

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2008)03-0227-04

反义抑制 Survivin 表达对槲皮素诱导肝癌 SSMC-7721 细胞凋亡的影响

李安强¹, 郭天康², 李荣范², 顾远晖², 蔡辉²(¹ 兰州大学临床医学院, 兰州 甘肃 730000, ² 甘肃省人民医院普通外科, 兰州 甘肃 730000)

Effect of survivin expression inhibition with antisense oligodeoxynucleotides compound on apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line SSMC-7721 induced with quercetin

LI An-Qiang¹, GUO Tian-Kang², LI Rong-Fan², GU Yuan-Hui², CAI Hui²¹ Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China, ² Department of General Surgery, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 AIM: To inhibit the expression of survivin with antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) compound, and then to study its effect on apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line SSMC-7721 induced with quercetin. **METHODS:** Human hepatocellular carcinoma cell line SSMC-7721 was cultured *in vitro*, and the cells in logarithmic growth phase were used. The whole experiment was divided into two parts - I and II. In part I, the cells were divided into blank control group, Lipofectamine^{TM2000} group, 400 μmol/L SODN compound group, 400 μmol/L ASODN compound group, and the ODN compound was transfected into SSMC-7721 cells mediated by Lipofectamine^{TM2000} for 48 h; In part II, the cells were divided into blank control group, 40 μmol/L quercetin group, Lipofectamine^{TM2000} group, SODN compound group, ASODN compound group, ASODN compound combined with quercetin group. The changes of survivin protein and mRNA expression at the end of part I were assessed by cell immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. At the end of part II, the changes of morphology of SSMC-7721 cells were observed with AO staining, and the growth inhibition rate was measured by MTT, and the apoptosis rate of SSMC-7721 cells was measured by the flow cytometry with Annexin-V/PI staining. **RESULTS:** The expressions of survivin mRNA and its protein were significantly down-regulated by transfecting ASODN compound for 48 h ($P < 0.01$). In ASODN

compound combined with quercetin group: the typical morphological changes of cell apoptosis were observed; and the apoptotic cell number was increased significantly; The growth inhibition rate and the apoptosis rate of SSMC-7721 cells were higher significantly than that in other groups ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** ASODN compound can efficiently inhibit expression of survivin gene. Inhibiting the expression of survivin in SSMC-7721 cells with ASODN compound could promote the growth inhibition and apoptosis of the cells induced with quercetin, which may be related to its inhibitory effect on expression of survivin gene.

【Keywords】 antisense oligodeoxynucleotides; quercetin; liver neoplasms; apoptosis; cell cycle; survivin

【摘要】目的: 采用 Survivin 反义寡核苷酸(ASODN)复合物抑制 survivin 的表达, 研究其对槲皮素诱导肝癌 SSMC-7721 细胞凋亡的影响。方法: 体外培养人肝癌 SSMC-7721 细胞, 取对数生长期细胞进行实验。实验分 I、II 两部分: I 分为空白对照组(设平行组)、等量脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 对照组、400 μmol/L SODN 复合物组、400 μmol/L ASODN 复合物组(设平行组)转染 48 h; II 弃掉 I 部分各组培养液, 换新指定培养液, 分为空白对照组、40 μmol/L 槲皮素组、脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 组、SODN 复合物组、ASODN 复合物组、ASODN 复合物 + 40 μmol/L 槲皮素组(联合组)孵育细胞 24 h 后检测。I 结束时采用 RT-PCR、细胞免疫组化染色检测各组 SSMC-7721 细胞 survivin 表达变化; II 结束时用吖啶橙染色法观察细胞凋亡时形态变化, MTT 法检测 SSMC-7721 细胞生长抑制率, Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测 SSMC-7721 细胞凋亡率。结果: ASODN 复合物作用肝癌 SSMC-7721 细胞 48 h 后能下调 survivin mRNA 及 Survivin 蛋白的表达 ($P < 0.01$); 与其他组比较, 联合组 AO 染色图片可观察到凋亡小体等典型的细胞凋亡形态特征变化且凋亡细胞数量明显增多, 并用 MTT 法、Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测显示联合组细胞的生长抑制率增高 ($P < 0.01$)、细胞凋亡率提高 ($P < 0.01$)。结论: ASODN 复合物可有效抑制肝癌 SSMC-7721 细胞 survivin 基因的表达; ASODN 复合物能增强槲皮素对 SSMC-7721 细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用即二者具有协同作用, 该作用可能与抑制 survivin 基因的表达有关。

