

靶向 MDM2 反义寡核苷酸增强肺癌细胞 A549 的辐射敏感性

郭万峰^{1,2} 林汝仙¹ 郭国祯² 王升启¹

¹ (军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

² (第四军医大学放射医学教研室 西安 710032)

摘要 放射治疗在肺癌的治疗中起着重要的作用。然而,提高肺癌的治愈率是一个重要的课题。MDM2 基因在肿瘤的形成和增殖过程中起着重要的作用,可能是一个重要的靶基因。本研究自行设计了针对 MDM2 的反义核酸药物,通过 RT-PCR 和 Western blotting 检测其抑制效率,然后通过流式细胞仪观察转染细胞受 5 Gy 照射后的细胞死亡情况,MTT 观察细胞照射后的增殖能力。结果发现通过反义治疗的策略成功降低了 MDM2 在肺癌细胞中 A549 中的表达,这导致了 A549 细胞辐射敏感性的增加。表明 MDM2 参与了 A549 的辐射抗性的形成,靶向 MDM2 的反义寡核苷酸可以增强肺癌细胞 A549 的辐射敏感性。

关键词 肺癌细胞 A549,辐射敏感性,反义寡核苷酸,MDM2 基因

中图分类号 R811, R730

肺癌为最常见的恶性肿瘤之一,死亡率很高^[1]。Spira 等^[2]对肺癌的治疗现状进行了综合分析,认为多种治疗相结合,尤其是针对基因靶分子的结合治疗,可能是肺癌治疗的发展方向。反义脱氧寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotide, ASO)是肿瘤治疗的潜在新型药物^[3],其能封闭或抑制肿瘤细胞的关键编码基因,从而对肿瘤细胞增殖作特异性抑制。MDM2 (Murine double minutes2,鼠双微粒体2)是一个促进细胞生长转化的癌基因。紫外线和电离辐射可以诱导 MDM2 基因的表达,MDM2 在阻断这两种辐射诱导的细胞死亡过程中具有关键性的作用^[4-6]。在以前的研究中发现,照射 5 Gy 后,使用寡核苷酸基因芯片动态检测不同辐射敏感性肺癌细胞的基因表达谱,发现 MDM2 基因在辐射抗性的 A549 细胞中是高表达的,而在辐射敏感性的 NCI-H446 细胞中是低表达的,MDM2 可能是一个

提高肿瘤辐射敏感性的靶基因^[7]。因此,针对 MDM2 基因使用反义策略提高肺腺瘤细胞 A549 的辐射敏感性。

1 材料和方法

1.1 反义寡核苷酸的制备

根据反义计算神经网络设计模型、核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA)的二级结构预测和 ASO 的作用机制^[8,9],设计了针对 MDM2 基因的序列,经 BLAST (Basic local alignment search tool, 同源性分析)分析确定了其特异性,然后在本实验室使用 applied biosystems 391 DNA synthesizer 进行合成,OPC (Perkin-Elmer, Foster City, CA)纯化。所有的 ASOs 经过硫代修饰(见表 1)。

Table 1 The sequence of the ASOs

No.	Position	Sequence (5'-3')
ASO 1:	689-708	5' GAT CAC TCC CAC CTT CAA GG 3'
ASO 2:	3-22	5' GCA GCC AAG CTCGCC GCG GT 3'
ASO 3:	686-705	5' CAC TCC CAC CTT CAA GGT GA 3'
ASO 4:	1560-1579	5' CTC TCT TCT TTG TCT TGG GT 3'
ASO 5:	2339-2358	5' CAT GCC TGT AAT CCC AGC AC 3'

第一作者:郭万峰,男,1974年5月出生,1996年毕业于苏州医学院放射医学专业,现为第四军医大学放射医学教研室博士研究生,从事肿瘤辐射增敏分子药物的研究

收稿日期:初稿 2004-12-02,修回 2005-01-24

1.2 细胞培养、照射及转染

取本室保存的肺腺癌细胞系 A549, 培养于含有 10% 小牛血清和抗生素的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中进行培养。用 ⁶⁰Co 放射源进行 5 Gy 照射, 剂量率为 1.51—1.68 Gy/min, 以假照射组作为对照。细胞转染在有 Lipofectin (Invitrogen, CA) 的无血清和抗生素的培养液中进行转染。

