

· 论 著 ·

## 存活蛋白反义寡核苷酸对 XWLC-05 细胞的影响\*

王巍炜<sup>1</sup>, 李高峰<sup>1</sup>, 洪志鹏<sup>2△</sup>, 郭刚<sup>1</sup>, 叶联华<sup>1</sup>, 陈楠<sup>1</sup>

(1. 昆明医学院第三附属医院胸外科/云南省肿瘤医院肺癌研究中心, 昆明 650118; 2. 昆明医学院第一附属医院胸外科, 昆明 650032)

**摘要:**目的 研究存活蛋白反义寡核苷酸对宣威肺腺癌细胞株(XWLC)-05 增殖、凋亡及细胞周期的影响。方法 通过设计合成 XWLC-05 靶向存活蛋白反义寡核苷酸。将其分为对照组、单纯脂质体组(Lip 组)、正义寡核苷酸转染组(Lip-SODN 组)、反义寡核苷酸转染组(Lip-ASODN 组)。转染 48 h 后, 蛋白质印迹法检测各细胞组中存活蛋白表达情况, 流式细胞仪检测各细胞组凋亡率。结果 转染后的 XWLC-05 存活蛋白表达明显下降。Lip-ASODN 组细胞在 12、24、48 h 凋亡率分别为  $3.01 \pm 0.26$ 、 $7.89 \pm 2.63$ 、 $17.24 \pm 3.92$ , 明显高于其他组( $P < 0.05$ )。结论 存活蛋白反义寡核苷酸转染能下调宣威肺腺癌细胞株 XWLC-05 存活蛋白表达, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖。

**关键词:**腺癌; 存活蛋白; 寡核苷酸, 反义; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)31-3129-03

## Effects of survivin antisense oligonucleotide on XWLC-05 cells\*

Wang Weiwei<sup>1</sup>, Li Gao Feng<sup>1</sup>, Hong Zhi Peng<sup>2△</sup>, Guo Gang<sup>1</sup>, Ye Lianhua<sup>1</sup>, Chen Nan<sup>1</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Institute of Lung Cancer Research Center, Kunming, Yunnan 650118, China; 2. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effects of survivin antisense oligonucleotide on the proliferation, apoptosis and cell cycle of the Xuanwei lung carcinoma cells (XWLC)-05. **Methods** Targeted antisense oligonucleotide survivin was designed and constructed firstly. XWLC-05 were classified into 4 groups: control group, liposome-alone group (lip group), sense oligonucleotide (Lip-SODN group) and antisense oligonucleotide group (Lip-ASODN group). Western blot was applied for detecting the expression of survivin in 4 groups after transfection for 48 h under the same condition. The apoptosis rate (AR) was examined by flow cytometry. **Results** The expression of survivin in XWLC-05 cells decreased significantly in Lip-ASODN group. The AR of Lip-ASODN was  $3.01 \pm 0.26$  on 12 h,  $7.89 \pm 2.63$  on 24 h and  $17.24 \pm 3.92$  on 48 h respectively. The AR of Lip-ASODN group was significantly higher than that of the other group ( $P < 0.05$ ), and the inhibitory rate (IR) of lip-ASODN group was significantly higher than that of other groups also ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The antisense oligonucleotide transfection of XWLC-05 cells will lead to decrease of survivin expression and this may induce lung carcinoma cell apoptosis and inhibit proliferation at the same.

**Key words:** adenocarcinoma; survivin; oligonucleotides, antisense; apoptosis

在分子生物学技术基础上建立起来的基因靶向治疗具有更好的特异性和高效性, 已经成为研究的热点。宣威地区是云南乃至全国肺癌高发区之一, 流行病学研究显示其高发人群主要为农民, 组织学类型以腺癌为主, 女性肺癌患者比例高于普通人群。如何提高该部分人群肺癌的防控和治疗已成为急待解决的问题。前期研究表明宣威女性肺癌、腺癌患者中存活蛋白明显高于云南其他地区<sup>[1]</sup>。反义寡核苷酸技术是基因沉默的有力手段之一, 在多个国内外实验研究中已经被证实<sup>[2-3]</sup>, 本研究尝试应用该技术阻断存活蛋白的基因表达, 并且观察其对宣威肺腺癌细胞株(XWLC)-05 凋亡的影响, 为今后女性肺癌患者的个体化治疗提供思路。

