

· 实验研究 ·

脂质体介导 *S100A4* 基因反义寡核苷酸对神经母细胞瘤细胞的作用效率及其稳定性的研究

冯晨,唐锁勤,黄东生,张晓飞,高晓宁,龙卉

(中国人民解放军总医院儿科,北京 100853)

[摘要] 目的 *S100A4* 基因在神经母细胞瘤早期转移中发挥重要作用。该研究以脂质体介导 *S100A4* 基因反义寡核苷酸转染体外培养的神经母细胞瘤细胞,观察其作用效率及稳定性。**方法** 以脂质体包裹 5'端带有 FAM 荧光标记的 *S100A4* 基因反义寡核苷酸转染体外培养的神经母细胞瘤细胞,用无脂质体包裹的反义寡核苷酸为对照,在激光共聚焦显微镜下观察荧光强度变化、作用效率及存留时间。**结果** 经脂质体介导的 *S100A4* 基因反义寡核苷酸可以高效进入神经母细胞瘤细胞,荧光强度转染后 8 h 达最高值 173,24 h 后仍高达 135,作用效率达 68%,稳定表达 72 h 以上;无脂质体包裹的反义寡核苷酸荧光强度在转染后 6 h 达最高值 90,作用效率 35%,稳定表达仅 12 h。**结论** 脂质体介导的 *S100A4* 基因反义寡核苷酸作用于神经母细胞瘤细胞效率高、时间持久,值得在神经母细胞瘤基因治疗中进一步探讨。

[中国当代儿科杂志,2005,7(6):520-522]

[关键词] *S100A4*;反义寡核苷酸;脂质体;神经母细胞瘤;激光共聚焦显微镜

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)06-0520-03

Liposome-mediated transfection efficacy of *S100A4* antisense oligodeoxynucleotide and its stability in neuroblastoma cells

Chen FENG, Suo-Qin TANG, Dong-Sheng HUANG, Xiao-Fei ZHANG, Xiao-Ning GAO, Hui LONG. Department of Pediatrics, People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China (Tang S-Q, Email: suoqin@yahoo.com)

Abstract: Objective *S100A4* gene plays an important role in neuroblastoma cell invasion and metastasis. This paper aimed to evaluate the liposome-mediated transfection efficacy of *S100A4* antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) and its stability in neuroblastoma cells. **Methods** The fluorescence (FAM) labeled *S100A4* AS-ODN was transfected with Lipofectamine™ 2000 into human neuroblastoma cells (LA-N-5). The transfection efficacy, stability and persistence time were observed by laser scanning confocal microscopy, and were compared with those of naked AS-ODN without Lipofectamine™ 2000. **Results** The transfection efficacy of the *S100A4* AS-ODN mediated by Lipofectamine™ 2000 in neuroblastoma cells was high. The maximal signal intensity of intracellular fluorescence was 173 at 8 hrs after transfection and remained as high as 135 at 24 hrs. The maximal efficacy of transfection was 68%, and the stable expression lasted for more than 72 hrs. The transfection efficacy of the naked AS-ODN without Lipofectamine™ 2000 was 35%. The maximal signal intensity of intracellular fluorescence was 90 and occurred at 6 hrs after transfection. The stable expression lasted for only 12 hrs. **Conclusions** The *S100A4* AS-ODN can be effectively transfected with Lipofectamine™ 2000 into neuroblastoma cells, and be stably expressed, which may be useful in gene therapy for neuroblastoma

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6):520-522]

Key words: *S100A4*; Antisense oligodeoxynucleotide; Liposome; Neuroblastoma; Laser scanning confocal microscopy

神经母细胞瘤作为最常见的外周神经系统恶性肿瘤在儿童恶性肿瘤的发病率中占第4位,其恶性程度高,早期转移,治疗效果不理想。研究表明 *S100A4* 基因在该肿瘤早期转移中发挥重要作用^[1]。反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN) 技术日渐成为肿瘤基因治疗的重要手段。细

胞对 AS-ODN 的摄取量及 AS-ODN 在细胞内的存留时间直接影响它发挥生物学效应。本研究以脂质体介导 *S100A4* 基因反义寡核苷酸转染体外培养的神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 的细胞,观察其作用效率及稳定性。

[收稿日期] 2005-02-28; [修回日期] 2005-08-17

[作者简介] 冯晨(1976-),男,硕士,医师。主攻方向:儿童血液、肿瘤疾病。

[通讯作者] 唐锁勤,解放军总医院小儿内科,邮编:100853。

1 资料与方法

1.1 细胞培养

神经母细胞瘤细胞 LA-N-5 由美国洛杉矶儿童医院 Stuart Siegel 教授惠赠,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养、传代。实验用对数生长期细胞,台盼蓝拒染率在 95% 以上。

