

文章编号:1005-6947(2005)09-0691-05

· 实验研究 ·

Survivin 反义寡核苷酸对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用研究

段体德¹, 刘德权², 杨策尧³

(昆明医学院第一附属医院 1. 普通外科 3. 中心实验室, 云南 昆明 650032; 2. 昆明医学院第三附属医院 乳腺病科, 云南 昆明 650106)

摘要:目的 探讨 survivin 反义寡核苷酸 (ASODN) 对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用。方法 30 只裸鼠建立人乳腺癌 MCF-7 细胞移植瘤动物模型。成瘤后动物随机分 3 组, 每组 10 只。分别于瘤周及瘤体注射阳离子脂质体 (lipofectin, Lip), ASODN/Lip 及 NODN/Lip, 每 5 天 1 次, 共 3 次。观察肿瘤抑制率、肿瘤体积和裸鼠体重的变化。用 TUNEL 法, 透射电镜观察体内瘤体的细胞凋亡情况; 用 Western-blot 检测各组肿瘤的 survivin 蛋白表达情况。结果 成功建立了裸鼠皮下移植瘤模型。ASODN/Lip 治疗组的肿瘤体积在治疗期内减少, 抑瘤率达 70.10%; 而 NODN/Lip 治疗组和 Lip 对照组肿瘤体积增加。各组裸鼠体重无明显变化。ASODN/Lip 组细胞凋亡率为 38.6% 明显高于其他两组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。ASODN/Lip 组肿瘤的 survivin 蛋白表达明显降低。结论 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, 并促进诱导肿瘤细胞的凋亡。

关键词: 乳腺癌/治疗; Survivin 反义寡核苷酸

中图分类号: **文献标识码:** A

Research of survivin antisense oligonucleotide on growth suppression of transplanted human breast cancer in nude mice

DUAN Ti-de¹, LIU De-quan², YANG Ce-yao³

(1. Department of General Surge 3. Department of Laboratory, The First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 2. Department of Breast Surgery, The Third Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650106, China)

Abstract: **Objective** To explore the suppressive effect of survivin antisense oligonucleotide on transplanted human breast cancer in nude mice. **Methods** 30 nude mice were transplanted with human breast cancer MCF-7 cells to construct tumor models, which were divided into three groups (10 mice per group): Lipofectin, ASODN/Lip, and NODN/Lip were injected in to the tumor or around the tumor, respectively. A total of 3 injections were given, once every five days. Observations were made on tumor suppression rate, tumor volume and changes in weight of the animals. TUNEL method and transmission electron microscopy were used to investigate cell apoptosis of the tumor; western blot was used to determine the expression of survivin protein in the 3 groups. **Results** The subcutaneous tumor model in nude mice was successfully established. The tumor volume in the group of ASODN/Lip decreased during treatment, the rate of tumor suppression reached 70.10%; while the tumor volume of the other two groups increased. There was no statistical difference among the groups in weight changes of the 3 groups mice, the apoptosis rate in ASODN/Lip group was 38.6% detected by TUNEL and the rate was markedly higher than the other two groups ($P < 0.05$). The expression of survivin protein in ASODN/Lip group decreased significantly. **Conclusions** Survivin antisense oligonucleotide can effectively suppress human breast cancer cells growth rate in subcutaneous tumor of nude mice and accelerate the induction of apoptosis of tumor cells.

收稿日期:2005-05-04; 修订日期:2005-09-19。

作者简介:段体德(1939-),男,云南昆明人,昆明医学院第一附属医院教授,博士生导师,主要从事胃肠、乳腺癌防治方面研究。

通讯作者:段体德 电话:0871-5388596; E-mail:tdduan@163.com。

Key words: Breast Cancer/therapy; Survivin Antisense Oligonucleotide

CLC number:

Document code: A

肿瘤细胞内导入凋亡活化基因或灭活凋亡抑制基因已成为肿瘤基因治疗的策略之一, survivin 是一种凋亡抑制基因, 其蛋白广泛表达于胚胎组织和多种恶性肿瘤中, 而在正常组织几乎不表达。作为肿瘤特异性凋亡抑制因子, survivin 将可能成为肿瘤靶基因蛋白治疗的理想靶点。实验室研究发现, 通过脂质体介导的 survivin 反义寡核苷酸能降低人乳腺癌 MCF-7 细胞株的 survivin mRNA 和蛋白的表达, 抑制 MCF-7 细胞增殖活性并促进其凋亡^[1]。由于实验室生长环境与肿瘤在体内环境有所不同, 且由于选择性生长等因素, 使其研究结果有一定的局限性。本研究在建立裸鼠人乳腺癌模型的基础上, 应用反义寡核苷酸技术 (ASODN) 在裸鼠瘤体及瘤周注射进行治疗, 观察其体内的抑瘤作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

