

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00033

放射性核素标记的 Ku70 反义寡核苷酸对甲状腺癌荷瘤小鼠疗效研究

王奇金, 邹大进*

第二军医大学长海医院内分泌科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究放射性核素标记的 Ku70 反义寡核苷酸(ASODNs)对甲状腺癌荷瘤小鼠的放疗疗效及其作用机制。**方法** 采用¹³¹I 标记 Ku70 ASODNs, 建立甲状腺癌 TT 细胞荷瘤小鼠模型, 通过 Ku70 ASODNs 和(或)放射处理, 观察小鼠成瘤率、死亡率和肿瘤生长情况。利用 Annexin V/PI 染色后流式细胞术(FCM)检测肿瘤细胞凋亡水平。蛋白质印迹分析检测不同处理后小鼠肿瘤组织 Ku70 蛋白的表达以及细胞增殖(PCNA)和凋亡指标(Bcl-2)的表达。**结果** 经¹³¹I 标记 Ku70 ASODNs 处理后, 肿瘤组织 Ku70 蛋白表达下调; 肿瘤细胞生长抑制, 与对照组相比肿瘤体积降低, 而且小鼠成瘤率下降, 死亡率亦降低($P < 0.01$); 并且¹³¹I-ASODNs 组肿瘤体积与单纯¹³¹I-Na 处理组相比也有降低($P < 0.05$)。细胞凋亡检测发现¹³¹I-ASODNs 组肿瘤细胞的凋亡率(35.6%)高于 ASODNs 组(10.4%)和生理盐水组(9.2%), 与¹³¹I-Na 组(26.6%)相比也有统计学差异($P < 0.05$)。进一步检测发现¹³¹I-ASODNs 组肿瘤组织细胞中的 PCNA 和 Bcl-2 表达与对照组和 ASODNs 组相比都降低。**结论** ¹³¹I 标记 Ku70 ASODNs 能显著抑制甲状腺癌肿瘤细胞的生长, 促进肿瘤细胞凋亡, 其作用机制与 Ku70 表达抑制和 PCNA 及 Bcl-2 信号通路相关。

[关键词] 甲状腺肿瘤; 放射性核素; 反义寡核苷酸类; Ku70; 增殖细胞核抗原; bcl-2

[中图分类号] R 736.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0033-04

Therapeutic effects of radioisotope labeled Ku70 antisense oligodeoxynucleotide on thyroid carcinoma implanted in nude mice

WANG Qi-jin, ZOU Da-jin*

Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effects of radioisotope labeled Ku70 antisense oligodeoxynucleotide (ASODNs) on thyroid carcinoma implanted in nude mice and the related mechanism. **Methods** The Ku70 ASODNs labeled with ¹³¹I was used to treat the tumor-bearing mouse model derived from thyroid carcinoma TT cells. The tumor-forming rate, mortality rate and tumor growth were observed and calculated after treatment with ¹³¹I-ASODNs, ¹³¹I-Na, ASODNs or NS (normal saline). Annexin V/PI assay was used to examine the apoptosis of tumor cells by flow cytometry. Western blotting analysis was performed to determine the protein expressions of Ku70, proliferating cell nuclear antigen (PCNA, a cell proliferation marker) and Bcl-2 (a cell apoptosis marker). **Results** After treatment with ¹³¹I-ASODNs, the Ku70 protein level was down-regulated in the tumor tissues and the growth of tumor was inhibited. The tumor volume, tumor-forming rate and mortality rate were significantly decreased in ¹³¹I-ASODNs group than in the NS control group ($P < 0.01$). The tumor volume of ¹³¹I-ASODNs group was also significantly smaller than that in the ¹³¹I-Na group ($P < 0.05$); the apoptosis rate of ¹³¹I-ASODNs group (35.6%) was significantly higher than that of the ASODNs group (10.4%), NS group (9.2%) and ¹³¹I-Na group (26.6%) ($P < 0.05$). Further investigation found that PCNA and Bcl-2 protein levels in ¹³¹I-ASODNs group were lower than those in NS and ASODNs groups. **Conclusion** The Ku70 ¹³¹I-ASODNs can effectively inhibit the growth of thyroid carcinoma and promote apoptosis of TT tumor cells, which might be related to the down-regulation of Ku70 and the changes of PCNA and Bcl-2 signal pathway.

