维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0580－05

粘蛋白 MUC2 反义核酸抑制胃癌细胞的研究

肖春卫，易永芬，林 晓

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨粘蛋白 MUC2 反义脱氧寡核苷酸(ASODN)对人胃癌细胞株 SGC7901 的抑制作用。方法:采用人工合成的 MUC2 ASODN 经阳离子脂质体包裹后转染入胃癌株 SGC7901 细胞,采用 MTT 法、形态学观察及免疫组化法测定 MUC2 ASODN 对胃癌细胞的抑制作用。结果:MTT 法测细胞增殖活性见不同浓度 ASODN 均能抑制 SGC7901 细胞的增殖,抑制作用在 48h 最强,0.5μmol/L ASODN 对细胞的抑制率为 55%,时间延长抑制作用逐渐减弱。SGC7901 细胞转染 MUC2 ASODN 后,与对照组相比,光镜下观察到细胞数量减少、体积变小、核分裂明显减少、可见较多的变性、坏死。免疫组化 S－P 法染色提示转染 ASODN 后,SGC7901 细胞 mRNA 的翻译受到抑制,MUC2 蛋白表达水平明显降低,p16 蛋白表达明显增强,粘附分子 CD44V6 表达明显降低,MMP－2 的表达也显著下降,MMP－9 的表达无明显变化。结论:使用人工合成 MUC2 ASODN 能有效抑制胃癌细胞株 SGC7901 的增殖及侵袭、转移潜能。

【关键词】胃肿瘤;MUC2;反义寡核苷酸

【中国图书分类法分类号】R345.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－01－05

Inhibitory effects on human gastric cancer cell line by MUC2 antisense oligodeoxynucleotide

XIAO Chunwei, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effect in vitro of mucin gene MUC2 antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on its gene expression and cell proliferation on gastric cancer cell line. *Methods*: Phosphorothioate MUC2 ASODN were synthesized and transfected to SGC7901 cells mediated by lipofectin. Their inhibitory effects on cell proliferation were determined by MTT method, light microscopy and immunohistochemical method. *Results*: The determination by MTT method demonstrated that MUC2 ASODN of varied concentrations could significantly inhibit the growth of SGC7901 cell lines while the control lipofectin showed no such effect. The result also suggested that the inhibitory effect was dose－dependent and time－dependent. The inhibition peaked at 48th hour after transfection, and the inhibition rate reached 55% when the concentration was 0.5μmol/L. After transfecting with MUC2 ASODN, SGC7901 cells showed decrease in number, volume and karyokinesis, increase in necroses under light microscopy. And the test by immunohistochemical method indicated that ASODN could downregulate the expression levels of MUC2 protein, MMP－2 protein and CD44V6 protein, but upregulate the expression levels of p16 protein. *Conclusion*: The data suggest that MUC2 ASODN transfection could effectively inhibit SGC7901 cells proliferation and invasion and metastasis potential of SGC7901 cells.

【Key words】Stomach neoplasms; MUC2; Antisense oligodeoxynucleotide

粘蛋白 MUC2 是一种分泌型糖蛋白,正常时只在小肠和空肠的杯状细胞有表达,对粘膜起保护作用。在组织细胞癌变过程中,粘蛋白 MUC2 的表达具有质或量的改变。在前期研究中发现,MUC2 在胃癌组织中的表达与肿瘤的生物学行为密切相关,表达 MUC2 的肿瘤浸润程度深,淋巴结转移较早[1]。为进一步观察 MUC2 在胃癌生长中的作用,我们在证实 MUC2 在胃癌细胞株 SGC7901 高表达后,采用反义核酸技术观察 MUC2 反义寡核苷酸对 SGC7901 细胞的抑制作用。

作者介绍:肖春卫(1973－),女,硕士研究生,主要研究方向:消化道肿瘤。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(渝卫科教 2000－48)。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

人胃腺癌细胞株 SGC7901(由重庆医科大学病理生理教研室提供)培养于含 10% 小牛血清,100U/ml 青霉素及 100U/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37.5℃、5% CO_2 培养箱贴壁生长,用 0.5% 胰酶消化传代。

