基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1339-05

Survivin 反义寡核苷酸联合 TCS 诱导食管癌细胞 Eca-109 凋亡的研究

陈玉龙,邓华瑜
(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 survivin 反义寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotide,ASODN)联合 TCS 诱导细胞凋亡的作用及其分子机制。方法:以食管癌细胞 Eca-109 为实验对象,将实验分 6 组:未处理组、脂质体组、survivin 正义寡核苷酸组(Sense oligodeoxynucleotide,SODN)、survivin 反义寡核苷酸组(Antisense oligodeoxynucleotide,ASODN)、天花粉蛋白组(Trichosan thein,TCS)、survivin 反义寡核苷酸联合天花粉蛋白组。各处理因素作用食管癌细胞 Eca-109 48 h,RT-PCR 检测 Eca-109 细胞 survivin mRNA 表达变化;Western blot 检测 Survivin、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达变化;AnnexinV-FITC/PI 双染法检测 Eca-109 细胞早期凋亡率。结果:ASODN 组、TCS 组和联合组的 survivin mRNA 和 Survivin 蛋白表达水平明显降低,联合组较单独药物组(ASODN 组、TCS 组)降低,而以上 3 组的早期凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达水平明显升高,联合组较单独药物组增高($P<0.05$);TCS 组和联合组细胞的 Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低,Bax 蛋白的表达增加。结论:TCS 联合 survivin 的 ASODN 在诱导 Eca-109 细胞的凋亡方面,能够发挥协同作用;TCS 和 survivin 的 ASODN 共同抑制 survivin 基因表达,TCS 下调 Bcl-2 蛋白表达和上调 Bax 蛋白表达,分别激活 caspase 级联反应上游、下游途径,是两药发挥协同作用的分子基础。

【关键词】食管癌;反义寡核苷酸;凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-08

Apoptosis of Eca-109 cells treated with antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin

CHEN Yu-long, et al
(*Department of Pathophysiology, College of Bacial Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin on the apoptosis of human esophageal carcinoma Eca -109 cells and its molecular mechanisms. *Methods*: The experimental Eca-109 cells were divided into six groups: untreated group, lipofectamine group, sense oligodeoxynucleotide targeting survivin group (SODN), antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin group(ASODN), trichosanthin group, and antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin group. Expression of survivin mRNA was detected by RT-PCR. Expressions of Survivin, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 proteins were detected by Western blot. The rate of early apoptosis was detected by AnnexinV-FITC/PI double stain. *Results*: Expressions of survivin mRNA and protein of the ASODN group, the TCS group, and the combination group were significantly decreased. The combined group had significantly lower expression than the single group (SODN group or the TCS group). However, the early apoptosis rates and expression of caspase-3 protein in the ASODN group, the TCS

作者介绍:陈玉龙(1982-),男,硕士,
研究方向:肿瘤免疫与肿瘤药理。
通讯作者:邓华瑜,女,教授,E-mail:cqdenghy@163.com。

用的相关分析[J].中药材,2009,32(11):1757-1760.
[6] 舒 静,王 怡,张晓云.黄芪注射液拮抗高糖腹膜透析液对腹膜皮细胞紧密连接的影响[J].上海中医药大学学报,2007,21(4):50-53.
[7] 徐家云,王俊霞,孟晓青,等.黄芪注射液对大鼠腹膜透析效能及腹膜超微结构的影响[J]河南科技大学学报,2006,24(2):81-83.
[8] Zhang Y F, Yang X, Zhang Y J, et al.Peroxisome proliferator -activated receptor-gamma is expressed by rat peritoneal mesothelial cells: Its potential role in peritoneal cavity local defense[J].Am J Nephrol, 2006, 26(6):602-611.
[9] Rhyu D Y, Yang Y Q, Ha H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF-β-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(3): 667-675.
[10] 刘伏友.腹膜透析腹膜纤维化的机制及防治[J]. 中国血液净化, 2007, 6(12):640-642.
[11] Okada H, Kalluri R. Cellular and molecular pathways that lead to progression and regression of renal fibrogenesis[J].Current Molecular Medicine, 2005, 5(5):467-474.

