基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1457-05

反义肽核酸阻抑线粒体基因表达诱导肺癌 SPC 细胞凋亡的实验研究

王光辉[1],黄桂君[1],余时沧[2],张志远[1],钱桂生[1]

(1.第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所,重庆 400037;2.第三军医大学西南医院病理研究所,重庆 400038)

【摘 要】目的:探讨以反义肽核酸(Anti-sense peptide nucleic acid, asPNA)封闭肺癌 SPC-A1 细胞线粒体 DNA(Mitochondrial DNA,mtDNA)转录启动子后,对其生物学特性的影响。方法:合成针对 mtDNA 重链转录启动子区的 asPNA,构建 asPNA-三苯磷复合物并鉴定,以该复合物转染人肺腺癌 SPC-A1 细胞系,激光共聚焦显微镜确定该复合物的亚细胞定位,RT-PCR 检测转染 48 h 后对 mtDNA 编码基因转录的影响,流式细胞术评估细胞周期分布及凋亡/坏死情况,自发光荧光仪检测细胞内 ATP 浓度,以未转染 asPNA-三苯磷复合物的肺腺癌 SPC-A1 细胞为对照。结果:成功获得 asPNA-三苯磷复合物,激光共聚焦显微镜显示该复合物顺利进入 SPC-A1 细胞线粒体;同未转染组相比,转染组 SPC-A1 细胞 mtDNA 编码基因的转录水平有所下降,而细胞内 ATP 浓度明显降低($P<0.01$);同时,细胞周期分析显示,转染组出现明显的亚二倍体峰,而 Annexin V-PI 双标结果进一步证实,转染组肺癌细胞凋亡率明显增加。结论:asPNA 在电子移位亲脂性阳离子-三苯磷的运载下,能够进入 SPC-A1 细胞线粒体并阻抑其 mtDNA 编码基因的转录,进而影响肺癌细胞的能量合成并诱导其凋亡。

【关键词】肺癌;反义肽核酸;线粒体;转录;凋亡

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-14

The effect of blocking the expression of mtDNA on lung cancer SPC-A1 cell by antisense peptide nucleic acid

WANG Guang-hui, et al

(*Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, the Third Military Medcial University*)

【Abstract】*Objective*: To study the change of the physiological characteristic of lung cancer SPC-A1 after its mtDNA transcript promoter was blocked by antisense peptide nucleic acid (asPNA). *Methods*: asPNA to the transcript promoter region on the heavy chain of mtDNA was synthesized, then asPNA-triphenyl phosphate complex was constructed and identified. This complex was transfected into SPC-A1. laser confocal microscope was used to detect the location of asPNA-triphenyl phosphate complex in SPC-A1. At 48 h behind transfection, the transcription of the gene encoded by mtDNA was detected by RT-PCR. Cell cycle and apoptosis/necrosis of SPC-A1 were detected by flow cytometry. The concentration of ATP in SPC-A1 was examined by spontaneous fluorescence analyzer. All of those results were compared with those of untransfected SPC-A1. *Results*: asPNA - triphenyl phosphate complex was successfully obtained. Confocal laser scanning microscope discovered that antisense peptide nucleic acid - triphenyl phosphate complex had been successfully transfected into the mitochondrion of SPC-A1. The transcriptional level of the gene encoded by mtDNA and concentration of ATP in the transfected SPC-A1 were lower significantly than the untransfected SPC-A1 ($P<0.01$). The analysis of Cell cycle displayed that noticeable sbu-G1 peak appeared in the transfected group. Annexin V-PI double labeling confirmed the apoptosis rate of lung cancer cell in the transfected group significantly increased. *Conclusion*: Carried by electronic shift lipophilic cation-triphenyl phosphate, asPNA can enter the mitochondrion of SPC-A1 and block the transcript of gene encoded by mtDNA to impact the synthesis of energy and induce apoptosis of SPC-A1.

