论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1272-03

Survivin基因反义寡核苷酸与大肠癌血管形成的实验研究

李 瑞,黄宗海,姚 航,厉 周,李 强 (南方医科大学珠江医院普通外科,广州 510282)

摘 要:目的 研究Survivin反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)对人大肠癌裸鼠移植瘤的细胞凋亡及血管形成的影响。**方法** 建立裸鼠人大肠癌模型,将成瘤后的裸小鼠分为空白对照组、脂质体转染对照组、脂质体SODN对照组和脂质体ASODN组。测定瘤质量并计算移植瘤抑制率,瘤组织进行HE染色,用S-P法染色检测微血管密度(MVD),TUNEL法检测凋亡细胞。**结果** ASODN实验组在第8天后测定最终瘤质量,与各对照组在统计学上均有显著性差异($P<0.05$)。常规病理观察ASODN实验组可见肿瘤细胞生长受抑制,肿瘤组织可见片状坏死区,而且这些区域可见大量炎性细胞浸润。空白对照组、脂质体对照组、脂质体SODN对照组MVD分别为(19.57±3.37)、(21.94±4.41)、(20.49±3.91),ASODN实验组MVD为(11.30±2.79),差异显著($P<0.05$)。空白对照组、脂质体对照组、脂质体SODN对照组AI分别为(3.53±1.89)、(3.86±2.14)、(4.47±2.30),ASODN实验组AI为(28.45±2.76),差异显著($P<0.05$)。**结论** Survivin基因反义寡核苷酸可显著抑制血管内皮生长因子的表达,导致内皮细胞凋亡和毛细血管迅速退化,从而达到抑制肿瘤生长的目的。

关键词: Survivin基因;反义寡核苷酸;大肠癌模型;微血管密度
中图法分类号: R73-362; R730.23; R735.34 **文献标识码:** A

Survivin ASODN suppresses vasiformation in xenograft of colorectal cancer cells in nude mice

LI Rui, HUANG Zong-hai, YAO Hang, LI Zhou, LI Qiang (Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of antisense oligonucleotide (ASODN) against survivin on the apoptosis and vasiformation in nude mice after colorectal cancer cells transplantation. Methods After the establishment of the xenograft model of colorectal cancer in nude mice, the 24 animals were randomized into 4 groups with 6 mice in each group, that is, control group, Lipofectamine group, Lipofectamine + SODN group and Lipofectamine + ASODN group. Lipofectamine, SODN or ASODN was directly injected into the corresponding xenograft in 1, 4 and 8 d after tumorigenesis. The final weight of tumor mass was measured to calculate the suppression rate of tumor. The tumor tissues were morphologically observed by HE staining, the expression of survivin was measured by immunohistochemical method to calculate the microvessel density (MVD), and the apoptosis of tumor cells was detected by TUNEL. Results There was significant difference in the final weight of tumor mass in Lipofectamine + ASODN group with the other groups ($P<0.05$), and the pathological observation showed that the growth of tumor cells was inhibited in this group. The tumor mass of this group showed necrosis in the lamellar zone and infiltration of massive inflammatory cells. The MVD of tumor was 19.57 ± 3.37 in control group, 21.94 ± 4.41 in Lipofectamine group, 20.49 ± 3.91 in Lipofectamine + SODN group, and 11.30 ± 2.79 in Lipofectamine + ASODN group. Significant difference was seen between Lipofectamine + ASODN group with the other groups ($P<0.05$). The apoptotic index (AI) was 3.53 ± 1.89, 3.86 ± 2.14, 4.47 ± 2.30, and 28.45 ± 2.76 respectively for above mentioned groups. There was also significant difference between Lipofectamine + ASODN group with the other groups ($P<0.05$). Conclusion Survivin ASODN inhibits significantly the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), induces the apoptosis of endothelial cells and the degeneration of capillaries, and thus suppresses the growth of tumor.

