论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2400-04

hTR反义寡核苷酸对结直肠癌SW480细胞的凋亡及凋亡诱导因子表达的影响

李 靓,李 洋,王继见 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院普外科)

【摘要】 **目的** 探讨封闭人端粒酶RNA功能区的反义寡核苷酸(human telomerase RNA antisense oligonucleotide,hTR ASODN)对结直肠癌SW480细胞凋亡及凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor,AIF)表达的影响。**方法** 通过脂质体将hTR ASODN 1次/d,连续3 d转染入人结直肠癌SW480细胞,以未加ASODN的脂质体空白组及脂质体转染的正义组为对照。荧光显微镜观察转染情况,流式细胞仪测定转染后SW480细胞的凋亡率,RT-PCR法测定转染后AIF的表达情况。**结果** hTR ASODN转染细胞后,倒置显微镜下观察各组细胞,细胞内有绿色荧光均匀分布表示转染良好。流式细胞仪测定转染24、48、72 h后,各实验组凋亡率分别为:空白组(3.07±0.11)%、(3.71±0.63)%、(4.23±0.41)%,正义组(4.28±0.41)%、(4.49±0.56)%、(5.13±0.56)%,反义组(13.11±0.32)%、(22.04±0.21)%、(16.71±0.82)%,反义组分别与空白组、正义组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。空白组、正义组、反义组光密度比值分别为(0.152 7±0.002 1)、(0.158 0±0.007 8)、(0.368 3±0.010 9),反义组分别与空白组、正义组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** hTR ASODN具有明显的促进凋亡、抗肿瘤作用。

【关键词】 hTR;反义寡核苷酸;结直肠癌;凋亡;凋亡诱导因子

【中图法分类号】 R730.23;R735.35;R394.3 【文献标志码】 A

Effect of hTR antisense oligodeoxynucleotide on apoptosis and expressions of apoptosis inducing factor in colon carcinoma cells SW480

Li Liang, Li Yang, Wang Jijian (Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effects of the human telomerase RNA (hTR) antisense oligodeoxynueleotide (ASODN) on cell apoptosis and expression of apoptosis inducing factor (AIF) of human colon cancer SW480 cells. **Methods** hTR antisense oligodeoxynueleotide was transfected into SW480 cells by liposome once a day with contact transfection for 3 d. The SW480 cells with blank plasmid or with ASODN sense oligodeoxynueleotide by liposome transfection served as control. The expression of green fluorescent protein (GFP) was observed by fluorescence microscopy. The cell apoptosis in SW480 cells after transfection were studied by flow cytometry. The expression of AIF was measured by RT-PCR. **Results** After hTR antisense oligodeoxynueleotide was transfected into SW480 cells, GFP was equally distributed in the cells. In 24, 48 and 72 h after transfection, flow cytometry indicated that the apoptotic percentages were (3.07±0.11)%, (3.71±0.63)% and (4.23±0.41)% in the blank group, (4.28±0.41)%, (4.49±0.56)% and (5.13±0.56)% in the sense group, and (13.11±0.32)%, (22.04±0.21)% and (16.71±0.82)% in anti-sense group. Significant differences were found in the anti-sense group compared with the blank group and the sense group at every time point ($P<0.05$), while no difference was seen between the sense group and the blank group ($P>0.05$). There were more AIF mRNA expression in the anti-sense group than in the blank group and the sense group (0.368 3±0.010 9 *vs* 0.152 7±0.002 and 0.158 0±0.007 8, $P<0.05$), while there was no difference between the later 2 groups ($P>0.05$). **Conclusion** hTR antisense oligodeoxynueleotide have obvious anti-tumor effect by improving apoptosis in SW480 cells..