【Key words】Lung cancer; Anti-sense peptide nucleic acid; Mitochondrial; Transcription; Apoptosis

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一。由于不良生活习惯和环境污染等因素,其发病率不断上升(近 30 年来我国肺癌发病率上升了 465%),已成为我国发病率、死亡率第一的恶性肿瘤[1]。然而,目前临床肺

作者介绍:王光辉(1975-),男,博士,
研究方向:肺癌的靶向治疗。

通讯作者:钱桂生,男,教授,E-mail:qiangs@tmmu.edu.com。

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30670919)。

癌综合治疗措施的效果尚不理想,患者 5 年生存率<15%[2]。因此,寻找新的治疗靶点和新的治疗方法,显得尤为迫切。越来越多的证据表明,线粒体结构和功能的改变,不仅会干扰肿瘤细胞的生长、能量代谢和增殖等过程,最终还会触发肿瘤细胞凋亡及坏死[3]。因此,以肺癌细胞线粒体作为治疗靶点是一个值得探索的方向。线粒体 DNA(Mitochondrial DNA,mtDNA)作为真核细胞唯一的核外遗传物质,编码 13 个与能量代谢相关的多肽,其损伤和转录障碍将导致所编码的多肽表达减少,电子传递链效率下降,渗透性转换孔开放,细胞凋亡[3];同时,观察发现肺癌细胞线粒体膜电位远高于正常呼吸道上皮细胞[4],而电子移位亲脂性阳离子类物质(Delocalized lipophilic cations,DLCs)在高线粒体膜电位的推动下,能够选择性地进入并积聚于肺癌细胞线粒体内[5]。

利用上述特性,本研究拟以 DLCs-三苯磷作为载体,将针对 mtDNA 转录启动子区的反义肽核酸(Anti sense peptide nucleic acid, asPNA)靶向性地运载到肺癌细胞线粒体内,通过 asPNA 与 mtDNA 转录启动子区域的特异性结合,抑制 mtDNA 编码基因的转录,观察其对肺癌细胞能量产生、凋亡/坏死等生物学特性的影响,从而为提高肺癌的综合治疗效果提供新的理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌 SPC-A1 细胞系引自美国典型培养物保藏中心(American type culture collection),RPMI1640 培养基、胎牛血清均购自美国 Hyclone 公司,ATP 检测试剂盒购自美国 Promega 公司,RT-PCR 试剂盒购自博大泰克公司(北京)。2-巯基乙醇、三氯乙酸、IBTP、乙腈购自上海生工生物工程公司,asPNA 序列为 FAM-OO-TCTTTGGGGT,由韩国 PANAGENE 公司合成。AnnexinV-PI 凋亡检测试剂盒购自浙江碧云天公司。

1.2 asPNA-三苯磷复合物的构建

根据文献[2]所述,将 50 nmol asPNA 溶入 50 μl 含 1 mmol/L EDTA 的 10 mmol/L HEPES 中,和 2-巯基乙醇 40℃共孵育 1 h,然后加入到 200 μl 含 500 nmol IBTP 的 HEPES 液中 40℃ 共孵育 4 h。以 2-巯基乙醇骤冷,反应产物通过分析柱用反相高压液相层析法进行分离。线性梯度开始浓度为:含 0.1%三氯乙酸的纯水,结束浓度为:含 90%的乙腈和 0.1%三氯乙酸。层析 30 min 后获得反应产物。以高压液相色谱及质谱鉴定。

1.3 细胞培养及实验分组

将 SPC-A1 细胞培养于含有 10%胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 的 RPMI1640 培养基中,培养条件为:37℃、5%CO_2、饱和湿度,待细胞长满培养瓶瓶底后,用 0.25%的胰酶消化传代。实验分为 asPNA—三苯磷复合物转染组和未转染组。

1.4 asPNA-三苯磷复合物转染 SPC-A1 细胞

将处于对数生长期的 SPC-A1 细胞以 0.25%的胰酶消化传代,按照 1×10^6 密度接种到 6 孔板,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5%CO_2 条件下培养至细胞密度为 85%~90%,用无血清 RPMI1640 培养基换液,24 h 后弃去培养基,加入 1 ml 含 25 nmol/ml asPNA—三苯磷复合物的无血清 RPMI1640 培养基孵育 4 h,激光共聚焦显微镜(TCS SP5,Leica 公司,德国)下观察转染效果,激发光 488 nm,发射光 525 nm。未转染组不含 asPNA—三苯磷复合物。

