

· 临床研究 ·

## survivin 反义寡核苷酸抑制 HL-60 细胞增殖并诱导细胞凋亡

朱永生, 郭祥, 葛娟

(南京医科大学第二附属医院, 江苏 南京 210011)

**[摘要]** 目的 探讨 survivin 反义寡核苷酸(ODN)对人白血病细胞系 HL-60 细胞增殖和凋亡的影响。方法 人工合成 survivin 基因反义和正义 ODN, 并进行硫代磷酸化修饰, 通过脂质体途径分别转染 HL-60 细胞; 应用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 survivin mRNA 和蛋白表达; 应用 MTT 法检测 survivin 反义 ODN 对 HL-60 细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测细胞周期变化及细胞凋亡比率。结果 体外培养的 HL-60 细胞可表达较强的 survivin mRNA 和蛋白; survivin 反义 ODN 可呈浓度依赖性地抑制 survivin mRNA 和蛋白表达, 1 000 ng/mL AS-ODN 几乎完全抑制 survivin mRNA 和蛋白表达。MTT 研究表明, survivin 反义 ODN 可呈浓度依赖性地抑制 HL-60 细胞增殖, 1 000 ng/mL AS-ODN 对细胞生长的抑制率可达 78.14%; 诱导细胞凋亡, 使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。survivin 正义 ODN 对 survivin mRNA 和蛋白以及 HL-60 细胞的增殖和细胞周期无明显的抑制作用。结论 脂质体介导转染 survivin 反义寡核苷酸可抑制细胞增殖、诱导细胞发生 G<sub>2</sub>/M 期阻滞而促进细胞凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 97-100]

**[关键词]** survivin; 反义寡核苷酸; 凋亡; 白血病;

[中图分类号] R733.7 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2006)02-0097-04

### Induction of apoptosis and inhibition of HL-60 cell proliferation by survivin antisense oligonucleotide

ZHU Yong-Sheng, GUO Xiang, GE Juan. Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China (Email: zhuysh@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of survivin antisense oligonucleotide (ODN) on cell proliferation and apoptosis of HL-60 cells. **Methods** Synthetic ODN was completely phosphorothioate-modified. Cationic lipid-mediated antisense ODN was transferred into HL-60 cells. The expression of survivin mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western Blot. The incorporation of MTT was used as the measurement of HL-60 proliferation. The cell-cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** HL-60 cells spontaneously expressed survivin mRNA and protein. Both mRNA and protein expression of survivin decreased significantly in the antisense ODN transfected cells in comparison to that in the original cells and cells transfected with sense ODN. Survivin antisense ODN significantly inhibited cell proliferation and induced apoptosis in a dose-dependent manner. The cell-cycle in the antisense ODN-transfected cells stopped at the G<sub>2</sub>/M phase. **Conclusions** Antisense ODN targeting at survivin mRNA can inhibit HL-60 cell proliferation and induce G<sub>2</sub>/M stop and apoptosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2): 97-100]

**Key words:** Survivin; Antisense oligonucleotide; Apoptosis; Leukemia

survivin 是新近发现的一种抑制细胞凋亡蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族成员, 1997 年由耶鲁大学的 Altieri 等用效应细胞蛋白酶受体-1 (effector cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先分离出来。其特异性表达于人和鼠的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞, 在正常成人组织中的表达仅见于胸腺、睾丸和分

泌期子宫内膜。survivin 通过直接抑制凋亡信号转导过程中最下游的效应分子 caspase-3 的活性而阻断凋亡的发生过程, 在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用<sup>[1~3]</sup>。本研究应用针对 survivin mRNA 设计的反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASODN), 通过脂质体介导转染人白血病细胞 HL-60, 抑制 survivin 的表达, 观察其对 HL-60 细胞

[收稿日期] 2005-05-11; [修回日期] 2005-09-10

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金 (基金编号: NY02003)

