论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1706-04

AdH1-siRNA-Survivin 抗小鼠黑色素瘤生长和转移的研究

于智勇[1,2],沈维干[1],薛庆於[2],武 辉[1] ([1]扬州大学医学院细胞生物学教研室,江苏 扬州 225009;[2]扬州教育学院生化工程系,江苏 扬州 225009)

摘 要:目的 研究针对 Survivin 的腺病毒介导的 siRNA 对小鼠黑色素瘤生长和转移的影响。**方法** 构建表达小鼠 Survivin 序列特异性 siRNA 复制缺陷型重组腺病毒(AdH1-siRNA-Survivin),利用 Western blot 方法检测感染 AdH1-siRNA-Survivin 的 B16BL6 细胞中 Survivin 蛋白的表达;采用皮下注射法建立小鼠黑色素瘤生长模型,采用瘤内或周围多点注射相应的重组腺病毒,每周 1 次,每次 2×10^9 FPU,共 3 次。定期测量各组肿瘤体积,应用免疫组化法检测肿瘤微血管密度(MVD);采用尾静脉注射感染重组腺病毒的 B16BL6 细胞建立小鼠肿瘤转移模型,计数并比较各组小鼠肺表面的黑色转移结节数。**结果** AdH1-siRNA- Survivin 可以显著下调 B16BL6 细胞 Survivin 蛋白的表达;与空白对照组和空载病毒组(AdH1-Empty)相比,AdH1-siRNA-Survivin 注射组显著抑制小鼠肿瘤的生长,降低肿瘤的 MVD 数($P<0.01$);感染 AdH1-siRNA-Survivin 的 B16BL6 细胞小鼠的肺转移灶数目也显著降低($P<0.01$)。**结论** 重组腺病毒介导的针对 Survivin 的 siRNA 技术有效地下调细胞中 Survivin 的表达,能减少肿瘤内微血管生成、抑制肿瘤生长和转移。

关键词: RNA 干扰;重组腺病毒;Survivin;黑色素瘤
中图法分类号: R394-33;R73-362;R739.5 **文献标识码:** A

AdH1-siRNA-Survivin inhibits tumor growth and metastasis of mouse melanoma

YU Zhi-yong[1,2], SHEN Wei-gan[1], XUE Qing-yu[2], WU Hui[1] ([1]Department of Cell Biology, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225009; [2]Department of Biochemistry Engineering, Yangzhou Educational College, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of adenovirus-mediated siRNA targeting Survivin on tumor growth and metastasis of mouse melanoma. Methods A replication-defective recombinant adenovirus AdH1-siRNA-Survivin targeting mouse Survivin was constructed using the homologous recombination technique. The expression of Survivin protein in B16BL6 cells after infection was detected by Western blotting. Mouse melanoma models were established by subcutaneous injection of B16BL6 cells. AdH1-siRNA-Survivin of 2×10^9 pfu every week by multi-spot intratumoral or peritumoral injection was performed to every mouse (totally three times). The tumor volume was measured every five days after tumor cell implantation, and the microvessel density (MVD) of tumor was counted by immunohistochemistry under the microscope. For the experimental metastasis assay, B16BL6 cells infected with AdH1-siRNA-Survivin were injected into the tail veins of mice, then the visible black nodules on the lung surface were counted macroscopically at 21th day after tumor cell injection. Results AdH1-siRNA-Survivin could obviously decrease the expression of Survivin protein in B16BL6 cells. When compared with the blank control and AdH1-empty control, the tumor growth was inhibited and MVD was less in the mice injected with AdH1-siRNA-Survivin ($P<0.01$), and lung nodules was significantly less, too ($P<0.01$). Conclusion The recombinant adenovirus-mediated siRNA targeting Survivin can obviously down-regulate Survivin expression in B16BL6 cells and inhibit tumor angiogenesis, growth and metastases.