(责任编辑:张学颖)

group and the combination group were significantly increased, with significantly higher results in the combination group than in the single group. Expression of bcl-2 protein of the TCS group and the combination group decreased. However, expression of the bax protein was increased. *Conclusion*: Survivin antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin can collaboratively induce apoptosis of the Eca-109 cells. The molecular mechanism may be that two drugs can activate caspase cascade channels due to collaborative suppressing the expression of survivin gene by two drugs and down-regulating the expression of bcl-2 protein and up-regulating the expression of bax protein by TCS.

【Key words】Esophageal carcinoma; Antisense oligodeoxynucleotide; Apoptosis

反义寡核苷酸技术(Antisenseoligodeoxynucleotide,ASODN)是肿瘤基因治疗策略之一。它是根据碱基互补原则,用人工合成或生物表达的特定互补的 DNA 或 RNA 片段抑制或封闭专一靶基因表达的技术[1]。在抗肿瘤中的应用较重要的一点是选择一个合适的靶基因,最理想的靶点是具有肿瘤表达特异性的成分。针对 survivin 基因的反义技术研究较多,并已应用于食管癌的体外研究[2]。目前该技术倾向于与多种药物联合应用于肿瘤的治疗,达到高效低毒目的。

天花粉蛋白(Trichosanthin,TCS)是我国最早提纯、分离并鉴定其分子结构的中药成分之一[3]。它是一种碱性蛋白,属于Ⅰ型核糖体失活蛋白(Ⅰribosome-inactivating protein,RIP)。研究显示,TCS 具有多种药理特性,如诱导中期流产、抗 HIV 感染和抗肿瘤等[4]。本研究前期工作表明,TCS 能够明显抑制食管癌细胞的增殖[5]。

本部分实验采用 SurvivinASODN 联合 TCS 作用食管癌细胞 Eca-109 细胞,研究两药的协同诱导 Eca-109 细胞凋亡作用及其分子机制,为食管癌的基因治疗应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 Eca-109 细胞为重庆医科大学病生实验室保存。

1.1.2 主要试剂 针对 survivin mRNA232-251 序列的 20 个碱基设计 ASODN 链,并同时设计出 SODN 链。ASODN 序列为 5'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3',SODN 序列为 5'-CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3',均全程硫代修饰,送上海生工生物工程技术服务有限公司合成;天花粉蛋白注射液规格:1.2 mg/ml,购于上海金山制药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人食管癌 Eca-109 细胞置于含 10%胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规培养,待其贴壁生长融合至 60%左右时,用 0.1%的胰酶消化传代培养。

1.2.2 实验分组 本次实验分为 6 组:其中对照组分为未处理组、脂质体组和 SODN 组;实验组为 ASODN 组、TSC 组及 ASODN 和 TSC 联合作用组。TCS 组及联合组的 TCS 终浓度为 33 μg/ml[5],SODN 组、ASODN 组和联合组按脂质体与寡核苷酸 1:1 的比例转染,作用 48 h 后,分别检测各项指标。

1.2.3 细胞转染 选择生长良好的 Eca-109 细胞,以 4×10^5 个/孔接种 6 孔细胞培养板,待细胞生长到 95%左右时,利用 Lipofecatmine™2000 将寡核苷酸片段转染细胞。

1.2.4 流式细胞仪检测早期凋亡率 细胞经药物处理后,胰酶消化及低速离心后吸去 PBS,最后用 250 μl 结合缓冲液重悬细胞,调节细胞浓度为 1×10^6 个/ml,取上述细胞悬液 100 μl 于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl 20 μg/ml 的 PI 溶液,混匀后,室温避光孵育 15min,在流式管中加入 400 μl PBS,上流式细胞仪进行分析,最后打印结果。

1.2.5 RT-PCR 检测 Survivin mRNA 表达 按 Trizol 试剂盒说明一步法提取总 RNA,进行琼脂糖电泳及利用紫外分光光度仪测定 RNA 纯度和浓度。逆转录反应合成第一链 cDNA,进行 PCR 反应。

Survivin 引物:上游引物,5'-CTCAAGGACCACCGCATCTC-3';

下游引物,5'-GAAAG CGCAA CCGGA CGAAT-3';

GAPDH 引物序列:上游引物,5'-GGCAAATTCCATGGCACCGTC-3';