[Key words] thyroid neoplasms; radionuclides; antisense oligonucleotides; Ku70; proliferating cell nuclear antigen; bcl-2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1):33-36]

甲状腺癌的治疗主要是以手术治疗和放疗为主。各种类型的甲状腺癌对放射线的敏感性差异很大, 几乎与甲状腺癌的分化程度成正比, 分化越好敏感性越差, 分化越差敏感性越高。未分化癌的治疗

[收稿日期] 2010-07-07 **[接受日期]** 2010-12-08

[作者简介] 王奇金, 讲师、主治医师, E-mail: wangqijin8668601@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873277, E-mail: zwjd22@medmail.com.cn

主要是放射治疗。甲状腺髓样癌对辐射不敏感,因而寻找一种有效、适用的方法增强甲状腺髓样癌对辐射的敏感性成为内分泌科恶性肿瘤治疗领域亟待解决的任务。

DNA 双链断裂(DSB)是电离辐射所致的与细胞死亡关系最密切的一种损伤, Ku70/80 异二聚体是 DNA DSB 修复的关键酶 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)的调节亚基,为 DNA-PK 发挥正常功能所必需。研究表明, Ku70 与肿瘤细胞的化学药物敏感性、肿瘤的发生与进展、细胞凋亡、病毒感染及衰老均有关^[1]。

研究报道, Ku70 的表达与一些肿瘤细胞的辐射敏感性相关,有可能成为辐射增敏治疗的一个新分子靶点^[2-4]。反义 Ku70 RNA 能降低某些肿瘤细胞 Ku70 蛋白水平,并且有反义 Ku70 表达的肿瘤细胞对辐射更为敏感^[5-6]。本研究在前期证明 Ku70 反义寡核苷酸(ASODNs)能提高甲状腺癌细胞的辐射敏感性^[7]的基础上,建立甲状腺癌 TT 细胞荷瘤小鼠模型,通过放射性核素标记的 Ku70 ASODNs 处理,观察小鼠的成瘤率、死亡率,以及细胞增殖和凋亡指标,探究动物整体实验证明 ASODNs 对肿瘤放疗疗效的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人甲状腺癌 TT 细胞(购自中国科学院上海细胞生物学研究所)用含 10% 胎牛血清的 F12 培养液(Gibco 公司),于 5% CO₂ 孵箱 37℃、饱和湿度条件下培养。

1.2 试剂与材料 BALB/c 裸鼠,雄性,4~6 周龄,购自第二军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2007-0003]。细胞总蛋白裂解液购自 Pierce 公司,0.45 μm NC 膜购自 Pharmacia 公司;Ku70 抗体、PCNA 抗体、β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司;Bcl-2 抗体购自 Sigma 公司。Ku70 ASODN 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 ¹³¹I-ASODNs 标记、纯化及准备 ¹³¹I 标记 ASODNs 由中国原子能研究院同位素研究所完成,采用氯胺酮法。100 μl 0.1 mol/L(pH 8.0)磷酸盐缓冲液中加入氯胺-T 0.1 mg、待标记的 ASODNs、¹³¹I 7.4 MBq,45℃ 保温 2 h。然后用 Sephadex G50 层析柱纯化,0.06 mol/L 磷酸盐缓冲液洗脱。测定比活度为 2.73 MBq/μg,标记率 > 95%,纯度大于 95%。以 1:1 脂质体包装 1 nmol ASODNs 的比例,将脂质体和 ASODNs、¹³¹I-ASODNs 分别用不含血清的培养液稀释,混匀,室温放置 45 min,生成 ASODNs(¹³¹I-ASODNs)-脂质体复合物,待用。

1.4 甲状腺癌移植瘤小鼠模型建立及分组处理 0.1 ml(约 5×10⁶个) TT 细胞注入 BALB/c 裸鼠皮下,6~7 周后成瘤。处死裸鼠,将瘤体剪成 0.1 cm 的小块后种植至皮下。待肿瘤长至直径 0.5 cm 大小时,每天瘤体注射连续 4 d。(1)¹³¹I-ASODNs 治疗组(*n*=10):0.1 ml ¹³¹I-ASODNs (7.4 MBq/L、10 nmol);(2) ASODNs 治疗组(*n*=10):0.1 ml ASODNs(10 nmol);(3)¹³¹I-Na 处理组(*n*=10):0.1 ml ¹³¹I-Na (7.4 MBq/L、10 nmol);(4)生理盐水对照组(*n*=10):0.1 ml 生理盐水。药物处理后第 6 天处死一批小鼠,取瘤组织待测。另外剩余小鼠继续饲养,第 30 天时观察并计算小鼠最后成瘤率(瘤体直径大于 0.5 cm)、死亡率。

