论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2152-04

3种不同的survivin siRNA对EJ28细胞增殖和凋亡的影响

吴 跃,苟 欣,吕天兵,余 周 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 观察靶向survivin的不同siRNA对EJ28细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 通过化学合成方法合成3对siRNA和1对荧光标记的阴性对照siRNA。转染荧光标记的siRNA后,在荧光显微镜下观察转染效率。实验分为siRNA164、siRNA167、siRNA389、阴性对照组、脂质体对照组和细胞对照组。转染后24、48 h和72 h,MTT法检测siRNA对EJ28细胞增殖的影响,流式细胞术检测凋亡率。**结果** 靶向survivin的序列特异性siRNA均能抑制EJ28细胞的增殖,其中以siRNA164抑制细胞的增殖能力最强($P<0.05$),转染48 h后的抑制率最高[(41.32±2.54)%];转染48 h后,siRNA164组凋亡率最高[(13.20±0.25)%]。**结论** 靶向survivin的RNAi技术在膀胱癌的基因治疗中可能具有一定的价值。

关键词: EJ28细胞;survivin;小干扰RNA;转染
中图法分类号: R73-362;R730.23;R737.14 **文献标识码:** A

Proliferation and apoptosis of EJ28 cells induced by 3 different survivin-targeted siRNA

WU Yue, GOU Xin, LU Tian-bing, YU Zhou (Department of Urology, the First affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the proliferative and apoptotic effect of 3 different siRNAs targeting survivin in human bladder cancer cell line EJ28. Methods Three siRNAs targeting survivin and 1 fluorescence-labeled siRNA as a negative control were chemically synthesized. Transfetion efficiency was observed under fluorescence microscope after transfecting the fluorescence-labeled siRNAs. EJ28 cells were divided into 6 groups: siRNA164 group, siRNA167 group, siRNA389 group, and negative control group, lipofectin group and cell control group. The proliferation of EJ28 cell was detected by MTT assay at 24, 48 and 72 h after the transfection. Apoptotic rate was detected by Annexin V-FITC-FCM assay at 48 h. Results All the sequence-specific siRNAs targeting survivin efficiently suppressed the proliferation of EJ28 cells. siRNA 164 had the most powerful effect because of its highest inhibitory rate of (41.32±2.54)% and the highest apoptotic rate of (13.20±0.25)% at 48 h after transfection. Conclusion RNAi targeting survivin has a potential value in the gene therapy of bladder cancer.

Key words: EJ28 cells; survivin; small interfering RNA; transfection

survivin属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族新成员,由Altieri研究组于1997年发现[1],高表达于大多数肿瘤组织。在正常成人组织中,除增殖活跃的睾丸、胸腺、分泌期的子宫内膜外,几乎无表达,因此survivin成为肿瘤治疗的一个较为理想的靶点。1998年,Fire等[2]首次发现RNA干扰(RNA interference, RNAi)现象,也称转录后基因沉默(post transcription gene silencing, PTGS),其主要的效应分子为siRNA,具有特异性强、抑制效率高、细胞摄取较容易等优点,目前已成为更优于反义核酸和核酶的基因治疗的理想工具[3]。

本研究以人膀胱癌细胞株EJ28为研究对象,利用RNAi技术,针对survivin mRNA不同位点设计,体外化学合成3对siRNA,转染EJ28细胞,研究不同siRNA对EJ28细胞增殖和凋亡的影响,筛选出最有效的1对siRNA,为膀胱癌的基因治疗提供实验依据。

基金项目: 重庆市卫生局项目(04-2-130)
Supported by the Project of Bureau of Public Health of Chongqing (04-2-130)
作者简介: 吴 跃(1977-),男,四川省泸定县人,硕士,主治医师,主要从事膀胱肿瘤和肾移植方面的研究。电话:13883906117, E-mail: wuyao414@yahoo.com.cn
通讯作者: 苟 欣,电话:(023)89011120
收稿日期: 2007-01-15;**修回日期:** 2007-04-06

1　材料与方法

1.1　主要试剂

脂质体 RNAi-Mate 购自上海吉玛公司；RPMI1640 购自美国 HyClone 公司，小牛血清购自杭州四季清公司；Annexin V-FITC 试剂盒购自武汉晶美公司。