1.2 合成硫代寡脱氧核苷酸

MUC2 反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide,ASODN)序列与 MUC2 基因的串联重复区互补[2],由 18 个碱基组成,其正义链为 5'GTGGTGGTGGTGATGGGT 3',反义链序列为 5'ACCCATCACCACCACCAC 3',反义链均用硫代磷酸修饰,委托上海生工合成。

1.3 脂质体-ASODN 复合物的制备

阳离子脂质体 Lipofectin 购自 Invitrogen life technologies 公司,制备前将 ADODN 稀释于 100μl 无血清无抗生素的 RPMI-1640 培养液中,加入同样方法稀释的脂质体,混匀,室温放置 5~10min,即可形成脂质体-ASODN 复合物,并立即用于细胞处理,脂质体及 ASODN 用量参考说明书。

1.4 MTT(四唑盐)法测 ASODN 对细胞生长的影响

取对数生长期细胞用无血清、无抗生素 RPMI-1640 稀释,接种细胞 100μl 于 96 孔培养板,细胞密度为 1×10^5/ml,实验分 6 组:1、细胞对照组;2、脂质体对照组(含脂质体 2μg/ml);3、0.125μ mol/L ASODN 处理组(含 0.125μmol/L ASODN 及脂质体 0.25g/ml);4、0.25μmol/L ASODN 处理组(含 0.25μ mol/L ASODN 及脂质体 0.5μg/ml);5、0.5μmol/L ASODN 处理组(含 0.5μmol/L ASODN 及脂质体 1.0μg/ml);6、1.0μmol/l ASODN 处理组(含 1.0μmol/L ASODN 及脂质体 2μg/ml)。每组接种 5 孔。转染时,各处理组将细胞与总体积为 50μl 脂质体-ASODN 复合物充分混匀,细胞对照组加入同等体积的无血清无抗生素的 RPMI-1640 培养液。培养 5h 后,各组另添加含血清 RPMI-1640 培养液 70μl 继续培养。分别于转染基因 24、48、72h 后,离心弃去上清液,加入无血清 RPMI-1640 培养液 200μl 及 5mg/ml MTT 20μl 继续培养 4h,再离心弃去上清液,再加入 200μl DMSO(二甲基亚砜)振荡,并立即于自动酶标仪(EL312e 型,Bio-Tek Instruments 公司)490nm 波长处测定各孔吸光度值。然后根据吸光度值计算细胞抑制率,其公式为抑制率=1-实验组平均吸光度值/细胞对照组平均吸光度值×100%。实验均重复 3 次。统计学方法采用 F 检验。

1.5 光镜观察:

取爬片细胞(爬片细胞处理同免疫组化法)行 HE 染色,光镜观察 MUC2 反义寡核苷酸封闭前后细胞形态的改变。

1.6 S-P 法测定 MUC2、CD44V6、MMP-9、MMP-2、p16 的表达

MUC2、CD44V6、MMP-9、MMP-2、p16 单克隆抗体及 S-P 试剂盒均购自福州迈新公司。细胞爬片时分为两组,空白对照组、0.5μmol/L 脂质体-ASODN 作用组。取对数生长期细胞用无血清无抗生素 RPMI-1640 稀释,将 1×10^5/ml 浓度的细胞 500μl 接种于预置无菌小盖玻片的 24 孔板中,转染时,处理组将细胞与总体积为 250μl ASODN-脂质体复合物充分混匀,空白对照组加入同等体积的无血清无抗生素 RPMI-1640 培养液。培养 5h 后,添加含血清 RPMI-1640 250μl 培养液继续培养 48h 后取出盖玻片,PBS 液漂洗 3 次,4℃丙酮固定 5min,然后按试剂说明书行对照组及处理组 S-P 染色。阳性标准:胞核/胞浆中出现棕黄色颗粒为 p16 阳性细胞;胞浆出现棕黄颗粒 MUC2 阳性细胞;胞膜出现棕黄色颗粒为 CD44V6 阳性细胞;胞浆出现棕黄颗粒 MMP-2、MMP-9 阳性细胞。