## 1 材料与方

**1.1 材料** XWLC-05 由昆明医学院第一附属医院肿瘤研究所惠赠。针对存活蛋白 mRNA 设计反义寡核苷酸序列, 序列为 5'-CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3', 正义寡核苷酸序

列为 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3', 两条序列两端均有 5 个碱基经硫代修饰对抗核酸酶的降解。经计算机网上检索证实其与存活蛋白以外的已知人类基因无同源性。由上海生物工程公司帮助合成。阳离子脂质体 Lipofectin 购于 Invitrogen 公司。存活蛋白抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体购于 Santa Cruz 公司。RPMI1640 和小牛血清清于福州迈新生物技术开发有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及转染** XWLC-05 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 按要求在 37 °C 的条件下培养。采用对数生长期细胞, 细胞贴壁生长, 隔日换液并传代 1 次。将脂质体分别与正、反义寡核苷酸混合, 制成脂质体-寡核苷酸复合物。完成后建立 3 组细胞: 单纯脂质体组(Lip 组)、正义寡核苷酸转染组(Lip-SODN 组)、反义寡核苷酸转染组(Lip-ASODN 组), 其中 Lip-SODN、Lip-ASODN 浓度均为 400

nmol/L。另设对照组。每组设 3 个复孔。按试剂盒说明进行操作转染细胞,48 h 后收集各组细胞用于后续实验。

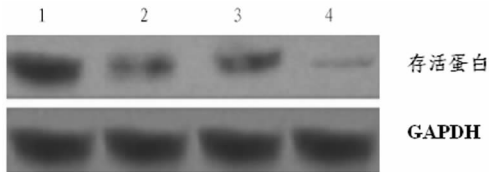
**1.2.2 蛋白质印迹法检测细胞存活蛋白表达** 将 4 °C 的匀浆缓冲液缓慢加入经磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗的培养细胞中,冰上刮取收集细胞,冰水中超声 10 s,共 3 次,测定蛋白浓度,以 100 μg/孔上样,15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶电泳分离,通过电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜。将硝酸纤维素膜置封闭液中室温孵育 3 h 后,加入一抗(兔抗人存活蛋白抗体),4 °C 孵育过夜, TBST 充分漂洗,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-AP,37 °C 作用 2 h, TBST 漂洗,四唑硝基蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐(NBT/BCIP)显色后观察结果。

**1.2.3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率** 将适量的细胞移入 1.5 mL 离心管中,4 °C 下 1 000 r/min 离心 8 min,冰预冷的 PBS 液将沉淀细胞洗 2 次,保证每管细胞数至少 10<sup>6</sup> 个细胞。加入新鲜配制的碘化丙啶染液 1 mL(1 g/L),轻微振荡后置于室温避光处染色 20 min 后检测细胞凋亡率。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 软件,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较应用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 转染后 XWLC-05 细胞存活蛋白表达变化** Lip-ASODN 组存活蛋白表达下调,与其他各组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );对照组、Lip 组、Lip-SODN 组存活蛋白表达无明显改变,见图 1、2。



1:对照组;2:Lip组;3:Lip-SODN组;4:Lip-ASODN组。

图 1 转染后各组存活蛋白表达变化

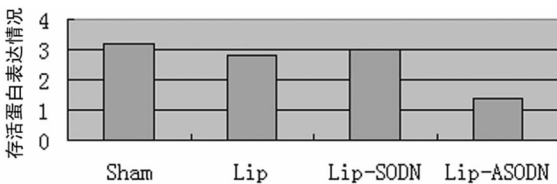


图 2 转染后各组存活蛋白表达变化的柱形图

表 1 各组 XWLC-05 细胞的凋亡率情况(%, n=5)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	0.67±0.23	1.21±1.51	1.35±0.12
Lip 组	0.64±0.19	1.11±2.22	1.39±0.15
Lip-SODN 组	0.68±0.24	1.30±1.97	1.36±0.21
Lip-ASODN 组	3.01±0.26*	7.89±2.63*	17.24±3.92*

\*:  $P < 0.05$ , 与同时间其他各组比较。

**2.2 转染对 XWLC-05 细胞周期及细胞凋亡的影响** 细胞周期分析显示转染后 Lip-ASODN 组 G<sub>1</sub> 期细胞显著减少, G<sub>1</sub> 峰左侧出现明显的凋亡峰(亚二倍体峰), Lip-ASODN 组细胞凋亡率、G<sub>2</sub>/M 期细胞数均较对照组和 Lip-SODN 组明显增加,