【关键词】 反义寡核苷酸; 槲皮素; 肝肿瘤; 细胞凋亡; 细胞周期; Survivin

【中图分类号】 Q786 **【文献标识码】** A

收稿日期 2007-10-15; 接受日期 2007-11-09

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (3ZS-A25-106)

通讯作者: 郭天康. Tel (0931) 8281969 Email zaialon@yahoo.com.cn

作者简介: 李安强. 硕士生(导师郭天康). Tel (0931) 8281780

Email anqiang333@sohu.com

0 引言

肝癌(hepatic carcinoma, HCC)是世界范围内发病率较高的恶性肿瘤之一,对于大多数肝癌患者,经肝动脉化学药物栓塞治疗和全身化疗仍是最常用的治疗方法。近年来抗凋亡机制在肿瘤细胞耐药性发生中的作用倍受关注^[1]。survivin 是 1997 年由 Ambrosini 等^[2]发现, Ito 等^[3]报道 Survivin 蛋白对破坏肝癌细胞增生凋亡平衡、促进肝癌细胞快速增生具有重要作用。槲皮素(quercetin, Quc)是广泛分布于蔬菜、水果、中草药等的一种天然的黄酮类化合物,化学名为 3,3',4',5',7-五羟基黄酮。Lopez-Lazaro 等^[4]研究表明, Quc 没有毒副作用。近年来的研究表明 Quc 在体外、动物实验模型中均显示出抗癌活性^[4-6]。本实验旨在研究反义抑制 survivin 的表达,检测其对 Quc 抑制肝癌 SSMC-7721 生长和诱导细胞凋亡的影响,探讨反义抑制 survivin 的表达是否在体外可增强 Quc 抗癌作用及可能的机制,为其进一步动物实验和临床应用提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 SSMC-7721 兰州大学医学实验中心提供。RPMI-1640 (Sigma 公司),小牛血清(杭州四季清公司),槲皮素(Sigma 公司,用前以少量 DMSO 溶解,用时加 RPMI-1640 稀释至使用浓度),MTI (Sigma 公司), Trizol (BBI 公司),Survivin 蛋白一抗兔抗人抗体、二抗羊抗兔抗体(北京中山公司),TaKaRa 试剂盒(宝生物工程公司),Annexin-V/PI 试剂盒(宝灵试剂公司),阳离子脂质体 Lipofectamine^{TM2000} (Invitrogen 公司),寡核苷酸(ODNs)-脂质体(Lip)转染复合物 survivin 正、反义寡核苷酸的设计、合成:根据 survivin 的基因序列(GenBank Accession Number U75285),应用 Primer5.0 软件设计互补于 survivin mRNA 的 232-251 序列的 20 个碱基组成的 ASODN 链 5' CC C AGCCTTCCAGCTCCTTG 3',同时合成正义链 5' CGCAGTAGCTGCGCTGATTG 3',两条链均采用硫代磷酸化修饰。在 GenBank 中证实反义寡核苷酸(ASODN)及正义寡核苷酸(SODN)与任何已知哺乳动物基因无匹配,上海生工公司合成。用 Lipofectamine^{TM2000} 输送 ODNs,依文献[7] ODNs/Lipo^{TM2000} = 4 g/L 配置 ODNs-Lipo^{TM2000} 转染复合物,按脂质体转染试剂盒说明书进行操作。

1.2 方法

取对数生长期的 SSMC-7721 细胞,消化、收集、计数并接种于 96 孔或 6 孔培养板或 100 mL 细胞培养瓶。

1.2.1 分组

实验分 I, II 两部分:I 分为空白对照

组(设平行组),等量脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 对照组、400 μmol/L SODN 复合物组、400 μmol/L ASODN 复合物组(设平行组)转染 48 h; II 弃掉 I 部分培养液,换新指定培养液,分为空白对照组、40 μmol/L 槲皮素组、脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 组、SODN 复合物组、ASODN 复合物组、ASODN 复合物 + 40 μmol/L 槲皮素组,孵育细胞 24 h 后检测。

