论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1350-03

针对 survivin 的反义寡核苷酸对人胃癌细胞株 BGC-823 生长、侵袭、迁移能力的影响

李 勇[1],范立侨[1],赵 群[1],孙 艳[2],焦志凯[1],张志栋[1],檀碧波[1] (050011 石家庄,河北医科大学第四医院外三科[1];050051 石家庄,河北医科大学第三医院妇产科[2])

【摘要】 **目的** 观察生存素(survivin)反义寡核苷酸(anti-survivin oligonucleotides, ASODN)对人胃癌细胞株 BGC-823 增殖、凋亡、侵袭、迁移能力的影响。**方法** 脂质体介导 ASODN 或对照 SODN 转染人胃癌细胞株 BGC-823 后,RT-PCR 方法检测 survivin 的 mRNA 表达水平,四氮唑盐(MTT)法检测 ASODN 或 SODN 对肿瘤细胞的增殖抑制效果,Transwell 小室法检测细胞侵袭和迁移能力的改变,流式细胞术检测细胞周期及凋亡指数的改变。**结果** ASODN 转染可明显降低 survivin 的表达($P<0.05$),并且 ASODN 转染具有以浓度及时间依赖的方式抑制 BGC-823 细胞增殖的作用($P<0.05$)。用 600 nmol/L 浓度的 ASODN 转染 BGC-823 后,BGC-823 细胞迁移和侵袭能力下降($P<0.05$),细胞凋亡指数(apoptotic index,AI)由(1.62±0.36)增加到(11.31±0.38)($P<0.01$),而增殖指数(proliferation index,PI)则由(43.80±0.81)下降至(27.77±2.97)($P<0.05$)。停滞于 G_2/M 期的细胞明显增加($P<0.01$)。**结论** 下调 survivin 表达的 ASODN 可通过抑制胃癌细胞增殖、诱导凋亡、降低胃癌细胞侵袭和迁移能力而发挥抗肿瘤作用。

【关键词】 胃癌;生存素;反义寡核苷酸;生物学行为
【中图法分类号】 R394.3;R73-362;R735.2 【文献标志码】 A

Anti-survivin oligonucleotides suppresses growth, invasion and migration in human gastric cancer BGC-823 cells

Li Yong[1], Fan Liqiao[1], Zhao Qun[1], Sun Yan[2], Jiao Zhikai[1], Zhang Zhidong[1], Tan Bibo[1] ([1]Third Department of General Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050011; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Third Hospital of Shijiazhuang, Hebei Medical University, Hebei Province, 050051, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effects of anti-survivin oligonucleotides (ASODN) on the proliferation, apoptosis, invasion and migration in gastric cancer BGC-823 cells. **Methods** After ASODN or SODN was introduced by Lipofectamine™ 2000 transfection reagent into BGC-823 cells, the mRNA expression of survivin, was detected by RT-PCR, cell proliferation was measured by 4-methyl-tetrazolium (MTT) assay, cell invasion and migration were assayed by Transwell chamber tests, and cell cycle and apoptosis index (AI) was detected by flow cytometry. **Results** ASODN transfection resulted in a marked decrease of survivin expression ($P<0.05$). And the cell proliferation was inhibited by ASODN transfection in a dose- and time-dependent manner (both $P<0.05$). Both cell invasion and migration activities of BGC-823 were decreased ($P<0.05$) after the transfection of 600 nmol/L ASODN. AI of ASODN transfection group was increased significantly when compared with that of control group (11.31±0.38 *vs* 1.62±0.36, $P<0.01$), and proliferation Index (PI) was decreased significantly in ASODN transfection group than in control group (27.77±2.97 *vs* 43.80±0.81, $P<0.05$). Cells in G_2/M stage were increased in ASODN transfection group compared with control group ($P<0.01$). **Conclusion** Down-regulation of survivin by ASODN inhibits the invasion and migration of BGC-823 cells through suppressing cell proliferation and improving cell apoptosis.

