论著

文章编号:1000-5404(2011)14-1488-04

cFLIP 反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞 SW620 的增殖

文又武,朱代华,杨 函,梁光熙 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院普通外科)

[摘要] **目的** 研究 cFLIP 反义寡核苷酸(cFLIP-asODN)对人结肠癌细胞株 SW620 细胞增殖的影响。**方法** 利用脂质体将 cFLIP-asODN 转染入 SW620 细胞,并设空载体 + cFLIP-asODN 转染组、脂质体 + 无意义 ODN 转染组和空白对照组作为对照。荧光倒置显微镜检测复合物对细胞的转染效率;荧光实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测转染后细胞中 cFLIP mRNA 和蛋白的表达水平的变化;MTT 法分析复合物对 SW620 细胞增殖的影响;流式细胞术分析转染后细胞凋亡情况。**结果** 与空载体 + cFLIP-asODN 转染组、脂质体 + 无意义 ODN 转染组和空白对照组相比,脂质体递送 cFLIP-asODN 进入细胞后,SW620 细胞的增殖受到明显抑制($P<0.05$);转染 cFLIP-asODN 后,SW620 细胞中的 cFLIP mRNA 和蛋白的表达水平降低($P<0.05$);且细胞凋亡率(29.5 ± 2.4)% 也明显高于空载体 + cFLIP-asODN 转染组(5.8 ± 0.7)%、脂质体 + 无意义 ODN 转染组(5.5 ± 0.8)% 和空白对照组(5.2 ± 0.5)%($P<0.05$)。**结论** 通过在体外转染 cFLIP-asODN 可有效抑制结肠癌细胞株 SW620 的增殖。

[关键词] cFLIP;反义寡核苷酸;转染;结肠癌;凋亡
[中图法分类号] R735.35;R73-362;R730.23 [文献标志码] A

cFLIP antisense oligonucleotide inhibits proliferation in human colon carcinoma cell line SW620

Wen Youwu, Zhu Daihua, Yang Han, Liang Guangxi (Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the inhibitory effect of cFLIP antisense oligonucleotide (cFLIP-asODN) on the proliferation of human colon carcinoma cell line SW620. Methods Human colon carcinoma cell line SW620 was transfected with cFLIP-asODN by liposome Lipofectamine™2000. Besides, a cFLIP-asODN group, a liposome + nonsense ODN (NSODN) group and a blank control group were constructed as the control groups. Inverted fluorescence microscope was used to detect the transfection efficiency of the complexes. Real-time quantitative RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression level changes of cFLIP mRNA and protein in SW620 cell after transfection. MTT assay was used to analyze the effects of the complexes on the proliferation of SW620 cell. Flow cytometry was used to determine the apoptosis of SW620 cell after transfection. Results The proliferation of SW620 cell transfected with cFLIP-asODN delivered by liposome Lipofectamine™2000 was significantly inhibited ($P<0.05$), as compared with the three control groups. The cFLIP mRNA and protein expression levels of transfected SW620 cell were significantly lower than those of non-transfected SW620 cell. The apoptosis of SW620 cell in the liposome + cFLIP-asODN group was significantly higher than those in the three control groups [(29.5 ± 2.4)% *vs* (5.8 ± 0.7)%, (5.5 ± 0.8)% and (5.2 ± 0.5)%; $P<0.05$]. Conclusion *In vitro* liposome-mediated transfection with cFLIP-asODN can significantly inhibit the proliferation of human colon carcinoma cell line SW620.