1.5 原位肿瘤生长 裸鼠肿瘤接种和(或)随后的不同处理后,每周 3 次观察接种肿瘤的生长并采用游标卡尺测量肿瘤结节的最长径 *a* 和最短径 *b*,根据公式计算肿瘤体积: $V(\text{mm}^3) = 1/6\pi(ab^2)$ 。

1.6 蛋白质印迹分析检测蛋白表达 收集不同处理后的肿瘤组织细胞,用细胞蛋白裂解液提取总蛋白,经 1% SDS-PAGE 后,半干转移法转至硝酸纤维素膜,以 5% 脱脂奶粉/TBST 封闭后,加入 Ku70、PCNA、Bcl-2、β-actin 一抗(1:1 000),以及相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000),ECL 显色。Smartscape 软件分析蛋白条带灰度值,比较各组目标蛋白的表达水平。

1.7 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率 收集处理后的细胞,按照凋亡试剂盒说明每 100 μl 细胞悬液加入 Annexin V/PI 工作液。将细胞在室温下孵育 15 min 后,向标本中加入 400 μl Annexin 结合缓冲液,冰上轻轻混匀。立即将标本用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。每批实验取 5 个培养孔的细胞进行检测,统计 3 批次的实验结果。

1.8 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析和 χ^2 检验分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 荷瘤小鼠放疗疗效分析 采用组织块接种法制作 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤模型,对荷瘤小鼠按上述方法进行分组不同处理后,以生理盐水注射为对照,在不同时间点观察肿瘤生长情况,统计肿瘤体积和成瘤率以及小鼠死亡情况,研究 Ku70 ASODNs 表达水平对肿瘤放疗疗效的影响。结果发现,¹³¹I-ASODNs 治疗组与生理盐水对照组、ASODNs 组相比成瘤率和死亡率降低,平均肿瘤体积亦降低($P < 0.01$)。而且与单纯对照 ¹³¹I-Na 组相比,

¹³¹I-ASODNs 组的疗效也有明显改善 ($P < 0.05$)。单纯的 ASODNs 组处理与生理盐水对照组相比各项指标差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 ¹³¹I-ASODNs 对荷瘤小鼠放疗疗效分析
Tab 1 Therapeutic effects of ¹³¹I-ASODNs on tumor-bearing nude mice

(N=10)			
Group	Tumor-forming n(%)	Mortality n(%)	Tumor volume V/mm ³
NS	10(100)	8(80)	328.6 ± 34.45
ASODNs	9(90)	6(60)	262.9 ± 26.48
¹³¹ I-Na	6(60)	3(30)	92.8 ± 18.43
¹³¹ I-ASODNs	2(20) * * Δ	1(10) * *	46.4 ± 12.34 * * Δ

NS: Normal saline; ASODN: Antisense oligodeoxynucleotide.
* * $P < 0.01$ vs NS and ASODNs group; Δ $P < 0.05$ vs ¹³¹I-Na group

2.2 ¹³¹I-ASODNs 对 Ku70 蛋白表达影响 蛋白质印迹分析表明, Ku70 蛋白在生理盐水对照组和 ¹³¹I-Na 组均有较高水平表达, 转染 ASODNs/¹³¹I-ASODNs 后表达水平下降, 见图 1。

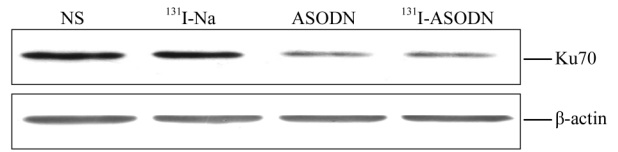


图 1 ASODNs 对甲状腺癌移植瘤组织细胞中 Ku70 蛋白表达的影响

Fig 1 Effect of ASODNs on Ku70 protein expression level in transplanted thyroid cancer

NS: Normal saline; ASODN: Antisense oligodeoxynucleotide

2.3 ¹³¹I-ASODNs 处理对移植瘤细胞凋亡的影响 TT 细胞裸鼠移植瘤经不同处理后 6 d, 分离肿瘤组织, 制备细胞悬液, 按照 Annexin V/PI 试剂盒说明进行细胞凋亡检测。结果表明: ¹³¹I-ASODNs 组的细胞凋亡率 (35.6%) 高于生理盐水对照组 (9.2%, $P < 0.01$); ¹³¹I-Na 组细胞凋亡率 (26.6%) 也高于生理盐水对照组, 但比 ¹³¹I-ASODNs 组低 ($P < 0.05$); ASODNs 组细胞凋亡率 (10.4%) 与生理盐水对照组相比, 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