【**Key words**】 gastric cancer; survivin; antisense oligonucleotide; biological behavior

Supported by the Foundation for Extra Characteristic Disciplines in High Colleges and Universities of Hebei Province ([2005]52), and the Project of Department of Technology and Sciences of Hebei Province (08276101D-38). Corresponding author: Li Yong, Tel: 86-311-86095678, E-mail: li_yong_hbth@126.com

胃癌细胞的恶性生物学行为能力导致肿瘤进展。如能实现对胃癌细胞恶性生物学行为的抑制,则有可能在胃癌治疗中实现突破。存活素(*survivin*)作为近年研究的热点基因,与胃癌的增殖、凋亡等多种生物学行为密切相关[1-2],该基因具有促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡的功能。反义寡核苷酸技术为近年兴起的肿瘤靶向生物治疗技术之一,在多种肿瘤的研究中都取得了良好的效果。故本研究设计了 Survivin 反义寡核苷酸(antisurvivin oligonucleotides, ASODN)转

【基金项目】 河北省普通高校强势特色学科项目{冀教高[2005]52};河北省科技厅基金(08276101D-38)
【通信作者】 李 勇,电话:(0311)86095678,E-mail:li_yong_hbth@126.com

染人低分化胃癌细胞株 BGC-823，对转染前后肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移情况进行了检测，试图为抑制胃癌细胞恶性生物学行为提供新的思路及实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胃癌细胞株 BGC-823 取自河北医科大学第四医院科研中心，RPMI1640 培养液常规培养。取对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后调节细胞浓度备用。

1.2 主要试剂及仪器

MTT 为美国 Sigma 公司产品，RPMI1640 培养液、胰蛋白酶来自 Gibco 公司，ASODN、SODN 由上海生物工程公司合成，Matrigel 为美国 BD 公司产品。显微共聚焦显微镜（SLM510 型）为德国 Carl Zeiss 公司产品，流式细胞仪（Epics-XL 型）为美国 Beckman Coulter 公司生产，Transwell 小室为美国 Corning 公司生产，Trizol 及 RT-PCR 试剂盒为美国 Invitrogen 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 ASODN 及其脂质体转染复合物制备 根据 Robert[3] 报道，由上海生工合成 ASOND 5′-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3′（部分 ASODN 于 5′端添加 FAM 荧光标记），同时设计正义链 SODN 序列 5′-CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3′，经网上检索证实与人类其他已知基因无同源性。按转染试剂盒提示的方法稀释、孵育、制备为不同的浓度的 ASODN 和 Lipofectamine™ 2000 复合物（美国 Invitrogen 公司）。通过 MTT 法确定 ASODN（μg）∶Lipofectamine™2000（μl）最适比例为 1∶2，流式细胞术（flow cytometry，FCM）和共聚焦显微镜（德国 SLM510）检测 ASODN 的转染率。

1.3.2 四氮唑蓝比色法（MTT 法） 按 10^4/孔接种 BGC-823 细胞于 96 孔板，生长至约 80% 融合后，分别以 100、200、400、600、800 nmol/L 浓度的 ASODN 或 600 nmol/L 的 SODN 以及 Lipofectamine™2000 对照转染 6 h，继续培养 24、48、72 h 后，每孔加入 MTT 20 μl，培养 4 h，倒去培养液，加入二甲基亚砜（DMSO）150 μl，酶标仪波长 490 nm 处检测光密度值 D(490)。计算各组的细胞存活率 = $D(490)_{实验组}/D(490)_{对照组}\times 100\%$。

1.3.3 细胞迁移和侵袭能力检测（Transwell 小室法）

1.3.3.1 迁移实验 BGC-823 细胞经 ASODN 或 SODN、空脂质体转染 24 h 后消化细胞，调整细胞浓度至 7.5×10^5/ml，取 0.2 ml 细胞悬液接种于 Transwell 小室的上层，下室加入含 2.5% 胎牛血清的培基 0.4 ml，上室加入 1% 的全牛血清白蛋白（BSA）10 μl 调节渗透压平衡，继续培养 24 h 后，取出小室隔膜，用棉签擦掉上层贴附的细胞，显微镜下计数迁移至膜下层的细胞数，每小室随机记录 4 个视野的迁移细胞数并计算均值，实验重复 3 次。

1.3.3.2 侵袭实验 取 100 μl 稀释好的 Matrigel 铺在 Transwell 小室上室，无菌台内自然风干（约 2 h），吸净未干的 Matrigel。加入不同转染的细胞悬液，继续培养 24 h 后，取出小室隔膜，计数侵袭并迁移至小室下层细胞数，方法同 1.3.3.1。

1.3.4 流式细胞术（FCM）检测细胞周期和凋亡 BGC-823 细胞经 ASODN 或 SODN、空脂质体转染 48 h 后消化细胞，PBS 液洗涤后，取细胞悬液 100 μl，预冷的 70% 酒精固定。加入 PI 1 ml，同时取样本加入 10% 鸡红细胞作为内参，置于 4 ℃冰箱，30 min 后铜网过滤，流式细胞仪检测 DNA 细胞周期和凋亡。实验重复 3 次。计算各组细胞的凋亡指数（Apoptotic Index，AI）和增殖指数（Proliferation Index，PI）。

