维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)08-0835-04

HTR 反义寡核苷酸抑制鼻咽癌细胞生长及对其致瘤能力的影响

曹 前,骆文龙,吴家廉

(重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究针对端粒酶 RNA(Human telomerase RNA,HTR)的反义寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN)抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞株生长及对其致瘤能力的影响。方法:PCR-ELISA 法检测细胞内端粒酶活性。MTT 法及平板集落形成实验评价细胞增殖活性。电镜观察细胞超微结构的改变。将经 AS-ODN 处理的 HNE-1 细胞接种于裸鼠皮下,观察其致瘤情况。结果:HTR 反义寡核苷酸作用 HNE-1 细胞后,细胞端粒酶活性受到明显抑制;细胞增殖受到明显抑制,此作用有剂量、时间依赖性和序列特异性;电镜发现少量细胞肿胀坏死,但未见细胞凋亡和大片坏死灶。AS-ODN 降低了 HNE-1 细胞的致瘤能力,裸鼠成瘤时间延长,肿瘤生长速度变慢。结论:HTR 反义寡核苷酸可通过抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞端粒酶活性而抑制细胞的生长,并抑制其对裸鼠的致瘤能力。

【关键词】鼻咽癌;反义寡核苷酸;端粒酶 RNA;裸鼠

【中国图书分类法分类号】R739.63 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-16

Growth inhibition of nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cell strain and effect on its tumorigenic ability by antisense oligodeoxynucleotide targeting telomerase RNA

CAO Qian, et al

(*Department of Otorhinolaryngology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the growth inhibition of nasopharyngeal carcinoma cell strain and effect on its tumorigenic ability by AS-ODN targeting telomerase RNA. *Methods*: Telomerase activity was analysed by PCR-ELISA technique. Proliferation of HNE-1 cells was examined by MTT test and clone formation test. Ultrastructure changes were examined by electron microscope. AS-ODN treated HNE-1 cells were implanted subcutaneously into nude mice to observe tumor growths. *Results*: When HNE-1 cells were incubated with the AS-ODN targeting telomerase RNA, telomerase activities of HNE-1 cells were significantly inhibited; proliferation of HNE-1 cells was significantly inhibited, which showed a dose-dependent and time-dependent correlation and was sequential specific; swelling or necrosis was found in a small proportion of HNE-1 cells by electron microscopy but no apoptosis and large necrosis area could be found. AS-ODN reduced the tumorigenic ability of HNE-1 cell strain. The tumor formation time was prolonged and tumor growth was slowed down. *Conclusion*: Through inhibiting the telomerase activity of HNE-1 cell strain, the AS-ODN targeting telomerase RNA can inhibit its growth and reduce its tumorigenic ability.

【Key Words】 Nasopharyngeal carcinoma; Antisense oligodeoxynucleotide; Human telomerase RNA; Nude mice

端粒酶是一种 RNA 依赖的 DNA 聚合酶,具有反转录活性,能以自身 RNA 为模板合成端粒结构,并将其添加至染色体末端,以补偿因有丝分裂所致的端粒的丢失,使细胞得以永生。端粒酶在绝大多数恶性肿瘤组织、永生细胞系和生殖细胞中呈阳性,而在绝大多数正常体细胞和良性肿瘤为阴性,对于保持细胞分裂增殖的能力有明显作用[1,2]。本研究用反义寡核苷酸抑制鼻咽癌细胞端粒酶活测对其生长及致瘤能力的影响,为鼻咽癌的基因治疗提供新思路。

作者介绍:曹 前 (1971-) 男,硕士,主治医师,主要研究方向:头颈肿瘤方面的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 细 胞

HNE-1 细胞购自湖南医科大学湘雅医院。

1.2 主要试剂

端粒酶检测试剂盒(Roche 公司)寡核苷酸(上海生工,全硫代型。反义寡核苷酸序列为 5'-$(TTAGGG)_3$-3',正义寡核苷酸(S-ODN)序列为 5'-$(CCCTAA)_3$-3'。)

1.3 裸 鼠

4~6 周龄 BALB/c(nu/nu)裸小鼠,体重 17~19g。雌性,购于第三军医大学野战外科研究所实验动物中心,饲养于 SPF 级无菌饲养室。自由摄取食物和水。