1.2 反义寡核苷酸合成与标记

反义寡核苷酸根据人 *SI00A4* mRNA 序列 5' 翻译起始位点第 70~89 位碱基互补设计:5'-TTC TCC AGA GGG CAC GCC AT-3',将设计得到的寡核苷酸序列在 GenBank 中进行 BLAST 分析,证明与其他基因同源性小于 60%。全硫代修饰,5'端 6-羧基荧光素 (FAM) 标记,聚丙酰胺凝胶电泳纯化,由北京赛百盛基因技术有限公司合成,使用前以 RPMI-1640 培养基配制所需浓度。

1.3 脂质体介导反义寡核苷酸转染

取对数生长期 LA-N-5 细胞悬浮于含 10% 胎牛血清不含抗生素的 RPMI-1640 培养液中,接种于 24 孔细胞培养板,每孔含 1×10^5 细胞,培养基补充终体积 500 μ L,置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。将反义寡核苷酸 1.5 μ g 稀释于 50 μ L 无血清 RPMI-1640 培养液 (A 液);将脂质体 Lipofectamine™ 2000 (美国 Life Technologies 公司) 3 μ L 稀释于 50 μ L 无血清 RPMI-1640 培养液,室温孵育 5 min (B 液)。A、B 液混匀,室温放置 20 min 后将 A、B 混合液加入各孔,轻轻晃动培养板混匀,置培养箱培养 6 h 后更换含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液继续培养。分别于转染后 30 min、1、2、6、8、12、24、30、36、48、60、72 h 观察,对照组加等量不含 lipofectamine™

2000 的 AS-ODN 每孔 1.5 μ g。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

观察前 PBS 洗细胞 2 次,每次 2 min,置于激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad laser scanning confocal microscopy),200 倍光镜下观察,每孔随机选取 3 个视野,计算平均荧光强度,并采集图像。随机计数 300 个细胞,计算可发射荧光的细胞数,求得 AS-ODN 的作用效率。

1.5 计学分析

计数资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 STATA 7.0 统计软件对荧光强度行 *t* 检验,作用效率行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 荧光强度变化

转染 30 min 后实验组、对照组均见绿色荧光,但实验组荧光强度值远高于对照组。实验组转染后 8 h 荧光强度达最高值 173,24 h 仍高达 135,72 h 时荧光强度值为 50。对照组 6 h 荧光强度达最高值 90,12 h 后荧光强度已减低到 52;24 h 荧光强度减低到 31。转染后各时间点实验组较对照组荧光强度值差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

2.2 AS-ODN 的作用效率变化

转染 30 min 后,实验组 34% (102/300) 的肿瘤细胞被转染,而对照组仅 12% (35/300) 的细胞被转染。实验组于转染后 8 h 效率最高,68% (203/300) 的细胞被转染,转染后 36 h 效率仍高于 40%。对照组于转染后 6 h 效率最高,为 35% (107/300)。且 24 h 后其作用效率已低至 9% (27/300)。各时间点两组转染效率差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 2。

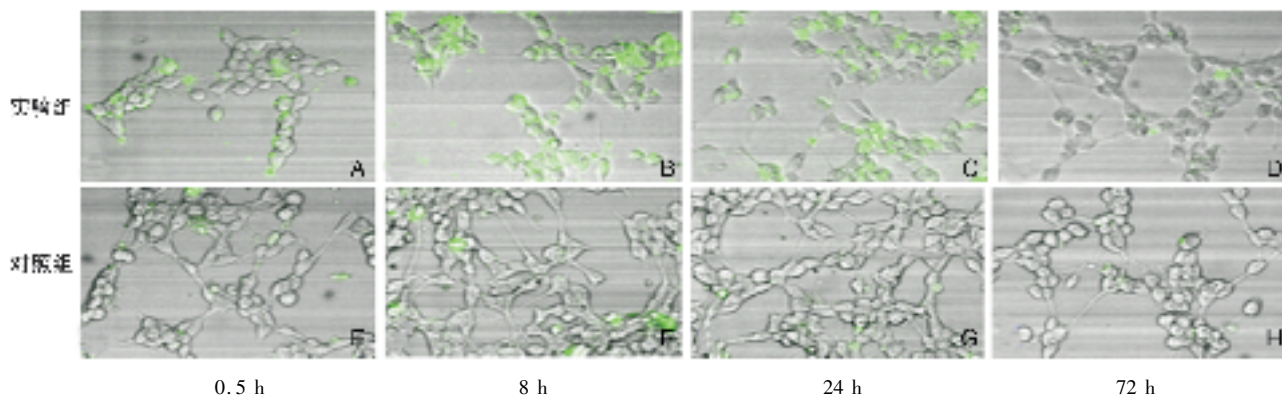


图1 各组不同时点荧光强度的变化 (激光共聚焦显微镜荧光、透射合成图像, $\times 200$)。A、B、C、D 分别为实验组转染后 0.5、8、24 和 72 h 图像。转染 8 h 后荧光强度达最高值 173,转染效率为 68%,24 h 荧光强度为 135,72 h 荧光强度值为 50。E、F、G、H 分别为对照组转染后 0.5、6、12 和 24 h 时图像。6 h 荧光强度达最高值 90,转染效率为 35%。12 h 后荧光强度已减低到 52;24 h 荧光强度减低到 31。