[作者简介] 朱永生, 男, 副主任医师。主攻方向: 小儿血液病。

凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及试剂

人白血病细胞株 HL-60 由中国科学院上海细胞生物学研究所引进。Tag DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶、dNTP、Oligo(dT) 15 和 RNA 酶抑制剂(RNasin) 购自上海 Promega 公司; RPMI 1640, Lipofectin, TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒购自美国 Gibco BRL 公司; Western Blot 试剂盒购自美国 promega 公司; 抗 survivin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 增强型化学发光(ECL) 试剂盒购自美国 Amersham 公司。

### 1.2 survivin 反义和正义寡核苷酸(ODN) 合成

survivin 反义寡核苷酸(AS-ODN) 序列为: 5'-GGGGCACCCTATGCCGCCGCC-3'; 正义寡核苷酸(S-ODN) 序列为: 5'-GGCGGCGGCATGCGTGCCCC3'。ODN 经全程硫代化修饰, 由上海博亚生物工程公司合成, 经 PAGE 方法纯化, 冻干保存。

### 1.3 细胞转染

脂质体介导 ODN 的细胞转染按试剂盒说明书操作, 具体方法为: 分别在 2 个 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管中配置溶液 A: 反义 ODN 加入 100 mL 无血清 RPMI 1640 培养液(终浓度分别为 200, 400, 800, 1 000 ng/mL) 和溶液 B: 10 mL (1g/L) 脂质体加入 100 mL 无血清 RPMI 1640 培养液(终浓度为 100 mg/L)。室温下静置 30~45 min 后轻轻混合两种溶液, 孵育 10~15 min。转种  $1 \times 10^6$  细胞于 6 孔培养板中, 待细胞 80% 融合后于反义 ODN-脂质体复合物中加入 800 mL RPMI 1640 培养液, 轻轻混合后平铺于细胞上, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 6 h 后加入含 10% 血清的 RPMI 1640 液终止, 于实验终点收集细胞进行检测。按相同的方法进行正义 ODN(1 000 ng/mL) 的细胞转染。

### 1.4 细胞总 RNA 抽提

细胞转染反义寡核苷酸后继续培养 24 h, 采用 TRIzol 抽提试剂盒提取细胞总 RNA, 应用 GeneQuant 核酸定量分析仪测定细胞总 RNA 的产量和纯度, A260/280 比值 > 1.6, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定证实无降解后用于 RT-PCR 扩增。

### 1.5 RT-PCR

取细胞总 RNA 1 mg, 加入 200 U AMV 逆转录酶、20 U RNasin、0.5 mmol/L dNTP、0.1 mg Oligo(dT) 15 进行逆转录反应。取逆转录后的原液 10 mL, 加入 0.5 mmol/L dNTP、3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、内

参照 b-actin 或 survivin 引物和 1 U Taq DNA 聚合酶, 总反应体积 50 mL, 92 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 反应 25 个循环, 72 °C 延伸 5 min。b-actin 引物序列为: 上游引物: 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3'; 下游引物: 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT TGG C-3'。survivin 引物序列为: 上游引物: 5'-CAT GGG TGC CCC GAC GTT-3'; 下游引物: 5'-TCA ATC CAT GGC AGC CAG CT-3'。取 PCR 产物 20 mL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 应用 UVP 凝胶图像扫描系统对 survivin 和 b-actin 电泳条带进行密度扫描, 由计算机计算出各自积分光密度, 以 survivin 和 b-actin 光密度比值表示 survivin 表达的相对强度。

### 1.6 Western Blot

细胞转染不同浓度的反义寡核苷酸后继续培养 24 h, 分别收取细胞。离心后用 PBS 洗 1 次, 沉淀用三去污剂裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L aprotinin, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠) 100 mL 重悬, 冰浴放置 45 min, 间或混旋震荡以促进蛋白释放, 以 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为细胞总蛋白抽提物。将抽提物用蛋白定量试剂盒定量, 80 mg/泳道进行 SDS-PAGE, 电泳结束后, 以 40V, 2 h 将蛋白转移至 NC 膜, 封闭液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.5% 脱脂奶粉) 封闭 2 h, 加入一抗, 4 °C 过夜, 二抗室温下杂交 45 min, 洗膜后用 ECL 试剂盒检测。应用 UVP 凝胶图像扫描系统对显影胶片进行光密度扫描, 结果以实验组光密度与对照组光密度比值表示。