【**Key words**】 hTR; antisense oligodeoxynueleotide; colon cancer; apoptosis; apoptosis inducing factor

Supported by the Program of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-227). Corresponding author: Li Yang, E-mail: liyang_68813@126.com; Wang Jijian, E-mail: Wang Jijian1963@163.com

【基金项目】 重庆市卫生局医学科研项目计划(2008-2-227)

【通信作者】 李 洋,E-mail:liyang_68813@126.com

王继见,E-mail:Wang Jijian1963@163.com

端粒酶是一种特殊的DNA聚合酶,具有逆转录酶活性,端粒酶复合体由六部分构成[1],其中最重要的是人端粒酶RNA(human telomerase RNA,hTR)和端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT),它们能够抑制肿瘤细胞的端粒酶活性[2],并以自身的RNA为模板,使细胞绕过衰老途径成为永生化细胞,导致人类肿瘤的发生。有研究表明,封闭人端粒酶RNA功能区的反义寡核苷酸(human telomerase RNA antisense oligonucleotide,hTR ASODN)能有效抑制癌细胞的端粒酶活性并诱导细胞凋亡[3]。凋亡诱导因子(apoptosis inducingfactor,AIF)是一种核黄素蛋白,可通过线粒体依赖性,从线粒体中释放而诱导细胞凋亡[4]。为探讨肿瘤细胞端粒酶活性受到抑制后,该肿瘤细胞的预后、转归以及AIF是否参与封闭hTR功能区的ASODN所致的细胞凋亡,本研究观察了hTR ASODN对人结直肠癌SW480细胞诱导凋亡作用以及在凋亡过程中AIF的表达,以期为人结直肠癌的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

结直肠癌细胞SW480由本实验室提供,脂质体Lipofectin2000购自Invitrogen公司,Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物技术发展有限公司,RPMI1640、小牛血清购自Gibco公司。荧光(FAM)标记5′羟基端并全硫代修饰纯化的hTR反义寡核苷酸片段(ASODN):互补于hTR模板区合成端粒的20个碱基序列(46~65 bp),序列为5′-CCCTTCTCAGTTAGGGTTAG-3′;正义寡核苷酸对照片段(SODN):与反义寡核苷酸互补作为对照的片段,序列为5′-CTAACCCTAACTGAGAAGGG-3′,此均系上海生物工程研究所合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养及传代 SW480细胞在37 ℃,50 ml/L CO_2条件下,用RPMI1640加入10%小牛血清培养液及双抗(100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素)中常规培养,隔天传代1次。实验所用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 脂质体介导的正反义寡核苷酸的转染 参考脂质体Lipofectin2000转染试剂盒说明书:转染前1 d,将对数生长期细胞接种于6孔培养板,并以2 ml无双抗的培养液培养,当细胞达到80%~90%时开始转染,先以无血清及双抗的培养液250 ml分别加入脂质体及寡核苷酸,静置5 min后,将两管混合,制备脂质体-寡核苷酸复合物,将复合物静置15 min后,加入到细胞培养板中,分为反义寡核苷酸组、正义寡核苷酸组、空白对照组(无血清、无抗生素、无脂质体培养液)。转染每隔24 h就用寡核苷酸包裹体重复转染1次,第1次转染的当天定为0 d,连续转染3 d,第24、48、72小时,各收获一批细胞,进行以下检测。

1.2.3 实验分组 ①空白对照组(空白组):只加入细胞培养基,②正义寡核苷酸组(正义组):终浓度为2.5 μmol/L,③反义寡核苷酸组(反义组):终浓度分别为2.5 μmol/L。每组设3个复孔。

1.2.4 细胞转染后的观察 分别于转染24、48、72 h后,在倒置显微镜下观察各组细胞的转染情况,并摄像。

1.2.5 流式细胞仪检测转染后的细胞凋亡率 分别于转染24、48、72 h后,先用PBS冲洗2次;再以不含EDTA的胰酶消化;离心后收集细胞[数量需达到$(5\sim10)\times10^5$];加入500 μl的Binding Buffer悬浮细胞后;加入1 μl Annexin V-PE混匀;室温、避光、反应5~15 min后;在流式细胞仪下检测细胞的凋亡率(荧光补偿调节:使用未经凋亡诱导处理的正常细胞,作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置)。