Key words: RNA interference; recombinant adenovirus; Survivin; melanoma

---

基金项目: 扬州大学生命科学学科群项目(2004)
Supported by the Project of Life Science of Yangzhou University (2004)

作者简介: 于智勇,男,江苏省泰兴市人,副教授,主要从事细胞生物学与动物生物学方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(0514)87697155, E-mail:jsyzyzy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-22;**修回日期:** 2008-05-31

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族成员之一,在绝大多数正常成年组织中则检测不到其表达,但在胚胎组织和绝大多数肿瘤组织中均高表达[1-4]。Survivin 在细胞中作为 Caspase 的抑制因子,阻断 Caspase 的活化,或者通过与核因子 NF-κB 的相互调控、与丝氨酸/苏氨酸激酶受体的相互作用抑制凋亡以及可能参与肿瘤血管生成调控制等[5-8]。因此,以 Survivin 为靶点,通过调节肿瘤细胞凋亡而抗肿瘤进程的研究引起了人们广泛的关注。

本研究利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的方法,通过设计并构建表达 Survivin 序列特异性的 siRNA 的复制缺陷型重组腺病毒,并导入黑色素瘤小鼠体内并联合传统化疗进行治疗研究,拟为肿瘤的基因治疗及综合治疗的临床应用提供新的途径。

1　材料与方法

1.1　材料

限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ、*Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ、小牛肠碱性磷酸酶(CIP 酶)、T_4 多聚核苷酸激酶和 T_4 DNA 连接酶均为 NEB 公司产品。质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自购自 Qiagen 公司。小牛血清购自杭州四季清生物工程材料研究所。DMEM 培养基购自 Gibco 公司。兔抗鼠 CD34、兔抗鼠 Survivin 和 β-tubulin 多克隆抗体以及辣根过氧化物酶结合的鼠抗兔 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司。pShuttle-H1 为本实验室保存。小鼠 Lewis 肺癌细胞系 LLC 和 HEK293A 细胞购于中国科学院上海细胞所,细胞培养于含 100 ml/L 小牛血清、100 mg/L 青霉素和 1 000 U/L 链霉素的 DMEM 培养液中,在 37 ℃,含 50 ml/L CO_2 湿度饱和的培养箱中培养。健康 6 ~ 8 周龄 BALB/c 小鼠由扬州大学实验动物中心提供。

1.2　方法

1.2.1　重组腺病毒的构建、扩增、纯化及滴度测定　　从 GenBank 中检索到鼠 Survivin 的 cDNA 序列(登录号:NM_009689),用 Ambion 公司网页上提供的在线工具找出潜在的靶序列,按照 siRNA 设计的一般原则选取靶序列[9]。本实验选取的靶序列位于起始密码子下游 186 ~ 204 nt 处。设计的引物序列为:P1:5′-GATCCCCGGAATTGGAAGGCTGGGAATTCAAGAGATTCCCAGCCTTCCAATTGGTTTTTGGAAA-3′;P2:5′-AGCTTTTCCAAAAAGGAATTGGAAGGCTGGGAATCTCTTGAATTCCCA-GCCTTCCAATTGGGGG-3′。引物由上海生工合成。按照文献[10]报道的方式克隆到 pShuttle-H1 穿梭载体上。pShuttle-H1-siRNA-Survivin 与骨架载体 pAdEasy-1 在 BJ5183 菌株中重组成腺病毒载体,重组腺病毒 AdH1-siRNA-Survivin 的包装、扩增、纯化及滴度测定按照文献[11]报道的方法进行。病毒颗粒的纯化采用氯化铯密度梯度离心方法进行。对照病毒为 AdH1-Empty(本实验室制备)。

1.2.2　Western blot 方法检测重组腺病毒感染 B16BL6 细胞后 Survivin 蛋白的表达　　腺病毒(50 MOI)感染 48 h 后的 B16BL6 细胞中 Survivin 的表达水平采用 Western blot 法检测。简要过程如下:B16BL6 细胞接种于 100 mm 细胞培养皿,待细胞达到 70% 汇合时,弃培养基,按 50 mol 的 AdH1-Empty 或 AdH1-siRNA/Survivin 加入无血清培养基病毒稀释液 3 ml,轻轻晃匀,置 37 ℃培养 2 h 后,PBS 洗涤细胞 2 次,每皿分别加入 7 ml新鲜培养基,继续培养 72 h 后,吸去培养基,用冰预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 RIPA 裂解液,冰浴 30 min,刮取细胞,12 000 × *g* 离心 2 min,收集上清。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度后,进行 SDS-PAGE,按常规方法转印至 PVDF 膜上,用兔抗鼠 Survivin 和 β-tubulin 抗体(作为内参)进行免疫印迹分析,用 HRP 标记的二抗及 DAB 显色液显色。

