论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0124-04

shRNA 沉默 survivin 基因对人膀胱移行细胞癌 T24 细胞生物学行为的影响

杜 虎[1],吴小候[1],罗春丽[2],刘 川[1],曾 柯[1],何云锋[1],尹志康[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院泌尿外科,[2]检验系,重庆 400016)

摘 要:目的 构建 survivin 特异性短发夹 RNA(shRNA)的表达载体,探讨其对人膀胱移行细胞癌 T24 细胞的生物学行为的影响。**方法** 将构建 survivin 特异 shRNA 表达载体转染 T24 细胞,RT-PCR、Western blot 检测 survivin mRNA 及其蛋白的表达水平;通过细胞生长曲线、随机运动实验、Matrigel 穿膜实验检测肿瘤细胞生长、运动及体外侵袭能力。**结果** 经 *Eco*RⅠ和 *Hin*dⅢ双酶切和测序鉴定,成功筛选含目的 DNA 片段的重组载体 pshRNA-survivin2,并成功转染 T24 细胞;转染 pshRNA-survivin2 后可显著抑制细胞中 survivin mRNA 及其蛋白的表达,抑制率分别为61.73% 和 73.27%;pshRNA-survivin2 组的细胞侵袭力与运动能力均有明显的下降,第 3、5 天时肿瘤细胞生长抑制率分别为 59.13%、83.86%。**结论** 应用 pTZU6 +1 质粒载体构建 survivin 的 shRNA 表达载体,能有效抑制其 survivin mRNA 及其蛋白的表达,并可抑制 T24 细胞的增殖、运动及体外侵袭能力。

关键词: survivin;shRNA;肿瘤侵袭;膀胱肿瘤
中图法分类号: R73-354;R730.23;R737.14 **文献标识码**: A

Inhibitory effects of shRNA-silencing endogenous survivin gene on T24 bladder carcinoma cells

DU Hu[1], WU Xiao-hou[1], LUO Chun-li[2], LIU Chuan[1], ZENG Ke[1], HE Yun-feng[1], YIN Zhi-kang[1] ([1]Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital, [2]Falculty of Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct the plasmid containing short hairpin RNA (shRNA) of survivin to suppress the expression of endogenous survivin gene in T24 cells. Methods The recombinant plasmid pshRNA-survivin2 expression construct was confirmed by *Eco*R Ⅰ and *Hin*d Ⅲ double digestion and by sequencing. The plasmid pshRNA-survivin2 was stably transfected into transitional cell carcinoma of the bladder (TCCB) cells T24. Then survivin mRNA and protein expressions in the transfected T24 cells were detected by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. The biological effects of the plasmid pshRNA-survivin2 on T24 cells were evaluated through the detection of their anchorage-independent growth and *in vitro* invasion by cell migration assay and tranwell chamber assay. Results The expression of survivin in transfected T24 cells was markedly depressed at both mRNA and protein levels (61.73% and 73.37%, respectively) as compared with control. Anchorage-independent growth assay showed the growth of tumor cells was retarded. The inhibitory percentage of transfected T24 cells was respectively 59.13% and 83.86% on the third day and the fifth day. Transwell chamber assay showed the invasion ability of T24 cells was inhibited significantly. Conclusion The pshRNA-survivin2 expression plasmid, constructed from plasmid pTZU6 +1, can be successfully transfected into TCCB cell line T24 and can effectively inhibit the expression of survivin mRNA and protein. Therefore, the proliferation, migration and invasion of T24 cells transfected with pshRNA-survivin2 expression plasmid are inhibited. RNAi targeting survivin has a potential value in gene therapy of bladder cancer.

