论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1750-04

Survivin siRNA 抑制人腺样囊性癌 ACC-2 细胞移植瘤血管生成

富 凯,杨 军,汪 欣,许 波 (400038 重庆,第三军医大学西南医院口腔科)

【摘要】 **目的** 观察 siRNA 抑制生存素 survivin 基因对裸鼠皮下人腺样囊性癌 ACC-2 细胞移植瘤血管生成的影响。**方法** 裸鼠 15 只完全随机分为 3 组($n=5$):①干扰质粒组,皮下接种 survivin RNA 干扰质粒转染的 ACC-2 细胞;②瘤体注射组,皮下接种正常 ACC-2 细胞 15 d 成瘤后,将针对 survivin 的 siRNA 真核表达载体脂质体法作瘤体内及瘤周注射;③肿瘤细胞组,皮下接种正常 ACC-2 细胞。25 d 后处死全部裸鼠,剥离瘤体,测量瘤体体积,RT-PCR 检测瘤体组织 VEGF mRNA 表达,HE 染色和免疫组化染色法观察 VEGF 阳性染色及其微血管参数。**结果** 干扰质粒组和瘤体注射组 VEGF 电泳条带的相对光密度比值(0.698±0.023、0.612±0.038)及总体微血管密度[(4.98±1.43)、(5.08±1.29)个]、有腔微血管密度[(2.98±1.05)、(3.10±1.23)个]、有腔血管周长[(68.60±15.98)、(70.12±14.19) μm]及管腔面积[(4 119.14±698.12)、(4 339.67±599.76) μm^2]较肿瘤细胞组 VEGF 电泳条带的相对光密度比值(0.912±0.039)及总体微血管密度[(8.90±1.36)个]、有腔微血管密度[(5.89±1.68)个]、有腔血管周长[(129.48±25.68) μm]及管腔面积[(6 952.74±1 298.54) μm^2]低($P<0.05$),而干扰质粒组和瘤体注射组无明显差别($P>0.05$)。**结论** survivin siRNA 能够抑制腺样囊性癌瘤体生长,并在体内通过抑制腺样囊性癌 VEGF 表达有效减少肿瘤血管生成。

【关键词】 siRNA survivin;ACC-2 细胞;血管生成

【中图法分类号】 R730.261;R73-361 【文献标志码】 A

Survivin siRNA suppresses angiogenesis of adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells-bearing nude mice

Fu Kai, Yang Jun, Wang Xin, Xu Bo (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the inhibitory effect of silencing survivin through siRNA on the tumor angiogenesis in nude mice bearing human adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells. **Methods** A total of 15 nude mice were randomized into 3 groups ($n=5$), intervention plasmid group (inoculated subcutaneously with survivin RNAi plasmid transfected ACC-2 cells), tumor intervention group (survivin RNAi plasmids were subcutaneously injected into and around the tumor mass which were formed in 15 d after ACC-2 cells inoculation into the nude mice), and tumor cell group (inoculated subcutaneously with wide ACC-2 cells). After all mice were sacrificed in 25 d after tumor cell inoculation, the tumor was stripped, and tumor volume was measured. RT-PCR was used to detect the expression of VEGF mRNA in tumor tissues, and HE staining and immunohistochemical staining were preformed for the morphology and microvessel parameters of the tumor mass. **Results** In the intervention plasmid group and tumor intervention group, VEGF mRNA was expressed at an optical density ratio of 0.698±0.023 and 0.612±0.038 in electrophoregram, overall microvessel density was 4.98±1.40 and 5.08±1.29, and a cavity microvascular density was 2.98±1.05 and 3.10±1.23 with an average circumference of blood vessel lumen 68.60±15.98 and 70.12±14.19 μm, and a mean lumen area of 4 119.14±698.12 and 4 339.67±599.76 μm^2. These indexes had a significant difference with those of tumor cell group [optical density ratio of VEGF 0.912±0.039, overall microvessel density 8.90±1.36, a cavity microvessel density 5.89±1.68, an average circumference of vascular cavity 129.48±25.68 μm and

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5064)

【通信作者】 杨 军,电话:(023)68754439,E-mail:yangjunsir@mail.tmmu.com.cn

lumen area 6 952.74 ± 1 298.54 μm^2 ($P < 0.05$)], while, there was no significant difference in these indexes between the intervention plasmid group and tumor intervention group ($P > 0.05$). **Conclusion** Survivin siRNA inhibits the growth of tumor mass in adenoid cystic carcinoma-bearing nude mice by inhibiting VEGF expression to suppress tumor angiogenesis effectively.

