

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0190-04

ets-1 基因的反义寡核苷酸治疗胃癌的研究

丁印鲁, 赵 峰, 常新忠, 宫向前, 李兆亭 (山东大学齐鲁医院普外科, 济南 250012)

[摘 要] **目的:** 研究 ets-1 反义寡核苷酸对胃癌的治疗作用及其机制。**方法:** 应用 ets-1 反义、正义寡核苷酸转染 SGC-7901 细胞, 并设 PBS 对照组。转染后应用逆转录聚合酶链式反应检测 ets-1mRNA 的变化, 克隆形成试验检测细胞增殖活性的变化, Transwell 小室检测癌细胞体外侵袭力的变化, 并应用裸鼠胃癌皮下转移模型观察对体内侵袭力的影响。**结果:** 转染 ets-1 反义寡核苷酸后, ets-1mRNA 表达降低, 形成克隆数目较正义组、对照组明显减少(24.2 ± 4.8 vs 47.6 ± 8.1 vs 44.3 ± 7.6 , $P < 0.01$), 穿过小室滤膜细胞数目明显减少(97.1 ± 11.1 vs 198.7 ± 18.3 , 205.8 ± 22.2 , $P < 0.01$), 裸鼠胃癌生长明显受到抑制。**结论:** ets-1 反义寡核苷酸对胃癌有治疗作用, 其机制可能与降低胃癌细胞体内外侵袭力有关。

[关键词] 胃癌; 转录因子; 反义寡脱氧核苷酸; 肿瘤浸润

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A

The Therapeutic Effects of Ets-1 Antisense Oligoxydeonucleotide On Gastric Carcinoma

DING Yin-lu, ZHAO Feng, CHANG Xin-zhong, GONG Xian-qian, LI Zhao-ting (Department of General Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, 250012 China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effects of ets-1 antisense oligoxydeonucleotide(AsODN) on gastric carcinoma. **Methods:** Cultured SGC-7901 cells were divided into control group, sense oligoxydeonucleotide(sODN) group and AsODN group. After transfection for 24 h, expression of ets-1mRNA was detected by RT-PCR, growth inhibition was detected by colone formation assay, *in vitro* invasive ability assay was carried out in Transwell chamber, the animal model of xenotransplanted gastric carcinoma in nude mice was established to detect invasive ability *in vivo*. **Results:** ets-1 AsODN could under-regulate the expression of ets-1 mRNA, number of colone formation of AsODN group was significantly lower than the other two groups(24.2 ± 4.8 vs 47.6 ± 8.1 vs 44.3 ± 7.6 , $P < 0.01$), so was the number of cells which crossed to the lower surface of the matrigel-coated filters (97.1 ± 11.1 vs 198.7 ± 18.3 , 205.8 ± 22.2 , $P < 0.01$). ets-1 AsODN could also inhibit the growth of xenotransplanted gastric carcinoma in nude mice significantly. **Conclusion:** ets-1 AsODN had therapeutic effects on gastric carcinoma, and the inhibition of the invasive ability of gastric cancer cells might be one of its mechanisms.

[Key words] gastric carcinoma; ets-1; antisense oligoxydeonucleotide; neoplasm invasiveness

* 反义寡核苷酸(Antisense oligoxydeonucleotide, AsODN)具有特异性抑制基因表达的能力, 目前已经有十几种 AsODN 应用于临床。ets-1 基因在胃癌中异常高表达, 在正常胃组织中无表达, 并且与胃癌的浸润转移密切相关^[1]。ets-1 在胃癌中的这种异常表达为反义治疗提供了依据。为了探讨靶向 ets-1 在胃癌治疗中的意义, 我们应用靶向 ets-1 的 AsODN, 观察其对胃癌细胞株 SGC-7901 侵袭力的影响。

1 材料与方

1.1 寡核苷酸链的人工合成

ets-1AsODN 序列为 5'-AGATCGACGGCCGCCTTCAT-3', 正义寡核苷酸(oli-goxydeonucleotide, sODN)序列为 5'-ATGAAGCGGCCGTCGA-3', 经 Genebank 同源性检测, 未发现与人类其它基因序列有同源性。AsODN 以及 sODN 序列由上海生工生物工程技术

[作者简介] 丁印鲁(1973-), 男, 山东省临清市人, 博士研究生, 主要从事消化道肿瘤方面的研究
Email: dy070102@163.com.