1.2.3　肿瘤生长动物模型的建立　　收集对数生长期的 B16BL6 细胞,按每只 200 μl(约 5.0×10^6 个细胞)的量将细胞悬液皮下接种于健康 6 ~ 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,待皮下长出直径约 5 mm 肿瘤时,分为对照组、AdH1-Empty 感染组、AdH1-siRNA/Survivin 感染组,每组 8 只小鼠。重组腺病毒感染组的小鼠分 3 次注射(间隔 1 周),每次瘤内和周围多点注射 6×10^9 pfu 的腺病毒。每隔 5 d 用游标卡尺测量一次肿瘤长轴和短轴,然后按公式计算[12]肿瘤的体积,肿瘤体积 = (长轴 × 短轴^2) × 0.52,作肿瘤生长曲线。饲养 6 周后,处死小鼠,取下肿瘤,称量并作统计学分析。免疫组化 ABC 法对血管内皮细胞的 CD34 抗原进行标记及微血管计数,肿瘤组织 MVD 用 5 个视野下(×200)的血管数的平均数表示。

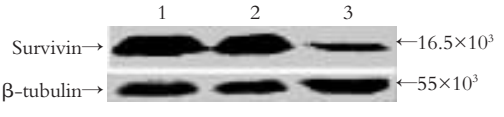
1.2.4　小鼠肿瘤转移实验模型的建立　　收集对数生长期感染 50 MOI 24 h 后的 B16BL6 细胞,制备成 $2 \times 10^6 ml^{-1}$ 的细胞悬液,按照每只 100 μl 的细胞悬液量,通过尾静脉注射到健康 6 ~ 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠。注射肿瘤细胞后的第 21 天,处死小鼠,分离肺,计数肺表面的黑色的转移结节数。

1.2.5　统计学分析　　应用 SPSS 8.0 软件按照 ANOVA 检测进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组样本间的比较采用 t 检验,多组样本间的比较采用 F 检验。

2　结果

2.1　AdH1-siRNA-Survivin 下调 B16BL6 细胞中 Survivin 的表达

Western blot 实验结果显示,对照组和空载腺病毒 AdH1-Empty 感染 72 h 后不影响 B16BL6 细胞中的 Survivin 表达,而 AdH1-siRNA-Survivin 感染细胞 72 h 后可以显著下调 B16BL6 细胞中 Survivin 的表达(图 1)。

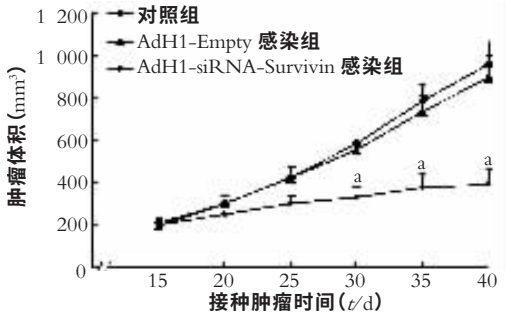


1:对照组;2:AdH1-Empty 感染组;3:AdH1-siRNA-Survivin 感染组

图 1　AdH1-siRNA-Survivin 对 B16BL6 细胞 Survivin 表达的影响

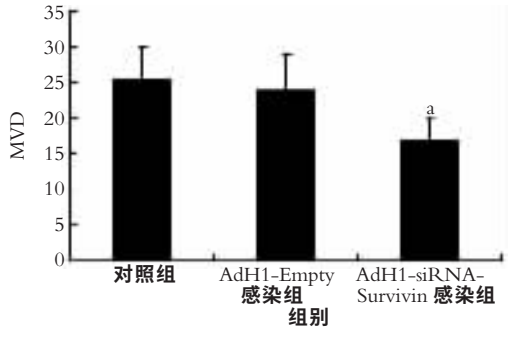
2.2 AdH1-siRNA-Survivin 对肿瘤生长抑制的作用

小鼠皮下接种肿瘤细胞后第 6 天，可观察到直径约 5 mm 的皮下肿瘤结节，成瘤率为 97%。取成瘤小鼠分组观察各组对接种肿瘤生长的影响。结果显示，对照组和空载病毒组的小鼠荷瘤体积均呈进行性增大，两组之间肿瘤大小无统计学差异（$P>0.05$）；而 AdH1-siRNA-Survivin 注射组的小鼠肿瘤的体积就显著小于空白对照组和空载病毒组，随着时间的延长，这种抑制作用更加显著（$P<0.01$，图 2）。肿瘤组织切片 HE 染色结果显示，AdH1-siRNA-Survivin 注射组肿瘤细胞出现局部坏死（图 3）。另外，肿瘤组织切片免疫组化结果显示，AdH1-siRNA-Survivin 注射组的肿瘤的微血管密度（MVD）与对照组以及空载病毒组相比也显著减少（图 4，$P<0.01$）。



a：$P<0.01$，与对照组比较

图 2 AdH1-siRNA/Survivin 对肿瘤生长的影响 （$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

