论著

文章编号:1000-5404(2010)11-1158-04

RNA干扰survivin基因增强SKBr-3细胞对多柔吡星敏感性的体外研究

李庆霞[1],王 娟[1],赵文清[1],刘家云[2],黄红艳[3],张 明[1],杨安钢[4] (050051 石家庄,河北省人民医院肿瘤一科[1];710032 西安,第四军医大学:附属西京医院检验科[2],免疫学教研室[4];100071 北京,军事医学科学院附属307医院肿瘤三科[3])

[摘要] **目的** 探讨抑制survivin基因的表达对人乳腺癌SKBr-3细胞化疗敏感性的影响。**方法** 构建针对survivin基因序列特异性shRNA的表达载体,脂质体转染SKBr-3,G418筛选阳性克隆。实验分为RNA干扰组(S1&P),脂质体对照组(H1&P)和空白对照组。光镜观察转染后细胞的形态变化;0.5 μg/ml多柔吡星作用于转染后的细胞,电镜观察细胞形态学变化;TUNEL染色、Annexin V荧光标记检测细胞凋亡,MTT法检测细胞增殖的抑制率。**结果** 成功构建具有新霉素抗性的靶向survivin的序列特异性shRNA表达载体,基因测序完全正确;转染后干扰组细胞均发生细胞凋亡的形态学改变;低剂量多柔吡星诱导后,TUNEL染色结果,S1&P组凋亡细胞比例(23.6±4.8)%明显高于H1&P组(4.1±1.1)%和空白对照组(3.2±1.4)%($P<0.05$),表明转染了RNA干涉载体的SKBr-3细胞对低剂量多柔吡星的敏感性显著增加;Annexin-V染色结果:空白对照组凋亡比例为(17.43±3.12)%,H1&P组为(20.51±4.67)%,S1&P组为(68.76±8.49)%,后者与前两者比较均有统计学差异($P<0.05$)。干扰组细胞凋亡率、细胞增殖的抑制率均明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 体外实验证实抑制survivin基因的表达可提高乳腺癌SKBr-3细胞对多柔吡星的敏感性。

[关键词] RNA干扰;survivin;SKBr-3细胞;药物敏感性
[中图法分类号] R73-362; R730.53; R737.9 [文献标志码] A

RNA-interfered survivin gene increases sensitivity of SKBr-3 cells to doxorubicin: an *in vitro* study

Li Qingxia[1], Wang Juan[1], Zhao Wenqing[1], Liu Jiayun[2], Huang Hongyan[3], Zhang Ming[1], Yang Angang[4] ([1]First Department of Oncology, People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei Province, 050051; [2]Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, [4]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032; [3]Third Department of Oncology, No. 307 Hospital of PLA, Beijing, 100071, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of RNA-interfered survivin gene on chemosensitivity of breast cancer cell line SKBr-3 to doxorubicin. **Methods** A shRNA expression vector, ΔpcDNA3-H1-S1, was constructed according to the specificity of survivin gene. SKBr-3 cells were transfected with liposome-encapsulated plasmids and positive clones were screened with G418. SKBr-3 cells were divided into RNA interference group, liposome control group and blank control group. Change of morphology in cells transfected with 0.5 μg/ml doxorubicin was observed under an optical or electron microscope. Cell apoptosis was detected by TUNEL assay with Annexin-V fluorescence staining, and inhibiting rate of cell proliferation was detected by MTT assay. **Results** The survivin gene sequence specific shRNA expression vector resistant to neomycin was successfully constructed, which was confirmed by DNA sequencing. The morphologic change of apoptotic cells was observed in RNA interference group. The rate of apoptotic cells was significantly higher in RNA interference group than in liposome control group and blank control group [(23.6±4.8)% *vs* (4.1±1.1)% and (3.2±1.4)%] after TUNEL staining ($P<0.05$), indicating that the sensitivity of SKBr-3 cells to doxorubicin was increased in RNA-interfered vector. The rate of apoptotic cells was significantly lower in liposome control group and blank control group than in RNA interference group [(17.43±3.12)% and (20.51±4.67)% *vs* (68.76±8.49)%] after Annexin-V staining ($P<0.05$). **Conclusion** The chemosensitivity of SKBr-3 cells to doxorubicin can be significantly increased by inhibiting the expression of survivin gene with RNA interference technology.