2 结 果

2.1 MTT 法测细胞增殖活性

细胞对照组、脂质体对照组之间,SGC7901 细胞的增殖情况无明显差异,不同浓度 ASODN 均能抑制 SGC7901 细胞的增殖(与对照组比较 $P<0.05$,F 检验),且对细胞生长抑制作用随 ASODN 浓度的增加而增高,抑制作用在 48h 最强,0.125μmol/L ASODN、0.25μmol/L ASODN、0.5μmol/L ASODN、1.0μmol/L ASODN 对细胞的抑制率分别为 26%、30%、55%、63%,时间延长,抑制作用逐渐减弱。

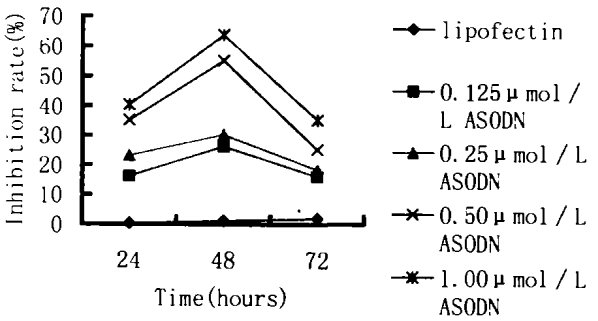


图 1 MTT 法测细胞增殖活性

2.2 光镜

将 SGC7901 细胞爬片细胞(分为细胞对照组及 0.5μmol/L ASODN 作用组)行 HE 染色。细胞对照组肿瘤细胞圆形或短梭形,细胞密度大,大小不一,核偏位,异型性明显,核浆比例增加,有较多核分裂相。而脂质体-ASODN 作用组细胞密度明显减小,体积减小,大小较一致,几乎不见核分裂,可见明显染色质边集、核固缩、核碎裂、核溶解。

2.3 免疫细胞化学染色结果

2.3.1 MUC2 蛋白表达

用 0.5μmol/L ASODN 作用 SGC7901 细胞 48h 后,免疫组化染色发现对照组染色强,可见胞浆均匀棕黄着色(见图 2A),反义组无明显胞浆着色(见图

维普资讯 http://www.cqvip.com

2B)，说明转染 MUC2ASODN 后，SGC7901 细胞 mRNA 的翻译受到抑制，MUC2 蛋白表达水平明显降低。

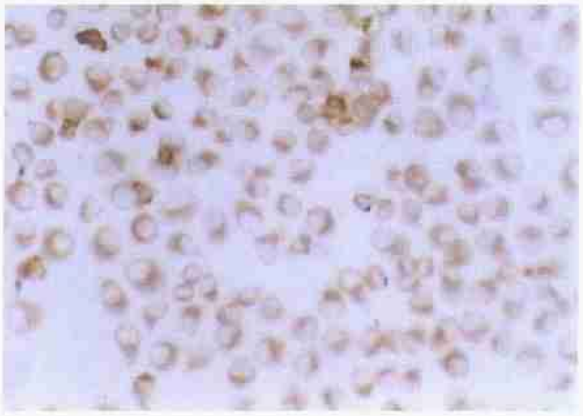


图 2A SGC7901 细胞对照组
免疫组化 S－P 法染色发现 MUC2 蛋白为胞浆均匀黄染 SP×200

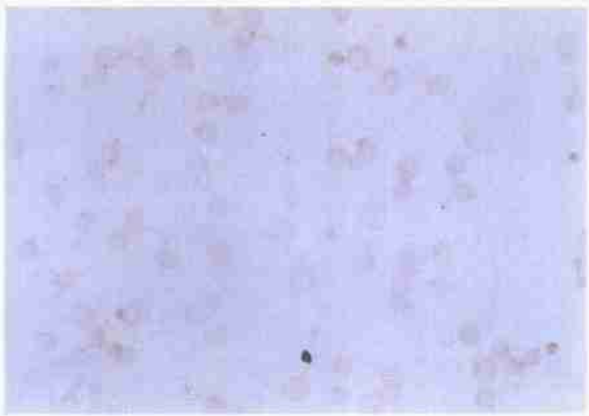


图 2B SGC7901 反义作用组
经 0.5μmol/L MUC2 ASODN 作用 48h 后，S－P 法染色，示 MUC2 蛋白胞浆着色明显减弱 SP×200

