c-erbB-2 反义寡核苷酸对人卵巢癌 $SKOV_3$ 细胞增殖的抑制作用

吴永忠[1],任庆兰[1],李少林[2]

Inhibitory Effects of c-erbB-2 Antisense Oligodeoxynucleotides Transfection on the Human Ovarian Carcinoma $SKOV_3$ Cell Lines

WU Yong-zhong[1], REN Qing-lan[1], LI Shao-lin[2]

1. *Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing* 400016, *China*; 2. *Department of Nuclear Medicine, The College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*

Abstract: Objective To investigate the proliferating inhibition and the mechanisms of c-erbB-2 antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) transfection on the human ovarian carcinoma $SKOV_3$ cell lines. **Methods** There were 4 groups in our study, blank control group, normal control group, c-erbB-2 sense control group and c-erbB-2 antisense experimental group. In the different time after liposome-mediated transfection, the cell proliferation, apoptosis, protein expressing level were observed by MTT assay, flow cytometry, fluorescent microscope and cloning test. **Results** According to the c-erbB-2 antisense experimental group and the c-erbB-2 sense control group, the OD-value were 0.201 and 1.298 ($P < 0.01$) respectively 72h after transfected; the cloning efficiency were 26.5 % and 76.5 % ($P < 0.05$) respectively; the apoptosis rate were 21.3 % and 7.5 % ($P < 0.05$) respectively; and the level of P185 protein was decreased statistically in ASODN group, respectively. **Conclusion** The study suggested that the proliferation of the human ovarian carcinoma $SKOV_3$ cell lines can be inhibited by the c-erbB-2 ASODN.

Key words: $SKOV_3$ cell lines; Antisense oligodeoxynucleotides; Ovarian carcinoma; c-erbB-2 gene

摘 要:目的 探讨 c-erbB-2 基因反义寡核苷酸转染对人卵巢癌 $SKOV_3$ 细胞增殖的抑制作用及其分子机制。**方法** 实验分空白对照组、正常对照组、c-erbB-2 正义对照组及 c-erbB-2 反义治疗组。脂质体转染后不同时间分别进行 MTT 试验、集落形成试验、荧光显微镜检测、蛋白质荧光强度测定,以观察不同条件处理后各组细胞的增殖、凋亡、蛋白质表达有无差别。**结果** 反义治疗组与正义对照组比较:转染 72h OD 值分别为0.201与1.298 ($P < 0.01$);克隆形成率分别为26.5 %与76.5 % ($P < 0.05$);凋亡率分别为21.3 %与7.5 % ($P < 0.05$),同时明显地下调 c-erbB-2 蛋白质的表达水平 ($P < 0.05$)。**结论** 在卵巢癌的基因治疗中,c-erbB-2 反义寡核苷酸能明显抑制人卵巢癌 $SKOV_3$ 细胞的增殖。

关键词:$SKOV_3$ 细胞;反义寡核苷酸;卵巢癌;c-erbB-2 基因

中图分类号:R737.31 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-8578(2006)10-0707-03

0 引言

卵巢癌已成为女性生殖系统恶性肿瘤死亡的首位原因。美国每年新发病率达到 23 000 例左右[1]。其总的 5 年生存率不到 30 %[2]。近 30 年来,卵巢癌发病率上升了 3 倍,治疗手段虽有改进,疗效却仍然不令人满意。有作者指出生物治疗在卵巢癌的治疗中将起关键性的作用[3],在分子水平上控制卵巢癌的发生发展可能成为最大的希望。本课题采用 c-erbB-2 反义寡核苷酸联合转染的方法,通过一系列实验,在细胞水平观察它们对人卵巢癌 $SKOV_3$ 细胞株增殖的抑制作用及其初步分子机制。

收稿日期:2005-09-29;**修回日期**:2006-02-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070230)

作者单位:1.400016 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科;2.重庆医科大学基础医学院核医学教研室