[**Key words**] RNA interference; survivin; SKBr-3 cells; chemosensitivity

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500433) and the Supporting Project of Science and Technology Research of Hebei Province (072761677). Corresponding author: Li Qingxia, Tel: 86-311-85989933, E-mail: lqx73@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30500433);河北省科技支撑计划(072761677)
[通信作者] 李庆霞,电话:(0311)85989933,E-mail:lqx73@163.com

肿瘤细胞对化疗药物的天然耐药及治疗期间产生的继发耐药是肿瘤治疗失败的主要原因之一。如何增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,达到增效减毒的目的是当今肿瘤治疗领域的热点和难点。多种基因参与了肿瘤细胞的耐药机制。研究表明,凋亡抑制蛋白家族成员 survivin 能够抑制某些化疗药物诱导的 Fas、Caspase、Bax 等参与的凋亡信号通路,通过多种途径抑制细胞凋亡,降低 survivin 的表达可能会增加肿瘤细胞放化疗的敏感性[1-3]。本研究拟采用 RNA 干扰技术抑制乳腺癌 SKBr-3 细胞中 survivin 的表达,观察其对多柔吡星敏感性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 SKBr-3(高表达 survivin 基因)由第四军医大学生化教研室提供。用含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 在 37 ℃,5% CO_2 温育箱中培养。真核表达载体 pCDNA3 及已构建好的针对人 survivin 基因的小干涉 RNA(small interfering RNA ,siRNA)表达载体 pSUPER-S1 质粒均由第四军医大学生化教研室保存。pSUPER-S1 全长 3 240 bp,其中自行设计的编码 siRNA 的 DNA 双链序列(S1 序列):5′-GATCCCCCTGGACAGAGAAAGAGCCATTCAAGAGATGGCTCTTTCTCTGTCCAGTTTTTTGGAAA-3′, 互补链 5′-AGCTTTTCCAAAAACTGGACAGAGAAAGAGCCATCTCTTGAATGGCTCTTTCTCTGTCCAGGGG-3′,上述双链退火后克隆于真核表达载体 pSUPER 的 *Hind*Ⅲ和 *Bgl*Ⅱ位点之间。转染 SKBr-3 细胞后可有效抑制 survivin 基因的表达[4]。Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品,限制性核酸内切酶 *Eco*RⅠ、*Bgl*Ⅱ、*Hind*Ⅲ和 *Xho*Ⅰ等为 Gibco 公司产品。T_4 DNA 连接酶、*Spe*Ⅰ、DL2000 DNA 标准为 TaKaRa 公司产品,LipofectAmine™2000 为 Invitrogen 公司产品,RPMI1640、G418、PI 均购自 GIBCO 公司,TdT-Frag ELTM DNA Fragmentation Detection kit 为 Oncogene 公司产品,Annexin-Ⅴ-Fluos kit 为 Roche 公司产品,MTT 为 Sigma 公司产品。注射用盐酸多柔吡星冻干粉剂(10 mg/支),购自法玛西亚有限公司无锡分公司。

1.2 方法

1.2.1 具有新霉素抗性的靶向 survivin 的 RNAi 表达载体的构建 我们曾较早构建了靶向 survivn 基因的 RNA 干扰载体 pSUPER-S1,实验表明其干扰作用特异性较强[1,4],但该载体无筛选标记,为了便于细胞转染和稳定筛选,我们重新构建了 ΔpcDNA3-H1-S1(简称 S1&P)载体。先用 *Spe*Ⅰ酶切 pcDNA3,将其中的 CMV 启动子去除,使大片段自身环化,标为 ΔpcDNA3。再用 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ分别双酶切 ΔpcDNA3 及 pSUPER-S1,将后者的小片段(包含 H1 启动子和 S1 序列)与前者的大片段(含 neo^R)连接。同时构建空载体 ΔpcDNA3-H1(不含干扰片段,仅含 H1 启动子序列,简称 H1&P)作为对照。

1.2.2 脂质体介导基因转染 在 6 孔板内按 1×10^6/孔接种细胞,细胞贴壁后用 S1&P 质粒及 H1&P 空载体质粒转染 SKBr-3 细胞分别作为 RNA 干扰组(S1&P 组)和脂质体对照组(H1&P 组)。未转染的细胞作为空白对照组。操作步骤按 LipofectAmine™2000 说明书进行。转染后 48 h 后换为含 400 μg/ml G418 的选择培养基继续培养,10~15 d 后获得稳定转染的细胞克隆。

