文章编号:1000-5404(2008)22-2111-04

论著

RNA干扰survivin基因对K562细胞化疗敏感性的影响及机制

陈 琳[1],徐酉华[1],温贤浩[1],杨 山[1],于 洁[1],戴碧涛[1],李 欣[2] (重庆医科大学儿童医院:[1]血液科,[2]临床检验中心,重庆 400014)

摘 要:目的 应用小分子干扰RNA(siRNA)技术抑制survivin基因的表达,观察其对K562细胞化疗敏感性的影响,为临床白血病治疗提供理论依据。**方法** 实验分为RNA干扰组、脂质体对照组、空白对照组。转染48 h后用RT-PCR法,免疫组化法分别检测survivin在mRNA及蛋白水平的表达;MTT法检测细胞对阿霉素的敏感性;流式细胞仪检测细胞内阿霉素的药物浓度;免疫组化法检测K562细胞中3种耐药相关蛋白P-gp、TOPO-2、GST-π的表达。**结果** ①RNA干扰组K562细胞的survivin基因表达水平明显下降;②RNA干扰组K562细胞对阿霉素敏感性增高;③RNA干扰组K562细胞中阿霉素浓度增高;④RNA干扰组K562细胞耐药蛋白GST-π表达水平下降,而P-gp,TOPO-2的表达与对照组比较无显著差异。**结论** 特异性siRNA能够有效抑制survivin基因的表达,并可能通过降低耐药蛋白GST-π的表达增加K562细胞对阿霉素的敏感性。

关键词: K562细胞;RNA干扰;survivin;阿霉素;耐药蛋白
中图法分类号: R394.3;R73-361;R733.7 **文献标识码:** A

Effect of RNA-silenced survivin gene on sensitivity of K562 cells to adriamycin

CHEN Lin[1], XU You-hua[1], WEN Xian-hao[1], YANG Shan[1], YU Jie[1], DAI Bi-tao[1], LI Xin[2] ([1]Department of Hematology, [2]Center of Clinical Laboratory, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the effects of survivin-targeted small interference RNA (siRNA) on the sensitivity of K562 cell line to adriamycin (ADM). **Methods** K562 cells were divided into three groups: RNA interference (RNAi) group, lipofectamine group and control group. Cell transfection was induced by lipofectamine2000. The expressions of survivin in K562 cells were assayed 48 h after transfection by RT-PCR and immunohistochemical methods. The protein levels of P-glycoprotein (P-gp), TOPO-2, GST-π were detected using immunohistochemical methods. The sensitivity of K562 cells to ADM was determined by MTT and flow cytometry. **Results** After transfection with recombinant plasmid pshRNA-survivin, the mRNA and protein expressions of survivin in K562 cells were decreased significantly ($P<0.05$). The sensitivity of K562 cells to ADM was increased in RNAi group as compared with lipofectamine group and control group ($P<0.05$). The protein level of GST-π expression was significantly lower in RNAi group than those in the other two control groups ($P<0.05$). **Conclusion** Survivin-targeted RNA interference can increase the sensitivity of K562 cells to ADM, probably by decreasing the expression of GST-π.

Key words: K562 cells; RNA interference; survivin; ADM; drug resistance-protein

克服白血病细胞的多药耐药性(MDR)是当今白血病治疗中的一个热点和难点。MDR的发生机制主要包括多种耐药相关基因的表达异常。survivin是新近发现的一种细胞凋亡抑制蛋白,选择性地在肿瘤组织中表达而在正常组织中不表达,推测与肿瘤的发生、发展有关[1]。大量研究表明,survivin基因参与的细胞凋亡与细胞有丝分裂的调控作用和肿瘤多药耐药性密

基金项目:重庆市教委科研基金(X3004-020050033)
Supported by the Funds by Chongqing Municipal Education Committee (X3004-020050033)
作者简介:陈 琳,女,四川南充市人,硕士,医师,主要从事儿童血液肿瘤的诊治方面的研究。E-mail:bonnie_474@yahoo.com.cn
通信作者:徐酉华,E-mail:xuyouhua54@163.com
收稿日期:2007-11-01;修回日期:2008-03-27