[Key words] siRNA surviving; human adenoid cystic carcinoma cells; angiogenesis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5064). Corresponding author: Yang Jun, Tel: 86-23-68754439, E-mail: yangjunsir@mail.tmmu.com.cn

survivin 是细胞凋亡抑制蛋白 IAP 家族(inhibitor of apoptosis proteins,IAP)中最小的成员,特异性表达于人和鼠的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞,已成为 siRNA 治疗肿瘤的新靶点。RNA 干扰技术是从对肿瘤基因治疗的角度进行的新的治疗方法的探索。实验证实 RNA 干扰是一种特异、高效、经济的抑制基因的技术手段,可有效地将靶基因的表达水平降到一个很低的水平,甚至于达到完全的清除[1]。前期研究表明 survivin 在腺样囊性癌中存在高表达[2]以及在体外通过沉默 survivin 基因可抑制腺样囊性癌细胞的生长[3]。本实验通过体内转染 survivin siRNA 表达载体及其对腺样囊性癌移植瘤行瘤体、瘤周注射 siRNA survivin 干扰质粒,观察 siRNA survivin 对裸鼠皮下腺样囊性癌 ACC-2 细胞移植瘤血管生成的影响,旨在探讨 survivin 基因通过下调 VEGF 基因表达,从而抑制肿瘤血管的生成。

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料与试剂

15 只 BALB/c 雄性裸鼠,4 ~ 6 周龄,体质量 15 ~ 18 g,由第三军医大学实验动物中心提供。腺样囊性癌细胞株 ACC-2 由华西医科大学细胞生物学教研室提供。转染 survivin siRNA 质粒腺样囊性癌细胞株 ACC-2 由第三军医大学西南医院口腔科汪欣提供。质粒大剂量提取试剂盒(美国 OMEGA 公司),脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),VEGF 引物由第三军医大学西南医院口腔科张从纪副教授赠予,抗小鼠 CD34 多克隆抗体(北京中杉生物有限公司)。

1.2 真核表达载体 survivin siRNA 的构建以及质粒的扩增与提取

按照 RNAi 目标序列的选取原则,从转录本(mRNA)的 AUG 起始密码开始,寻找"AA"二连序列,并记下其 3′端得 19 个碱基序列,作为潜在的 siRNA 靶位点,然后将潜在的序列和相应的基因组数据库进行比对,排除同源性,最后选出合适的目标序列进行合成。合成 Oligo DNA 由上海生工生物公司合成。将合成的 Oligo DNA survivin 先退火成小片段,然后插入经 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ限制性内切酶酶切的载体 pGenesil-1 上,转化入感受态大肠杆菌 DH5α 中,经过筛选克隆,构建好重组质粒,命名为 survivin-siRNA。此过程由前期实验完成[3]。经重组转化的大肠杆菌 DH5α 置 LB 细菌培养基中 37 ℃恒温摇床 12 ~ 16 h 孵育。以试剂盒大量提取质粒调整浓度 0.2 μg/μl,-20 ℃保存备用。

1.3 细胞培养及动物模型建立、分组

腺样囊性癌 ACC-2 细胞及转染 survivin siRNA 干扰质粒的 ACC-2 细胞用含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 ℃,5% CO_2 的细胞培养箱中培养。将 15 只裸鼠完全随机分为 3 组,每组 5 只,取对数生长期细胞调整细胞数至 4×10^8/ml,每只 0.1 ml,将转染 survivin siRNA 的 ACC-2 细胞注射到:①干扰质粒组;将正常 ACC-2 细胞分别注射到:②瘤体注射组,③肿瘤细胞组。15 d 成瘤后,将重组质粒 20 μg 与脂质体按 1 μg/2 μl 与无血清细胞培养基混合至总体积 150 μl,对瘤体注射组做瘤体及瘤周多点注射,1 次/2 d,共 5 次。肿瘤细胞组作为对照组。25 d 后处死全部裸鼠,剥离瘤体,每个瘤体取部分组织迅速置液氮中保存,其余组织以多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋切片。