1.2.3 稳定转染光镜观察 选对数生长期的 3 种细胞(未转染、H1&P 和 S1&P 稳定转染的 SKBr-3 细胞)在 CK30 倒置显微镜下进行细胞形态观察并照相。

1.2.4 稳定转染电镜观察 同时传代上述 3 种细胞,37 ℃孵箱孵育 1~2 h,使细胞贴壁,终浓度为 0.5 μg/ml 的多柔吡星作用 12 h 后,分别收集细胞,细胞沉淀用 2.5% 戊二醛 4 ℃固定 2 h,拨离细胞团块,PBS 洗 2 次,脱水、包埋,制备超薄切片,染色,水洗,透射电镜观察并照相。

1.2.5 TUNEL 染色 胰酶分别消化同时传代的 SKBr-3 细胞、转染 H1&P 48 h、转染 S1&P 48 h 的 SKBr-3 细胞,加 3~4 滴至 12 孔板中的盖玻片上,37 ℃孵箱孵育 1~2 h,使细胞贴壁,终浓度为 0.5 μg/ml 的多柔吡星作用 12 h 后,弃培养液,PBS 洗 3 遍制作细胞爬片,4% 多聚甲醛固定后按 TdT-Frag^{ELTM} DNA Fragmentation Detection kit 说明书方法进行操作。凋亡细胞的细胞核染色呈棕黄色。在 200 倍光镜下,每张切片随机选取 3 个视野,计算凋亡细胞在全部细胞中所占的比例。实验重复 3 次。

1.2.6 稳定转染 Annexin V 实验 同时传代 SKBr-3 细胞、H1&P、S1&P 稳定转染的 SKBr-3 细胞,37℃孵箱孵育 1~2 h,使细胞贴壁,终浓度为 0.5 μg/ml 的多柔吡星作用 12 h 后,消化细胞成单细胞悬液,PBS 洗涤,再以 labeling solution buffer(孵育缓冲液:Annexin-Ⅴ-FITC:PI = 50∶1∶1),重悬,PBS 补足 300~500 μl,4 ℃避光染色 10 min,上机检测。实验重复 3 次。

1.2.7 MTT 法测定抑制率 台盼蓝染色活细胞计数,调整细胞数为 5×10^5/ml,接种于 96 孔板,100 μl/孔。37 ℃,5% CO_2,培养 24 h,实验孔加入 25 μl 的多柔吡星(终浓度为 0.5 μg/ml),对照孔加入等量的 PBS,继续培养 48 h,去除培养液,加入 25 μl MTT(2 mg/ml),继续培养 6 h,加入 DMSO 150 μl/孔,振荡待紫色结晶完全溶解,将 96 孔板置于酶标仪上,570 nm 为检测波长,630 nm 为参考波长,测量各孔的光密度值,计算抑制率:抑制率 =(1 - 实验孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值)×100%。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 Fisher 精确概率检验法检验。

2 结果

2.1 S1&P 载体基因测序

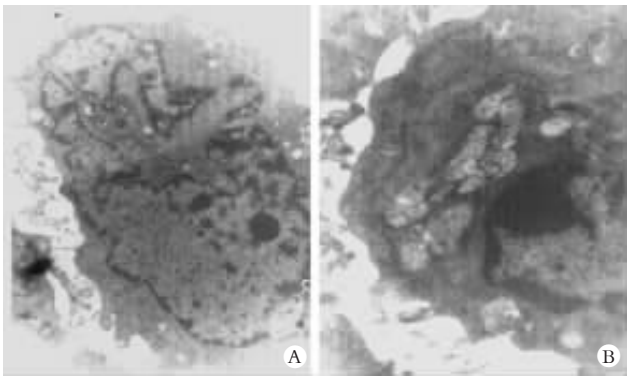
成功构建了含新霉素抗性的靶向 survivin 的 RNA 干扰载体 S1&P,经酶切测序后完全正确。

