文章编号:1000-5404(2006)10-1069-03

论著

细胞周期素D1反义脱氧寡核苷酸对A549细胞增殖及凋亡的调控作用

蒋 力,闵家新,李学昌,姚 珂 (第三军医大学新桥医院胸外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨脂质体转染细胞周期素D1(cyclin D1)反义脱氧寡核苷酸链(antisense oligodeoxynucleotide, ASON)对A549细胞增殖及细胞周期的影响。**方法** 采用脂质体转染技术将cyclin D1 ASON转入A549细胞培养,用MTT法检测细胞生长状况,应用流式细胞术(FACS)、检测细胞DNA梯形带等方法观察细胞凋亡及RT-PCR法检测cyclin D1蛋白的表达。**结果** 脂质体转染cyclin D1 ASON组和单纯cyclin D1 ASON组的A549细胞存活率较对照组显著降低($P<0.01$)。脂质体转染cyclin D1 ASON组cyclin D1表达水平(32%)较对照组(83%)明显减低($P<0.01$),并能检测出DNA断裂。**结论** 脂质体转染cyclin D1 ASON能在体外明显抑制肺腺癌细胞的生长,且有诱导细胞凋亡、抑制细胞内cyclin D1合成的作用,可能会成为基因治疗的一个新靶点。

关键词: 细胞周期蛋白D1;脂质体;转染;反义寡脱氧核糖核苷酸;细胞凋亡
中图法分类号: R394.3;R73-354;R730.23 **文献标识码:** A

Effect of liposomal transfection of cyclin D1 antisense oligodeoxynucleotide on A549 cell proliferation and apoptosis

JIANG Li, MIN Jia-xin, LI Xue-chang, YAO Ke (Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effect of liposomal transfection of cyclin D1 antisense oligodeoxynucleotide (ASON) on A549 cell proliferation and apoptosis. **Methods** By liposomal transfection technique, cyclin D1 ASON was co-cultured with A549 cells. The cell growth curve was determined by MTT assay. The protein and mRNA of cyclin D1 were measured by FACS and RT-PCR. **Results** In the cyclin D1 ASON liposomal transfection group, the proliferation of A549 cells was significantly inhibited as compared to that in cyclin D1 ASON group ($P<0.01$). The expression of cyclin D1 in the cyclin D1 ASON liposomal transfection group was significantly lower than that in the control group (32% *vs* 83%, $P<0.01$), and the DNA ladder and apoptosis body was displayed. **Conclusion** Liposomal transfection of cyclin D1 ASON can inhibit *in vitro* the proliferation of lung cancer cells, which might provide a new target for gene therapy.

Key words: cyclin D1; liposome; transfection; oligodeoxynucleotide antisense; apoptosis

编码细胞周期素D1(cyclin D1)的CCND1基因是细胞增殖的重要基因,其蛋白产物cyclin D1能促进细胞增殖,并与细胞凋亡有关。通过研究证实,cyclin D1在癌症组织中的表达明显高于正常人[1],将反义的cyclin D1在体外导入A549细胞,发现它能抑制细胞的生长,但作用强度有明显的浓度依赖性。为了增加细胞的吸收度及提高导入效率,我们用脂质体作为转染cyclin D1反义脱氧寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASON)的载体,观察其对细胞cyclin D1表达的影响,探讨cyclin D1与A549细胞增殖及凋亡的关系,以期能为反义核酸基因治疗肺癌提供一个新的靶点。

1 材料与方法

1.1 A549细胞的培养及传代

复苏后的A549细胞(由第三军医大学军事预防医学院黄小春硕士惠赠)在含10%胎牛血清的RPMI1640(GibcoPBRL公司产品)培养液中,置于5% CO_2、37 ℃、饱和湿度的Model 2300 CO_2孵育箱中培养,细胞贴壁形态正常,生长良好,隔天换液并传代1次,细胞处于对数生长期,成活率>95%时,以0.25%胰酶消化培养瓶内单层细胞,将细胞悬液移入离心管内,在800~1 000 r/min常温下低速离心5 min,吸去上清液,加入无血清RPMI1640培养基,重悬细胞,计数板计数细胞。在96孔板中

