

文章编号:1005-6947(2007)07-0646-04

· 基础研究 ·

Survivin 反义寡核苷酸对人肝癌细胞的抑制作用

张鸽文¹, 汤恢煊¹, 王志明¹, 冯超², 魏伟¹

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 探讨 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)对人肝癌细胞 HepG2 的抑制作用。方法 采用免疫组织化学法检测肝细胞癌(HCC)组织中 survivin 的表达。采用脂质体介导 survivin ASODN 体外转染人肝癌细胞株 HepG2, Western blot 检测细胞 survivin 蛋白的表达, FCM 检测细胞的凋亡率, 观察细胞在软琼脂中的集落形成能力。建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型, 观察 survivin ASODN 的体内抑癌作用。**结果** (1) 肝癌组织中 survivin 表达阳性率为 75.8% (25/33), 明显高于癌旁组织和正常肝组织 ($P < 0.01$); (2) survivin ASODN 体外转染可明显下调 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达, ASODN 组 HepG2 细胞凋亡率明显高于空白对照组和 SODN 组 ($P < 0.01$), ASODN 组 HepG2 细胞在软琼脂中形成的集落数目明显少于空白对照组和 SODN 组 ($P < 0.01$); (3) ASODN 组瘤体生长速度较空白对照组和 SODN 组明显减慢 ($P < 0.01$), ASODN 组瘤体重量较空白对照组和 SODN 组明显减轻 ($P < 0.05$)。**结论** Survivin 在 HCC 组织中高表达; survivin ASODN 可以诱导 HepG2 细胞凋亡, 在体外实验和动物实验中对 HepG2 细胞生长都有抑制作用。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(7): 646-649]

关键词: 肝肿瘤, 实验性; 蛋白 survivin; 反义核苷酸; 基因疗法

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

The inhibitory effect of survivin antisense oligonucleotide on human hepatocellular carcinoma cells

ZHANG Ge-wen¹, TANG Hui-huan¹, WANG Zhi-ming¹, FENG Chao², WEI Wei¹

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

2. Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect of survivin antisense oligonucleotide (ASODN) on human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2. **Methods** The expression of survivin protein in HCC tissue was detected immunohistochemically. Survivin ASODN was transfected into HepG2 cell by lipofectamine in vitro. The expression of survivin protein was detected by western-blot. Apoptotic index (AI) and colony formation were examined by flow cytometry and in soft agar respectively. Human HCC model in nude mice was established by subcutaneous injection of HepG2 cells. In vivo effect of survivin ASODN on tumor growth was observed. **Results** (1) The expression rate of survivin protein in HCC was 75.8% (25/33), which was significantly higher than that in corresponding non-cancerous adjacent liver tissue and normal liver tissue ($P < 0.01$). (2) The expression of survivin protein in HepG2 cells was obviously downregulated after transfected with survivin ASODN. AI of HepG2 cells in ASODN group were significantly higher than those in the control and SODN groups ($P < 0.01$). Colonies of HepG2 cells in ASODN group were significantly fewer those that in the control and SODN groups ($P < 0.01$). (3) The tumor growth of nude mice in ASODN group was significantly slower than that in the control and SODN groups ($P < 0.01$). The tumor weight of ASODN group was significantly lower than that of the control and SODN groups ($P < 0.05$). **Conclusions** There is overexpression of survivin in HCC. Survivin ASODN can induce HepG2 cells apoptosis and inhibit the growth of HepG2 cells in vitro and in vivo.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(7): 646-649]

Key words: Liver Neoplasms, Experimental; Protein, survivin; Antisense Oligonucleotide; Gene Treatment

CLC number: R735.7

Document code: A

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20335020)

收稿日期: 2007-04-03; 修订日期: 2007-06-15。

作者简介: 张鸽文, 男, 湖南邵东人, 中南大学湘雅医院主治医师, 主要从事肝癌的基础与临床方面的研究。

通讯作者: 张鸽文 E-mail: zyxh888@163.com

肝细胞癌(HCC)是肝脏最常见的原发性恶性肿瘤,其病死率在我国十大恶性肿瘤排名第二。目前对肝癌的治疗是以手术切除为主的综合治疗,其术后5年生存率为38.1%^[1]。基因治疗是近年来研究的热点之一。而survivin是凋亡抑制蛋白家族的一个新成员,其选择性地表达在肿瘤组织中而在正常分化成熟组织中几乎不表达^[2],这种选择性表达特性使其成为恶性肿瘤基因治疗的一个理想分子靶点。为此,本研究检测了survivin在HCC中的表达,同时采用针对survivin mRNA设计的反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN),转染人肝癌细胞HepG2,观察survivin ASODN对HepG2细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源及分组 (1)肝癌组织组 选用中南大学湘雅医院2003年2月—2004年3月手术切除、病理诊断明确的HCC石蜡标本33例,其中男27例,女6例;年龄15~69岁,中位年龄46.2岁。按Edmonson病理分级,I级5例,II级9例,III级10例,IV级9例。(2)癌旁组织组 33例取自上述HCC患者距肿瘤1cm以上的肝组织,病理证实无癌组织。(3)正常肝组织 6例取自2003年5月—2004年1月切除的肝外伤性肝破裂或肝血管瘤周围的正常肝组织,其中男5例,女1例;年龄12~47岁。

