基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0570-05

生存素反义寡核苷酸在胃癌化疗中对表阿霉素的增敏性及其信号转导途径研究

侯 俊,张才全,彭 洪,马国栋
(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过构建 survivin 反义寡核苷酸,研究其在胃癌化疗中对表阿霉素(Epirubicin,EPI)的增敏作用及作用机制。方法:构建 survivin 反义寡核苷酸链(Antisense RNA,ASODN)及正义寡核苷酸对照链(SODN),脂质体法转染胃癌 SGC-7901 细胞,MTT 法检测转染组细胞抑制率并筛选出适宜浓度,不同浓度表阿霉素处理胃癌 SGC-7901 细胞,MTT 法检查表阿霉素对其生长抑制作用并筛选出 4 组浓度做为待测浓度,将 2 种因素联合作用于 SGC-7901 细胞,Western-blot 法检查 survivin 蛋白表达情况,MTT 法检查表阿霉素对其抑制率,流式细胞仪检查细胞周期,Annexin V-FITC 法检查细胞凋亡情况,RT-PCR 法检查 bcl-2、SMac mRNA 表达情况。结果:经 200 nmol/L survivin 反义寡核苷酸处理后的 SGC-7901 细胞对表阿霉素的敏感性明显增加:MTT 法示转染后细胞经表阿霉素作用 24 h 后,抑制率较单独使用表阿霉素的未转染组明显提高($P<0.05$,$q>1.15$),流式细胞仪检查示联合作用组使细胞 G_2/M 期细胞数较单独使用表阿霉素组明显增多:Western-blot 检查示转染后 survivin 蛋白表达水平显著降低,Annexin V-FITC 检查示转染组细胞凋亡明显增加,RT-PCR 检查示:SMac mRNA 在联合作用组较空白对照组表达上调。结论:Survivin 反义寡核苷酸能够增强 SGC-7901 细胞对表阿霉素的敏感性,其作用可能是通过上调 SMac 的表达实现的。

【关键词】反义寡核苷酸;生存素;表阿霉素;信号转导途径
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-10

Enhancement of cytotoxic effect of epirubicin on gastric carcinoma cell line SGC-7901 by survivin antisense RNA and signaling pathway

HOU Jun, et al
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether interfering survivin has the potential to sensitize stomach cancer cells to Epirubicin. *Methods*: By the method of liposome transfection, survivin antisense oligodeoxynucleotide was transfected into human stomach cancer SGC-7901 cell line. Treat cells with different concentrations of survivin ASODN and Epirubicin respectively to select the best combination trough assessing the growth of cells by MTT assay. Cells were randomly divided into control group, ASODN group, Epirubicin and combination group. Western blot analysis was used to check the survivin protein expression; inhibitive rate were detected by MTT assay; Flow cytometric analysis was used to detect the cycle status of SGC-7901 cells. The apoptosis was screened according to the result of Annexin V-FITC. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)were applied to detect the expression of bcl-2、SMac mRNA. *Results*: MTT assay showed the proliferation of SGC-7901 cells was retarded obviously contrasting to control group . The level of survivin protein expression in ASODN group are lower than control group according to Western blot analysis. Annexin V-FITC show that the apoptosis rate of ASODN group cells increases . The level of SMac mRNA expression in ASODN group are higher than control group according to RT-PCR analysis. *Conclusion*: Survivin siRNA can sensitize stomach cancer cells to Epirubicin. Up-regulating the SMac expression might be one of mechanisms.

