DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.017
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1290 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1290-03

脂质体介导ANG反义核酸对A549细胞作用的研究

唐 敏[1],刘松青[1],王吉刚[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]药剂科;[2]肿瘤血液科;重庆 400038)

提 要:目的 研究脂质体介导ANG反义核酸转染A549细胞后,对其中ANG蛋白表达的影响,探讨其作为抗血管生成与抗肿瘤药物的可行性。方法 用人工合成的人ANG反义寡聚核苷酸,以脂质体为载体转染人肺癌A549细胞,研究A549细胞在基因转染后,其ANG蛋白表达的变化。结果 脂质体转染程序优化后,得到最佳转染效率;免疫组化显示细胞内ANG蛋白表达明显减少;培养基ELISA检测显示每细胞分泌的ANG蛋白量与对照组相比有显著差异。结论 ANG反义寡聚核苷酸抑制A549细胞中ANG的表达,为体内研究提供了基础。

关键词:血管生成素;脂质体;寡核苷酸;反义;新生血管形成;肿瘤
中图法分类号:R394.2;R734.2;R977.6 文献标识码:A

Effects of ANG antisense oligonucleotide transfected by liposome on A549 cells

TANG Min, LIU Song-qing, WANG Ji-gang (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ANG antisense oligonucleotide transfected by liposome on A549 cells and to explore the possibility as anti-angiogenetic and anti-tumor drugs. Methods Human lung cancer cell line A549 was transfected with a synthetic oligonucleotide. The changes of ANG protein oression was observed after transfection by cationic liposome. Results The liposome could effectively deliver ANG antisense oligonucleotide to A549 cells. When the cells were treated with antisense oligonucleotide, ANG protein level decreased greatly both in the cells and in the media. Conclusion Antisense ANG oligonucleotide can inhibit ANG expression specifically in A549 cells *in vitro*, providing the basis for further studies *in vivo*.

Key words: angiogenin; lipofectin; oligonucleotide; antisense; neoangiogenesis; tumor

肿瘤的发生、发展和转移与肿瘤新生血管的形成密切相关。血管生成素(Angiogenin, ANG)是第一个从肿瘤细胞培养上清液中分离而得的具有强力致血管生成效应的活性蛋白质[1],它广泛存在于多种肿瘤组织中,在肿瘤发生的不同阶段刺激新生血管的形成[2],如果能够有效地抑制或封闭ANG基因的表达,就有可能影响肿瘤诱导的血管生成,达到抑制肿瘤生长的目的。我们采用阳离子脂质体介导人ANG反义寡聚核苷酸转染人肺癌A549细胞株,并对转染程序优化,以期得到最佳转染效率,同时观察其对细胞中ANG蛋白表达及细胞外分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 反义核酸

ANG反义核酸互补于ANG mRNA,含AUG起始密码部位,序列为5′-GCC CAT CAC CAT CTC TTC-3′,均采用硫代磷酸化修饰,由上海生工公司合成、纯化、分装、-20 ℃保存待用。A549细胞株由本院呼吸科实验室提供。

1.2 细胞培养

A549细胞采用含10%小牛血清(60℃灭活1 h)的RPMI1640完全培养基(GIBCO/BRL USA)培养,置于37℃、5%二氧化碳、饱和湿度的恒温孵箱中培养,实验选用对数生长期细胞。

1.3 优化脂质体转染程序

1.3.1 转染时限优化 将A549细胞接种于60 mm培养平皿中,用经验选择的脂质体(GIBCO/BRL USA)用量(15 μl脂质体)及说明书中要求的反义核酸用量(2 μg)来转染细胞,分别在转染6、8、10、12、14 h等5个时相点各取1个平皿消化计数,台盼蓝拒染法判断细胞活性,以确定最佳转染时限。

1.3.2 转染时脂质体用量优化 接种细胞,采用说明书上的反义核酸用量来转染细胞,在每孔中分别加入2.5、5.0、7.5、10.0(ml/L)的脂质体,通过Dot-ELISA的方法来确定脂质体的最佳用量。

1.4 脂质体介导ANG反义核酸转染A549细胞

按照脂质体转染说明书及上述优化结果进行转染,同时设定空白对照组。

1.5 A549细胞内ANG蛋白检测

采用SABC试剂盒(LAB VISION USA)通过免疫组化来检测细胞内ANG蛋白表达情况。

1.6 培养基中ANG水平的ELISA分析

消化每孔细胞并计数,收集转染组与对照组的培养基,离心(12 000 r/min, 6~8 min),取其上清液与ANG标准品(0, 78.1, 156, 312, 625, 1 250, 2 500, 5 000 pg/ml)加到ELISA试剂盒(R&D System USA)的微量滴定孔中,按程序操作,最后在450 nm处采用HTS7000型酶联仪对平板进行读数,通过与人ANG的标准曲线进行比较后对培养基中ANG水平进行定量分析,然后将求出的浓度比上每孔细胞数得到每细胞数的ANG量。

1.7 统计学分析

采用t检验。

作者简介:唐 敏(1974-),女,重庆市人,硕士研究生,药师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。电话:(023)68753442
通信作者:刘松青,电话:(023)68754438
收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-10-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果