1.3 RT-PCR 检测

使用 Trizol (Invitrogen life technologies) 提取 A549 细胞的总 RNA, 使用 ImProm-II™ 逆转录系统 (Promega) 进行逆转录和 PCR 扩增, PCR 引物为: MDM2, 上游 5' AAG ACT ATT CTC AGC CAT CA 3', 下游 5' CAT ACT GGG CAG GGC ATT 3'。GAPDH, 上游 5' ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG 3', 下游 5' CCA TCA CGC CAC AGT TTC C 3'。条件为: 94℃ 5 min, 然后 94℃ 30 s, 55—58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 28—30 个循环, 72℃, 5 min。取 5 μL PCR 产物在 2% 琼脂糖上进行电泳, 溴化乙锭染色, Quantity one (Bio-Rad) 软件进行分析。MDM2 扩增片段为 259 bp, GAPDH 扩增片段为 363 bp。

1.4 Western-Blotting 检测 MDM2 蛋白的表达

脂质体转染 72 h 和电离辐射后 48 h 收集细胞, 加入 60 μL 预冷的 RIPA-PICT 细胞裂解液 (Roche), 置冰上 40 min。4℃、10000 g 离心 15 min, 取上清进行蛋白定量 (Lowrey 酚试剂法)。取 40 μg 蛋白加入 2×上样缓冲液, 经 100℃ 5 min 变性, 用 12% 的 SDS-PAGE 胶分离。凝胶经半干转移至 PVDF 膜上 (Millipore, Bedford, MA)。用含 5% 奶粉的 TBST 缓冲液 4℃ 封闭过夜。加入 1:500 稀释的 MDM2 一抗 (鼠抗, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 和 1:1000 稀释的 β-actin 一抗 (羊抗, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 室温 1 h, TBST 洗涤三次, 加入 1:2500 稀释的 MDM2 二抗 (羊抗鼠, 北京中山) 和 1:3000 稀释的 β-actin 二抗 (兔抗羊, 北京中山) 室温 1 h, TBST 洗涤四次。加 ECL 显色剂 (北京中山) 1 min, X 光胶片曝光成像。

1.5 细胞凋亡的检测

A549 细胞在 RPMI-1640 中培养 24—48 h, 然后加入 200 nmol/L ASO 在存有 Lipofectin (5 μg/mL) 的无血清和抗生素的培养液中孵育 6 h, 然后更换完全培养液。24 h 后, 细胞照射 5 Gy, 48 h 后收集细

胞。按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (北京宝赛) 操作步骤进行, 在 FACScalibur 流式细胞仪检测, CellQuest 软件进行分析。

1.6 MTT 分析

取对数生长期 A549 细胞接种 96 孔板, 每个浓度设 4 个重复孔。经反义核酸和电离辐射处理后按 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) 操作步骤, 每孔加入一种新的四唑复合物 MTS 20 μL, 在 37℃ 条件下继续培养 90 min, 在波长 490 nm 酶标仪 (Wallac 1420 Multilable counter) 下测定吸光度 A 值。试验重复 3 次, 结果通过 Student's *t* 检验分析。计算肿瘤细胞增殖抑制率: 细胞增殖抑制率 (%) = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

1.7 细胞克隆分析

取对数生长期的细胞进行消化, 接种在培养皿中, 细胞数为 200—2000 个/皿, 然后给予 0 Gy、2 Gy、4 Gy 和 6 Gy 的照射, 剂量率为 1.60 Gy/min。照射后 10—14 d, 姬姆萨染色, 计数大于 50 个细胞的细胞克隆, 以假照射组为对照计算集落形成率 (PE), 按照公式计算细胞存活率 (S): $S = \text{照射后细胞形成的细胞克隆数} / (\text{接种细胞数} \times \text{PE}) \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 ASOs 降低 A549 的 MDM2 水平和细胞增殖能力

A549 细胞经 200 nmol/L 抗 MDM2 ASOs 转染后 48 h, MDM2 表达量显著降低, 以 ASO5 最为显著 (见图 1)。ASO2 没有抑制作用。结合 MTT 结果, 我们以 ASO2 作为阴性对照进行实验。分别在