服务有限公司合成,均为部分硫代磷酸型,PAGE 纯化,冻干分装,-20℃保存,应用时以无菌双蒸水溶解。

1.2 细胞培养与实验分组

人胃癌细胞株 SGC-7901 为上皮样中分化腺癌,培养于含 10% 小牛血清(杭州四季青公司)的 RPMI-1640 培养液(Gibico)中;采用 0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司)消化。实验设 sODN 组、AsODN 组以及对照组。取处于对数生长期的细胞,密度为 $1 \times 10^3/L$,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl ,培养 12 h,约 80% 细胞贴壁后,加入相应的寡核苷酸。AsODN,sODN 的浓度均为 20 $\mu mol/L$,对照组加等体积的 PBS。继续培养 24 h 后收获细胞备用。

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

应用 Trizol 试剂盒,提取总 RNA,DEPC 处理。采用总体积 50 μl 的逆转录体系,37℃ 逆转录 1 h,95℃ 变性 10 min,4℃ 保存。ets-1 上游引物 5'-GGGT-GACGACTTCTGTGTTTG-3',下游引物 5'-GTTAATG-GAGTCAACCCAGC-3'; β -actin 上游引物 5'-TCCTCCCT-GGAGAAGACTA-3',下游引物 5'-AGTACTTGCCT-CAGGAGGA-3'。扩增片段长度分别为 274,313 bp。PCR 反应条件:94℃ 变性 60 s,57℃ 复性 60 s,72℃ 延长 90 s,共 28 个循环后,取 RT-PCR 产物 20 μl 加入 2% 的琼脂糖中(含少量溴化乙锭),电泳,分析结果。

1.4 平板克隆形成试验

取收获的细胞,按每孔 300 个细胞,接种于 6 孔板,每组接种 4 孔,轻轻晃动,使细胞分散均匀。将培养板移入 37℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中,静止培养 2 周后终止培养,弃培养液,PBS 漂洗,纯甲醇固定 15 min,Giemsa 染色 10 min,流水冲去染液,空气干燥。分别于显微镜下计数克隆数(大于 50 个细胞以上者计为一个克隆),每组计算平均值。

1.5 体外侵袭实验

Transwell 小室(COSTER 公司)为一杯状结构,杯孔直径 6.5 mm;杯底由 8 μm 孔径的聚碳酸脂微孔滤膜封闭(Watllman 公司)。滤膜上均匀涂 1:5 RPMI-1640 稀释的人工基质 Matrigel(B. D 公司),约 50 μg /小室。制备好的小室用紫外线照射 2 h 杀菌,使用前加入少量无血清的培养基水化。小室的下室加入 0.5 ml 无血清培养 24 h 的 NIH₃T₃ 细胞上清液,上室加入收获的细胞悬液 25 μl ,调整细胞浓度为 $2 \times 10^2/L^{-1}$,每组 3 个复孔。培养 12 h 后取出滤膜,甲醇固定,常规 HE 染色。随机于显微镜下取上、下、左、右、中心共 5 个视野,计数穿膜细胞数,取每个视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.6 裸鼠胃癌皮下种植瘤抑制试验

取处于对数生长期的未经寡核苷酸处理的 SGC-7901 细胞,制成浓度为 $1 \times 10^4/L^{-1}$ 单细胞悬液。取裸鼠 12 只,于每只右后肢腋部皮下接种 0.2 ml。以皮下结节直径超过 0.5 cm 为成瘤标准。成瘤后随机分为:(1)对照组:每日于瘤体内多点注射 0.2 ml/只的生理盐水;(2)sODN 组:同法每只裸鼠注射 ets-1 sODN 50 mg/L;(3)AsODN 组:同法每只裸鼠注射 ets-1 AsODN 50 mg/L。治疗后每天观察裸鼠的生长情况,治疗后 12 d 断颈处死裸鼠,剥瘤称重,计算肿瘤生长抑制率。

$$\text{抑瘤率}(\%) = (1 - \frac{\text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}}) \times 100\%$$

1.7 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件中的多组样本均数的比较(LSD 法), $P < 0.05$ 时差异有显著性。