Key words: survivin; short hairpin RNA; neoplasm invasiveness; bladder neoplasm

survivin 基因是 1997 年由 Ambrosini 等[1]利用效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1)的 cDNA 在人类基因库中筛选克隆的一种凋亡抑制基因。survivin 在人膀胱移行细胞癌中的这些特点,提示通过抑制 survivin 基因表达来抑制肿瘤的生长,可能为肿瘤治疗提供一条新的途径。本实验利

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(040313)
Supported by the Sci & Tech Research Project by Education Committee of Chongqing (040313)
作者简介:杜 虎,男,重庆市人,博士,副主任医师,主要从事泌尿系统肿瘤方面的研究,发表论文 20 篇。E-mail: cy86y3@126.com
通信作者:吴小候,电话:(023)89011122
收稿日期:2008-04-10;**修回日期**:2008-05-07

用转录载体 pTZU6 + 1 构建 survivin 的短发夹状 RNA (small hairpin RNA, shRNA)表达载体,研究其在膀胱移行细胞癌细胞 T24 中沉寂肿瘤细胞 survivin 基因及其与膀胱移行细胞癌的生物学行为的相关性。

1　材料与方法

1.1　细胞培养

膀胱移行细胞癌细胞株 T24(由重庆医科大学基础研究所提供)常规培养于含 10% 的新生牛血清的 RPMI1640 培养液中,培养条件为 37 ℃,CO_2饱和度为 5%,定期观察细胞生长情况,每 2 ~ 3 天用 0.25% 的胰酶消化,进行传代培养。

1.2　survivin siRNA 有效序列的选择及真核表达载体的构建

含有人全长 survivin 的 pTZU6 + 1/survivin 质粒(即 pshRNA-survivin2)[2] 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室黄爱龙教授惠赠。根据 shRNA 设计原则和 survivin 编码序列,设计 19 ~ 21 nt 的 DNA 片段,中间为 4 个或 8 个与目的基因无同源性的插入序列(TTCG 或 TTAGTACT 或 GAGTACTG),并利用 BLAST 进行查询,确定其为特异性序列。实验中采用 1 对 survivin 编码序列的反向重复序列,为 survivin-2 siRNA(编码基因 191 ~ 211 nt):正义链 5′-TCGAGCTGAGAACGAGCCAGACTTGTTAGTACTCAAGTCTGGCTCGTTCTCAGTTTTT-3′,反义链 5′-CTAGAAAAACTGAGAACGAGCCAGACTTGGTACTAACAAGTCTGGCTCGTTCTCAGC-3′。

1.3　pshRNA-survivin2 表达质粒的筛选及鉴定

取 7 μl 转化大肠杆菌 JM109,Amp 抗性筛选,筛选克隆提取质粒 DNA,用 *Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ分别酶切阳性克隆,并用相同的酶切载体 pTZU6 + 1 作为对照,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。进一步测序鉴定,阳性重组质粒命名为 pshRNA-survivin2。

1.4　转染细胞

转染过程按 Invitrogen 转染试剂盒说明书操作,将 Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司)按质粒与其 1∶2 的比例加入 T24 细胞中。置 37 ℃培养 4 ~ 6 h 后加入含血清的 RPMI1640 培养液,置 37 ℃培养继续培养 48 h 后收集细胞进行检测。实验分为未转染组、空载体组和 pshRNA-survivin2 组。

1.5　T24 细胞生长曲线的测定

经转染后筛选获得的靶细胞(1×10^6 细胞)分别接种于直径 25 cm^2 培养皿,以含胰岛素(10 μg/ml)的无血清 DMEM 培养 24 h,使其同步化;先以磷酸缓冲液(PBS,pH 7.4)洗涤 3 次,用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液并按 5×10^4 ml^{-1},每孔 200 μl 分别接种于 96 孔板,再于 5% CO_2 孵箱 37 ℃培养 18 h;以噻唑蓝法 MTT 于 490 nm 处测定 24 ~ 120 h 3 组细胞吸光值[D(490)]的变化,每时间点取 6 孔细胞测定,每时相点前 6 h,向各孔加入 MTT 应用液 20 μl,37 ℃孵育 6 h,从每孔中吸去 200 μl 上清液,每孔加入 200 μl DMSO,轻度振荡后,用 ELISA 测定仪测定 D(490)值。设定时间为横坐标,D(490)值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。按公式计算:

$$\text{肿瘤抑制率}(\%) = [D(490)_{\text{对照孔平均值}} - D(490)_{\text{实验孔平均值}}] / D(490)_{\text{对照孔平均值}} \times 100\%$$

pshRNA-survivin2 对 T24 细胞的抑制率用以判断 pshRNA-survivin2 对 T24 细胞的体外杀伤细胞毒作用。

1.6　侵袭实验

用无血清培养基 DMEM 稀释 Matirgel(美国 BD Biosciences 公司产品)到 5 mg/ml,在上下室之间铺直径为 13 mm、孔径为 8 μm 的聚碳酸酯微孔滤膜,膜上均匀铺 50 μg/孔的人工基质胶;Transwell 的下室加入含 5 μg/ml 纤维粘连蛋白(FN)的 DMEM 培养基;重悬细胞于 1% FBS 的 DMEM 培养基中,细胞数达 10^5 ml^{-1},将 500 μl 细胞悬液移入 Matirgel 上,37 ℃,5% CO_2 孵育 12 h。移入 Transwell,甲醛固定,HE 染色。用无菌棉签檫去上室上面未侵袭的细胞及 Matirgel,每组设 3 个平行样本,每张膜记数 5 个 200 倍光镜视野下侵袭细胞的数目,取其平均值,进行统计学分析。

1.7　运动实验

随机运动实验:将 10^6 个肿瘤细胞接种到 3 个平皿中,等待细胞生长到饱和密度后,分别用细胞刮子在平皿培养基中刮去 1 条无细胞的痕迹,PBS 冲洗刮掉的细胞,培养 48 h,在倒置显微镜下照相。

趋向运动实验:体外趋化运动能力的测定方法步骤与体外侵袭力测定相同,但侵袭小室的滤膜不用人工基质膜覆盖。将细胞接种到 Transwell 的上室内,下室加入含有 FN 的条件培养基 1 ml,每室加 2×10^5 个细胞,孵育,取下滤膜,甲醇固定,HE 染色。用棉签拭去未穿膜的细胞,封片,在高倍镜下照相、记数。每个组设 3 个平行孔。

1.8　半定量 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的变化

取细胞总 RNA 2 μg 用于 RT-PCR 检测。survivin 基因的引物序列:上游 5′-ATAGTCGACATGGGTGCCCCGACGTTG-3′,下游 5′-CTCGGATCCCAATCCATGGCAGCCAGCT-3′,其扩增长度为 421 bp。GAPDH 5′-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,扩增长度为 760 bp。反应条件:50 ℃ 30 min,*Taq* 酶激活:95 ℃ 15 min,然后 PCR 循环:94 ℃变性 45 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min。共计 30 个循环;72 ℃延伸 10 min 。取 10 μl 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,以出现约 420 bp 大小条带为阳性结果。通过 Bio-Rad 图像分析仪分析电泳条带。

1.9　Western blot 检测 survivin 蛋白的表达

培养的 T24 细胞经细胞裂解液(0.5 mol/L Tris-HCl pH 6.8,10% 十二烷基硫酸钠,1 mol/L 二硫基苏糖醇)裂解后 100 ℃变性 5 ~ 10 min,冰水中骤冷,4 ℃低温离心,12 000 r/min,10 min。蛋白上样经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳后,转至硝酸纤维素膜(NC 膜),其后与一抗 survivin (1∶1 000,Santa Cruz 公司产品)4 ℃过夜,再与二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1∶2 000,北京中杉生物技术公司)37 ℃,轻轻振荡 1 h 后弃反应液,加入化学发光试剂反应 5 min,应用图像分析系统观察并照相。通过 Bio-Rad 图像分析仪分析电泳条带。

1.10　数据分析

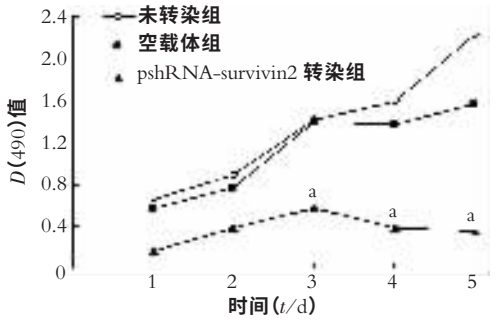
采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　pshRNA-survivin2 对 T24 细胞生长、运动、侵袭的影响