【Key words】Antisense RNA; Survivin; Epirubicin; Signaling pathway

胃癌是发病率居于我国消化道肿瘤中第二位的恶性肿瘤,其化疗方案国际上尚未有统一标准。表阿霉素(Epirubicin,EPI)是胃癌化疗中常用药物,可能通过调节 P53,B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白等发挥作用,但经体外诱导胃癌细胞凋亡的实验证实,其对胃癌细胞的生长抑制率并不十分令人满意[1],Survivin 是 1997 年发现的结构独特的凋亡蛋白抑制因子(Inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族的新成员,是一种凋亡抑制蛋白,其高表达可能与恶性肿

作者介绍:侯 俊(1981-),男,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤。
通讯作者:张才全,男,教授,E-mail:tyrael811@163.com。

瘤对化疗的敏感性及耐药性有密切关系[2]，反义寡核苷酸技术利用其能与特定 mRNA 精确互补，特异阻断其翻译的 RNA 或 DNA 分子封闭某些基因，使之低表达或不表达，本研究即采用反义核酸技术封闭 Survivin 基因以研究其对表阿霉素作用于胃癌细胞的敏感性的影响及其可能的信号转导途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞生物研究所，由重庆医科大学基础医学研究所长期保存，胎牛血清购自美国 HYCLONE 公司，RMPI1640 培养基及胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司，Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司，survivin 反义寡核苷酸由上海生工合成，兔抗人 survivin 抗体及羊抗兔抗体购自武汉博士德公司，SDS-PAGE 胶及蛋白裂解液、ECL 发光试剂盒及 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒均购自碧云天生物技术公司，RT-PCR 试剂盒及 Trizol 购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞株 SGC-7901 的培养 胃癌细胞置于 37℃，饱和湿度，含 5%CO_2 的孵箱中培养，培养液 RPMI1640 含 100 ml/L 胎牛血清，100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素，每 48 h 换液 1 次，实验取对数生长期细胞。

1.2.2 ASODN、SODN 的合成及脂质体—反义寡核苷酸转染复合物的制备 采用人类 survivin 基因序列 232~251（来自 GenBank）设计反义寡核苷酸序列（ASODN），其 5'到 3'为 5'-CCC AGC CTT CCAGCT CCT TG-3'（部分 5'-端采用 FAM 荧光标记），正义对照序列（SODN）为：5'-CAAGGAGCTG-GAAGG CTG GG-3'，2 条序列均使用 BLAST 筛查无明显同源性，以上序列由上海生工合成。根据 Lipofectamine 2000 使用说明书稀释 ASODN/脂质体。

1.2.3 转染细胞及转染率的检测 胰酶消化并调整细胞至 50 000 个/ml，按每孔 100 μl 接种于 96 孔板中，待生长至约 60%时进行转染；将 ASODN 与不含血清及抗生素的 RPMI1640 培养基混合，调整其浓度为 200 nmol/L、400 nmol/L、800 nmol/L、1 200 nmol/L、1 600 nmol/L，将脂质体与培养基混合；室温静置 5 min；混合 2 种溶液，室温静置 30 min，转染复合物最终浓度为 100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L、600 nmol/L、800 nmol/L，将转染复合物与细胞作用 5 h 后更换完全培养液，培养 48 h 后检查转染效率，SODN 转染与效率检查同 ASODN。

1.2.4 MTT 法筛选 ASODN 及表阿霉素适宜浓度 取对数生长期的 SGC-7901 细胞制成单细胞悬液，按每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中，贴壁培养 24 h 后，分别加入终浓度为 0.1、0.5、1、2.5、5、10、20、40、60 μg/ml 的表阿霉素，每一浓度设 5 个复孔，以不含药物的细胞作为阴性对照，以空白孔调零。继续培养 24、48、72 h 后，每孔加 MTT 20 μl，4 h 后弃上清液，每孔加二甲基亚砜（DMSO）200 μl，震荡 10 min，490 nm 处测定吸光度值（A 值）。按下列公式计算抑制率：抑制率（%）=（对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值）× 100%。用统计分析软件进行方差分析，按抑制率筛选出对细胞抑制作用较小的 4 组浓度，作为实验浓度，按同样方法筛选出 1 组 ASODN 浓度

