文章编号:1000-5404(2009)11-1053-04

论著

survivin基因沉默对腺样囊性癌细胞生长和凋亡的影响

汪 欣,杨 军,许 波,熊 宇,张从纪 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨RNA干扰下调survivin基因表达后腺样囊性癌细胞生物学行为变化及其与caspase-3基因表达的相关性。**方法** 设计、合成小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA),构建表达载体pGenesil-shRNA-survivin,将重组质粒导入人腺样囊性癌ACC-2细胞株,G418筛选阳性克隆。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blot分别检测转染后的ACC-2细胞中survivin、caspase-3 mRNA及蛋白表达的变化,用噻唑蓝(MTT)法检测细胞的增殖,原位细胞凋亡(TUNEL)法及透射电子显微镜研究细胞凋亡。**结果** 测序证实表达载体构建成功,在pGenesil-shRNA-survivin的ACC-2细胞株中,survivin mRNA及蛋白表达明显降低($P<0.05$),caspase-3 mRNA及蛋白表达明显增加($P<0.05$),survivin与caspase-3的mRNA和蛋白表达呈显著负相关($r=-0.333$, $P<0.05$)。ACC-2细胞增殖受到抑制,透射电镜及TUNEL法可见细胞出现凋亡。**结论** 成功构建了survivin基因的RNAi真核表达载体,pGenesil-shRNA-survivin重组质粒能有效抑制腺样囊性癌细胞生长。

关键词:RNA干扰;腺样囊性癌细胞株;survivin;caspase-3
中图法分类号:R394.2;R73-362;R730.23 **文献标识码**:A

Effects of survivin gene silencing on growth and apoptosis of adenoid cystic carcinoma cell line

WANG Xin, YANG Jun, XU Bo, XIONG Yu, ZHANG Cong-ji (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of survivin down-regulation on the biological behavior of adenoid cystic carcinoma cells and the relationship with caspase-3. **Methods** Small interfering RNA (siRNA) was designed and synthesized for the construction of eukaryotic expression vector pGenesil-shRNA-survivin. The recombinant plasmid was transfected into ACC-2 cells. The positive clones were screened with G418. The expressions of survivin and caspase-3 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot. The proliferation of adenoid cystic carcinoma cells was detected by MTT. Cell apoptosis was detected by TUNEL assay and transmission electron microscopy. **Results** The recombinant plasmid was successfully constructed. Down-regulation was found in the expressions of survivin mRNA and protein ($P<0.05$), but up-regulation in the expressions of caspase-3 mRNA and protein ($P<0.05$). There was a negative correlation between the mRNA and protein expression of caspase-3 and survivin ($r=-0.333$, $P<0.05$). ACC-2 cell proliferation was inhibited. TUNEL assay and transmission electron microscopy showed typical apoptosis of cells. **Conclusion** The RNAi eukaryotic vector pGenesil-shRNA-survivin was constructed successfully. Recombinant plasmid pGenesil-shRNA-survivin can inhibit the proliferation of adenoid cystic carcinoma cells.

Key words: RNA interference; adenoid cystic carcinoma cells line; survivin; caspase-3

凋亡抑制蛋白Survivin由于其组织表达特异性而受到广泛的关注,目前认为其可能参与调控细胞的增殖、分裂,抑制细胞凋亡,参与肿瘤血管形成。半胱氨酸酶(Caspase)是细胞凋亡的核心机制,Survivin主要通过与Caspase直接或间接作用以实现对细胞凋亡的抑制,通过直接抑制凋亡终末效应器Caspase-3和Caspase-7的活性,阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程。在前期的研究中,我们发现survivin在腺样囊性癌细胞中高表达[1],survivin的过度表达可抑制肿瘤细胞凋亡,调节细胞周期,促进血管形成。RNA干扰是