作者简介:吴永忠(1968-),男,博士,副教授,主要从事肿瘤放射治疗基因增敏的研究

1 材料与方法

1.1 材料

$SKOV_3$ 细胞株购自重庆医科大学基础医学院肿瘤研究室。阳离子脂质体(lipofectin)购自美国 sigma 公司。c-erbB-2 正义脱氧寡核苷酸(SODN)序列为:5′-GGTTCACACGTGGCC-3′,c-erbB-2 ASODN 序列为 5′-CCAAGTGTGCACCGG-3′[4]。所有 SODN 与 ASODN 均由上海生物工业公司合成并全部经硫代磷酸化修饰。RPMI-1640 培养基、小牛血清、各种抗体等试剂均购自美国 hyclone 公司。转染液为自制的无

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血清无抗生素 RPMI-1640 培养液。实验所用仪器均由重庆医科大学分子生物学实验室提供。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　SKOV$_3$细胞在 37 ℃、5 %CO_2条件下、含 10 %小牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养。传代培养时,将处于对数生长期的细胞用 0.25 %胰酶消化 2～5min 后,用 RPMI-1640 培养液终止消化,在低速离心机上 1 500r/ min 离心 5min,弃上清,再用 PBS 液重悬细胞,再离心 5min。利用 ELX800 微孔板读数仪调整细胞浓度后,接种到新的培养瓶。

1.2.2　实验分组 共设立 4 组:0 组:空白对照组,仅予以转染液处理;I 组:正常对照组,阳离子脂质体 lipofectin + 转染液; II组:正义治疗组,c-erbB-2 SODN + lipofectin + 转染液; III组:反义治疗组,c-erbB-2 ASODN + lipofectin + 转染液。

1.2.3　脂质体转染方法　按照产品说明书进行,脂质体与寡核苷酸的比例为 1 ∶4。

1.2.4　MTT 试验　脂质体转染 20h 后再分别培养 24、48、72h。培养 48h 时换液一次。到相应终止时间,弃原培养液,每孔加入转染液 90μl,再加入 MTT(5mg/ ml) 10μl,放入 CO_2孵箱中孵育 4h。弃上清,每孔加入 DMSO 100μl,震荡 10min。酶联免疫检测仪 570nm 波长比色。

1.2.5　平板集落形成试验　脂质体转染 20h 后,吸去上清液,用 0.25 %胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 10^3/ ml。取 9cm 培养皿 24 个,每组 3 个平行皿,分别预置 10ml 普通培养液,做好分组标志。每皿接种单细胞悬液各 200μl,即细胞数为 200 个/ 皿,然后十字方向轻巧晃动培养皿,使细胞分散均匀。将培养皿移入 CO_2孵箱中,37 ℃、5 % CO_2及饱和湿度条件下,静止培养2.5 周。肉眼下计数细胞形成的集落数,对难以判断者,在显微镜下计数 > 50 个细胞的集落数。

集落形成率 (%) = 计数细胞集落数/200 × 100 %。

1.2.6　AO/ EB 荧光染色法检测细胞凋亡　脂质体转染 20h 后,弃上清,加入 RPMI-1640 培养液再培养 72h。培养 48h 时换培养液一次。新鲜配制 AO/ EB 混合液,AO(100μg/ ml) 与 EB(100μg/ ml) 按 1 ∶1混合即可。培养 72h 终止实验,用无菌小镊子取出盖玻片,置于载玻片上,加 AO/ EB 混合液一滴于盖玻片上,荧光显微镜下计数。

凋亡率 (%) = (VA + NVA)/ (VN + NVN + VA + NVA) ×100 %。

1.2.7　流式细胞仪检测 c-erbB-2 蛋白(p185)　脂质体转染 20h 后,弃上清,加入 RPMI-1640 培养液再培养 72h。吸去上清液,常规消化细胞,1 500r/ min 离心 5min,弃上清。用 4 ℃ PBS 重悬细胞后,移至 EP 管中,再次 1 500r/ min 离心 5min。重复上一步一次。各加入 1 %福尔马林液固定 2h,1 500r/ min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤细胞 3 次。各加入 0.5 %皂角素 1ml,室温静置 15min,1 500r/ min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤细胞 3 次。各加入 1 ∶10 鼠抗人单克隆抗体 IgG 50μl,置室温 1h,PBS 洗涤细胞 3 次。各加入 1 ∶5兔抗鼠 FITC 标记的抗体 IgG 10μl,置室温 1h。流式细胞仪检测 c-erbB-2 蛋白的荧光强度。

