文章编号:1000-5404(2005)04-0295-03

论著

Survivin 反义核酸真核表达载体的构建及在胶质瘤细胞中的表达

王志成[1*],周丽娜[2*],郭德玉[1],李海东[3] (第三军医大学西南医院:[1]病理科;[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室;[3]呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 构建 survivin 反义核酸真核表达载体 pIRES2-EGFP-SVVas,并检测其在恶性胶质瘤细胞 SHG-44 中的表达。**方法** 构建 survivin 反义核酸真核表达载体 pIRES2-EGFP-SVVas,并用脂质体介导转染入 SHG-44 细胞,通过 RT-PCR 及 western blot 检测细胞中 survivin mRNA 和蛋白的表达。**结果** 构建了 survivin 反义核酸真核表达载体 pIRES2-EGFP-SVVas,并成功导入 SHG-44 细胞中,且有效表达,使 SHG-44 细胞中 survivin mRNA 和蛋白表达水平均降低。**结论** Survivin 反义核酸真核表达载体 pIRES2-EGFP -SVVas 可以降低 SHG-44 细胞 survivin 基因的表达。

关键词: survivin 基因;反义核酸;细胞转染;恶性胶质瘤
中图法分类号: R341; R394-33; R730.264 **文献标识码**: A

Construction of antisense survivin eukaryotic expression vector and its expression in glioma cells

WANG Zhi-cheng[1*], ZHOU Li-na[2*], GUO De-yu[1], LI Hai-dong[3] ([1]Institute of Pathology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [3]Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct antisense survivin eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-SVVas and detect its expression in human malignant glioma cell line SHG-44 cells. **Methods** The antisense survivin eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-SVVas was constructed and then transfected into SHG-44 cells with lipofectamine. The expression of survivin on the cells was measured by RT-PCR and Western blotting. **Results** The mRNA and protein expression of survivin decreased in the transfected cells. **Conclusion** pIRES2-EGFP-SVVas can decrease the expression of survivin in the cells transfected with the vector.

Key words: survivin gene; antisense nucleic acid; cell transfection; glioma

Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员,特异性地表达于胚胎组织以及大多数人类肿瘤细胞,在促进肿瘤的发生发展中具有重要作用[1]。我们既往的实验发现 survivin 在胶质瘤中有表达且其与肿瘤的恶性程度密切相关[2]。本实验旨在构建携带全长反义 survivin 核酸的真核表达载体,并用脂质体介导转染胶质瘤 SHG-44 细胞,观察其对 SHG-44 细胞 survivin mRNA 和蛋白表达的影响,为进一步研究 survivin 在恶性胶质瘤中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

pGEM-T Easy-SVV 载体由中国科学院协和医科大学梁智勇博士惠赠,载体含有 survivin 基因的从起始密码子到终止密码子的全长 cDNA,长度为 429 bp。pIRES2-EGFP 质粒、大肠杆菌 DH5α 由本室引进并保存。人脑恶性胶质瘤细胞系 SHG-44(第 110 代)引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室。

1.2 主要试剂

T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sac* Ⅰ 和 *Sac* Ⅱ 购自 TaKaRa 公司;Taq DNA 聚合酶、WizardPlus 质粒纯化试剂盒购自 Promega 公司;凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司;小牛血清(Hyclone)、一抗 survivin(clone 8E2, 稀释度为 1:20)购自福州迈新公司;转染试剂为 DOTAP Liposomal Transfection Reagent,购自 Roche 公司。

1.3 重组质粒的构建与鉴定

载体构建步骤见图 1。用 *Sac* Ⅰ 和 *Sac* Ⅱ 分别双酶切质粒 pGEM-T Easy -SVV、pIRES2-EGFP,回收目的片段和载体片段。T4DNA 连接酶连接二者,连接产物经转化 DH5α 感受态细胞后,涂布于卡那抗性琼脂平板,37 ℃培养过夜,挑选克隆,转种卡那抗性 LB 培养液中摇荡增菌,提取质粒进行 *Sac* Ⅰ + *Sac* Ⅱ 双酶切和 PCR 鉴定,并进行序列分析。

