论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1622-04

Livin 反义寡核苷酸诱导人肾癌细胞凋亡及其机制的研究

刘 川[1],吴小候[2],张唯力[1],唐 伟[2],尹志康[2],何云锋[2],杜 虎[2] (重庆医科大学:[1]附属第二医院泌尿外科,重庆 400010,[2]附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨 Livin 反义寡核苷酸(ASODN)对人肾癌细胞株 786-O Livin mRNA 及蛋白表达的抑制作用以及对细胞凋亡的影响。方法 设计合成全硫代磷酸化修饰的 Livin ASODN,脂质体辅助转染至 786-O 细胞内。采用 RT-PCR 检测转染后 Livin mRNA 的变化,细胞免疫化学、激光扫描共聚焦显微镜观察 Livin 蛋白在细胞内的分布、转染后表达的变化及细胞形态的变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化,激酶法测定 Caspase3 活性的变化。结果 转染 Livin ASODN 后,RT-PCR 显示 786-O 细胞表达 Livin mRNA 减少($P<0.01$),激光扫描共聚焦显微镜下见细胞表达 Livin 蛋白减少、细胞形态发生变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率显著增加($P<0.01$),Caspase3 活性明显增加($P<0.01$)。结论 Livin ASODN 能明显下调 786-O 细胞 Livin 基因的表达,诱导细胞凋亡。抑制 Caspase3 活性是 Livin 抑制细胞凋亡的途径之一。

关键词:Livin;寡核苷酸类,反义;细胞凋亡;肾肿瘤
中图法分类号:R394.2;R73-362;R737.11 文献标识码:A

Antisense oligonucleotide targeting livin induces apoptosis of human renal carcinoma cell 786-O *in vitro* and its mechanism

LIU Chuan[1], WU Xiao-hou[2], ZHANG Wei-li[1], TANG Wei[2], YIN Zhi-kang[2], HE Yun-feng[2], DU Hu[2] ([1]Department of Urinary Surgery, The Second College of Clinical Medicine, Chongqing 400010, [2]Department of Urology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of antisense oligonucleotides (ASODN) targeting livin on the inhibition of livin mRNA and protein expression and the apoptosis of human renal carcinoma cell line 786-O cells. Methods Specific phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides targeting livin were synthesized and then transfected into 786-O cells. The expressions of livin mRNA were detected by RT-PCR. Expression and location of livin protein were observed by confocal laser scanning microscope (CLSM). Apoptosis rate of 786-O cells was investigated by flow cytometer. The activity of Caspase-3 was detected by colorimetric assay. Results After the transfection of ASODN, the expression of livin mRNA was decreased ($P<0.01$), the fluorescence signal of livin protein observed by CLSM was significantly decreased, the apoptosis rates detected by flow cytometry were significantly increased ($P<0.01$), and the caspase-3 activity was enhanced ($P<0.01$). Conclusion Livin ASODN could remarkably down-regulate the expression of livin gene in 786-O cells line and induce tumor cell apoptosis. These events are linked to the activation of caspase-3.

Key words: livin; oligonucleotides, antisense; apoptosis; renal tumor

凋亡受到抑制是许多肿瘤细胞恶性生长的原因,其中凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)扮演了重要角色。IAPs 是近年凋亡研究领域的热点,它是一类新的独立于 Bcl-2 的抗凋亡蛋白家族。Livin 是最近新发现的 IAPs 家族新成员,主要在一些肿瘤组织细胞中高表达而正常组织少有表达,可能成为肿瘤治疗的新靶点[1,2]。2007 年,Kempkenstetfen[3]、Kitamura 等[4]先后报道肾癌组织表达 Livin,而癌旁组织及正常肾脏无表达。因此,我们以 Livin 为靶基因,设计、合成其反义脱氧寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)及对照错义寡核苷酸(missense oligonucleotides, MSODN),并观察它们对人肾癌细胞株 786-O的影响,以探讨 Livin 作为肾癌治疗靶点的可能

基金项目:重庆市卫生局课题(04-2-131)
Supported by the Project of Chongqing Health Bureau(04-2-131)
作者简介:刘 川,男,重庆市南川区人,博士研究生,副主任医师,主要从事泌尿系统肿瘤方面的研究。电话:(023) 63693576, E-mail: liuchuan100@126.com
通信作者:吴小候,电话:(023)89011122
收稿日期:2008-03-06 修回日期:2008-04-24

