

以胰岛素样生长因子受体 1 基因为靶的反义寡核苷酸体内外抗肿瘤研究*

林莉¹⁾ 王升启^{2)**} 管伟²⁾ 杨秉呼²⁾ 胡小电¹⁾

(¹⁾军事医学科学院附属医院, 北京 100039; ²⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 以胰岛素样生长因子受体-1 基因为靶筛选抗肿瘤药物. 根据 IGF1RmRNA 的二级结构设计了 9 条反义寡核苷酸药物, 以脂质体介导进行转染, MTT 染色计算细胞生长抑制率, 从中筛选出一条序列并对之进行优化, 最后以最佳序列进行体外作用持续时间及体内细胞生长抑制率分析. 结果表明该序列在体内外具有良好的抗肿瘤活性, 具有剂量依赖性关系, 且对荷瘤裸鼠无明显的毒性. IGF1R 可作为肿瘤治疗的新靶点.

关键词 IGF1R, 反义寡核苷酸, 肿瘤

学科分类号 R7335

反义技术是近十几年兴起的一种生物高技术, 用反义技术封闭和抑制特定基因的表达是基因治疗的重要组成部分. 1978 年 Stephenson 和 Zamecnick^[1]用寡聚核苷酸特异性抑制 Rous 肉瘤病毒的复制, 首次提出了反义寡聚脱氧核糖核苷酸 (ASODN) 抑制基因表达的概念. ASODN 是通过 Watson-Crick 碱基配对原理与 mRNA 的碱基对互补结合阻止其翻译成蛋白质. 近年来反义寡核苷酸成为治疗肿瘤等由于基因表达异常引起疾病的一类潜在型药物, 本研究以胰岛素样生长因子受体 1 (IGF1R) 基因作为靶标进行抗肿瘤反义寡核苷酸的筛选和评价, 寻找高效抑制肿瘤的候选药物.

1 材料和方法

1.1 反义寡核苷酸的设计和合成

本研究选取了 IGF1R 基因作为靶标进行抗肿瘤反义寡核苷酸的筛选和评价, 基因序列由 GenBank 获得, 通过国际互联网引入 RNAstructure 3.2 分析软件, 选择 RNA 二级结构中膨胀环, 内环, 发夹, 多分支连接部等结构不稳定的区域作为反义药物作用的靶点. 针对 IGF1RmRNA 的二级结构设计了 6 条针对 3' 非编码区的序列和 3 条针对 5' 非编码区的序列 1~9 (各含 20 个碱基). 具体序列见表 1. 硫代寡聚核苷酸合成后浓氨水 55℃ 脱保

Table 1 Sequence and characteristics of ASODN¹⁾

No.	Target	Length	Characteristics	Sequence (5'-3')
1	1543~ 1562	20	A	TTCATTCCTTTTATTTGGGA
2	1559~ 1578	20	A	TCCTCCGGAGCCAGACTTCA
3	1567~ 1584	20	A	GGACCCTCCTCCGGAGCC
4	1584~ 1603	20	A	GCCCCACAGCGAGGTCGGG
5	1595~ 1614	20	A	GAGAAACAGGAGCCCCACA
6	1552~ 1571	20	A	GAGCCAGACTTCATTCCTTT
7	22~ 41	20	A	GCGCGGCTGAAAGCGCGTT
8	35~ 54	20	A	GAAAACAACAACAGCGCGGC
9	52~ 71	20	A	GCTGGGAGAGGTTTATTGAA
10	1555~ 1574	20	A	CCGGAGCCAGACTTCATTCC
11	1561~ 1577	18	A	CCTCCGGAGCCAGACTT
12	1561~ 1580	20	A	CCTCCTCCGGAGCCAGACTT

¹⁾phosphorothioate ASODN. A: antisense sequence.

* 国家重点基础研究发展规划项目 (G1998051118) 和国家高技术“863”计划资助项目 (102-08-04-01).

** 通讯联系人. Tel: 010-66932211, E-mail: Sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2001-06-04, 接受日期: 2001-07-30

护 15 h, 然后用反相柱 (购自 Solid Phase Science 公司) 层析纯化, 它为无色粉末状, 体外实验用无双抗的 DMEM 培养基溶解 ASODN, 体内实验用生理盐水溶解 ASODN, 保存于 -20°C .

