维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0041-04

survivin 反义寡核苷酸对 K562 细胞增殖的抑制作用

温贤浩,徐酉华

(重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

【摘 要】目的:采用反义寡核苷酸技术研究凋亡抑制基因 survivin 对白血病细胞增殖的影响。方法:1.细胞抑制率实验分 5 组:111nmol/L 反义寡核苷酸组、333nmol/L 反义寡核苷酸组、555nmol/L 反义寡核苷酸组、777nmol/L 反义寡核苷酸组、空白组。转染后 24、48、72h 收集细胞进行检测:用台盼蓝染色进行活细胞计数,计算细胞抑制率。2.细胞周期及 survivin 蛋白表达实验分 4 组:555 nmol/L 寡核苷酸组、544nmol/L 无义组、脂质体组、空白组,转染后 24、48h 流式细胞仪检测细胞周期;免疫组织化学方法检测 survivin 蛋白水平。结果:不同浓度的反义寡核苷酸对 K562 细胞的细胞抑制率均高于空白组($P<0.05$),并随反义寡核苷酸的浓度增大抑制率增加;随作用时间延长,抑制作用越明显,抑制率与浓度及时间呈正相关;555nmol/L 反义寡核苷酸作用后,K562细胞被阻滞在 G_0/G_1 期,细胞周期进程受到明显阻滞,而无义、脂质体、空白组细胞周期进程无明显变化($P<0.05$);反义寡核苷酸作用 48h 后 survivin 蛋白表达水平明显降低,与各对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。结论:survivin 反义寡核苷酸能抑制 K562 细胞的增殖。

【关键词】K562 细胞;反义寡核苷酸;细胞增殖;survivin

【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-29

Inhibition of antisense oligonucleotide targeting survivin on the proliferation of K562 cells

WEN Xian-hao, et al

(*Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of survivin, an inhibitor of apoptosis, on the proliferation of leukemic cell by antisense oligonucleotide (ASON) technique. *Methods*: 1.K562 cells were divided into 5 groups for cell inhibition rate experiment, 111nmol/L ASON group, 333nmol/L ASON group, 555nmol/L ASON group, 777nmol/L ASON group and the blank control group. At 24h, 48h and 72h after transfection cells were collected to be stained by tapan-blue, and than the number of live cells and the rate of inhibition were counted. 2.K562 cells were divided into 4 groups for the cell cycle and survivin protein expression, 555nmol/L ASON group, 544nmol/L NSON group, lipofectin group and the blank control group. At 24h, 48h after transfection, the cell cycle progression was detected by flow cytometry, and the expression of survivin was examined by immunohistochemistry. *Results*: The rate of inhibition in ASON groups with different concentration was significantly higher than that of the control group, and the rate of inhibition was positively related to concentration of ASON and time of transfection. In 555nmol/L ASON group, the cell number in G_0/G_1 phase increased , and the cell cycle progression was inhibited significantly; while cell cycle progression in NSON group, lipofectin group and the control group had no significant change ($P<0.05$). After transfection for 48h, the protein level of survivin in ASON group decreased significantly compared to the other groups ($P<0.05$). *Conclusions*: ASON targeting survivin can inhibit proliferation of K562 cells.

【Key words】K562 cells; Antisense oligonucleotide; Cell proliferation; Survivin

Survivin 是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员[1],选择性表达于常见的恶性肿瘤(如乳腺癌、结直肠癌、白血病等)及胚胎组织,而在正常分化成熟的组织中无表达。Mori 等研究发现 survivin 与造血细胞的分化及白血病的发生、预后有关[2]。survivin 能促进细胞增殖及转化、抑制细胞凋亡,也参与白血病的耐药[3-5]。前期研究发现 survivin 反义寡核苷酸与白血病细胞 K562的分化有关[6]。本研究以人白血病细胞株 K562 为研究对象,利用

作者介绍:温贤浩(1974-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:儿童白血病。

通讯作者:徐酉华,女,教授,E-mail:xuyouhua@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

反义寡核苷酸(Antisense oligonucleuotide,ASON)技术研究 survivin 与 K562细胞增殖的关系,进一步研究 survivin 的功能,为 survivin 基因的靶向治疗提供实验室依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

脂质体 Lipofectamine™ 购自 invitrogen 公司;山羊抗人 survivin 多克隆抗体(sc-8807)购自 Santa Cruz 公司;SABC 试剂盒购自武汉博士德公司;RPMI1640 购自 hyclone 公司;ASON 序列为 5'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3',两端各 5 个碱基硫代磷酸化修饰,无义寡核苷酸(Nonsense oligonucleotide,NSON),序列为 5'-GCCATGGCTACCTTAGCGTT-3',两端各 5 个碱基硫代磷酸化修饰,均由上海生工生物工程公司合成。