所用有 BALB/C 遗传背景的裸鼠购于中国医学科学院医学生物研究所。选用 4~6 周龄、体重 18~22 g 的雌性裸鼠 30 只, 在 SPF 级条件下饲养。

1.2 细胞培养

人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。MCF-7 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。至对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后, 收集制成 2 × 10⁷ 个/mL 的细胞悬液备用。

1.3 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

每只裸鼠取 1 个注射点, 用以上细胞液 0.5 mL 注射于右前肢腋下。接种后每天观察有无肿瘤形成及注射点有无破溃红肿, 按规定时间测量肿瘤体积大小, 以肿瘤直径 0.5 cm 为成瘤。

1.4 瘤周及瘤体注射

皮下接种 15 d 后, 30 只裸鼠均被成功建立了皮下移植瘤模型并将其被随机分为 3 组, 每组 10 只。称重并测量瘤体大小, 然后根据不同组别进行瘤周及瘤体注射。阳离子脂质体 (lipofectin, Lip)、硫化反义寡核苷酸 (ASODN) 及无义寡核苷酸 (NODN),

均由上海生物工程有限公司提供。Lip 组 (对照组) 注射 lipofectin 10 μg 加转染液 (无血清无抗生素培养液), 总量 600 μL; 无义治疗 (NODN/Lip) 组: 注射 NODN 40 μg 加 lipofectin 10 μg 加转染液总量 600 μL; 反义治疗 (ASODN/Lip) 组: 注射 ASODN 40 μg 加 lipofectin 10 μg 加转染液总量 600 μL。以后每隔 5 d 注射 1 次, 共 3 次。注射前, 脂质体先溶于转染液中室温静置 40 min, 再与寡核苷酸混合包裹并室温静置 15 min。

1.5 瘤体测量

用游标卡尺测量瘤体最长径 (a) 与最短径 (b)。肿瘤体积为 $V(\text{mm}^3) = \pi ab^2/6$ 。抑瘤率 (%) = $1 - (V_{\text{对照组}} - V_{\text{治疗组}}) / V_{\text{对}} \times 100\%$ 。肿瘤缩小率 (%) = $(V_{\text{治疗前}} - V_{\text{治疗后}}) / V_{\text{治疗前}} \times 100\%$ 。每次注射前及最后 1 次注射后第 5 天 (即治疗开始后当天、5 d、10 d、15 d) 均须称重并测量瘤体大小, 绘制肿瘤生长曲线。

1.6 组织标本采集

于注射后 20 d 末处死裸鼠。剥离瘤体并称重。将肿瘤标本分为两部分: 一部分在 (包括心脏、肝脏、肾脏、肾脏) 10% 的福尔马林溶液中固定, 常规石蜡包埋后, 行 HE 染色; 另一部分用 OCT 包埋液速冻后切片 -70℃ 保存备用。

1.7 肿瘤免疫组织化学 (免疫组化) 检查

采用 SABC 法对切片进行免疫组化染色。用 PBS 代替一抗作阴性对照, 阳性对照由试剂盒提供。观察 3 组切片凋亡细胞的表达情况。以胞核染深黄色或棕黄色为阳性结果。每张切片不同视野观察 1 000 个细胞, 计算其阳性细胞率。

1.8 透射电镜观察

从剥离的瘤体上取下小块组织用眼科剪剪成 2 mm × 2 mm, 戊二醛前固定, 锇酸后固定 2 h, 常规脱水包埋切片, 铅铀染色透射电镜观察、拍照。

1.9 survivin 蛋白的检测

分别取 100 mg 肿瘤组织, 眼科剪剪碎, 置研钵中研碎后提取肿瘤组织细胞总蛋白, 紫外分光光度法进行蛋白定量, SDS-PAGE 电泳, 将硝酸纤维素膜

上的目的蛋白条带在 Gel DOC2000 凝胶成像系统上分析处理。survivin 蛋白含量以光密度 INT × 面积表示。

1.10 统计学处理

计量资料数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;应用 SPSS11.0 软件包进行统计学分析。显著性水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组肿瘤体积的比较

30 只裸鼠均成活并有肿瘤形成,接种点无红肿破溃表现。治疗前各组裸鼠肿瘤体积无显著差别。不同治疗时间各组裸鼠移植瘤体积变化明显:第 5 天 ASODN/Lip 组瘤体开始缩小,而对照组则继续增大;至第 15 天时 Lip 组体积为 $(322.16 \pm 7.95) \text{ mm}^3$, NODN/Lip 组为 $(288.14 \pm 7.45) \text{ mm}^3$, 而 ASODN/Lip 组为 $(89.9 \pm 9.22) \text{ mm}^3$ 。Lip 组和 NODN/Lip 组的瘤体随时间而增大,ASODN/Lip 组则随时间而缩小;各组不同时间体积比较均有统计学意义 ($P < 0.05$),此结果显示 ASODN 对裸鼠荷瘤有抑制作用(图 1)。