性。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;RNAfast200 总 RNA 极速抽提试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司;RT-PCR 试剂盒(RNA PCR Kit AMV Ver. 3.0)为宝生物(大连)有限公司产品;山羊抗人 Livin 抗体为 R & D 公司产品;小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品;Caspase-3 活性测定(激酶法)试剂盒为 BioVision 公司产品;Annexin Ⅴ-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2　细胞培养

人肾癌细胞株 786-O 购自中国医学科学院上海细胞生物研究所。常规培养于含 10% 的小牛血清,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中,置于 37 ℃、5% CO_2、湿度 95% 的 CO_2 孵箱中培养。

1.3　反义寡核苷酸的合成

Livin 反义及错义寡核苷酸序列由大连宝生物有限公司以全硫代磷酸寡核苷酸的形式合成,用无血清无抗生素 RPMI1640 培养基稀释为 20 μmol/L 原液,经微孔滤膜过滤,-20℃ 保存备用。

反义序列 5′-ACCATCACCGGCTGCCCAGT-3′,

靶序列:5′-ACUGGGCAGCCGGUGAUGGU-3′,

错义序列 5′-GTCAGGATCTTCCCACGGAG-3′。

1.4　反义寡核苷酸包裹体制备及细胞转染

细胞在 24 孔培养板中培养,进入对数生长期后,按照 Lipofectamine™ 2000 说明书,将脂质体分别与反义及错义寡核苷酸在无血清培养基中混合,制成脂质体-寡核苷酸复合物,分别加入培养板中,寡核苷酸终浓度为 400 nmol/L。转染后 72 h 收集细胞,进行下一步试验。

1.5　细胞分组

根据向培养细胞中加入的成分不同,分为:①反义组:加入反义寡核苷酸;②错义组:加入错义的寡核苷酸;③脂质体组:只加入等量稀释的脂质体;④PBS(磷酸缓冲液)组:只加入等量的 PBS。每组设 3 个平行复孔。

1.6　转染细胞 Livin mRNA 表达的检测

于转染后 72 h 收集细胞,以 RNAfast200 总 RNA 极速抽提试剂盒提取总 RNA。采用 AMV 两步法检测 Livin mRNA 的表达。Livin 及 GAPDH 扩增引物序列由宝生物(大连)有限公司合成。Livin 引物及 RT-PCR 反应条件参考文献[5]。GAPDH 引物:上游引物:5′-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3′,下游引物:5′- CATACCAGGAAATGAGCTTG -3′,扩增片段 177 bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳鉴定,图像采集。用 Bandleader 软件定量分析基因表达量(以 Livin/GAPDH 灰度比值表示目的基因mRNA 的相对表达水平)。

1.7　细胞免疫化学、激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察 Livin 蛋白表达的变化

细胞加入载有血盖片的 24 孔培养板中,贴壁,转染结束后吸弃培养液,用 0.01 mol/L PBS 漂洗,4% 多聚甲醛室温下固定,0.4% Triton-X100 室温下作用 20 min,加兔封闭血清室温下作用 30 min,加一抗(山羊抗人 Livin),置湿盒内 4 ℃过夜,0.01 mol/L PBS 漂洗,加 FITC 标记的二抗(兔抗山羊),置湿盒内室温下 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗,滴加 100 μg/ml PI,室温下暗处 5 min,0.01 mol/L PBS 漂洗,50% 的甘油封片。激光扫描共聚焦显微镜(Leica Tcs Sp2)观察、成像。

1.8　Annexin Ⅴ/PI(碘化丙啶)法流式细胞仪检测凋亡细胞

按照 Annexin Ⅴ-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书收集上述经相应处理的各组细胞,Annexin Ⅴ-FITC、PI 染色,1 h 内流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。

1.9　激酶法测定 Caspase3 活性

按试剂盒(BioVision 公司)提供的操作说明书进行实验:收集细胞,加入细胞裂解液,冰上孵育 10 min,离心,取上清液,加反应缓冲液和偶联底物,37℃ 水浴 1 h,于酶联检测仪上测定 405 nm 波长的吸光度值,以此值代表 Caspase-3 的相对活性。

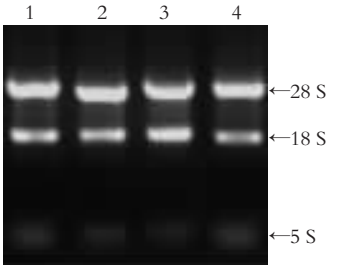
1.10　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计学软件进行方差分析、独立样本的 t 检验、χ^2 检验。