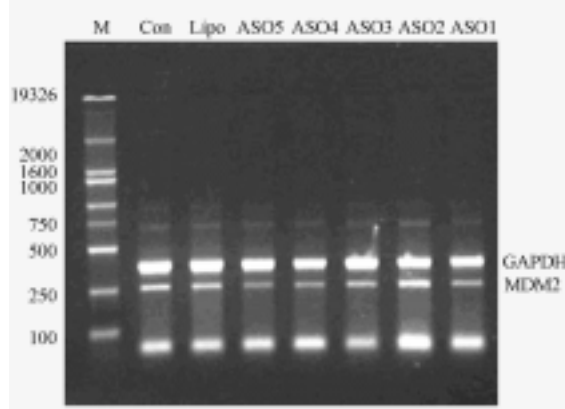


Fig.1 RT-PCR analyses of A549 cells at 48 h after 200 nmol/L anti-MDM2 ASOs. M: Marker; Con: A549 without treatment; Lipo: Lipofectin control

RNA 水平和蛋白水平上检测了 ASO5 处理和电离辐射后的 MDM 水平。由图 2 和图 3 显示在照射后 48 h, MDM2 的水平明显增加, 而在给予 ASO5 后, MDM2 表达显著降低。

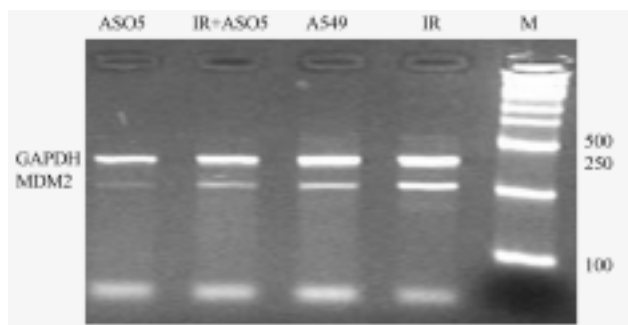


Fig.2 RT-PCR analyses of A549 cells treated with ASO and IR. ASO5 was administered at 200 nmol/L, IR at 5 Gy was given. The cells were harvested 48 h later, RNA was extracted for analysis of MDM2 and GAPDH

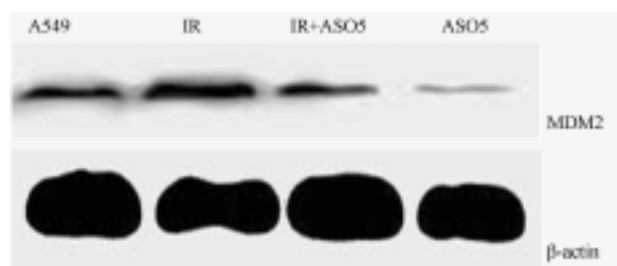


Fig.3 Western blot analyses of A549 cells treated with ASO and IR. ASO5 was administered at 200 nmol/L, IR at 5 Gy was given. The cells were harvested 48 h later, protein was extracted for analysis of MDM2 and β -actin levels

2.2 照射和 ASO 处理后 A549 细胞的增殖和细胞凋亡情况

A549 细胞是肺腺癌细胞系, 辐射抗性较强, SF2 (2 Gy 照射后细胞的存活率) 为 $(64 \pm 11) \%$ (图 4)。经过流式细胞检测发现, 照射 5 Gy 后, 其细胞凋亡率仅为 $(2.56 \pm 0.38) \%$ (见图 5)。而经过 ASO5 处理后, 其辐射敏感性明显增强, SF2 为 $(46 \pm 16) \%$; 细胞凋亡率为 $(34.2 \pm 6.3) \%$, 在合并电离辐射后, 细胞凋亡率为 $(47.5 \pm 7.9) \%$ 。MTT 检测, 发现 ASO5 的抑制率最高, 达到 $(54 \pm 10) \%$, 而在合并电离辐射后, 其细胞增殖抑制率达到 $(76 \pm 13) \%$ (见图 6)。

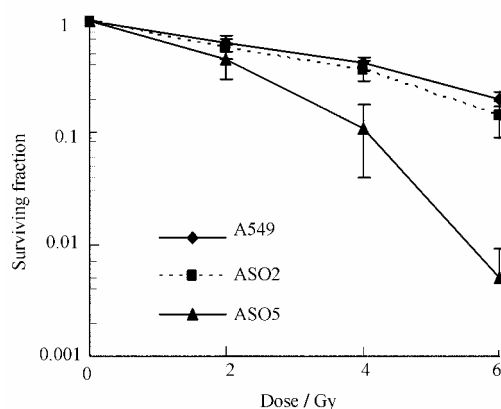


Fig.4 Radiation cell survival curves of the A549 cells without and with ASO treatment. Error bars represent standard deviations for three independent experiments