1.2.6 RT-PCR技术检测AIF的表达 ①总RNA的提取:应用Trizol试剂,根据使用说明书提取SW480细胞中的总RNA,紫外分光光度计检测RNA的纯度($1.8<D(260)/D(280)<2.0$)。②RT-PCR反应:根据GenBank提供的AIF(geneID:9131)与β-actin(geneID:60)的核酸序列,利用计算机软件设计AIF引物及其内参,北京赛百盛公司合成。AIF引物:上游5′-TCTGTAGTGAGGGCTGCCTGCT-3′,下游5′-AGGCCCACAGCTGCCACTATGT-3′,扩增产物331 bp;β-actin引物:上游5′-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3′,下游5′-GAAAGGGTGTAACGCAACTA-3′,扩增产物678 bp。将提取的总RNA以反转录说明书步骤,配置10 μl反义体系:5×PrimeScript™Buffer 2 μl,PrimeScript™RT Enzyme Mix 0.5 μl,Oligo dT Primer 0.5 μl,Random 6 mers 0.5 μl,Total RNA 2 μl,RNase Rree ddH_2O 4.5 μl。反转录反应条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。再将反转录的cDNA扩增,PCR 50 μl反应体系:cDNA 3 μl,10×PCR bufer(含$MgCl_2$)5 μl,dNTP Mixture 4 μl,*Taq*酶0.25 μl,AIF与β-actin上下游引物各1 μl,加ddH_2O至50 μl。反应条件:94 ℃预变性4 min,再30个循环:94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s(AIF)/55 ℃(β-actin),72 ℃ 30 s,72 ℃充分延伸10 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳后,扫描凝胶电泳图片。以BandScan分析软件进行分析PCR产物量。根据β-actin的光密度扫描结果设定标化值,各基因条带的标化光密度值=待测基因条带光密度值/β-actin基因条带光密度值。实验重复3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析及独立样本*t*检验。

2 结果

2.1 hTR ASODN转染的荧光摄像

分别于转染24、48、72 h后,在倒置显微镜下观察各组细胞,细胞内有绿色荧光均匀分布表示转染良好。见图1。

2.2 流式细胞仪测定凋亡率

转染24、48、72 h后,各组的凋亡率分别为:空白组(3.07±0.11)%、(3.71±0.63)%、(4.23±0.41)%,正义组(4.28±0.41)%、(4.49±0.56)%、(5.13±0.56)%,反义组(13.11±0.32)%、(22.04±0.21)%、(16.71±0.82)%。反义组分别与空白组、正义组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);而正义组与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

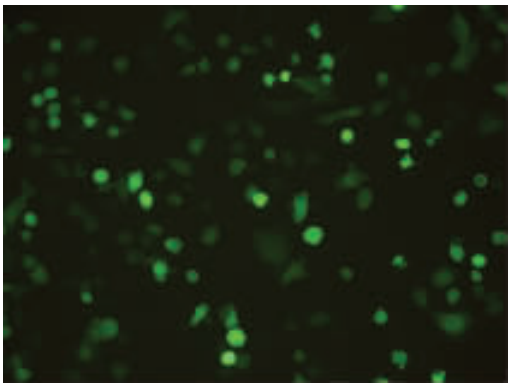
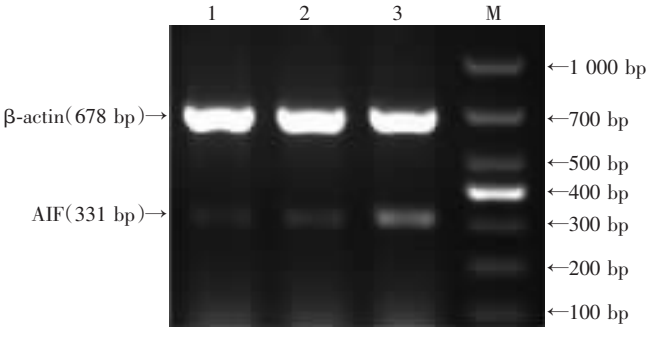