1.2.2 RT-PCR 检测 SSMC-7721 细胞 survivin mRNA 表达变化

在实验 I 部分结束时,按 Takara 试剂盒操作说明书进行,收集各组细胞,Trizol 提取总 RNA,用紫外分光光度计检验纯度并定量。设 β-actin 为内参照,对样品模板用量标准化, survivin 和 β-actin 分管扩增,引物由上海生工公司合成。其序列如下: survivin 引物序列 5' AAAGAGCCAAGAACAAAATTGC 3'(F)和 5' GAGAGAGAAGCAGCCACTGTAC 3'(R), 338 bp; β-actin 引物序列 5' CTTCTACAATGAGCTGCGTG 3'(F)和 5' TCATGAGGTA GTCAGT-CAGG 3'(R), 243 bp。10 μL 逆转录体系用于逆转录合成 cDNA, 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min 完成逆转录。10 μL cDNA 用于 PCR 反应,分别单独加入相应上下游引物等在 50 μL PCR 反应体系进行 PCR 反应。94℃ 预变性 2 min 后进入 PCR 循环,条件: survivin 和 β-actin 94℃ 变性 30 s, 54℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环。RT-PCR 产物 8 μL 在 18 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,经凝胶图像分析仪分析结果,以 survivin 与 β-actin 的比值作为 survivin mRNA 表达的相对含量。

1.2.3 细胞免疫组化染色检测 SSMC-7721 细胞 Survivin 蛋白表达变化

取对数生长期细胞于预先置入盖玻片 6 孔板进行细胞爬片,在实验 I 部分处理结束时,取出各组爬片细胞, PBS 液轻轻漂洗, 750 mL/L 乙醇固定,按试剂盒操作步骤进行细胞免疫染色。以正常鼠血清和磷酸盐缓冲液分别代替一抗行替代对照和空白对照。于普通光学显微镜下观察,以细胞核或细胞质出现棕褐色或棕黄色颗粒为阳性。随机选取 5 个高倍视野进行计数,每个高倍视野计数 100 个细胞,共 500 个细胞,计算细胞 Survivin 蛋白阳性表达率。

1.2.4 吖啶橙(AO)染色法观察细胞凋亡时形态变化

消化、收集实验 I, II 两部分处理的各组细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,制成单细胞悬液,浓度 10¹⁰ 个/L, 750 mL/L 乙醇固定 4 h,离心弃乙醇,加入 8.5 mg/L 的 AO 2 mL 工作液,室温染 10 min 后,滴几滴在载玻片,加缓冲甘油封片。在荧光显微镜下用吸收波长 405 nm,发射波长 550~630 nm 观察,并随

机拍照。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖变化 取对数生长期的 SSMC-7721 细胞, 消化、收集、计数并接种于 96 孔板, 每孔 2×10^3 个, 并设 3 个复孔。实验设数个平行板, 分 I, II 两部分, 到实验预定前 4 h 加 5 g/L 的 MTT 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 弃掉 MTT, 加 200 μ L DM-SO, 轻轻振荡 10 min, 使结晶溶解, 酶标仪检测 570 nm 波长 A 值。计算细胞生长抑制率 (inhibitory rate, IR)。重复 2 次, 取平均值。IR (%) = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率 消化、收集经实验 I, II 两部分各处理组细胞, 按 Annexin-V 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗, 加入 Binding buffer 缓冲液 200 μ L, Annexin-V/FITC (20 mg/L) 10 μ L 和 PI 液 (50 mg/L) 5 μ L, 室温避光孵育 30 min 后加入 Binding buffer 缓冲液 300 μ L, 立即用流式细胞仪 FACSscan (Beclon Dickison 公司) 测定, 经计算机软件处理, 计算凋亡细胞百分率, 实验重复 2 遍。

统计学处理: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 采用单因素方差分析, 并进行两两比较 (q 检验)。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

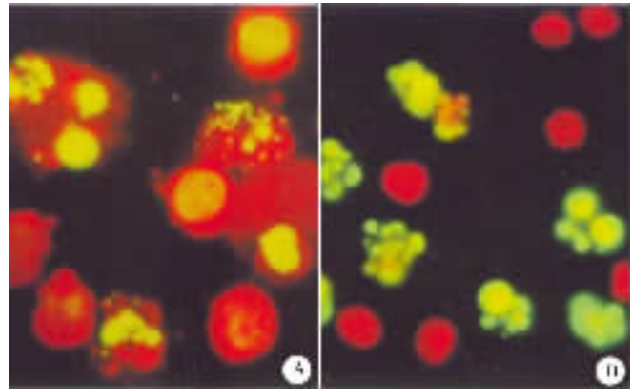
2 结果

2.1 ASODN 反义复合物对肝癌 SSMC772 细胞 survivin mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测 survivin mRNA 水平显示 400 nmol/L ASODN 反义复合物组 (0.21 ± 0.03) 较空白对照组 (0.99 ± 0.02)、等量脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 对照组 (0.94 ± 0.03), 400 nmol/L SODN 复合物组 (0.94 ± 0.03) RT-PCR 扩增的条带减弱 ($P < 0.01$)。通过计算机图像分析结果表明 400 nmol/L ASODN 反义复合物组与空白对照组、等量脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 对照组、400 nmol/L SODN 复合物组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 其他各组间相比较差异无统计学意义。