2.2 S1&P 转染的瘤细胞发生形态学改变

2.2.1 光镜观察结果 用新构建的干涉载体 H1&P 和 S1&P 分别转染乳腺癌 SKBr-3 细胞,在相差显微镜下观察 G418 稳定筛选后的混合克隆,发现 S1&P 转染后的肿瘤细胞出现自发凋亡:细胞明显皱缩,形态均变得不规则,细胞变圆,贴壁性差,随后漂浮于培养液中死亡,阴性对照组、脂质体组仅有少量细胞出现漂浮,大部分细胞形态基本正常,贴壁生长良好。

2.2.2 电镜观察结果 未经转染的 SKBr-3 细胞形态基本正常,并未受到小剂量多柔吡星的影响,呈现出典型的肿瘤细胞的特征,包括异染色质、巨核等现象,极少见到凋亡细胞(图

1A);S1&P转染组中的多数细胞则出现了典型的凋亡特征:如细胞膜表面微绒毛消失,核膜及细胞膜仍然完整,细胞膜表面出泡,细胞器空泡化,染色质凝集以及凋亡小体形成等(图1B)。



A:SKBr-3细胞(×5 000);B:S1&P转染的SKBr-3细胞(×12 000)

图1 透射电镜观察低剂量多柔吡星诱导SKBr-3细胞凋亡

2.3 TUNEL染色结果分析

S1&P组凋亡细胞比例(23.6%±4.8%)明显高于H1&P组(4.1%±1.1%)和对照组(3.2%±1.4%)($P<0.05$),表明转染了RNA干涉载体的SKBr-3细胞对低剂量多柔吡星的敏感性显著增加。见图2。

2.4 Annexin-V染色结果

对照组凋亡比例为(17.43%±3.12%),H1&P组为(20.51%±4.67%),S1&P组为(68.76%±8.49%),后者与前两者比较均有统计学差异($P<0.05$,图3)。

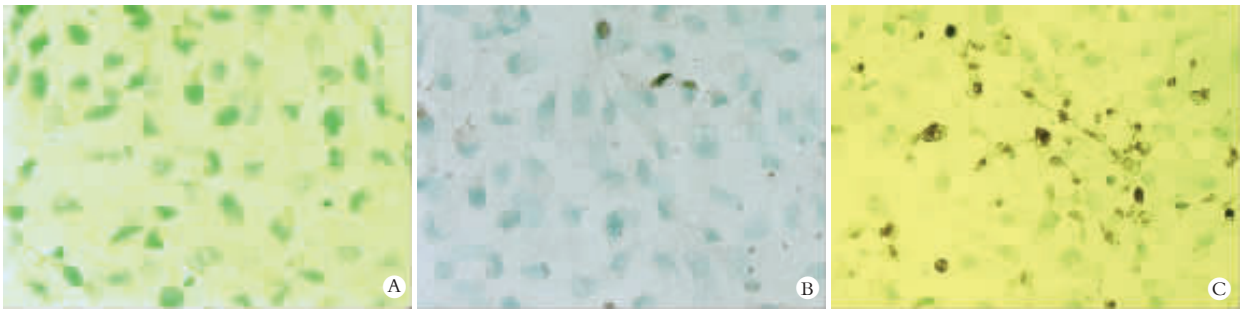
2.5 细胞增殖抑制率的变化

MTT实验结果显示,对照组细胞抑制率为(13.27%±4.52%)、H1&P组为(15.20%±2.40%),2者间无统计学差异($P>0.05$);S1&P转染组细胞抑制率为(37.28%±7.57%),与前两组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