1.2 细胞培养

K562(购自重庆医科大学附属第二医院肝病研究所)细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 中,于 37℃,5%CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 细胞分组及转染

1.3.1 细胞抑制率 实验分为 5 组:111nmol/L 反义寡核苷酸组(反义组)、333nmol/L 反义组、555nmol/L 反义组、777nmol/L 反义组、空白对照组(空白组)。

转染:取对数生长期的 K562细胞,接种于 24 孔板(每孔细胞数为 1×10^5 个),在脂质体介导下进行寡核苷酸的转染(操作见试剂盒说明书)。空白组加相同量的细胞及培养液,未加脂质体及寡核苷酸。

1.3.2 细胞周期及 survivin 表达 实验分为 4 组:555nmol/L 反义组、544nmol/L 无义寡核苷酸组(无义组)、脂质体组、空白组。

转染:取对数生长期的 K562细胞,接种于 6 孔板(每孔细胞数为 3×10^5),在脂质体介导下进行寡核苷酸的转染(操作见试剂盒说明书)。脂质体组加相同量的细胞、培养液及脂质体,未加寡核苷酸;空白组加相同量的细胞及培养液,未加脂质体及寡核苷酸。

1.4 活细胞计数及细胞抑制率

台盼蓝染色计数活细胞并计算细胞抑制率、绘制细胞生长曲线。

$$细胞抑制率(\%)=\frac{空白组活细胞数-反义组活细胞数}{空白组活细胞数}\times100\%$$

1.5 细胞周期的检测

收集转染后 24、48h 的 K562细胞,用 4℃预冷 75%乙醇 1ml 重悬浮细胞,离心弃去酒精,加 RNA 酶消化 30min 后加染色剂(PI,Triton-x-100),反应 30min,上流式细胞仪检测。

1.6 survivin 蛋白表达的检测

采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法进行免疫组织化学染色(具体步骤见试剂盒说明书)。PBS 作阴性对照。

阳性结果的判断(采用染色强度及阳性细胞数进行评分)[7]:染色强度分 4 级:阴性(0 分)、淡黄色(1 分)、黄色(2 分)、棕黄色(3 分);阳性细胞数分 5 级:<5%(0 分)、6%~25%(1 分)、26%~50%(2 分)、51%~75%(3 分)、>75%(4 分);随机计数 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,计算阳性细胞率。两者的乘积作为最终的结果判断:0 分(-)、1~4 分(+)、5~8 分(++)、9~12 分(+++)。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析及秩和检验(Kruskal-Wallis Test)。

2 结 果

2.1 活细胞计数

24h:555、777nmol/L 组与空白组比较均有显著性差异,$P<0.05$;但此 2 组两两比较无显著性差异,$P>0.05$;48、72h:333、555、777nmol/L 组与空白组比较均有显著性差异,$P<0.05$;333nmol/L 组与 555、777nmol/L 组两两比较有显著性差异,$P<0.05$;555、777nmol/L 组两两比较无显著性差异,$P>0.05$。

2.2 细胞抑制率

24h:333、555、777nmol/L 组与空白组比较均有显著性差异,$P<0.05$;333nmol/L 组与 555、777nmol/L

表 1 不同浓度反义寡核苷酸转染后活细胞计数($\times10^5$)

组别	0h	24h	48h	72h
反义组(111nmol/L)	1.00±0.00	2.24±0.33	3.40±0.37	6.14±0.32
反义组(333nmol/L)	1.00± 0.00	2.09±0.27	2.61±0.41*	3.89±0.47*
反义组(555nmol/L)	1.00±0.00	1.73±0.47*	2.02±0.22*	2.70±0.32*
反义组(777nmol/L)	1.00±0.00	1.52±0.31*	1.80±0.29*	2.55±0.36*
空白组	1.00±0.00	2.30±0.19	3.78±0.59	6.60±0.51

*:各时期分别与空白组比较,$P<0.05$,有统计学意义

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 不同浓度反义寡核苷酸转染 k562 细胞后细胞抑制率(%)

组别	0h	24h	48h	72h
反义组 (111nmol/L)	0.00 ± 0.00	2.96 ± 0.89	7.74 ± 2.96*	10.05 ± 2.16*
反义组 (333nmol/L)	0.00 ± 0.00	10.41 ± 2.40*	27.10 ± 5.77*	37.34 ± 3.20*
反义组 (555nmol/L)	0.00 ± 0.00	22.85 ± 5.66*	41.40 ± 3.27*	54.39 ± 4.11*
反义组 (777nmol/L)	0.00 ± 0.00	26.39 ± 2.98*	45.80 ± 2.30*	56.27 ± 6.80*
空白组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