1.1.2 细胞及裸鼠 人肝癌细胞株HepG2由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。Balb/c裸鼠由北京中科院动物研究所提供,雌性,4~6周龄,体重18~22g,实验裸鼠及实验条件均达到无特殊病原菌级(SPF级)标准。

1.1.3 主要试剂 ASODN序列为5'-CCCAGCCT-TCCAGCTCCTG-3',正义寡核苷酸(SODN)序列为5'-CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3',均采用硫代磷酸化修饰^[3],由上海生工公司合成。Lipofectamine™2 000购自美国Invitrogen公司。Western-blot试剂盒、EMC显色剂、SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Survivin Ab-1购自美国Santa Cruz公司。碘化丙啶(PI)购自美国Sigma公司。

1.2 HCC组织survivin蛋白表达检测

采用卵白素-生物素-过氧化酶(SABC)免疫组织化学染色方法,实验步骤按试剂盒说明书进行,一抗工作浓度为1:200。Survivin为胞浆表达,阳性表达判断参照Lu^[4]的方法。

1.3 HepG2细胞培养及survivin ASODN转染

人肝癌细胞株HepG2,以含10%胎牛血清青霉素、链霉素各100μg/mL的DMEM培养基常规培

养,每4天传代1次,取对数期生长的细胞用于实验。按Invitrogen公司提供Lipofectamine™2 000转染程序,将survivin ASODN导入细胞,待细胞孵育24h后收集细胞进行检测。

1.3.1 实验分组 实验共分为3组。(1)ASODN组:以400nmol/LASODN转染HepG2细胞;(2)SODN组:以400nmol/LSODN转染细胞;(3)空白对照组:以无血清DMEM培养基代替转染复合物转染细胞。

1.3.2 Western blot检测转染后HepG2细胞survivin蛋白的表达 将转染后的3组细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 5×10^6 /mL,取1mL细胞悬液提取总蛋白质,用紫外分光光度法测定其浓度。取50μg蛋白进行Western blot印迹检测survivin蛋白的表达,一抗为1:1 000兔抗人survivin,二抗为1:1 000辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG。EMC显色,常规显影和定影,观察结果。

1.3.3 FCM检测转染后HepG2细胞的凋亡率 将转染后的3组细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^6 /mL,取1mL细胞悬液,常规固定,PI染色,采用FACSsort流式细胞仪(Becton Dickson, USA)在488nm波长处进行检测,所得数据用Cellquest软件进行分析。细胞凋亡指数(AI)的计算:AI = 亚二倍峰细胞数/总细胞数 × 100%。

1.3.4 软琼脂集落形成实验 将转染后的3组细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^3 /mL,0.6%琼脂与DMEM培养液按1:1比例混合,加入细胞悬液,充分混匀,注入到0.5%下层琼脂的6孔板中,使每孔细胞数为500个,设6个复孔,凝固后置于37℃,5%CO₂和饱和湿度培养箱内,培养14d后弃培养基,1×PBS冲洗,甲醇固定,加姬姆萨应用液染色30min,流水洗净,计数细胞数≥50的克隆数。克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) × 100%,比较ASODN组,SODN组及空白对照组克隆形成率的差别。倒置显微镜下观察细胞集落形成。

1.4 Survivin ASODN对裸鼠肝癌移植瘤的影响

取9只雌性,4~6周龄,体重18~22g的BALB/c裸鼠,随机分为3组。将HepG2细胞按每只 1×10^7 个细胞/0.2mL接种于裸鼠腋下。以皮下结节直径超过0.5cm为成瘤标准。当瘤体最大径长至1cm大小时,开始分3点向瘤体内缓慢注射相应注射剂0.2mL(ASODN组注射10μg ASODN + 20μL Lipofectamine™2 000混合物。SODN组注射10μg SODN + 20μL Lipofectamine™2 000混合物。空白对照组:以无血清DMEM培养基替代上述注射剂)。每3天1次,同时用游标卡尺测量肿瘤最大径(L)和最小径(I)。连续测定3周。根据

公式: $V = \pi/6 LI^2$ 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤体积生长曲线。第22天处死裸鼠并分离瘤体, 称瘤重。