[**Key words**] cFLIP;antisense oligonucleotide;transfection;colon carcinoma;apoptosis

Supported by the Project Chongqing Municipal Health Bureau (07-2-097). Corresponding author: Zhu Daihua, Tel:86-23-63693509, E-mail:geoffroy324@yahoo.com.cn

肿瘤是一种多基因协同作用的基因病。利用基因治疗恶性肿瘤已经成为肿瘤治疗领域新近发展起来的一项治疗手段,也是目前肿瘤研究的热点之一。细胞型 Fas 相关死亡区域蛋白样 β 白介素-1 转换酶抑制蛋

[基金项目] 重庆市卫生局科研项目(07-2-097)
[通信作者] 朱代华,电话:(023)63693509,E-mail:geoffroy324@Yahoo.com.cn

白(Fas associated death domain-like IL-lbeta-converting enzyme inhibitory protein,cFLIP)首先发现于黑色素瘤细胞中,它的过量表达能抑制Fas系统介导的凋亡,从而使肿瘤细胞过量生长[1-2]。cFLIP作用于肿瘤细胞凋亡调控的重要环节,与肿瘤的发生、发展关系密切,因而对cFLIP过量表达的肿瘤细胞,可通过抑制cFLIP的表达达到治疗目的。目前已在人黑色素瘤、Kaposi肉瘤、Burtitt淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、大肠癌等多种肿瘤中发现cFLIP蛋白的表达增高[3]。本研究用cFLIP-反义寡核苷酸(cFLIP-asODN)在体外转染人结肠癌细胞,观察其转染后对细胞的增殖抑制效应,从而为使用cFLIP-asODN对结肠癌进行基因靶向治疗的可能性提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、主要试剂和仪器

人结肠癌细胞株SW620购自中科院上海细胞所,转染试剂Lipofectamine™2000、PAMAMA-D(G5)及opti-MEMI培养基均购自Sigma公司,L15培养基购自美国Gibco公司,Trizol总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green荧光染料购自Takara公司,鼠抗人c-FLIP单克隆抗体购自美国Abcam公司,DMSO溶液、MTT溶液购自Sigma公司,实时定量PCR仪为Bio-Rad公司产品,流式细胞仪为BD公司产品,荧光倒置显微镜为Leica公司产品。实验所需核酸均委托北京赛百盛公司合成和修饰。

1.2 cFLIP反义寡核苷酸及引物的合成

参照文献[4],以cFLIP基因翻译起始区为靶点,人工合成cFLIP-asODN及无意义ODN对照序列,并且行3′-FITC荧光素标记、全硫代修饰、纯化、冻干粉保存备用。cFLIP-asODN序列:5′-GACTTCAGCAGACATCCTAC-3′,无意义ODN对照序列:5′-TGGATCCGACATGTCAGA-3′。使用前加去离子水溶解,于4 ℃保存,根据所需浓度稀释后使用。参照文献[5],人工合成cFLIP及内参基因GAPDH引物。cFLIP基因上游:5′-AATTCAAGGCTCAGAAGCGA-3′,cFLIP基因下游:5′-GGCAGAAACTCTGCTGTTCC-3′,扩增产物长度1 470 bp;GAPDH基因上游:5′-TGCCGTCTAGAAAAACCTGC-3′,GAPDH基因下游:5′-ACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3′,扩增产物长度850 bp。

1.3 载体-反义基因复合物的制备

转染前取4.0 μg cFLIP-asODN置于EP管中,加入opti-MEMI培养基500 μl,混匀后置室温下孵育10 min。按照脂质体使用说明书推荐最佳转染质量比例,取10 μl脂质体置于EP管中,加入opti-MEMI培养基250 μl,稀释混匀并放置5 min,然后将两者充分混匀,室温孵育30 min。脂质体+无意义ODN复合物的制备方法相同。

1.4 细胞培养及基因转染

按照ATCC指南,SW620细胞用含有10%胎牛血清的L15培养基,37 ℃,无CO_2的条件下培养,细胞呈贴壁生长。细胞生长至约80%融合时,常规胰酶消化并制成单细胞悬液,计数活细胞数。在转染前1 d按每孔5×10^4个细胞接种6孔板,继续常规培养。