1.4 瘤体体积测量

每 3 天用游标卡尺测量皮下肿块大小,以公式 V(cm^3) = $ab^2/2$ 计算肿块体积,a 为肿块长径,b 为短径。取下肿块组织,病理切片 HE 染色,证实为肿瘤组织。

1.5 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的表达

各组冻存瘤体组织冰上匀浆,试剂盒分别提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增 VEGF 目的基因和内参基因。VEGF 引物序列:上游 5′-CCCAAGCTTCACCGCCTCGGCTTGTC-3′,下游 5′-CGTCATGACCATGAACTTTCTGCTGT-3′。VEGF 和 β-actin 得扩增片段分别为 479 bp 和 590 bp。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,用凝胶成像分析系统成像观察,分析并保存结果。比较各组 VEGF 条带相对光密度值。

1.6 免疫组织化学法观察微血管参数

常规免疫组化 S-P 二步法染色,一抗抗小鼠 CD34 多克隆抗体 1∶100。参照 Weidner 的方法在低倍镜下找到 CD34 阳性着色最密集区,换至 200 倍镜。以病理图像分析系统保存 5 个不重复视野图片,以 5 个视野的平均微血管数作为该样本的微血管密度值。同样方法计算每个样本有腔微血管密度、管腔周长及管腔面积。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件对组间比较进

行单因素方差分析。

2　结果

2.1　移植瘤病理切片HE染色观察

肿瘤细胞多为导管内衬上皮细胞和肌上皮细胞，肿瘤细胞体积小，细胞核分裂少见，排列成圆形或卵圆形的上皮团片，呈筛孔状。经第三军医大学西南医院病理科鉴定，各组肿块组织均为腺样囊性癌（图1）。

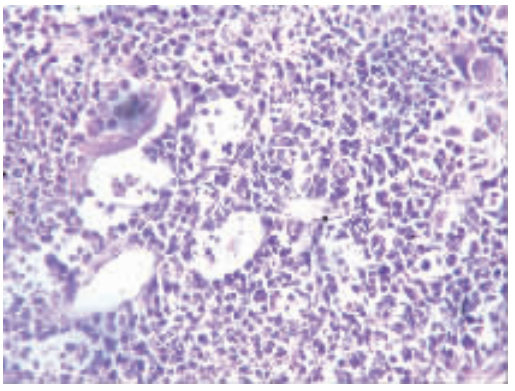


图1　移植瘤病理切片HE染色观察　（×200）

2.2　各组移植瘤体积比较

各组移植瘤生长曲线显示：15 d时瘤体注射组、肿瘤细胞组腺样囊性癌裸鼠移植瘤体积明显大于干扰质粒组，25 d时干扰质粒组、瘤体注射组腺样囊性癌裸鼠移植瘤体积明显小于肿瘤细胞组，表明转染survivin siRNA质粒和瘤体内注射质粒均明显抑制了腺样囊性癌裸鼠移植瘤的生长（图2）。

2.3　各组移植瘤VEGF mRNA表达

3组电泳条带的相对光密度比值分别为：肿瘤细胞组为（0.912±0.039），干扰质粒组为（0.698±0.023），瘤体注射组为（0.612±0.038）。干扰质粒组、瘤体注射组较肿瘤细胞组低（$P<0.05$），而干扰质粒组与瘤体注射组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。表明survivin siRNA可以抑制VEGF表达，从而抑制血管生成。见图3。

2.4　各组移植瘤CD34染色及微血管参数比较

干扰质粒组和瘤体注射组分别与肿瘤细胞组比较，微血管密度、有腔微血管密度、管周周长、管腔面积均较少，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明survivin siRNA可以减少血管生成，从而抑制肿瘤的生长。干扰质粒组和瘤体注射组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图4、表1。