2 结果

2.1 RT-PCR

提取的总 RNA 经核酸蛋白分析仪测定,OD260 nm/OD280 nm 比值为 1.8~2.0,变性胶电泳后可以见到 18S 和 28S 2 条清晰的条带,没有降解的 RNA 片段出现。RT-PCR 结果显示,ASODN 作用 24 h 后,ets-1 mRNA 表达较对照组明显下降,而 sODN 组 ets-1 mRNA 的表达无明显变化(见图 1)。

图 1 RT-PCR 检测 ets-1 的 mRNA 表达

Fig. 1 The analysis of ets-1 mRNA by RT-PCR

1: AsODN; 2: sODN; 3: PBS; 4: β -actin; M: Marker

2.2 平板克隆形成试验

AsODN 组的克隆形成数目显著低于对照组和 sODN 组($P < 0.01$),而对对照组和 sODN 组的克隆形成数目无显著性差异($P > 0.05$)(表 1),且 AsODN 组克隆体积亦较小。提示 ASODN 能够抑制单个癌细胞的增殖能力。

2.3 体外侵袭试验

3 组细胞均能够穿过铺有 Matrigel 的滤膜(图 2);对照组和 sODN 组穿过滤膜的细胞数目无显著差异($P > 0.05$),而 AsODN 组的穿过滤膜的细胞数目明显少于其它 2 组($P < 0.01$)(表 2)。表明 ets-1 AsODN 能够显著降低 SGC-7901 细胞的侵袭能力。

图2 不同寡核苷酸对SGC7901细胞侵袭力的影响

Fig. 2 Effect of ets-1 oligonucleotides on the invasion ability of SGC-7901 cells.

Invasive ability assay was carried out in transwell chamber. A and B: Cells were treated with PBS and sODN respectively, which crossed to the lower surface of the matrigel-coated filters. C: Cells were treated with ets-1 AsODN (HE, ×200).

2.4 裸鼠胃癌皮下种植瘤抑制试验

所有裸鼠于接种细胞后2周左右成瘤,成瘤率100%。对照组与sODN组肿瘤生长较快,处死裸鼠后剥瘤称重,2组瘤重无显著差异($P > 0.05$);AsODN组肿瘤生长缓慢,平均瘤重显著低于对照组与sODN组($P < 0.01$);AsODN的抑瘤率明显高于sODN(表3)。

表1 不同寡核苷酸对SGC-7901细胞克隆形成能力的影响
Tab.1 Effect of oligonucleotides on ability of clone formation

Groups	Parallel holes	Number of clone formation
Control	4	47.56 ± 8.1
sODN	4	46.03 ± 7.6*
AsODN	4	24.16 ± 4.8▲

* $P > 0.05$ vs control group,

▲ $P < 0.01$ vs Control and sODN group

表2 不同寡核苷酸对SGC7901细胞侵袭力的影响

Tab.2 Effect of oligonucleotides on invasion ability of SGC7901 cells

Groups	Parallel holes	Number of invasion
Control	3	205.8 ± 22.2
sODN	3	198.7 ± 18.3*
AsODN	3	97.1 ± 11.1▲

* $P > 0.05$ vs control group;

▲ $P < 0.01$ vs control and sODN group

表3 不同寡核苷酸的抑瘤率比较

Tab.3 Comparison of tumor growth inhibitory rate after treatment(%)

Groups	n	Tumor weight(g)	Inhibitory rate(%)
Control	4	1.28 ± 0.13	0
sODN	4	1.18 ± 0.11*	8.0
AsODN	4	0.60 ± 0.11▲	54.0

* $P > 0.05$ vs control group;

▲ $P < 0.01$ vs control and sODN group

3 讨论

人类 ets-1 基因位于染色体 11q23,其编码的分子量为 54 kD 的蛋白是一种转录因子,具有一个由 85 个氨基酸组成的特异的 DNA 结合区,该区可以识别、结合嘌呤丰富的 DNA 核心序列 GGAA/T,进而调节相关基因的转录,这一序列存在于与细胞外基质降解以及血管生成有关的许多基因的 5'-侧翼调节区,如整合素 $\alpha 4$ (integrin $\alpha 4$)、基质分解素-1(stromelysin-1)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)、胶原酶(collagenase)等。因此,ets-1 基因与多种肿瘤的侵袭转移有关。