1.2　siRNA 的合成

针对 survivin mRNA 序列的不同位点（即靶点）设计，采用化学合成方法合成 3 对 siRNA，分别命名为：siRNA164 正义链：5′-GGACCACCGCAUCUCUACAdTdT-3′，反义链：5′-UGUAGAGAUGCGGUGGUCCdTdT-3′，siRNA167 正义链：5′-CCACCGCAUCUCUACAUUCdTdT-3′，反义链：5′-GAAUGUAGAGAUGCGGUGGdTdT-3′；siRNA389 正义链：5′-GAAGCAGUUUGAAGAAUUAdTdT-3′，反义链：5′-UAAUUCUUCAAACUGCUUCdTdT-3′。另外合成和 survivin 基因无同源性的羧基荧光素（FAM）标记的阴性对照：siRNA 正义链：5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′，反义链：5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。以上序列均由上海吉玛公司合成。

1.3　细胞培养

EJ28 膀胱肿瘤细胞株（高表达 survivin 基因）购自上海麦莎生物公司。用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。

1.4　脂质体 RNAi-Mate 介导 siRNA 转染

转染方法参照说明书进行。转染 6 h 后，换用普通完全培养基培养，培养至实验所需时间后做相关检测。预实验结果显示，细胞增殖活性与 siRNA 浓度有剂量依赖关系。结合脂质体的细胞毒性作用，我们选择 225 nmol/L 浓度进行研究，在这个浓度下，脂质体毒性最小，siRNA 的非特异性抑制也最小。

1.5　优化转染效率

转染 FAM 标记的阴性对照 siRNA 至 EJ28 细胞，在倒置荧光显微镜下观察转染效率。取对数生长期的细胞接种于 96 孔板，密度为 1×10^5/ml，每孔 200 μl，将 siRNA∶RNAi-Mate 比例按1∶2、1∶3和1∶4 分成 3 组，转染 6 h 后在倒置荧光显微镜下观察不同比例下的转染效率。

转染效率 =（转染细胞/细胞总数）×100%

1.6　MTT 法检测转染后对 EJ28 细胞的抑制作用

共分 6 个组：siRNA164、siRNA167、siRNA389、阴性对照组、脂质体组和空白对照组。阴性对照组加阴性对照 siRNA 及相同量的细胞、培养液及脂质体；脂质体组加相同量的细胞、培养液及脂质体，未加寡核苷酸；空白对照组加相同量的细胞及培养液，未加脂质体及 siRNA。siRNA 终浓度为 225 nmol/L。取对数生长期的细胞接种于 96 孔板，密度为 1×10^5/ml，每孔 200 μl，每组设 6 个复孔。细胞在 60% 汇合度时进行转染，转染 6 h 后换完全培养基继续培养。分别在复培养 24、48、72 h 后采用 MTT 法检测 EJ28 细胞的吸光度值[D(570)]，再计算其抑制率：抑制率 =[1 − 实验组 D(570)/阴性对照组 D(570)]×100%。再比较 3 对 siRNA 各个时间段的抑制率，得出最佳抑制时间。

1.7　流式细胞检测凋亡率

将细胞接种于 100 ml 培养瓶，分为 siRNA164、siRNA167、siRNA389、阴性对照组，转染 48 h 后收集细胞，加入 Annexin V-FITC 避光孵育 10 min 后，结合缓冲液冲洗细胞后再加碘化丙啶（PI），静置 10 min 后上流式细胞仪检测每组凋亡率。

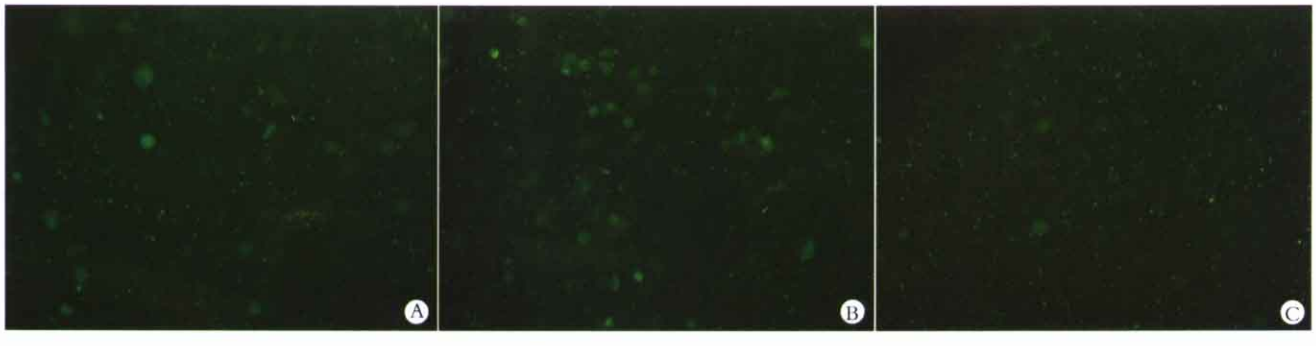
1.8　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 10.0 进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　转染效率的观察

