论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2444-04

应用RNAi技术沉默survivin基因对肾癌786-O细胞的影响

李 戈,王 明 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘 要:目的 运用RNA干扰(RNA interference,RNAi)技术特异性阻断肾癌786-O细胞系中survivin基因的表达,并研究survivin沉默后对786-O细胞的影响。**方法** 用真核转录载体pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR构建针对survivin基因的干扰载体,用脂质体法转染肾癌786-O细胞,通过RT-PCR、免疫组化分别检测survivin基因的mRNA和蛋白水平的表达,MTT法检测细胞生长的影响。**结果** 干扰载体有效地阻断了786-O细胞中survivin基因在mRNA与蛋白水平上的表达,细胞活性受到抑制。**结论** RNAi技术沉默survivin基因可以下调肾癌786-O细胞survivin基因的表达,抑制细胞的活性。

关键词: RNA干扰;survivin;肾癌;基因治疗

中图法分类号: R394-33;R73-362;R737.11 **文献标识码:** A

Silencing survivin gene with RNAi inhibits proliferation of human renal cancer cell line 786-O

LI Ge, WANG Ming (Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effects of RNAi targeting survivin to suppress the expression of survivin and to induce the apoptosis of human renal cancer cell line 786-O. Methods The target gene fragments were cloned into pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR vectors, and then the recombinant eukaryotic expression vectors were transfected into 786-O cells with liposomes. The expression changes in survivin mRNA and protein were detected by RT-PCR and immunohistochemical assay, and the proliferation inhibitory rate (IR) of 786-O cells was detected by MTT assay. Results The mRNA and protein expressions of survivin in the siRNA group were significantly inhibited by the eukaryotic expression vectors, and it also inhibited significantly the growth and proliferation of 786-O cells. Conclusion Silencing survivin gene by the RNAi technique can not only effectively decrease the expressions of survivin gene and protein, but also inhibit the cell proliferation in 786-O cells. This may provide the experimental evidence for the survivin gene as a target of gene therapy in renal cancer.

Key words: RNA interference; surviving; renal cancer; gene therapy

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,但由于绝大多数肾癌为先天多药耐药,除早期肾癌通过手术治疗效果较好外,大多数中晚期肾癌缺乏有效的治疗方法[1],故探明一种对肾透明细胞癌切实有效的治疗方法就显得尤为重要。RNA干扰(RNA interference,RNAi)是近年来发现的一项的可以快速、高效地降解体内特定基因的mRNA,使特定基因沉默的技术,它的出现为肿瘤的基因治疗开辟了一个更广阔的领域。

Survivin是新近发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族中作用最强的凋亡抑制因子,在大多数恶性肿瘤中高表达,不见于正常成熟组织中。它不仅能抑制细胞凋亡,还具有促进细胞增殖的作用。因此,鉴于它的特性使其有望成为理想的肿瘤基因治疗靶点。本研究通过设计合成针对survivin基因的特异性siRNA(small interference RNA),将其转染入肾癌786-O细胞,研究沉默survivin基因后对肾癌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

肾癌786-O细胞购于重庆医科大学超声研究所,四氮甲基唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司,pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR质粒、RPMI1640培养基、Trizol、转染试剂脂质体Lipofectamine2000、无血清培养基Opti-MEM购自美国Invitrogen公司,RT-PCR试剂盒TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0购自大连宝生物工程有限公司,一抗兔抗人survivin多克隆抗体购自美国ABZOOM公司,二抗羊抗兔IgG、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥公司,去内毒素质粒抽提试剂盒

作者简介:李 戈,男,四川省泸州市人,硕士研究生,医师,主要从事肾肿瘤方面的研究。E-mail: haodeheng927@sina.com

通信作者:王 明,电话:(023)89011021

收稿日期:2009-01-15;修回日期:2009-04-22

E.Z.N.A.™Endo-free Plasmid Mini Kit Ⅱ购自 Omega 公司,survivin 特异性干扰片段的合成及其与转录载体的连接由上海英骏生物公司完成。

