

· 基础研究 ·

Survivin 反义核苷酸对宣威肺腺癌移植瘤裸鼠模型作用的研究*

王巍炜¹, 洪志鹏², 李高峰^{1△}, 王绍佳³, 陈瑞彬¹, 张继朋¹

(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 650118; 2. 昆明医学院第一附属医院胸外科 650032; 3. 昆明医学院第三附属医院妇科肿瘤科 650118)

摘要:目的 选用宣威肺腺癌细胞裸鼠移植瘤模型, 采用 survivin mRNA 的反义寡核苷酸 (ASODN) 抑制宣威肺腺癌细胞, 观察其疗效, 为进一步临床研究提供实验依据。方法 建立宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 裸鼠皮下移植瘤模型, 选取 48 只成瘤裸鼠, 随机分为: 对照组、单纯脂质体转染 (LIP) 组、survivin 正义寡核苷酸 (SODN) 组、survivin ASODN 组, 通过皮下移植瘤内多点注射后, 观察裸鼠一般情况、移植瘤体积, 计算抑瘤率等。病理学检测各组肿瘤的变化以及对心脏、肝脏、肾脏的影响。结果 survivin ASODN 组注射 survivin ASODN 后, 裸小鼠表现为生长速度较为缓慢, 质量低于其他 3 组 ($P > 0.05$), 其生长抑制率高于其他 3 组 ($P > 0.05$)。而对照组、LIP 组、survivin SODN 组在肿瘤质量及生长抑制率方面均无明显差异。病理检查见瘤组织中有大量的细胞坏死灶。各组裸鼠均未出现死亡, 病理检查重要脏器未见明显损害。结论 survivin ASODN 能够抑制裸鼠皮下移植瘤的生长, 未对其他脏器产生明显损害。

关键词: survivin; 反义寡核苷酸; 移植瘤; 抑瘤作用

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.015

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1710-03

Study on effect of survivin antioligonucleotide on subcutaneous transplanted Xunwei lung adenocarcinoma nude mice model*

Wang Weiwei¹, Hong Zhipeng², Li Gaofeng^{1△}, Wang Shaojia³, Cheng Ruibin¹, Zhang Jipeng¹

(1. Department of Thoracic Surgery, Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Lung Cancer Research Center, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming, Yunnan 650118, China; 2. Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Department of Gynecologic Oncology, Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective By selecting transplanted Xunwei lung adenocarcinoma nude mice model, to adopt survivin mRNA antisense oligonucleotide to inhibit Xunwei lung adenocarcinoma cells and to observe its effects to provide the experiment evidence for further clinical study be offered in clinical treatment. **Methods** After modeling subcutaneous transplanted Xunwei lung adenocarcinoma cell XWLC-05 nude mice, 48 nude mice were selected and divided into 4 groups randomly: control group (blank), Lip group (simple liposome), survivin-SODN group (injecting sense oligonucleotide) and survivin-ASODN group (injecting antisense oligonucleotide). We injected different drugs according to different groups. Then the general activity of nude mice in different groups was observed and the tumor size was measured. Also, the antineoplastic rates in different groups were calculated. The pathological methods were used to analyse the effects of 4 groups on heart, liver and kidney under different treatment. **Results** In the Lip-ASODN group, the tumor size was increased slowly and weight was lower than that of the other 3 groups. The antineoplastic rate in the Lip-ASODN group was significantly higher than that of other groups ($P < 0.05$). However, as time passed, the tumor size was increased in the control group, Lip group and survivin-SODN group, there was no statistical difference among these 3 groups ($P > 0.05$). A great quantity of cell necrosis were seen under microscope. Death happened in all groups. The pathological examination revealed no obvious damage in vital organs (heart, liver, kidney). **Conclusion** Survivin antioligonucleotide could prohibit the growth of subcutaneous transplanted Xunwei lung adenocarcinoma in nude mice with little damage on vital organs.