1.2.5 MTT 检查 survivin 反义寡核苷酸对表阿霉素的增敏性 该实验分为空白、ASODN、SODN、表阿霉素、表阿霉素联合 ASODN 5 组，每组设 5 个复孔，取对数生长期的细胞制成单细胞悬液，按每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中，贴壁培养 24 h 后，ASODN、SODN 及 ASODN 联合表阿霉素组按 200 nmol/L 进行转染，继续培养 24 h 后，0.5、1、2.5、5 μg/ml 表阿霉素处理实验组细胞，继续培养 12、24、36、48、72 h 后，每孔加 MTT 20 μl，4 h 后弃上清液，每孔加二甲基亚砜（DMSO）200 μl，震荡 10 min，490 nm 处测定吸光度值（A 值）。按下列公式计算抑制率：抑制率（%）=（1- 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值）× 100%，该实验重复 3 次，用统计分析软件进行方差分析，并通过公式 q=Eea/[EA+(1-EA)XES]计算 ASODN 与表阿霉素合用的效果，其中 Eea 为 ASODN 与表阿霉素合用时的增殖抑制率，EA 和 ES 分别为 ASODN 和表阿霉素单用时的增殖抑制率，q=0.85 ~ 1.15 表示两者作用相加，q>1.15 表示两者具有协同作用，q<0.85 表示两者相互拮抗[3]。

1.2.6 Western-blot 法检查各组 survivin 蛋白表达情况 该实验分为空白、ASODN、SODN、表阿霉素、表阿霉素联合 ASODN5 组，200nmol/LASODN 转染 SGC-7901 细胞后，培养 24h，0.1 μg/ml 表阿霉素处理实验组细胞并继续培养 24 h，细胞裂解液裂解细胞，提取蛋白后上样，SDS-PAGE 分离后电转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 1 h，加一抗（兔抗人 survivin，工作浓度为 1:400），4℃孵育过夜，洗膜，37℃孵育二抗 1 h（羊抗兔，工作浓度为 1:800），ECL 化学发光显色。图像存入计算机，Western 条带用 Quantity One 图像分析软件进行吸光度计算，重复测量 3 次后进行方差分析。

1.2.7 流式细胞仪检查细胞周期 取 200 nmol/L ASODN 转染及表阿霉素处理后的实验及空白对照组细胞 PBS 洗涤后，加入 70%冷乙醇固定单细胞悬液 18 h 以上；离心后 PI 染液 4℃染色 30 min，用流式细胞仪进行细胞周期分析，得出细胞各周期的百分率，该实验重复 3 次。

1.2.8 Annexin V-FITC 法检查细胞凋亡情况 取各实验组细胞，消化并 PBS 重悬细胞，取 5~10 万重悬的细胞，1 000 g 离心 5 min，弃上清，加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞，再加入 5 μl Annexin V-FITC 轻混匀并 25℃避光孵育 10 min，孵育完成后 1 000 g 离心 5 min，加入 190 μl Annexin V-FITC 结合液及 10 μl 碘化丙啶染色液，流式细胞仪检测结果。

1.2.9 RT-PCR 法检查 bcl-2 及 SMAC 表达情况 将 SGC7901 细胞分为空白、ASODN、EPI、EPI+ASODN 共 4 组，培养 48 h 时后，按各组实验条件进行预处理，提取细胞总 RNA，调整各组总 RNA 浓度至 400 ng/μl。取 400 ng 总 RNA 逆转录成 cDNA 进行聚合链式反应，设计 bcl-2、SMac（基因库序列号：