1.4 细胞培养和转染

人脑恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 (第 110 代)引自苏州医学

作者简介:王志成(1972-),男,河南省南阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肿瘤病理基础方面的研究。电话:(023)65399002
* 对本工作有同等贡献
通讯作者:郭德玉,E-mail: gdy007@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-10-15;修回日期:2005-01-28

院附属第二医院脑肿瘤研究室，按常规方法培养。转染试剂为阳离子脂质体试剂 DOTAP Liposomal Transfection Reagent，具体方法参照转染试剂说明书进行。转染后继续培养 48 h，将各组细胞以 1∶10 稀释后，换用含 G418 400 mg/L 培养基筛选，25 d 时选取单克隆细胞扩大培养。筛选到的阳性克隆分别命名为 SHG-44 SVVas、SHG-44 neo。正常对照为未加转染液的 SHG-44 细胞。

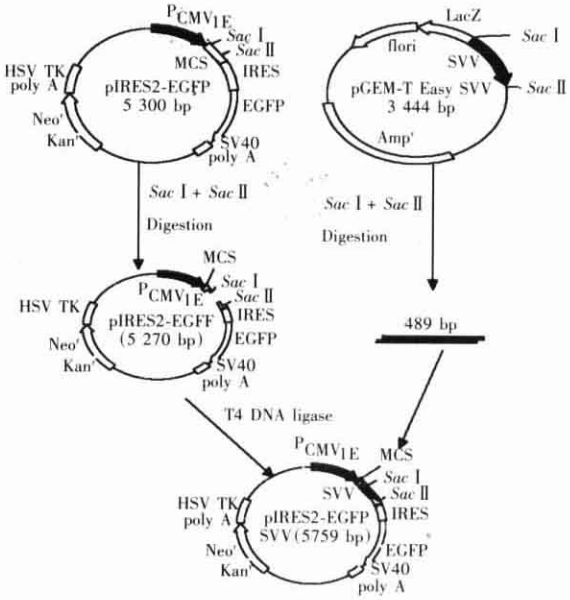


图 1 pIRES2-EGFP-SVVas 的构建

Fig 1 Construction of pIRES2-EGFP-SVVas

1.5 转染细胞 survivin mRNA 表达的检测

实验分 3 组：SHG-44 细胞组、SHG44-neo 细胞组和 SHG-44 SVVas 细胞组，细胞培养 48 h 后，收集 1×10^6 个细胞，提取总 RNA 逆转录成 cDNA，进行 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达。引物序列为：survivin 特异性引物：P1 5′-CAAGGACCACCG-CATCT-3′，P2 5′- TTCTTCGCAGTTTCCTCA-3′，产物长度 340 bp。

内参照 β-actin：P1 5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA- 3′，P2 5′-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC- 3′，产物长度 540 bp。

PCR 扩增条件是：95 ℃ 2 min 后，94 ℃ 45 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共进行 36 个循环，将 PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳，观察 survivin mRNA 的表达，并用 Quantity one 分析软件对电泳结果进行分析。计算每组两条电泳带光密度值之比。

1.6 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达

分别提取上述 3 组细胞蛋白，测定蛋白浓度后，各取 50 μg 总蛋白以 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达。将蛋白经 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜，5% 脱脂奶常温封闭 1 h，加入兔抗人 survivin 多克隆抗体，于 4 ℃孵育过夜，相应二抗常温孵育 1 h，ECL 显色，X 线片曝光，保存结果。

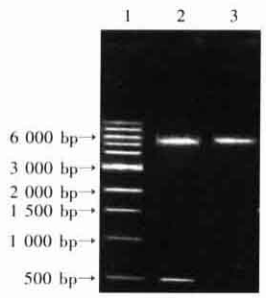
1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS10.0 软件对各组数据进行 t 检验分析，比较各组间的差异。