2.1.1　T24 细胞生长曲线　　与未转染组、空载体组相比较,pshRNA-survivin2 转染组细胞株的生长明显受抑制($P < 0.05$),而未转染组、空载体组各细胞株的生长,两组之间无明显差异($P > 0.05$),说明 pshRNA-survivin2 可以抑制 T24 细胞的生长

(图1)。经 MTT 检测,第 3 天、第 5 天时肿瘤细胞生长抑制率分别为 59.13%、83.86%。



a: $P<0.05$,与未转染组、空载体组比较

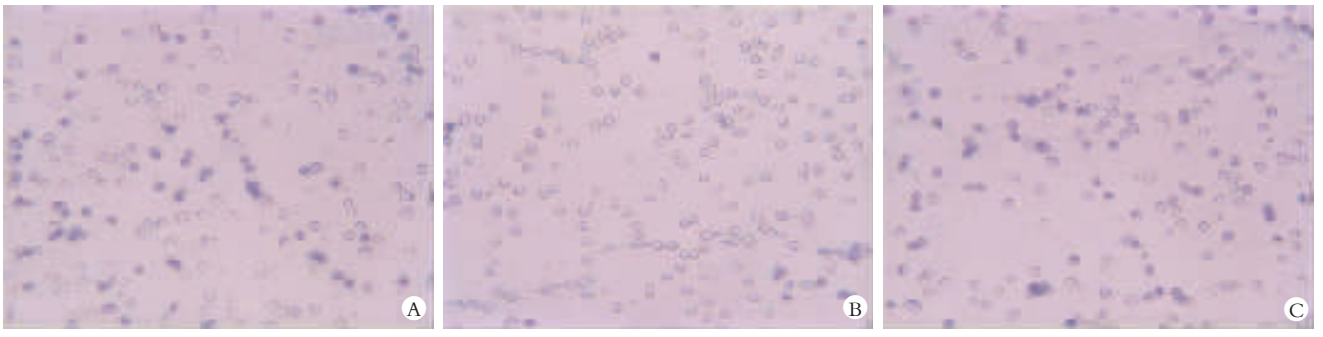
图1 重组质粒 pshRNA-survivin2 对 T24 细胞生长的影响

2.1.2 侵袭实验 pshRNA-survivin2 转染组穿膜细胞数为(15.34±1.85);而未转染组、空载体组分别为(27.62±2.06)、(26.07±1.73),后2组之间无差异($P>0.05$)。转染组与未转染组、空载体组相比较均有明显差异($P<0.01$)。因此转染前后 T24 细胞侵袭力差异有统计学意义($P<0.01$),见图2。

2.1.3 运动实验 随机运动实验:pshRNA-survivin2 转染组与未转染组、空载体组相比较,pshRNA-survivin2 转染组细胞株显示空白区域较大(图3)。趋向运动实验:pshRNA-survivin2 转染组穿膜细胞数为(41.32±3.47),而未转染组、空载体组分别为(62.84±4.97)、(64.15±6.71)。转染组与未转染组、空载体组相比较均有差异(图4)。因此转染前后 T24 细胞运动能力差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 半定量 RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达水平

图5电泳结果表明,3组泳道中细胞内源 GAPDH 基因扩增片段条带的亮度强弱相似,说明 RT-PCR 中加入的模板的量一致,而扩增的 survivin 基因电泳带存在明显差异。其中空载体组和未转染组的 survivin PCR 扩增带亮度较强[分别为(920.0±3.6)、(821.0±9.3)],而转染重组质粒 pshRNA-survivin2组的 survivin PCR 扩增带亮度明显减弱(352.0±8.6),与前两组之间有明显差异($P<0.05$),证明重组质粒 pshRNA-survivin2 在 mRNA 水平上均可促进 survivin mRNA 的降解。