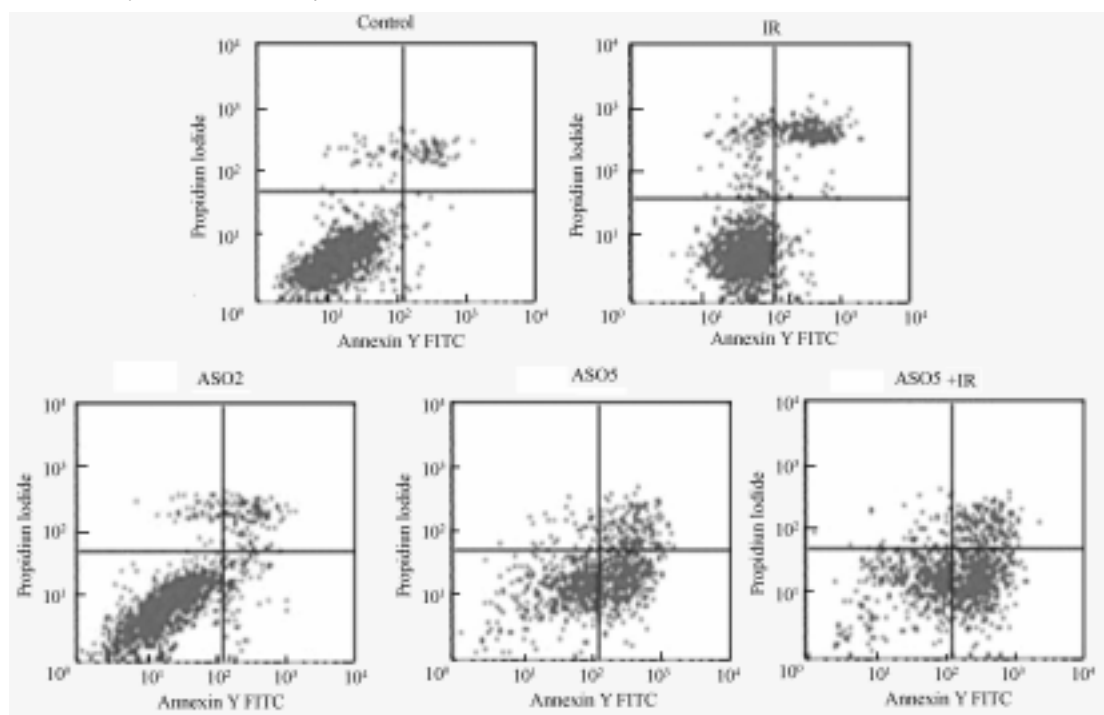


Fig.5 Density plots of A549 cells treated with ASO5 or / and IR. Apoptosis was quantified 48 h after IR or/and 72 h after ASOs, by staining with Annexin-V-FITC and PI and analyzing by flow cytometry

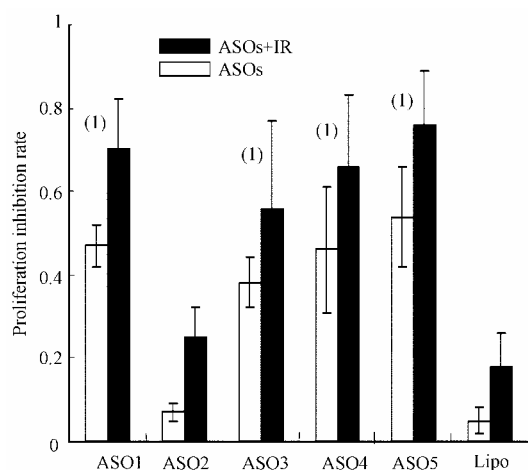


Fig.6 MTT analysis of A549 cells without and with ASOs or / and IR ⁽¹⁾ Compared to Lipo group, a significant difference ($p < 0.01$)

