

BRCA1 基因反义寡核苷酸对人骨肉瘤细胞的影响

范德刚, 范清宇, 张惠中, 刘云燕, 文艳华

Effectsofantisenseoli gonucleotidesofBRCA 1 geneonhumanosteosarcomacells

FANDe -gang,FANQin g-yu,ZHANGHui -zhong,etal

Orthoedic Oncology Institute of PLA , Tangdu Hospital , Fourth Military Medical University , Xi 'an 710038 , China

Abstract: Objective Toevaluatetheeffectsofantisenseoli gonucleotidesofBRCA1 geneinhumanos - teosarcomacellsSOSP -9607. **Methods** TheSOSP -9607celllinewascultured,thentheeffectsoftheantisense oligonucleotiedsofBRCA1 geneinthecellwasobservedbycloneformattin g,cell growthline,andcellc ycle. **Results** Facilitateeffectswereobservedbythegrowthlineandcloneformattin gwhileitis10 μ mol/Lantisense oligonucleotidesofBRCA1 gene.Theresultofflowc ytometersshowedanauxo -actiontothecell proliferationby cellc ycle. **Conclusion** Therearetrans parenteffectsofantisenseoli gonucleotidesofBRCA1 geneinhumanos - teosarcomacellsSOSP -9607,itsu ggestedthattheBRCA1 geneplayarolein progressionofhumanosteosarco - ma.

Keywords: Osteosarcoma;BRCA1 gene;Antisenseoli gonucleotides;Proliferation;Cellc ycle

摘 要:目的 探索抑癌基因 BRCA1 基因反义寡核苷酸对人骨肉瘤细胞 SOSP-9607 的影响。方法 通过细胞培养,测量细胞生长曲线、计算细胞集落形成率、检测细胞周期等,观察 BRCA1 基因反义寡核苷酸对人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 的影响。结果 BRCA1 基因反义寡核苷酸浓度为 10 μ mol/L 时,骨肉瘤细胞的生长速度变快,集落形成率明显增高;流式细胞仪检测发现其引起细胞周期变化,细胞增殖活性提高。结论 BRCA1 基因反义寡核苷酸对人骨肉瘤细胞 SOSP-9607 有明显的影响,使得骨肉瘤细胞恶性生物学特性更加显著,提示 BRCA1 基因在人骨肉瘤发展过程中起作用。

关键词:骨肉瘤;BRCA1 基因;反义寡核苷酸;增殖;细胞周期

中图分类号:R738.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2003)03-0200-03

0 引言

骨肉瘤是临床常见高度恶性骨肿瘤,其转移是造成患者死亡的主要原因。对骨肉瘤发生和发展相关基因的研究,有助于提高对肿瘤转移机制的认识,促进诊断和治疗研究的深入。诸多研究表明,BRCA1 基因作为一种抑癌基因,与多种恶性肿瘤的发展密切相关^[1]。在研究骨肉瘤转移相关基因的过程中,我们发现 BRCA1 基因在骨肉瘤转移过程中表达水平下降。该基因在骨肉瘤中的表达、与骨肉瘤转移的关系等,尚未见报道。为了探讨该基因在骨肉瘤转移过程中的作用,本研究用 BRCA1 基因经硫代修饰反义寡核苷酸,作用于人骨肉瘤细胞 SOSP-9607,观察其对细胞生存、集落形成和细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 反义寡核苷酸的合成和纯化

反义寡核苷酸由上海博亚生物技术有限公司合成与纯化,合成序列主要根据 BRCA1cDNA 设计^[2],与 BRCA1 转录起始位点互补并给予全程抗核酸酶硫代修饰,反义寡脱氧核糖核酸(antisense oligodeoxynucleotides,ASODNs)序列为 5'-CGAAGAGCAGATAAATCCATTCTCT-3',正义寡脱氧核糖核酸(senseoli godeoxynucleotides,SODNs)序列为 5'-AGAAATGGATTATCTGCTCTTCG-3',使用前用无菌 RPMI-1640 培养液配制所需浓度,加入培养体系中。

1.2 细胞系的培养和传代

人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 由本实验室建立^[3]。在含 10% 灭活小牛血清 RPMI-1640 完全培养体系中接种细胞,倒置显微镜下观察细胞生长情况,每 2~3d 传代,置 37℃、饱和湿度、体积分数为 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.3 BRCA1ASODNs 对人骨肉瘤细胞生长曲线的

收稿日期:2002-08-05;修回日期:2002-10-25

基金项目:2001 年第四军医大学博士学位论文课题资助项目(2001010)