切相关[2,3]。本研究拟采用 RNA 干扰技术探讨 survivin 与白血病细胞多药耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组质粒 pshRNA-survivin[4] 由重庆医科大学感染分子实验室惠赠。人红白血病细胞株 K562 由重医儿研所外科实验室保存。RPMI1640 培养基及胎牛血清为 Gibco 公司产品,TRIzol 及 RT-PCR 其他相关试剂购自 TaKaRa 公司,脂质体 lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品,survivin 兔抗人多克隆抗体,p-gp,TOPO-2,GST-π 多克隆抗体,S-P 免疫组化试剂盒为福州迈新公司产品。阿霉素购自浙江海正公司。

1.2 重组质粒

重组质粒 pshRNA-survivin 的 shRNA 序列(编码基因 191-211)为,正义链:5′-TCGAGCTGAGAACGAGCCAGACTTGTTAGTACTCAAGTCTGGCTCGTTCTCAGTTTTT-3′,反义链:5′-CTAGAAAAACTGAGAACGAGCCAGACTTGAGTACTAACAAGTCTGGCTCGTTCT-CAGC-3′。经过筛选及测序分析证实目的 DNA 片断克隆入 pTZU6 +1 载体。

1.3 细胞培养

以人红白血病细胞株 K562 为研究对象,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37°C,5% CO_2 条件下培养,观察细胞生长情况,每 2 ~ 3 天传代。

1.4 特异性 siRNA 的转染

我们应用脂质体 lipofectamine 2000 作为 siRNA 的转染介质,选择 siRNA 终浓度为 4 μg/ml 进行研究。实验分为 3 组:RNA 干扰组(RNAi 组)、脂质体对照组、空白对照组(空白组)。每组均设 3 复孔。为确保转染效率,取生长状态良好并处于对数生长期的 K562 细胞,转染前行细胞计数,用 1640 无血清培养基洗细胞 1 次,将细胞稀释至 $1.0\times10^6\,ml^{-1}$,于 6 孔板每孔接种 3.0×10^5 个细胞,在脂质体介导下进行重组质粒的转染(操作见试剂盒说明书)。脂质体组加相同量的细胞、培养液及脂质体,未加重组质粒;空白组加相同量的细胞及培养液,未加脂质体及重组质粒。各组其他处理条件完全相同,于 37 ℃,5% CO_2 孵育 6 h 后,每组加入终浓度为 10% 的胎牛血清,继续培养 48 h。

1.5 RT-PCR 法检测 survivin mRNA 的表达

提取各组细胞总 RNA,取 1 μg 进行逆转录,PCR 扩增 survivin 基因和内参 β-actin 基因。survivin 引物序列:正义链为 5′-CCACTTCCAGGGTTTATTCC-3′;反义链为 5′-CCACACGCTTC-CTATCACTC-3′,扩增片断长度为 697 bp。β-actin 引物序列:正义链为 5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′;反义链为 5′-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT-3′。扩增片断长度为 394 bp。反应条件:94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min,30 个循环。

1.6 免疫组化法检测 survivin 蛋白的表达

采用 S-P 法进行免疫组织化学染色。PBS 作阴性对照。阳性结果的判断采用染色强度及阳性细胞数进行评分。染色强度分为 4 级:阴性(0 分)、淡黄色(1 分)、黄色(2 分)、棕黄色(3 分);阳性细胞数分为 5 级:<5% (0 分)、6% ~25% (1 分)、26% ~50% (2 分)、51% ~75% (3 分)、>75% (4 分);随机计数 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,计算阳性细胞率。两者的乘积作为最终的结果判断:0 分(-)、1 ~4 分(+)、5 ~8 分(++)、9 ~12 分(+++)。

1.7 MTT 检测 K562 细胞对阿霉素的敏感性

实验分 2 组:对数生长期的 K562 细胞、经过 siRNA 转染 48 h 的 K562 细胞,分别加入 96 孔培养板中,每孔 100 μl,含 1.0×10^4 个细胞。分别加入阿霉素使终浓度为 0 μg/ml(对照组)、0.1、0.2、0.5、1、2、4 μg/ml 的 RPMI1640 培养液。每个剂量组设 3 复孔。在 5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后,每孔中加入 MTT (5 mg/ml)20 μl,继续培养 4 h,弃去培养液,再加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,微量震荡约 10 min,于自动酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度值[D(450)],并计算抑制率。

抑制率(%) = [对照孔 D(450)值 - 实验孔 D(450)值/对照孔 D(450)] ×100%。

1.8 流式细胞仪检测细胞内阿霉素的药物浓度

将经过 siRNA 转染 48 h 后的细胞按 $1.0\times10^6\,ml^{-1}$ 细胞浓度与 0.2 μg 的 ADM 37 ℃共同孵育 1 h 后,冰浴终止 ADM 的作用。用流式细胞仪检测细胞内 ADM 稳态积累量。