图1 hTR-AsODN 转染 48 h 后荧光观察 （倒置荧光显微镜 ×400）

2.3 RT-PCR 检测结果

转染 48 h 后空白组、正义组、反义组光密度比值分别为（0.152 7 ± 0.002 1）、（0.158 0 ± 0.007 8）、（0.368 3 ± 0.010 9）。反义组分别与空白组、正义组比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；正义组与空白组比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图2。



1：空白组；2：正义组；3：反义组；M：标准

图2 RT-PCR 检测转染 48 h 后 AIF mRNA 的表达

3 讨论

结直肠癌是人类常见的恶性肿瘤之一，如何能更有效的治疗大肠癌成了最近几年的热门课题。肿瘤的发生是多阶段、多步骤的复杂过程。肿瘤细胞获得无限增殖特性而成为永生化细胞，其中端粒酶起了重要作用。

细胞凋亡是在基因参与调控下的机体细胞的主动死亡过程，可发生于生理、病理条件下。细胞凋亡受众多的机体内外的促凋亡因子和抑凋亡因子的调节与控制。诱导肿瘤细胞出现凋亡的时机，数量因细胞种类、分化程度等不同，亦与端粒酶活性受抑制程度有关。因而，ASODN 抑制肿瘤细胞端粒酶活性后的细胞凋亡机制值得深入探讨。hTR ASODN 诱导肿瘤细胞凋亡尚处于实验研究阶段，在决定端粒酶活性方面有些技术问题仍有待于改进。端粒酶活性调控机制在决定端粒酶活性方面具有重要意义。已证实有 3 个活性调控亚基（hTR、TP1 和 TZRT）参与端粒酶的活性调节。已有研究表明，封闭端粒酶 RNA 的 hTR ASODN 可抑制癌细胞的端粒酶活性及细胞的增殖，促进细胞凋亡[1,4]。有相关文献报道了各种基因的 ASODN 转染癌细胞，有一定的浓度和转染时间的依赖性。本实验参考类似实验[1,4-8]，将 hTR ASODN 转染到人结直肠癌 SW480 细胞中（最初结合相关文献报道，在预实验中设定了不同的转染浓度 0.5、1.0、2.5、5、10 μmol/L，同时转染相同天数，选择转染的最佳浓度进行后续实验），以预实验中最佳转染浓度 2.5 μmol/L 转染不同天数（24、48、72 h），利用荧光显微镜观察以及流式细胞仪测定细胞凋亡率的变化，结果显示，经 hTR ASODN 转染后，荧光显微镜可观察到细胞内带绿色荧光染料，表明成功转染。通过流式细胞仪，测定出了转染不同天数的凋亡率的情况，在转染 48 h 后凋亡率最高。表明 hTR ASODN 具有促进人结直肠癌 SW480 细胞凋亡的作用。其原因可能有以下两点：①抑制基因转录、加工、RNA 的翻译；②诱导 RNA 酶 H 介导的 RNA 降解作用，这可能是反义抑制作用的最主要的机制。

ASODN 容易降解，细胞通透性差，所以本实验采用硫代修饰，增强其稳定性；而利用脂质体转染法，靠静电作用结合寡核苷酸链形成“寡核苷酸链-脂质体”复合物，同时又吸附于带负电的细胞膜表面，增加细胞通透性，增加了转染的效率，从而增加达到靶细胞的有效药物浓度端粒酶活性的表达。