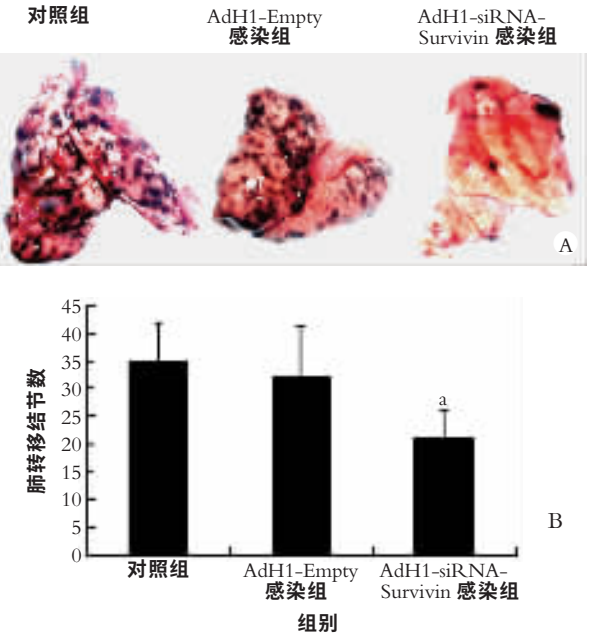


a：$P<0.05$，与对照组比较

图 4 AdH1-siRNA/Survivin 对肿瘤 MVD 的影响 （$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

2.3 AdH1-siRNA-Survivin 感染 B16BL6 细胞接种小鼠后对 B16BL6 细胞转移的影响

通过尾静脉注射感染腺病毒 24 h 后的 B16BL6 细胞悬液，21 d 后，处死小鼠，分离肺，计数肺表面的黑色转移结节数，结果见图 5，注射感染 AdH1-siRNA-Survivin 的 B16BL6 细胞组的小鼠肺转移结节数与空白对照组以及空载病毒组相比显著减少（$P<0.01$），而空白对照组与空载病毒组两者之间无统计学差异（$P>0.05$）。

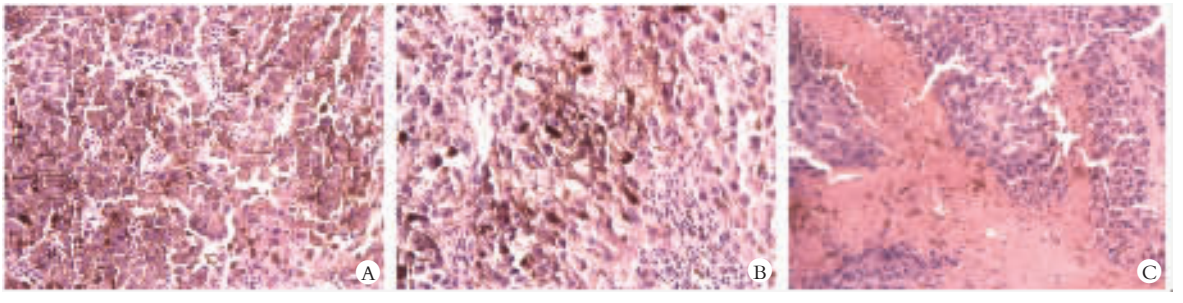


A：肺大体观察；B：计数结果 a：$P<0.05$，与 Mock 比较

图 5 AdH1-siRNA/Survivin 对小鼠肺转移的影响 （$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

3 讨论

RNAi 是有机体中进行的序列特异性的转录后基因沉默过程，由细胞中核糖核酸酶Ⅲ的类似物 Dicer 将较长的与靶基因序列同源的双链 RNA 裂解成 19～23 个核苷酸的 siRNA，并在细胞中形成 RNA 诱导的沉默复合体，降解序列同源的目的基因 mRNA，从基因转录后的水平上抑制靶基因翻译成蛋白质[9, 13]。本实验结果表明，针对 Survivin 的腺病毒介导的序列特异性的 siRNA 可以明显下调肿瘤细胞中 Survivin 蛋白的表达，提示利用该技术可以有效地沉默 Survivin 基因