基金项目:重庆市自然科学基金(2007BB5064)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5064)
作者简介:汪 欣,女,安徽省黄山市人,硕士研究生,医师,主要从事颌面外科方面的研究。E-mail:aaron_wang8@hotmail.com
通信作者:杨 军,电话:(023)68754439
收稿日期:2008-09-04;修回日期:2008-11-17

一种经济、快捷、高效的抑制基因表达的技术手段,本实验采用 RNA 干扰技术特异性沉默腺样囊性癌细胞株 ACC-2 中 survivin 的表达。通过构建 survivin 基因的小干扰 RNA(small interfere RNA,siRNA)真核表达载体,观测其沉默作用,探讨应用 RNA 干扰调控 survivin 的可能性,探索促进肿瘤治疗的新策略,为进一步实验提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料和试剂 人腺样囊性癌细胞株 ACC-2 由成都四川大学华西医学中心细胞生物学教研室提供,质粒 pGenesil-1 购自武汉晶赛生物工程技术有限公司,阴性对照质粒(将选中的 siRNA 序列打乱并与其无同源性的质粒)由西南医院烧伤科实验室苏踊跃博士馈赠。DOTAP 为 Rochf 公司产品,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为 TOYOBO 公司产品,一抗兔抗人 survivin 多克隆抗体、二抗羊抗兔抗体均购自北京中杉金桥公司,RT-PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.2 模板 DNA 选取 3 条符合条件的 19 nt 的 siRNA 靶序列,设计出相应的 2 条反向重复序列:5′-GATCGGCATCTCTACATTCAAGAATTCAAGACGTTCTTGAATGTAGAGATGCTTTTTTA-3′ 和 3′-CCGTAGAGATGTAAGTTCTTAAGTTCTGCAAGAACTTACATCTCTACGAAAAAATTCGA-5′; 5′-GATCGGAAGCAGTTTGAAGAATTATTCAAGACGTAATTCTTCAAACTGCTTCTTTTTTTA-3′和 3′-CCTTCGTCAAACTTCTTAATAAGTTCTGCATTAAGAAGTTTGACGAAGAAAAAATTCGA-5′;5′-GATCGGAAGAAAGAATTTGAGGAATTCAAGACGTTCCTCAAATTCTTTCTTCTTTTTTA-3′和 3′-CCTTCTTTCTTAAACTCCTTAAGTTCTGCAAGGAGTTTAAGAAAGAAGAAAAAATTCGA-5′。DNA 链的结构为 *Bam*H Ⅰ + 正义链 + Loop + 反义链 + 终止序列 + *Hind* Ⅲ(上海英骏生物公司合成)。上述 DNA 链退火后与质粒载体 pGenesil-1 连接。

1.2 方法

1.2.1 靶向 survivin 的 siRNA 表达载体的构建及鉴定[2-4]

用 T_4 连接酶将退火核苷酸与 pGenesil-1 连接后转化入大肠杆菌 DH5α,挑选卡那霉素抗性菌落并扩增培养,然后小量制备质粒并测序(由上海生工生物工程技术服务有限公司测序)。

1.2.2 细胞转染及鉴定 实验分为空白对照组、阴性对照组、siSurvivin-1 组、siSurvivin-2 组、siSurvivin-3 组。以脂质体包裹 pGenesil-shRNA-survivin 质粒和阴性对照质粒,室温下孵育 15 min,加入无血清 RPMI1640 培养的 ACC-2 细胞中,37 ℃、5% CO_2 孵箱中孵育,10 h 后换为含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养。载体 pGenesil-1 及其衍生质粒因携带增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因表达框,导入细胞后会呈现绿色荧光,转染 24 h 后,通过荧光显微镜观察结果。

1.2.3 转染细胞的筛选 转染后 24 h,在培养基中加入 G418 700 μg/ml,同时用未转染的细胞作对照,7 d 后将 G418 浓度更换为 300 μg/ml,40 d 后抗性克隆形成。