AIF 在 1996 年由 Susin 等发现并命名，是一种相对分子质量为 57×10^3 的系统发育的核黄素蛋白，在各种正常组织和肿瘤细胞中广发表达，分布于细胞富含线粒体的区域，其基因定位于 X 染色体上，在人类定位于 Xq25-26，在大鼠定位于 X 染色体的 A6 区。当收到致命信号后，AIF 由线粒体释放，并迅速从细胞质移位到细胞核里结合 DNA 并引起不依赖天冬半胱氨酸蛋白激酶（caspase）的染色质凝集[9]，导致线粒体外膜通透性（mitochondrial outer membrane permeability，MMP）改变和程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD）[10,11]。有研究表明，Caspase 非依赖性是细胞凋亡的关键，AIF 就是这种新的重要的 Caspase 非依赖的死亡效应器[12-14]。AIF 在肿瘤细胞中呈现高表达，其可能的解释是：AIF 对细胞凋亡起促进作用，因此对肿瘤细胞产生选择性机制，即令具有抵 AIF 凋亡作用的肿瘤细胞得以存活；另一个可能性就是 AIF 在细胞中发挥消除自由基或清除过氧化的毒性，从而使细胞得以继续存活。本研究结果显示，经 hTR ASODN 转染 48 h 后，通过 RT-PCR 的检测，反义组 AIF 的表达较正义组和空白组比较有明显增强，表明通过 hTR ASODN 转染入细胞，可以促进 AIF 的释放，使 AIF 参与了协同 hTR ASODN 对癌细胞的作用，引起肿瘤细胞凋亡的诱导过程。

目前对反义核酸技术的研究已取得了一定的成

果,反义核酸技术是癌症治疗的生物学工具,其还可以通过促进线粒体中 AIF 的释放,诱导细胞凋亡,抑制异常表达的靶基因,有效抑制癌细胞的增殖。随着分子生物学及基因工程的发展,基因治疗已成为当代医学、生物学的研究重点和提高结直肠癌患者预后生存质量有前景的途径。

参考文献:

[1] Harley C B. Telomerase and cancer therapeutics[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(3):167 - 179.
[2] Han M, Chen J L, Hu Y, *et al*. *In Vitro* and *in vivo* tumor suppressive activity induced by human telomerase transcriptase-targeting antisense oligonucleotides mediated by cationic liposomes[J]. J Biosci Bioeng, 2008, 106(3):243 - 247.
[3] Fu X H, Zhang J S, Zhang N, *et al*. Combination of telomerase antisense oligonucleotides simultaneously targeting hTR and hTERT produces synergism of inhibition of telomerase activity and growth in human colon cancer cell line[J]. World J Gastroenterol, 2005,11(6):785 - 790.
[4] Millan A, Huerta S. Apoptosis-inducing factor and colon cancer[J]. J Surg Res, 2009,151(1):163 - 170.
[5] 杨波, 王志新. MMP-7 反义寡核苷酸抑制肺腺癌 A549 细胞体外增殖活性的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3):250 - 252.
[6] Bajpai A K, Park J H, Moon I J, *et al*. Rapid blockade of telomerase activity and tumor cell growth by the DPL lipofection of ribbon antisense to hTR[J]. Oncogene, 2005, 24(43):6492 - 6501.
[7] Liu C, Wu X, Luo C, *et al*. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell *via* a mechanism involving caspase 3[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29:63.
[8] Yang X, He H, Yang W, *et al*. Effects of HSP70 antisense oligonucleotide on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010, 30(3):337 - 343.
[9] Scovassi A I, Soldani C, Veneroni P, *et al*. Changes of mitochondria and relocation of the apoptosis-inducing factor during apoptosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171:12 - 17.
[10] Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, *et al*. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space[J]. EMBO J, 2005, 24(7):1375 - 1386.
[11] Hisatomi T, Ishibashi T, Miller J W, *et al*. Pharmacological inhibition of mitochondrial membrane permeabilization for neuroprotection [J]. Exp Neurol, 2009, 218(2):347 - 352.
[12] Zhang Y, Han T, Zhu Q, *et al*. The proapoptotic activity of C-terminal domain of apoptosis-inducing factor (AIF) is separated from its N-terminal[J]. Biol Res, 2009, 42(2):249 - 260.
[13] Yu W, Mechawar N, Krantic S, *et al*. Evidence for the involvement of apoptosis-inducing factor-mediated caspase-independent neuronal death in Alzheimer disease[J]. Am J Pathol, 2010,176(5):2209 - 2218.
[14] Cheung E C, Melanson-Drapeau L, Cregan S P, *et al*. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms[J]. J Neurosci, 2005, 25(6):1324 - 1334.