下游引物,5'-CATACTCAGCGCCAGCATCGC-3'。

反应条件为:94℃预变性 2 min 后,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 29 个循环。最后 72℃延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭显色,用自动凝胶成像分析系统中 Quantity one 软件分析各扩增条带产物的含量,用 Survivin 与 GAPDH 光密度的比值表示 Survivin mRNA 的相对含量。

1.2.6 Western blot 检测 Survivin、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 细胞经 PBS 清洗后,加入细胞裂解液,利用 BCA 定量试剂盒进行蛋白定量,上样量为 60 μg,常规电泳、转印和 ECL 显色。其中 Survivin 兔抗人多克隆抗体、Caspase-3、Bax 及 β-actin 的鼠抗人单克隆抗体稀释比例为 1:300,Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体稀释比例为 1:250,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG 稀释比例都为 1:3 500。用 Quantity one 分析软件测定条带的灰度值,利用 Survivin、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白与内参 β-actin 蛋白灰度值的比值作为细胞间蛋白表达量的比较。

1.3 统计学方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 for windows 统计软

件处理数据，采用多样本均数比较的方差分析、多重比较的 q 检验对数据进行分析。

2 结 果

2.1 Annexin V-FITC/PI 检测食管癌细胞 Eca-109 早期凋亡率

未处理组、脂质体组、SODN 组、ASODN 组、TCS 组和联合组的早期凋亡率（%）分别为 0.90 ± 0.05、1.05 ± 0.14、0.86 ± 0.03、3.69 ± 0.15、3.52 ± 0.42 和 5.11 ± 0.33，其中 ASODN 组、TCS 组和联合组的早期凋亡率明显高于未处理组，差别具有显著性（$P<0.05$），脂质体组、SODN 组和未处理组两两比较，差别均无显著性（$P>0.05$），联合组早期凋亡率高于 A-SODN 组和 TCS 组，差别有显著性（$P<0.05$），ASODN 组和 TCS 组差别无显著性（$P>0.05$）（见图 1）。

2.2 不同处理组食管癌细胞 Eca-109 的 survivin mRNA 表达水平

未处理组、脂质体组、SODN 组、ASODN 组、TCS 组和联合组 survivin mRNA 的表达水平分别为 0.242 1 ± 0.006 2、0.242 9 ± 0.002 0、0.247 0 ± 0.001 8、0.110 7 ± 0.006 9、0.113 4 ± 0.003 3 和 0.043 9 ± 0.003 5。其中 ASODN 组、TCS 组和联合组明显低于未处理组，差别具有显著性（$P<0.05$），脂质体组、SODN 组和未处理组两两比较，差别均无显著性（$P>0.05$），联合组 survivin mRNA 表达水平明显低于 ASODN 组和 TCS 组，差别有显著性（$P<0.05$），ASODN 组和 TCS 组差别无显著性（$P>0.05$）（见图 2）。