2 结果

2.1 重组质粒 pIRES2-EGFP-SVVas 的构建和鉴定

利用 pGEM-T Easy-SVV，酶切得到约 489bp 的目的基因片段，然后反向亚克隆至绿色荧光蛋白表达载体 pIRES2-EGFP 的相应酶切位点，构建 survivin 反义核酸重组荧光蛋白表达载体 pIRES2-EGFP-SVVas。经过 PCR 以及 *Sac* Ⅰ 和 *Sac* Ⅱ 双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果均得到 1 条 489 bp 的目的片段（图 2）。对重组质粒的测序结果表明，目的基因序列同 Genebank 已公布的人 survivin cDNA 序列进行比较，序列组成相同，但是方向相反，表明重组载体构建成功。



1：1 kb DNA marker；2：pIRES2-EGFP-SVVas；3：pIRES2-EGFP

图 2 重组体经 *Sac* Ⅰ 和 *Sac* Ⅱ 双酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig 2 Identification of recombinants digested with *Sac* Ⅰ and *Sac* Ⅱ on 1% agarose gel electrophoresis

2.2 细胞转染的鉴定结果

转染后 24 h 和 48 h 在荧光显微镜下观察，结果显示：未转染细胞在荧光显微镜下观察未见荧光，而转染细胞在荧光显微镜下观察见绿色荧光，且转染后 48 h 表达绿色荧光蛋白的细胞数量多于 24 h。

2.3 RT-PCR 法检测 survivin mRNA 的表达

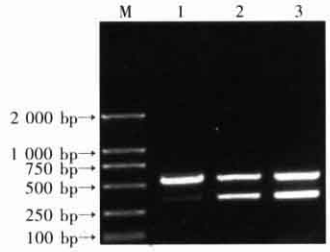
抽提总 RNA 电泳结果显示，在 5 S、18 S 和 28 S 处均可见 1 条电泳条带，证明抽提成功。以细胞总 RNA 为模板，运用特异性引物进行 PCR 扩增，得到 1 条特异性 DNA 片段，其大小约 340 bp。利用 Quantity one 分析软件对琼脂糖电泳结果进行分析，结果显示，SHG-44 SVVas 组与正常对照组和 SHG-44neo 组间的差异有显著意义（$P < 0.05$）；而 SHG-44neo 组与正常对照组无显著差异，即与阴性对照组比较，SHG-44neo 细胞其 survivin mRNA 表达量未见明显改变，而 SHG-44 SVVas 细胞 survivin mRNA 表达水平（$P < 0.05$）（表 1、图 3）。

表 1 胶质瘤细胞中 survivin mRNA 的表达[$(\bar{x} \pm s)$%]

Tab 1 Expression of survivin mRNA in glioma cells[$(\bar{x} \pm s)$%]

Group	*OD*
SHG-44 cell	1.03 ± 0.07
SHG-44neo cell	0.92 ± 0.13
SHG-44 SVVas cell	0.34 ± 0.08*

*：$P < 0.05$，*vs* SHG-44 cell



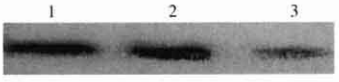
M: DL2000 DNA marker; 1: SHG-44 cells; 2: SHG-44neo cells; 3: SHG-44 SVVas cells

图 3　三组胶质瘤细胞中 survivin mRNA 的表达

Fig 3　mRNA expression of survivin in the three groups of glioma cells

2.4　Western blot 检测 survivin 蛋白的表达

Western blot 检测结果表明，各组细胞中均有 survivin 蛋白的表达，但表达量不同，与正常对照组相比，SHG-44neo 细胞中 survivin 的表达量未见明显改变，SHG-44 SVVas 细胞中 survivin 的表达量明显降低，相对积分吸光度值显示，后者 survivin 表达降低了 65.3%（图 4）。



