维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0160-03

反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对喉癌细胞Hep-2增殖的影响

蒲一平[1]，刘 勇[2]，吴家廉[1]，曹 前[1]

（1. 重庆医科大学第二临床学院耳鼻咽喉科 重庆 400010；2. 贵州安顺市第二人民医院五官科 安顺 561000）

【摘 要】目的：检测端粒酶的反义寡核苷酸对喉癌细胞Hep-2的影响。方法：采用MTT法及平板集落形成实验检测靶向于端粒酶的反义寡核苷酸对喉癌细胞株Hep-2增殖的抑制作用。用PCR-ELISA法检测反义寡核苷酸对喉癌细胞株Hep-2细胞内端粒酶活性的影响。结果：反义寡核苷酸明显抑制了喉癌细胞Hep-2的增殖，此作用有剂量、时间依赖性。反义寡核苷酸可抑制喉癌细胞端粒酶活性，此作用有浓度依赖性。结论：靶向于端粒酶的反义寡核苷酸能抑制喉癌细胞Hep-2的增殖。

【关键词】喉癌；反义寡核苷酸；端粒酶

【中国图书分类法分类号】R 739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-25

Effect of antisense oligodeoxynucleotide targeting against telomerase on proliferation of laryngeal carcinoma cells

PU Yiping, et al

(Deparment of Otorhinolaryngology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of the antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) targeting against telomerase on laryngeal carcinoma cells Hep-2 strain in vitro. *Methods*: MTT test and plat clone forming test were used to measure the proliferation inhibition of the AS-ODN targeting against telomerase on Hep-2 cell strain. Telomerase activity of Hep-2 cell strain was analysed by PCR-ELISA technique. *Results*: The AS-ODN inhibited Hep-2 cell strain obviously with dose dependence and time dependence. The AS-ODN inhibited telomerase activity of Hep-2 cell strain with density dependence. *Conclusion*: The AS-ODN targeting against telomerase could inhibit the proliferation of Hep-2 cell strain.

【Key words】Laryngeal carcinoma; Antisense oligodeoxynucleotide; Telomerase

端粒酶是一种RNA依赖的DNA聚合酶，具有逆转录活性，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。据报导，人喉鳞状细胞癌组织有端粒酶高表达，其阳性检出率在90%以上[1]。喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤，治疗目前以手术加放疗为主，由于对发声功能影响较大，患者生存质量不高，有必要寻找一种有效而副作用小的治疗方法。本研究用反义寡核苷酸抑制端粒酶活性观察其对喉癌细胞增殖的影响。旨在探讨一种新的治疗措施，用于肿瘤的综合治疗。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 喉癌细胞株Hep-2细胞购自武汉大学细胞中心（来源于美国ATCC细胞库）。

1.1.2 主要试剂 小牛血清（hyclone公司），RPMI1640培养基（Gibco公司），胰蛋白酶（Gibco公司），端粒酶检测试剂盒（Roche公司），MTT（北方同正生物技术发展公司），DMSO（Sigma公司），寡核苷酸（上海生工合成，为全硫代型）。反义寡核苷酸(AS-ODN)序列为 5'-(TTAGGG)$_3$-3'，正义寡核苷酸(S-ODN)序列为 5'-(CCCTAA)$_3$-3'。

1.2 方法

1.2.1 MTT试验 取对数生长期细胞，调整细胞数为10^5/ml。接种于96孔板内（细胞数为10^4/孔）。加寡核苷酸使其终浓度分别为(0μmol/L、5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L)，培养2天。另用40μmol/L寡核苷酸，分别培养1、2、3天，每24h重复加入相应寡核苷酸一次，每48 h更换培养液一次。到相应终止时间，弃去原培养液，每孔加入无酚红、无血清 RPMI 1640 培养液90μl，另加入MTT(5mg/ml)10μl，置CO_2孵箱中，孵育4h。去上清，每孔加入DMSO 100μl，振荡10min。540nm波长比色。