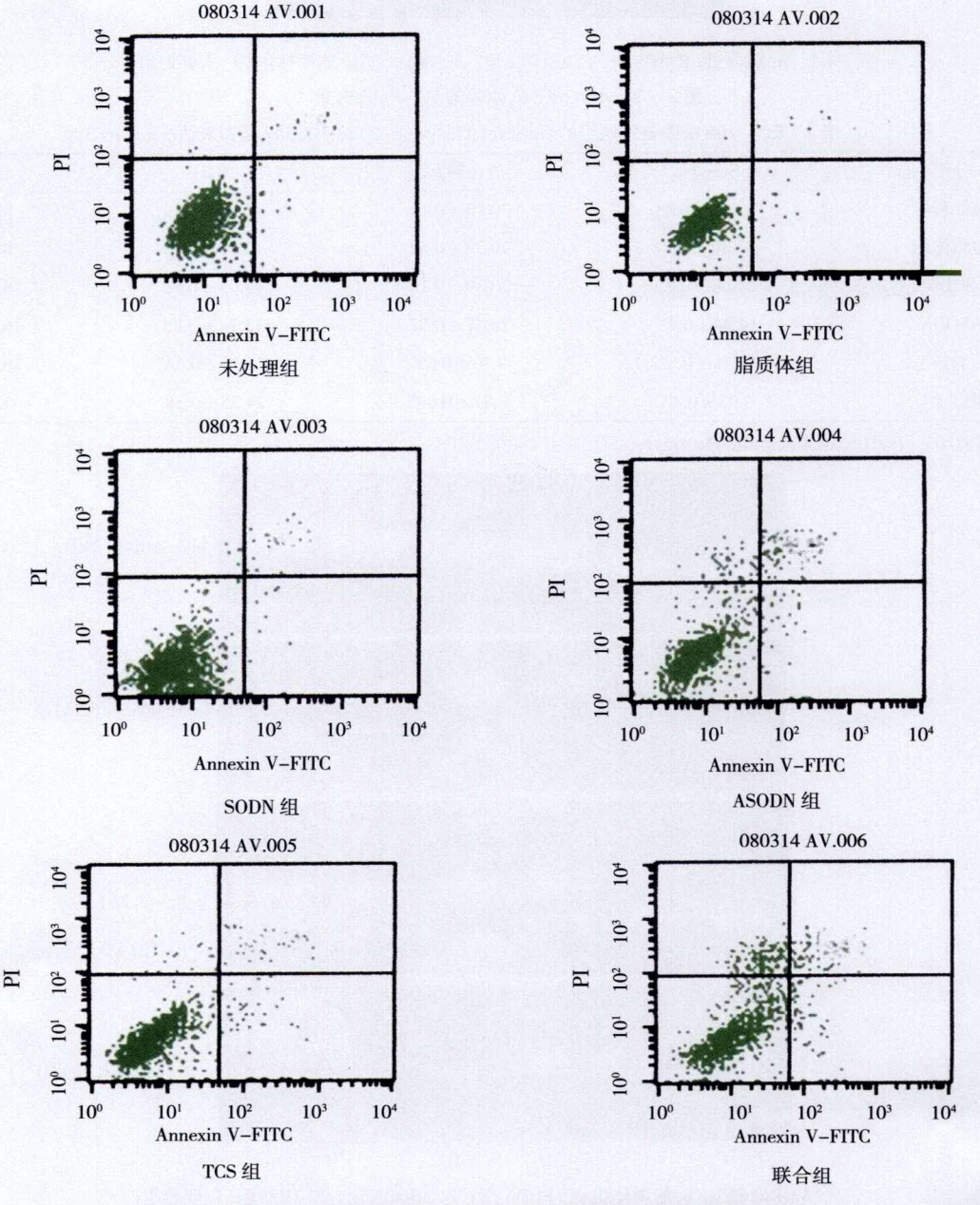
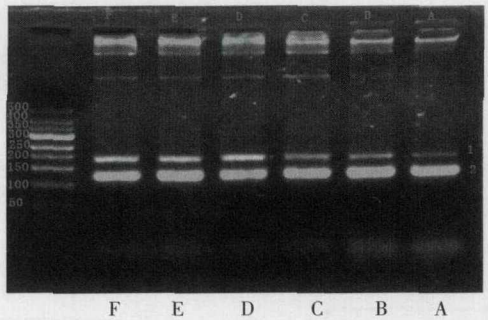


图 1 Annexin V-FITC/PI 检测 Eca-109 细胞早期凋亡率的流式分析图

2.3　不同处理组食管癌细胞 Eca-109 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平

ASODN 组、TCS 组和联合组细胞的 Survivin 蛋白表达明显低于未处理组，Caspase-3 蛋白表达明显高于未处理组，差别有显著性（$P<0.05$）；脂质体组、SODN 组和未处理组两两比较，Survivin、Caspase-3 蛋白差别均无显著性（$P>0.05$）。TCS 组和联合组细胞的 Bcl-2 蛋白的表达，较未处理组明显降低，差别有显著性（$P<0.05$），Bax 蛋白的表达则升高，差别具有显著性（$P<0.05$）。对于 Bcl-2、Bax 蛋白的表达，TCS 组和联合组差别并无显著性（$P>0.05$），脂质体组、SODN 组、ASODN 组与未处理组两两比较，差别均无显著性（$P>0.05$）（见表 1 和图 3）。