1.4 端粒酶活性分析采用 PCR-ELISA 测定原理

端粒酶自带模板将端粒重复片段(TTAGGG)加到生物素标记人工合成的 P1-TS 引物的 3' 端,经 PCR 反复扩增 P1-TS 和 P2 引物间的特异产物,产生含有端粒特异的六核苷酸重复序列的 PCR 产物。将 PCR 产物变性后与地高辛标记并对端粒重复片段特异的探针杂交,杂交产物通过生物素标记的引物固定在抗生素蛋白包被的微孔板上,之后用与过氧化物酶结合的抗地高辛抗体检测到固定的 PCR 产物。最后加入过氧化物酶的反应底物 TMB 便可产生着色反应产物。

1.5 MTT 试验

浓度依赖实验:寡核苷酸终浓度分别为(0、1.25、2.5、5、10、20、40μmol/L),培养 2 天。时间依赖实验:寡核苷酸终浓度为 20μmol/L,分别培养 1、2、3 天。培养时,每 24h 重复加入相应寡核苷酸 1 次,每 48h 更换培养液 1 次。

1.6 平板集落形成实验

寡核苷酸终浓度为 5μmol/L。接种细胞数为 200 个/皿,培养 3 周。在肉眼下计数细胞形成的集落数,对难于判断者,在镜下数其细胞数,计数细胞数>50 的细胞集落。计算集落形成率$=\frac{\text{计数细胞集落数}}{200}\times 100\%$。

1.7 形态学观察

收集用 20μmol/L 反义、正义寡核苷酸作用 2 天后的细胞、经戊二醛固定,电镜观察细胞结构改变。

1.8 处 理

9 只裸鼠分为 3 组,分别接种 HNE-1 细胞、经 20μmol/L AS-ODN 处理 2 天的细胞、经 20μmol/L S-ODN 处理 2 天的细胞于每只裸鼠背部近右下肢皮下接种 2×10^6 个细胞。接种后,每天测量皮下节结的长、短径,按公式 $V=1/2ab^2$ (a= 长径 b= 短径)计算肿瘤近似体积,以皮下节结体积 >0.5cm^3 为成瘤标准。

1.9 统计方法

连续性变量用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较用 t 检验。多组间比较用方差分析。

2 结 果

2.1 端粒酶活性测定

AS-ODN 可明显抑制 HNE-1 细胞的端粒酶活性,此作用随浓度增加而加强,S-ODN 无此作用,说明该作用有序列特异性(表 1)。

表 1 端粒酶活性测定结果

组别	1d	3d
对照组	2.745±0.115	2.272±0.212
5μmol/L S-ODN	2.570±0.095	2.351±0.218
5μmol/L AS-ODN	1.842±0.131[ab]	1.712±0.278[ab]
20μmol/L S-ODN	2.627±0.138	2.289±0.185
20μmol/L AS-ODN	1.055±0.096[ab]	0.954±0.125[ab]
阳性对照	2.840±0.193	
阴性对照	0.444±0.089	

a:与对照组比 $P<0.01$

b:与同浓度同一时间正义寡核苷酸组比 $P<0.01$

2.2 MTT 实验结果

AS-ODN 及 S-ODN 均表现出对 HNE-1 细胞增殖的抑制作用,但 AS-ODN 的抑制率明显较 S-ODN 大($P<0.01$),表现出序列特异性。且 AS-ODN 对 HNE-1 细胞增殖的抑制作用表现出时间、剂量依赖性(图 1、2)。

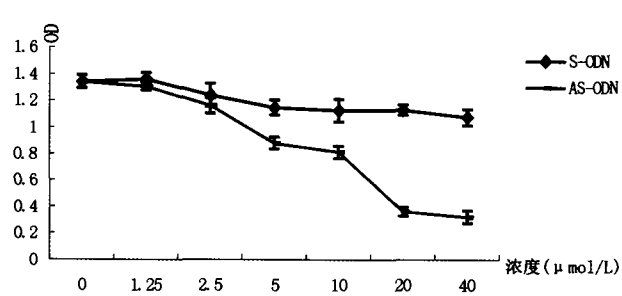


图 1 浓度依赖曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

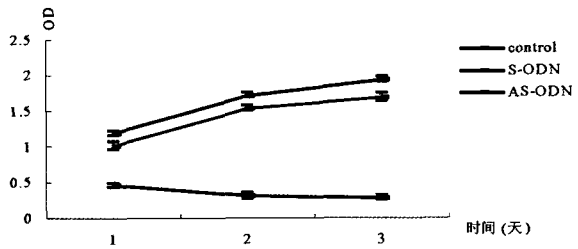


图 2 时间依赖曲线

2.3 集落形成实验结果

AS-ODN 和 S-ODN 均对 HNE-1 细胞集落形成能力有抑制作用，但 AS-ODN 抑制率明显较 S-ODN 大($P<0.01$)，表现出序列特异性(表 2)。