1.5 统计学处理

运用SPSS11.0软件处理数据, 半定量等级资料用秩和检验分析组间差异, 计量资料用方差分析分析组间差异。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Survivin 蛋白在 HCC 组织中的表达

Survivin 阳性染色主要定位于肝癌细胞的胞浆, 阳性细胞在 HCC 组织内呈散在分布。33例 HCC 组织中有25例 survivin 表达为阳性, 阳性率为75.8%。其中强阳性11例(33.3%), 中等阳性7例(21.2%), 弱阳性7例(21.2%), 阴性8例(24.3%)。33例癌旁组织和6例正常肝组织 survivin 表达均为阴性。HCC 组织中 survivin 的表达水平较癌旁组织和正常肝组织明显高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (图1)。

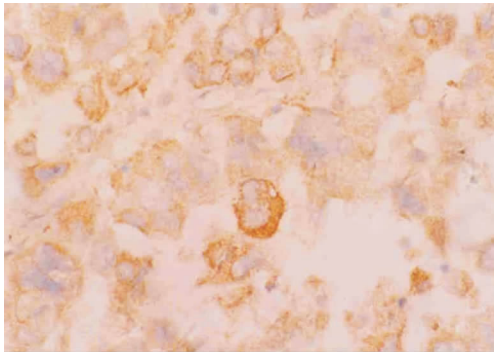


图1 HCC 中 survivin 免疫组织化学染色强阳性 ($\times 400$)

2.2 Western blot 检测转染后细胞 survivin 蛋白的表达结果

ASODN 组细胞 survivin 蛋白的表达较空白对照组和 SODN 组明显减弱, 而对照组与 SODN 组无明显差异 (图2)。

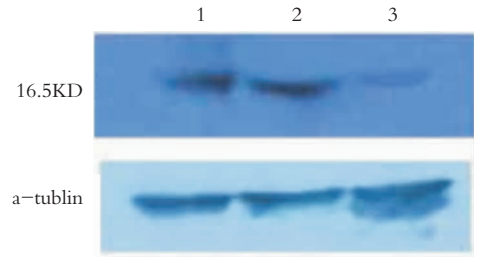


图2 Western blot 检测细胞 survivin 蛋白表达结果
1: 空白对照组; 2: SODN 组; 3: ASODN 组

2.3 FCM 对细胞凋亡率 (%) 的分析结果

经单因素方差分析, ASODN 组细胞凋亡率 (15.31 ± 0.54) 较空白对照组 (6.25 ± 0.40) 和 SODN 组 (6.36 ± 0.35) 明显增加 ($P < 0.01$), 而空白对照组与 SODN 组则无明显性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 软琼脂集落形成实验结果

经单因素方差分析, ASODN 组细胞集落形成率 [$(14.16 \pm 1.68)\%$] 较空白对照组 [$(33.24 \pm 1.91)\%$] 和 SODN 组 [$(31.42 \pm 2.05)\%$] 明显减少 ($P < 0.01$), 而空白对照组与 SODN 组则无明显性差异 ($P > 0.05$) (图3)。

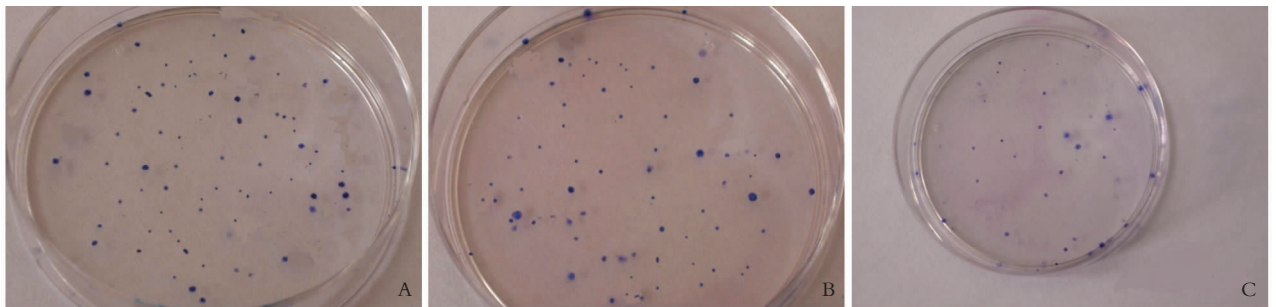


图3 软琼脂集落形成实验结果 A: 空白对照组; B: SODN 组; C: ASODN 组

2.5 Survivin ASODN 对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用

3组裸鼠均于接种后5~7d在皮下可触及瘤体, 出瘤率为100%; 10~12d瘤体最大径可长至1cm大小, 实验过程中无裸鼠死亡。根据持续测量所得肿瘤体积, 绘制出3组裸鼠肿瘤体积生长曲线图 (图4)。经重复测量设计资料的方差

