

· 基础研究 ·

XIAP 反义寡核苷酸对喉癌 Hep-2 细胞 化疗增敏作用的研究

路秀英, 李晓明, 张立坤, 韩海平

(白求恩国际和平医院 耳鼻咽喉头颈外科, 全军耳鼻咽喉头颈外科中心, 河北 石家庄 050082)

摘要: **目的** 通过 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白 (XIAP) 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASODN) 转染喉癌 Hep-2 细胞, 探讨其对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响。**方法** 体外培养人喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞, 应用脂质体法进行 XIAP ASODN 基因转染, 荧光显微镜下观察计算转染率, MTT 法检测基因转染前后联合顺铂作用对 Hep-2 细胞增殖的抑制情况, RT-PCR 法检测 XIAP mRNA 水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡率及 XIAP 蛋白表达。**结果** 不同浓度 XIAP ASODN 转染喉癌 Hep-2 细胞转染率均在 90% 以上, 无明显差异。不同浓度的顺铂作用 24 h 后对细胞增殖有抑制作用, 并随剂量的增加抑制率逐渐增大 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率随顺铂 (DDP) 剂量的增加而逐渐增大 ($P < 0.05$); MTT 法检测发现不同浓度及不同作用时间的 XIAP ASODN 与 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 联合作用对细胞的生长抑制率显著高于单用 XIAP ASODN 组和单用 DDP 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 流式细胞仪检测结果显示 ASODN + DDP 组细胞凋亡率与单纯 DDP 组相比显著升高 ($P < 0.01$); RT-PCR 法显示 ASODN + DDP 组 XIAP mRNA 的表达明显下调, 而对照组和错义寡核苷酸 (scramble oligonucleotides, SCODN) 组 XIAP mRNA 水平无明显变化; 流式细胞仪结果显示 ASODN 治疗组的 XIAP 蛋白荧光指数明显低于空白对照组、脂质体转染组以及 SCODN 转染组 ($P < 0.05$), Pearson 相关分析显示, 在不同处理组与对照组中细胞凋亡率的变化与 XIAP 蛋白荧光指数的变化呈负相关 ($r = -0.976, P < 0.01$)。**结论** XIAP ASODN 喉癌转染 Hep-2 细胞能够抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 并能提高其对化疗的敏感性。

关键词: X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白; 喉肿瘤, 癌; 反义寡核苷酸; 化疗; 细胞凋亡
中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2011)03-0167-06

Effect of XIAP antisense oligonucleotide on the chemosensitivity of laryngeal squamous carcinoma Hep-2 cells

LU Xiu - ying , LI Xiao - ming , ZHANG Li - kun , et al .

(Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery , Bethune International Peace Hospital , Shijiazhuang 050082 , China)

Abstract : **Objective** To explore the effect of X - chromosome - linked inhibitor of apoptosis (XIAP) antisense oligonucleotides (ASODN) on cell growth , apoptosis and chemosensitivity of laryngeal carcinoma Hep2 cells by transfecting XIAP ASODN into Hep - 2 cells . **Methods** Transfection of XIAP ASODN into Hep - 2 cells was carried out by lipofectamine assay . Transfection efficiency was observed by inverse - phase fluorescence microscope . Cell growth inhibition rate was detected with MTT assay . The level of XIAP mRNA was measured with RT - PCR . Cell apoptosis rate as well as the expression of XIAP protein was detected with flow cytometry . **Results** Transfection efficiency of XIAP ASODN of different concentrations was more than 90 % and the differences between groups of different dose of XIAP ASODN were statistically insignificant . DDP of all concentrations could inhibit cell proliferation with dose - and time - dependent manners , and the differences were

statistically significant ($P < 0.05$). The apoptosis rate increased gradually with the raise of DDP concentration ($P < 0.05$). The cell inhibition rates of all concentrations of XIAP ASODN groups with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP at different stages of time were higher than those of the ASODN group and DDP group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The flow cytometry results showed that the apoptosis rate in DDP combined with ASODN group was significantly higher than that of the DDP group ($P < 0.01$). The relative expression levels of XIAP mRNA of DDP combined with ASODN group and ASODN group were down-regulated. The flow cytometry results showed that the fluorescence index (FI) in ASODN group was lower than those of the blank group, lipofectamine group and SCODN group ($P < 0.05$). According to the Pearson's correlation analysis, there was positive correlation between the cell apoptosis rate and the fluorescence index (FI) ($r = -0.976$, $P < 0.01$). **Conclusion** Transfection of XIAP ASODN into Hep-2 cells can inhibit cell proliferation, induce apoptosis and enhance the sensitivity of laryngeal carcinoma Hep-2 cells to chemotherapy.