1.9 免疫组化法检测 p-gp、TOPO-2、GST-π 的表达

采用 S-P 法进行免疫组织化学染色,PBS 作阴性对照,阳性结果的判断同 1.6。

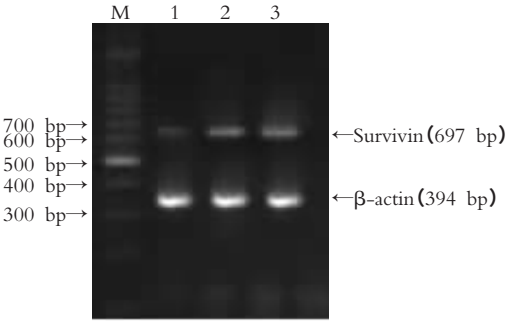
1.10 统计学处理

用 SAS 9.0 统计学软件进行秩和检验,组内两两比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 重组质粒特异性抑制 survivin 在 K562 细胞的表达

2.1.1 survivin mRNA 表达 RT-PCR 结果显示,转染重组质粒组细胞 survivin mRNA 表达显著低于其他两对照组(图 1)。



M:标准;1:RNA 干扰组;2:脂质体对照组;3:空白对照组

图 1 survivin mRNA 的表达情况

2.1.2 survivin 蛋白表达 survivin 表达阳性细胞可见胞质或胞核被染成棕黄色(图 2)。RNA 干扰组 survivin 蛋白表达降低(表 1),其他各组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。其他两组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1　survivin 和 3 种耐药蛋白的表达($n=20$)

组别	Survivin				p-gp				TOPO-2				GST-π			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++	−	+	++	+++	−	+	++	+++
RNAi 组	4	10	5	1[a]	16	4	0	0	5	12	3	0	6	9	3	2[a]
脂质体对照组	0	4	9	7	15	5	0	0	7	12	1	0	2	7	7	4
空白对照组	1	4	9	6	16	4	0	0	8	11	1	0	3	5	9	3

a：$P<0.05$,与另两组比较

2.2　重组质粒对 K562 细胞对阿霉素敏感性的影响

浓度 0.2 μg/ml 以下的 ADM 对 K562 细胞的抑制较弱,随着浓度提高而抑制作用明显增强,活细胞比率逐渐下降(表 2)。$P<0.05$,提示 2 组间差异有统计学意义。RNA 干扰组 K562 细胞对阿霉素敏感性增高。

2.3　流式细胞仪检测 K562 细胞内阿霉素浓度

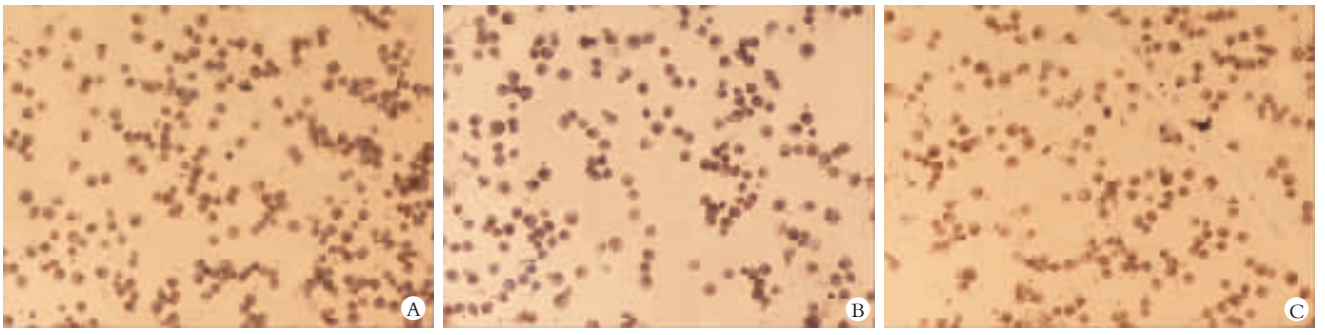
阿霉素在各组 K562 细胞中的浓度由阿霉素在细胞内的荧光强度表示。RNA 干扰组 K562 细胞内阿霉素浓度(120.71 ± 2.01)较两对照组[脂质体对照组(75.47 ± 3.55),空白对照组(73.54 ± 2.19)]增高,差异有统计学意义($P<0.05$),两对照组比较,无统计学意义($P>0.05$)。