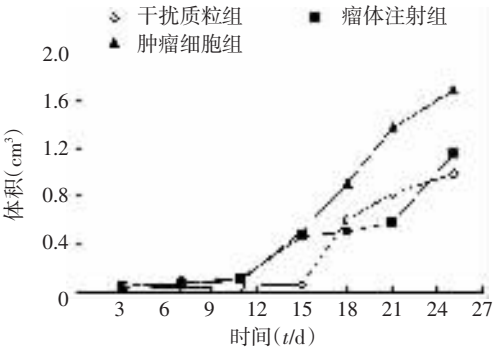
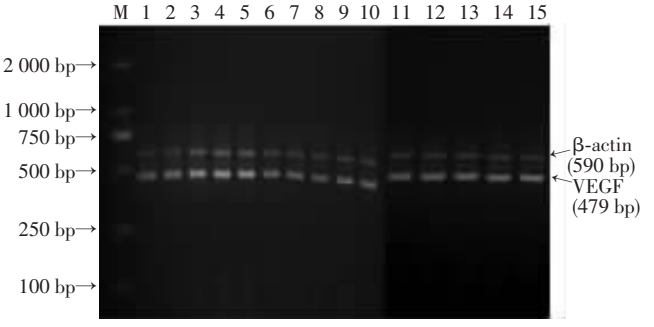


图2　survivin基因对各组移植瘤生长情况的影响



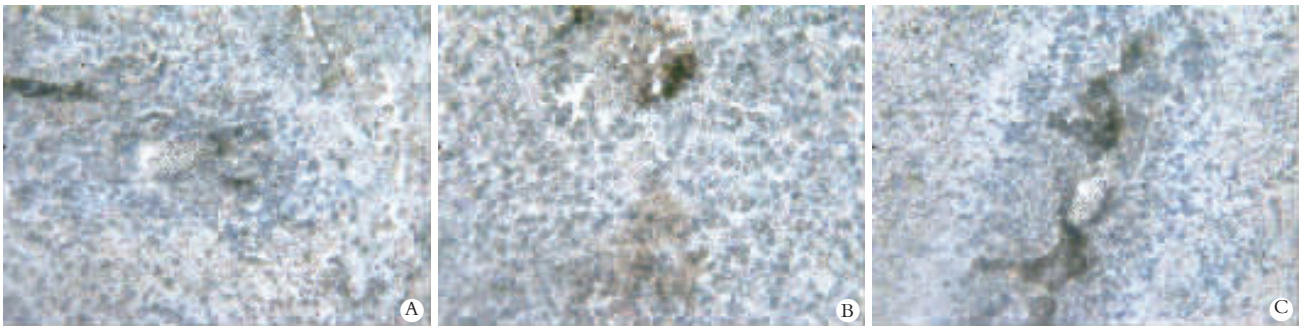
M：DNA标准（DL 2000）；1～5：肿瘤细胞组；6～10：干扰质粒组；11～15：瘤体注射组

图3　RT-PCR检测survivin基因对各组移植瘤VEGF mRNA表达的影响

表1　各组移植瘤微血管参数比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	微血管密度（个）	有腔微血管密度（个）	管腔周长（μm）	管腔面积（μm²）
干扰质粒组	4.98±1.43[a]	2.98±1.05[a]	68.60±15.98[a]	4 119.14±698.12[a]
瘤体注射组	5.08±1.29[a]	3.10±1.23[a]	70.12±14.19[a]	4 339.67±599.76[a]
肿瘤细胞组	8.90±1.36	5.89±1.68	129.48±25.68	6 952.74±1 298.54

a：$P<0.05$，与肿瘤细胞组比较



A：干扰质粒组；B：瘤体注射组；C：肿瘤细胞组

图4　免疫组化染色观察各组移植瘤CD34微血管阳性染色　（S-P ×200）

3 讨论

survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族的一个新成员,其主要调控两个重要的细胞过程:抑制细胞凋亡和促进细胞有丝分裂。其特异表达于人和鼠的胚胎发育组织和大多数肿瘤细胞,但在正常组织细胞中几乎很少表达。研究表明,survivin 可以通过减少 IL-3、FAS 刺激、BAX 过表达、TRAIL、P53、Caspase-3、甲氨喋呤、紫杉酚等内在或外在因素直接或间接地实现对细胞凋亡的抑制[4-9]。因此鉴于其特异性的组织分布及特殊的作用机制,近年来 survivin 作为肿瘤标记物和基因治疗的新靶点[10],备受人们的关注。分子靶向治疗是指使用小分子化合物、单克隆抗体、多肽等物质特性,干预调节肿瘤细胞的生物学行为的信号通路,从而达到抑制肿瘤发展的目的。目前 RNA 干扰技术就是利用双链 RNA 经过一系列处理,形成具有活性的小干扰 RNA 片段。这种片段能够与目的基因 mRNA 结合并使其 mRNA 降解,从而达到抑制目的基因表达的作用[11]。RNA 干扰自发现以来,已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性疾病治疗等的研究。最早采用 RNA 干扰技术减少 survivin 表达是在 HeLa 细胞上[12]。