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所

影响

分组: 对照组; Sense(S)组; Antisense(AS)组。S 和 AS 分别取浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 。实验步骤:取对数生长期细胞, $1000\text{ rpm} \times 5\text{ min}$ 离心弃上清, RPMI-1640 洗 1 次。配制细胞起始浓度 $2 \times 10^4/\text{ml}$, 取 24 孔板, 每孔加细胞悬液 $400\mu\text{l}$, 置 37 饱和湿度, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养。24h 后按分组浓度分别加 S 和 AS $40\mu\text{l}$, 再加 $360\mu\text{l}$ 含 10% 灭活小牛血清 RPMI-1640 培养液; 对照组加 $400\mu\text{l}$ 含 10% 灭活小牛血清 RPMI-1640 培养液, 每组 8 孔, 置 37 饱和湿度, $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养。第 1、2、3、4、5、6、7d 分别取 1 孔细胞计数, 绘制细胞生长曲线。

1.4 BRCA1ASODNs 对人骨肉瘤细胞集落形成的影响

分组: 对照组; $10\mu\text{mol/L}$ S 组, $10\mu\text{mol/L}$ AS 组。取对数生长期细胞 $400\text{ cell}/\text{孔}$, 接种于 6 孔板, 每组 2 孔, 摇匀, 置 37 饱和湿度, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养。24h 后加药, 2~3d 换液 1 次, 14~21d 后在低倍镜下计数结果, 大于 50 个细胞为 1 集落。实验重复 3 次, 求均值。统计学处理: 测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用成组设计的样本均数比较的 Student t 检验。

1.5 BRCA1ASODNs 对人骨肉瘤细胞周期的影响

分组: 对照组; $10\mu\text{mol/L}$ S 组; $10\mu\text{mol/L}$ AS 组。取对数生长期细胞 $10^5/\text{孔}$, 接种于 6 孔板, 每组 2 孔, 置 37 饱和湿度, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养。24h 后分别加药, 再过 24h 后收集细胞, 95% 酒精固定, 流式细胞仪测量细胞周期。

2 结果

2.1 BRCA1ASODNs 对细胞生长曲线的影响, 见图 1

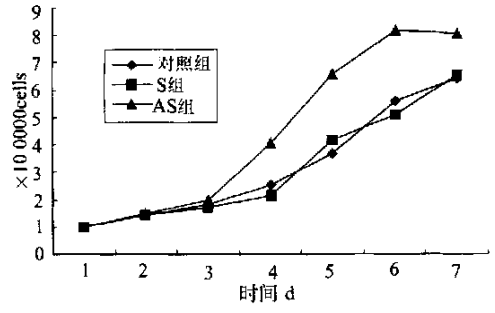


图 1 SOSP-9607 生长曲线

从图 1 曲线可以看出, 当 BRCA1ASODN 剂量为 $10\mu\text{mol/L}$ 时细胞生长速度加快, 自第 4d 起, 对细胞存活率产生显著的影响, 细胞比较早进入对数生长期并很快达到平台期。同时期内, 对照组及 S 组 BR-

CA1SODN 组则无此作用, 均未达到对数生长期。

2.2 BRCA1ASODNs 对人骨肉瘤细胞集落形成的影响

BRCA1ASODN 组的集落数为 87 ± 7 , 而空白对照组和 BRCA1SODN 组分别为 52 ± 6 和 54 ± 7 , A-SODN 组与空白对照组及 SODN 组集落数间比较, 有明显差别 ($P < 0.001$), 而空白对照与 SODN 间差别无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 BRCA1ASODNs 对人骨肉瘤细胞周期的影响

流式细胞仪检测细胞周期结果表明, BRCA1 $10\mu\text{mol/L}$ AS 组 G_1 期 63.8%, S 期 21.5%, PI 指数 36.2%, 与对照组 (G_1 期 67.8%, S 期 17.0%, PI 指数 32.2%) 相比, PI 指数、S 期上调, 细胞增殖活性提高。对照组与 $10\mu\text{mol/L}$ S 组 (G_1 期 66.8%, S 期 17.8%, PI 指数 33.2%) 相比, 细胞增殖活性未见明显变化 (图略)。