1.5 RT-PCR 检测 SPC-A1 细胞 mtDNA 重链编码基因 ATP 合酶 8(ATPase8)的表达

待 SPC-A1 细胞至 80%融合度,更换无血清 RPMI1640 培养基,24 h 后弃去培养基,加入 1 ml 含 25 nmol/ml asPNA-三苯磷复合物的无血清 RPMI1640 培养基孵育 48 h,收集细胞。未转染组不含 asPNA—三苯磷复合物。以 Trizol(Invitrogen 公司,美国)提取总 RNA(具体步骤参见说明书)。DNA 扩增仪(PTC-200,MJ 公司,美国)逆转录合成 cDNA,然后行 PCR 反应。针对重链编码基因 ATPase8 设计引物,序列为:上游 5'-ATTCTAACCTGAATCGGAGG-3',下游 5'-GATGCTTGCATGTGTAATCT-3',产物长度为 1 528 bp,反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min、54℃退火 1 min、72℃延伸 1.5 min,35 个循环后 72℃延伸 8 min。以 GAPDH 为内参照,引物序列:上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',产物长度:450 bp,反应条件同前。反应结束后,各取 10 μl PCR 产物,以含 0.5 μg/ml 溴乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,AlphaImager TM2200 型成像系统(美国)成像,AlphaEaseFC 软件分析电泳结果,进行图像分析和半定量分析。

1.6 复合物转染对细胞内 ATP 浓度的影响

加入 1 ml 含 25 nmol/ml asPNA- 三苯磷复合物的无血清 RPMI1640 培养基孵育 SPC-A1 细胞 48 h,未转染组单用无血清 RPMI1640 培养基,收集细胞。根据 ATP 检测试剂盒说明书,裂解细胞,绘制ATP 标准曲线,并根据自发荧光仪(Berthold 公司,德国)检测结果,利用检测试剂盒中的标准品绘制标准曲线,并计算样品中 ATP 浓度,以样品中蛋白质浓度进行校正。

1.7 对 SPC-A1 细胞细胞周期的影响

加入 1 ml 含 25 nmol/ml asPNA—三苯磷复合物的无血清 RPMI1640 培养基孵育 SPC-A1 细胞 48 h,未转染组单用无血清 RPMI1640 培养基,收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。PBS 洗涤 3 次,70% 预冷的乙醇固定 24 h 以上,1 mg/ml RNaseA 消化,离心,碘化丙啶(PI)染色,200 目尼龙

网筛滤，流式细胞仪（Coulter Epics XL，美国 Beckman 公司）分析细胞周期。

1.8 复合物转染对肺癌细胞细胞凋亡的影响

加入 1 ml 含 25 nmol/ml asPNA－三苯磷复合物的无血清 RPMI1640 培养基孵育 SPC-A1 细胞 48 h，未转染组单用无血清 RPMI1640 培养基，收集细胞，根据凋亡检测试剂盒的说明书进行离心、清洗，加入 Annexin V-FITC 及 PI 孵育后，流式细胞仪（Coulter Epics XL，美国 Beckman 公司）检测。

1.9 统计学分析

计量资料数据以均数 ± 标准差表示，SPSS12.0 软件包进行统计处理，组间变量比较采用配对 t 检验，$P \leqslant 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 asPNA-三苯磷复合物的鉴定

合成的 asPNA-三苯磷复合物，其分子量为 3979.9，高压液相色谱鉴定结果显示，在 22.1 min 处可见一单峰，未见明显的杂质峰，与标准品一致（如图 1A）；添加电荷后，质谱分析，复合物分子量为 3 982.2（如图 1B）。以上结果表明：asPNA-三苯磷复合物符合设计要求。

2.2 asPNA-三苯磷复合物进入细胞线粒体内

激光共聚焦显微镜观察，可见 asPNA-三苯磷（绿色）分布于细胞质中，形态和空间分布同线粒体基本一致（图 2），提示 asPNA-三苯磷成功进入细胞线粒体内。

2.3 SPC-A1 细胞 mtDNA 重链编码基因 ATPase8 转录水平下降

电泳结果如图 3 所示，于 1 500、400 bp 附近分别可见 ATPase8、GAPDH 的扩增产物，长度分别为 1 528、450 bp。同未转染组相比，asPNA-三苯磷复合物转染后，SPC-A1 细胞 ATPase8 的 mRNA 水平明显降低，仅为未转染组的 56.01%。提示，实验组 mtDNA 重链的转录受到明显抑制。

2.4 SPC-A1 细胞内 ATP 浓度降低

asPNA-三苯磷复合物转染组细胞内 ATP 浓度为（1.20±0.11）nmol/mg 蛋白，空白未转染组细胞内 ATP 浓度为（2.19±0.15）nmol/mg 蛋白，转染组明显低于空白未转染组（$t = 7.280$，$P = 0.002 < 0.05$）。