1.2.2 平板集落形成实验 取对数生长期细胞，调整细胞数

作者介绍：蒲一平（1963- ），女，主治医师，主要研究方向：头颈部肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

为10^3/ml。在9cm培养皿，预置含10%小牛血清的RPMI 1640培养液。对照组内不含药物，实验组各含相应寡核苷酸，浓度为10μmol/L。接种细胞数为200个/皿，置CO_2孵箱中培养3周。在肉眼下计数细胞形成的集落数，对难于判断者，在显微镜下计数细胞数＞50个为一细胞集落、计算集落形成率。

1.2.3 端粒酶活性分析方法采用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P_1-TS引物的3'端，经PCR反复扩增P1-TS和P_2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物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。具体步骤见Sigma公司试剂盒。

1.3 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。

2 结 果

2.1 MTT实验

表1显示：AS-ODN对Hep-2细胞增殖有明显抑制作用，且随浓度的增加其抑制作用增强。

表2显示：AS-ODN对Hep-2胞增殖的抑制作用随时间延长而增强。

2.2 集落形成实验

表3显示：AS-ODN对Hep-2细胞集落形成能力有明显抑制作用。

2.3 端粒酶活性测定

表4显示：AS-ODN可明显抑制Hep-2细胞的端粒酶活性，此作用随浓度升高而加强。

表1 不同浓度寡核苷酸对Hep-2细胞增殖作用的影响

组 别	OD值	抑制率
正常对照	1.175 ± 0.032	
5μmol/L S-ODN组	1.107 ± 0.051	5.8%
5μmol/L AS-ODN组	1.093 ± 0.038	7.3%
10μmol/L S-ODN组	0.886 ± 0.047○	24.6%
10μmol/L AS-ODN组	0.738 ± 0.029*●▲	37.2%
20μmol/L S-ODN组	0.906 ± 0.065*	22.9%
20μmol/L AS-ODN组	0.538 ± 0.021*●▲	54.2%
40μmol/L S-ODN组	0.859 ± 0.023*	26.9%
40μmol/L AS-ODN组	0.418 ± 0.033*○▲	64.4%
80μmol/L S-ODN组	0.840 ± 0.052*	28.5%
80μmol/L AS-ODN组	0.370 ± 0.017*●▲	68.5%

与对照组比*$P<0.01$ 与上一浓度比，○$P<0.05$
●$P<0.01$ 与同一浓度正义组比▲$P<0.05$

表2 40μmol/L寡核苷酸作用不同时间对Hep-2细胞增殖的影响

组 别	OD值	抑制率
对照1天组	0.931 ± 0.031	
S-ODN1天组	0.712 ± 0.042*	23.5%
AS-ODN1天组	0.509 ± 0.022*●	45.3%
对照2天组	1.358 ± 0.046	
S-ODN2天组	1.062 ± 0.048*	21.8%
AS-ODN2天组	0.578 ± 0.037*●	57.4%
对照3天组	1.974 ± 0.026	
S-ODN3天组	1.487 ± 0.036*	24.7%
AS-ODN3天组	0.591 ± 0.045*●	70.3%
80μmol/L S-ODN组	0.840 ± 0.052*	28.5%

与对照组比*$P<0.01$ 与正义组比●$P<0.01$

表3 10μmol/L寡核苷酸对Hep-2细胞集落形成的影响

组别	集落形成率(%)	抑制率(%)
对照组	68.9 ± 5.8	
S-ODN组	57.1 ± 8.7	17.1
AS-ODN组	29.6 ± 7.5	57.0

3 讨 论

3.1 反义寡核苷酸对细胞端粒酶活性的影响

我们设计的针对端粒酶HTR模板结构的反义寡核苷酸5'-$(TTAGGG)_3$-3'与Hep-2细胞共同孵育，结果显示明显抑制了喉癌细胞的端粒酶活性，且此抑制作用随反义寡核苷酸浓度的升高而加强，表现出浓度依赖性。相同浓度的正义寡核苷酸作用相同的时间，其端粒酶活性与对照组相比无显著差异($P>0.05$)，说明此抑制作用是特定碱基序列而非硫代核苷酸骨架的作用，有序列特异性。其作用的可能机制为[2]：①反义寡核苷酸与HTR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。