1.3　统计分析

用 SPSS 10.0 统计软件处理。检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ 检验,计量资料采用 t 检验,$P < 0.05$差异有显著性,$P < 0.01$差异有极显著性。

2　结果

2.1　MTT 试验　转染后 24、48、72h,MTT 检测结果,见表 1。

表 1　不同转染时间的 OD 值比较

Group	24h	48h	72h
0	0.772 ±0.068	1.321 ±0.205	1.519 ±0.257
I	0.689 ±0.059	1.187 ±0.105	1.334 ±0.195
II	0.648 ±0.051	1.065 ±0.113	1.298 ±0.146
III	0.425 ±0.044	0.269 ±0.034	0.201 ±0.025
P	> 0.05	< 0.05	< 0.01

2.2　平板集落形成试验 见表 2。

表 2　各组克隆形成率比较

Group	cloning efficiency(%)	*P*	inhibitory rate(%)
0	89.0 ±3.6		
I	84.5 ±4.2		
II	76.5 ±4.0	> 0.05	9.6
III	26.5 ±4.8	< 0.05	68.6

2.3　荧光染色法检测细胞凋亡结果　见表 3

表 3　荧光显微镜检查结果

Group	Apoptotic rate(%)	*P*
I	5.5 ±3.5	
II	7.5 ±5.6	> 0.05
III	21.3 ±4.2	< 0.05

2.4　流式细胞仪检测 c-erbB-2 蛋白

通过流式细胞仪检测相应蛋白的荧光强度,可反映各组不同作用条件下,对细胞表达抑制程度的强弱,见表 4。

表 4　c-erbB-2 蛋白 p185 荧光强度

Group	Fluorescent intensity	*P*
I	2.8732 ±0.1181	
II	2.4568 ±0.0859	> 0.05
III	1.7864 ±0.0457	< 0.05

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

本研究采用 Kim 等[5]报道的脂质体与核苷酸的配制方法,二者的比例为 1∶4时转染效率最高。根据文献报道,脂质体对细胞的生长有一定的影响,所以在本课题中为了排除脂质体的干扰,正常对照组也给予了脂质体处理。在 MTT 试验和平板集落试验中,我们另设了空白对照组,目的在于判断 Liperfectin 对本组实验的影响。结果表明,在本研究条件下,其影响程度较小。查阅文献,为了比较脂质体介导的不同 ASODN 之间的疗效,一般以脂质体为对照,而非单纯的空白对照。故本研究的其他实验,我们不再给出空白对照组的实验结果。

反义技术是阻断已知基因表达的有效方法,反义靶点的选择尤其重要,同时核苷酸序列碱基数目必须合适(15～20 个碱基)。有研究[6]采用全长 c-erbB2 反义核酸对 $SKOV_3$ 细胞生长抑制率不高,可能是降低了 ASODN 的特异性及对细胞的穿透性从而影响了 ASODN 的最佳发挥。选用针对 c-erbB2 mRNA 5′端编码区互补的 ASODN 5′-CAGCTCCATGGTGCT-3′[7]取得了对卵巢癌细胞增殖的较好抑制率。c-erbB-2 是理想的基因治疗靶点[8]。c-erbB-2 是 EGFR 家族中最重要成员之一,编码 I 型跨膜酪氨酸蛋白激酶型(tyrosine protein kinase, TPK)生长因子受体,分子量为 185 KD,在许多实体肿瘤中呈高表达,并与肿瘤的生物学行为密切相关,是 EGFR 介导的信号转导系统的关键基因之一,c-erbB-2 是近年研究的热点之一[9]。本研究选用的 c-erbB-2 ASODN 与 c-erbB-2 mRNA 5 端编码区互补[4]。