*:各时期分别与空白组比较,$P<0.05$,有统计学意义

表 3 k562 细胞各期分布比例(%)

组别	24h			48h		
	G_0/G_1	G_2/M	S	G_0/G_1	G_2/M	S
反义组	37.28 ± 1.31*	16.25 ± 1.05*	44.87 ± 1.93*	45.42 ± 2.14*	10.88 ± 0.93*	40.36 ± 0.76*
无义组	32.62 ± 1.26	18.92 ± 1.49	49.02 ± 2.40	34.48 ± 1.61	18.69 ± 0.86	50.09 ± 1.32
脂质体组	33.74 ± 1.16	18.57 ± 1.24	51.59 ± 1.45	32.11 ± 1.27	19.22 ± 0.67	49.53 ± 1.14
空白组	31.96 ± 1.70	20.41 ± 0.97	51.01 ± 1.79	33.36 ± 2.31	19.42 ± 0.95	50.16 ± 0.87

*:与其它各组比较(各期分别比较),$P<0.05$,有统计学意义

表 4 survivin 蛋白表达结果

组别	24h				48h			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
反义组	0	4	12	4	2	9	7	2*
无义组	0	3	9	8	1	2	8	9
脂质体组	0	2	10	8	0	3	8	9
空白组	0	3	7	10	0	2	9	9

*:与其它各组比较,$P<0.05$,有统计学意义

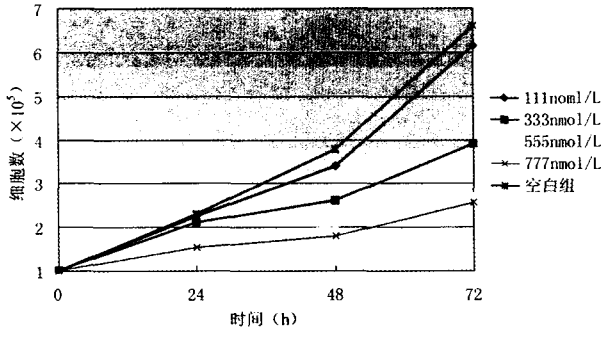


图 1 不同浓度反义寡核苷酸转染后细胞生长曲线

组两两比较有显著性差异,$P<0.05$;48、72h:111、333、555、777nmol/L 组与空白组比较均有显著性差异,$P<0.05$;111、333nmol/L 组分别与 555、777nmol/L 组两两比较有显著性差异,$P<0.05$;555、777nmol/L 组两两比较无显著性差异,$P>0.05$。

由此可见,不同浓度的反义寡核苷酸对 K562细胞的增殖都有不同程度的抑制,并随作用时间的延长、寡核苷酸浓度增加抑制作用越明显。

2.3 细胞周期

转染后 24h 即可见反义组 K562细胞被阻滞于细胞周期的 G_0/G_1 期,G_0/G_1 期细胞增加,与其它各对照组比较有显著性差异,$P<0.05$,而 S 期及 G_2/M 期细胞减少,与其它各对照组比较有显著性差异,

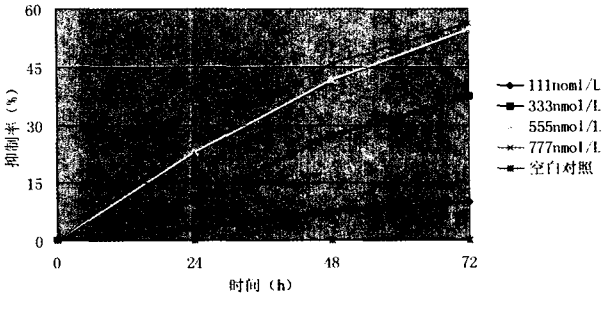
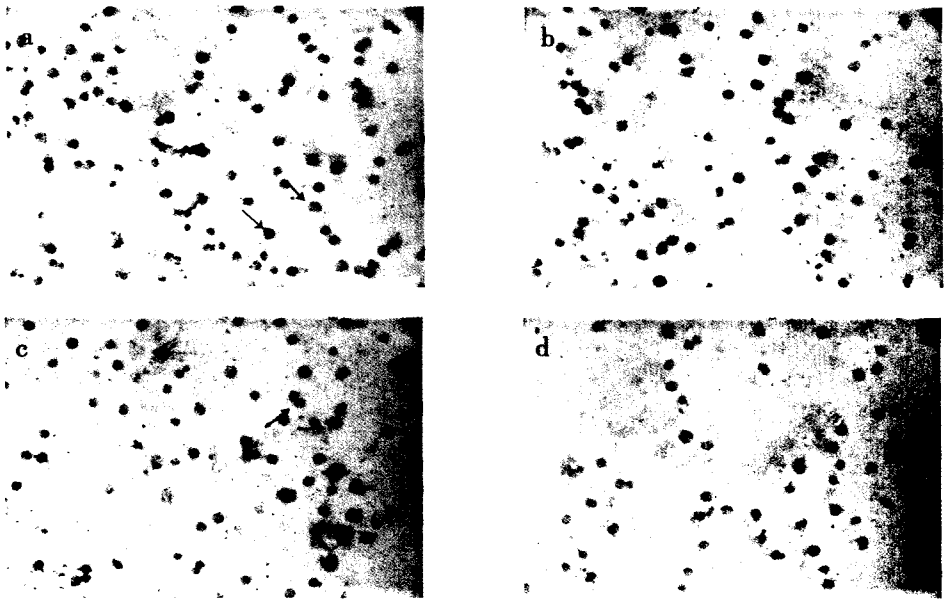