表1 各组转染强度的时相变化 (n=3, $\bar{x} \pm s$, 荧光强度值)

	0.5 h	1 h	2 h	6 h	8 h	12 h	24 h	30 h	36 h	48 h	60 h	72 h
对照组	62 ± 3	71 ± 7	84 ± 6	89 ± 9	79 ± 7	52 ± 4	31 ± 7	22 ± 5	11 ± 3	5 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
实验组	103 ± 7	113 ± 11	125 ± 9	131 ± 6	172 ± 9	161 ± 7	135 ± 12	121 ± 9	113 ± 11	101 ± 7	87 ± 6	50 ± 4
t	-9.1414	-5.3708	-6.5812	-6.8535	-14.0054	-23.4170	-16.2078	-16.654	-15.4949	-22.8399	-25.1147	-21.6506
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 各组转染效率的时相变化(300个细胞中的阳性细胞数)

	0.5 h	1 h	2 h	6 h	8 h	12 h	24 h	30 h	36 h	48 h	60 h	72 h
对照组	35	47	85	107	79	59	27	18	9	3	0	0
实验组	102	118	157	176	203	185	152	143	125	89	47	31
χ^2	42.4619	42.1400	35.9019	31.8422	102.8770	109.6611	124.4045	132.6419	129.2934	94.9504	50.9946	32.6889
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

S100A4 基因是通过消减杂交克隆技术从小鼠乳腺肉瘤细胞中分离出来的特异性表达于多种高转移能力细胞中的肿瘤转移相关基因^[2]。*S100A4* 蛋白属于钙联蛋白 S100 家族,该家族在细胞的信号转导、生长和分化调节等方面起作用^[3]。近来发现,*S100A4* 蛋白可能通过与细胞骨架、肌纤蛋白的成分相互作用调节细胞运动,参与肿瘤细胞的侵袭和转移^[4]。神经母细胞瘤是儿童最常见的恶性实体肿瘤,目前经强烈的诱导化疗、手术切除、局部放疗、自体骨髓干细胞移植、13-顺维甲酸生物治疗等其5年无病生存率也仅40%^[5]。最近研究发现 *S100A4* 基因在神经母细胞瘤早期转移中发挥重要作用^[1],因此针对该基因靶点进行基因治疗对提高患儿预后具有重要意义。

反义技术是近年来发展的一种精确和高效的调控特异基因表达的方法,其原理是使用与靶基因(mRNA 或 DNA)特定序列互补的短核苷酸片段封闭靶基因表达^[6]。作为药用的反义寡核苷酸关键的技术问题是如何提高细胞膜的通透性,并克服其易被核酸酶降解的缺点。

脂质体作为基因载体,由于转染效率较高,保护基因不被体内核酸酶降解,具有延缓药物代谢、操作方便等优点得到了广泛应用^[7]。本实验中应用转染能力更强且不受血清干扰的 Lipofectamine™ 2000 脂质体,进一步提高了作用的效率及作用时间。荧光强度反映了进入细胞的 AS-ODN 数量,每 300 个细胞中有荧光发射的细胞比例反映了作用效率。经脂质体介导的 AS-ODN 的荧光强度、作用效率均达非脂质体介导的 1 倍以上,其转染 36 h 后仍可检测

到很高的荧光强度,且作用效率也比较满意。但本实验中对对照组于转染后 6 h 达细胞内最高荧光强度,实验组相对滞后为 8 h,原因可能在于脂质体介导的 AS-ODN 进入肿瘤细胞机制与单纯 AS-ODN 不同所致。

脂质体介导的最大副作用在于其细胞毒性,Bennett 等^[8]研究认为 30 μg/mL 的 Lipofectamine 就可产生细胞毒性,新的脂质体的应用,减少脂质体的用量都是解决的方向。

[参 考 文 献]

[1] Gao XN, Tang SQ, Zhang XF. S100A4 antisense oligodeoxynucleotide suppresses invasive potential of neuroblastoma cells[J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(4): 648-652.

[2] Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family[J]. Genes Dev, 1989, 3(7): 1086-1093.

[3] Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(4): 134-140.

[4] Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Maitland N, Lomonosov M, Hansen K, et al. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin[J]. J Biol Chem, 1998, 273(16): 9852-9856.

[5] 唐锁勤,冯晨,王建文,黄东生,张小飞. RT-PCR 检测神经母细胞瘤患儿化疗后骨髓 PGP9.5mRNA 表达在预后判断中的意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3): 215-217.

[6] Tamm I, Dorken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea [J]. Lancet, 2001, 11, 358(9280): 489-497.

[7] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(21): 7413-7417.

[8] Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides [J]. Mol Pharmacol, 1992, 41(6): 1023-1033.

(本文编辑:钟乐)