目前研究抗肿瘤药物对细胞增殖抑制作用的方法主要有两类:一是短期增殖抑制试验,包括细胞计数、MTT、^{3}H-TdR 掺入试验;二是持续增殖抑制试验,包括软琼脂糖克隆形成试验、平板集落形成试验。本实验采用 MTT 法和平板集落形成试验来观察 c-erbB-2 反义寡核苷酸联合转染对 $SKOV_3$ 细胞增殖的抑制作用。转染后 24h,即显示出各组 OD 值有明显的不同,反义组对细胞增殖的抑制效果明显强正义治疗组;转染后 72h,各组 OD 值差别更加明显,反义组对细胞增殖的抑制效果更加明显。随着时间的延长,反义治疗组 OD 值进行性降低,降低幅度在转染 48h 时最大。平板集落形成试验结果显示出与 MTT 试验结果具有很好的一致性。

表皮生长因子受体(EGFR)在许多恶性肿瘤中呈高表达,并与肿瘤的发生、转移、预后等有密切关系。c-erbB-2 过表达的卵巢癌病人生存期明显缩短。Wiechen 等[10]针对 c-erbB-2 mRNA 5 端起始编码区下游 33bp 处设计合成硫代反义寡核苷酸,观察其对卵巢癌细胞株 $SKOV_3$ 的影响,结果发现它能降低 p185 蛋白的表达水平,对细胞生长的抑制率达 60 %。本组资料中,为了观察在蛋白水平上的情况,我们采用 Vaughn 等[11]报道的方法,通过流式细胞仪检测相应蛋白的荧光强度,可反映各组不同作用条件下,对细胞中相应基因表达抑制程度的强弱。结果显示 c-erbB-2ASODN 能明显下调 p185 蛋白的表达水平,这可能是其产生增殖抑制效果的分子基础之一。

在卵巢癌的基因治疗中,c-erbB-2 反义寡核苷酸是一种有效的基因治疗手段,具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、下调 p185 蛋白表达的作用。

参考文献:

[1] Wadler S. New developments in treatment of ovarian cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs,2001,10(6):1167-1172.

[2] Harries M, Kaye SB. Recent advances in the treatment of epithelial ovarian cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs,2001,10(9):1715-1724.

[3] Ozols Robert F. Future directions in the treatment of ovarian cancer[J]. Semin Oncol,2002,29(1 supp1):32-42.

[4] Funato T, Kozawa K, Fujimaki S, et al. Increased sensitivity to cisplatin in gastric cancer by antisense inhibition of the HER-2/neu (c-erbB-2) Gene[J]. Chemotherapy,2001,47(4):297-303.

[5] Kim CK, Haider KhH, Choi SH. Nonviral vector for efficient gene transfer to human ovarian adenocarcinoma cells[J]. Gynecol Oncol,2002,84(1):85-93.

[6] Wu L, Wu A, Jiang K, et al. Effect of antisense c-erbB2 on biologic behavior and chemotherapeutic drug sensitivity in human ovarian cancer cells[J]. Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih, 1996,31(3):169-172.

[7] Shen M, Feng YJ, Ge BQ, et al. Effect of Liposome c-erbB2 Antisense oligodeoxynucleotides on human ovarian cancer cells [J]. Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih,1999,34(8):485-487.

[8] Yang SP, Song ST, Tang ZM, et al. Optimization of antisense drug design against conservative local motif in simulant secondary structures of HER-2 mRNA and QSAR analysis[J]. Acta pharmacologica Sinica,2003,24 (9),897-902.

[9] James PV, Joanne S, Samuel D, et al. Inhibition of the erbB2 tyrosine kinase receptor in breast cancer cells by phosphoromonothioate and phosphorodithioate antisense oligonucleotides [J]. Nucleic Acids research,1996,24(22):4558-4564.

[10] Wiechen K, Dietel M. c-erbB-2 antisense phosphorothioate ologodeoxynucleotides inhibit growth and serum-induced cells spreading of $p185^{c\text{-}erbB\text{-}2}$-overexpression ovarian carcinoma cells [J]. Int J Cancer,1995,63(4):604-645.

[11] Vaughn JP, Iglehart JD, Demirdji S, et al. Antisense DNA downregulation of the erbB-2 oncogene measured by a flow cytometric assay[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(6):8338-8342.

[**编辑**:安 凤]

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net