2.4　3 种耐药蛋白的表达

p-gp 表达于 K562 细胞的细胞膜,从表 1 可见,在 K562 细胞中表达低,3 组间表达差异无统计学意义;RNA 干扰组中 TOPO-2 表达高于两对照组,但经检验差异无统计学意义($P>0.05$);RNA 干扰组 GST-π 明显低于两对照组($P<0.05$),提示针对 survivin 的 RNA 干扰组的 GST-π 表达降低。

3　讨论

白血病是造血系统的恶性增生性疾病,目前以联合化疗为主的综合治疗使白血病的治疗取得了令人瞩目的成绩,但仍有很多患者因化疗失败而死亡。白血病细胞产生的耐药性是导致白血病化疗失败、复发的重要原因之一。肿瘤的耐药与多种耐药蛋白密切相关,而肿瘤细胞内高度表达凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成员,有助于耐药性的形成[5]。



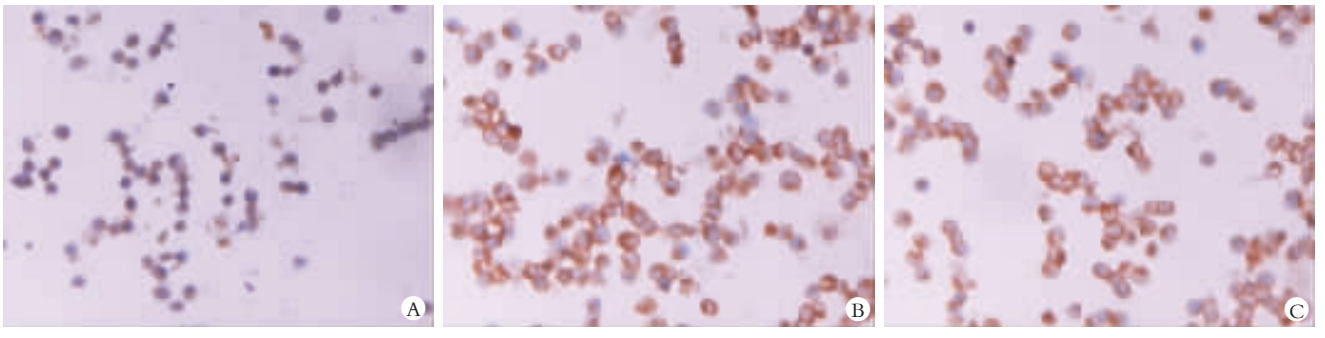
A:RNAi 组; B:脂质体对照组; C:空白对照组

图 2　survivin 蛋白在 K562 细胞中的表达　(S-P×400)

表 2　不同浓度 ADM 作用对 K562 细胞的抑制率(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	0.1 μg/ml	0.2 μg/ml	0.5 μg/ml	1 μg/ml	2 μg/ml	4 μg/ml
空白对照组(%)	17.56 ± 0.89	33.74 ± 1.36	50.32 ± 0.84	62.11 ± 2.03	67.55 ± 2.14	88.36 ± 1.47
RNAi 组(%)	21.23 ± 1.02[a]	42.61 ± 0.97	58.33 ± 1.61	63.05 ± 1.58	70.28 ± 1.89	89.94 ± 2.03

a：$P<0.05$,与空白对照组比较



A:RNAi 组;B:脂质体对照组;C:空白对照组

图 3　GST-π 在 K562 细胞中的表达　(S-P×400)

本研究选用的基因是凋亡抑制基因 survivin。survivin 是 IAP 家族的新成员，位于染色体 17q25，全长 14.7 kb，含有 3 个内含子和 4 个外显子，只含有一个半胱氨酸/组氨酸的杆状病毒重复区序列（baculovirus IAP repeat，BIR），无锌指结构，编码由 142 个氨基酸组成的相对分子质量约为 16.5×10^3 的胞质蛋白。survivin 不仅具有抑制凋亡的功能，而且参与细胞增殖分化及细胞周期的调控。研究表明，survivin 参与肿瘤细胞的耐药[6]。在肿瘤细胞内，这些抑制蛋白水平升高是肿瘤细胞逃避抗癌药物杀伤作用的原因之一[7,8]。Survivin 广泛表达于多种肿瘤组织，在白血病患者和白血病细胞株中也有高表达。