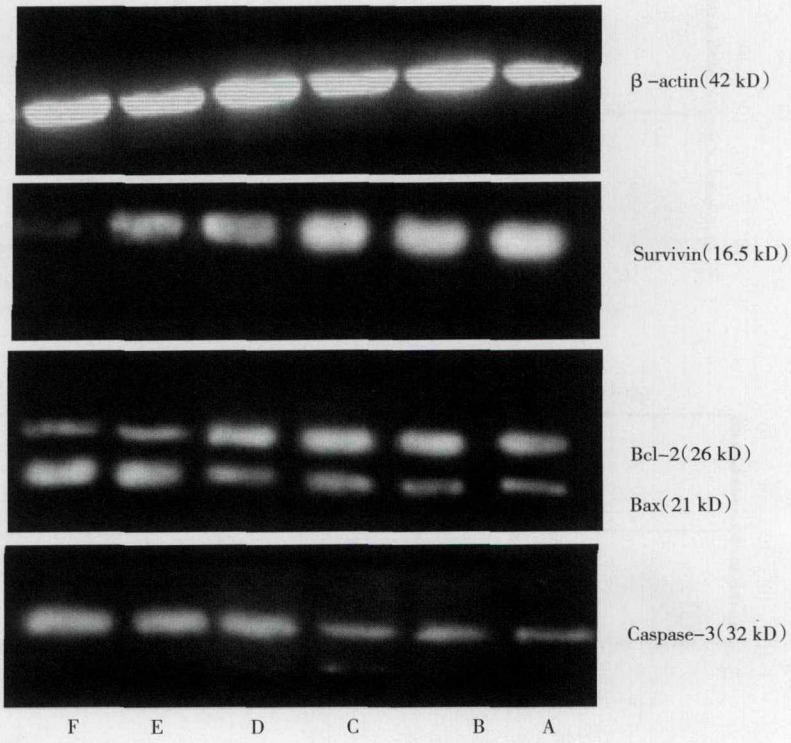
A. 联合组；B. TCS 组；C. ASODN 组；D. SODN 组；E. 脂质体组；F. 未处理组

图 2　survivin mRNA 水平的 RT-PCR 分析

表 1　Eca-109 细胞各实验组的 Survivin、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	Survivin	Bcl-2	Bax	Caspase-3
未处理组	21.69 ± 0.28	20.13 ± 0.11	12.90 ± 0.44	8.55 ± 0.43
脂质体组	21.36 ± 0.19	20.39 ± 0.52	12.53 ± 0.43	8.45 ± 0.10
SODN	21.64 ± 0.75	20.39 ± 0.18	13.05 ± 0.66	8.12 ± 0.35
ASODN	14.04 ± 0.45*	20.47 ± 0.32	13.14 ± 0.85	16.79 ± 0.06*
TCS	13.26 ± 0.62*	9.70 ± 0.65*	24.13 ± 0.64*	16.66 ± 0.34*
联合组	8.03 ± 0.3*#	8.97 ± 0.04*	24.25 ± 0.38*	41.59 ± 0.33*#

方差分析，$P<0.05$；* $P<0.05$ vs 未处理组，# $P<0.05$ vs ASODN 组 and TCS 组



A. 未处理组；B. 脂质体组；C. SODN 组；D. ASODN 组；E. TCS 组；F. 联合组

图 3　survivin、casepase-3、bcl-2、bax 蛋白水平的 Western blot 分析

3 讨 论

细胞凋亡(Apotosis)是由一系列基因控制的自主性有序死亡,它是胚胎发育和成人组织器官中细胞清除的正常途径。肿瘤是细胞增生和凋亡平衡失调的结果,凋亡受阻在肿瘤的发生发展过程中起着极其重要的作用。目前已知的凋亡调节基因主要有 bcl-2 基因家族和凋亡抑制蛋白家族(Inhibitor of apoptosis protein,IAPs)等。细胞凋亡通过 Caspase 蛋白的程序性激活实现,无论是从上游激活还是从下游激活,Caspase-3 被认为是凋亡系统的终末环节[6]。