1.2 细胞培养、脂质体转染及细胞增殖抑制活性测定

人肝癌 HepG2 细胞株由军事医学科学院放射医学研究所提供. 将其用含 10% 小牛血清及 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液, 置 37°C 、5% CO_2 孵箱培养. 在 96 孔细胞培养板中, 每孔接种 5×10^3 细胞. 待长成 50% ~ 60% 细胞层后, 在无血清状态下, 采用 lipofectin (GIBCO, 1 g/L) 试剂并参照说明书操作进行硫代反义寡核苷酸转染. 每条硫代反义寡核苷酸设置 3 个浓度, 分别为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.4 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.8 \mu\text{mol/L}$. 每个浓度 3 孔, 每孔总体积为 100 μL , 并设置细胞和脂质体对照. 转染 5 h 后, 换含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养 19 h, 每孔加 20 μL MTS (Promega 公司), 并继续培养 90 min, 于 492 nm 处测定光吸收 (A_{492}), 计算抑制率.

$$\text{抑制率} = \frac{A_{492}(\text{对照}) - A_{492}(\text{用药})}{A_{492}(\text{对照})} \times 100\%$$

1.3 反义寡核苷酸作用持续时间测定

HepG2 细胞接种于 96 孔板 (3000/孔), 待 50% ~ 60% 细胞融合后, 同 1.2 方法转染反义寡核苷酸一次, 终浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$. 分别于转染后第 1 天~第 6 天, 各取 3 孔细胞测定细胞增殖抑制情况, 观察其作用持续时间.

1.4 裸鼠的饲养、移植瘤的接种和药物处理

Balb/c (nu/nu) 裸鼠 (18 g ~ 22 g, 6 ~ 8 周, 雌性) 购自中国医学科学院肿瘤医院. 将其饲养于二级动物房的层流柜中, 自由摄取食物和水, 用 800 ml 的培养瓶大量扩增 HepG2 肿瘤细胞, 0.2% 胰酶溶液消化和收集细胞, PBS 清洗两次后, 调节细胞浓度为 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$, 于每个裸鼠左后肢腋窝皮下接种 0.2 ml. 接种细胞后第 5 天, 确认肿瘤细胞生长并可触及后, 将裸鼠分为两组, 给药组每日腹腔注射 0.1 ml 的 2# 药物, (5 g/ml), 对照组给予相应量的生理盐水, 每周测量两组动物的重量, 观察记录肿瘤的大小 (用游标卡尺), 按下列公式计算肿瘤的相对体积: $V = L \times W^2 \times 1/2$, 式中 V 为肿瘤体积 (mm^3); L 、 W 分别为瘤体最长和最短的两个径 (mm). 待裸鼠行动困难时处死, 称量瘤重量并制备病理切片. 用药共 28 d.

1.5 裸鼠的饲养, 移植瘤的接种和药物剂量关系

Balb/c (nu/nu) 裸鼠 (购自中国医学科学院肿瘤医院 18 ~ 22 g, 6 ~ 8 周, 雌性) 饲养及细胞培养同上, 于每个裸鼠左后肢腋窝皮下接种 0.2 ml 细胞悬液 (4.5×10^6 个细胞). 接种细胞后第 4 天, 确认肿瘤生长并可触及后, 将裸鼠分为四组, 给药组每日腹腔注射 2# 药物 0.1 ml, 剂量分别是 12.5 mg/kg 组 (2.5 g/ml), 25 mg/kg 组 (5.0 g/ml), 50 mg/kg 组 (10 g/ml), 对照组给予相应量的生理盐水, 每周称量四组动物的重量, 观察记录肿瘤的大小 (用游标卡尺), 按下列公式计算肿瘤的相对体积: $V = L \times W^2 \times 1/2$, 式中 V 为肿瘤体积 (mm^3); L 、 W 分别为瘤体最长和最短的两个径 (单位: mm). 待接种的肿瘤将要破溃时处死裸鼠. 用药共 20 d, 取尾静脉血测血常规, 取肺脏、肝脏、脾脏、肾脏及肿瘤组织制备病理切片, 称量瘤重量.

1.6 病理组织标本的制备

标本在 10% 福尔马林溶液固定 72 h, 经石蜡包埋切片, 苏木素伊红 (H-E) 染色, 在光镜下阅片.

2 实验结果

2.1 反义寡核苷酸作用靶位的选择

针对 IGF1R mRNA 的二级结构设计了 6 条针对 3' 非编码区的序列和 3 条针对 5' 非编码区的序列 1 ~ 9 (各含 20 个碱基). 图 1 所示, 针对 3' 非编码区的 2# 序列在 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 时抑制率是 49.6%, $0.4 \mu\text{mol/L}$ 时抑制率是 73.1%, $0.8 \mu\text{mol/L}$ 时抑制率是 89.6%, 它的抑制细胞增殖作用最强.