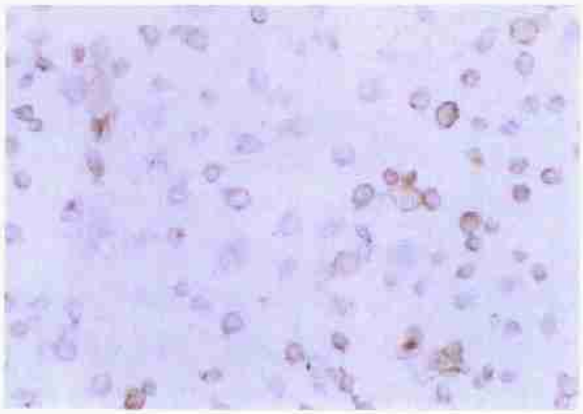


图 3A SGC7901 细胞对照组
S－P 法染色示 $CD44V_6$ 蛋白为胞膜棕黄着色 SP×200

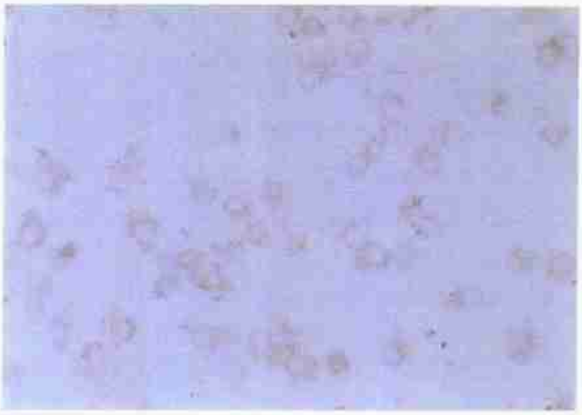


图 3B SGC7901 细胞反义作用组
S－P 法染色发现，经 0.5μmol/L MUC2 ASODN 作用 48h 后肿瘤细胞胞膜 $CD44V_6$ 蛋白着色明显减弱 SP×200

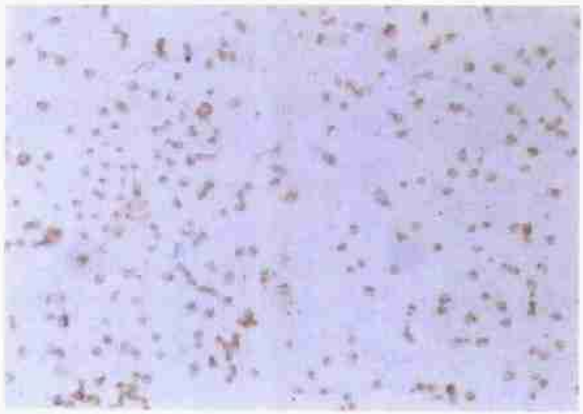


图 4A SGC7901 细胞对照组
S－P 法染色示 MMP－2 蛋白为胞浆棕黄着色 SP×100



图 4B SGC7901 细胞反义作用组
S－P 经 0.5μmol/L MUC2 ASODN 作用 48h 后肿瘤细胞胞膜 MMP2 蛋白着色明显减弱 SP×100

2.3.2 CD44V6 蛋白表达

用 0.5μmol/L ASODN 作用 SGC7901 细胞 48h 后，免疫组化染色发现对照组染色强，可见胞膜均匀黄染(见图 3A)，反义组无明显胞膜着色(见图 3B)，说明转染 MUC2 ASODN 后，CD44V6 蛋白表达水平明显降低。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3.3 MMP－9/MMP－2 蛋白表达

用 0.5μmol/L ASODN 作用 SGC7901 细胞 48h 后，MMP－9 免疫组化染色发现对照组及反义组均为胞浆黄染，两者无明显着色差异，说明转染 MUC2 ASODN 后，MMP－9 蛋白表达水平无明显差异。但用 0.5μmol/L ASODN 作用 SGC7901 细胞 48h 后，MMP－2 免疫组化染色发现对照组染色强，可见胞浆均匀黄染(见图 4A)，反义组无明显胞浆着色(见图 4B)，说明转染 MUC2 ASODN 后，MMP－2 蛋白表达水平明显降低。