基因转染分3组:脂质体-cFLIP-asODN转染组(10 μl脂质体+4 μg cFLIP-asODN)、空载体+cFLIP-asODN转染组(空载体+4 μg cFLIP-asODN)、脂质体+无意义ODN转染组(10 μl脂质体+4 μg无意义ODN);此外,另设空白对照组。各组平行设置3孔,重复3次。将生长至约80%融合状态的细胞用PBS溶液洗涤2次,分别加入已制备好的转染复合物和含10%小牛血清的L15培养基(终体积2 ml),常规孵育6 h,小心吸弃上层转染复合物及培养液,PBS洗涤细胞2次,再加入2 ml含10%小牛血清的L15培养基继续培养。每隔24 h使用荧光倒置显微镜对细胞进行观察和计数。

1.5 荧光倒置显微镜观察载体-反义基因复合物对SW620细胞的转染效果

在荧光倒置显微镜下,先选择可见光观察细胞并固定视野,要求视野中细胞数>100个,作全视野细胞计数,然后转换成荧光并计数发出绿色荧光的细胞,计算其所占百分比(转染效率),各培养孔选取5个视野计数,结果以$\bar{x}\pm s$表示。

1.6 流式细胞仪检测载体-反义基因复合物对SW620细胞的转染率

已转染的各组细胞在继续培养48 h后,经胰酶消化收集,用预冷PBS溶液洗涤2次,之后重悬细胞并调解细胞浓度到1×10^7/ml;取100 μl调节好浓度的细胞悬液到5 ml流式管;向流式管中加入400 μl 1×的结合缓冲液,充分重悬后上流式细胞仪进行分析。计数有荧光染色细胞的数量,计算其占总检测细胞数的比率(转染率),每份标本分析20 000个细胞并重复3次计数,并求其$\bar{x}\pm s$。

1.7 荧光实时定量RT-PCR检测目的基因的表达

1.7.1 总RNA抽提 常规消化收集各组细胞,重悬后计数收集$10^6\sim10^7$个细胞,Trizol抽提总RNA,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。紫外分光光度法(Thermo公司,NaNoDrop 2000)测定RNA浓度及260 nm和280 nm处的光密度值,取$D(260)/D(280)=1.9$左右的RNA进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,18S:28S比值为2:1。剩余RNA为避免RNase的污染与降解,立即行逆转录反应。

1.7.2 逆转录合成cDNA 取2 μg上述RNA进行逆转录反应,反应总体系为20 μl,反应步骤严格按照试剂盒说明书进行,将得到的cDNA置于-20 ℃冰箱中保存备用。

1.7.3 荧光实时定量PCR法测定基因表达 cDNA稀释10倍,取2 μl与SYBR premix *Ex Taq*Ⅱ及引物进行多聚合酶链反应。扩增体系10 μl,95 ℃扩增2 min,95 ℃变性15 s,60 ℃退火15 s,72 ℃延伸40 s,循环40次。选择GAPDH作为内参来标准化mRNA的表达,产物的特异性通过溶解曲线进行评估,实时定量PCR的结果用$2^{-\triangle\triangle Ct}$进行计算,比较各组间cFLIP mRNA的相对表达量。

1.8 MTT法检测细胞的增殖情况

按1.4所述分组并增设空白细胞对照组。分别取各组处于对数生长期的SW620细胞,按每孔5 000个细胞接种到96孔板,每孔体积为200 μl,每组设6个平行孔。分别于接种后1、2、3、4、5 d进行MTT检测。每孔加入MTT溶液(5 mg/ml

PBS配制)20 μl;继续孵育4 h后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μl DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫分析仪上选择490 nm波长,测定各孔光密值[D(490)],按公式计算肿瘤细胞抑制率,并以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

肿瘤细胞抑制率=[1-实验孔D(490)]/对照孔D(490)×100%

1.9 流式细胞仪检测肿瘤细胞转染后的凋亡率

取对数生长期细胞,调整细胞浓度至2×10^5/ml,接种于6孔板内,每孔1.5 ml,置于细胞培养箱内24 h,待细胞贴壁;按上述分组对各组细胞进行转染,之后入培养箱常规培养,在48 h和72 h后先于荧光倒置显微镜下观察荧光表达情况,之后常规胰酶消化收集细胞,重悬后计数10^7/ml转入流式管中,按凋亡试剂盒说明书要求加入试剂,送流式细胞仪检测。每组细胞重复检测3管,每管检测细胞20 000个以上并重复3次,最后计算各组凋亡率。