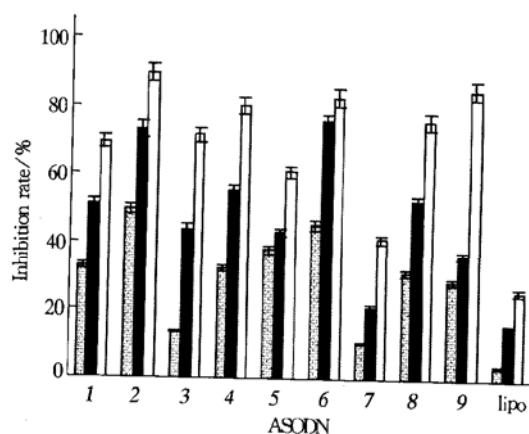


Fig.1 Effect of ASODNs on HepG2 cells proliferation

□: $0.2 \mu\text{mol/L}$; ■: $0.4 \mu\text{mol/L}$; ▨: $0.8 \mu\text{mol/L}$.

2.2 反义寡核苷酸序列的优化

在反义寡核苷酸设计中发现一个有效的序列

后, 进一步对其进行优化. 观察碱基的移动对其活性的影响. 因此我们以 2# 序列为中心进行优化, 向其 5' 端, 3' 端移动几个碱基设计了 3 条反义寡核苷酸 (10~12), 在体外评价了这四条反义寡核苷酸对 HepG2 细胞生长的影响, 以便筛选出更加有效的药物. 2# 序列的抑制率高于其他 3 条序列. 2# 的 IC_{50} 是 $0.195 \mu\text{mol/L}$. 10# 和 11# 的 IC_{50} 是 $0.250 \mu\text{mol/L}$, 12# 的 IC_{50} 是 $0.265 \mu\text{mol/L}$. 因此选择 2# 序列为体内动物实验的药物, 从 12 条序列中筛选出了一条序列. 2# 的二级结构由内环 (2 个碱基) - 茎 (6 个碱基) - 多分支连接部 (3 个碱基) - 茎 (8 个碱基) - 连接部 (1 个碱基) 组成. 各个碱基的组成如下 A = 4, T = 4, C = 8, G = 4.

2.3 反义寡核苷酸作用的持续性

反义药物作用的持续性不仅是评价反义核酸药物的一个重要指标, 同时对于给药方案具有重要的参考价值. 从图 2 可以看出在肝癌细胞 (HepG2) 中, 终浓度 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 的 2# 药物脂质体介导转染给药 1 次后, 1~4 天抑制活性逐渐增加, 第 4 天抑制率达到 90% 的峰值, 然后缓慢下降, 到第 6 天抑制率为 74.5%.

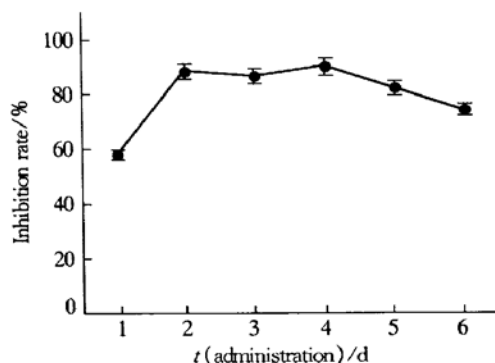


Fig. 2 Inhibition rate of ASODNs 9# on HepG2 Cells ($0.2 \mu\text{mol/L}$)

2.4 反义寡核苷酸对荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用

荷瘤裸鼠在接种肿瘤的第 3 天即可见其生长, 第 5 天可触及肿瘤并开始用药, 在用药的 4 天内用药组与对照组相比, 肿瘤体积无差异, 第 8 天时出现差别, 第 15 天后两者差别显著. 从图 3 中可见对照组体积增长迅速而用药组体积增长缓慢. 裸鼠处死时 2# 药物处理组瘤体积增加到原来的 7.82 倍, 而对照组瘤体积增加到原来的 81.55 倍. 用药期间裸鼠体重均呈增长趋势, 作方差分析表明 2# 药物处理组与对照组相比有显著性差异, 用药组肿瘤率达 72.4%. 肿瘤的病理切片显示两组肿瘤均

有变性和坏死, 程度以用药组严重, 这一组肿瘤中心部有囊腔形成, 炎细胞浸润用药组以淋巴细胞和浆细胞为主, 对照组以中性粒细胞和单核细胞为主, 两组均有部分裸鼠呈现纤维组织增生.