1.2　方法

1.2.1　siRNA 的设计合成　　根据 siRNA 设计原则[2],使用 Invitrogen 公司提供的在线设计软件(http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress)设计 siRNA 序列:正义链 5′-TGCTG**ACTGGGCCAAGTCTGGCTCGT**GTTTTGGCCACTGAC**TGACACGAGCCACTTGGCCCAGT**-3′,反义链 5′-CCTG**ACTGGGCCAAGTGGCTCGTGTCA**GTCAGTGGCCAAAAC**ACGAGCCAGACTTGGCCCAGT**C-3′。黑体部分为针对 survivin 基因的特异性序列,阴性对照:正义链 5′-TGCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT-3′,反义链 5′-CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCGCAGTACATTTC-3′。经 BLAST 同源性分析后,序列的合成及其与转录载体连接,并转化到大肠杆菌 DH5α 菌株的工作提交 Invitrogen 公司完成。

1.2.2　细胞培养和 siRNA 转染　　将 786-O 细胞置于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,37 ℃、5% 的 CO_2,孵箱内培养至对数生长期。用 0.25% 胰酶消化并调节细胞浓度以 1×10^5/ml 的密度将细胞接种于 6 孔板中。实验分为 siRNA 组、阴性对照组、转染空脂质体组、正常空白对照组。用去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒,并于核酸蛋白检测仪上测定浓度。待种板 24 h 后细胞达到 >80% 的融合时,更换无抗生素、无血清的 RPMI1640 培养基,并参照 Lipofectamine 2000 说明书,每孔用量按质粒 4 μg,脂质体 10 μl,将脂质体分别与质粒在无血清培养基 Opti-MEM 中混合,制成脂质体-DNA 复合物后,转染入细胞。转染 6 h 后,移去培养基,换入新的含有 10% 小牛血清不含抗生素的培养基。

1.2.3　RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达水平　　细胞转染 48 h 后,参照 Trizol 试剂的说明书提取每孔细胞的总 RNA 并定量。各取 0.5 μg 总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA,然后用 survivin 的引物和内参照 β-actin 的引物进行 PCR 扩增。survivin PCR 引物:正义链 5′-GGACCACCGCATCTCTACAT-3′,反义链 5′-TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT-3′,产物长度 344 bp;β-actin PCR 引物:正义链 5′-GGCATGGACGAGCTGTACAA-3′,反义链 5′-CTCTAGATCAACCACTTTGT-3′,产物长度 587 bp,引物由上海生工公司合成。RT-PCR 二步法参照试剂盒的说明书进行,PCR 的扩增条件为:94 ℃变性 2 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 30 次;72 ℃延伸 5 min。PCR 反应结束后,取 10 μl 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,电泳条带用凝胶成像系统扫描后经 Quantity One 软件分析,将各组的 survivin 条带 β-actin 条带灰度值的比值作为 survivin mRNA 的相对表达量。干扰载体对 survivin mRNA 表达的抑制率采用下式计算:抑制率 = [1 - (siRNA 组 survivin 条带灰度/siRNA 组 β-actin 条带灰度)/(空白对照组 survivin 条带灰度/空白对照组 β-actin 条带灰度)] ×100%。

1.2.4　免疫组化检测 survivin 蛋白表达水平　　制备细胞爬片 24 h 后进行转染操作,转染 72 h 后,吸去培养基,PBS 洗 3 次 ×3 min,用 80% 冰丙酮固定 15 min 后,PBS 洗 3 次 ×3 min,用 0.2% Triton X-100 孵育 20 min,PBS 洗 3 次 ×2 min,然后 3% H_2O_2 孵育 15 min 后,PBS 洗 3 次 ×2 min,滴加 1∶100 稀释的一抗兔抗人 survivin 多克隆抗体,37 ℃孵育 1 h,PBS 洗 3 次 ×2 min,滴加二抗,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗 3 次 ×2 min,DAB 染色 5 ~ 10 min(镜下控制),自来水冲洗 3 ~ 5 min 终止反应,然后依次进行脱水、透明、固定。用荧光显微镜(Olympus AX70)观察,每组随机选取 5 个视野照相后,运用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 测量阳性结果的平均光密度光密度,以表示 survivin 蛋白表达的相对强度。