2.2 ASODN 反义复合物对肝癌 SSMC772 细胞 Survivin 蛋白表达的影响 细胞免疫组化染色结果显示, 400 nmol/L ASODN 反义复合物组 (19.7 ± 3.7)% 较空白对照组 (76.5 ± 8.7)%、等量脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 对照组 (74.5 ± 8.2)% 400 nmol/L SODN 复合物组 (73.9 ± 7.9)% Survivin 蛋白表达明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 细胞凋亡形态学变化 ASODN 反义复合物联合槲皮素组凋亡细胞数量明显较空白对照组、等量脂

质体 Lipofectamine^{TM2000} 对照组、SODN 复合物组、ASODN 复合物组及槲皮素组增加, 活细胞核呈黄绿色荧光, 胞质成红色荧光。凋亡细胞核染色质呈黄绿色浓聚在核膜内侧, 可见细胞膜呈泡状膨出及凋亡小体等典型改变 (图 1)。



A: 空白对照; B: ASODN + 槲皮素。
图 1 细胞凋亡情况 AO $\times 40$

2.4 MTT 法检测 SSMC-7721 细胞增殖变化 ASODN 复合物组 (28.4%) 或槲皮素组 (43.1%) 可抑 SSMC-7721 细胞增殖 ($P < 0.01$), 而脂质体组 (1.7%) 则无此效, ASODN 反义复合物联合槲皮素时表现出协同抑制细胞增殖作用 (69.8%), 两药联合对细胞的增殖抑制效果高于单用 ASODN 复合物组 (28.4% $P < 0.01$) 和槲皮素组 (43.1% $P < 0.01$)。

2.5 细胞凋亡率的变化 与空白对照组、脂质体对照组相比, ASODN 复合物组、槲皮素组、ASODN 复合物 + 槲皮素组均能诱导细胞凋亡, 且其诱导细胞凋亡率 (Annexin(+)PI(-)) 分别是脂质体组的 3.1 倍、4.3 倍、18.2 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), ASODN 复合物联合槲皮素组与 ASODN 复合物组、槲皮素组比较, 其诱导细胞凋亡率分别是他们的 5.9 倍、4.2 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并且各组间流式细胞仪检测时损伤率 (Annexin(+)PI(+)) 无统计学意义 (表 1)。

表 1 各组细胞凋亡率变化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Annexin(+)PI(-)	Annexin(+)PI(+)
	空白对照	0.32 ± 0.01^d
脂质体	0.31 ± 0.02^d	2.18 ± 0.19
SODN 复合物	0.33 ± 0.03^d	2.17 ± 0.19
ASODN 复合物	24.2 ± 0.85^{bd}	2.09 ± 0.14
槲皮素	37.5 ± 0.95^{bd}	2.05 ± 0.12
ASODN 复合物 + 槲皮素	67.8 ± 1.36^d	2.12 ± 0.16