NM-138929）β-actin 引物（基因库序列号 NM_001101）序列，bcl-2 引物：正义链 5'-TCACAAATGGACCACGAGA-3，anti 正义链 5'-GAGAAGAGGCGGCAGATC-3'，扩增片段 445 bp；SMac 引物：正义链 5'-GACGATTGGCTTTGGAGT-3'，antisense：5'-CGGATG GACGCACTCCTA-3'，扩增片段 469 bp；β-actin 引物：正义链：5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3'，反义链：5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'，扩增片段 272 bp。SMac 预变性 94℃ 5 min，变性 94℃ 30 s，退火 54.5℃ 30 s，延伸 72℃ 1 min，32 个循环，再延伸 72℃ 10 min；bcl-2 预变性 94℃ 5 min，变性 94℃ 30 s，退火 53℃ 30 s，延伸 72℃ 1 min，30 个循环，再延伸 72℃ 10 min；β-actin 预变性 94℃ 5 min，变性 94℃ 30 s，退火 57℃ 30 s，延伸 72℃ 1 min，35 个循环，再延伸 72℃ 10 min。产物经电泳，结果用凝胶自动成像系统扫描，以每组样本目的基因与 β-actin mRNA 光密度的比值计算相对表达强度（Relative optical density，ROD）。

2 结　果

2.1 转染效率的检测

Lipofectamine 2000 与 ASODN 按 1:2.5 比例稀释转染后，荧光物质均匀进入细胞，荧光显微镜检查转染效率达到 70%以上（图 1）。

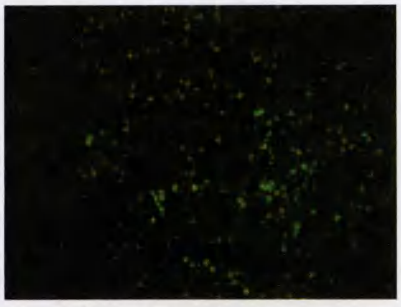


图 1　转染效率，倒置荧光显微镜（×100）

2.2 MTT 法筛选 ASODN 及表阿霉素适宜浓度

作用 48 h 后，低浓度的表阿霉素对 SGC-7901 细胞的生长抑制作用不明显（$P>0.05$），0.5 μg/ml 的表阿霉素即能对 SGC-7901 细胞增殖起到较低的抑制作用（$P<0.05$），强度随表阿霉素浓度增加而增强，当浓度>20 μg/ml 后，其抑制作用达到到一个平台（图 2），故筛选出 0.5、1、2.5、5 μg/ml 4 组作为实验浓度；ASODN 按 100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L、600 nmol/L、800 nmol/L 转染 SGC-7901 细胞后并培养 48 h 后，各浓度均对 SGC-7901 细胞具有一定增殖抑制作用（$P<0.05$），其强度随 ASODN 浓度而增加（图 3），选用 200 nmol/LASODN 作为实验浓度。

2.3 MTT 法检查 2 种因素联合作用后 SGC-7901 细胞抑制率

与空白对照及表阿霉素、ASODN 单独作用组相比，联合作用组细胞抑制率提高，可协同抑制 SGC-7901 细胞的增殖（$q>1.15$），其抑制作用与表阿霉素剂量呈正相关，低至 2 μg/ml 的表阿霉素即可对 SGC-7901 的增殖起到明显抑制作用（图 4）。