转染了 FAM 标记的阴性对照 siRNA 后，整个 EJ28 细胞发出绿色荧光，未转染的细胞则没有荧光。实验中观察到，当 siRNA∶RNAi-Mate 比例为1∶3时转染效率最高，荧光显微镜下观察达 60%（图 1），与 1∶2和 1∶4两种比例转染的结果比较，差异显著（$P<0.05$），故将 siRNA∶RNAi-Mate 比例定为1∶3进行以后的实验。



A：比例为 1∶2；B：比例为 1∶3；C：比例为 1∶4

图 1　倒置荧光显微镜下观察不同 siRNA∶RNAi-Mate 比例的转染效率　（×200）

2.2　siRNA 对 EJ28 细胞抑制率的检测结果

与阴性对照组相比，siRNA 组的 D(570) 都较低，EJ28 细胞的增殖受到了抑制（$P<0.05$），见表 1。通过抑制率比较，结果显示 siRNA164 抑制 EJ28 细胞增殖的效果最明显（$P<0.05$），而且都在转染 48 h 后抑制效果最好，抑制率为（41.32 ± 2.54）%，其次为 siRNA389，而 siRNA167 效果最差（表 2）。阴性对照组和空白对照组的 D(570) 比较，差别不显著（$P>0.05$）。

表1 转染24、48、72 h后EJ28细胞的吸光度值[$D(570)$,$\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
siRNA164	1.361±0.076[a]	1.412±0.095[a]	1.318±0.058[a]
siRNA167	1.662±0.068[a]	2.106±0.018[a]	1.852±0.067[a]
siRNA389	1.473±0.081[a]	1.865±0.075[a]	1.746±0.082[a]
阴性对照	1.876±0.012	2.430±0.048	1.924±0.091

a:$P<0.05$,与阴性对照比较

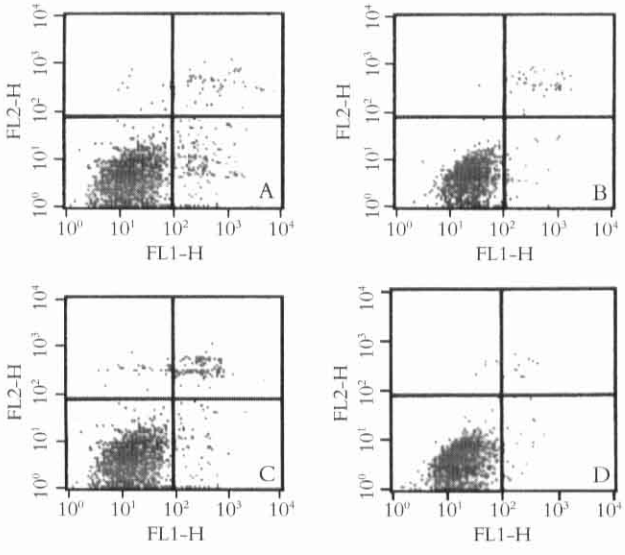
表2 转染24、48、72 h后EJ28细胞的抑制率[($\bar{x}\pm s$)%]

组别	24 h	48 h	72 h
siRNA164	27.05±3.54	41.32±2.54	31.46±0.14
siRNA167	9.11±0.21[a]	13.31±3.18[a]	5.28±0.30[a]
siRNA389	16.93±0.65[a]	20.50±1.35[a]	10.65±0.10[a]

a: $P<0.05$,与siRNA164比较

2.3 转染48 h后siRNA诱导EJ28细胞的凋亡率

靶向survivin的siRNA都能诱导EJ28细胞凋亡,和阴性对照比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中siRNA164凋亡率最高,转染48 h后凋亡率最高为(13.20±0.25)%,其次为siRNA389[(4.50±0.17)%],siRNA167凋亡率最低[(2.50±0.23)%]。阴性对照组和空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。