我们应用针对 survivin mRNA 的 siRNA 重组质粒，通过脂质体转染 K562 细胞，观察重组质粒对 survivin 表达的影响，进而观察 survivin 过度表达被拮抗后细胞对阿霉素的敏感性的变化，以了解 survivin 在白血病化疗中与耐药的关系。RT-PCR、免疫组化等证实上述重组质粒可在 mRNA 及蛋白水平显著抑制 survivin 的表达。RNA 干扰组 K562 细胞对阿霉素敏感性增高，细胞内阿霉素药物浓度较对照组明显增高。结合 survivin 的生物学特性，考虑 RNA 干扰组 K562 细胞对阿霉素敏感性增高可能与以下两者相关：①减少 survivin 所致的肿瘤自发性凋亡及化疗诱导的凋亡抑制[1]；②细胞内阿霉素浓度增高。多种耐药相关蛋白可影响化疗药物在细胞内的浓度，从而导致肿瘤细胞的耐药。

P-gp、GST-π 和 TOPO2 3 种耐药相关蛋白是肿瘤细胞耐药的主要因素，我们检测其在 K562 细胞的表达情况，并与针对 survivin 基因的 RNA 干扰组 K562 细胞的耐药蛋白表达进行对比，拟揭示其与 survivin 的表达有无相关性，从而进一步了解影响 K562 细胞对化疗药物敏感性的因素。P-gp 由位于第 7 号染色体上的 mdrl 基因编码，是一种相对分子质量为 170×10^3 的膜转运蛋白，具有药泵作用，其高表达是耐药的主要机制。免疫组化检测显示 p-gp 在 K562 细胞中表达低，在 3 组间无明显差异，提示重组质粒 pshRNA-survivin 对 p-gp 在 K562 细胞的表达影响小。谷胱甘肽-S-转移酶（GST）能与亲脂性细胞毒性药物结合，增加其水溶性，促进药物排泄，致使化疗效果不佳，其在不少肿瘤中均有明显的基因扩增和表达水平增高从而导致肿瘤耐药。RNA 干扰组 GST-π 表达较两对照组明显降低。提示抑制 survivin 表达可能降低 GST-π 蛋白表达从而导致细胞内阿霉素浓度提高，增强 K562 细胞对化疗药物阿霉素的敏感性，进一步加强药物对 K562 细胞的杀伤作用。拓扑异构酶（TOPO）是 DNA 复制和转录所需的基本核酶，是耐药的负调节蛋白，药物通过该酶与 DNA 交链形成共价复合物，引起 DNA 永久性损伤，导致肿瘤细胞凋亡，其活性下降，耐药产生[9]。其在 RNA 干扰组的 K562 细胞表达较高，但与两对照组比较无显著差异，提示重组质粒 pshRNA-survivin 对 TOPO2 在 K562 细胞的表达影响小。故 RNA 干扰组 K562 细胞对阿霉素的敏感性增加的机制之一可能是抑制 survivin 表达导致的耐药蛋白 GST-π 表达降低。

由此可见，survivin 基因是 K562 细胞耐药相关的基因，RNA 干扰 survivin 基因可提高 K562 细胞对化疗药物的敏感性，survivin 可作为白血病基因治疗的靶点。

参考文献：

[1] Li Q X, Zhao J, Liu J Y, *et al*. Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 860－866.

[2] Olie R A, Simoes-Wust A P, Baumann B, *et al*. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2805－2809.

[3] Blanc-Brude O P, Mesri M, Wall N R, *et al*. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2683－2692.

[4] 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.

[5] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone M G. Survivin as a target for new anticancer interventions[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360－372.

[6] 马 荣，陈曦海，张岂凡，等. 反义 survivin 核酸增强胃癌细胞对多西他赛敏感性及其逆转耐药机制的探讨[J]. 中华肿瘤杂志，2007，29(2)：89－92.

[7] Lopes R B, Gangeswaran R, McNeish I A, *et al*. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy[J]. Int J Cancer, 2007, 120(11): 2344－2352.

[8] 赵守魁，范正军，王艳瑛，等. 肝细胞癌组织中脆性组氨酸三联体和 Survivin 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2008，43(3)：557－560.

[9] Williams A O, Isaacs R J, Stowell K M. Down-regulation of human topoisomerase Iialpha expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions[J]. BMC Mol Biol, 2007, 8: 36.

（编辑 王 红）