1.3.5 RT-PCR 检测 survivn 的表达 BGC-823 细胞分别以 ASODN 或 SODN 转染 48 h，加入 1 ml Trizol，一步法提取总 RNA，经纯度及完整性鉴定后取 2 μg 总 RNA 进行反转录，采用下述引物进行 PCR 扩增：Survivn 上游引物 5′-ACCACCG-CATCTCTACATTCA-3′，下游引物 5′-TTCTTGGCTCTTTCTCT-GTCC-3′，片段长度 286 bp；内参照 β-actin 上游引物 5′-CTTC-TACAATGAGCTGCGTG-3′，下游引物 5′-TCATGAGGTAGT-CAGTCAGG-3′，片段长度 305 bp。PCR 参数为预变性 96 ℃ 4 min，然后 94 ℃ 30 s、59 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s 进行 30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。各引物均由上海生工合成。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

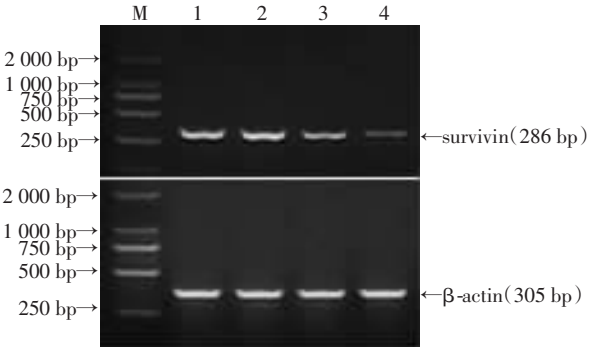
1.4 统计学方法

应用 SAS 6.12 统计软件分析实验数据，计量资料采用 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 ASODN 细胞转染后抑制 survivin 表达的效果

RT-PCR 结果表明，ASODN 可明显抑制 survivin 的表达，而未转染对照组、脂质体转染对照组、转染 SODN 组无明显影响。见图 1。



1∶未转染对照组；2∶脂质体转染对照组；3∶转染 SODN 组；4∶转染 ASODN 组；M∶DNA 标准

图 1 RT-PCR 检测 ASODN 转染 BGC-823 细胞抑制 Survivin 的效果

2.2 MTT 法检测 ASODN 对 BGC-823 的抑制作用

ASODN 对 BGC-823 细胞生长有明显抑制作用（$P<0.01$），并具有明显的时间和浓度的依赖效应，而 SODN 和脂质体对照组对细胞生长无明显影响（$P>0.05$），见表 1。

表 1 ASODN 对 BGC-823 细胞生长的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
Lipo 对照组	1.11±0.12	1.08±0.12	0.89±0.11	0.95±0.11
SODN 对照组	0.94±0.12	0.96±0.14	1.04±0.17	0.95±0.14
AS-100 nmol/L	0.88±0.11[a]	0.79±0.10[ab]	0.68±0.10[ab]	0.65±0.12[ab]
AS-200 nmol/L	0.82±0.13[a]	0.77±0.14[ab]	0.61±0.10[ab]	0.52±0.09[ab]
AS-400 nmol/L	0.81±0.13[a]	0.65±0.10[ab]	0.45±0.06[ab]	0.39±0.04[ab]
AS-600 nmol/L	0.79±0.13[a]	0.45±0.08[ab]	0.33±0.04[ab]	0.28±0.04[ab]
AS-800 nmol/L	0.75±0.15[ab]	0.43±0.08[ab]	0.22±0.03[ab]	0.20±0.03[ab]

a∶$P<0.01$，与 Lipo 对照组比较；b∶$P<0.05$，与 SODN 对照组比较

2.3 Transwell 小室法检测 ASODN 对 BGC-823 细胞迁移和侵袭能力的影响

细胞计数结果显示,600 nmol/L ASODN 转染 48 h 后,BGC-823 的迁移活性与侵袭活性明显下降($P<0.05$,$P<0.01$),见表 2。

表 2 ASODN 对 BGC-823 细胞迁移和侵袭活性的影响($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	迁移活性		侵袭活性	
	迁移率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭率(%)	侵袭细胞数(个)
ASODN 组	54.53±2.13[a]	74.33±2.08[b]	19.20±0.66[b]	59.33±5.69[b]
Lipo 对照组	67.97±2.21	140.67±1.53	27.30±0.57	97.33±4.04

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Lipo 对照组比较

2.4 FCM 法检测 ASODN 对 BGC-823 细胞周期和 AI、PI 的影响

经 ASODN 转染 48h 的 BGC-823 细胞的细胞周期发生明显改变,G_0/G_1 期细胞比例明显升高,AI 升高,PI 降低($P<0.05$)。见表 3。