1.2.4 ACC-2 细胞中 survivin 和 caspase-3 mRNA 的变化 将筛选出的细胞用 Tripure 裂解液裂解细胞,采用 RT-PCR 试剂盒检测 survivin 和 caspase-3 mRNA 的表达量。PCR 产物 2 μl,2% 琼脂糖凝胶电泳。以 survivin 和 caspase-3 与内参吸光度值的比值来反映其相对含量。

1.2.5 ACC-2 细胞中 Survivin 和 Caspase-3 蛋白的变化 将筛选出的细胞收集,提取总蛋白,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Survivin 和 Caspase-3 蛋白的变化,采用增强化学发光技术在凝胶成像仪上扫描条带,结果以其和内参 β-actin 吸光度值的比值来反映其相对含量。

1.2.6 噻唑蓝(MTT)法观察细胞生长活性 将各实验组的 ACC-2 细胞进行细胞计数,以 2×10^3/孔接种于 96 孔板,每个组别设 3 个复孔。分别于转染后 24、48、72 h,加入 20 μl MTT 继续培养 4 h,弃去培养基,每孔加二甲基亚砜 150 μl,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光度值[D(570)],记录结果。通过计算细胞吸光度值来比较各组间的差别。

1.2.7 透射电镜观察 收集对数生长期细胞,转移到 EP 管中,用电镜专用戊二醛固定,送第三军医大学中心实验室电镜室检测。

1.2.8 TUNEL 检测细胞凋亡的变化 采用 TUNEL 检测试剂盒进行常规检测,用抗荧光淬灭封片液封片后在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理

实验资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 靶向 survivin 的 siRNA 表达载体的构建及 pGenesil-shRNA-survivin 稳定转染 ACC-2 细胞株的鉴定

将重组质粒 pGenesil-shRNA-survivin 进行序列分析,测序结果与设计的插入片段完全匹配,表明 pGenesil-shRNA-survivin 表达载体构建成功。

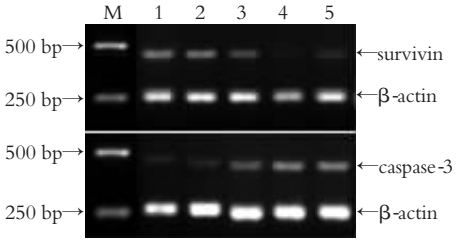
pGenesil 载体由 Clontech 公司的 pEGFP-C1 改建而来,转染后通过 EGFP 表达,可以直观地了解转染效率。本实验采用 DOTAP 转染试剂,优化转染条件,ACC-2 细胞转染 24 ~ 48 h 后,细胞的转染效率超过 60%。经 G418 筛选后获得单克隆细胞。

2.2 pGenesil-shRNA-survivin 转染对靶基因的抑制效率

半定量 RT-PCR 结果显示:空白对照组与阴性对照组 survivin 表达明显高于处理组,各组相对表达强度分别为空白对照组:(1.00 ± 0.33),阴性对照组:(0.87 ± 0.39),siSurvivin-1 组:(0.76 ± 0.30),siSurvivin-2 组:(0.27 ± 0.09),siSurvivin-3 组:(0.34 ± 0.10)。统计学分析表明,ACC-2 细胞转染 siRNA 后 survivin mRNA 的表达受到了明显的抑制($P < 0.05$),其中 siSurvivin-2 组表现最为明显。阴性对照组质粒转染进 ACC-2 细胞后对 survivin mRNA 的表达与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

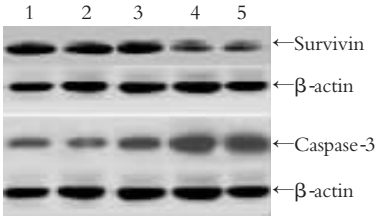
Western blot 结果及相对密度分析表明 Survivin 各组条带表达强度分别为空白对照组:(1.00 ± 0.31),阴性对照组:

(0.97 ± 0.35),siSurvivin-1 组:(0.82 ± 0.40),siSurvivin-2 组:(0.36 ± 0.08),siSurvivin-3 组:(0.47 ± 0.11)。统计学分析表明 pGenesil-shRNA-survivin 转染后 Survivin 蛋白的表达受到了明显抑制,其中 siSurvivin-2 组表现最为明显($P < 0.05$,图 2)。



M:DNA 标准(DL 2000);1:空白对照组;2:阴性对照组;3:siSurvivin-1 组;4:siSurvivin-2 组;5:siSurvivin-3 组

图 1　实验各组 survivin、caspase-3 mRNA RT-PCR 产物电泳图



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:siSurvivin-1 组;4:siSurvivin-2 组;5:siSurvivin-3 组

图 2　实验各组 Survivin 、Caspase-3 蛋白印迹杂交结果

2.3　pGenesil-shRNA-survivin 转染对 Caspase-3 的影响

半定量 RT-PCR 结果显示:空白对照组与阴性对照组 caspase-3 表达明显低于处理组,各组相对表达强度分别为空白对照组:(1.00 ± 0.28),阴性对照组:(0.69 ± 0.22),siSurvivin-1 组:(0.96 ± 0.36),siSurvivin-2 组:(1.35 ± 0.43),siSurvivin-3 组:(1.12 ± 0.46)。统计学分析表明,ACC-2 细胞转染 siRNA 后 caspase-3 mRNA 的表达明显增多($P < 0.05$),其中 siSurvivin-2 组表现最为明显。阴性对照组质粒转染进 ACC-2 细胞后对 caspase-3 mRNA 的表达与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

Western blot 结果及相对密度分析表明 Caspase-3 各组条带表达强度分别为空白对照组:(1.00 ± 0.30),阴性对照组:(0.96 ± 0.27),siSurvivin-1 组:(0.94 ± 0.38),siSurvivin-2 组:(1.89 ± 0.66),siSurvivin-3 组:(1.68 ± 0.69)。统计学分析表明 pGenesil-shRNA-survivin 转染后 Caspase-3 蛋白的表达明显增多,其中 siSurvivin-2 组表现最为明显($P < 0.05$,图 2)。

2.4　细胞生长活性测定

质粒转染后 24、48、72 h,实验各组细胞光密度值见表 1,结果表明转染 siSurvivin-2 组的细胞生长出现了明显的抑制($P < 0.05$)。

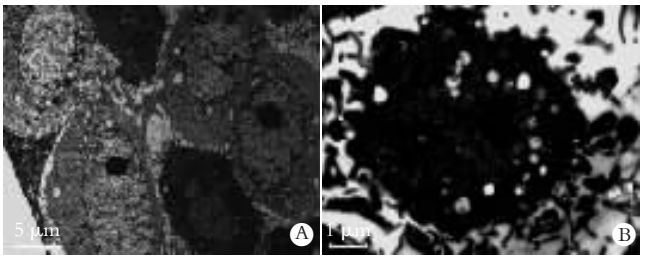
表 1　质粒转染后不同时间各组细胞生长活性的比较[$D(570)$, $\bar{x} \pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
siSurvivin-2 组	0.213 ± 0.009	0.249 ± 0.017	0.313 ± 0.015
阴性对照组	0.232 ± 0.017	0.326 ± 0.029[a]	0.515 ± 0.017[a]
空白对照组	0.229 ± 0.016	0.353 ± 0.016[a]	0.536 ± 0.009[a]

a:$P < 0.05$,与 siSurvivin-2 组比较

2.5　透射电镜观察结果

空白对照组图片可见细胞呈多形性,大小不一,细胞膜表面有丰富的微绒毛,细胞核大,细胞器无明显肿胀;siSurvivin-2 组细胞图片显示,微绒毛样突起变粗大,脱落,线粒体肿胀明显,细胞核染色质固缩,核膜皱褶,细胞质浓缩,提示细胞凋亡(图 3)。