1.10 Western blot检测转染后肿瘤细胞中cFLIP蛋白的表达

分别提取各组细胞内总蛋白,蛋白定量为0.5 μg/μl。每泳道以20 μg作15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜。5%脱脂奶粉封闭后,加入1∶200的鼠抗人cFLIP多克隆抗体,4 ℃过夜,加入兔抗鼠IgG(1∶5 000),TBS洗膜,最后经ECI系统显色。测定条带光密度,数据以各组条带的光密度/对照组条带光密度表示。

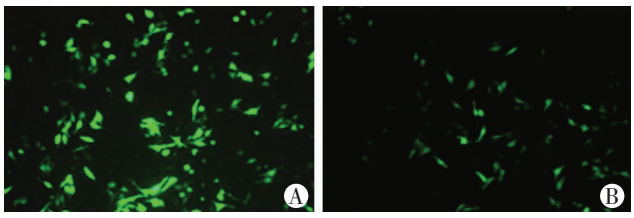
1.11 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件,计量资料的数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组均数比较行t检验,多组均数的显著性检验行方差分析,计数资料行χ^2检验。

2 结果

2.1 载体-反义基因复合物转染肿瘤细胞的效果

经3′-FITC荧光素标记的cFLIP-asODN转染SW620细胞后,在荧光倒置显微镜下,被转染细胞呈现绿色荧光,未转染的细胞不显色,而两者在细胞形态上无差异。脂质体+cFLIP-asODN组的转染率(30.5±0.6)%明显高于空载体+cFLIP-asODN组(5.2±0.3)%($P<0.05$)。见图1。



A:脂质体+cFLIP-asODN转染组;B:空载体+cFLIP-asODN转染组

图1 3′-FITC标记的cFLIP-asODN转染SW620细胞

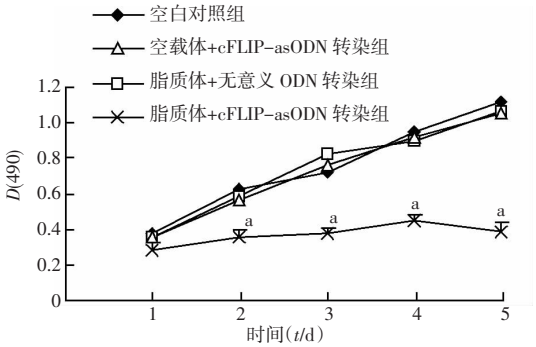
(荧光倒置显微镜 ×200)

2.2 cFLIP-asODN对SW620细胞cFLIP mRNA表达的影响

荧光定量PCR结果显示,空白对照组的SW620细胞Ct值为(25.3±1.4),脂质体+cFLIP-asODN转染组、脂质体+无意义ODN转染组、空载体+cFLIP-asODN转染组的Ct值分别为(26.1±1.2)、(25.42±1.9)、(25.45±2.1)。以空白对照组为对照,根据$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算mRNA相对表达量。脂质体+cFLIP-asODN转染组细胞中的cFLIP mRNA的表达量明显降低(0.512±0.06),且同时低于其他各处理组($P<0.05$)。脂质体+无意义ODN转染组(0.921±0.03)、空载体+cFLIP-asODN转染组(0.901±0.03)与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 cFLIP-asODN对SW620细胞增殖的影响

MTT法检测结果显示,SW620细胞经阳离子脂质体转染cFLIP-asODN后,细胞生长速度明显降低且倍增时间延长,与脂质体+无意义ODN转染组、空载体+cFLIP-asODN转染组和空白对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),而后三者之间差异不明显($P>0.05$,图2)。