作者简介:蒋 力(1978-),男,重庆市人,硕士研究生,主要从事肺癌的发生发展及治疗方面的研究。电话:13527541736
通讯作者:闵家新,电话:(023)68755616
收稿日期:2005-12-19;修回日期:2006-03-28

分3组，每组设5个复孔，每孔取3×10^5/L个细胞，放入孵育箱中培养24 h后用于转染。

1.2 脂质体转染寡核苷酸

按照脂质体LipofectinTM(Invitrogen公司产品)说明书中的步骤，取30 μg纯化的cyclin D1 ASON及SON，各溶于不含抗生素及新生牛血清的RPMI1640培养液250 μl中，此为A液，取75 μl脂质体溶于不含抗生素及新生牛血清的RPMI1640培养液250 μl中，此为B液。取新鲜配制的A、B液放置30 min，轻柔地把两者混匀，使之成为反义核酸-脂质体混合液，室温下孵育20 min，以使其充分混匀，将96孔板中培养的3组细胞设置为对照组(A组)、单纯SON组(B组)、单纯ASON组(C组)，每孔中的单层细胞用DMEM冲洗2次。在B组和C组中，每个复孔加入100 μl核酸-脂质体混合液，脂质体组加入等体积等浓度的脂质体悬液，置于5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养。

反义和正义cyclin D1寡核苷酸序列如下：ASON：5′-TCTTCCTGGGCAGCTGGGGA-3′，SON：5′-TCCCCAGCTGCCCAGGAAGA-3′。

引物均经上海生工生物工程技术服务公司合成并鉴定，以荧光蛋白GFP标记，经过OPC柱纯化，定量，冻干后-4 ℃保存。

1.3 对A549细胞生长抑制的检测

采用MTT法检测培养液cyclin D1 ASON浓度依次为0、2、4、6、8 μg/100 μl 5组细胞(每组6孔)在检测时间分别为12、24、48、72 h时A549细胞的存活率。

采用MTT法检测脂质体转染cyclin D1 ASON后12、24、48、72 h对A549细胞生长的抑制，以上试验结果用细胞存活率表示(细胞存活率=实验组光吸收值/对照组光吸收值×100%)。

1.4 凋亡细胞DNA梯形带的检测

收获各组培养48 h的细胞约10^6个，用酚-氯仿法提取细胞DNA，取10 μl用15% 20 g/L的琼脂糖凝胶电泳(100 V，2 h)，然后在凝胶成像系统下观察并照相。

1.5 细胞周期的测定

将转染cyclin D1 ASON和cyclin D1 SON的A549细胞及正常的A549细胞分别按每孔4×10^4个细胞，每组6孔接种到24孔板内。培养5 d后，以0.25%胰酶消化，收集3组细胞，800 r/min离心5 min，0.01 mol/L PBS漂洗，吹打成单细胞悬液，70%冷乙醇4 ℃下固定24 h，RNAase消化，碘化丙啶标记，在激发光488 nm，检测光610 nm下用流式细胞仪检测。

1.6 细胞cyclin D1水平的检测

RT-PCR法测定cyclin D1 mRNA表达：采用Takala公司RNA PCR Ver3.0试剂盒，设计cyclin D1引物序列为：正义：5′-ACCAGCTCCTGTGCTGCGAA-3′；反义：5′-CAGGACCTCCT TCTGCACAC-3′。

扩增片断长359 bp；以β-actin阳性产物作为内参照，扩增片断长165 bp，引物序列为：正义：5′-CCTTCCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3′；反义：5′-AGGAGCAATGATCTTGACTTC-3′。

1.7 统计学方法

计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 12.0软件行方差分析。

2 结果

2.1 cyclin D1 ASON对A549细胞生长的抑制

单纯加入cyclin D1 ASON培养12 h内，A549细胞生长无明显抑制，与对照组相比，差异无显著性($P>0.05$)。24 h后，A549细胞存活率开始降低，并与时间及ASON浓度成正相关，在72 h最明显，与对照组及其他各组相比，差异有显著性($P<0.01$)(表1)。

表1 不同浓度ASON对A549细胞存活率的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

浓度(μg/100 μl)	时相(h)				
	0(对照组)	2	4	6	8
12	92.41±3.17	91.97±4.51	90.17±3.04	89.74±3.16	88.87±2.37[a]
24	95.12±2.73	84.12±3.88[a]	84.97±4.32[a]	81.52±4.56[a]	76.65±6.53[ab]
48	94.31±4.45	76.91±4.98[a]	74.19±6.32[a]	71.32±5.47[ab]	65.24±5.47[ab]
72	93.27±4.10	62.97±6.76[a]	51.89±7.12[ab]	47.89±7.12[ab]	43.75±7.92[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与同一浓度前一时相比较