Key words: X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP); laryngeal carcinomas; antisense oligonucleotide; chemotherapy; cell apoptosis

X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白(X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)是凋亡抑制蛋白家族中最有效的抗凋亡蛋白。XIAP 表达增高是肿瘤发生的重要的始动和促进因素,并与肿瘤预后相关。喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,研究表明 XIAP 在喉癌中表达增高,并且与肿瘤化疗抵抗形成有关^[1]。本研究应用 XIAP ASODN 及顺铂化学治疗处理喉癌细胞,观察细胞增殖和凋亡,以及 XIAP mRNA 和蛋白的表达水平,探讨抑制 XIAP 生成在降低喉癌化疗抵抗和增强其对化疗敏感性的可能性,从而为以 XIAP 为靶点的肿瘤基因治疗奠定理论与实验基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞和试剂

人喉癌细胞系 Hep-2 引自白求恩国际和平医院中心实验室,在含有 10% 新生小牛血清与 RPMI 1640 培养基中培养。MTT 为 Sigma 公司产品。脂质体 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品。硫代磷酸化修饰 XIAP ASODN 和 SCODN 由上海生工生物技术公司合成。引物由北京奥科生物技术公司合成。RT-PCR 相关试剂购自宝生物工程有 限 公 司。

1.2 XIAP 反义寡核苷酸基因转染

1.2.1 XIAP 反义寡核苷酸设计与合成 根据文献^[2],针对 XIAP 表达阅读框架设计 XIAP ASODN,合成以硫代磷酸化修饰的 ASODN,同时以 FITC 标记末端碱基。以错义

序列作为对照。其序列(由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)为反义序列: G4 AS 5'-GCTGAGTCTCCATATTGCC-3', 错义序列: G4 SC 5'-GGCTCTTTGCCACTGAAT-3'。

1.2.2 转染率测定 Hep-2 细胞 85% ~ 90% 铺满孔底时进行转染, XIAP ASODN 浓度为 100、200、400、600 nmol/L,转染过程严格按照 Lipofectamine™ 2000 说明书操作。细胞用甘油封片液封固,于荧光显微镜下观察计数,转染率 = 被转染细胞数/细胞总数 $\times 100\%$

1.3 MTT 法检测细胞生长抑制率

实验分为空白对照组、脂质体对照组、ASODN 组、SCODN 组、ASODN 加 DDP 组、SCODN 加 DDP 组。Hep-2 细胞于转染后 6 h 更换培养基的同时加入终浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 顺铂,作用时间分别为转染后 12、24、36、48 h。于培养结束前 4 h 每孔加入 MTT 20 μl (5 mg/ml),继续培养 4 h,应用二甲基亚砷溶解甲贲,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值(OD570 值)。生长抑制率 = (对照组 OD570 值 - 实验组 OD570 值) / 对照组值 OD570 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.4 RT-PCR 测定 XIAP mRNA 表达

Trizol 法提取细胞总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。RT-PCR 按照说明书进行操作。XIAP (802 bp) 引物序列分别为:上游 5'-CTTGCACTGTCTTTCTGAGC-3',下游 5'-ACACCATATACCCGAGGAAC-3', β -actin 引物序列分别为:上游 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3',下游 5'-GGAT-

AGCACAGCCTGGATAG-3'。PCR 产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并用凝胶成像分析系统(AmpGeneGel 3000)观察各电泳条带亮度并照相。

1.5 流式细胞学检测细胞凋亡及 XIAP 蛋白表达

收集细胞,碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色检测细胞凋亡(Apo, apoptosis, Apo),二倍体 G_0/G_1 细胞峰前出现的亚二倍体 DNA 含量的细胞峰为 Apo 峰。在收集的细胞中加入 XIAP 一抗,荧光标记二抗,上机检测,计算样本的荧光指数(FI)为 XIAP 蛋白表达量。