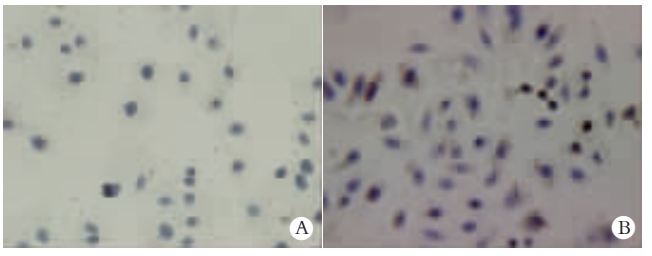


A:空白对照组 ;B:siSurvivin-2 组

图 3　ACC-2 细胞稳定转染 pGenesil-shRNA-siSurvivin-2 质粒后电镜观察结果

2.6　TUNEL 检测结果

从实验结果图可见:空白对照组细胞形态基本无变化,无着色;siSurvivin-2 组多数细胞核皱缩成圆形并均一呈棕黄染色(图 4)。



A:空白对照组;B: siSurvivin-2 组

图 4　ACC-2 细胞稳定转染 pGenesil-shRNA-siSurvivin-2 质粒后 TUNEL 检测结果　(×100)

2.7　Caspase-3 和 Survivin 在腺样囊性癌组织中表达的相关性

在 ACC-2 细胞中, Caspase-3 和 Survivin 的蛋白表达呈显著负相关($r = -0.333$,$P < 0.05$)。

3　讨论

涎腺腺样囊性癌是一种恶性程度较高的肿瘤,对于放疗、化疗均不敏感,目前仍以手术治疗为主,但仍发现许多手术后远处转移的病例,因而寻找更为有效的治疗手段至关重要。凋亡抑制因子 Survivin 自发现以来由于其组织表达特异性而备受研究者关注,它特异地表达于人和鼠的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞。据文献[5-8]报道,Survivin 在多种恶性肿瘤组织中呈高表达,包括乳腺癌、肺癌、前列腺癌、直肠癌、胰腺癌、胃癌、子宫内膜癌、神经纤维瘤和淋巴瘤等,但不表达于正常组织。在前期的研究中,我们发现 survivin 在腺样囊性癌细胞中高表达[1],它的高水平表

达常常同肿瘤的预后不良、高复发、耐药以及减少的细胞凋亡指数密切相关[9]。

天冬氨酸特异性的半胱氨酸酶(Caspase)是一组细胞凋亡蛋白酶。在正常情况下,Caspase 活化酶的严格底物特异性和高度有效性确保了在细胞凋亡过程中发生专一性的蛋白水解,即 Caspase 以一种和谐的方式选择地剪切一组蛋白质,导致其功能的丧失或结构变化,以至发生细胞凋亡反应。当 Caspase 的活性受到抑制而引起细胞凋亡障碍,即细胞凋亡与增殖之间平衡失调时,就可能引起多种肿瘤的发生、发展。Caspase-3 是已知该家族成员中执行凋亡的关键酶之一。Caspase-3 正常以酶原(32×10^3)的形式存在于细胞质中,在凋亡的早期阶段,它被激活,活化的 Caspase-3 由 2 个大亚基(17×10^3)和 2 个小亚基(12×10^3)组成,2 种亚基再组成活性形式的 Caspase-3,裂解相应的细胞质、细胞核底物,最终导致细胞凋亡。现在一般认为 Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,也是细胞杀伤机制(CTL)的重要组成部分。Survivin 主要是通过直接抑制凋亡终末效应器 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性,阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程[10-12]。有学者在对乳腺癌[13]及膀胱癌[14]的研究中发现 Survivin 的增加与 Caspase-3 的减少显著相关。本实验结果同空白对照组、阴性对照组相比,siSurvivin-2 组 caspase-3 的 mRNA 和蛋白含量明显增多,进一步说明腺样囊性癌细胞转染 survivin siRNA 后,激发 Caspase-3 的活性是导致细胞发生凋亡的关键因素之一。