Key words: survivin; antisense oligodeoxynucleotide; implanted tumor; antitumor effect

宣威地区一直是西南、乃至全国的肺癌高发地区, 其发病率和病死率一直高居不下, 肺癌防控面临着严峻的挑战。前期研究发现宣威地区肺癌患者中 survivin 高表达, 研究人员利用 survivin 反义核苷酸 (ASODN) 抑制宣威肺腺癌细胞取得了较好的效果^[1-2]。在前期研究基础上本研究采用体外培养宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 细胞皮下接种法, 在裸鼠体内建立皮下宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 细胞移植瘤模型。通过皮下移植瘤内多点注射, 观察 survivin ASODN 对肺癌移植瘤生长影响

的情况, 为下一步临床研究提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 survivin ASODN 的合成和主要试剂 参照文献^[3]针对位于 survivin mRNA 232~251 bp 处的序列, 合成 ASODN: 5'-CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3' 和正义寡核苷酸 (SODN): 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3'。序列两端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与 survivin 以外的已知人类基因无同源性。序列由上海生物

* 基金项目: 云南省科技厅社会发展科技计划应用基础研究项目 (2009ZC120M); 云南省社会发展重点项目 (2010CA015); 云南省自然科学基金资助项目 (2010CD185)。△ 通讯作者, Tel: 13987123539; E-mail: ligaofenghl@126.com。

工程公司帮助合成。细胞培养采用 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司);新生小牛血清采用杭州四季青生物公司产品。

1.2 细胞培养 选取云南宣威肺腺癌细胞株 XWLC-05,由昆明医学院第一附属医院临床医学实验研究中心提供。将其于 -80℃ 冰箱中将保存后取出、后培养、传代,最后将处于对数生长期的细胞进行实验。

1.3 移植瘤裸鼠模型的建立 4~6 周龄 BALB/C 裸小鼠,体质量 18~22 g,雌、雄均可,购于昆明医学院动物中心,饲养于 SPF 级无菌饲养室,自由摄取食物和水。采用培养细胞皮下接种移植法。对 XWLC-05 细胞常规传代培养 1 个月左右,于接种当日收集大量的培养细胞后,立即接种,接种细胞数量为 2.0×10^6 (约 0.5 mL 悬液),用 1 mL 注射器将单细胞悬液注射于裸鼠左前腋侧皮下。

1.4 实验分组及 survivinASODN 注射 将一批实验用裸鼠接种后至肿瘤最长径达 8~10 mm 时,随机挑选其中 48 只,随机分 4 组,每组 12 只。对照组:予生理盐水处理;单纯脂质体转染(LIP)组:予等量的脂质体转染液处理;survivinSODN 组:予 600 nmol/L survivinSODN 脂质体复合物处理;survivinA-SODN 组:予 600 nmol/L survivinASODN 脂质体复合物处理。各组分别于成瘤分组后每隔 48 h 按直接移植瘤内多点注射 1 次,共注射 5 次。

1.5 XWLC-05 裸小鼠皮下移植瘤体积、质量及肿瘤生长抑制率的测定 分别于每次注射前用游标卡尺测量肿瘤最长径和最短径,并称体质量。于末次 survivinASODN 注射后第 2 周以脱臼法断颈处死所有荷瘤裸鼠,取移植瘤测量肿瘤最长径(a)和最短径(b),按公式 $v = ab^2 / 2$ 计算肿瘤体积,计算肿瘤生长指数: $(V_{\text{治疗后}} - V_{\text{治疗前}}) / V_{\text{治疗前}}$ 。称取瘤结节质量,以瘤结节质量计算抑瘤率: $\text{抑瘤率}(\%) = (\text{对照组质量} - \text{实验组质量}) / \text{对照组质量} \times 100\%$ 。

1.6 一般状况观察及组织学检查 观察包括裸鼠的饮食、大小便、精神状况等。处死裸鼠后标本固定后,留取心脏、肝脏、肾脏和肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定后在光镜下观察肿瘤细胞坏死、凋亡、炎症反应等改变。

1.7 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件包处理数据。计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较应用方差分析最小显著差法(F 检验, $\alpha = 0.05$),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组裸鼠一般情况 整个实验期间 4 组裸鼠未出现死亡,大、小便及饮食情况正常,活动度等未出现其他明显的异常情况。处死后对各组裸鼠心脏、肝脏、肾脏进行病理检查均没有发现明显变性坏死表现。