目前对于 ets-1 基因的认识还处于初始阶段,ets-1 与肝细胞生长因子受体(c-met)在食道癌中的共同高表达有利于增强癌细胞在肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)刺激下的运动能力,提高肿瘤的侵袭性^[2];ets-1 与大肠癌间质反应、淋巴结转移、静脉侵犯等呈正相关,是影响结肠癌的肺转移的独立因素^[3];ets-1 是乳腺癌手术后复发转移的极有价值的预测指标^[4];ets-1 mRNA 高表达的宫颈癌患者术后生存时间

明显缩短^[5]。ets-1 反义寡核苷酸的使用可以导致肝癌细胞株 Bel-7402 浸润能力下降, HLE 细胞的基质金属蛋白酶 7 (matrix metalloproteinase 7, MMP7) 的 mRNA 含量减少, 且表现为剂量依赖性^[6]; 也能够使脑胶质瘤细胞 uPA 表达减少, 降低其侵袭能力^[7]。

Transwell 小室内细胞具有合适的生理环境, 其聚碳酸酯微孔滤膜上的 Matrigel 胶含有人生理浓度的 LN, IV 型胶原, 一般正常细胞不具有侵袭穿透 8 μm 孔径滤膜的能力。我们发现 SGC7901 细胞转染 ets-1 AsODN 后, 体外侵袭能力受到明显抑制, 克隆形成能力降低, 且能够显著抑制裸鼠胃癌皮下种植瘤的生长, 提示 ets-1 AsODN 有可能成为一种有效的抗肿瘤药物, 其机制可能与抑制胃癌细胞侵袭力有关。

[参 考 文 献]

- [1] Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, *et al.* Expression of the ets-1 proto-oncogene in human gastric carcinoma: Correlation with tumor invasion[J]. *Am J Pathol*, 1996, 149(6): 1931-1939.
- [2] Saeki H, Oda S, Kawaguchi H, *et al.* Concurrent overexpression

of ets-1 and c-Met correlates with a phenotype of high cellular motility in human esophageal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 98 (1): 8-13.

- [3] Sato T, Miwa A. ets-1 and integrin beta 3 for lung metastasis from colorectal cancer[J]. *APMIS*, 2002, 110(4): 347-353.
- [4] Span PN, Manders P, Heuvel JJ, *et al.* Expression of the transcription factor ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2002, 21 (55): 8506-8509.
- [5] Fujimoto J, Aoki I, Toyoki H, *et al.* Clinical implications of expression of ets-1 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers[J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(10): 1605-1611.
- [6] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, *et al.* Involvement of the ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6519-6525.
- [7] Kitange G, Shibata S, Tokunaga Y. ets-1 transcription factor-mediated urokinase-type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells stimulated by serum and basic fibroblast growth factors[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(4): 407-416.

[收稿日期] 2003 - 04 - 07

[修回日期] 2003 - 05 - 25

《实用肿瘤杂志》征订启事

《实用肿瘤杂志》由中华人民共和国教育部主管, 浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊不仅连续入选《中文核心期刊要目总览》第 1 版、第 2 版, 2000 年 6 月至今又入选第 3 版肿瘤学类核心期刊, 并被列为医学院校研究生教育 A 类期刊。本刊被《中国科学引文数据库》及《中国生物医学文摘光盘数据库》收录, 被《中国学术期刊光盘版(CAJ-CD)》、《中国期刊网》及《中国学术期刊综合评价数据库》选为全文收录来源期刊。1998 年据《中国科学引文数据库》统计, 本刊已进入全国科技期刊最高引用频率前 500 名。2000 ~ 2002 年度本刊又被被评为浙江省科学技术优秀期刊二等奖。这是对本刊创刊十多年来学术价值的肯定。本刊突出实用性, 主要栏目有专家论坛, 专题讨论, 基础与临床研究, 技术与经验, 药物与临床, 流行病学调查, 综述与讲座, 误诊分析, 短篇报道与个案等, 适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与教学工作阅读, 参考。

《实用肿瘤杂志》为双月刊, 大 16 开, 72 页, 每逢双月 10 日出版。每期定价 8.00 元, 全年 48.00 元。本刊刊号 ISSN1001-1692, CN33-1074/R, 邮发代号 32-87, 全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误, 可汇款至杭州市解放路 88 号浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话: (0571)87783654

传真: (0571)87783654

邮编: 310009