(收稿 2010-06-03 修回 2010-09-09)
(编辑 王小宴)

(上接 2399 页)

血常规:白细胞 11.5×10^9/L,血小板 7×10^9/L,血红蛋白 64 g/L。生化:谷丙转氨酶 89.2 U/L,肾功、血糖、免疫球蛋白正常。补体 C3 0.7 g/L,补体 C4 0.08 g/L。荧光抗核抗体(+),滴度 1:320,核型为颗粒型,抗双链 DNA(+),ENA 抗体谱提示抗 Sm(+),nRNP(+)。血沉 102 mm/h。尿常规正常。心电图正常。心脏彩超提示少量心包积液,少量胸腔积液。最后诊断:系统性红斑狼疮。给予利妥昔单抗注射液 600 mg,1 次/周,静滴,连续 4 周,甲泼尼龙片 60 mg 口服,每周减 4 mg,4 周后患者血小板升至 54×10^9/L 后出院。目前患者在我科门诊定期随访治疗。

2 讨论

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematous,SLE)是一种以自身抗体产生为特点的多器官和多系统损伤的慢性全身性的自身免疫性疾病,好发于年轻女性,全球发病率为 12 ~ 39/10 万,我国为 30.13/10 万 ~ 70.41/10 万[2]。SLE 具有很强的家系聚集性,同胞患病率是一般人群的 20 倍,同卵双生子发病一致率为 24% ~58%,异卵双生子的发病一致率为 2% ~5%[3,4],但临床上母女同患 SLE 病例尚不多见[5,6]。本病例报告中的母亲发现血小板减少近 2 年后发展为 SLE,提示血小板减少可能是 SLE 的早期表现,因此当临床发现家族中有 SLE 患者时,要高度警惕家族中其他人员患此病,一旦出现相关临床表现,应及时进行相关的免疫学全面检查,以免误诊、误治。

机体的遗传因素在 SLE 的病因、发病机制中有重要作用。目前已知多种与 SLE 易感性有关的遗传基因包括雌激素受体基因、人类白细胞抗原基因、肿瘤坏死因子、中性粒细胞集落刺激因子基因、Fcr 受体、C 反应蛋白等[7]。随着分子生物学研究水平的不断提高,必然有更多的遗传物质被发现,将来为指导优生,减少发病率发挥重要作用。

参考文献:

[1] 赵继军, 陆才生. 人系统性红斑狼疮遗传易感性研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(10):617 - 620.
[2] 郑文军, 梁伶. 人类白细胞抗原基因与系统性红斑狼疮关联性的研究进展[J]. 临床荟萃, 2004, 19(2):109 - 111.
[3] 姜综敏, 郜艳晖, 孟炜, 等. 系统性红斑狼疮的家庭聚集性研究[J]. 复旦学报:医学版, 2005, 32(3):270 - 274.
[4] Jonsen A, Bengtsson A A, Nived O, *et al*. Gene-environment interactions in the aetiology of systemic lupus erythematosus[J]. Autoimmunity, 2007, 40(8):613 - 617.
[5] 孔珍珍, 杨琳, 张正森, 等. 母女同患结缔组织病治疗体会[J]. 河南中医, 28(1):72 - 73.
[6] 邓艳平. 母女同患系统性红斑狼疮 1 例报告[J]. 航空航天医药, 2001, 12(3):166.
[7] 云宇光, 刘庆平, 陈阿梅. 系统性红斑狼疮的分子遗传学研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(4):120 - 122.

(收稿 2010-06-09 修回 2010-08-01)
(编辑 吴培红)