表 3 ASODN 对 BGC-823 细胞周期和 AI、PI 的影响[$n=6$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	细胞周期			AI	PI
	G_0/G_1	S	G_2/M		
ASODN 组	72.25±2.95[a]	26.12±2.81	1.75±0.17[b]	11.31±0.38[b]	27.77±2.97[a]
Lipo 对照组	56.25±0.75	30.35±0.75	13.42±0.05	1.62±0.36	43.80±0.81

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Lipo 对照组比较

3 讨论

迄今对胃癌进行的综合治疗效果不理想,故寻找新的治疗方法意义重大。反义寡核苷酸技术为当前受到广泛关注的分子靶向技术之一,已在肿瘤生物治疗研究中取得了一定成果[4-7]。该技术的基础是利用合成的、短的、单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸序列地抑制某个基因的表达,其设计旨在通过碱基互补配对的原则,选择性地与靶基因 mRNA 中的互补序列结合,从而干扰或阻止其基因产物的形成。因此,本研究以该技术为实验手段对 *survivin* 基因进行了干预。

survivin 是 1997 年发现的凋亡抑制蛋白(IAPs)家族中分子量最小的蛋白质,具有调节细胞分裂和抑制细胞凋亡等多种功能,是目前胃癌研究的热点因子[8-9]。鉴于 survivin 可影响肿瘤细胞的多种生物学行为,故本研究设计了以 survivin 为靶分子的反义寡核苷酸并对胃癌细胞株进行了转染。结果显示,ASODN 成功转染进入了胃癌细胞,并对胃癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移均产生了明显抑制作用。

抑制肿瘤细胞增殖已成为肿瘤治疗的重要手段之一。本结果显示,ASODN 对胃癌细胞生长起到明显抑制作用,降低了肿瘤细胞增殖指数,并使大部分肿瘤细胞滞留于 G_0/G_1 期,S 期细胞明显减少,有效控制了肿瘤细胞的增殖。在恶性肿瘤发生进展过程中,凋亡异常的作用逐渐被认识,肿瘤细胞均有不同程度的凋亡抵抗能力以逃避凋亡调控,因此诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的重要策略。survivin 是迄今所知的凋亡抑制功能最强的蛋白质之一,本研究应用的 ASODN 对 *survivin* 基因有直接抑制作用,结果显示 ASODN 对胃癌细胞的凋亡产生了明显影响,实验组凋亡率和凋亡指数均明显高于对照组,证实 ASODN 对促进肿瘤细胞凋亡有积极作用。

本结果还发现 ASODN 对胃癌细胞的侵袭迁移能力有明显抑制作用。肿瘤的侵袭迁移是一个多步骤、多因素参与的复杂的病理过程。有报道显示 survivn 与肿瘤的侵袭转移关系密切[10-11],本研究通过 Transwell 小室实验证实 ASODN 对胃癌细胞的侵袭迁移能力有抑制效果,提示应用 ASODN 有可能通过抑制肿瘤细胞侵袭迁移而实现胃癌分子生物治疗。

参考文献:

[1] Kinoshita J, Fushida S, Harada S, *et al*. Local angiotensin Ⅱ-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF-kappaB and survivin[J]. Int J Oncol, 2009, 34(6): 1573-1582.

[2] Miao G Y, Lu Q M, Zhang X L. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8): 1170-1174.

[3] Olie RA, Sim es-W st AP, 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.

[4] Ju W, Yoo B C, Kim I J, *et al*. Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays[J]. Oncol Res, 2009, 18(2/3): 47-56.

[5] Furukawa J, Wraight C J, Freier S M, *et al*. Antisense oligonucleotide targeting of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in prostate cancer[J]. Prostate, 2010, 70(2): 206-218.

[6] 陈余清, 李伟, 周继红, 等. *survivin* 抗肺癌细胞凋亡的分子机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6): 413-417.

[7] 李瑞, 黄宗海, 姚航, 等. *survivin* 基因反义寡核苷酸与大肠癌血管形成的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(13): 1272-1274.

[8] Lu J, Tan M, Huang W C, *et al*. Mitotic deregulation by survivin in ErbB2-overexpressing breast cancer cells contributes to Taxol resistance[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1326-1334.

[9] Mita A C, Mita M M, Nawrocki S T, *et al*. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5000-5005.

[10] Lee G H, Joo Y E, Koh Y S, *et al*. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(9): 957-963.

[11] Hino R, Uozaki H, Inoue Y, *et al*. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A[J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1427-1435.

(收稿 2010-12-25 修回 2011-02-14)

(编辑 张 维)