2　结果

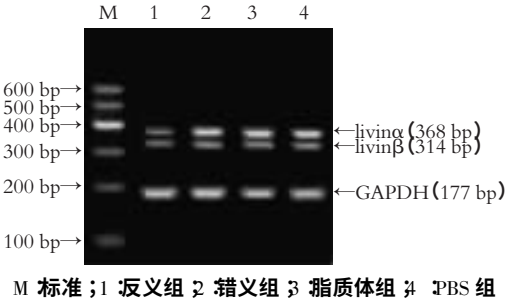
2.1　转染细胞 Livin mRNA 表达的检测

各组细胞总 RNA 抽提后琼脂糖凝胶电泳结果显示出 18S 和 28S 2 条电泳条带(图 1),在紫外光栅分光光度计测定 $D(260)$、$D(280)$,计算 $D(260)/D(260)$ 值,均在 1.9 ~ 2.0。说明提取的细胞总 RNA 的完整性和纯度可以满足后续实验要求。经 RT-PCR 扩增后,可见 GAPDH 扩增片段大小为 177 bp,各组电泳条带无明显变化。Livin 扩增后可见两个片段,大小分别为 368 bp 和 314 bp,分别是 Livinα 和 Livinβ。Livin ASODN 作用 72 h 后,Livin 两个片段的 mRNA 相对表达量(0.63 ± 0.06)较错义组(0.85 ± 0.07)、脂质体组(0.88 ± 0.05)、PBS 组(0.91 ± 0.05)明显减弱($P < 0.01$);而错义组、脂质体组及 PBS 组间比较无显著性差异($P > 0.05$,图 2)。



1:反义组 2:错义组 3:脂质体组 4:PBS 组

图 1　各组细胞总 RNA 抽提后电泳结果

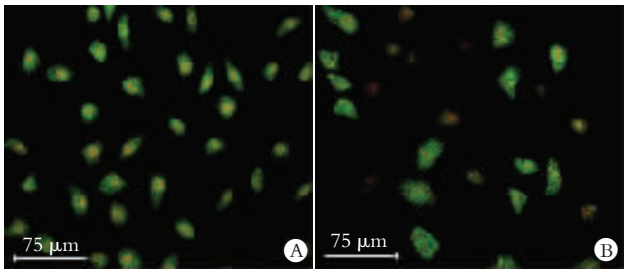


M 标准;1:反义组 2:错义组 3:脂质体组 4:PBS 组

图 2　转染后各组细胞 Livin mRNA 表达的变化

2.2 细胞免疫化学、激光共聚焦显微镜观察 Livin 蛋白在 786-O 细胞定位及表达的变化

从本实验的 LSCM 图像可观察到各对照组 Livin 蛋白呈现绿色荧光，分布于细胞质和细胞核，以细胞核为主（红色荧光为碘化丙啶所染色的细胞核内 DNA），见图 3。而转染 Livin ASODN 后，标记 Livin 的绿色荧光明显减弱，且见有的细胞体积明显缩小，完全无绿色荧光。



A：对照组；B：反义组

图 3 激光共聚焦显微镜显示 Livin 蛋白在 786-O 细胞内分布的变化

2.3 Annexin Ⅴ/PI（碘化丙啶）法流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

400 nmol/L 的 Livin ASODN 作用 72 h 后，细胞早期凋亡率为（35.38% ±6.90%），同错义组（4.50% ±0.82%）、脂质体组（4.35% ±1.13%）及 PBS 组（4.28% ±0.61%）比较差异显著（$P<0.01$），而后 3 组之间比较差异无显著性（$P>0.05$）。

2.4 各组细胞 Caspase3 活性的检测

激酶法检测 Caspase3 活性显示，786-O 细胞转染 Livin ASODN 后，其 Caspase3 活性明显增加，其相对活性为（0.097 ± 0.016），同错义组（0.058 ± 0.015）、脂质体组（0.052 ± 0.016）及 PBS 组（0.047 ± 0.011）比较差异显著（$P<0.01$），而后 3 组之间比较差异无显著性（$P>0.05$）。