2.3.4 p16 蛋白表达

用 0.5μmol/L ASODN 作用 SGC7901 细胞 48h 后，免疫组化染色发现对照组染色极弱，而反义组可见明显胞核/胞浆棕褐色着色，说明转染 MUC2 ASODN 后，p16 蛋白表达水平显著增强。

3 讨 论

反义核酸技术是 20 世纪 80 年代出现的一种应用反义核酸类药物来抑制特定基因表达为目的的基因治疗技术。其中反义寡核苷酸是人工设计合成的与特定基因互补的寡核苷酸，它能通过 W－C 配对与特定基因结合抑制其表达。应用此类药物可以特异、高效抑制某种基因的表达。多数反义核酸都是多聚阴离子，在通过细胞时很容易与细胞膜上的蛋白相互作用，很难穿过细胞，所以必须使用转移载体将其携带进入细胞内，才能发挥最大作用。最常用的转移载体是阳离子脂质体，它通过电荷的作用与核酸结合成颗粒将其携带进入细胞内[3]。

MUC2 基因位于染色体 11p15.5 位点上，首先从小肠粘膜的 cDNA 表达文库中克隆，是调节小肠杯状细胞表达粘蛋白的主要基因。其编码的 MUC2 蛋白是一种分泌型的糖蛋白，包含有两个中央重复序列[4]。MUC2 正常时只在小肠和结肠的杯状细胞表达，在正常的胃粘膜没有表达，胃粘膜肠型化生后，MUC2 在杯状细胞及不成熟的柱状细胞和吸收细胞中有表达，在肿瘤细胞中，其表达呈增高趋势，并且呈弥漫的胞浆着色[5]。本研究采用脂质体作为载体，将与 MUC2 基因的串联重复区互补的，经硫代磷酸修饰的反义寡核苷酸导入 MUC2 蛋白高表达的胃癌细胞株 SGC7901，探讨其对胃癌细胞抑制作用。

本研究结果显示，用脂质体介导的 MUC2 ASODN 转染 SGC7901 细胞后，可有效降低 MUC2 蛋白的表达，明显抑制胃癌细胞株 SGC7901 的增殖，而脂质体对照组无此效应。MUC2 ASODN 对肿瘤细胞增殖抑制作用具有明显的时效性及量效性，作用时间以 48h 为最佳，随时间延长，抑制作用减弱。经 MUC2 ASODN 转染的肿瘤细胞，有明显的变性坏死，光镜下见明显的核固缩，核碎裂、核溶解等。表明 MUC2 基因具有促进胃癌细胞增殖的作用。

研究表明，p16 基因在生化功能上与细胞增殖周期紧密相关，并通过细胞周期与其它癌基因及肿瘤抑制基因相互作用，成为正常细胞增殖的负调控因子[6]。p16 基因表达产 p161NK4 的作用是抑制 CDK4 和 CDK6，使 pRb 磷酸化减少，从而阻断 cyclinD、pRb 等介导的转录因子 E2F 的活化，影响了众多的癌基因的转录，最终抑制细胞增殖。如果 p16 基因异常，p16 含量减少，通过 CDK4 活化增强、Rb 出现持续磷酸化而使细胞增殖失控，导致恶性增殖，p16INK4－Rb 的高频失活可能是肿瘤形成的条件[7,8]。本研究结果显示，胃癌细胞 SGC7901p16 蛋白表达极弱，说明 p161NK4－Rb 失活，但经用脂质体介导的 MUC2 ASODN 转染后，肿瘤细胞 p16 蛋白表达显著增强。也即 SGC7901 细胞 MUC2 经反义抑制后，肿瘤抑制基因 p16 活性大大增强，提示胃癌发生过程中，MUC2 的畸形表达，可导致肿瘤抑制基因 p16 的失活，从而促进胃癌细胞的恶性增殖。