A: siRNA164; B: siRNA167; C: siRNA389; D:阴性对照

图2 FCM检测转染48 h后EJ28细胞的凋亡率 右下象限示凋亡率

3 讨论

survivin具有抑制细胞凋亡和促进细胞分裂的功能,是目前发现的最强的凋亡抑制因子。它抑制凋亡的作用主要通过类杆状病毒IAP重复序列来完成,作用于凋亡途径上游的启动因子半胱天冬酶-9(caspase-9)以及最下游的效应分子caspase-3和caspase-7,从而抑制caspase依赖的细胞凋亡途径;同时还调节线粒体释放细胞色素c和Smac/DIABLO,从而间接地影响caspase-3的活性[4]。

RNAi现象自被发现以来,引起许多研究者的注意。RNAi的机制还不完全清楚,涉及很多功能不清楚的酶和蛋白质,但最重要的是双链RNA(dsRNA)特异性核酸内切酶(dicer)。目前认为dsRNA进入细胞后,被Dicer裂解成3′端带有2个游离核苷酸的21~23 nt的siRNA是RNAi发挥作用的重要中介分子,它与一系列酶结合形成诱导沉默复合体,引起靶基因的转录沉默。2001年,Elbashir等[5]首次报道siRNA在哺乳动物体外培养细胞内成功诱导基因特异阻抑以后,siRNA是否可应用于人类疾病的治疗受到了广泛的关注。已有研究证实靶向survivin的siRNA能抑制肿瘤细胞的增殖[6-8],可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,促进其凋亡[9,10]。与传统的反义技术相比,RNAi以其高效、高特异性等优点,展示了其独特的优势及广泛的应用前景。

膀胱癌是我国最常见的泌尿系统肿瘤,其中大多数为膀胱移行细胞癌(TCC)。70%浅表性膀胱癌可以检测到survivin的高表达,而且在膀胱癌的诊断中,尿survivin检测的敏感性、特异性等都优于NMP22和细胞学检查[11,12]。这为靶向survivin的RNAi技术在膀胱肿瘤基因治疗的应用提供了一定的理论基础。我们以survivin基因为靶标,针对其不同位点设计合成了3对siRNA序列,以探讨siRNA对膀胱肿瘤EJ28细胞株的增殖和凋亡的影响。优化转染条件,提高转染效率是RNAi效应的重要保证,只有在较高的转染效率的前提下,才能获得较高的干扰效果。在实验中,我们观察到当siRNA:RNAi-Mate比例为1:3时,转染效率最高,达60%,减少或增加脂质体RNAi-Mate的比例并不能增加转染效率,可能是因为脂质体量不够导致siRNA进入细胞过少,或是脂质体量过大而增强其对细胞的毒性。进行RNAi研究时,干扰目的基因的位点选择至关重要。针对不同的位点,干扰的效果可能相差甚远[13]。本实验中,我们针对survivin mRNA序列的不同位点,采用化学合成的方法设计合成3对siRNA;另外合成1对与survivin基因无同源性的荧光标记的siRNA,用来观察转染效率以及作为阴性对照排除非特异性影响。通过MTT和FCM检测,我们观察到3对siRNA都能抑制EJ28细胞的增殖和促进其凋亡,但以siRNA164的效果最明显,其抑制率和凋亡率都比siRNA167和siRNA389高;我们还观察到siRNA所产生的RNAi效应在转染48 h后最明显,可能与化学合成的siRNA容易降解,产生的RNAi效应持续时间短有关。转染靶向survivin的siRNA后,可以抑制EJ28细胞的增殖,并诱发一定程度的凋亡,提示靶向survivin的RNAi技术在膀胱癌的治疗中具有一定

的价值，为今后进一步研究膀胱癌的基因治疗提供一定的实验基础。

参考文献：

[1] 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.

[2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 - 811.

[3] Zhang Y C, Taylor M M, Samson W K, *et al*. Antisense inhibition: oligonucleotides, ribozymes, and siRNAs [J]. Methods Mol Med, 2005, 106: 11 - 34.

[4] Chiou S K, Jones M K, Tarnawski A S. Survivin--an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond [J]. Med Sci Monit, 2003, 9(4): PI25 - PI29.

[5] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature, 2001, 411 (6836): 494 - 498.

[6] Carvalho A, Carmena M, Sambade C, *et al*. Survivin is required for stable check point activation in taxol-treated HeLa cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 14): 2987 - 2998.