1.6 统计学分析

所有数据经 Excel 软件整理,应用美国 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,随机分组比较用单因素方差分析,两因素的相关性用 Pearson 直线相关进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察及转染效率的测定

各浓度 FITC 标记的 XIAP ASODN 转染 Hep-2 细胞后 6 h,于荧光显微镜下观察均可见绿色荧光,荧光分布主要积聚于细胞核内,同时细胞质中也有较强的荧光分布(图 1)。转染后 12~24 h 几乎所有的细胞均可见荧光聚集,24 h 时其平均转染效率在终浓度为 100、200、400、600 nm/L 分别为 $(95 \pm 2.1)\%$, $(98 \pm 1.3)\%$, $(96 \pm 2.6)\%$, $(93 \pm 3.0)\%$ 。方差分析显示组间差异无统计学意义($P > 0.05$);培养基对照组则未见转染现象。

2.2 XIAP ASODN 转染联合化疗对 Hep-2 细胞增殖活性的影响

MTT 检测结果显示不同浓度 XIAP ASODN (100~600 nmol/L) 转染 Hep-2 细胞分别作用不同时间(12、24、36、48 h)后均对细胞增殖有抑制作用,并呈时间和剂量的依赖性,各时间段及各浓度的 XIAP ASODN 与 $3 \mu\text{g/ml}$ DDP 联合作用组对细胞的生长抑制率显著高于单用 XIAP ASODN 组

和单用 DDP 组,差异均有显著性意义($P < 0.05$),呈明显的时间和剂量依赖关系,其中以 600 nmol/L 的 XIAP ASODN 组抑制率最大(图 2,3)。说明转染 XIAP ASODN 对细胞增殖有抑制作用,并对化疗药 DDP 有增敏作用。

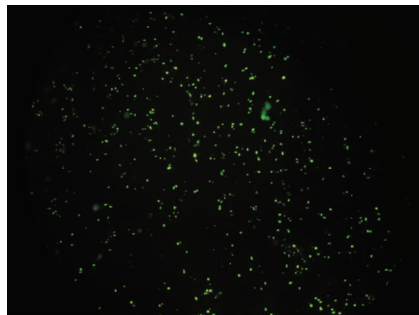


图 1 XIAP ASODN 转染喉癌 Hep-2 细胞 6 h 的荧光倒置显微镜照片($\times 200$)

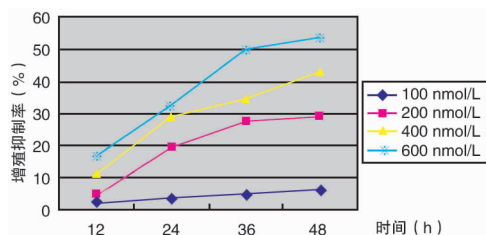


图 2 不同浓度的 XIAP ASODN 作用不同时间对 Hep-2 细胞增殖抑制率的影响($n = 3$)

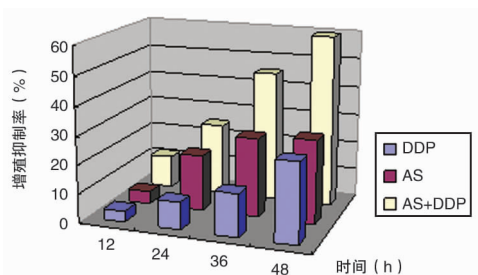


图 3 XIAP ASODN 转染联合化疗对 Hep-2 细胞增殖活性的影响($n = 3$)

2.3 XIAP ASODN 转染联合化疗对 Hep-2 细胞凋亡的影响

200 nmol/L ASODN 转染 Hep-2 细胞 36 h 流式细胞仪检测亚二倍体细胞显示细胞凋亡率。ASODN 转染 + 化疗组凋亡率与单纯化疗组相比细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);而 SCODN 转染组细胞凋亡率

与对照组相比无统计学意义 ($P > 0.05$), SCODN 转染 + 化疗组与单纯化疗组细胞凋亡率也无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果提示: ASODN 转染后 Hep-2 细胞对化疗的敏感性明显提高, 同时 XIAP ASODN 本身也诱发肿瘤细胞的凋亡, ASODN 转染与化学药物 (顺铂) 杀伤肿瘤具有协同作用 (表 1)。