2.5 SPC-A1 细胞出现亚二倍体峰

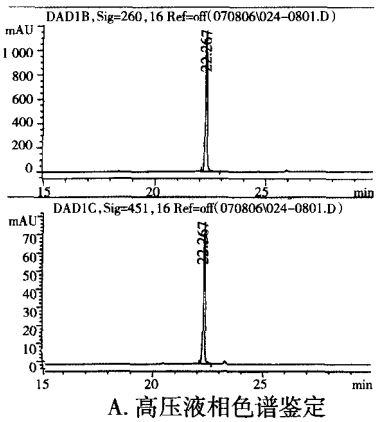
如图 4 所示，处于 G_1 期的细胞分别为：51.0%（未转染组），49.50%（复合物转染组）；增殖指数（$S+G_2/M$）分别为：42.03%（未转染组）；50.45%（复合物转染组）。而 asPNA-三苯磷复合物转染组可见明显的亚二倍体峰（8.81%），提示，部分细胞发生了凋亡/坏死。

2.6 SPC-A1 细胞凋亡增加

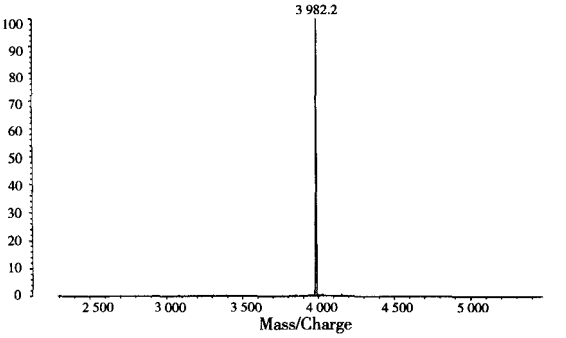
复合物转染组细胞凋亡率为 11.83%±0.66%，明显高于未转染组 2.56%±0.71%（$t = 13.463$，$P = 0.001 < 0.05$）（图 5）。提示：asPNA-三苯磷复合物转染后，部分 SPC-A1 细胞发生凋亡。

3 讨 论

线粒体是维持细胞生存的“动力工厂”。正常情况下，通过氧化磷酸化为细胞提供绝大部分 ATP，其功能障碍，将导致细胞能量产生效率下降，并引起活性氧簇（Reactive oxygen species，ROS）生成增多，从而对细胞的生存和正常功能的维持产生严重的影响[6]。而参与氧化磷酸化作用的蛋白质中，有 13 个由 mtDNA 编码。抑制肿瘤细胞 mtDNA 基因的表达，则可导致其线粒体蛋白质合成系统障碍，氧化磷酸化作用受抑制，能量产生效率下降；并引起 ROS 生成增多，进而严重干扰肿瘤细胞的生存和正



A. 高压液相色谱鉴定

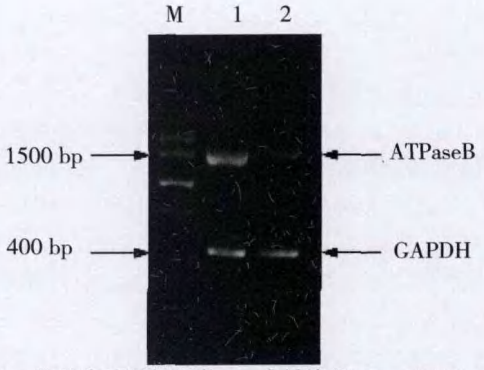


B. 质谱鉴定

图 1 asPNA-三苯磷复合物的鉴定结果

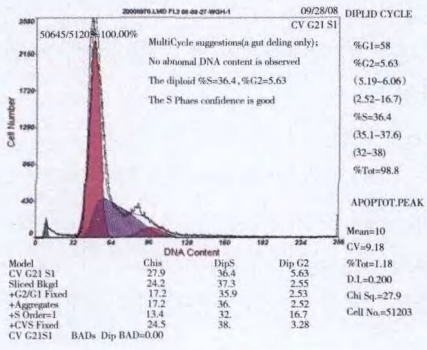


图 2 asPNA-三苯磷复合物的亚细胞定位(绿色荧光为复合物,激光共聚焦显微镜检测,标尺= 5 μm)