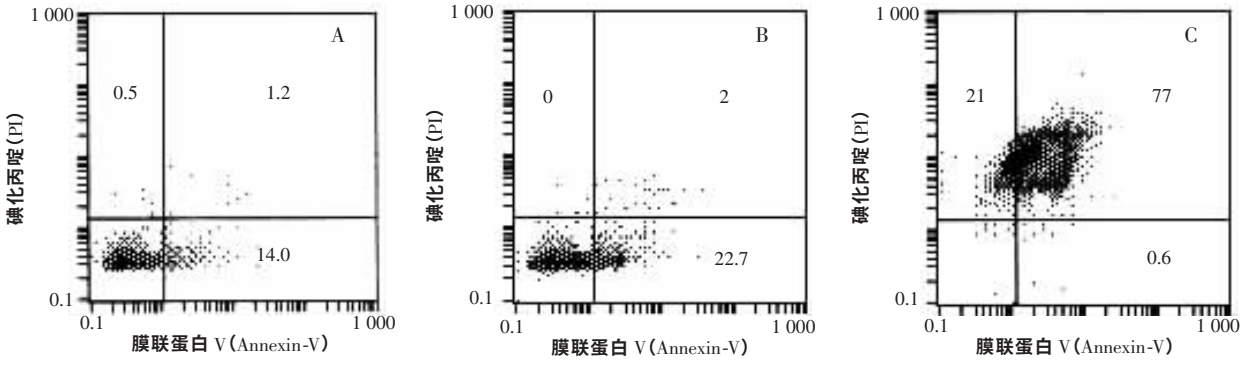
随着对肿瘤发病机制研究的不断深入,人们发现肿瘤不仅是细胞无限增殖的产物,同时也是细胞凋亡受阻的结果。其中bcl-2和凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族作为主要的两类凋亡抑制基因在维持肿瘤恶性生物学行为方面发挥了重要作用。survivin是1997年发现的IAP家族成员,它的特殊分布及功能的多样性已引起了国内外学者的广泛关注,成为该家族中最令人瞩目的一员。survivin具有以下两个突出的特点[5]:①选择性地表达在几乎所有种类的肿瘤组织中,而正常组织几乎没有表达;Tamm等[6]研究发现,60种人类肿瘤细胞株均有survivin蛋白的表达,其中在乳腺癌及肺癌中的表达最高。②survivin具有抗凋亡、促进有丝分裂、调节细胞周期、参与血管形成和放化疗耐受的功能。因此,抑制survivin的表达可能增加乳腺癌细胞的凋亡和化疗敏感性。

研究表明,抗肿瘤药物在高浓度下诱导细胞坏死,而在较低血药浓度下则主要引起细胞凋亡[7]。在某种程度上,可以认为肿瘤细胞的耐药就是由于细胞凋亡的受阻;逆转对肿瘤细胞凋亡的抑制或增强对凋亡的诱导,则可能逆转肿瘤细胞的耐药。多柔吡星属于蒽环类药物,是中高危乳腺癌化疗中的首选药物,但晚期患者多存在多药耐药(MDR),同时其心脏毒性限制



A:SKBr-3细胞;B:H1&P转染的SKBr-3细胞;C:S1&P转染的SKBr-3细胞

图2 多柔吡星诱导瞬时转染的SKBr-3细胞凋亡观察 (TUNEL ×200)



A:SKBr-3细胞;B:H1&P转染的SKBr-3细胞;C:S1&P转染的SKBr-3细胞

图3 Annexin-V染色检测多柔吡星诱导稳定转染的SKBr-3细胞凋亡

了使用剂量。本研究中采用的化疗药物浓度是依据临床最大血药浓度所推算的体外用药剂量的 1/10[7],利用已证实能有效干涉 survivin 基因表达的载体 pSUPER-S1[1,4,8-11],重新构建了具有新霉素抗性的 RNA 干涉表达载体 S1&P,结果表明无论是瞬时转染还是稳定转染 S1&P 的乳腺癌 SKBr-3 细胞自发凋亡均增加,对低剂量多柔吡星的敏感性也明显增加。文献[12]报道抑制 survivin 基因的表达可以降低耐药蛋白 GST-π 的表达,从而增加人白血病 K562 细胞对阿霉素的敏感性。我们认为抑制 survivin 基因的表达还可以解除凋亡抑制,增加细胞的自发凋亡率;通过细胞周期阻滞[2]延缓细胞有丝分裂。提示可以将 survivin 作为临床治疗乳腺癌的分子靶点,或联合蒽环类药物进行特异性靶向治疗,降低此类药物的使用剂量,减少心脏毒副作用,达到增效减毒的目的,为乳腺癌的治疗开辟新的思路。