2.2 裸鼠肿瘤的体积及生长指数变化情况 survivinASODN 治疗组其肿瘤生长速度较为缓慢,其中部分裸鼠表现为肿瘤停止生长,甚至其中 3 只出现肿瘤退缩消失。治疗结束后 survivinASODN 注射组瘤体的肿瘤大小明显低于其他 3 组,而其他 3 组相似。survivinASODN 治疗组肿瘤生长指数为 (2.78 ± 0.27) ,远远低于对照组 (5.71 ± 0.31) 、LIP 组 (6.21 ± 0.23) 和 survivinSODN 组 (5.69 ± 0.37) ,见图 1。

2.3 裸鼠肿瘤的质量变化及抑瘤率情况 末次 survivinA-SODN 注射后第 2 周以脱臼法断颈处死所有荷瘤裸鼠,提取肿瘤并且称取质量。可以发现 survivinASODN 注射组瘤体的肿瘤质量为 (1.06 ± 0.04) g,低于对照组 (2.22 ± 0.03) g、LIP 组

(2.61 ± 0.04) g 和 survivinSODN 组 (2.69 ± 0.05) g, survivinASODN 抑瘤率为 $(37.26 \pm 1.92)\%$,见图 2。

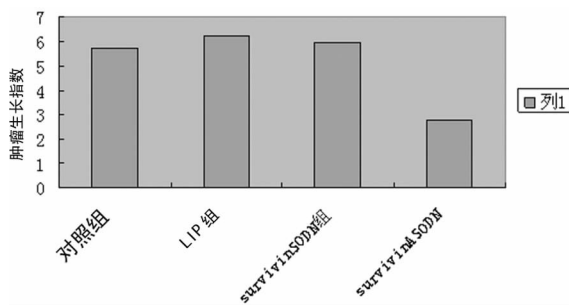


图 1 survivinASODN 转染对裸鼠移植瘤肿瘤生长指数的影响

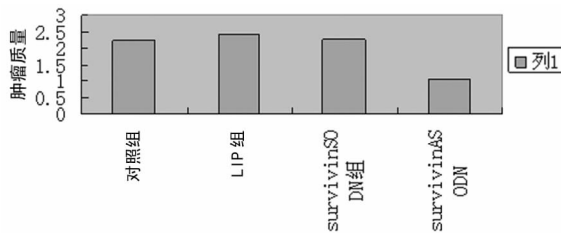


图 2 survivinASODN 转染对裸鼠移植瘤肿瘤质量的影响

2.4 survivinASODN 转染对裸鼠肿瘤组织的影响 对照组、LIP 组和 survivinSODN 组细胞体积大,大小不等,胞浆丰富,胞核大,深染,核分裂相多见,偶见瘤巨细胞。而 survivinASODN 处理组 XWLC-05 细胞形态与其他 3 组相似,但瘤组织中有大量的细胞坏死灶,结缔组织增生,炎症细胞浸润明显。

3 讨 论

survivin 基因是在人类基因组文库中筛选克隆出 IAP 家族的一个新成员,在多种肿瘤中均有表达^[4-5]。前期研究表明,和其他肿瘤细胞中情况相似^[6-7],通过对特定靶向基因的 survivin 的反义抑制,可以影响其基因、蛋白的表达,可抑制宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 增殖并诱发其凋亡,从而抑制其生长^[8]。本研究采用动物实验的方法进一步研究 survivinASODN 对小鼠宣威肺腺癌转移瘤的干预作用。采用反义技术,针对 survivin 基因 232~251 bp 处的序列,合成反义寡核苷酸,并且采用脂质体包裹、硫代磷酸修饰后将其直接多点注射于宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 裸鼠皮下移植瘤内。肉眼观察发现 survivinASODN 组的肿瘤生长比较缓慢,其中部分裸鼠表现为肿瘤生长缓慢或者停止生长,甚至其中 3 只裸鼠出现肿瘤退缩消失。测量结果也显示 survivinASODN 组瘤体生长指数 (2.78 ± 0.27) 低于与对照组、LIP 组和 survivinSODN 组。处死所有荷瘤裸鼠称取其肿瘤质量。可以发现 survivinASODN 注射组瘤体的肿瘤质量为 (1.06 ± 0.04) g,低于其他 3 组,其抑瘤率高达 $(37.26 \pm 1.92)\%$ 。显微镜下观察显示,ASODN 组液化坏死灶增多,凋亡细胞增加。提示,survivinASODN 对宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 裸鼠移植瘤产生了明显的抑制作用,结合相关研究和本研究结果推测可能是由于 survivinASODN 干扰 survivin 的表达或抑制其功能的发挥,从而抑制有丝分裂并促进自发细胞凋亡,使肿瘤生长速度延缓,瘤体质量减轻^[9-10]。整个实验过程中 4 组裸鼠均没有出现死亡,大小便及饮食情况没有发现明显异常,处死后各组裸鼠心脏、肝脏、肾脏均没有发