3.2 反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对细胞增殖的影响

本实验采用MTT试验和平板集落形成试验来观

维普资讯 http://www.cqvip.com

表4 寡核苷酸对Hep-2细胞端粒酶活性影响

组别	1d	3d
对照组	1.714 ± 0.281	1.697 ± 0.318
10 μ mol/L S-ODN组	1.574 ± 0.179	1.406 ± 0.236
10 μ mol/L AS-ODN组	0.998 ± 0.165*△	0.877 ± 0.137*△
40 μ mol/L S-ODN组	1.609 ± 0.187	1.372 ± 0.105
40 μ mol/L AS-ODN组	0.615 ± 0.093*△	0.566 ± 0.114*△

与对照组比 △ $P<0.01$,
与同浓度同一时间S-ODN比 * $P<0.01$

察对Hep-2细胞增殖的抑制作用。结果显示、针对端粒酶的反义寡核苷酸对喉癌细胞Hep-2的增殖有明显抑制作用。此作用随时间的延长和剂量的增加而增加。显示出明显的时间、剂量依赖性。虽然正义寡核苷酸也显示一定的抑制增殖作用（最大28.5%），但与反义寡核苷酸(最大70.3%)相比，抑制程度小、有明显的差异($P<0.01$)。说明此抑制作用也主要是由特定的碱基序列所致。这与 Mata等[3]在淋巴瘤中的结果相似。

本实验结果显示，针对端粒酶的反义寡核苷酸对喉癌细胞Hep-2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试验)的抑制作用强。达相近抑制率(60%左右)时，前者仅需10 μ mol/L反义寡核苷酸、一次性加药、后者需40 μ mol/L反义寡核苷酸，且需每日补充加药。这是因为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[4]。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。这与Feng等[5]在人宫颈癌 Hela细胞的研究结果相似。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[3]诱导淋巴瘤细胞凋亡而未出现明显滞后表现的原因。

参 考 文 献

[1] 李 源，张小伯，曹淑兰，等. 人喉鳞状细胞癌端粒酶活性检测的临床意义[J]. 中日友好医院学报，1999;13:263-266.

[2] Carter G, Lemoine NR. Antisense technology for cancer therapy: does it makes sense[J]? Br J Cancer, 1993;67:869-876.

[3] 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.

[4] Nielsen PE. A new target for gene therapeutics: telomerase [J]. Nature Biotech, 1996;14:580-583.

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

（上接第159页）

参 考 文 献

[1] 康格非. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 第2版、北京：人民卫生出版社，1998;164-165.

[2] 秦晓光. 应用尿肌酐比值法时需注意的几个问题[J]. 中华医学检验杂志、1991;14:279-282.

[3] 王继贵. 临床生化检验[M]. 第2版，长沙：湖南科学技术出版社、1996;415.

[4] Winn-Deen ES. Development of a direct assay for α-amylase[J]. Clin Chem, 1988;34(10):2000-2008.

然比尿淀粉酶稳定。

但是，如果血中AMY与免疫球蛋白结合形成（下转第162页）"巨淀粉酶"复合物，由于该复合物分子量巨大而不能被肾小球滤过，故可发生血清AMY升高，而尿淀粉酶/肌酐比值不高的情况，此时，尿淀粉酶/尿肌酐比值得不到满意结果[4]。

尿淀粉酶/尿肌酐比值可有效地降低由于尿液浓缩和稀释对尿淀粉酶测定结果的影响，提高了实验的灵敏度、特异性和总有效率。将尿淀粉酶/尿肌酐比值的参考值范围定为3.2 - 57.2U/mol Cr是合适的，可在临床推广使用。