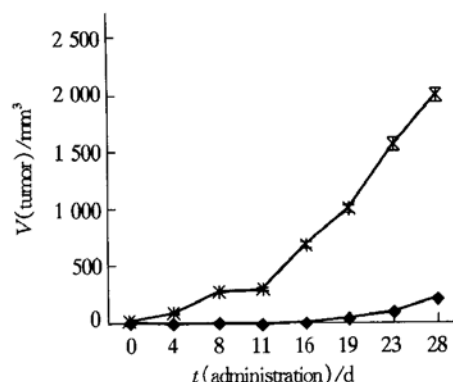


Fig. 3 Tumor volume after ASODNs treated

◆: 2#; * : control (n = 5).

2.5 反义寡核苷酸对荷瘤裸鼠生长抑制的剂量依赖性关系

荷瘤裸鼠在接种肿瘤的第 2 天即可见其生长, 第 4 天可触及肿瘤并开始用药, 在用药的 4 天内用药组与对照组相比, 肿瘤体积无差异, 第 8 天时出现差别, 第 15 天后两者差别显著, 从图 4 中可见对照组体积增长迅速而用药组体积增长缓慢. 12.5 mg/kg 组使瘤体积倍增 40.75 倍, 25 mg/kg 组使瘤体积倍增 17.33 倍, 50 mg/kg 组使瘤体积倍增 5.56 倍, 生理盐水组使瘤体积倍增 120.14 倍. 用药物期间所有裸鼠体重均呈增长趋势, 随着肿瘤重量的增长裸鼠体重增加, 20 天后对照组肿瘤即将破溃, 处死后肿瘤重量及抑制率见表 2, 作方差分析表明各组与对照组相比均有显著性差异, 各组间也有差异, 12.5 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg 组抑制率呈一定的剂量依赖性关系. 50 mg/kg 组抑制率最高达 61.6%.

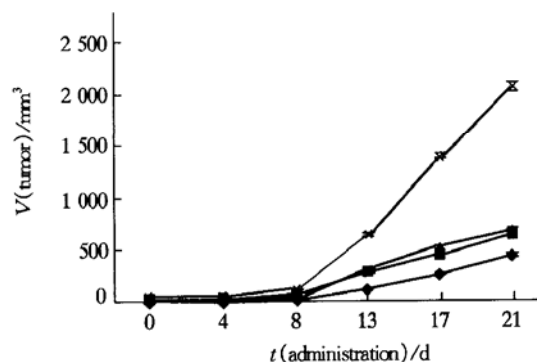


Fig. 4 Tumor volume after ASODNs treated under various concentration

◆: 12.5 mg/kg; ■: 25 mg/kg; ▲: 50 mg/kg; * : control.

Table 2 Tumor mass after ASODNs treated

Team	Tumor mass/ g	Inhibition rate/ %
12.5 mg/kg	0.62 ± 0.30	44.6%
25 mg/kg	0.51 ± 0.11	54.6%
50 mg/kg	0.43 ± 0.13	61.6%
Control	1.12 ± 0.63	

* $F = 6.78$, $P < 0.01$, there are obvious difference between each team.

各组裸鼠的血常规如表3所示, 通过统计学表明血小板随着用药剂量的增加呈下降趋势, 对照组的血小板为 $1109.8 \times 10^9 \pm 157.56 \times 10^9/L$, 而高

剂量组的血小板为 $867.20 \times 10^9 \pm 140.01 \times 10^9/L$, 各组之间的差异具有显著性, 表明此药物可引起血小板的异常; 红细胞, 血红蛋白在各组之间无显著性差异; 高剂量组 (50 mg/kg) 的白细胞与对照组相比有显著意义, 但都在正常值范围内; 肿瘤的病理切片显示各组肿瘤均有不同程度的变性和坏死, 以高剂量组严重, 此组肿瘤中心部有囊腔形成, 炎细胞浸润用药组以淋巴细胞和浆细胞为主, 对照组以中性粒细胞和单核细胞为主, 各组裸鼠的脏器均无明显的变化。

Table 3 Nudes blood cell analyse

	Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
WBC ($10^9/L$) *	7.28 ± 1.96	6.45 ± 1.79	7.28 ± 2.13	8.77 ± 2.37
RBC ($10^{12}/L$) *	8.65 ± 0.57	8.61 ± 0.31	8.59 ± 0.23	8.92 ± 0.68
Plt ($10^9/L$) **	1109.8 ± 157.56	1028.21 ± 90.23	949.89 ± 127.61	867.20 ± 140.01
Hb (g/L) *	149.78 ± 12.83	144.37 ± 6.20	148.28 ± 4.49	151.69 ± 8.14

* $F = 2.12$, $P > 0.05$; ** $F = 10.34$, $P < 0.01$.