现明显变性、坏死表现。提示脂质体、反义核酸对于裸鼠是安全的,这可能由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织^[11-12],而 survivinASODN 治疗具有良好的靶向性、特异性,其对正常组织影响较小。

survivinASODN 处理宣威肺腺癌细胞裸鼠肺癌细胞 XWLC-05 移植瘤后,肿瘤的生长明显受到抑制,未出现明显不良反应,提示在宣威肺腺癌中采用反义核苷酸治疗是安全、可行的^[13-15],为下一步临床治疗提供了思路和实验室资料。

参考文献:

- [1] Wang WW, Li GF, Hong ZP. The effect of the expression of Survivin antioligonucleotide on the apoptosis of Xuanwei lung adenocarcinoma cell[J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2011, 10(5): 252-255.
- [2] 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.
- [3] Isaka T, Maruno M, Nakata H, et al. Effectiveness of spray application of ACNU in the local of malignant gliomas: report of two case[J]. Neurol Res, 2002, 22(2): 181-184.
- [4] 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.
- [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] Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1[J]. Physiology, 2009, 24(2): 97-106.
- [7] 李玉华, 宫向前, 邢建华, 等. Survivin 反义核酸对大肠癌 HT29 细胞化疗的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13

(21): 1620-1622.

- [8] Shen C, Duck A, Polat B, et al. Triplex forming oligodeoxy-nucleotides targeting Survivin inhibitor proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(5): 403-410.
- [9] 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.
- [10] Shen C, Duck A, Polat B, et al. Triplex forming oligodeoxy-nucleotides targeting Survivin inhibitor proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(5): 403-410.
- [11] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127.
- [12] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early stage non small cell lung cancer[J]. J Pathol, 2003, 200(5): 620-626.
- [13] Lehner R, Bobak J, Kim NW, et al. Localization of telomerase protein and Survivin in placenta: relation to placental development and hydatidiform mole[J]. Obstet Gynecol, 2001, 97(6): 965-970.
- [14] 孙顶, 蔡建明, 祝宝让, 等. STAT3 反义寡核苷酸对人肺腺癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(1): 76-79.
- [15] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural functional and therapeutic biology of Survivin[J]. Cancer Lett, 2006, 244(2): 164-171.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-12-09)

(上接第 1709 页)

参考文献:

- [1] Hansson GK. Atherosclerosis an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007[J]. Atherosclerosis, 2009, 202(1): 2-10.
- [2] 王虹艳, 曲鹏, 富晶, 等. TLR4 激动上调内皮细胞氧化低密度脂蛋白受体 LOX-1 表达[J]. 高血压杂志, 2005, 13(7): 422-426.
- [3] 姜华, 张艳, 王辰. 益气活血复方对内皮细胞 ToLL 样受体 4 及其下游 MyD88、TRAF-6 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 519-522.
- [4] Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T cell adhesion to human aortic endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2002, 161(2): 365-374.
- [5] Papa A, Danese S, Kondeatis, et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2004, 8(5): 187-191.

- [6] Meroni PL, Raschi E, Testoni C, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: Effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44: 2870-2878.
- [7] Reiss A B, Anwar K, Wirkowski P. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis: a brief review [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(21): 2641-2652.
- [8] Mehta JL, Chen J, Yu F, et al. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(2): 243-249.
- [9] Hoffmann R, Haager P, Suliman H, et al. Effect of statin therapy before Q-wave myocardial infarction on myocardial perfusion [J]. American J Cardiology, 2008, 101: 139-143.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-11-22)