2.2 脂质体转染cyclin D1 ASON对A549细胞生长的抑制

脂质体转染cyclin D1 ASON及cyclin D1 SON 24 h后，在荧光倒置显微镜下可观察到发出绿色荧光的细胞(图1、2)，转染率达30%～40%，提示cyclin D1 ASON及cyclin D1 SON成功转染进入A549细胞。实验表明：脂质体+cyclin D1 ASON组转染24 h后A549细胞生长明显受抑，于72 h最明显，与对照组及脂质体+cyclin D1 SON组相比，差异有显著性($P<0.01$)；在同一时相上，脂质体+cyclin D1 ASON组与单纯加入cyclin D1 ASON浓度为6 μg/100 μl组相比，差异有显著性($P<0.01$)(表2)。

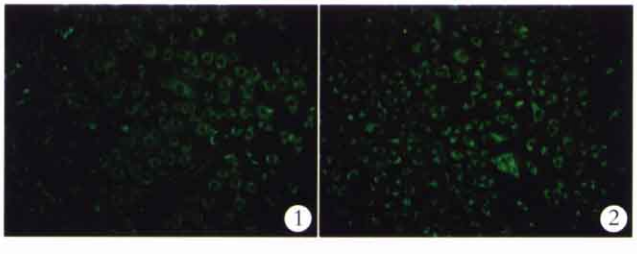


图1 脂质体+ASON组转染24 h后A549细胞生长情况 (荧光倒置显微镜×200)

图2 脂质体+SON组转染24 h后A549细胞生长情况 (荧光倒置显微镜×200)

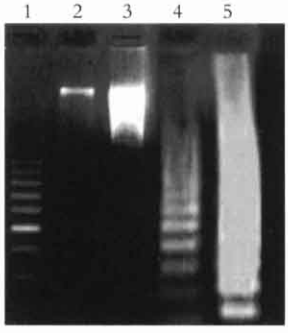
表2 脂质体转染cyclin D1 ASON培养不同时间A549细胞生长情况(%，$\bar{x}\pm s$)

组别	时相(h)			
	12	24	48	72
对照组	92.41±3.17	95.12±2.73	94.31±4.45	93.27±4.10
脂质体+ASON	88.17±6.32[a]	78.23±3.74[ab]	65.24±6.68[ab]	45.17±5.06[ab]
脂质体+SON	89.64±3.72	94.02±1.98	93.46±3.78	93.13±3.46

a：$P<0.01$，与对照组相比；b：$P<0.01$，与脂质体+SON组同一时相相比

2.3　DNA 凝胶电泳检测

脂质体转染 cyclin D1 ASON 组对 A549 细胞作用 48 h 后可见到明显的 DNA 梯形带，72 h 最明显（图 3）。



1：标准；2：空白对照；3：脂质体 + ASON 组转染 24 h 后；4：转染后 48 h；5：转染后 72 h

图 3　细胞 DNA 梯形带凝胶成像

2.4　细胞增殖周期的变化

空白对照组 G_0/G_1 期细胞所占比例为 27.9%，S 期细胞比例为 64.3%；脂质体 + SON 组 G_0/G_1 期细胞比例为 36.2%，S 期细胞比例为 53.7%；脂质体 + ASON 组 G_0/G_1 期细胞比例为 69.5%，S 期细胞比例为 19.7%，即脂质体 + ASON 组 A549 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期，使进入 S 期的细胞比例相对减少，与空白对照组及脂质体 + SON 组相比有显著差异（$P<0.01$，$n=12$）。

2.5　细胞表达 cyclin D1 水平的变化

体外培养正常 A549 细胞 cyclin D1 mRNA 相对表达量为（0.83 ± 0.12），经用脂质体转染 SON 48 h 后 A549 细胞 cyclin D1 mRNA 相对表达量为（0.89 ± 0.09），脂质体转染 ASON 48 h 后 A549 细胞 cyclin D1 mRNA 相对表达量为（0.32 ± 0.11），与 SON 组和正常对照组相比较有显著差异（$P<0.01$）。