2.4 XIAP ASODN 联合化疗对 Hep-2 细胞中 XIAP 蛋白表达的影响

流式细胞术检测结果显示 ASODN 组的

XIAP 蛋白荧光指数明显低于空白对照组、脂质体转染组以及 SCODN 组 ($P < 0.05$), ASODN + 化疗组比单纯化疗组荧光指数明显降低 ($P < 0.01$), SCODN + 化疗组与单纯化疗组 XIAP 蛋白荧光指数无统计学意义 ($P > 0.05$)。ASODN 转染后 Hep-2 细胞中 XIAP 蛋白的表达量明显下降, 对化疗的敏感性明显提高, 同时 ASODN 转染本身也降低 XIAP 蛋白的表达并与化疗药物具有协同作用 (表 1)。

表 1 化疗联合 XIAP ASODN 对 Hep-2 细胞凋亡和 XIAP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	不加顺铂组			加顺铂组 (3 $\mu\text{g/ml}$)		
	对照组	SCODN	ASODN	空白组	SCODN	ASODN
凋亡率 (%)	6.35 \pm 0.63	7.69 \pm 0.57	14.41 \pm 0.71 *	9.00 \pm 0.64 *	11.51 \pm 0.57 *	23.29 \pm 1.15 **
蛋白表达 (FI)	1	1.04 \pm 0.93	0.85 \pm 0.39 *	0.92 \pm 0.26 *	0.90 \pm 0.23 *	0.64 \pm 0.06 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 XIAP ASODN 联合化疗对 Hep-2 细胞中 XIAP mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示 PCR 扩增产物约为 802 bp 大小的特异性条带, ASODN 组较 SCODN 对照组, 脂质体对照组和空白对照组相比, XIAP 扩增条带的亮度明显降低。200 nmol/L ASODN 作用于 Hep-2 细胞 36 h 后, XIAP mRNA 的表达下调, ASODN + DDP 组 XIAP mRNA 的表达明显下调, 而 SCODN 组 XIAP mRNA 水平与对照组比较无明显变化 (图 4)。

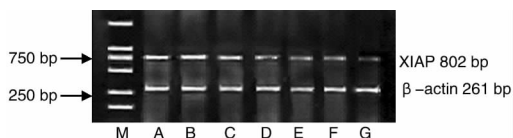


图 4 XIAP ASODN 转染对 Hep-2 细胞 XIAP mRNA 表达的影响

2.6 XIAP 蛋白表达与细胞凋亡及细胞增殖抑制率之间的关系

Pearson 相关分析显示, 在不同处理组与对照组中细胞凋亡率变化与 XIAP 蛋白荧光指数 (FI) 变化呈负直线相关 ($r = -0.976, P < 0.01$)。细胞增殖抑制率的变化与 XIAP 蛋白荧光指数 (FI) 的变化呈

负直线相关 ($r = -0.923, P < 0.01$)。

3 讨论

XIAP 是凋亡抑制蛋白家族中最有效的 Caspases 抑制剂, 它可以直接抑制 Caspase 并可多途径抑制凋亡^[3]。已经有大量的研究表明^[4,5], XIAP 与很多肿瘤的发生发展有非常重要的关系, 可能是导致肿瘤细胞耐药性的因素之一, 并且与某些肿瘤的分期、生存期、预后及化疗的敏感性有关。

本研究中采用反义技术降低 XIAP mRNA 的表达, 从而降低 XIAP 蛋白的表达, 探讨其是否可以提高喉癌 Hep-2 细胞对化疗的敏感性。Hu 等^[2] 针对 XIAP 设计的约 100 种 ASODN, 其中 G4 ASODN 在非小细胞肺癌 H460 细胞株最有效降低 mRNA 和蛋白表达, 并有效的促进 H460 细胞凋亡。所以笔者选择 G4 ASODN 进行转染实验, 以相应的错配寡核苷酸 G4 SCODN 作为对照。

通过转染 ASODN 进入 Hep-2 细胞株, 笔者发现 XIAP ASODN 本身对 Hep-2 细胞株的增殖即有抑制作用, XIAP ASODN 对 Hep-2 细胞增殖的抑制作用呈现时间-剂量依赖关系, 随着时间延长和药物浓度的加大, 抑制

(下转第 174 页)