出现 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。而对照组、Lip 组、Lip-SODN 组无明显变化,见表 1,图 3。

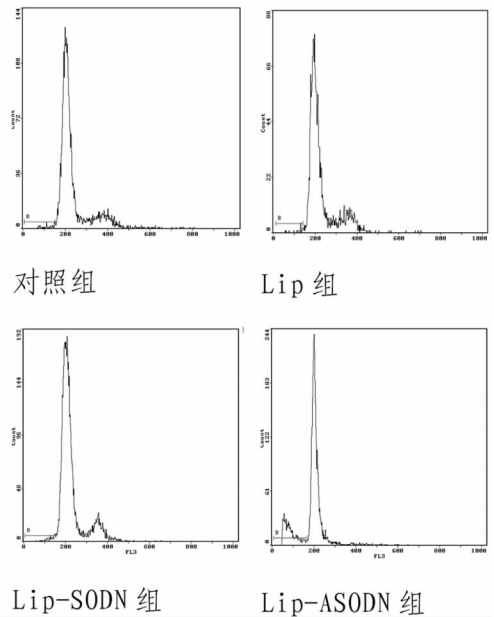


图 3 转染 48 h 后各组细胞凋亡的流式细胞仪分析

## 3 讨论

肺癌的发生是一多基因、多步骤的病理过程,是细胞中多种基因表达改变累积的结果,在此过程中既有原癌基因的激活、抑癌基因的失活,也有细胞周期的调控和凋亡基因的改变,以及细胞内调节环节的紊乱,而凋亡的改变是其中重要一环。存活蛋白基因是在人类基因组文库中筛选克隆出凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族的一个新成员,在多种肿瘤中均有表达<sup>[4-5]</sup>。其他实体瘤研究中发现,存活蛋白的高表达可抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖<sup>[6-7]</sup>。前期研究发现宣威肺腺癌患者中存活蛋白的表达明显高于云南其他地区,呈现出一定的地域性特点<sup>[8]</sup>。存活蛋白主要分布在宣威肺腺癌组织中,而在正常肺组织中未见表达<sup>[9-10]</sup>,这使得针对存活蛋白的治疗具有良好的靶向性、特异性和安全性。

Shen 等<sup>[11]</sup>利用存活蛋白反义 cDNA 表达载体与合成的存活蛋白反义寡核苷酸,针对存活蛋白 DNA 3' 端非编码区构建了反义寡核苷酸,通过电泳测定该寡核苷酸在生理条件下形成稳定的 3 倍体结构,并转染到存活蛋白过表达的肺腺癌细胞株 A549 中,发现存活蛋白的表达水平明显下调,显著抑制细胞增殖。本研究利用反义寡核苷酸技术抑制存活蛋白基因的表达。蛋白质印迹结果表明,存活蛋白反义寡核苷酸转染 XWLC-05 细胞后,存活蛋白水平明显下降,提示存活蛋白基因的表达受到抑制,这和其他恶性肿瘤中得到的结果相似<sup>[12-14]</sup>。流式细胞检测显示存活蛋白反义寡核苷酸可使 XWLC-05 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期并发生凋亡,这与存活蛋白特异性地表达于细胞 G<sub>2</sub>/M 期及定位于纺锤体等一致<sup>[15]</sup>。因此有理由推测,抑制存活蛋白表达可诱导 XWLC-05 细胞生长并使其停滞于 G<sub>2</sub>/M 期,使之无法完成有丝分裂,进而诱导细胞凋亡。当然存活蛋白和多西他赛等化疗药物有着相同的作用位点,通过抑制存活蛋白表达能否提高化疗药物的敏感性也是今后的研究方向之一。存活蛋白反义寡核苷酸可以有效抑制