3　讨论

肿瘤的发生是一个多步骤的复杂过程，其发生发展与不同时期不同的原癌基因的激活和或抑癌基因的失活有关[2]。近年来对细胞周期调控的深入研究及取得的进展表明细胞周期失控是癌变的重要原因。细胞周期的控制主要由细胞周期素 - CDKs 复合物，以及 CKIs 形成的一个级联网络来完成的，而影响细胞周期失控的主要因素之一便是关键卡点处正性调节基因（cyclin D1）的失控表达[3]。cyclin D1 蛋白于 1991 年被发现并克隆出其相应的 cDNA[4]，该蛋白在细胞周期关键限速卡点 G_1 ~ S 期转移中通过激活 cdk4 和 cdk6，使后者催化一系列关键底物（如 Rb 蛋白）磷酸化，导致转录因子释放，促进 DNA 合成而发挥加速细胞增殖的正性调节作用。近年来国内外相继报道了在各类型肺癌中发现存在 cyclin D1 基因扩增，以及 cyclin D1 蛋白在肺癌组织中的异常高表达，提示 cyclin D1 与多种肿瘤的发生、发展相关，是一个极好的癌基因候选者。

cyclin D1 是细胞增殖的正性调控因子，参与细胞的 DNA 合成、复制，促进细胞进入有丝分裂，它的正常表达代表细胞正常的增殖活性[5]。用特异的 ASON 抑制 cyclin D1 基因表达，致使基因沉默，能抑制细胞的生长。但 ASON 对基因的抑制作用有明显的浓度依赖性，限制了其在体内的研究。为提高转染的效率，我们采用人工载体脂质体，以克服上述缺陷，提高转染效率。

我们用脂质体介导 cyclin D1 ASON 进入 A549 细胞中，通过封闭 cyclin D1 基因表达、抑制其蛋白合成，明显控制了 A549 细胞的无限制生长。细胞周期分析显示，用 ASON 封闭 cyclin D1 基因之后，A549 细胞中 S 期与 G_0/G_1 期细胞的比例明显下降。进一步证实了 cyclin D1 在细胞增殖过程中的正性调控作用。我们认为：cyclin D1 的高表达在肺癌细胞增殖中起重要的促进作用，cyclin D1 ASON 能将 A549 细胞阻滞在 G_0/G_1 期，抑制其异常生长。

cyclin D1 作为细胞周期关键卡点处的正性调节基因，在 A549 细胞转染 cyclin D1 ASON 后，理论上可以完全抑制肺腺癌细胞的无控性增值，但我们的实验结果显示在转染 72 h 后，实验 A549 细胞组平均存活率仍为 45.1%，可能的原因为：①cyclin D1 不是肺癌发病的独立因素，单独封闭一个基因不足以完全阻止细胞的无限生长；②反义技术有时间和浓度依赖性，随时间的延长，基因封闭作用消失或减弱，这在体外实验已经证实。这给我们带来一个需解决的新问题，在反义技术应用于体内的过程中，如何维持体内反义 ASON 在癌组织中的浓度，来提高反义治疗的质量。应用反义技术封闭癌基因治疗癌症是一个新兴的课题，从实验到临床应用要经历一个漫长的过程，需要我们不断努力探索。

参考文献：

[1] LAMB J, RAMASWAMY S, FORD H L, *et al*. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer [J]. Cell, 2003, 114(3): 323 - 334.

[2] HARTWELL L H, KASTAN M B. Cell cycle control and cancer [J]. Science, 1994, 266 (5192): 1821 - 1828.

[3] 曹乃清，王鸿程，陈　洁，等. CyclinD1 MDR1 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 四川医学，2004，25(7)：732 - 734.

[4] PIRKMAIER A, DOW R, GANIATSAS S, *et al*. Alternative mammary oncogenic pathways are induced by D-type cyclins; MMTV-cyclin D3 transgenic mice develop squamous cell carcinoma [J]. Oncogene, 2003, 22 (28): 4425 - 4433.

[5] LIU S, ASPARUHOVA M, BRONDANI V, *et al*. Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilinA[J]. Nucleic Acid Res, 2004, 32(12): 3752 - 3795.

（编辑　薛国文）