1.2.5　MTT 法检测细胞增殖抑制率　　实验分为 siRNA 组、阴性对照组、转染空脂质体组及空白对照组。将细胞接种于 96 孔板中培养,接种密度为 1×10^5/ml,每组均设置 5 个复孔。接种 24 h 后转染,分别在转染后 24、48、72 h 后弃上清,每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT,继续孵育 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的光密度值[$D(490)$],计算细胞生长增殖的抑制率(inhibition ratio, IR)。

$$IR=[D(490)_{空白对照组}-D(490)_{siRNA组})]/D(490)_{空白对照组}\times100\%$$

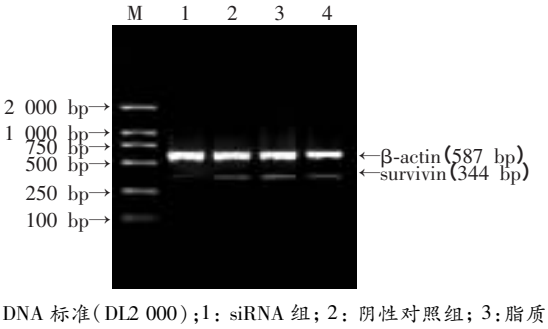
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 14.0 统计软件进行单因素方差分析和 χ^2 检验。

2　结果

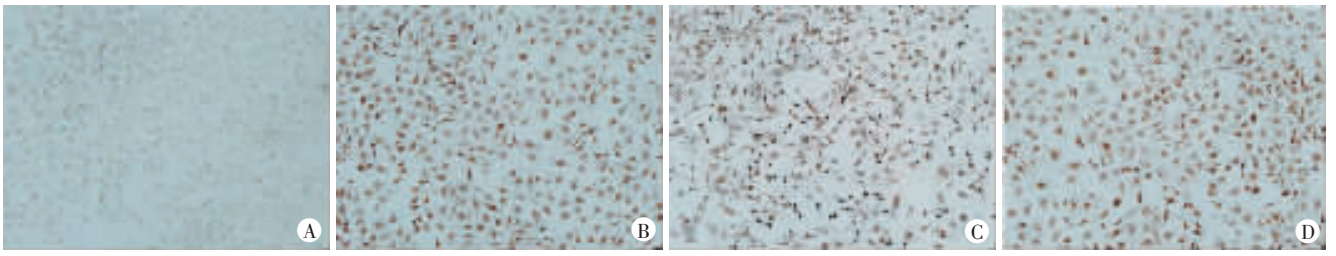
2.1　siRNA 对肾癌 786-O 细胞中 survivin mRNA 的抑制作用

应用 RT-PCR 检测 siRNA 干扰前后 survivin 基因的转录水平差异。4 组细胞所提取的总 RNA 均可见清晰的 28S、18S、5S 3 条带,核酸蛋白仪测得的 $D(260)/D(280)$ 的光密度比值在 1.9 以上。各组 survivin 的 RT-PCR 凝胶电泳结果见图 1,第 1 ~ 4 泳道分别是 siRNA 组、阴性对照组、脂质体组及空白对照组,4 个组在 587 bp 处的 β-actin 条带亮度相当,表达水平无明显差别;在 344 bp 处为 survivin 条带,可见 siRNA 组条带亮度明显弱于其他 3 个组,siRNA 组的 survivin 条带/β-actin 条带灰度值的比值为 0.362 6;阴性对照组、脂质体组及空白对照组的 survivin 条带/β-actin 条带灰度值的比值分别为(0.65 ± 0.023)、(0.624 ± 0.021)、(0.642 ± 0.017)。可见 siRNA 组 survivin mRNA 的表达明显弱于其他组($P<0.05$),抑制率为 43.5%,而其他 3 组间差异无显著性($P>0.05$)。



M: DNA 标准(DL2 000);1: siRNA 组;2: 阴性对照组;3:脂质体组;4:空白对照组

图 1　转染后的 survivin RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果



A:siRNA 组;B:阴性对照组;C:空脂质体组;D:空白对照组

图2 转染后各组细胞爬片免疫组化结果 (S-P×200)

2.2 siRNA 对肾癌 786-O 细胞中 survivin 蛋白表达的抑制作用

采用免疫组化的方法检测各组 survivin 蛋白的表达情况,见图2,survivin 蛋白阳性染色呈棕黄色,以细胞质或伴有细胞核染色为阳性细胞,其中 siRNA 组的颜色明显浅于其他3组,阴性对照组、转染空脂质体组、空白对照组的光密度值分别为(0.249±0.012)、(0.262±0.013)、(0.258±0.015),而 siRNA 组的光密度值为(0.158±0.019),与其他3组比较均有明显差异($P<0.01$),而阴性对照组、转染空脂质体组、空白对照组组间比较差异无显著性($P>0.05$)。

2.3 siRNA 对肾癌 786-O 细胞的增殖抑制作用

经酶标仪测得的各组吸光度值如表1所示:siRNA 组与阴性对照组、转染空脂质体组及空白对照组之间均有显著性差异($P<0.05$)。与阴性对照组及空脂质体组相比,siRNA 组具有明显地细胞增殖抑制效应,并随时间的延长而抑制率增高。