^b $P < 0.01$ vs 空白; ^d $P < 0.01$ 其他 vs ASODN 复合物 + 槲皮素。

3 讨论

Survivin 的组织分布特征具有明显的选择性,其表达于胚胎和发育的胎儿组织,但不见于终末分化的成人组织(胸腺、生殖腺除外),而表达于大多数肿瘤组织中^[8-9],使它成为一个癌分子标志和治疗靶点。研究发现, Survivin 能够通过杆状病毒 IAP 重复序列(BIR)作用于 Caspase-3, Caspase-7 来抑制凋亡蛋白酶活性,阻止多种凋亡信号诱导的细胞凋亡,而且能在细胞有丝分裂前期通过与纺锤体微管发生特异性结合反应,使肿瘤细胞逃避细胞周期 G2/M 期检测点的监控,抵抗因 DNA 损伤或突变自身诱导的细胞凋亡,从而导致肿瘤细胞异常分裂增殖^[10],另外 Survivin 蛋白亦可通过 p21 蛋白间接抑制 caspase 酶而起作用,阻断细胞的凋亡过程,其抑制细胞凋亡的作用远远大于 bcl-2 家族成员,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。Survivin 的高表达可以使肿瘤细胞免受各种凋亡信号的刺激而帮助细胞存活^[11-12]。槲皮素(Quercetin)是具有多种生物活性的黄酮类化合物,其维生素 P 样的作用已应用于临床。国内外已有研究显示,槲皮素是目前已知的最强的抗癌剂之一,能够诱导多种肿瘤细胞凋亡^[13],同时槲皮素还有抗炎、抗过敏、抗氧化、降血脂、降压等生理活性。本实验应用反义核酸技术,用脂质体 Lipofectamine^{TM2000} 介导人工合成的特定 DNA 片段 ASODN 分子转染 SSMC-7721 细胞,人工合成的特定 DNA 片段 ASODN 分子与进入细胞质的 survivin mRNA 上的特定位点相结合,形成 DNA-RNA 复合物,抑制 survivin mRNA 与核糖体结合,同时激活 RNA 降解酶 H,降解 survivin mRNA,从而抑制或封闭基因的表达,干扰 survivin 致病蛋白的产生^[14]。实验结果显示, ASODN 复合物作用于肝癌 SSMC-7721 细胞 48 h 后,采用 RT-PCR 和细胞免疫组化检测示与空白对照组比较, ASODN 复合物组 survivin mRNA、Survivin 蛋白表达明显下调,而等量脂质体组、SODN 复合物组 survivin mRNA、Survivin 蛋白表达变化差异则无统计学意义,实验证明了 ASODN 复合物可有效抑制 survivin 基因的表达。实验进一步用等剂量的槲皮素(亚致死浓度)处理实验 I 部分各实验组肝癌 SSMC-7721 细胞 24 h 后,实验结果显示,与其它组比较, ASODN 复合物 + 40 μmol/L 槲皮素组(联合组) AO 染色法观察在相同条件联合组满视野见典型细胞凋亡形态学变化且凋亡细胞数量明显增加, MTT 法、Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测示在同等条件联合组细胞生长抑制率和细胞凋亡率明显高于其它组,差异有统计学意义。也就是有效封闭肝癌 SSMC-7721 细胞 survivin 基

因的表达能增强槲皮素对该细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用即 ASODN 反义复合物联合槲皮素对肝癌 SSMC-7721 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用具有协同效应。实验结果还表明, SSMC-7721 细胞 survivin 基因表达降低后,其抗凋亡能力被有效抑制了,推测联合组对肝癌细胞的协同细胞毒性导致的凋亡可能是通过两个凋亡途径的共同通路^[15]即激活 Caspase 效应子而实现的。至于是通过死亡受体途径还是通过线立体途径介导的凋亡有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Huang Y, Ibrado AM, Reed JC, et al. Co-expression of several molecular mechanisms of multidrug resistance and their significance for paclitaxel cytotoxicity in human AML HL-60 cells [J]. *Leukemia*, 1997, 11(2): 253-257.
- [2] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, et al. Anovel anti-apoptosis gene surviving, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 927-921.
- [3] Ito T, Shiraki K, Yamanaka T, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2000, 31(5): 1080-1085.
- [4] Lopez-Lazaro M. Flavonoids as anticancer agents: Structure-activity relationship study [J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002 2(6): 691-714.
- [5] Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumor [J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(3): 438-445.
- [6] Shi M, Wang FS, Wu ZZ. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild type P53, GM-CSF and B7-1 gene on hepatocellular cells *in vitro* [J]. *World Gastroenterol*, 2003 9(1): 73-78.
- [7] Dai DJ, Lu CD, Lai RY, et al. Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells [J]. *World Gastroenterol*, 2005, 11(2): 193-199.
- [8] Tong QS, Zheng LD, Chen FM, et al. Selection of optimal antisense accessible sites of survivin and its application in treatment of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol* 2005 11(5): 634-640.
- [9] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer [J]. *Oncogene* 2003 22(53): 8581-8589.
- [10] Johnson AL, Langer JS, Bridgman JT. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptosis protein in granulose cells [J]. *Endocrinology*, 2002 143(9): 405-413.
- [11] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein Survivin inhibits Caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, Capase, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5315-5320.
- [12] Conway EM, Pollefeyt S, Steiner-Mosonyi M, et al. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(2): 619-631.
- [13] Kim WK, Bang MH, Kim ES, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells [J]. *J Nutr Biochem* 2005 16(3): 155-162.
- [14] Green DW, Roh H, Pippin J, et al. Antisense oligonucleotides: An evolving technology for the modulation of gene expression in human disease [J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 191(1): 93-105.
- [15] Gessner PK. Isobolographic analysis of interaction: An update on applications and utility [J]. *Toxicology*, 1995 105(2-3): 161-179.