1: SHG-44 cells; 2: SHG-44neo cells; 3: SHG-44 SVVas cells

图 4　Western blot 检测胶质瘤细胞的 survivin 蛋白表达水平

Fig 4　Protein expression of survivin in glioma cells measured by Western blotting

3　讨论

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族的一个新成员，是迄今发现最强的凋亡抑制因子。它是 1997 年 Altieri 等[3]用效应细胞蛋白酶受体-1cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中分离出来的，位于染色体 17q25，其蛋白含有 142 个氨基酸。Survivin 与其它凋亡抑制基因不同，它在正常组织和癌旁组织不表达，而特异地表达于胚胎期的组织和绝大多数人类恶性肿瘤细胞和肿瘤组织中。利用肿瘤表达 survivin 的这种特异性，可将 survivin 作为肿瘤基因治疗的重要靶基因[4]。Survivin 在胶质瘤患者及细胞系中都有不同程度的表达，且与恶性胶质瘤的病程发展、预后及复发密切相关[2,5-7]。本实验成功构建了携带能够表达全长反义 survivin mRNA 的 pIRES2-EGFP-SVVas 重组质粒，并用脂质体转染法成功地转染人 SHG-44 胶质瘤细胞，并抑制其 survivin 基因的表达，为进一步研究 survivin 在恶性胶质瘤中的作用以及为胶质瘤的防治研究奠定了基础。

自 Izant 等[8]于 1984 年首次提出反义 RNA 可以抑制基因的表达和影响细胞的生物代谢以来，反义核酸技术的研究方兴未艾，近年来用反义 RNA 特异性地封闭靶基因，调节靶基因的表达来作为一种新基因治疗方式和途径也受到人们的广泛关注。

质粒 pIRES2-EGFP[9] 为双顺反子真核表达载体，在其多克隆位点和 EGFP 编码区基因之间设计有核糖体进入位点（IRES），用于转录后修饰的 V40mRNA 早期 PolyA 信号肽与 EGFP 相隔约 50 个碱基，确保克隆入多克隆位点内的外源基因与 GFP 编码基因共同转录，而翻译出的 EGFP 与目的蛋白各具独自的空间结构和生理活性，而不是融合蛋白。由于 EGFP 基因能编码绿色荧光蛋白（green fluorecent protein，GFP），在激发光下可自发地发射内部荧光。GFP 能在活细胞中直观地观察到外源基因的表达，又无需外源物质参与，对细胞无毒性，且能维持一定时间的稳定，因此可以把 GFP 作为标记基因用于筛选。故此我们采用该质粒作为载体，并成功构建了 pIRES2-EGFP-SVVas 重组质粒，经测序鉴定后成功地用脂质体转染法转染人 SHG-44 胶质瘤细胞系。

总之，本实验中我们利用已构建的 survivin 原核克隆载体，反向亚克隆构建真核表达载体，通过脂质体介导转染胶质瘤 SHG-44 细胞，可特异地封闭 survivin 基因的表达。

参考文献：

[1] Adida C, Crotty L, McGrath J, *et al*. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 43-49.

[2] 郭德玉，辛　榕，刘丽梅，等. Survivin 在胶质瘤中的表达及其与肿瘤恶性程度的关系[J]. 第三军医大学学报，2004，26(2)：162-164.

[3] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[4] 温贤浩，徐西华. Survivin-肿瘤基础治疗的新靶美[J]. 局解手术学杂志，2004，13(4)：277-279.

[5] Katoh M, Wilmotte R, Belkouch M C, *et al*. Survivin in brain tumors: an attractive target for immunotherapy[J]. J Neurooncol, 2003, 64(1-2): 71-76.

[6] Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, *et al*. Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis[J]. Cancer, 2003, 97(4): 1077-1083.

[7] Chakravarti A, Noll E, Black P M, *et al*. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(4): 1063-1068.

[8] Izant J G, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis[J]. Cell, 1984, 36(4): 1007-1015.

[9] Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F, *et al*. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 338-343.

（编辑　陈聪连）