### 1.7 MTT 掺入法

细胞转种于 96 孔板, 转染后继续培养 48 h, 加入 MTT (5 mg/mL) 10 mL/孔, 继续培养 4 h, 去上清, 加入二甲亚砜 0.1 mL/孔, 振荡后用酶标仪检测 OD 值, 检测波长 570 nm。同时计算细胞增殖的抑制率, 抑制率(%) = [(对照组 OD<sub>570</sub> - 实验组 OD<sub>570</sub>)/对照组 OD<sub>570</sub>] × 100%。

### 1.8 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡比率

收集细胞, 应用 70% 乙醇溶液 4 °C 固定, RNase A 37 °C 孵育 1 h, 碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡细胞的比率。

### 1.9 统计学方法

对 MTT 法测得的抑制率进行平方根反正弦处理, 实验结果以均数 ± 标准差表示。应用 SPSS 10.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理。采用单

因素方差分析( $F$ 检验和 $q$ 检验)进行各组间比较。

## 2 结果

### 2.1 HL-60 细胞中 survivin mRNA 及蛋白表达

RT-PCR 及 Western Blot 研究结果显示,HL-60 细胞在含 10 % 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中生长时,可表达较强的 survivin mRNA 和蛋白,见图 1。

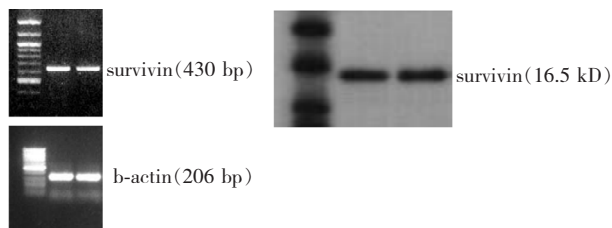


图1 HL-60 细胞中 survivin mRNA 及蛋白表达

### 2.2 survivin 反义寡核苷酸对其 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,与未经反义寡核苷酸处理的 HL-60 细胞相比,200 ng/mL AS-ODN 即可显著降低 HL-60 细胞中 survivin mRNA 水平,且其作用呈浓度依赖性,1 000 ng/mL AS-ODN 几乎完全抑制 survivin mRNA 表达,而作为阴性对照的正义序列(浓度为 1 000 ng/mL)则对 survivin mRNA 没有影响,表明 survivin AS-ODN 在细胞内可诱导其 mRNA 特异性的降解,见图 2。

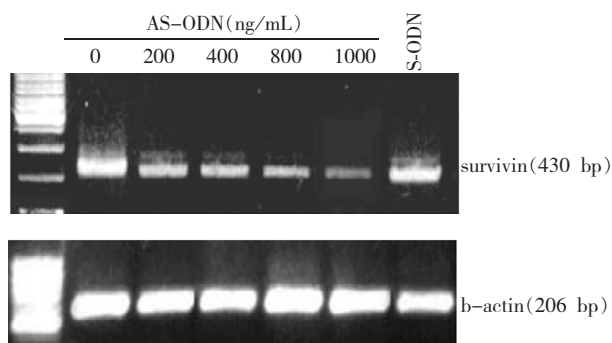


图2 survivin 反义寡核苷酸对其 mRNA 表达的影响

### 2.3 survivin 反义寡核苷酸对其蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示,与未经反义寡核苷酸处理的 HL-60 细胞比较(空白对照组),200,400,800,1 000 ng/mL 的反义寡核苷酸可呈梯度性的抑制 HL-60 细胞中 survivin 的蛋白表达,而作为阴性对照的正义序列(浓度为 1 000 ng/mL)则没有明显的抑制 survivin 表达的效应,见图 3。