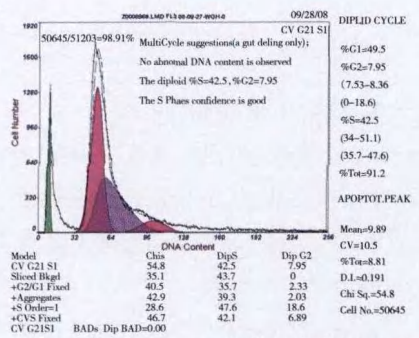


M. 核酸分子量标记物;1. 未转染组;2. asPNA—三苯磷复合物转染组

图 3 RT-PCR 检测 ATPase8 的表达情况

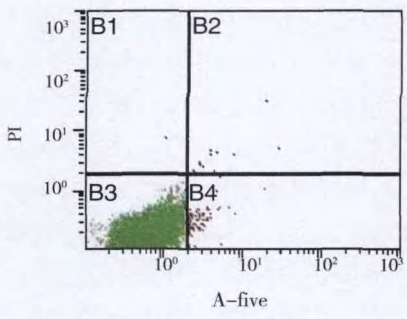


A. 未转染组

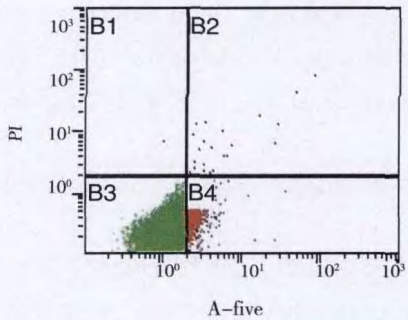


B. asPNA—三苯磷复合物转染组

图 4 细胞周期分布情况



A. 未转染组



B. asPNA—三苯磷复合物转染组

图 5 细胞凋亡情况

常功能的维持,诱导其凋亡[3]。要达到以上目的,导入针对 mtDNA 的外源性反义物质是一种可行的选择[7]。

asPNA 是一种人工合成的 DNA 类似物,由氮 2(氨基乙基)甘氨酸通过酰胺连接组成骨架,核酸碱基通过亚甲基羰基连在氮原子上,空间大小与天然核酸相近,除具备核酸的基本特性以外,还具有高水溶性,对各种酶活性抑制力强,碱基配对的特异性高,容易被细胞吸收等优点,是目前较有前途的反义物质之一[8]。但由于 asPNA 对脂质膜的穿透能力差,难以直接进入线粒体内。以往的研究通过抗原、抗体、配体、受体、磷脂键连接以及核定位信号肽(Nuclear localization signal peptide,NLS)连接等机制,提高细胞对 PNA 的摄入量[9-11]。还有一些体外研究通过显微注射和电穿孔术等方法,直接提高 PNA 在细胞内的浓度[12]。而近来的研究发现,DLCs 类物质能够在细胞线粒体跨膜电位的推动下,选择性地聚集于肿瘤细胞线粒体内,可作为 asPNA 等反义物质的载体[13],因此,本研究构建了 asPNA-三苯磷复合物,利用 DLCs 类物质能够在肿瘤细胞高线粒体膜电位的推动下,选择性积聚于肺癌细胞线粒体的特性[5],激光共聚焦显微镜结果初步显示(图 2),成

功地将 asPNA 运载至肺癌细胞细胞线粒体内。

要达到抑制 mtDNA 编码基因表达的目的，设计的 asPNA 应针对 mtDNA 哪个环节以及靶序列，也是值得探索的问题。既往有研究者合成了针对 mtDNA 复制过程的 asPNA，试图治疗因为 mtDNA 的 A8344G 处点突变引起的疾病—肌阵挛癫痫破碎红纤维综合症，尽管实验证实，这些 asPNA 成功地进入线粒体并同 mtDNA 相结合，然而却未能抑制细胞 mtDNA 的复制，同时，包括 A8344G 处突变片断的表达量也未出现明显的变化[14]。本研究改变思路，设计了直接针对肺癌细胞 mtDNA 转录过程的 asPNA。同时，大量研究表明，由于缺乏组蛋白的保护，肿瘤细胞 mtDNA 突变发生率很高[15]，也就是说，外源性反义物质很有可能因为突变的发生而失去作用；我们在分析已有研究结果的基础上，发现位于肺癌细胞 mtDNA D-loop 区的 2 个转录启动子区域（531~568 bp、424~445 bp）很稳定，没有检测到突变的发生[16-20]。因此，我们设计了针对肺癌 mtDNA 重链转录启动子区域的 asPNA。结果表明，复合物转染后，mtDNA 重链编码基因的转录受到明显抑制，重链编码基因 ATPase8 的 mRNA 水平显著下降。