A：对照组；B：AdH1-Empty 感染组；C：AdH1-siRNA-Survivin 感染组

图 3 各组 B16BL6 移植瘤的病理学检测 （HE×200）

的表达,可以用来特异性阻断 Survivin 表达以进一步研究其生理功能,同时也可能为应用序列特异性 siRNA 作为基因治疗的"药物"提供了开发应用的可能性。

凋亡抑制蛋白是细胞周期终末效应阶段的重要调节因子,其家族的成员 Survivin 在细胞中可以直接为抑制 Caspases 的活性,或者通过与核因子 NF-κB 的相互调控、与丝氨酸/苏氨酸激酶受体的相互作用等,阻断细胞的凋亡过程[5-7]。与其他凋亡抑制蛋白家族成员不同,Survivin 在组织分布上具有明显的细胞选择性,在正常成人组织中不表达或低表达,而在绝大多数肿瘤组织中高表达[1,3],引起了学者们的广泛关注,有望成为肿瘤治疗的选择性靶点。腺病毒载体是基因治疗常用的病毒载体,具有宿主范围广、感染率高、理化性质稳定和无插入突变性等优点,可以克服常规基因治疗转染效率低和只能瞬间或短期表达等缺点。本研究的体外实验显示,AdH1-siRNA-Survivin 可以极显著地下调小鼠黑色素瘤 B16BL6 细胞中 Survivin 的表达,表明本研究设计、构建的序列特异性 Survivin-siRNA 是成功的。

本研究将表达 Survivin 特异性 siRNA 的重组腺病毒感染小鼠黑色素瘤 B16BL6 细胞可以极显著地下调细胞中 Survivin 的表达,表明本研究设计、构建的序列特异性 Survivin-siRNA 是成功的。比较各组小鼠移植瘤体积生长曲线的实验结果表明,AdH1- siRNA-Survivin 可以有效地抑制小鼠黑色素瘤的生长,进一步分析肿瘤 MVD 的结果显示,Survivin 特异性 siRNA 还可以抑制肿瘤体内的血管生成,这与文献[8]报道的结果相一致。这些结果提示,Survivin 特异性 siRNA 沉寂 Survivin 基因的表达后,在诱导肿瘤细胞凋亡的同时,也诱导血管内皮细胞凋亡,从而协同抑制肿瘤的血管新生和肿瘤的生长。另外,由于黑色素瘤是一种高度恶性肿瘤,生长迅速,患者临床预后较差,因此本研究进一步研究 Survivin 特异性 siRNA 沉寂黑色素瘤细胞中 Survivin 基因的表达后对体内转移的影响,结果表明,通过尾静脉注射后的 AdH1-siRNA-Survivin 感染的 B16BL6 细胞体内向肺转移的能力显著下降。该结果表明,Survivin 特异性 siRNA 沉寂 Survivin 基因的表达不仅可以抑制肿瘤的生长,而且可以抑制肿瘤的转移。本研究结果提示,以腺病毒介导的 RNAi 技术沉默 Survivin 的基因治疗,具有良好的靶向性、特异性,将为探讨肿瘤的发生机制和肿瘤的生物治疗奠定基础。

参考文献:

[1] Peng X H, Cao Z H, Xia JT, *et al*. Real-time detection of gene expression in cancer cells using molecular beacon imaging: new strategies for cancer research[J]. Cancer Res, 2005, 65(5): 1909 - 1917.

[2] 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.

[3] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, *et al*. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127 - 134.

[4] Yang L, Cao Z, Yan H, *et al*. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy[J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6815 - 6824.

[5] Peng X H, Karna P, Cao Z, *et al*. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281(36): 25903 - 25914.

[6] Sato A, Oya M, Ito K, *et al*. Survivin associates with cell proliferation in renal cancer cells: regulation of survivin expression by insulin-like growth factor-1, interferon-gamma and a novel NF-kappaB inhibitor [J]. Int J Oncol, 2006, 28(4): 841 - 846.

[7] Reed J C. The Survivin saga goes *in vivo*[J]. J Clin Invest, 2001, 108(7): 965 - 969.

[8] Konturek P C, Konturek S J, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection[J]. J Physiol Pharmacol, 2006, (57 Suppl 3): 51 - 65.

[9] 沈维干. RNA 干扰的研究方法[J]. 实用临床医药杂志, 2003, 7(1): 73 - 74, 77.

[10] Shen C, Buck A K, Liu X, *et al*. Gene silencing by adenovirus - delivered siRNA[J]. FEBS Lett, 2003, 539(1 - 3): 111 - 114.

[11] He T C, Zhou S, da-Costa L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509 - 2514.

[12] Fahmy R G, Dass C R, Sun L Q, *et al*. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth[J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1026 - 1032.

[13] Shen W G. RNA interference and its current application in mammals [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(7): 1084 - 1091.

(编辑　王　红)