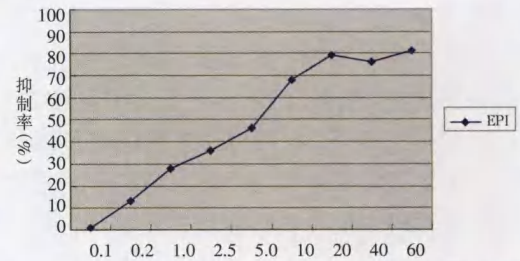


图 2　不同浓度表阿霉素对 SGC-7901 细胞增殖的影响

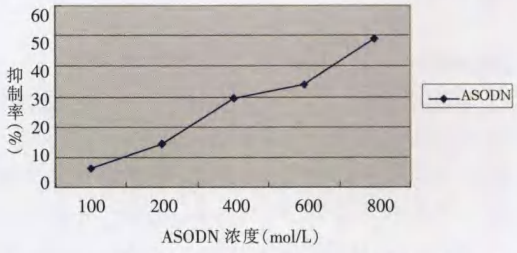


图 3　ASODN 转染后 48 h 对 SGC-7901 细胞增殖的影响

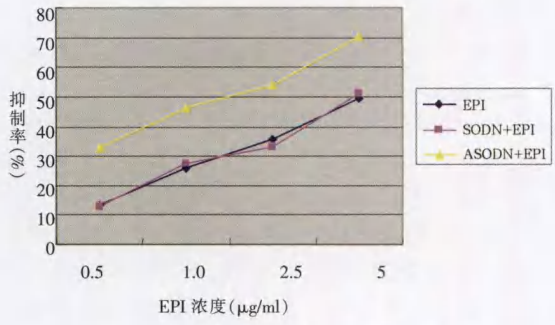


图 4　survivin 反义寡核苷酸与不同浓度表阿霉素联合应用对 SGC-7901 细胞增殖的影响

2.4 Western-blot 法检查各组 survivin 蛋白表达情况

SGC-7901 细胞经转染生存素反义寡核苷酸 48 h 后，survivin 蛋白表达量降低，目的条带颜色变淡（图 6）。Western 条带中阴性对照组、正义核酸组、表阿霉素组、反义核酸组及联合用药组其光密度比值分别为 22.62%±0.51%、21.92%±0.78%、22.44%±0.38%、17.01% ±0.62%、16.23%±0.42%，经反义核酸转染组与对照组相比均表现出统计学意义（$P<0.05$，而正义核酸组及单纯用药组与对照组比较则无显著性差异（$P>0.05$），见图 5。

2.5 流式细胞仪检查细胞周期变化

各实验组（空白对照、SODN、ASODN、EPI、EPI+ASODN）处理后经周期分析，其 G_1 期细胞分别为：



空白　表阿霉素　正义核酸　联合用药　反义核酸

图 5　转染后 survivin 蛋白表达情况

70.29%，69.71%，62.98%，61.41%及 50.42%，G_2/M 期细胞分别为：5.79%，6.21%，13.88%，14.36%，20.28%，采用单因素方差分析统计结果，与空白对照及正义寡核酸组比较，反义核酸、EPI 及联合作用组均出现了 G_1 期细胞数减少，G_2 期细胞数增多），差异有统计学意义（P<0.05），而反义核酸、EPI 分别与联合作用组比较，联合作用组 G_2 期细胞数增加比例明显大于前二组（P<0.01），见表 1。

表 1　反义寡核苷酸、EPI 及联合作用对 SGC-7901 细胞周期的影响（$\bar{x}\pm s$）

分组	G_0/G_1（%）	S（%）	G_2/M（%）
Blank	70.29 ± 1.23	22.83 ± 1.36	5.79 ± 0.63
SODN	69.71 ± 1.71	23.19 ± 1.48	6.21 ± 0.57
ASODN	62.98 ± 1.06	22.04 ± 0.93	13.88 ± 0.17
EPI	61.41 ± 1.00	23.05 ± 1.26	14.36 ± 0.69
Combine	51.42 ± 0.63	24.28 ± 2.85	21.28 ± 0.04

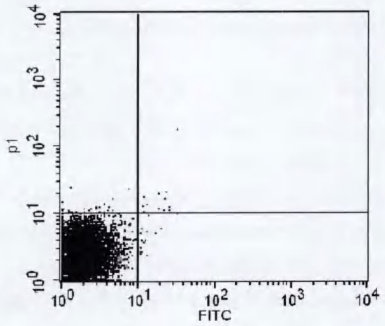


图 6　空白对照组

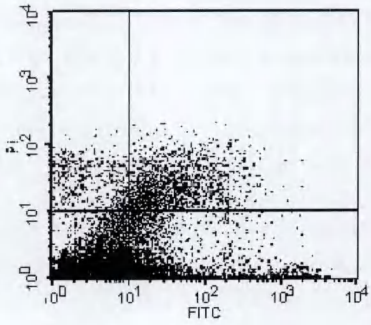


图 8　单纯表阿霉素组

2.6　Annexin V-FITC 法检查细胞凋亡情况

空白对照、转染组、表阿霉素组、联合作用组凋亡率分别为：0.09%，7.42%，15.26%，34.15%，联合作用组凋亡率较其他各组明显提高（P<0.05），见图 6~9。