3 讨论

近年 Vucic[6]、Kasof 等[7] 根据 IAPs 同源序列，用含有 BIR 序列的 EST 克隆，在人的胎肾 cDNA 文库中发现了该基因家族的新成员 Livin。它在正常成人的大多数组织中（除胎盘）均不表达。在一些癌细胞系中高表达，如黑色素瘤细胞系（G361 和 SK-Mel29）、淋巴瘤、HaCat 细胞、MCF7 乳腺癌细胞[5] 等。近年来，临床发现 Livin 在许多肿瘤组织中高表达，如膀胱癌[8]、淋巴瘤[7]、肺癌[9,10] 等。2007 年，Kempkensteffen 等[3] 报道运用 RT-PCR、Western blot 方法检测 152 例肾癌患者肿瘤组织及癌旁组织的 Livin 表达情况，结果有 59 例表达阳性（阳性率 38.8%），而癌旁组织及正常患者无表达。作者认为 Livin 可作为肾癌治疗的新的靶基因。

反义核酸是天然存在或人工合成的核苷酸序列，它通过 Watson Crick 碱基互补原则，与目的基因杂交，从而阻止基因的表达，抑制细胞的增殖，促进细胞的凋亡，达到预防或治疗肿瘤的目的。天然寡核苷酸容易被核酶降解，而经过硫代修饰后可以提高其耐受核酸水解的能力，并有良好的溶解性和杂交性能，是迄今为止研究最深入、应用最广泛的寡核苷酸类似物[11]。目前已有多种反义抗肿瘤药物进入临床试验阶段[12,13]。本实验以全硫代磷酸化修饰 Livin ASODN，以增强其抗核酶的活性，同时采用阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000 将其包裹，使其更容易被细胞摄取。Livin ASODN 转染细胞后，通过 RT-PCR、细胞免疫荧光 LSCM 观察，发现细胞表达 Livin mRNA 及蛋白均明显低于各对照组。Annexin Ⅴ/PI 法流式细胞仪检测各组细胞凋亡率，发现 Livin ASODN 组细胞凋亡率明显高于各对照组（$P<0.01$）。说明 Livin ASODN 能特异性抑制 Livin 的表达，诱导细胞凋亡。

Livin 在转录过程中因剪接方式的不同，产生两种 mRNA 亚型，分别有 1 351 个和 1 297 个碱基。两者除相差一段 54 bp 以外，其他完全一致，分别命名为 Livinα 和 Livinβ[5]。两种蛋白质的功能在不同的肿瘤中有所不同。Gazzaniga P 等[8] 运用 RT-PCR 技术研究 Livin 在膀胱癌组织中的表达时发现，Livin 在正常膀胱组织中不表达，但其 α 亚型在膀胱癌组织中表达（不表达 Livinβ），尤其在膀胱癌早期复发标本高表达。作者认为对初发的浅表性膀胱癌，Livinα 的表达能预示早期复发。我们采用与 Ashhab Y[5] 和 Gazzaniga [8] 相同的扩增引物（能区分 Livinα 和 Livinβ），经 RT-PCR 扩增后，可见两个片段，大小分别为 368 bp 和 314 bp，说明 786-O 细胞同时表达 Livinα 和 Livinβ。转染 Livin ASODN 后，两个片段的 mRNA 相对表达量明显减弱，细胞凋亡率明显增加。表明 Livin ASODN 能同时抑制 Livinα 和 Livinβ 的表达，二者在 786-O 细胞中具有抑制细胞凋亡的作用。

有研究表明 Livin 通过其 BIR 结构域选择性地与 Caspase（半胱天冬酶）蛋白的多个成员相互作用（如 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 等），阻止 Caspase 蛋白在细胞凋亡时执行蛋白切除功能，从而抑制凋亡的执行过程[7]。本研究结果显示 Livin ASODN 抑制 Livin 表达后，caspase-3 活性显著增强，细胞凋亡也明显增多。提示抑制 caspase-3 活性是 Livin 执行凋亡抑制功能的重要机制之一。

本研究结果表明，人肾癌细胞株 786-O 表达 Livin，Livin 在其中具有抑制细胞凋亡的作用。以 Livin 为靶基因的 ASODN 能特异性抑制 Livin 的表达，诱导细胞凋亡。

参考文献：

[1] Chang H，Shimmer A D. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy [J].

Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 24 – 30.
[2] Liu B, Han M, Wen J K, *et al*. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 168 – 176.
[3] Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, *et al*. Expression of the apoptosis inhibitor livin in renal cell carcinomas: correlations with pathology and outcome[J]. Tumour Biol, 2007, 28(3): 132 – 138.
[4] Kitamura H, Honma I, Torigoe T, *et al*. Expression of livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients[J]. Urology, 2007, 70(1): 38 – 42.
[5] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, *et al*. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. FEBS Lett, 2001, 495(1 – 2): 56 – 60.
[6] Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro M T, *et al*. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curr Biol, 2000, 10(21): 1359 – 1366.
[7] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3238 – 3246.
[8] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, *et al*. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85 – 89.
[9] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, *et al*. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1000 – 1009.
[10] Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, *et al*. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2004, 46(3): 299 – 304.
[11] 张礼和. 以核酸为作用靶的药物研究[M]. 北京. 科学出版社, 1996: 221 – 250.
[12] Geary R S, Bradley J D, Watanabe T, *et al*. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2′-0-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone[J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45(8): 789 – 801.
[13] Chi K N, Eisenhauer E, Fazli L, *et al*. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2′-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(17): 1287 – 1296.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2008)17-1625-01

个案与短篇

手术治疗髁状突骨折 30 例临床疗效

刘家武[1]，傅成扬[1]，刘 磊[2]（[1]南京医科大学附属淮安第一人民医院口腔科，江苏 淮安 223300；[2]四川大学华西口腔医院口腔颌面外科，成都 610041）

髁状突骨折是最常见的下颌骨骨折。常见致伤原因有交通事故、坠跌、击打等，不同的致伤力、致伤方向、致伤性质对髁状突骨折的严重程度、移位程度以及骨折的方向、部位等影响较大，导致髁状突骨折差异较大，治疗的方法也不尽相同。迄今为止，临床上对髁状突骨折的治疗方法选择仍有较大争议。我们采用手术治疗 30 例髁状突骨折，效果满意，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

入选病例为 2005 年 9 月至 2007 年 2 月四川大学华西口腔医院口腔颌面外科及江苏省淮安市第一人民医院口腔科收治的髁状突骨折并进行手术治疗的患者，共 30 例。其中男性 21 例，女性 9 例，平均年龄为 29.8 岁。本组病例中双侧髁状突骨折 18 例，单侧髁状突骨折 12 例，共有髁状突骨折 48 侧。所有骨折均为中、低位骨折且有移位，成角大于 30°，无粉碎性骨折情况。

1.2 治疗方法

30 例(48 侧)均采用髁状突骨折切开复位内固定术进行治疗，常规采用耳前切口或颌后切口作为手术入路，其中 6 侧采用颌后切口，42 侧采用耳前切口。解剖复位后采用小型接骨板或定位螺钉进行固定，术后颌间牵引固定 1 周，随访 6 个月至 2 年。

2 结果

28 例患者术后面容和咬合关系恢复满意，张口度 3.0 ~ 3.7 cm，不影响咀嚼等生理功能，未出现开骀等并发症，颞颌关节功能基本恢复正常；2 例患者出现术后尖窝关系不协调情况，经过调骀处理后咬合关系满意。所有患者术后在三维空间平面运动良好(图 1 ~ 3)。

3 讨论

3.1 髁状突骨折手术适应证

国外的临床统计学研究结果显示，髁状突的保守治疗和手术治疗可取得类似的功能性预后，但手术治疗髁状突运动灵活性更大，适应范围更为广泛[1,2]。作者认为，高位囊内髁状突骨折、不完全骨折(如青枝骨折)、无明显移位的髁状突骨折均可采取保守治疗；但对于髁状突中、低位骨折，有明显移位，保守治疗不能获得良好咬合关系、成角畸形大于 30°、髁状突骨折片向颅中窝移位、髁状突外侧移位并突破关节囊者均属手术适应证，应及时进行手术治疗。

（下转 1633 页）

基金项目：四川省杰出青年学科带头人培养基金(06ZQ026-008)
Supported by the Cultivation Funds for Distiguished Young Leading Scholars of Sichuan Province(06ZQ026-008)
作者简介：刘家武，男，江苏省灌南县人，硕士，讲师，主要从事颌面部创伤诊治方面的研究，发表论文 7 篇。E-mail：ljiawu@163.com
通信作者：刘 磊，电话：(028)85503406，E-mail：drliulei@sohu.com
收稿日期：2007-10-08；修回日期：2008-02-29