2.1　脂质体介导 ANG 反义寡聚核苷酸转染 A549 细胞的优化

2.1.1　转染时限的优化　在脂质体介导 ANG 反义寡核苷酸转染 A549 细胞的实验中, 当转染时限在 8~10 h 之间, 细胞计数与对照组无显著差别, 台盼蓝染色见细胞活性良好, 10 h 以后则发现细胞活性下降, 细胞数明显减少。

2.1.2　脂质体用量的优化　Dot-ELISA 结果显示, 当细胞数约为 2.0×10^5个, 反义寡核苷酸的浓度为 0.34 μmol/L, 脂质体用量为 5 ml/L 时, 所打的点颜色最淡, 与空白对照组最接近, 即 A549 细胞培养基中 ANG 蛋白浓度最低, 抑制效果最明显, 见图 1。



图 1　"Dot-ELISA"结果　脂质体用量: 5.0、10.0、0、2.5、7.5 ml/L

Fig 1　Results of Dot-ELISA　Dosage of lipofectin: 5.0, 10.0, 0, 2.5, 7.5 ml/L



图 2　未转染的 A549 细胞免疫组化

Fig 2　Immunohistochemistry of untransfected A549 cells



图 3　已转染的 A549 细胞免疫组化

Fig 3　Immunohistochemistry of transfected A549 cells

2.2　对细胞内 ANG 蛋白水平的影响

免疫组化方法检测显示, 脂质体介导 ANG 反义寡核苷酸转染过的 A549 细胞, 部分细胞胞质几乎不着色; 而未转染的空白对照组的 A549 细胞染成明显的棕黄色, 见图 2、3, 二者之间阳性率存在差异。说明 A549 细胞在 ANG 反义核酸转染后, ANG 蛋白表达量降低。

2.3　培养基中 ANG 蛋白浓度的检测

用 HTS7000 型酶联仪于 450 nm 波长对离心后的培养基样品进行检测, 采用 ANG 标准品绘制人 ANG 的标准曲线, 见图 4, 对培养基中 ANG 浓度进行定量, 见表 1。转染过反义寡核苷酸的 A549 细胞, 其培养基中 ANG 蛋白浓度为(63.8±38.9) pg/ml; 空白对照组的培养基中 ANG 蛋白浓度为(211±81.8) pg/ml, 数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 二者比较有显著性差异($P<0.05$)。

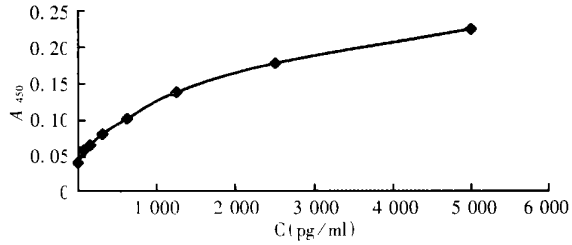


图 4　人 ANG 标准曲线图

Fig 4　Standard curve of human ANG

表 1　培养基中 ANG 浓度的 ELISA 检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Result of ANG concentration in medium detected by ELISA($\bar{x}\pm s$)

Group	n	ANG Concentration(pg/ml)	P
Transfected	16	63.8±38.9	$P<0.05$
Untransfected	16	211.0±81.8	$P<0.05$

3　讨论

恶性肿瘤尤其是实体肿瘤的发生、发展依赖于新生血管的不断形成, 通过新生毛细血管为肿瘤提供必需的营养, 带走肿瘤代谢产物, 为肿瘤发展、转移提供必要条件。因此抑制肿瘤血管生长, 从而间接杀伤肿瘤细胞, 成为治疗肿瘤的另一种策略[3]。在肿瘤相关的血管生成因子中, 血管生成素(ANG)是非常重要的因素, 它作为肿瘤细胞分泌的一种强效的致血管生成因素, 在不同组织学类型的人类肿瘤的形成中起着最基本的作用。而且, 肿瘤患者血液中 ANG 水平高低与肿瘤的恶性程度密切相关[4]。ANG 拮抗剂, 包括特异性单抗及可溶性的结合蛋白—肌动蛋白等等可阻碍人类肿瘤在无胸腺小鼠体内的生长, 组织学分析显示这些拮抗剂可以减少或清除肿瘤组织中的新生血管[5]。这提示 ANG 参与了最初的血管生成, 这对于肿瘤的生长是至关重要的。抗 ANG 治疗对于临床多种疾病, 尤其是癌症是非常有益的。传统的 ANG 拮抗剂作用于蛋白水平, 效率低, 还可能引起一些非特异性作用。近来兴起的反义核酸技术为抗血管生成展示了广阔的前景, 其基本原理是通过碱基配对特异性的与某些 DNA 或 RNA 结合, 阻止其复制, 转录和翻译, 从而达到封闭基因和抑制表达的作用。用反义技术拮抗 ANG 的作用点在基因水平, 可以把 ANG 消灭在"萌芽"状态, 具有高效率, 高特异性。