[7] Williams N S, Gaynor R B, Scoggin S, *et al*. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(3): 931 - 946.

[8] 苟　欣，何卫阳，肖朝明，等. Survivin 在膀胱癌中的表达及其与癌细胞增殖关系的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：377 - 378.

[9] Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, *et al*. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin [J]. Int J Cancer, 2006, 118(4): 812 - 820.

[10] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, *et al*. Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA[J]. Cancer Lett, 2006, 232(2): 243 - 254.

[11] 何卫阳，苟　欣，祝海洲，等. 凋亡抑制基因 survivin 在膀胱移行细胞癌中表达的初步研究[J]. 重庆医科大学学报，2004，29(1)：41 - 44，50.

[12] Shariat S F, Casella R, Khoddami S M, *et al*. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer[J]. J Urol, 2004, 171(2 Pt 1): 626 - 630.

[13] Luo K Q, Chang D C. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2004, 318(1): 303 - 310.

（编辑　薛国文）

（上接 2151 页）

4 例穿孔小于 1 cm，于腹腔镜下行单纯修补术，其余患者明确诊断后即中转开腹手术；18 例腹腔肿瘤发现病变即用活检钳取活检，明确诊断后 16 例中转开腹行相应根治手术，2 例因肿瘤广泛转移于腔镜下行单纯造瘘姑息手术；12 例腹腔黏连均采用腔镜行黏连分解术；10 例妇科疾病术中请妇科专家会诊做相应妇科处理；急性坏死性小肠炎探查明确即转开腹行坏死小肠切除、肠吻合术；急性肠系膜淋巴结炎及原发性腹膜炎探查明确行保守治疗；结核性腹膜炎利用腔镜抽取腹水明确诊断后保守抗痨治疗。除 2 例晚期肿瘤腹腔广泛转移外，其余患者手术后均顺利康复。

3　讨论

用腹腔镜行腹腔探查其优点主要体现在对急腹症极其准确的诊断率，尤其对确定是否需要开腹手术准确率达 100%；或确定开腹手术的切口位置，决定手术内容，避免延误诊治或作不必要的剖腹探查[1]。我们认为，腹腔镜行急腹症腹腔探查术，关键要掌握正确探查的顺序。若疑有某些用腹腔镜探查困难的部位有病变（如肝脏和脾脏膈面深部、胰腺、胃的后壁等）应立即开腹探查[2]，避免延误疾病的诊治。

采用腔镜行黏连分解术，应首先探查黏连的部位，而腹腔黏连大部分是网膜或肠管的黏连。用腔镜探查肠管应从腔镜较易发现的回盲部开始。在探查肠管时应注意如下几点：①应该用无损伤抓钳抓持肠管探查，避免肠管的副损伤。②掌握探查进度，抓钳要均匀移动，距离大致相等。③发现肠管病变要及时标记，若病情允许，可探查完全程肠管后再作相应处理。④在探查肠管的同时应观察系膜可能存在的病变[3]。我们从本组病例观察到，对常见腹腔黏连而导致的急腹症，采用腔镜行黏连分解术确实是一种行之有效的治疗方法。

越来越多的急腹症是由腹腔肿瘤导致的并发症，本组 100 例急腹症中有 18 例是由腹腔各种肿瘤引发的并发症，其中肠道肿瘤引起的梗阻或穿孔最常见。采用腔镜探查时，最大的优势是可以提取少量病灶明确病变的性质，对不明原因的腹水也可抽取少量以明确诊断。当需要用腹腔镜取活检时，要在比较明显的病变部位进行，同时要注意防止腹腔内副损伤，尽量采用活检钳在病变处多处活检，钳取的活组织应用隔离袋移出，防止脱落引起的腹腔内医源性播散。

关键词：急腹症；腹腔镜；腹腔探查术

中图法分类号：R572.04　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 万德礼，刘树清，司亚卿，等. 腹腔镜在 208 例急腹症中的应用[J]. 郑州大学学报：医学版，2004，39(1)：135 - 136.

[2] 赵　挺，裘华森，刘金明，等. 腹腔镜在外科急腹症诊治中的应用评价[J]. 中国普通外科杂志，2002，11(12)：753 - 754.

[3] 张伟强，刘宁青，吕鹏飞，等. 用腹腔镜行腹腔探查的方法及注意事项[J]. 中国实用外科杂志，2002，22(10)：625 - 626.

（编辑　陈聪连）