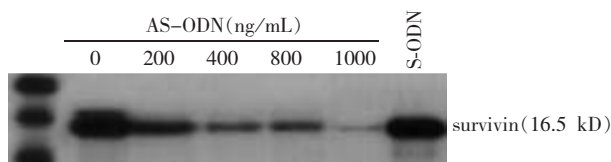


图3 survivin 反义寡核苷酸对其蛋白表达的影响

### 2.4 survivin 反义寡核苷酸对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

转染 HL-60 细胞 48 h 后,200 ng/mL AS-ODN 对细胞生长的抑制率达 24.39%,与空白对照组比较差异有显著性,其作用呈浓度依赖性,1 000 ng/mL AS-ODN 对细胞生长的抑制率可达 78.14%,survivin S-ODN 对 HL-60 细胞的生长无明显抑制作用,见图 4。

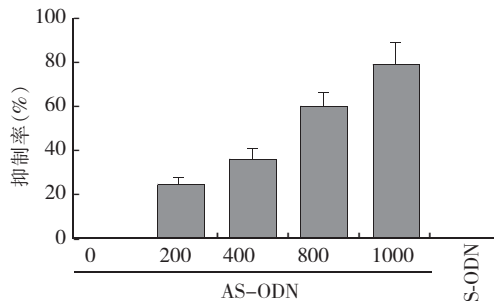


图4 survivin 反义寡核苷酸对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

### 2.5 survivin 反义寡核苷酸对 HL-60 细胞周期及凋亡的影响

细胞周期分析可见 survivin AS-ODN 转染组  $G_1$  期细胞显著减少, $G_1$  峰左侧出现明显的凋亡峰(亚二倍体峰),各 AS-ODN 转染组细胞凋亡率、 $G_2/M$  期细胞数均较空白对照组和正义对照组明显增加,出现  $G_2/M$  期阻滞,且这种作用呈浓度依赖性,见表 1。

表1 survivin 反义寡核苷酸对 HL-60 细胞周期及凋亡的影响

| 分组                 | 凋亡峰          | $G_1$        | S            | $G_2/M$      |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AS-ODN 0 ng/mL     | 0.64 ± 0.11  | 73.18 ± 2.05 | 19.62 ± 1.87 | 6.17 ± 0.12  |
| AS-ODN 200 ng/mL   | 2.19 ± 0.15  | 63.27 ± 2.19 | 25.30 ± 1.10 | 8.51 ± 0.43  |
| AS-ODN 400 ng/mL   | 7.83 ± 0.51  | 54.39 ± 1.95 | 24.64 ± 0.79 | 12.17 ± 0.38 |
| AS-ODN 800 ng/mL   | 26.31 ± 1.98 | 10.69 ± 0.91 | 22.85 ± 1.07 | 39.28 ± 2.04 |
| AS-ODN 1 000 ng/mL | 34.17 ± 2.86 | 6.28 ± 0.47  | 15.24 ± 0.71 | 43.69 ± 1.95 |
| S-ODN              | 0.71 ± 0.12  | 68.93 ± 2.51 | 22.18 ± 0.96 | 7.62 ± 0.14  |

### 3 讨论

survivin 作为 IAP 家族中目前发现的唯一与细胞凋亡和周期调控均密切相关的成员,对维持快速增殖的细胞以及肿瘤细胞的正常生理功能具有非常重要的作用。研究表明,survivin 仅在胚胎有显著表达,而且有严格的发育阶段特异性,在成年终末分化组织中表达很低,甚至不表达。此外,survivin 在绝大多数肿瘤组织以及约 50% 高分化的非霍奇金淋巴瘤中表达,且其高表达常与预后不良相关<sup>[1~3]</sup>。本研究首先观察了 survivin 在人白细胞细胞株 HL-60 中的表达,结果证实,在正常培养状态下,HL-60 有较强的 survivin mRNA 和蛋白表达。