与人 ANG 的 mRNA 含 AUG 起始密码区域互补的 18 mer 反义寡聚核苷酸链, 序列设计为 5′- GCC CAT

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

CAC CAT CTC TTC-3′，经人工合成修饰后，利用脂质体 Lipofectin 介导来转染人肺癌 A549 细胞。本研究首先对转染程序进行了优化筛选，确定了转染的最佳时限是 8～10 h，脂质体用量为 5.0 ml/L 时可将 0.34 μmol/L 的 ANG 反义核酸成功的转染入肿瘤细胞中，并且非常有效的抑制 ANG 蛋白的表达与分泌。转染组与对照组相比较，免疫组化显示前者细胞内 ANG 蛋白表达明显减少，ELISA 分析培养基中 ANG 蛋白分泌量也是前者较后者显著降低。证明了人 ANG 反义核酸可有效封闭肿瘤细胞中 ANG 蛋白的表达与分泌。目前研究发现，肿瘤相关的致血管生成因子种类较多，如 VEGF，bFGF 等，因此，联合应用针对各种不同致血管生成因子设计的反义核酸可能更大程度，更有效的拮抗肿瘤诱导的血管生成。

参考文献：

[1] Fett J W, Strydom D J, Lobb R R, *et al*. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells[J]. Biochemistry, 1985, 24(20): 5 480－5 486.
[2] Moenner M, Gusse M, Hatzi E, *et al*. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis[J]. Eur J Biochem, 1994, 226(2): 483－490
[3] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors[J]. Science, 1987, 235(4 787): 442－447
[4] Choprav, Dinh T V, Hannigan E V. Serum levels of interlukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1997, 123(3): 167－172
[5] Karen A O, James W F, Thayer C F. Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(2): 442－446

（编辑 张 宁）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)11-1292-02

Rh 新生儿溶血病换血治疗 1 例

A case report of exchange blood for treating Rh hemolytic disease of newborn

何 静[1]，陈方祥[1]，马贵山[1]，罗 梅[1]，李华强[2] （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所：[1] 输血科；[2] 小儿科，重庆 400042）

我院于 2000 年 11 月 2 日检测到 1 例高胆红素血症患儿，为母婴 Rh 血型不合，产生抗 D 抗体，效价为 64，经换血治疗痊愈出院，现报告如下。

1 病例摘要

产妇余某某，女，27 岁，于 2000 年 11 月 1 日在重庆市某医院经剖腹产娩出一子，1 min 及 5 min Apgar 评分为 10 分，出生体重为 3 650 g，羊水清亮，脐带及胎盘正常。当晚皮肤黄染，且进行性加重。前来我院就诊。妊娠史，孕 2 产 0 剖 1，1999 年人工流产 1 次。未做产前抗体监测。

患儿余某之子新生儿，2000 年 11 月 1 日 21：51 入我院儿科，查体 T 36.8 ℃，脉搏 112 次/min，呼吸 44 次/min，发育正常。新生儿溶血病三项实验阳性，血清抗 D 效价为 64，总胆红素 391 μmol/L，间接胆红素 381.85 μmol/L，血常规：WBC 19.6×10^9/L，RBC 2.98×10^{12}/L，Hb 112 g/L，HCT 0.3，PLT 223×10^9/L。11 月 2 日，总胆红素增加到 509.14 μmol/L，Hb 降至 92 g/L，RBC 减少到 2.5×10^{12}/L，Hct 0.264，经专家会诊，诊断明确，需立即换血治疗。1 月 3 日 22：30 入手术室行换血手术。剪开脐静脉扎结线，行脐静脉插管，插管顺利，反复缓慢抽取患儿血液 10～21.5 ml，注入相近量 A 型 Rh 阴性血液，其中间断注入生理盐水、肝素（生理盐水 100 ml，加入肝素 3 万单位 ml），术中换出血液 326 ml，注入 Rh 阴性血液 317 ml，患儿心率维持在 132～148 次/min，心音有力，分别在换血前、换血 200 ml 及换血完毕留取血标本，做血清学及胆红素检查。1：14 时手术结束，结扎脐带，局部消毒后，安全返回病房。

2 实验室检查

患儿 A 型 CcDE、产妇余某血型 A ccddE、其丈夫血型 A CcDE。患儿直接抗人球蛋白实验 4＋。患儿血清及 RBC 释放液（56 ℃热放散）、母亲血清与谱细胞反应结果详见表 1。

表 1 患儿与母血清抗体鉴定

谱细胞	与患儿血清反应			与患儿 RBC 释放液反应			与母亲血清反应		
	酶	37 ℃盐水	抗人球	酶	37 ℃盐水	抗人球	酶	37 ℃盐水	抗人球
CCDee	4＋	0	4＋	4＋	0	4＋	4＋	0	4＋
CcDE	4＋	0	4＋	4＋	0	4＋	4＋	0	4＋
Ccddee	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CcddE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
自身细胞	0	0	0	0	0	0	0	0	0

作者简介：何 静（1964－），女，湖南省长沙市人，主管技师，主要从事输血前检验、血液成分和自体输血临床应用方面的研究，发表论文 5 篇。电话：（023）68757634

收稿日期：2001-07-16；修回日期：2002-01-08

（下转 1298 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net