3 讨 论

研究表明肿瘤的发生是在各种外部因素参与下多种基因共同作用的结果, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活及细胞周期的异常^[2]. 肿瘤药物研究是生物医学界面临的一个重要难题. 反义技术是近十几年兴起的新兴技术, 用反义技术封闭不该表达的基因, 以抑制有害基因或直接抑制有害基因的表达是基因治疗的重要组成部分. 基因治疗现有逐步同手术放疗化疗一道成为肿瘤治疗的主要手段. 反义治疗首先是选择靶基因, 本研究选取与细胞增殖有关的 IGF1R 作为靶基因进行药物的筛选和设计. IGF1R 是调节哺乳动物细胞增殖的一种受体, 在有丝分裂细胞生存、运动和粘附中起重要作用^[3]. 在人类大多数肿瘤中 IGF1R 表达增加, 干扰 IGF1R 的功能导致肿瘤细胞大量凋亡, 抑制其生长, 防止其转移, 存活的肿瘤细胞被宿主的免疫反应清除而对正常细胞影响较少^[4]. 在卵巢癌及儿童胶质瘤中, 抑制 IGF1R 的活性可以抑制肿瘤细胞的增殖^[5]. 鼠的肝癌细胞中含有较多的 IGF1R, 减少 IGF1R 的水平使之丧失了致瘤性^[6], 说明鼠肝癌细胞的凋亡途径与 IGF1R 缺乏有关. 它的特殊性质使它成为肿瘤治疗的理想靶点, 减少 IGF1R 对促进细胞凋亡有极其重要的作用^[7].

反义药物设计是在 mRNA 链上选择最佳位点

位置, 并非 mRNA 上所有位点均可成为反义药物作用的靶位, 近年发现多数有效的反义序列靶位的二级结构多为不稳定部位, 如发卡, 内部环, 膨胀环, 多分支环等^[8], 这为 ASODN 的设计提供了一定指导作用.

本研究根据 IGF1RmRNA 的二级结构, 在结构不稳定区域设计了 9 条含 20 个碱基的序列, 在 HepG 2 人肝癌细胞中以脂质体转染的方法筛选出了 2# 序列, 对此序列进行了优化, 并进一步对其进行了体内动物实验. 它体外作用具有持续性. 在用药前 4 天抑制率逐渐上升, 从第 5 天始缓慢下降.

在体内动物实验中 25 mg/kg 剂量组的 2# 对荷瘤裸鼠 (3×10^6 个/只) 肿瘤生长的抑制率达到 72.4%, 病理切片表明用药组肿瘤周边的细胞浸润以淋巴细胞和浆细胞为主, 对照组以中性粒细胞及单核细胞为主. 2# 对荷瘤裸鼠 (4.5×10^6 个细胞/只) 的体内作用具有剂量依赖性关系, 统计学上低、中、高剂量组与对照组之间具有显著的差异. 由于两组动物实验中接种肿瘤的细胞数有差异, 剂量依赖性关系组荷瘤的细胞数为第一次接种细胞数的 1.5 倍, 随着荷瘤的细胞数增加药物的抑制率会随之下降.

对于一种药物除了药效学外, 毒性是人们普遍关注的又一主要问题, 硫代的毒性作用与动物种类, 寡核苷酸序列及寡核苷酸的主要理化性质有

关, 已有研究表明对动物应用高剂量的硫代反义寡核苷酸时, 常表现一定的毒性且随动物种类而异, 对啮齿类动物主要表现为淋巴增生, 脾肿大, 多种实质性脏器发生单核细胞浸润, 对猴等非灵长类动物主要表现为血压降低, 心搏缓慢, 外周血中白细胞和淋巴细胞降低, 凝血异常等^[9~11] 在本研究中用药后裸鼠的体重随着肿瘤的增长而增加, 裸鼠的生长状态没有影响, 无肉眼可见的毒性. 随着用药剂量的增加, 如表3所示裸鼠的血小板呈现下降的趋势, 具有统计学意义, 高剂量组的白细胞比对照组的高, 但尚在正常范围之内, 而外周血中淋巴细胞, 血红蛋白, 红细胞无明显变化, 表明反义核酸药物对于血小板似有一定的影响, 病理切片显示各脏器中的淋巴细胞浸润不明显. 关于寡核苷酸的急性毒性反应有待进一步研究.