肿瘤的生长和转移依赖新生血管的形成。血管生成方式中微血管内皮细胞源于宿主成熟的血管内皮细胞。在促血管生成因子作用下发生分裂增殖形成新生血管。VEGF 特异地促血管内皮细胞有丝分裂,增加内皮细胞通透性,是目前已知的作用最强的促血管生成因子。因此我们试图通过 siRNA survivin 特异性抑制 VEGF 表达来减少肿瘤血管生成,达到 siRNA survivin 干扰肿瘤间质和抑制肿瘤细胞的双重作用。涎腺腺样囊性癌是口腔颌面部一种恶性程度高、侵袭性强的肿瘤,手术定位受侵部位非常困难,且其对于放化疗不敏感,因此腺样囊性癌的综合治疗仍是目前最迫切需要解决的问题。在前期实验研究中,我们发现 survivin 在腺样囊性癌细胞中高表达[2],且转染 RNAi survivin 质粒明显抑制细胞生长[3]。本实验中,我们通过对细胞转染 siRNA survivin 质粒和针对 survivin 的 siRNA 真核表达载体脂质体法作瘤体内及瘤周注射构建裸鼠移植瘤,与腺样囊性癌细胞构建的裸鼠移植瘤作对照,结果显示前 2 组移植瘤体积明显较肿瘤细胞组低,说明靶向 survivin 具有明显的抑制移植瘤生长的作用。RT-PCR 检测 VEGF mRNA 及免疫组化染色检测微血管参数,结果显示干扰质粒组和瘤体注射组均较肿瘤细胞组低($P<0.05$),表明通过靶向 survivin RNAi 可以明显地抑制促血管生成因子 VEGF 的表达,影响肿瘤血管生成,达到抑制肿瘤生长的作用。但干扰质粒组和瘤体注射组比较无明显的差异($P>0.05$)。

与肿瘤细胞生长一样,血管发生和生长对肿瘤的发生、发展是非常必要的[13]。本实验证实了 siRNA survivin 可以抑制肿瘤血管的发生发展,其机制之一为其抑制促血管生成因子表达。但肿瘤血管的生成取决于 2 个因素:血管内皮细胞和促血管内皮生长因子。survivin 也具有抑制细胞凋亡的作用,究竟二者哪个占主导地位,有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Guan H T, Xue X H, Wang X J, *et al*. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA suppresses proliferation of two human cancer cell lines [J]. Chin Med Sci J, 2006, 21(2): 115-119.

[2] 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.

[3] 汪欣, 杨军, 许波, 等. survivin 基因沉默对腺样囊性癌细胞生长和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1053-1056.

[4] Altieri D C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 81(1): 61-70.

[5] 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.

[6] Suzuki A, Ito T, Kawano H, *et al*. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death[J]. Oncogene, 2000, 19(10): 1346-1353.

[7] Mirza A, McGuirk M, Hockenberry T N, *et al*. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(17): 2613-2622.

[8] Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, *et al*. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(8): 1406-1412.

[9] Azuhata T, Scott D, Griffith T S, *et al*. Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma[J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(8): 1431-1440.

[10] Duffy M J, O'Donovan N, Brennan D J, *et al*. Survivin: a promising tumor biomarker[J]. Cancer Lett, 2007, 249(1): 49-60.

[11] Aagaard L, Rossi J J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2-3): 75-86.

[12] Carvalho A, Carmena M, Sambade C, *et al*. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 14): 2987-2998.

[13] Bergers G, Benjamin L E. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 401-410.

(收稿 2010-01-11 修回 2010-01-21)

(编辑 龙 亮)