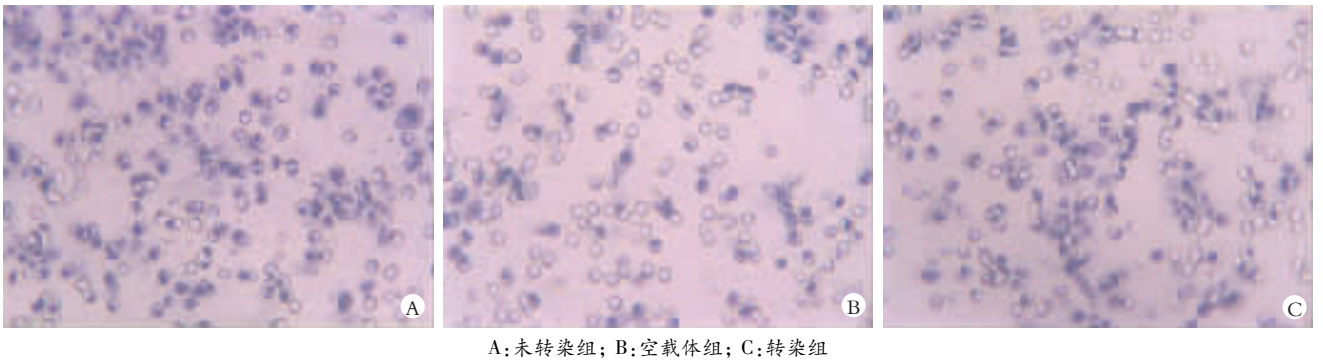
A:未转染组; B:空载体组; C:转染组

图2 pshRNA-survivin2 对 T24 细胞侵袭能力的影响 (HE×200)



A:未转染组; B:空载体组; C:转染组

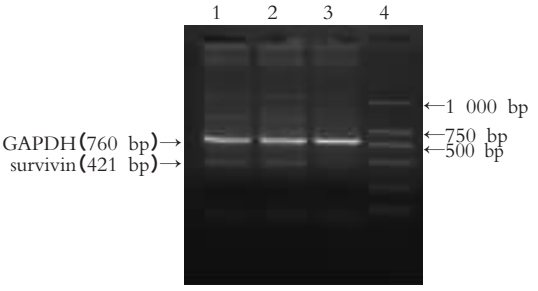
图3 pshRNA-survivin2 对 T24 细胞随机运动能力的影响 (×100)



A:未转染组; B:空载体组; C:转染组

图4 pshRNA-survivin2 对 T24 细胞趋向运动能力的影响 (HE×200)

pshRNA-survivin2 组的抑制率为 61.73%,与未转染组、空载体组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

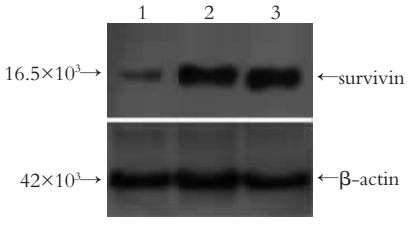


1:未转染组; 2:空载体组; 3:pshRNA-survivin2 组; 4:DNA 标准(DL 2000)

图 5　survivin 和 GAPDH 半定量 RT-PCR 电泳图

2.3　Western blot 检测 survivin 蛋白的表达

结果显示,未转染组和空载体组 survivin 蛋白杂交带明显强于重组质粒 pshRNA-survivin2 转染组,证实构建的 pshRNA-survivin 能够明显抑制 survivin 蛋白的表达。表达强度未转染组为(1 800.0 ± 11.0),空载体组为(1 893.0 ± 11.8),转染组为(481.0 ± 7.4)。pshRNA-survivin2 组抑制率为 73.27%,与未转染组、空载体组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 6。