本研究选用的 pGenesil-1 载体是一种经过优化的 siRNA 表达载体,其带有抗性筛选基因 kana 和绿色荧光蛋白 GFP 指示基因,这样可以更好的对转染效率进行监测,并在以后进一步筛选出稳定表达的细胞株。本研究采用分子克隆技术,成功构建了针对 survivin 基因开放阅读框上 3 个靶位点的 siRNA 重组质粒。经测序比对,完全符合预计,无异常结构和碱基错误。经过转染和筛选,成功筛选出克隆化的 Survivin 沉默的 ACC-2 细胞株,发现 siSurvivin 转染能够高效地抑制 ACC-2 细胞株 survivin mRNA 和蛋白的表达。比较发现,不同的靶位点对目的基因的沉默效应在 mRNA 和蛋白水平上都略有差异,其中 2 号靶点的 siRNA 质粒对 survivin 基因的抑制效率最高。实验结果显示,pGenesil-shRNA-survivin 转染组的 survivin mRNA 和蛋白表达同空白对照组、阴性对照组相比明显受到抑制,而 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达同空白对照组、阴性对照组相比明显增多。MTT、电镜和 TUNEL 的结果显示 ACC-2 细胞的生长活性受到明显抑制,细胞出现了明显的凋亡。

本实验成功构建了 survivin 基因的 RNAi 真核表达载体,survivin 特异性 siRNA 可能通过沉默 survivin 基因的表达,抑制肿瘤的生长,为肿瘤基因治疗的研究打下基础。

参考文献:

[1] 肖 胤,杨 军,肖 林,等. Survivin 基因在人涎腺腺样囊性癌中的表达[J]. 临床口腔医学杂志,2007,23(4):209-211.

[2] 汪 欣,杨 军,许 波,等. siRNA 干扰 Survivin 表达对腺样囊性癌细胞株 ACC-M 的抑制作用[J]. 重庆医学,2008,37(10):1062-1064.

[3] 杨 军,汪 欣,许 波,等. RNA 干扰 Survivin 对腺样囊性癌细胞株 ACC-M 生长的抑制作用[J]. 临床口腔医学杂志,2008,24(4):197-200.

[4] 辛海明,刘泽军,陈 杰,等. iASPP 特异性 RNAi 表达载体的构建及其干扰效果鉴定[J]. 第三军医大学学报,2006,25(9):900-902.

[5] Invernizzi R, Travaglino E, Benatti C, *et al*. Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia [J]. Eur J Haematol, 2006, 76(6): 494-501.

[6] Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, *et al*. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor *via* phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 11018-11025.

[7] Branca M, Giorgi C, Santini D, *et al*. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(1): 113-121.

[8] Kannangai R, Wang J, Liu Q Z, *et al*. Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation [J]. Int J Gastrointest Cancer, 2005, 35(1): 53-60.

[9] Engels K, Knauer S K, Metzler D, *et al*. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker[J]. J Pathol, 2007, 211(5): 532-540.

[10] 虞长春,吴 强,吴正升,等. Caspase-3 和 Survivin 在肝细胞癌中的表达及意义[J]. 安徽医药,2006,10(3):199-200.

[11] Wang Z M, Zhao Z G, Guan X M, *et al*. Expression of Survivin mRNA and Caspase-3 mRNA and their correlation in tongue squamous cell carcinoma[J]. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2007, 16(6): 582-586.

[12] 何 伟,何 巍,曹选平,等. 涎腺腺样囊性癌组织中 P27 及 Ki-67 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2006,43(3):554-556.

[13] Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, *et al*. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(2): 113-120.

[14] Singh R P, Tyagi A, Sharma G, *et al*. Oral silibinin inhibits *in vivo* human bladder tumor xenograft growth involving down-regulation of survivin[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(1): 300-308.

(编辑 王 红)