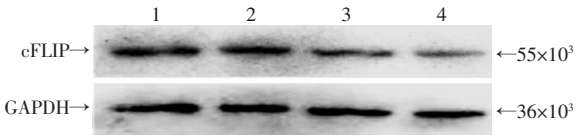


a:$P<0.05$,与脂质体+无意义ODN转染组、空载体+cFLIP-asODN转染组和空白对照组比较

图2 cFLIP-asODN转染SW620细胞后对细胞生长的影响

2.4 cFLIP-asODN对SW620细胞cFLIP蛋白表达的影响

脂质体+cFLIP-asODN转染组的蛋白表达量较空载体+cFLIP-asODN转染组、脂质体+无意义ODN转染组和空白对照组明显降低($P<0.05$)。而脂质体+无意义ODN转染组、空载体+cFLIP-asODN转染组和空白对照组之间差异不明显($P>0.05$)。见图3。



1:空白对照组;2:脂质体+无意义ODN转染组;3:空载体+cFLIP-asODN转染组;4:脂质体+cFLIP-asODN转染组

图3 cFLIP-asODN对SW620细胞cFLIP蛋白表达的影响

2.5 cFLIP-asODN对SW620细胞凋亡率的影响

流式细胞仪结果显示,转染72 h后,脂质体+无意义ODN转染组、空载体+cFLIP-asODN转染组和空白对照组的细胞凋亡率分别为(5.8±0.7)%、(5.5±0.8)%、(5.2±0.5)%,明显低于脂质体+cFLIP-asODN转染组的细胞凋亡率(29.5±2.4)%($P<0.05$)。

3 讨论

asODN因其作用的高靶向性和特异性,以及抑制

目的基因和蛋白表达的高效性,越来越受到人们的关注。Irmler 等[1]于 1997 年首次发现并克隆了凋亡信号传导抑制蛋白 cFLIP,其基因位于人染色体 2q33,可以表达多种 mRNA,但其蛋白产物只有 2 种,即 cFLIPS(cellular FLIP short)和 cFLIPL(cellular FLIP long),相对分子质量分别为 28×10^3 和 55×10^3,其中抑制凋亡的作用主要来自 cFLIPL[6]。cFLIP 蛋白具有 2 个死亡功能效应区(DED),通过它可以与 FADD 或 caspase8 上的 DED 和受体之间发生竞争性结合,因其不具备 caspase8 的活性,故 cFLIP 的过量表达能够抑制和阻断死亡信号复合体(DISC)的形成,最终抑制 Fas 途径介导的细胞凋亡[3]。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的受体 DR-4 和 Fas 受体在近几年的体内外实验中均证实它们能够诱导肿瘤细胞的凋亡,被视为肿瘤免疫监视的关键调节者[7-8]。而在上述两种因子的作用通路上都具有 Fas 相关死亡机构域蛋白(FADD)或 Fas 相关死亡域蛋白样 β 白介素 1-转化酶的环节[9]。近年来,国内外已有文献报道 cFLIP 蛋白在结肠癌细胞中表达升高,且其在抵抗 Fas 受体诱导的细胞凋亡过程中发挥着一定的作用[10]。cFLIP 作用于肿瘤细胞凋亡调控的重要环节,与肿瘤的发生、发展关系密切,因而对于 cFLIP 过量表达的肿瘤细胞,可通过抑制 cFLIP 的表达达到治疗目的,因此特定改变 cFLIP 表达水平的基因药物无疑将给结肠癌的基因治疗带来新的前景。目前,cFLIP-asODN 已在体外转染胃癌、肺癌及肾癌细胞,并均能明显抑制上述肿瘤细胞的增殖。