Key words: survivin; antisense oligonucleotide; colorectal cancer cells; microvessel density

作者简介:李 瑞,男,河南省郑州市人,博士研究生,主治医师,主要从事大肠癌基因治疗方面的研究。E-mail:lirui181h@163.com
通信作者:黄宗海,E-mail:hghigh@gdvnet.com
收稿日期:2008-11-17;修回日期:2009-02-04

在凋亡的调节因子中,凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)作为一种独特的细胞死亡调节因子引起了人们的注意。Survivin 是 IAP 家族的新成员,大多数正常组织均测不到 Survivin 基因表达,但在大多数恶性实体肿瘤中呈高度选择性表达[1]。它可以抑制细胞凋亡,并在新生血管的形成中有重要作用。Survivin 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide,ASODN)具有高度特异性,能够明显抑制肿瘤的生长,故本研究旨在探讨 Survivin 反义寡核苷酸对人大肠癌细胞裸鼠移植的瘤细胞凋亡及血管形成的影响。

1　材料与方法

1.1　实验动物

实验在南方医科大学实验动物中心和珠江医院中心实验室完成。实验动物为 4 ~ 6 周龄 BALB/c 裸小鼠,体质量(19.2 ± 1.3)g,由南方医科大学实验动物中心提供。

1.2　主要试剂

人大肠癌 Lovo 细胞由解放军广州军区总医院实验中心提供;阳离子脂质体(Lipofectamine™2000)购自 Invitrogen 公司;鼠抗人 CD34 单克隆抗体为 SantaCruz(美国)公司产品。Survivin 正、反义寡核苷酸的设计、合成根据 Survivin 的基因序列(Genbank Accession NumberU75285),按参考文献[2]设计互补于 Survivin mRNA 的 232-251 序列的 20 个碱基组成的 ASODN 链,序列为 5′-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3′,同时合成正义链,序列为 5′-CGCAGTAGCTGCGCTGATTG -3′,两条序列每端 5 个磷酸基采用硫代修饰,由上海生工生物工程公司合成。

1.3　方法

1.3.1　细胞培养　　水浴复苏人大肠癌细胞株 Lovo 后接种于 30 ml 培养瓶,在 37℃,5% CO_2 培养箱中用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液常规培养。

1.3.2　人大肠癌裸鼠模型的建立　　将对数生长期的人大肠癌细胞 Lovo 细胞胰酶消化,离心 3 min,RPMI1640 培养液制成细胞悬液,浓度调整为 3.5×10^5/ml,取 0.2 ml 接种于每只裸鼠的一侧背部靠左后肢处。接种后每天观察注射点有无破溃红肿,以皮下结节直径超过 0.5 cm 为成瘤标准。

1.3.3　实验分组及处理　　将 24 只成瘤后的裸小鼠运用简单完全随机分组法分成 4 组:空白对照组、脂质体转染对照组、脂质体 SODN 对照组和 400 ng/ml 浓度的脂质体 ASODN 组。各组均同时于成瘤后 1、4、8 d 向瘤体内直接注射相应的试剂 0.2 ml,定期观察皮下移植瘤生长情况。

1.3.4　人大肠癌裸小鼠皮下移植瘤体积和质量的测量　1、4、8 d 观测裸小鼠肿瘤体积变化,并测量瘤体大小,8 d 后断颈处死裸小鼠,取肿瘤称量。肿瘤体积 = $a \times b^2/2$ mm^3(a:长径,b:短径)。

1.3.5　光镜观察　　将处死后的裸小鼠部分肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定,标本经石蜡包埋后连续 4 μm 切片,HE 染色,光镜下观察人大肠癌移植瘤细胞形态变化。

1.3.6　微血管密度(MVD)的检测　　按 Vltrasensitive TM S-P 超敏试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明进行操作。然后在低倍镜(×40)选取切片中 3 个血管密度最高区域(排除肿瘤出血及边缘反应区),在高倍镜下(×200)计数每个区域的血管数量,其平均值即为肿瘤的 MVD。

1.3.7　脱氧核苷酸末端转移酶介导的末端标记(TUNEL)法检测凋亡细胞　　应用细胞凋亡原位检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)染色,细胞核呈棕黄色为阳性细胞。每张切片随机选择 3 个高倍视野(×400),计数 1 000 个癌细胞中阳性癌细胞数,凋亡指数(AI) = 阳性癌细胞数/1 000 × 100%。