表 2 5μmol/L 寡核苷酸作用对 HNE-1 细胞集落形成的影响

组 别	集落形成率(%)	抑制率(%)
对照组	79.6 ± 3.8	2.272±0.212
S-ODN	61.0 ± 4.1[a]	23.37
AS-ODN	17.2 ± 8.7[ab]	78.39

a:与对照组比 $P<0.05$ b:与 S-ODN 组比 $P<0.01$

2.4 透射电镜结果

对照组、正义寡核苷酸组细胞核大，核仁明显，有较多的核分裂相，胞浆内细胞器丰富。反义寡核苷酸组细胞内脂滴较多，出现髓样结构，细胞核内染色质边集，可见散在的细胞坏死及局灶的坏死区域，其内见脂滴、线粒体肿胀、空泡化及核物质，未见细胞凋亡和大片坏死灶(图 3、4)。



图 3 对照组鼻咽癌细胞核分裂相(×4000)

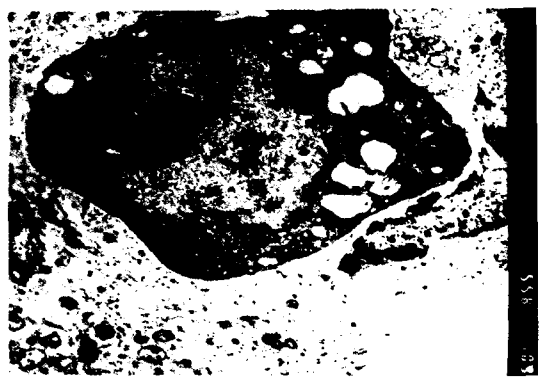


图 4 鼻咽癌细胞经 20μmol/L AS-ODN 处理 2d 细胞质内脂滴增多，出现髓样结构，细胞核内染色质边集(×6000)

2.5 裸鼠移植瘤的生长情况

对照组、S-ODN 组、AS-ODN 组的平均成瘤时间分别为 5.2 天、7.1 天、12.6 天，三者相比有显著性差异($P<0.01$)。各组皮下移植瘤的体积随时间变化而不同。皮下接种 AS-ODN 处理的癌细胞后，最早成瘤时间为 10 天，最迟延长到 15 天，且肿瘤生长缓慢。

表 3 裸鼠皮下种植瘤体积的变化情况(cm^3)

组别	5 天	10 天	15 天	20 天
对照组	0.51 ± 0.02	1.34 ± 0.08	2.77 ± 0.13	5.42 ± 0.28
S-ODN	0.34 ± 0.02[a]	0.75 ± 0.06a	1.68 ± 0.09 [a]	3.08 ± 0.14[a]
AS-ODN	0[ab]	0.41 ± 0.05[ab]	0.69 ± 0.08[ab]	1.03 ± 0.11[ab]

a:与对照组比较 $P<0.01$，b:与 S-ODN 组比较 $P<0.01$

3 讨 论

基因反义技术是根据碱基互补原理，用人工合成或生物体自身表达的特定序列的短片段核苷酸与靶基因或 RNA 配对结合、阻断其表达的技术。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，最理想的靶点是肿瘤生长所必需而又不存在于正常细胞的细胞成分。以端粒酶作为肿瘤基因治疗的靶点，具有广谱、特异、副作用小等特点[3]。报道显示：针对端粒酶的反义寡核苷酸可抑制多种肿瘤细胞端粒酶活性[4-6]。本研究发现：针对端粒酶 RNA 模板结构的反义寡核苷酸 5'-$(TTAGGG)_3$-3' 对鼻咽癌 HNE-1 细胞的端粒酶活性有明显抑制作用，而正义寡核苷酸无此作用。说明是特定碱基序列而