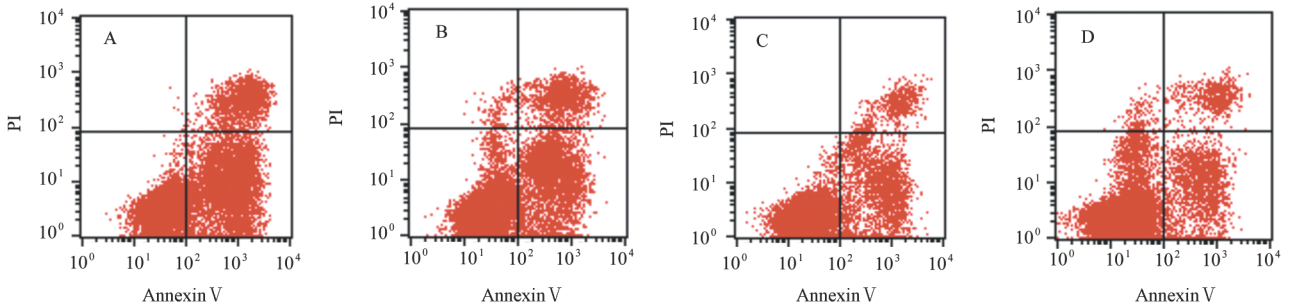


图 2 流式细胞术检测 ¹³¹I-ASODNs 诱发甲状腺癌 TT 细胞凋亡

Fig 2 ¹³¹I-ASODNs induced thyroid cancer TT cell apoptosis as showed by flow cytometry

NS: Normal saline; ASODN: Antisense oligodeoxynucleotide. A: ¹³¹I-ASODN; B: ¹³¹I-Na; C: ASODN; D: NS

2.4 ¹³¹I-ASODNs 处理对瘤组织 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 结果发现 ¹³¹I-ASODNs 组与生理盐水组、ASODNs 组相比 PCNA 和 Bcl-2 表达水平降低, 提示 ¹³¹I-ASODNs 处理可能抑制细胞增殖, 并

诱导细胞凋亡。而 ASODNs 组处理后 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平与生理盐水对照组相比差异无统计学意义 (图 3)。

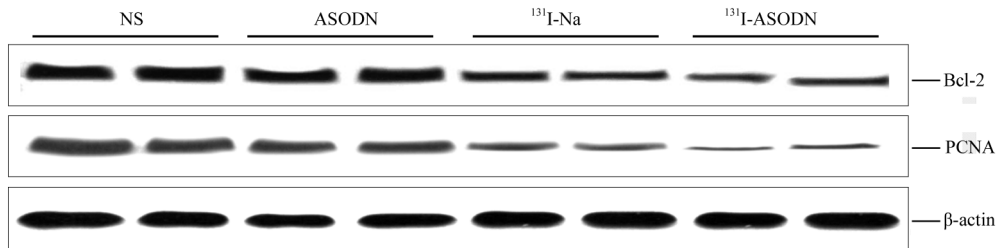


图 3 ¹³¹I-ASODNs 处理后瘤组织 PCNA 和 Bcl-2 蛋白的表达

Fig 3 Influence of ¹³¹I-ASODNs on expression of PCNA and Bcl-2

NS: Normal saline; ASODN: Antisense oligodeoxynucleotide

3 讨论

甲状腺癌的治疗首先是手术切除。即使发现已有转移,也需把原发病灶切除。如果甲状腺癌已转移,针对不同类型的甲状腺癌转移灶应采取不同的方法治疗。乳头状癌和滤泡状癌采用放射性核素¹³¹I治疗疗效显著。¹³¹I可发射出一种 β 射线,当¹³¹I聚集在转移灶内时,癌细胞不断受到射线的照射后死亡,从而达到治愈的目的。目前髓样癌治疗尚无特别有效的方法,因此需要寻找一种新的治疗方法。