本实验中使用脂质体携带 3′-FITC 荧光素标记的 cFLIP 反义寡核苷酸转染 SW620 细胞,48 h 后经荧光倒置显微镜观察证明反义寡核苷酸阳性转染率可以达到 30.5%,和空载体 + cFLIP-asODN 转染组、脂质体 + 无意义 ODN 转染组和空白对照组相比有较高的转染率。荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 检测发现脂质体 + cFLIP-asODN 转染组的 mRNA 和蛋白表达量降低。MTT 实验和流式细胞仪检测也证明,转染脂质体 + cFLIP-asODN 复合物后,SW620 细胞生长受到明显抑制,并同时可以促进其凋亡,这些结果都印证了我们预先的设想。空载体 + cFLIP-asODN 转染组、脂质体 + 无意义 ODN 转染组和空白对照组在 mRNA 和蛋白的表达量、细胞增殖抑制率及细胞凋亡率方面,没有明显的差异。吴军等[11]报道采用脂质体携带 cFLIP-asODN 转染肺癌细胞 SPCA-1 后,cFLIP 蛋白的表达量明显降低,流式细胞仪检测细胞凋亡率 34.25%,而空载体 + cFLIP-asODN 转染组、脂质体 + 无意义 ODN 转染组和空白对照组无明显效果,与本研究结果相近。但其还报道随着 cFLIP-asODN 浓度的增加(0.5、1.0、2.0 μmol/L),mRNA 和蛋白的表达量会逐渐降低,凋亡率和细胞增殖抑制率也相应增加。由于各种肿瘤细胞对 Fas 系统介导的凋亡过程敏感性不同,自身整合外来基因的能力也有差异,因此结肠癌细胞的凋亡水平是否也会和 cFLIP-asODN 的浓度在一定范围内呈现正相关关系?促进结肠癌细胞凋亡的最适 cFLIP-asODN 浓度是多少?这些都有待于进一步研究。

目前认为 cFLIP 基因能够抑制所有已知死亡受体途径诱导的凋亡,它与肿瘤、炎症和自身免疫性疾病、糖尿病等重要的生理病理过程有关。目前,多种反义寡核苷酸治疗恶性肿瘤在国外已经进入 1、2 期临床试验。本实验结果表明,在体外实验中,靶向的 cFLIP 反义寡核苷酸能够特异性封闭 cFLIP 蛋白的表达,有效抑制 SW620 细胞的生长,并促进其凋亡,从而为结肠癌的反义基因治疗提供了可靠的实验室依据。利用 asODN 技术,特异性开展针对 cFLIP 的靶向治疗,将可能为结肠癌基因治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] Irmler M, Thome M, Hahne M, *et al*. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP[J]. Nature, 1997, 388(6638): 190-195.
[2] Scaffidi C, Schmitz I, Krammer P H, *et al*. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis[J]. J Boil Chem, 1999, 274(3): 1541-1548.
[3] 刘志能, 唐良荅. cFLIP 与卵巢癌[J]. 重庆医学, 2005, 34(10): 1554-1556.
[4] Clarke P, Tyler K L. Down-regulation of cFLIP following reovirus infection sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(1): 211-223.
[5] Garcia-Garcia C, Fumarola C, Navaratnam N, *et al*. AMPK-independent down-regulation of cFLIP and sensitization to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6): 853-863.
[6] Siegmund D, Mauri D, Peters N, *et al*. Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mediate up-regulation of c-Fos by Fas Ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) *via* a FLICE inhibitory protein (FLIP)-regulated pathway [J]. J Biol Chem, 2001, 276(35): 32585-32590.
[7] Lavrik I, Golks A, Krammer P H. Death receptor signaling[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 2): 265-267.
[8] Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, *et al*. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy [J]. Cancer Sci, 2004, 95(10): 777-783.
[9] Krueger A, Baumann S, Krammer P H, *et al*. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(24): 8247-8254.
[10] 高文超, 范列英, 蔡清萍, 等. cFLIP 蛋白在大肠癌细胞中的表达及其对大肠癌细胞凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(7): 795-797.
[11] 吴军, 胡永校, 杜杰, 等. cFLIP 反义寡核苷酸对人肺腺癌 SPCA-1 细胞作用的探讨[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(10): 571-574.

(**收稿**:2010-12-21;**修回**:2011-02-13)
(编辑 邓强庭)