综上，本研究利用肺癌细胞线粒体膜电位高于正常上皮细胞这一特性，以 DLCs（三苯磷）作为载体，将 asPNA 靶向性地运载到肺癌细胞线粒体内，通过与 mtDNA 重链转录启动子的特异性结合，抑制 mtDNA 编码基因的转录，成功地诱导了肺癌细胞的凋亡，为提高肺癌的综合治疗效果提供了新的理论依据和实验基础。

参 考 文 献

[1] 陈万青，张思维，李连弟，等. 中国部分市县 1998～2002 年肺癌的发病和死亡[J].中国肿瘤，2006,15(9)：570-574.

[2] Chabowski M, Orowski T M, Rabczenko D. Analysis of prognostic factors and efficacy of surgical treatment for non-small cell lung cancer: department of surgery NTLDRI (1998-1999)[J]. Pneumonol Alergol Pol, 2008, 76(1): 1-10.

[3] Ricci C, Pastukh V, Leonard J. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2008,294(2):413-422.

[4] Ralph S J, Neuzil J. Mitochondria as targets for cancer therapy[J]. Mol Nutr Food Res,2009,53(1):9-28.

[5] Kurtoglu M, Lampidis T J. From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors[J]. Mol Nutr Food Res,2009,53(1): 68-75.

[6] Brenner C,Kroemer G.Apoptosis. Mitochondria-the death signal integrators[J]. Science,2000,289(5482):1150-1151.

[7] Rapozzi V,Cogoi S,Xodo L E,et al. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells[J]. Mol Cancer Ther,2006,5(7):1683-1692.

[8] Belotserkovskii B P, Liu R, Hanawalt P C, et al. Peptide nucleic acid (PNA) binding and its effect on in vitro transcription in friedreich's ataxia triplet repeats[J]. Mol Carcinog,2009,48(4):299-308.

[9] Ohsugi M,Cras-Meneur C,Zhou Y,et al. Glucose and insulin treatment of insulinoma cells results in transcriptional regulation of a common set of genes[J]. Diabetes,2004,53(6):1496-1508.

[10] Johnson J D,Bernal-Mizrachi E, Alejandro E U,et al. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(51):19575-19580.

[11] Li Y, Cao X, Li L X,et al. Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1[J]. Diabetes,2005,54(2):482-491.

[12] Berggren P O, Yang S N, Murakami M, et al. Removal of Ca^{2+} channel 3 subunit enhances Ca^{2+} oscillation frequency and insulin exocytosis[J]. Cell,2004,119(2):273-284.

[13] 余时沧，黄桂君，钱桂生，等. 电子移位亲脂性阳离子选择性肿瘤细胞线粒体毒性分子[J]. 生命的化学，2004，24(5)：417-420.

[14] Muratovska A,Lightowlers R N,Taylor R W. Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations implications for mitochondrial DNA replication expression and disease[J]. Nucleic Acids Res,2001,29(9):1852-1863.

[15] Santos C, Martínez M, Lima M, et al. Mitochondrial DNA mutations in cancer:a review[J]. Curr Top Med Chem,2008,8(15): 1351-1366.

[16] Nielsen P E,Egholm M,Berg R H,et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thyminesubstituted polyamide [J]. Science,1991,254(5037):1497-1500.

[17] Egholm M,Buchardt O,Christensen L,et al.PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hudrogen bonding rules[J]. Nature,1993,365(6446):556-568.

[18] Marin V L, Roy S, Armitage B A. Recent advances in the decelopment of peptide nucleic acid as a gene-targeted drug[J]. Expert Opin Bill Ther,2004, 4(3): 337-348.

[19] Sanchez R,Saralegui A,Olivos-Garcia A, et al. Entamoeba histolytica: intracellular distribution of the sec61alpha subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acid[J]. Exp Parasitol,2005,109(4): 241-251.

[20] Jin X, Zhang J,Gao Y,et al. Relationship between mitochondrial DNA mutations and clinical characteristics in human lung cancer[J]. Mitochondrion, 2007,7(5): 347-353.

（责任编辑：冉明会）