近年来已有多项反义基因治疗研究进入肿瘤临床I期试验,但由于反义寡核苷酸在体内不断降解而肿瘤mRNA不断合成,因此效果并不令人满意。有鉴于此,人们设想出基因放射技术,即将反义寡核苷酸偶联放射性核素转染肿瘤细胞,使其既能抑制靶基因表达,又能放射损伤靶基因,从而提高治疗效果。Watanabe等^[8]以³³P偶联癌基因ETS-1反义寡核苷酸体外转染人黑素瘤细胞,取得肯定治疗效果。Sedelnikova等^[9]将¹²⁵I偶联的反义核酸导入人纤维肉瘤HT-1080细胞,结果肿瘤细胞生长明显受抑。这些研究证实了基因放射治疗的有效性,但国内有关研究尚少。

本研究采用¹³¹I标记Ku70反义核酸(¹³¹I-ASODNs)转染体外培养的甲状腺癌细胞,动物实验证明¹³¹I-ASODNs具有更强的抑制甲状腺癌肿瘤生长、促进凋亡作用,从而对裸鼠甲状腺癌细胞移植瘤具有较好的治疗作用。

基因放射治疗效果的产生依赖于¹³¹I衰变发出的Auger电子。Auger电子射程仅为10 nm,因此对核内其他基因影响较小。其具有的高线性能量可引起靶基因DNA断裂,¹³¹I平均衰变一次即可产生一个DNA断裂^[10]。同时Auger电子只能使DNA双链间的氢键断裂,而不破坏磷酸二酯键,因此与其偶联的反义核酸不会受损^[11];同时联用的Ku70反义核酸可以抑制射线造成的DNA的损伤修复,进一步促进肿瘤细胞的凋亡。

肿瘤细胞增殖由多种信号通路介导,本研究发现放射性核素标记的Ku70 ASODNs作用下能抑制细胞增殖相关基因PCNA的表达。曾甫清等^[12]报道也证实,PCNA基因表达下调可阻断多种信号诱导的膀胱癌细胞增殖。另外,凋亡抑制相关基因

Bcl-2的表达在放射性核素标记的Ku70 ASODNs作用条件下显著降低,说明Ku70作为靶基因的有效性。以Ku70基因为靶基因的放射核素反义治疗比单独反义治疗具有更好的治疗效果,有望给甲状腺癌治疗带来新的突破。

[参考文献]

- [1] Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1765:223-234.
- [2] Zhang F, Zhang T, Gu Z P, Zhou Y A, Han Y, Li X F, et al. Enhancement of radiosensitivity by roscovitine pretreatment in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2008, 49:541-548.
- [3] Beskow C, Skikuniene J, Holgersson A, Nilsson B, Lewensohn R, Kanter L, et al. Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86 [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101:816-821.
- [4] Omori S, Takiguchi Y, Suda A, Sugimoto T, Miyazawa H, Takiguchi Y, et al. Suppression of a DNA double-strand break repair gene, Ku70, increases radio- and chemosensitivity in a human lung carcinoma cell line [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2002, 1:299-310.
- [5] Li G C, He F, Shao X, Urano M, Shen L, Kim D, et al. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2003, 63:3268-3274.
- [6] Raju U, Ariga H, Dittmann K, Nakata E, Ang K K, Milas L. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioreponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63:520-528.
- [7] 王奇金, 邹大进. Ku70反义寡核苷酸增强甲状腺癌细胞的辐射敏感性 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2009, 25:544-548.
- [8] Watanabe N, Sawai H, Endo K, Shinozuka K, Ozaki H, Tanada S, et al. Labeling of phosphorothioate antisense oligonucleotides with yttrium-90m [J]. *Nucl Med Biol*, 1999, 26:239-243.
- [9] Sedelnikova O A, Panyutin I G, Thierry A R, Neumann R D. Radiotoxicity of iodine-125-labeled oligodeoxyribonucleotides in mammalian cells [J]. *J Nucl Med*, 1998, 39:1412-1418.
- [10] O'Donoghue J A. Strategies for selective targeting of Auger electron emitters to tumor cells [J]. *J Nucl Med*, 1996, 37(4 Suppl):3S-6S.
- [11] Panyutin I G, Neumann R D. Sequence-specific DNA double-strand breaks induced by triplex forming ¹²⁵I labeled oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22:4979-4982.
- [12] 曾甫清, 朱朝晖, 林晨, 赵军, 鲁功成. PCNA反义寡核苷酸抑制人膀胱癌EJ细胞增殖活性的实验研究 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2000, 21:213-215.

[本文编辑] 尹茶