表1 各组细胞转染后不同时间的吸光度值及抑制率比较

组别	24 h		48 h		72 h	
	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)
空白对照组	0.832±0.039	0	1.132±0.049	0	1.567±0.031	0
阴性对照组	0.819±0.032	1.6	1.086±0.065	1.1	1.549±0.022	1.2
空脂质体组	0.821±0.034	1.3	1.116±0.056	1.4	1.539±0.032	1.8
siRNA 组	0.746±0.043	10.3	0.896±0.055	20.8	1.003±0.044	35.9

3 讨论

肿瘤是多因素多个基因相互作用的基因网络调控的结果,单个的癌基因阻断不可能完全抑制或逆转肿瘤的生长。与其他基因治疗方法相比,RNAi 技术具有高特异性[3]、高效性[4]、稳定性等优势。我们可以利用同一基因家族的多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特征而设计针对这一序列的 dsRNA 分子,只引入一种 dsRNA 就可以将多个基因同时剔除,而正常基因不受影响,这就是利用 RNAi 抗肿瘤的基本思路。因此,RNA 干扰用于肿瘤的基因治疗有着巨大的临床应用价值。

作为凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族中的作用最强的凋亡抑制因子,survivin 是目前发现的 IAP 家族中唯一与细胞凋亡和细胞周期调控都相关的因子,并且具有促进血管形成的功能[5,6]。survivin 广泛表达于人类肿瘤组织,而在正常分化成熟的组织中几乎不表达。近期研究表明,在全球近400万的基因转录表达分析中,survivin 基因是肿瘤组织中表达上调最为普遍的基因,其表达与肿瘤的恶性程度、侵袭性及预后密切相关,可使肿瘤细胞对治疗的敏感性降低。由于肾癌绝大多数为先天多药耐药,大多数中晚期肾癌缺乏特异性的疗法。Mahotka 等[7]最早研究了 survivin 在肾癌的表达,发现其在肾癌有两个剪变体,即 survivin-DeltaEx3 和 survivin-2B,并且肾细胞癌均表达 survivin-DeltaEx3、survivin-2B 和 survivin,以 survivin 为主,survivin-DeltaEx3 和 survivin 的表达与肿瘤分级无关,survivin-2B/survivin 的比率与肿瘤分级呈负相关。朱李兵等[8]研究发现,无论是 survivin 基因还是 survivin 蛋白,在肾透明细胞癌中均有较高的表达,而在正常组织中无表达,其表达与性别、年龄、肿瘤大小等无明显关系,而与病理分级、临床分期、有无淋巴结转移密切相关。Parker 等[9]研究表明,作为一个独立的预后指标,survivin 在肾癌中的表达与肾癌的进展有着显著的联系,与低表达水平的患者相比,高表达的患者其死亡率显著增加。Zamparese 等[10]也证明了 survivin 在肾癌组织中的高表达,且其高表达与肾癌的低分化、高恶性和高侵袭性密切相关。郑骏年等[11]研究发现 Ki67 siRNA 能抑制人肾癌 786-O 细胞 Ki67 基因的表达,从而抑制其增殖促进其凋亡。Sato 等[12]运用 survivin siRNA 减少 survivin 的表达后抑制了肾癌细胞 KU19~20 的增殖。由于基因表达仅限于肾脏本身,其合成的蛋白产物也主要集中在肾脏局部,因此,肾脏是理想的基因治疗靶器官。正是由于 survivin 在肾癌中有较高的表达,而在正常组织中无表达,其表达可能是肾癌发生的重要因素之一,因此,survivin 可能成为肾脏肿瘤基因治疗的新靶点,使得应用靶向 survivin 的阻断基因治疗促进肾癌肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤疗法成为可能。

我们在实验设计中针对 survivin 基因3个剪接体(NM_001168、NM_001012270、NM_001012271)的编码

区共同序列来设计 siRNA 序列,将其与转录载体相结合转染入肾癌细胞后,运用 MTT、RT-PCR 及免疫组化的方法分别检测细胞转染后的增殖能力及 survivin 基因的 mRNA 和蛋白的表达情况。MTT 实验结果表明,转染后细胞的增殖明显受到了抑制,该抑制作用呈时间依赖性,在 72 h 时抑制作用最强。通过 RT-PCR 检测到细胞 survivin mRNA 的转录受到有效抑制,抑制率为 43.5%,通过免疫组化也证实其蛋白的表达明显下调,具有明显的抑制作用。