图 2 不同浓度反义寡核苷酸转染后细胞抑制率

维普资讯 http://www.cqvip.com



a.无义组(24h);b.无义组(48h);c.反义组(24h);d.反义组(48h)　　阳性细胞:胞核着色(↑),胞浆着色(↑)

图 3　survivin 蛋白表达(SABC 法,×200)

$P<0.05$;转染后 48h 上述变化更明显,$P<0.05$。无义组、脂质体组、空白对照组之间两两比较均无显著性差异,$P>0.05$。

2.4　K562 细胞 survivin 蛋白水平

survivin 表达在 K562细胞的胞浆及胞核都有表达;阳性细胞可见胞浆或胞核被染成棕黄色。24h 反义组 survivin 蛋白表达降低,但与其它各组比较无显著性差异,$P>0.05$;48h 反义组 survivin 蛋白表达进一步降低,与其它各组比较有显著性差异,$P<0.05$。

3　讨　论

凋亡抑制基因 survivin,是 IAP 家族成员[1],定位于 17q25,全长 15kb,含 4 个外显子和 3 个内含子。survivin 与 IAP 家族的其它成员一样,也有杆状病毒重复结构(Baculovirus IAP repeat,BIR),BIR 是 survivin 发挥抗凋亡作用必需的结构。Moriai 等[8]研究发现,在 12 种造血系统恶性肿瘤细胞中均能检测到 survivin mRNA 的表达,在正常白细胞中没有检测到 survivin mRNA 的表达。survivin 具有促进细胞增殖和转化,抑制细胞凋亡的作用。反义 survivin转染肿瘤细胞后能抑制细胞的增殖,促进细胞凋亡[9]。

实验参照 Olie 等的研究设计并合成 survivin 反义寡核苷酸,转染人白血病细胞 K562。研究发现经脂质体介导转染不同浓度的 survivin 反义寡核苷酸后,K562细胞的增殖会发生不同程度的抑制,在转染反义寡核苷酸后 24h,K562细胞的抑制率 (除 111nmol/L 组外)均明显高于对照组,并随转染的反义寡核苷酸的浓度增加细胞抑制率也增加;随转染时间延长,细胞抑制也明显,可见细胞抑制率与反义寡核苷酸的浓度及作用时间呈正相关。

survivin 的表达具有细胞周期的特异性[10],其抗凋亡作用依赖于细胞周期的 G_2/M 期的校正点。研究表明,pEGFP-C1- 反义 survivin 重组质粒转染 MKN-45 低分化胃癌细胞株后,细胞凋亡明显增加,G_2/M 期细胞减少,同时 survivin 基因在 mRNA 水平被抑制。表明反义 survivin 核酸能抑制细胞增殖,减少 survivin 基因的 mRNA 表达而促进胃癌细胞凋亡[11]。本实验用 555nmol/L 反义 survivin 寡核苷酸转染 K562细胞后,K562细胞被阻滞在 G_0/G_1 期,而各对照组细胞周期进程没有明显改变。

白血病是造血细胞增殖失控、分化受阻、凋亡受抑所致的恶性肿瘤。研究已经证实,survivin 反义寡核苷酸能抑制 K562细胞的增殖,故 survivin 反义寡核苷酸有望成为白血病基因治疗的手段之一。