Survivin 是 IAP 家族中最小的 1 个新成员。该蛋白可以与 Caspase-3、Caspase-7 结合直接抑制它们的生成和活化,从 Caspase 途径的下游抑制细胞凋亡[7]。bcl-2 是 bcl-2 基因家族中备受关注的原癌基因,其主要作用是抑制细胞凋亡,不刺激细胞增殖,在肿瘤形成过程中起辅助作用,通过与某些癌基因产生协同作用方式实现。该蛋白主要通过抑制线粒体途径抑制细胞凋亡,直接或间接抑制线粒体细胞色素 C 的释放,从而阻止细胞色素 C 对 Caspase-9 激活,从 Caspase 的上游抑制细胞凋亡。bax 是 bcl-2 的同源基因,当 Bax 在细胞内过表达时能形成同源二聚体,而拮抗 Bcl-2 的抑制效应使细胞趋于凋亡,对死亡信号的反应增强。Bcl-2 与 Bax 的比值是决定细胞接受致病信号刺激后成活与否的关键因素,肿瘤时两者比值增高,导致上游抑制 Caspase 途径,从而抑制肿瘤细胞凋亡[8]。

本研究采用反义寡核苷酸技术特异性抑制 survivin 基因表达,联合 TCS 作用于食管癌细胞 Eca-109。实验结果显示:TCS 和 survivin 的 ASODN 联合应用较其分别单独应用时,能够使 survivin mRNA 和蛋白表达水平显著降低、Caspase-3 蛋白表达水平显著增加;早期凋亡率检测结果可见,应用 TCS 或 survivin 的 ASODN 作用细胞 48 h 后,细胞凋亡率较未处理组、脂质体组、SODN 组增加,有统计学差异,即两种药物都可以诱导细胞凋亡,但凋亡率不高;联合 TCS 和 survivin 的 ASODN 共同作用细胞后,与 TCS 组、ASODN 组相比较,细胞早期凋亡率明显提高,具有统计学差异。实验结果表明,TCS 和 survivin 的 ASODN 联合应用能够共同抑制 survivin 基因的转录翻译水平、上调 Caspase-3 蛋白,从 Caspase 级联反应下游诱导细胞凋亡。另外,Bcl 和 Bax 蛋白检测结果表明,TCS 独立具有下调 Bcl-2 蛋白、上调 Bax 蛋白表达作用,使 Bcl-2 与 Bax 比值下降,进而可导致细胞色素 C 从线粒体内释放,激活 Caspase-9 乃至 Caspase-3,产生从 Caspase 级联反应的上游诱导细胞凋亡的效应。

本研究认为,联合应用 survivin 的 ASODN 与 TCS 具有协同效应,可以对食管癌细胞 Eca-109 取得更加有效的诱导凋亡、抑制增殖作用,此为探寻肿瘤防治高效低毒手段提供了有价值的实验依据。

参 考 文 献

[1] Cheon S,Nadesan P,Poon R,et al. Growth factors regulate beta-catenin-mediated TCF-dependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing[J].Exp Cell Res, 2004,293(2):267-274.

[2] 赵 晶,刘铁夫,董春燕,等.反义 Survivin 诱导食管鳞癌细胞凋亡[J].世界华人消化杂志,2005,13(12):1447-1449.

[3] 金善炜. 天花粉蛋白的故事—中药现代化的一个成功实例[J]. 生命的化学,2006,26(6):564-567.

[4] Shaw P C,Lee K M,Wong K B. Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties[J]. Toxicol,2005, 45(6):683-689.

[5] 陈玉龙,邓华瑜,段 红,等.TCS 对 Eca-109 的增殖抑制作用及其机制初探[J].天津医药,2009,37(3):173-176.

[6] Zhu X F,Liu Z C,Xie B F,et al.Involvement of caspase-3 activation in squamocin induced apoptosis in leukemia cells line HL-60[J].Life Sci, 2002,70(11):1259-1259.

[7] Alteri D C,Marchisio P C,Marchisio C.Survivin apoptosis:an interloper between cell death and cell proliferation in cancer[J].Lab invest, 1999,79(11):1327-1333.

[8] Cheng E H,Wei M C,Weiler S,et al.Bcl-2,bcl-X1 sequester BH3 domain only molecules preventing bax and bax-mediated mitochondrial apoptosis[J].Mol Cell,2001,8(3):705-711.

(责任编辑:冉明会)