XWLC-05 细胞的增殖,诱导其凋亡并参与细胞周期调控。那么在实际临床工作中如何就宣威肺腺癌患者利用反义存活蛋白寡核苷酸进行治疗,其他药物的搭配如何使用值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王巍炜,李高峰,洪志鹏,等. 宣威昆明两地区肺腺癌中存活蛋白表达的比较研究[J]. 医学研究,2010,39(7):61-62.
- [2] Liao L,Li ZY. Correlation between gene silencing activity and structural features of antisense oligodeoxynucleotides and targetRNA[J]. *In Silico Bio*,2007,7(4/5):527-534.
- [3] 许文平,林宗明,张建平,等. 丛生蛋白反义核苷酸对裸鼠人膀胱癌模型的肿瘤抑制作用[J]. 复旦学报:医学版,2008,38(5):747-750.
- [4] Sohn DM, Kim SY, Baek MJ, et al. Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer[J]. *Biomed Pharmacother*,2006,60(6):289-292.
- [5] 刘敏,李萍,兰显国,等. survivin 和 VEGF 在涎腺腺样囊性癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2010,39(10):1231-1232.
- [6] Vallbohmer D, Peter JH, Oh D, et al. survivin, a potential biomarker in the development of Barrett's adenocarcinoma [J]. *Surgery*,2005,138(4):701-704.
- [7] 陈轩,王子卫,张可. 生存素基因 mRNA 和蛋白在胃癌中表达及其意义[J]. 重庆医学,2008,37(13):1453-1455.
- [8] 王巍炜,李高峰,洪志鹏,等. 宣威昆明两地区肺腺癌中 survivin 表达的比较研究[J]. 医学研究杂志,2010,39(7):61-62.
- [9] 邓开,王洪林. survivin 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学,2008,37(10):1111-1113.
- [10] 王凯忠,赵慧,付鑫,等. 凋亡抑制因子 survivin 在肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学,2009,13(7):901-904.
- [11] Shen C, Duck A, Polat B, et al. Triplex forming oligodeoxy-nucleotides targeting survivin inhibitor proliferation and induce apoptosis of human lung carcinomars cells[J]. *Cancer Gene Ther*,2003,10(5):403-410.
- [12] 李尊岭,邵淑红,谢书阳,等. CT120 反义寡核苷酸抑制肺腺癌细胞 A549 的生长[J]. 基础医学与临床,2009,29(4):400-404.
- [13] Zheng X, Koropatnick J, Li M, et al. Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference. [J]. *Immunol*,2006,177(8):5639-5646.
- [14] 王志成,王海霞,郭德玉,等. survivin 反义核酸抑制胶质瘤细胞增殖的实验研究[J]. 重庆医学,2008,37(22):2570-2574.
- [15] 蒋碧佳,曾锦荣. survivin 抗凋亡机制及其与肺癌的关系[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2010,9(4):443-446.
- (收稿日期:2011-06-09 修回日期:2011-09-13)
- 
- (上接第 3128 页)
- failure, and mortality[J]. *J Gastrointest Surg*,1999,3(3):252-262.
- [6] Flint RS, Windsor JA. The role of the intestine in the pathophysiology and management of severe acute pancreatitis[J]. *HPB*,2003,5(2):69-85.
- [7] Sakhawat H, Rahman B, Ammori J, et al. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis[J]. *J Gastrointest Surg*,2003,7(1):26-36.
- [8] 陈吉,吴国豪. 胰高血糖素样肽 2 与肠道保护[J]. 中华胃肠外科杂志,2005,8(6):548-550.
- [9] Kouris GJ, Liu Q, Rossi H, et al. The effect of glucagon-like peptide 2 on intestinal permeability and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis[J]. *Am J Surg*,2001,181(6):571-575.
- [10] Kong LS, Liu ML, Zhang ZB. Influence of glucagon-like peptide-2 on intestinal lymphocyte homing in mice with acute pancreatitis[J]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*,2009,21(2):103-106.
- [11] Zhang J, Yuan C, Hua G, et al. Early gut barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis: attenuated by continuous blood purification treatment[J]. *Int J Artif Organs*,2010,33(10):706-715.
- [12] Wang YL, Zheng YJ, Zhang ZP, et al. Effects of gut barrier dysfunction and NF-kappaB activation on aggravating mechanism of severe acute pancreatitis [J]. *J Dig Dis*,2009,10(1):30-40.
- [13] 唐晋,宋孟龙,程飞,等. 大承气汤治疗 SAP 大鼠的实验研究[J]. 重庆医学,2010,39(3):1051-1052,1055.
- [14] Windsor JA, Fearon KC, Ross JA, et al. Role of serum endotoxin and antiendotoxin core antibody levels in predicting the development of multiple organ failure in acute pancreatitis[J]. *Br J Surg*,1993,80(8):1042-1046.
- (收稿日期:2011-06-29 修回日期:2011-08-14)