2.7　生存素反义核酸与表阿霉素联合作用对 bcl-2 和 SMac 的影响

采用单因素方差分析，RT-PCR 扩增产物结果显示，联合作用组、反义核酸组、表阿霉素组及空白对照组光密度比值分别为：SMac：18.35%±1.23%、17.98%±0.44%、7.26%±0.35%、7.81%±0.47%，其中联合用药组及反义核酸组与空白组及表阿霉素组比较，差异有统计学意义（P<0.05）。bcl-2：19.71%±0.74%、20.23%±1.18%、25.85%±0.66%、26.49%±0.93%，其中联合用药组及表阿霉素组与空白对照组比较，差异有显著性意义（P<0.05），但联合用药组与表阿霉素组比较，差异无统计学意义（P>0.05），见图 10、11。

3　讨　论

现行消化道恶性肿瘤治疗方式以手术联合术后化疗为主，其中表阿霉素为其中重要组分，但表阿霉素的体外抗肿瘤作用并不十分令人满意，且静脉使用大剂量的表阿霉素可导致浅表静脉炎，Survivin 是一种凋亡抑制蛋白，在绝大多数分化成熟的组织中无表达，而表达于大多数肿瘤组织中[4]，这种组织分布使得特异性抑制 survivin 的表达不会影响

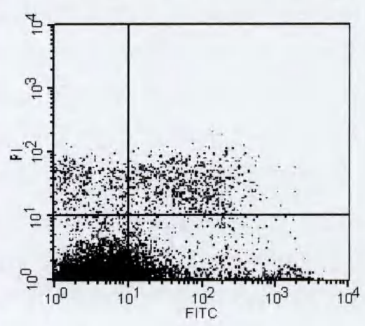


图 7　单纯转染组

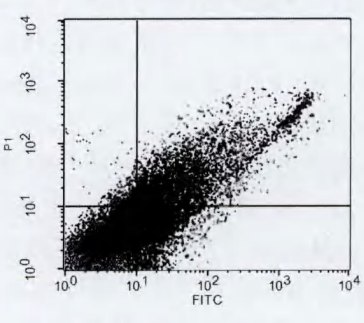


图 9　联合作用组

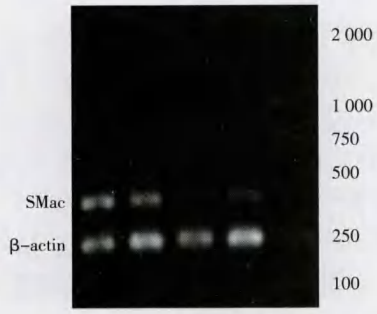


图 10 线粒体促凋亡蛋白

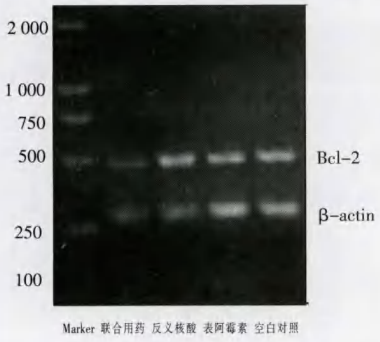


图 11 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白（bcl-2）

其他组织的正常生理机能[5]，有研究证实，survivin在实体瘤中的高表达预示着 5 年生存率下降，复发率高[6]，Zaffaroni N 等[7]的研究证实，经相同的化疗过程后，survivin 表达阴性的患者临床症状及病理表现缓解率均高于 survivin 表达阳性的患者。