1: pshRNA-survivin2 组; 2: 空载体组; 3: 未转染组

图 6　Western blot 检测转染细胞 survivin 蛋白的表达

3　讨论

survivin 是 Ambrosini 等[1]于 1997 年发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族的一个新成员,由于其独特的生物学结构,特殊的组织分布及明显的抗凋亡作用,目前越来越受到重视。survivin 可以通过诱导肿瘤坏死因子受体介导的 NF-κB 活化发挥抗凋亡作用。研究还表明 survivin 还可抑制 IL-3、fas、bax、TNF-α 诱发的凋亡[2]。因此 survivin 将会成为膀胱肿瘤研究的新热点,为肿瘤的诊治带来了希望。

由于 RNAi 在研究沉寂目的基因表达方面的优势,正逐渐取代寡核苷酸,成为新的基因表达干预技术[3,4]。沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)是由 siRNA 的反义链指导合成的核蛋白体,含有内切核酸酶、外切核酸酶、解旋酶,同源 RNA 链搜索活性等;siRNA 作为引导序列引导 RISC 与同源 mRNA 结合,该 mRNA 与 siRNA 的正义链置换,并被降解,降解发生在距 siRNA 3′端 12 个 bp 的位置,形成 10 bp 左右的寡核苷酸残端。尽管小干扰 RNA(siRNA)可以通过化学合成、体外转录或核酸内切酶等途径产生,但化学合成昂贵,内切酶切割可能导致非特异性效应,并且 siRNA 瞬时转染导致的沉默效应持续时间短(5 ~ 7 d),不能满足某些实验需要。发夹状 RNA(hairpin RNA)是 RNA 二级结构中最简单的。它是由 1 条 RNA 单链自身折叠形成双链的茎,再加上 1 条单链的环构成。研究认为在哺乳动物细胞中,短发夹 RNA(shRNA)可以长期甚至稳定的发挥 RNAi 的作用,而且不引起非特异性效应[5-7]。

本研究采用侵袭实验为人工基底胶 Matirgel 用量 50 μg,使其能够达到理想覆盖和理想厚度,选择侵袭时间为 12 h,然后将膜 HE 染色,选择上下左右及中心的视野计数。实验结果表明:细胞侵袭力与运动能力较一致;并且测定癌细胞的运动能力和生长曲线等指标可以间接判断癌细胞的侵袭能力;pshRNA-survivin2 组的细胞侵袭力与运动能力均有明显的下降;第 3、5 天时肿瘤细胞生长抑制率分别为 59.13%、83.86%。其所致肿瘤细胞的侵袭能力与运动能力降低,机制尚不十分明确,是否与 E-cadherin、β-catenin-Tcf/Lef 通路相关调控有关有待进一步探明[8]。RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达水平抑制率达 61.73%;Western blot 结果表明在肿瘤细胞 T24 中 pshRNA-survivin 能明显抑制 survivin 的表达,抑制率达 73.27%,而且具有明显的特异性。

本研究通过利用转录载体 pTZU6 + 1 构建能在哺乳动物细胞中产生针对 survivin 的 siRNA 重组质粒 pshRNA-survivin2 作用于膀胱移行细胞癌细胞株 T24,在基因和蛋白水平均检测到目的基因的抑制作用,为临床上治疗和预防膀胱癌提供了实验基础。

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] 闫　歌, 黄爱龙, 唐　霓, 等. 短发夹状 RNA 抑制 survivin 基因在肝癌细胞中的表达[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(12): 712 - 715.

[3] Wheatley S P, Barrett R M, Andrews P D, *et al*. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis[J]. Cell Cycle, 2007, 6(10): 1220 - 1230.

[4] Ekwall K. The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin[J]. Mol Cell, 2004, 13(3): 304 - 305.

[5] 陈　莹, 钟　玲, 王　勇, 等. RNA 干扰沉默 survivin 基因在抑制卵巢裸鼠移植瘤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 530 - 533.

[6] Altieri D C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(1): 61 - 70.

[7] 杨俊福, 张　辉, 赵亚冰, 等. 膀胱移行细胞癌组织中 KAI1 mRNA 与蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(5): 858 - 860.

[8] Torres V A, Tapia J C, Rodriguez D A, *et al*. E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(21): 7703 - 7717.

(编辑　龙　亮)