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] 徐虹, 蒋东霞, 胡杰英, 等. 宫颈癌组织中 Survivin、Fas 与 FasL 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(3): 496-498.
[3] 宋彦, 王科峰, 宋永胜. 凋亡相关蛋白 Survivin 及 Caspase-3 在膀胱移行细胞癌中表达及临床意义[J]. 临床泌尿外科杂志, 2007, 22(5): 324-327.
[4] 李庆霞, 黄红艳, 刘家云, 等. Survivin 基因的 RNA 干涉抑制人乳腺癌 SKBr-3 细胞体外增殖的作用[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(2): 101-104.
[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] Tamm I, Wang Y, Sausville E, *et al*. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5315-5320.
[7] 徐萌. 恶性肿瘤化疗及其对策[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 112-113.
[8] 李庆霞, 刘家云, 黄红艳, 等. 表达的 siRNA 对人乳腺癌 SKBr-3 细胞中 survivin 基因的干涉作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志 2004, 11(4): 277-280.
[9] 李庆霞, 刘家云, 黄红艳, 等. RNAi 抑制 survivin 基因表达对乳腺癌 SKBr-3 细胞放射敏感性影响的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(20): 1528-1531.
[10] 罗颖, 温贤浩, 徐酉华. K562 细胞 survivin 基因表达对淋巴细胞增殖和功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2215-2218.
[11] 陈莹, 钟玲, 王勇, 等. RNA 干扰沉默 survivin 基因在抑制卵巢癌裸鼠移植瘤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 530-533.
[12] 陈琳, 徐酉华, 温贤浩, 等. RNA 干扰 survivin 基因对 K562 细胞化疗敏感性的影响及机制[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2111-2114.

(**收稿**:2009-11-08;**修回**:2009-12-02)
(编辑 龙 亮)

(上接 1151 页)

粪水, 但清晰无渣,不影响窥视;良: 镜检时有粪水及少量渣样物, 但可入镜并完成检查; 差:肠道不干净, 无法入镜。优、良者判断为有效, 差者无效。所有结果均由肠镜操作者及送镜者共同认可并记录。组间肠道清洁效果比较采用 ridit 分析。

2 结果

3 组清洁方法比较,结果见表 1。

表 1 3 种肠道清洁方法满意度比较

组别	例数	优(%)	良(%)	差(%)
A 组	162	96 (55)	48(30)	18(11)
B 组	163	102(63)	42(26)	19(11)
C 组	175	145(82)[a]	28(16)	2 (1)

a: $P<0.05$ 组间比较

3 讨论

多数行纤维结肠镜检查术的患者不仅仅只是镜检,尚需做局部治疗、标本采集、息肉切除等手术,所以对肠道的清洁要求很高。传统的方法难以达到满意的清洁要求,也很难做到门诊的患者当天完成纤维结肠镜的检查。

本研究表明,A 组因单纯使用大肠水疗机由于受水压、按摩的手法及肛门括约肌功能是否正常等因素影响,患者不一定能每次憋水都能让水完全充满全结肠后才排出大便,如不能完成理想的进水与排出大便全过程,使水只在结肠下部冲洗很难达到检查所需要的肠腔清洁标准。B 组口服硫酸镁、果导片是自上而下的全肠道灌洗法,需要大量饮水才能达到冲洗全结肠的目的,如能按规定量饮用清肠液清肠满意率亦可达 95 % 以上[3],但老年人、体质虚弱及胃部不适患者不可能在检查前 3 h 在 30 min 内饮入 3 000 ml 清肠液,。对于身体无不适的患者也很难接受大量口服清肠剂,多数患者不愿意检查,从而延误了最佳的治疗时机。大量饮入口服洗肠液后肠蠕动增加,排便次数增多,可导致水电解质丢失,部分吸收的电解质溶液会增加心脏前负荷或引起水钠滞留,并发严重的不良反应。C 组与 A、B 两组的效果比较有显著性差异($P<0.05$)。我们在采用大肠水疗前 1 h 先让患者口服硫酸镁以达到溶解回盲部以及结肠深部成型便,再行大肠水疗法两者配合使用不仅可以减少口服清肠药的用量,还可以缩短大肠水疗的时间,更能彻底清洗肠道且无明显不良反应,清洁的优良率高、安全、舒适、有效。门诊患者可以做到当天就诊当天检查,这是传统方法无法比拟的,因此适合临床推广应用。

参考文献:

[1] 华静蕙,赵发,郭伶俐 . 大肠水疗用于结肠镜检查前的肠道准备河北医药,2003, 12(25): 920.
[2] 王秀娣,崔桂兰,石蕾. 老年人结肠镜检查的肠道准备方法改进与护理[J]. 中华护理杂志, 2004, 39 (6):424-426.
[3] 于皆平,雷亨郎. 纤维肠镜临床应用技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1990: 91-96.

(**收稿**:2010-03-31;**修回**:2010-04-30)
(编辑 邓强庭)