肿瘤是一类细胞增殖周期紊乱性疾病,对细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中起重要作用,其中 G<sub>2</sub>/M 检验点的存在则控制遗传的忠实性和有丝分裂的完整性<sup>[4,5]</sup>。本研究结果发现,survivin 反义寡核苷酸可使 HL-60 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期并发生凋亡,提示 survivin 在 HL-60 细胞分裂的调控中发挥了重要作用,这一结果与 survivin 特异性地表达于细胞周期的 G<sub>2</sub>/M 期以及在纺锤体的定位等特性是一致的。因此,我们认为 survivin 基因对于 HL-60 细胞顺利通过 G<sub>2</sub>/M 期检验点,并强迫细胞完成有丝分裂以维持细胞增殖活性具有重要作用,封闭 survivin 的表达可以诱导细胞的生长停滞于 G<sub>2</sub>/M 期,使之无法完成有丝分裂,进而诱导细胞发生凋亡。

由于 survivin N 端只有一个较为保守的 BIR (baculoviral IAP repeat) 结构域,BIR 结构域是直接对凋亡程序执行元件-caspase-9, caspase-3, caspase-6 与 caspase-7 起始活化事件或催化反应发挥抑制作用的主要基序(motif)。而 survivin 的 C 端则缺乏 RING 锌指,体外实验结果提示缺失 RING 可能与增强其凋亡抑制功能有关<sup>[6,7]</sup>。Olie 等<sup>[8]</sup>研究发现,针对 survivin mRNA 232-251 区域的反义寡核苷酸对 survivin mRNA 表达的抑制率达 70%,并可诱导细胞的凋亡及增加肿瘤细胞对化疗药物表鬼白素的;应用 survivin 反义寡核苷酸抑制正常细胞和肿瘤细胞中 survivin 表达,结果细胞凋亡增加,软琼脂集落的形成减少。本研究结果发现,survivin 反义寡核苷酸可呈浓度依赖性地抑制体外培养的 HL-60 细胞增殖并诱导细胞凋亡。本研究中所用的反义寡

核苷酸是针对 survivin 基因的翻译起始密码子区设计的,它通过诱导 RNase H 活性对靶 mRNA 进行切割,以及占领起始密码子区序列阻碍靶 mRNA 的翻译起始来抑制 survivin 基因的表达。RT-PCR 和 Western Blot 研究结果亦表明,survivin 反义寡核苷酸转染 HL-60 细胞后,细胞内 survivin mRNA 及蛋白水平均显著下降,200 ng/mL AS-ODN 即可明显降低 HL-60 细胞中 survivin mRNA 和蛋白水平,且这种作用呈剂量依赖性,1 000 ng/mL AS-ODN 对 survivin mRNA 和蛋白的抑制作用可达 85% 以上,作为对照的正义序列则不能降低 HL-60 细胞内 survivin 的 mRNA 和蛋白水平,从而进一步证明了 survivin 反义寡核苷酸能有效抑制 HL-60 细胞中 survivin 基因的表达。我们又进一步观察了 survivin 反义寡核苷酸对细胞增殖和细胞凋亡的影响。我们的研究结果发现,200 ng/mL survivin 反义寡核苷酸即可显著抑制 HL-60 细胞增殖、使 G<sub>1</sub> 期细胞明显减少,并出现细胞凋亡,1 000 ng/mL AS-ODN 对细胞生长的抑制率可达 78.14%,这些研究结果提示,survivin 可能是白血病靶向治疗的一个很好的靶基因或蛋白。

### [参 考 文 献]

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8):917-921.
- [2] Altieri DC, Marchisio PC, Marchisio C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer [J]. Lab Invest, 1999, 79(11):1327-1333.
- [3] Marzia P, Gennaro C, Marco F, et al. Ribozyme-mediated attenuation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis [J]. J Clin Invest, 2002, 109(2):285-286.
- [4] Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis [J]. Science, 1996, 274(5293):1664-1672.
- [5] 高红,王常林,蔡炜嵩,朱贝贝. Survivin Caspase-3 mRNA 在肾母细胞瘤中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(5):381-384.
- [6] Badran A, Yoshida A, Wano Y, Imamura S, Kawai Y, Tsutani H. Expression of the antiapoptotic gene survivin in chronic myeloid leukemia[J]. Anticancer Res, 2003, 23(1B):589-592.
- [7] Li FZ, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. Nature, 1998, 396(6711):580-584.
- [8] Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy [J]. Cancer Res, 2000, 60(11):2805-2809.

(本文编辑:钟乐)