3 讨论

在肿瘤发生发展过程中起变化的基因很多, 许多基因相互作用、影响。有的表达水平上升, 有的表达水平下降, 基因调控机制非常复杂。反义核酸技术的发展, 为肿瘤研究提供了有力的手段, 使得研究者可以有针对性地调节目的基因表达水平^[4]。反义核酸作为基因表达的反义和反基因抑制剂, 直接以基因为靶位点阻止基因转录和翻译, 或直接导致靶基因失活, 抑制某些基因表达, 达到治疗目的。反义寡核苷酸能与特定 DNA、RNA 以碱基互补配对的方式结合, 阻止其转录与翻译。通常, 研究者选择表达水平提高的基因为靶基因, 使之下调, 观察相应的指标变化情况。如研究发现 IGF-I 反义寡核苷酸能使人肺癌细胞 NCIH460 和 SCC5 细胞软琼脂集落形成能力下降 84%; IGF-IR 反义寡核苷酸在裸鼠腹腔内应用治疗 NCIH460 肿瘤, 能显著延长裸鼠生存时间^[5]。

我们前期研究发现, 与骨肉瘤原位细胞系相比, BRCA1 在人骨肉瘤高转移亚系中表达水平下降。本研究选择靶基因 BRCA1, 利用反义技术, 作用于骨肉瘤原位细胞系的靶基因, 使之下调, 观察其对细胞的影响。通过模拟 BRCA1 基因表达变化趋势, 研究 BRCA1 基因是否与骨肉瘤转移相关。

BRCA1 即乳腺癌易患基因, 是 1994 年发现的一个抑癌基因, 编码有 7.5 kb (1865 个氨基酸) mRNA, 以常染色体显性遗传的方式传递^[2]。BRCA1 在细胞增殖时表达, 其功能是细胞增殖和组织分化所必需的。它所编码的蛋白质与 RDAI 蛋白质 (一种和双链 DNA 损伤修复有关的蛋白) 有关。BRCA1 蛋白在控制细胞增殖速度也具有特殊的作用, 可能是通过细胞

周期依赖激酶抑制因子 p21 调节细胞周期。有认为其突变与 p53 突变有相关性。功能研究表明其参加了转录调节和 DNA 损伤修复,提示这种抑癌基因在维持基因稳定性和调节细胞生长和分化中起作用,保证 DNA 分裂的精确性、维持基因组的完整性和防止受损 DNA 的复制^[1,6]。本研究发现,BRCA1 反义寡核苷酸对骨肉瘤细胞 SOSP-9607 的影响表现为促进细胞生长,细胞生长速度加快,集落形成能力增强,增殖活性提高。这与 BRCA1 的功能有一定关系,说明 BRCA1 蛋白控制细胞增殖速度。

国外研究者将 BRCA1 转导入人类结肠癌细胞,发现 BRCA1 可抑制 S 期进展而负性调控细胞周期。这种作用至少部分通过诱导 p21 而抑制细胞周期进展^[7]。我们应用 BRCA1 反义寡核苷酸抑制 BRCA1 基因转录和翻译或直接导致靶基因失活,使基因表达水平下降,对细胞增殖速度调控减弱,细胞的恶性生物学特征性行为表现出一定的变化,如生长速度变快、克隆形成率增高、增殖活性增强等,与我们的推测相一致。这也从另一角度证明了抑癌基因 BRCA1 基因的功能。

本研究发现 BRCA1 基因在骨肉瘤发展过程中

起着相当的调节作用,与骨肉瘤转移相关的恶性生物学行为有一定的关系,为后续研究提供了理论和实验基础。其参与骨肉瘤转移的具体机制值得深入研究。

参考文献:

- [1] Zheng L, Li S, Boyer TG, et al. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2[J]. *Oncogene*, 2000, 19 (53): 6159-6175.
- [2] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. *Science*, 1994, 266 (5182): 66-71.
- [3] 杨彤涛, 范清宇, 张殿忠, 等. 1 株人成骨肉瘤细胞系的建立及特性观察[J]. *第四军医大学学报*, 1998, 19 (3): 264.
- [4] Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides[J]. *Nature*, 1994, 372 (6504): 333-335.
- [5] Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, et al. Antitumor effect of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (13): 3038-3041.
- [6] Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 20): 3591-3598.
- [7] Somasundaram K, Zhang H, Zheng YX, et al. Arrest of the cell cycle by tumor suppressor BRCA1 requires the CDK inhibitor P21WAF1/CIP1[J]. *Nature*, 1997, 389 (6647): 187-190.

(周永红校对)

动态·简讯·

本刊启事

为了提高杂志的质量,更好地回报钟爱本刊的广大读者和作者,《肿瘤防治研究》杂志自 2003 年 6 月 5 日(第 3 期)改铜版纸印刷。

《肿瘤防治研究》编辑部
2003.6.5