传统理论认为表阿霉素通过调节 P53、bcl-2 等发挥作用，本研究也证实了表阿霉素对 bcl-2 的作用，但与单独应用表阿霉素组相比较，封闭了 survivin基因的反义寡核酸组 bcl-2 表达水平并无明显差异，故其对表阿霉素的增敏作用可能并不是籍由传统途径实现的。SMac 是 2000 年在线粒体中发现的一种蛋白，是重要的促凋亡因子，其作用机制尚不清楚，可能是通过解除 IAPS 的凋亡抑制作用[8]和通过非依赖 bcl-2、CYT-C 的途径调节如 caspases3 等[9]实现的，而表阿霉素对肿瘤的生长抑制及促凋亡作用可能也与 caspases3 有关[10]，根据 RT-PCR 检测的结果，在胃癌 SGC-7901 细胞中，SMac 表达较低，封闭 survivin 基因后，SMac 表达上调，有研究证实[11]转染 SMac 后能增强化疗药物的诱导凋亡作用，因此我们推测，封闭 survivin 基因后对表阿霉素的增敏作用可能是通过对 SMac 的调节实现的，其可能机制如下：肿瘤细胞在接受小剂量表阿霉素凋亡信号刺激后，激活 IAPS 系统产生拮抗作用，导致药物诱导的凋亡刺激作用降低，转染反义核酸封闭生存素基因后，直接解除了 IAPS 对肿瘤细胞的凋亡抑制作用，同时刺激了线粒体释放 SMac，进一步解除了因药物刺激引起的凋亡抑制作用，而使药物对肿瘤细胞的抑制作用增加，本实验中 MTT 筛选证实了低浓度转染条件下，封闭生存素基因对细胞造成的促凋亡作用并不明显，故这种增敏效果可能由 SMac 水平升高引起，其具体分子机制尚需进一步实验证实。

总的来说，本研究结果证实了采用反义寡核苷酸技术封闭生存素基因后，胃癌 SGC-7901 细胞对表阿霉素的敏感性有较大增强，这种作用可能是通过藉由上调 SMac 水平实现的，故本研究结果不仅有助于降低化疗药物使用剂量，同时也为难治性或复发性胃癌的化疗方案提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] 涂正生，彭小娟，刑 军，等.SGC7901 细胞对化疗药物的敏感性研究[J]. 江西医学院学报，2007，47(1)：355-357.

[2] Chandele A，Prasad V，Jagtap J C，et al. Upregulation of Survivin in G_2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis[J]. Neoplasia，2004，6(1)：29-40.

[3] 吴裕丹，陈 燕，陈文娟，等.INF 对姜黄素抑制 HL-60 细胞增殖的影响[J]. 癌症，1999，18(6)：635-638.

[4] Altieri D C.Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer[J].Prog Cell Cycle Res，2003，5：447-452.

[5] Mahotka C，Wenzel M，Springer E，et al. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B：two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties[J]. Cancer Res，1999，59(24)：6097-6102.

[6] Cohen C，Lohmann C M，Cotsonis G，et al. Survivin expression in ovarian carcinoma：correlation with apoptotic markers and prognosis[J]. Mod Pathol，2003，16(6)：574-583.

[7] Zaffaroni N，Daidone M G. Survivin expression and resistance to anticancer treatments：perspectives for new therapeutic interventions[J]. Drug Resist Updat，2002，5(2)：65.

[8] Verhagen A M，Ekert P G，Pakusch M，et al. Identification of DIABLO，A mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. Cell，2000，102(1)：43-53.

[9] Kashkar H，Haefs C. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma derived B cells[J]. J Exp Med，2003，198(2)：341-347.

[10] Bafaloukos D，Bozas G，Kalofonos H，et al. Paclitaxel，epirubicin，and carboplatin in advanced or recurrent endometrial carcinoma：A Hellenic Cooperative Oncology Group（HeCOG）study[J]. Gynecol Oncol，2008，110(1)：87-92.

[11] Fulda S，Wick W，Weller M，et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL-or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo[J]. Nat Med，2002，8(8)：808-815.

（责任编辑：冉明会）