(下转第 48 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

抑制活性的关系时发现:OSCs 能阻滞人类白血病细胞于 G_2/M 期,并于此期发生凋亡。Sigounas 等[4]研究成熟大蒜提取物中的有机硫化物对红白血病细胞系 HEL 和 OCIM-1 的抗增生作用中,发现其能有效地抑制 HEL 和 OCIM-1 细胞增生,并诱导凋亡。Sengupta 等[5]研究了大蒜素能抑制鼠结肠肿瘤增生并诱导凋亡。Gunadharin 等[6]发现大蒜素能诱导人前列腺癌 LNCaP 细胞的凋亡,并且呈剂量依赖关系。本研究采用 TUNEL 法检测膀胱癌细胞凋亡情况,结果发现顺铂组、不同浓度大蒜素组、顺铂 + 大蒜素组与生理盐水组相比,凋亡细胞数均明显多于生理盐水组;随大蒜素浓度的增加凋亡细胞数增多;而且,顺铂 + 大蒜素组同顺铂组、不同浓度大蒜素组相比,凋亡作用更明显。

顺铂是膀胱癌重要的化疗药物之一,目前,研究发现以顺铂为基础的联合新辅助化疗能够明显的延长膀胱癌患者的总体生存时间。但是,顺铂的毒副作用大大限制了它在临床上的应用。本研究观察到,大蒜素组、顺铂 + 大蒜素组荷瘤大鼠给药后不仅能够明显抑制膀胱肿瘤生长,而且荷瘤大鼠表现为食欲良好、活动正常、皮毛有光泽;而顺铂组虽然膀胱肿瘤生长也明显受到抑制,但大鼠却表现出食欲减退、活动迟缓、毛色晦暗,体重明显下降,与其他各组比较差异显著。有学者研究发现,大蒜素有对化疗药物的增敏作用[7]。本研究结果证实,大蒜素联合顺铂治疗膀胱肿瘤,不但增强了抗肿瘤作用,而且一定程度避免了顺铂的毒副作用,此两种药物的组合,有望成为一种新的膀胱肿瘤治疗方法。

参 考 文 献

[1] Gebhardt R. Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes[J]. Lipids, 1993; 28(7): 613-619.

[2] 刘红耀,李晓东,米振国,等.N- 甲基亚硝基脲的制备及其诱导膀胱肿瘤的作用[J]. 中华实验外科杂志,2000;17(6):548-549.

[3] Wong W W, Macdonald S, Langler RF, et al. Novel synthetic organosulfur compounds induce apoptosis of human leukemic cells[J]. Anticancer Res, 2000; 20(3A): 1 367-1 374.

[4] Sigounas G, Hooker JL, Li W, et al. S-allylmercaptocysteine, a stable thioallyl compound, induces apoptosis in erythroleukemia cell lines[J]. Nutr Cancer, 1997; 28(2): 153-159.

[5] Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S, et al. Indian food ingredients and cancer prevention -an experimental evaluation of anticarcinogenic effects of garlic in rat colon [J]. Asian Pac Cancer Prev, 2004; 5(2): 126-132.

[6] Gunadharin DN, Arunkumar A, Krishnamoorthy G, et al. Antiproliferative effect of diallyl disulfide (DADS) on prostate cancer cell line LNCaP[J]. Cell Biochem Funct, 2006; 24(5): 407-412.

[7] 陆婉琴,金杏泉,徐静芳.大蒜素对抗癌药物作用的初步研究[J]. 肿瘤,1992;12(3):113-115.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 44 页)

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in ca:cer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997; 3(8): 917-921.

[2] Mori A, Wada H, Nishimura Y, et al. Expression of the apoptosis gene survivin in human leukemia[J]. Int J Hematol, 2002; 75(2): 161-165.

[3] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2002; 86(6): 886-892.

[4] 朱红霞,刘 爽,周翠琦,等.抗凋亡基因 survivin 促进细胞转化的作用机制[J]. 中华医学杂志,2002;82(5):338-340.

[5] 刘筱梅,徐西华,于 洁,等.儿童急性白血病 survivin, bcl-2, mdr1 的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(2):215-218.

[6] 温贤浩,徐西华.survivin 反义寡核苷酸对 K562细胞诱导分化的研究[J].中华儿科杂志,2005;43(4):279-283.

[7] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998; 58(22): 5071.

[8] Moriai R, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells[J]. Anticancer Res, 2001; 21(1B): 595-600.

[9] Olie RA, Simoes-Wust P, 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): 2 805-2 809.

[10] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998; 396(6 771): 580-584.

[11] 邹 冰,涂水平,谭继宏,等. pEGFP-C1- 反义生存素重组质粒的构建和转染[J]. 中华消化杂志,2002;22(12):711-714.

(责任编辑:冉明会)