总之, 本研究从反义药物的设计, 筛选, 优化, 体内外活性评价筛选出具有一定发展前景的2#药物, 并对2#体内作用的剂量依赖关系和毒性反应作了初步探讨, 为进一步研究反义药物的分子设计及用反义技术治疗肿瘤提供了可靠的试验依据.

参 考 文 献

- 1 Zamecnik P C, Stephenson M L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75** (1): 280~284
- 2 Weinstein I B, Begemann M, Zhou P, *et al.* Disorders in cell circuitry associate with multistage carcinogenesis exploitable targets for cancer prevention and therapy. *Clin Cancer Res*, 1997, **3** (12 pt 2): 2696~2702
- 3 Liu X, Turbiville T, Fritz A, *et al.* Inhibition of insulin-like growth factor I receptor expression in neuroblastoma cells induces the regression established tumors in mice. *Cancer Res*, 1998, **58** (23): 5432~5438
- 4 Resnicoff M. Antitumor effects elicited by antisense-mediated down regulation of the insulin-like growth factor I receptor. *Int J Mol Med*, 1998, **1** (5): 883~888
- 5 Ellouk-Achard S, Djenabi S, de Oliveira G A, *et al.* Induction of apoptosis in rat hepatocarcinoma cells by expression of IGF1 antisense cDNA. *J Hepatol*, 1998, **29** (5): 807~818
- 6 Liu X, Turbiville T, Fritz A, *et al.* Inhibition of insulin-like growth factor I receptor expression in neuroblastoma cells induces the regression established tumors in mice. *Cancer Res*, 1998, **58** (23): 5432~5438
- 7 Matrera O, Felden B, Tsodikov A, *et al.* Methods prediction of antisense oligonucleotides efficacy *in vitro*. *Nature Biotech*, 1998, **16** (12): 1374~1375
- 8 Branch A D. A hitchhiker's guide to antisense and non antisense biochemical pathways. *Hepatology*, 1996, **24** (6): 1517~1529
- 9 Henry S P, Grillome L R, Orr J I, *et al.* Comparison of the toxicity profiles of ISIS 1082 and ISIS2105, phosphorothioate oligonucleotides, following subacute intradermal administration in spague-dawley rat. *Toxicity*, 1997, **116** (1~3): 77~88
- 10 Henry S P, Bolte H, Auletta C, *et al.* Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a four-week study in cynomolgus monkeys. *Toxicity*, 1997, **120** (2): 145~155
- 11 Henry S P, Monteith D, Bennett F, *et al.* Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified oligonucleotides inhibitors of PKC- α and C-raf kinase. *Anticancer Drugs Des*, 1997, **12** (5): 409~420

Antitumor Activity of Antisense Oligonucleotides Targeted to IGF1R *in vivo* and *In vitro**

LIN Li¹⁾, WANG Sheng-Qi^{2)**}, GUAN Wei²⁾, YANG Bing-Hu²⁾, HU Xiao-Dian¹⁾
(¹⁾ Department of Oncology, The Affiliated Hospital, Academy of Military Medical Science, Beijing 100039, China;

(²⁾ Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract In order to Screening antitumor drugs targeted to IGF1R gene, 9 different 20-mer antisense oligodeoxyribonucleic acid (ASODN) were designed according to the mRNA second structure of IGF1R gene and were transfected into tumor cells under various conditions in the presence of lipofectin. Cell growth activity were evaluated by MTT assay. The best sequence with antitumor activity *in vitro* and *in vivo* were analyzed. This sequence showed strong anticancer activity *in vitro* and *in vivo* and had dose-dependent relation. The sequence had no obvious toxicity on tumor-burdened nude either. IGF1R could be used as an appropriate target for tumor therapy.

Key words IGF1R, antisense oligonucleotides, tumor

* This work was supported by grants from the Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051118) and State 863 High Technology R & D Project of China.

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, E-mail: Sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: June 4, 2001 Accepted: July 30, 2001