1.4　统计学分析

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析(显著性水准 $\alpha = 0.05$)。

2　结果

2.1　Survivin ASODN 对人移植瘤的抑制作用

各实验组初始瘤体体积差异无统计学意义,第 8 天后断颈处死裸小鼠,测定最终瘤质量及抑瘤率,ASODN 实验组与各对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),各对照组之间无显著性差异。见表 1。

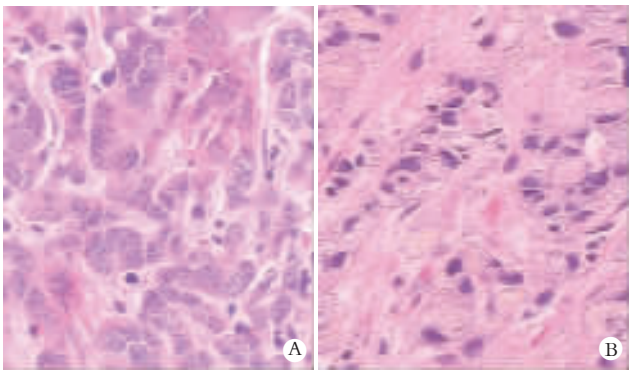
表 1　各组移植瘤初始瘤体体积、最终瘤质量及抑制率($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体体积(mm^3)	最终瘤质量(mg)	抑瘤率(%)
空白对照组	48.42 ± 1.42	498.14 ± 13.90	0
脂质体对照组	46.59 ± 2.08	502.68 ± 11.24	0.83 ± 0.54
脂质体 SODN 对照组	47.44 ± 2.05	506.20 ± 10.40	1.05 ± 0.28
脂质体 ASODN 组	47.22 ± 1.58	238.41 ± 8.26[a]	52.07 ± 1.49[a]
F	1.058	843.095	2 230.326
P	0.389	0.000	0.000

a:$P < 0.05$,与空白对照组比较

2.2　移植瘤病理变化

HE 染色后,光镜下见各对照组人大肠癌移植瘤细胞密集成群,细胞多为多边形,核大深染。而 ASODN 实验组可见肿瘤细胞较少,分布稀疏,有变性的液化坏死灶,癌细胞皱缩变圆,胞核固缩,核深染(图 1)。



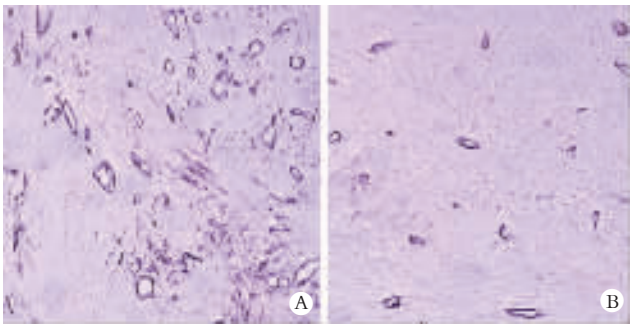
A:空白对照组;B:脂质体 ASODN 组

图 1　治疗后各组荷瘤裸鼠肿瘤组织学观察　(HE ×400)

2.3　Survivin ASODN 与 MVD、AI 之间的关系

检测肿瘤组织 MVD:空白对照组、脂质体对照组、脂质体 SODN 对照组 MVD 分别为(19.57 ± 3.37)、(21.94 ± 4.41)、(20.49 ± 3.91),ASODN 实验组 MVD 为(11.30 ± 2.79),差异

显著($P<0.05$)。各实验组测定凋亡指数:空白对照组、脂质体对照组、脂质体 SODN 对照组 AI 分别为(3.53±1.89)、(3.86±2.14)、(4.47±2.30),ASODN 实验组 AI 为(28.45±2.76),ASODN 实验组 AI 与空白对照组,脂质体对照组,脂质体 SODN 对照组 AI 相比,差异显著($P<0.05$)(图2)。



A:空白对照组;B:脂质体 ASODN 组

图2 各组移植瘤微血管密度观察 (S-P×200)