2.2 不同治疗时间抑瘤率的变化

ASODN/Lip 组抑瘤率随时间而增大,第 5 天为 $(26.52 \pm 0.67) \%$,第 15 天为 $(72.96 \pm 2.00) \%$,与 Lip 组和 NODN/Lip 组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 不同治疗时间抑瘤率比较(%)

组别	治疗时间(d)		
	5	10	15
Lip	0 [†]	0 [†]	0 [†]
NODN/Lip	9.79 ± 0.18 [†]	10.97 ± 0.13 [†]	11.15 ± 0.20 [†]
ASODN/Lip	26.52 ± 0.67	50.51 ± 1.45	72.96 ± 2.00

注:†与 ASDN/Lip 组比较 $P < 0.05$

2.3 治疗前后各组裸鼠体重变化

3 组治疗前后体重均无明显变化 ($P > 0.05$)。提示所用 Lip, NODN 和 ASODN 对实验动物机体损伤不明显。

2.4 各组细胞凋亡率

ASODN/Lip 的凋亡率为 $(38.6 \pm 1.38) \%$, 显

著高于 Lip 组的 $(3.5 \pm 1.25) \%$ 和 NODN/Lip 组的 $(4.8 \pm 1.32) \%$ ($P < 0.05$)(图 2,3)。

2.5 光镜观察结果

MCF-7 接种在 BALB/C 裸鼠上的 Lip 组肿瘤组织切片可见癌细胞生长旺盛,核分裂相多见(图 4)。经 ASODN/Lip 治疗后,肿瘤组织切片见癌细胞出现核固缩、凋亡细胞形成(图 5)。ASODN/Lip 组实验荷瘤裸鼠的心肌、肝脏、肾脏组织病理切片显示正常无损伤表现。

2.6 电镜观察结果

经 ASODN/Lip 治疗 15d 取肿瘤组织在透射电镜下观察发现:细胞核体积较小,核染色质呈团块状,有的呈典型的凋亡细胞形态学改变——染色质浓缩边集可见凋亡小体形成(图 6)。而 Lip 组和 NODN/Lip 组则无上述表现。

治疗 15d 后处死动物,剥离瘤体标本在 Lip 组与 NODN/Lip 组均可发现肿瘤体积较大,瘤体血管丰富,与皮肤有粘连,有的肿瘤有破溃;而 ASODN/Lip 组肿瘤包膜完整,体积明显小于前两组。

2.7 肿瘤组织 survivin 的蛋白表达

ASODN/Lip 组蛋白明显下调 ($37.16 \pm 1.01) \%$,显著低于 Lip 组和 NODN/Lip 组 ($P < 0.01$)。(表 2,图 7)。

表 2 survivin ASODN/Lip 治疗后蛋白表达变化

组别	survivin 的蛋白表达量
Lip	65.60 ± 0.99 +
NODN/Lip	65.19 ± 1.29 [†]
ASODN/Lip	37.16 ± 1.01

注:†与 ASODN/Lip 组比较, $P < 0.01$

图 1 Lip 组、NODN/Lip 组和 ASODN/Lip 组不同治疗时间肿瘤体积比较

图2 Lip组肿瘤组织未见明显的凋亡细胞(TUNEL×200)

图3 ASODN/Lip组肿瘤组织棕色和深黄色为早期凋亡细胞(TUNEL×400)

图4 Lip组肿瘤组织切片(×200)

图5 ASODN/Lip组肿瘤组织切片细胞核固缩,核碎裂的凋亡细胞(×400)

a: 细胞核染色质边集附着在核膜上,凋亡小体形成; b: 细胞核浓缩并形成缢痕,可见染色质边集

图6 ASODN/Lip组治疗15d肿瘤组织电镜(透射电镜×3 000)

1:Lip; 2:NODN/Lip; 3:ASODN/Lip

图7 各组肿瘤组织 survivin 蛋白表达

3 讨论

survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员,是具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双功能蛋白,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子,能抑制 caspase 活性而发挥抗凋亡作用。据研究报导^[1~2] survivin 在乳腺癌组织中表达的阳性率为 68.75%~70.50%, survivin 表达可作为判断预后的一个指标,这些研究提示使用 survivin 表达功能的拮抗剂有可能提供新的乳腺癌治疗的策略。目前乳腺

癌的治疗手段以手术切除为主、辅以化疗、放疗和内分泌治疗,但其远期疗效仍不够理想。肿瘤的基因治疗在实验室阶段取得了瞩目的进步,肿瘤的反义基因治疗是应用反义核酸在转录和翻译水平阻断某些异常基因的表达,以阻断瘤细胞内的异常信号传导,使瘤细胞进入正常分化轨道或引起细胞凋亡的一种治疗手段。