综上所述,本研究通过利用转录载体 pcDNA™ 6.2-GW/miR 构建针对靶向 survivin 的 siRNA 重组质粒作用于肾透明细胞癌细胞株 786-O,有效地下调了 survivin 基因和蛋白的表达水平,抑制 survivin 的抗凋亡作用,诱导和促进肾癌细胞的凋亡。因此,我们认为 RNAi 技术能特异性沉默肾癌的 survivin 基因,为肾癌的基因治疗提供了一种可能的新的途径与实验依据。

参考文献:

[1] Scheltema J M, Romijn J C, van-Steenbrugge G J, *et al*. Inhibition of apoptotic proteins causes multidrug resistance in renal carcinoma cells [J]. Anticancer Res, 2001, 21(5): 3161 - 3166.
[2] Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al*. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326 - 330.
[3] Sui G, Soohoo C, Afar el B, *et al*. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5515 - 5520.
[4] Ngo H, Tschudi C, Gull K, *et al*. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(25): 14687 - 14692.
[5] O'Connor D S, Schechner J S, Adida C, *et al*. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2): 393 - 398.
[6] 杨华安, 苟 欣, 郑传东, 等. RNAi 沉默 survivin 基因表达对膀胱癌 EJ 细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1260 - 1263.
[7] Mahotka C, Krieg T, Krieg A, *et al*. Distinct *in vivo* expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas[J]. Int J Cancer, 2002, 100(1): 30 - 36.
[8] 朱李兵, 王 禾, 武国军, 等. Survivin 在肾透明细胞癌中的表达及其意义[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2006, 27(2): 186 - 188.
[9] Parker A S, Kosari F, Lohse C M, *et al*. High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2006, 107(1): 37 - 45.
[10] Zamparese R, Pannone G, Santoro A, *et al*. Survivin expression in renal cell carcinoma[J]. Cancer Invest, 2008, 26(9): 929 - 935.
[11] 郑骏年, 史启铎, 孙晓青, 等. 小干扰 RNA 对肾癌细胞 Ki67 基因表达及其增殖的抑制作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(10): 656 - 659.
[12] 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.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2009)24-2447-01

个案与短篇

电子鼻咽喉镜引导下胃管置入法在临床中的应用

向悠琼,黄茂华,施又兴,唐 正 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

胃管置入在临床护理工作中是一项常见的护理操作技术。喉癌患者、大面积烧伤患者,以及普外科的胃肠道手术患者均需置入胃管[1],以保证患者的营养供给。但常规插胃管的方法不能看到解剖位置,不但影响一次性成功率,更增加了患者痛苦和护士的工作量。我科采取电子鼻咽喉镜引导下置入胃管,取得了满意效果。

1 临床资料

收集本科 2008 年 7 - 12 月常规法置入胃管失败的住院患者 8 例,均为男性,年龄 50 ~ 80 岁,之前为其做同样的心理护理,均表示积极配合。插胃管前准备同常规法,另外备有喉镜及普通镊子。患者取端坐位,头靠检查椅背,解释并取得合作后开始。先由喉镜检查医师在咽喉部、双侧鼻腔 1% 丁卡因表面麻醉 5 ~ 8 min 后[2],将喉镜按常规检查从一侧鼻腔插入,至口咽部时,护士用液状石蜡纱布润滑胃管前端 20 cm 左右,一手持纱布托住胃管,另一手持镊子夹住胃管前段,经对侧鼻腔轻轻向前插入,在喉镜引导下将胃管前段插入食管入口内,与此同时,嘱患者做吞咽动作,将胃管送入 45 ~ 55 cm,证实在胃内后固定。

2 结果

8 例患者均一次性置管成功,整个置管过程中患者无明显不舒适的感觉,更无呛咳、恶心、呕吐等引起患者心理紧张及不安情绪的症状。

3 讨论

临床胃管置入时因食管和气管解剖位置相隔较近,常规胃管置入方法不能窥及解剖标志,胃管向前推进的过程中易误入气管,引起患者呛咳、恶心、呕吐等,反复多次插管可引起并发症,

(下转 2451 页)

作者简介:向悠琼,女,重庆市人,护师。E-mail: xiangyongiong@sina.com
收稿日期:2009-03-17;修回日期:2009-04-01