3 讨论

放射治疗在肿瘤治疗中占有重要地位。据统计,在我国约有 70% 的恶性肿瘤病人在病程的某一阶段需接受不同方式的放射治疗,但是放射治疗的治愈率仍较低。肺癌为最常见的恶性肿瘤之一,如何提高部分辐射抗性肺癌的辐射敏感性是放射生物学和放射肿瘤治疗学的一个重要课题。

近年来,随着对肿瘤发病分子机制及细胞生长调控机理研究的深入,肿瘤的基因治疗研究取得了巨大的进展。目前基因治疗与放射结合治疗肿瘤的研究正不断深入^[5,10-12]。MDM2 是一个促进细胞生长转化的癌基因,其在体内可以抑制野生型 p53 的转录激活功能。正常情况下,MDM2 和野生型 p53 有着精确的平衡,其相互调节形成一种负反馈回路^[13]。MDM2 也是电离辐射和紫外线照射时的重要反应基因,高水平的 MDM2 基因影响了野生型 p53 激活所产生的细胞毒性作用,它可能是一个提高肿瘤辐射敏感性的靶基因^[4-8]。在我们根据反义核酸设计模型和二级结构的分析后,设计出了针对 MDM2

的反义寡核苷酸,并成功的部分降低了 A549 细胞中 MDM2 的表达(见图 1—3)。随后,我们研究了在抗 MDM2 ASO 处理后,A549 细胞的生物学特征,发现其辐射敏感性明显增强(图 4—6)。这说明 MDM2 可能是一个提高肿瘤辐射敏感性的重要靶基因。

参考文献

- 1 Wang T, Hopkins D, Schmidt C, *et al.* *Oncogene*, 2000, **19**(12): 1519-1528
- 2 Spira A, Ettinger D S. *N Engl J Med*, 2004, **350**(4): 379-392
- 3 Scherer L J, Rossi J J. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(12): 1457-1465
- 4 Perry M E, Piette J, Zawadzki, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(24): 11623- 11627
- 5 Mu Z, Hachem P, Agarawal S, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, **58**(2): 336-343
- 6 Perry M E. *Mol Cancer Res*, 2004, **2**(1): 9-19
- 7 郭万峰,林汝仙,黄坚,等. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, **25**(2): 107-110
GUO Wanfeng, LIN Ruxian, HUANG Jian, *et al.* *Chin J Radiol Med Prot*, 2005, **25**(2): 107-110
- 8 Chalk A M, Sonhammer E L. *Bioinformatics*, 2002, **18**(12): 1567-1575
- 9 Cooke S T. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1489**(1): 31-44
- 10 Ma B B, Bristow R G, Kim J, *et al.* *J Clin Oncol*, 2003, **21**(14): 2760-2776
- 11 Wacheck V, Selzer E, Gunsberg P, *et al.* *Br J Cancer*, 2003, **89** (7): 1352-1357
- 12 Guo G, Wang T, Gao Q, *et al.* *Oncogene*, 2004, **23**(2): 535-545
- 13 Wu X, Bayle J H, Olson D, *et al.* *Genes Dev*, 1993, **7**(7A): 1126-1132

Antisense MDM2 sensitizer of lung cancer cells A549 to ionizing radiations

GUO Wanfeng^{1,2} LIN Ruxian¹ GUO Guozheng² WANG Shengqi¹

¹(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

²(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT Lung cancer causes a great number of deaths worldwide, and is a leading cause of cancer death in China. Radiotherapy plays a key role in lung cancer treatments. Currently, however, it is difficult to further improve radiocurability of lung cancers. Murine double minute 2 (MDM2), an important gene in tumorigenesis and cell prolif-

eration, might be a suitable target for gene therapy approaches. In this study, we designed an antisense drug targeting to MDM2, and detected inhibitory effect of the antisense in A549 cells by RT-PCR and Western Blotting. Subsequently, the radiation-mediated cell killing was detected by Flow Cytometry and proliferative activity was observed by MTT assay. The antisense strategy was employed, too, to achieve partial reduction of MDM2 in a lung cancer cell line. This suppression of MDM2 resulted in increased radiosensitivity. The results support the hypothesis that MDM2 gene can be a candidate for radioresistance of A549 lung cancer cells, which may provide a potential molecular drug sensitizing the radioresistant cell A549.

KEYWORDS Lung cancer cell A549, Radiosensitivity, Antisense oligodeoxynucleotide, MDM2 gene

CLC R811, R730