本研究选用 BALB/C 遗传背景的裸鼠作为体内移植肿瘤的动物模型,成瘤后见肿瘤细胞呈条索状排列,肿瘤内有出血和坏死,并有丰富的新生

血管形成,核分裂相多见,表明所建立的动物模型符合实验要求。然后应用反义核酸技术对瘤体及瘤周进行注射观察其抑瘤效果。结果发现 ASODN/Lip 组鼠肿瘤的生长速度、体积均明显慢于或低于 Lip 组和 NOND/Lip 组,而各组裸鼠之间体重无明显差异。表明 ASODN/Lip 组裸鼠体内接种的乳癌细胞由于经过 survivin 反义核酸封闭后, survivin 基因的表达受到抑制,细胞分泌 survivin 的量明显减小,从而减缓或解除了其抑制凋亡的作用,诱导了大量肿瘤细胞凋亡并抑制了肿瘤细胞的增殖活性。已知肿瘤的生长必须有血管形成的参与,血管形成过程的核心是血管内皮细胞的分裂增殖,即取决于血管内皮细胞的生存和凋亡的平衡。已有研究^[7]表明, survivin 参与了血管形成过程。survivin 可能作为一种抗凋亡保护性基因参与血管形成。推测它可能是血管内皮生长因子(VEGF)信号转导通路的下游信号分子 PKC 或 Akt 的作用底物。新血管生成是肿瘤生长和转移的必要因素。因此抑制 survivin 的表达可能对减少肿瘤组织新生血管形成,防止肿瘤细胞的浸润、转移起重要作用。

虽然 3 组裸鼠的种植瘤的生长速度及体积有明显差异,但在 ASODN/Lip 组并未出现种植瘤完全消失的现象,表明单纯封闭肿瘤细胞 survivin 的表达,不足以完全抑制肿瘤的生成。因为肿瘤的生成受多种因素的调节。另外,在 3 组裸鼠中治疗前后体重无明显变化,且光镜观察各组裸鼠心脏、肝脏、肾脏的组织学检查亦未见明显结构受损情况,说明脂质体、反义核酸的应用对于裸鼠是安全的。这可能由于 survivin 仅特异性表达于肿瘤组织,反义核酸 survivin 基因治疗具有良好的靶向性、特异性及安全性,对正常组织几乎无不良影响缘故。

解剖肿瘤组织发现, ASODN/Lip 组的肿瘤组织周围有较明显的完整包膜形成,界限清楚,无明显粘连浸润现象;而其余 2 组裸鼠肿瘤破溃明显,与周围组织分界不清,包膜形成不完整,累及表面皮肤,肿瘤难以完整剥离。说明在由于 survivin 基因

的表达受到 ASODN/Lip 抑制,肿瘤血管生成减少,阻止了肿瘤向周围正常组织的浸润,减少了肿瘤播散、转移的机会。光镜下见 ASODN/Lip 组肿瘤细胞的异型性、病理性核分裂相及排列紊乱情况均不如其余 2 组明显,表明 survivin 有抑制肿瘤细胞凋亡并增加恶性程度的作用。

ASODN/Lip 组的肿瘤细胞凋亡率明显高于其余 2 组($P < 0.05$)。透射电镜下调亡的早期特征为细胞核染色质致密、边集,细胞膜微绒毛消失、可见出芽现象,胞浆内可见核周池、RER 池扩张,进而细胞核致密、皱缩,最终细胞核崩解为碎片,并连同其周围的胞浆共同形成许多凋亡小体。ASODN/Lip 组肿瘤细胞核内可见大量凋亡小体,而 NOND/Lip 组则很少见凋亡小体。此结果证实选择适当的靶基因,采用反义核酸封闭技术可达到促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长的目的。本研究为其临床应用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 毛杰,海建,舒衡平,等. 乳腺癌组织中 survivin, P53 蛋白的表达与预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4): 265 - 268.
- [2] 吴可敏,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] Seth P, Brinkmann O, Schwartz GN, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(6): 1346 - 1351.
- [4] Seth P, Katayose K, Li Z, *et al.* A recombinant adenovirus expressing wild type p53 induces apoptosis in drug-resistant human breast cancer cells: a gene therapy approach for drug-resistant cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 1997, 4(6): 383 - 390.
- [5] Xu M, Kumar D, Srinivas S, *et al.* Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(2): 177 - 180.
- [6] Stribbling SM, Friedlos F, Martin J, *et al.* Regressions of established breast carcinoma xenografts by carboxypeptidase G2 suicide gene therapy and the prodrug CMDA are due to a bystander effect[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(2): 285 - 292.
- [7] Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, *et al.* Suppression of vascular endothelial growth factor mediated endothelial cell protection by survivin targeting[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(5): 1757 - 1765.