通过 G₂/M 期检验点,促进细胞周期从 G₁ 向 S 期变化。据此也可认为 survivin 是一种 G₂/M 检验点调控相关基因。封闭 survivin 的表达可以诱导乳腺癌细胞的生长停滞于 G₂/M 期,使之无法完成有丝分裂,从而抑制乳腺癌细胞的增殖活性促进其发生凋亡。

本实验通过 DNA 电泳发现, survivin ASODN/lip 在 400 ng/mL 作用 48 h 后可检出特异性凋亡带,终浓度为 600 ng/mL, 800 ng/mL 时较明显。凋亡细胞的生化改变关键点是 DNA 链被核酸内切酶从核小体处切断形成大约 180 ~ 200 bp 整数倍的 DNA 片段,电泳图,表现为 DNA 梯形构型或条纹。说明 ASODN 在 lip 倡导下能诱导 MCF-7 细胞发生凋亡。测定 DNA 含量即可辨别凋亡细胞;其特点是在正常细胞周期前出现一个不连续性亚二倍体峰(或凋亡峰)。凋亡峰的出现及其大小是流式细胞仪定量分析 DNA 断裂的一个重要指标,较琼脂糖凝胶电泳检测具有更高的灵敏性,且能精确定量区分早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞与死亡细胞。本实验通过流式细胞仪检测不同浓度 ASODN/Lip 转染组凋亡峰值较 lip 和 NODN/lip 组明显上升($P < 0.05$)。经 600 ng/mL survivin ASODN/Rip 处理

后的 MCF-7 细胞再经 Hoechst 33258/PI 双重染色后,在荧光显微镜下紫外光激发可观察到细胞肿胀、体积增大、外形不规则、细胞膜皱缩、染色质浓缩边聚呈新月形、细胞核固缩与断裂、核仁消失等细胞形态学改变,在细胞核或细胞质内可见到有浓染致密的颗粒状荧光的早期凋亡细胞及被染成红色荧光的坏死细胞。通过电镜观察发现 survivin ASODN/lip 在 400 ng/mL 作用 48 h 后大量细胞凋亡,表现为 MCF-7 细胞有较多致密的凋亡小体,并出现细胞核浓缩、核聚集、核碎裂、核边集等。在 ASODN/lip 600 ng/mL 及 800 ng/mL 组则可观察到更多的细胞凋亡形态学改变,而在 lip 组及 NODN/lip 组细胞超微结构未发现明显的凋亡细胞形态学改变。吴万敏等^[2]报道在人浸润性乳腺癌中 Survivin 的阳性表达率为 70.5%, Survivin 在组织学 III 级的表达阳性率明显高于 II 级($P < 0.05$),即分化低者阳性率高于分化高者,提示使用 Survivin 表达功能拮抗剂有可能提供新的乳腺癌治疗模式。段体德等^[3]的动物实验研究报道证实 Survivin 反义寡核苷酸可有效地抑制人乳腺癌裸鼠皮下肿瘤的生长速度,异促进诱导肿瘤细胞的凋亡。综上所述,笔者认为 ASODN 能抑制乳腺癌细胞中的凋亡抑制基因 survivin 的表达,可望成为一种治疗肿瘤的有效方法。

参考文献:

- [1] Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, *et al.* Expression of amurine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (4): 1457 - 1462.
- [2] 吴万敏,王小娟,孟化. survivin 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (11): 868 - 869.
- [3] 段体德,刘德权,杨策尧. survivin 反义寡核苷酸对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (9): 691 - 695.