恶性肿瘤的侵袭和转移，涉及肿瘤细胞与宿主之间错综复杂的关系，受多种相关基因的调控。包含粘附、细胞外基质的降解等过程。CD44V6 是 CD44 基因的变异体，它是分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白分子，主要参与细胞与细胞、细胞与基质间的特异性粘连过程。有关研究表明多种肿瘤的转移行为均与 CD44 基因的异常转录有关[9]。本研究显示，胃癌细胞 SGC7901 表达 CD44V6 较强，但用脂质体介导的 MUC2 ASODN 转染后，CD44V6 的表达明显减弱。也即，经反义核酸有效抑制 MUC2 的表达后，CD44V6 的表达相继减弱。由此也间接说明，MUC2 基因可增强粘附分子 CD44V6 的表达，促进肿瘤的侵袭和转移。

基质金属蛋白酶是参与细胞外基质降解活动的主要蛋白酶类之一。其中Ⅳ型胶原酶的二个亚型(MMP－2，MMP－9)在多种组织中均有阳性表达，但由于二者作用的机制不同则表达的程度有差异，

维普资讯 http://www.cqvip.com

肿瘤细胞表达 MMP－2,MMP－9,在肿瘤细胞突破基底膜屏障而浸润转移中起着重要作用[10]。本研究显示,胃癌细胞表达 MMP－2,MMP－9 较强,但用脂质体介导的 MUC2 ASODN 转染后,MMP－2 的表达明显减弱,而 MMP－9 的表达无明显影响。即 MUC2 经反义核酸有效抑制其表达后,MMP－2 的表达相继减弱,因此抑制 MUC2 的表达,可抑制肿瘤细胞某些基质金属酶的分泌,由此降低肿瘤细胞的浸润能力。可见,MUC2 在一定程度上,增进胃癌细胞水解酶的活性,促进其浸润和转移。

本组实验以胃癌细胞株 SGC7901 为研究对象,采用硫代磷酸修饰的 MUC2 反义寡核苷酸,通过脂质体导入培养细胞 SGC7901 后,其转染后细胞形态、细胞生长增殖活性、MUC2、P16、MMP－2、MMP－9、CD44V6 的表达变化均说明,使用人工合成的 MUC2 反义寡核苷酸,可特异抑制体外胃癌细胞株 MUC2 的表达,抑制细胞的恶性增殖,并能抑制肿瘤细胞的侵袭及转移潜能。本研究对胃癌 MUC2 在胃癌发生机制的探讨和胃癌的基因治疗有一定的理论意义和潜在的应用价值。

参 考 文 献

[1] 张红凯,易永芬,李圆圆,等. MUC2 和 E－钙粘附素在胃癌组织中的表达及其意义[J]. 重庆医科大学学报,2003;28(2):135－137.

[2] Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, et al. Enhanced sialylation of mucin－associated carbohydrate structure in human colon cancer metastasis[J]. Gastroenterology, 1996; 110(5): 1354－1367.

[3] Islam A, Handley SL, Thompson KS, et al. Studies on uptake, subcelluar trafficking and effiux of antisense oligodeoxynucleotides in glima cells using selfassembling cationic lipoplexes as delivery systems[J]. J Drug Target, 2000; 7(5): 373－382.

[4] Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, et al. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism[J]. J Biol Chem, 1989; 264: 6480－6487.

[5] Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, et al. Mucin gene expression in normal, preneoplastic and neoplastic human gastric epithelium[J]. Cancer Res, 1995; 55(12): 2681－2690.

[6] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cellcycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4 [J]. Nature, 1993; 336: 704－707.

[7] Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, et al. Absence of p16INK4 protein is restricted to subset of lung cancer lines that retains wild type RB[J]. Oncogene, 1994; 9: 3357－3378.

[8] Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, et al. CDKN29/p16/MTS1 gene deletion or cdk4 amplification occurs in the majority of glioblastomas[J]. Cancer Res, 1994; 54: 6321－6324.

[9] 许良中,主编. 实用肿瘤病理方法学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1997;480－482.

[10] Aznavoorian S, Murphy AN, Steler Stevenson WG, et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. Cancer, 1993; 71(4): 1368－1383.