3 讨论

Survivin 是一个新的凋亡抑制蛋白,由 142 个氨基酸组成,N 端含有一个杆状病毒 IAP 重复序列,其中含有对抑制凋亡有重要作用的氨基酸残基 Pro33、Trp67 和 Cys84,survivin 通过这些残基与 caspase-3 和 caspase-7 结合抑制 caspase 的活性,阻止多种凋亡信号诱导的细胞凋亡[3-7]。Survivin 是迄今发现的作用最强的凋亡抑制因子。Survivin 选择性的在肿瘤组织中表达而在正常成熟的组织中不表达,并且参与了细胞周期的调控和新生血管的生成,因而 Survivin 成为肿瘤诊断和治疗的新靶点[8]。本实验采用培养细胞移植法,建立大肠癌 Lovo 细胞裸鼠移植瘤模型,在动物实验中应用 Survivin 反义寡核苷酸对人大肠癌进行治疗,观察 survivin ASODN 治疗大肠癌的效果,证实其有效性,并探讨其作用机制,为大肠癌基因治疗提供新的思路和可靠的实验证据。

Survivin 是生长因子诱导血管形成中的保护性基因,在血管内皮细胞和新生血管的形成中有重要作用。有研究证明[9],在正常皮肤的非增殖性的毛细血管内皮中 Survivin 表达量很低,而在体内肉芽组织中的新生血管中 Survivin 的表达量很高。因而应用 Survivin 基因反义寡核苷酸可消除血管内皮生长因子(endothelial growth factor,VEGF)在血管形成中的细胞保护作用。大量研究证实,肿瘤之所以能够通过血循环转移到其他组织器官与肿瘤内部的微血管生成有密切关系。Holash 等的研究进一步发现微血管在肿瘤发生之前已经开始形成,故肿瘤微血管数量可作为肿瘤诊断和评价预后的指标。因此,利用反义核酸技术干扰 survivin 的表达或抑制其功能的发挥可抑制有丝分裂并促进自发的细胞凋亡[10],使肿瘤生长速度延缓,瘤重量减轻。我们设计合成了互补于 Survivin mRNA 的 232~251 序列的 20 个碱基组成的 ASODN 链,于 400 ng/ml 浓度向瘤体内直接注射,结果显示,空白对照组、脂质体对照组、脂质体 SODN 对照组 MVD 分别为(19.57±3.37)、(21.94±4.41)、(20.49±3.91),ASODN 实验组 MVD 为(11.30±2.79),明显低于其他组,具有显著性差异($P<0.05$),表明 survivin ASODN 对肿瘤的抑制作用是通过抑制细胞增殖和血管生成来实现。survivin 在肿瘤血管新生调节中是至关重要的,正常血管内皮细胞不表达 survivin,肿瘤血管内皮细胞过度表达 survivin,使得肿瘤血管内皮细胞凋亡减少,有利于肿瘤生长。因此,survivin 反义寡核苷酸能够拮抗肿瘤血管内皮因子的保护作用,从而抑制肿瘤血管的新生,促进肿瘤内皮细胞凋亡,最后导致肿瘤生长受到抑制,达到治疗肿瘤的目的,这是 Survivin 基因反义寡核苷酸抗肿瘤作用的重要机制之一。

参考文献:

[1] Schultz I J, Kiemeney L A, Willems J L, *et al*. Survivin and MKI67 mRNA expression in bladder washings of patients with superficial urothelial cell carcinoma correlate with tumor stage and grade but do not predict tumor recurrence[J]. Clin Chem, 2006, 52(7): 1440-1442.

[2] Olie R A, Simoes-Wust A P, 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.

[3] Ma H, Nguyen C, Lee K S, *et al*. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression [J]. Oncogene, 2005, 24(22): 3619-3631.

[4] Sun C, Nettesheim D, Liu Z, *et al*. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo[J]. Biochemistry, 2005, 44(1): 11-17.

[5] Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis[J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 212-216.

[6] Johnson M E, Howerth E W. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein[J]. Vet Pathol, 2004, 41(6): 599-607.

[7] McNeish I A, Lopes R, Bell S J, *et al*. Survivin interacts with Smac/Diablo in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2005, 302(1): 69-82.

[8] Yamamoto T, Tanidawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer[J]. Med Electron Microsc, 2001, 34(4): 207-212.

[9] Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann E J, *et al*. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting[J]. Am J Pathol, 2001, 158(5): 1757-1765.

[10] Xia C, Xu Z, Yuan X, *et al*. Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(9): 687-694.

(编辑 汪勤俭)