维普资讯 http://www.cqvip.com

非硫代核苷酸骨架的作用。其可能作用机制为[7]:①反义寡核苷酸与端粒酶 RNA 模板区碱基互补,阻碍了其作为模板逆转录合成端粒的功能。②硫代型反义寡核苷酸与 RNA 结合后,能激活细胞内的核糖核酸酶 H,使其特异性地降解与之结合的 RNA。本实验反义寡核苷酸抑制端粒酶活性未显示出时间依赖性,而且高浓度反义寡核苷酸(20μmol/L)作用 3 天后,细胞端粒酶活性(0.954)与阴性对照(0.444)间仍有明显差异($P<0.01$)。说明在抑制端粒酶活性时,单用硫代型反义寡核苷酸效果还不够满意,可考虑用一些方法加强其作用:如①加用脂质载体以增强反义寡核苷酸进入细胞的能力。②选用肽核酸替代硫代型反义寡核苷酸以增强与 RNA 结合的能力。

本实验结果显示:针对 HTR 的反义寡核苷酸对鼻咽癌 HNE-1 细胞持续增殖能力(细胞克隆形成能力)的影响较短期增殖能力(MTT 实验)的抑制作用强。达相近抑制率(80%左右)时,前者反义寡核苷酸仅需 5μmol/L,一次性加药,后者需 20μmol/L 反义寡核苷酸,且需每日补充加药。结合电镜结果:反义寡核苷酸作用后在短期内(48h)虽出现细胞衰老、坏死的征象,但未见大片坏死区及细胞凋亡。说明该反义寡核苷酸对鼻咽癌细胞在短期内未出现细胞致死效应。这与 Feng 等[8]在人宫颈癌 Hela 细胞的研究结果相似。MTT 实验显示的细胞数减少仅是抑制肿瘤细胞的分裂增殖所致,是相对于对照组和正义寡核苷酸组的细胞快速增殖的相对减少,而非杀死大量细胞致细胞绝对数的减少。这是因为应用反义寡核苷酸抑制端粒酶后,虽使其合成端粒 DNA 的能力下降,肿瘤细胞在分裂增殖时端粒的缩短无法得到补充,但由于肿瘤细胞本身有一定端粒长度,肿瘤细胞尚不会立即死亡。只有经过若干次分裂后,端粒缩短到一个极限,细胞才会衰老、死亡。因此细胞的致死效应有一定的滞后性。由于不同的肿瘤细胞有不同的端粒长度,对于端粒短而又分裂增殖快的肿瘤,由于端粒迅速缩短至极限,细胞致死效应滞后性的表现就不明显。这可能就是 Mata 等[9]诱导淋巴瘤细胞凋亡而未出现明显滞后表现的原因。

肿瘤细胞在裸鼠的致瘤能力可间接反映其在体内形成肿瘤尤其是远处转移灶的能力。针对端粒酶 RNA 的反义寡核苷酸抑制了鼻咽癌 HNE-1 细胞的致瘤能力,使其成瘤时间延长,肿瘤生长缓慢,说明它至少在消除体内微小转移灶、防止肿瘤复发方面有重要的临床价值。

(作者电话:13637756229,E-mail:ttaggg@163.com,地址:重庆市渝中区重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉科,邮编:400010)

参 考 文 献

[1] Weise JM,Gunes C. Telomeres and telomerase. A survey about methods and recent advances in cancer diagnostic and therapy[J]. Histol Histopathol,2006;21(11):1249-1261.

[2] Masutomk K,Yu EY,Khurts S,et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cell[J]. Cell,2003;114(2):241-253.

[3] Kiyozuka Y. Correlation of telomerase activity and telomere length to chemosensitivity[J]. Method Mol Med,2005;111:97-108.

[4] 邓志华,王 琦,韩子岩.端粒酶反义寡核苷酸对肝癌细胞生长的影响[J]. 肿瘤防治研究,2006;33(6):455-456.

[5] 马 艳,陈忠东. 端粒酶反义寡核苷酸体外抑制宫颈癌细胞端粒酶活性的研究[J]. 中国现代医学杂志,2004;14(24):61-63.

[6] 曹 前,吴家廉,骆文龙.反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对鼻咽癌细胞癌基因表达的影响[J]. 重庆医科大学学报,2003;28(2):162-165.

[7] Carter G,Lemoine NR. Antisense technology for cancer therapy: does it make sense[J]? Br J Cancer,1993;67(5):869-876.

[8] Feng J,Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase[J]. Science,1995;269:1236-1239.

[9] Mata JE,Hoshi SS,Palen B,et al. A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of burkitt's lymphoma cells in vitro and in vivo[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997;144(1):189-195.