分析, ASODN 组瘤体生长较空白对照组和 SODN 组明显受到抑制 ($P < 0.01$), 而空白对照组瘤体生长与 SODN 组无明显性差异 ($P > 0.05$)。经单因素方差分析, ASODN 组瘤体重量 [$(1.21 \pm 0.18)\text{g}$] 较空白对照组 [$(3.58 \pm 1.17)\text{g}$] 和 SODN 组 [$(3.25 \pm 1.06)\text{g}$] 明显减轻 ($P < 0.05$), 而空白对照组瘤体重量与 SODN 组无明显性差异 ($P > 0.05$)。

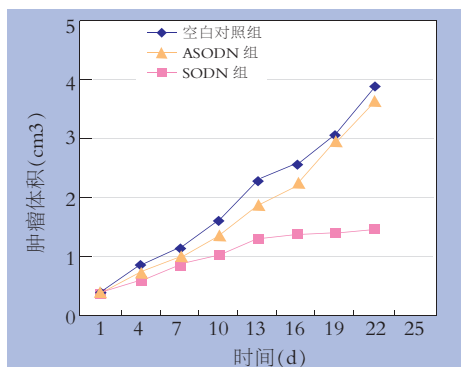


图4 裸鼠肿瘤体积生长曲线图

3 讨论

Survivin 是近年来发现的一种凋亡抑制蛋白,具有抑制细胞凋亡和促进细胞增殖双重生物学效应,广泛表达于肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌等肿瘤,与肿瘤的发生、发展密切相关^[5]。本研究发现,survivin 在 HCC 组织中的阳性表达率为 75.8% (25/33),而在癌旁组织和正常肝组织中无表达,这与 Ito 等^[6]的结果相一致,提示 survivin 在 HCC 组织中高表达,且表达具有很高的特异性,因而可作为 HCC 基因治疗的特异性靶点。

反义核酸技术是近年来兴起的一种新基因治疗技术,主要包括 ASODN、反义 RNA 和核酶。其中 ASODN 是一种能特异性抑制基因表达的单链 DNA 分子,可以在转录水平和翻译水平调节相关基因的表达,其设计相对简便,毒副作用小,稳定性较高,是目前最有可能应用于临床的基因治疗方法^[7]。本研究采用针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 ASODN 体外转染人肝癌细胞系 HepG2,结果表明,400 nmol/l survivin ASODN 可明显下调 survivin 蛋白的表达,提示该 ASODN 能够有效地封闭 survivin 的表达,因此可用于特异性地阻断 survivin 表达以研究其功能并进行反义治疗。

研究显示,survivin ASODN 能够诱导肿瘤细胞自发性凋亡,引起细胞有丝分裂失败,抑制肿瘤形成和生长^[8-10]。本研究应用 survivin ASODN 体外转染后发现,HepG2 细胞凋亡率明显增加,软琼脂细胞集落形成能力明显下降,提示 survivin 基因在肝癌细胞中发挥重要的抑制凋亡作用,survivin ASODN 转染后可解除 survivin 对凋亡的抑制作用,明显诱导 HepG2 细胞自发性凋亡,从而抑

制细胞增殖。为进一步了解 survivin ASODN 的体内抑癌作用,本研究建立了人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型,将 survivin ASODN 直接注射到移植瘤内观察肿瘤体积生长曲线和瘤体重量变化。结果表明,ASODN 组裸鼠皮下移植瘤生长速度较 SODN 组和对照组明显减慢 ($P < 0.01$),ASODN 组瘤体重量较对照组和 SODN 组明显减轻 ($P < 0.05$),提示 survivin ASODN 可以有效抑制肝癌裸鼠移植瘤的生长。

综上所述,survivin ASODN 在体外实验和动物实验中对肝癌细胞 HepG2 生长都有抑制作用,因此 survivin 有望成为肝癌基因治疗中的一个有效靶点。

参考文献:

- [1] 吴孟超. 原发性肝癌治疗的进展及展望 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(1): 1-4.
- [2] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expression in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [3] Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy [J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2805-2809.
- [4] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. Cancer Res, 1998, 58(9): 1808-1812.
- [5] Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy [J]. Trends Mol Med, 2001, 7(12): 542-547.
- [6] Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2000, 31(5): 1080-1085.
- [7] Alama A, Barbieri F, Cagnoli M, et al. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. Pharmacol Res [J]. 1997, 36(3): 171-178.
- [8] Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, et al. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 635-640.
- [9] Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth [J]. Neoplasia, 2000, 2(3): 235-241.
- [10] 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癌作用研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(9): 691-695.