论著

文章编号:1000-5404(2010)12-1312-04

RNAi 抑制 XIAP 基因诱导 MG63 细胞凋亡、化疗增敏及其分子机制

何 畔[1],梁 珊[2] (410005 长沙,湖南省人民医院:创伤外科[1],临床医学研究所[2])

[摘要] 目的 观察 RNAi 技术抑制 X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibit apoptosis protein,XIAP)基因对 MG63 细胞凋亡及化疗药物敏感性的影响,并探讨其分子机制。**方法** 构建 XIAP 基因的 shRNA 稳定表达载体,将 MG63 细胞分为空白组(A 组,不作转染),阴性对照空白质粒转染组(B 组,psiRNA-Con 转染组),实验组(C 组,psiRNA-XIAP 转染组),在此基础上又设 A + 阿霉素(doxorubicin,Dox,0.3 μmol)、C + Dox 两化疗药物干预组;Western blot 检测 XIAP 蛋白的表达,MTT 检测细胞的增殖情况,流式细胞术检测细胞周期、凋亡及 Caspase-9 蛋白的表达情况。**结果** 与 A、B 组比较,C 组细胞 XIAP 蛋白水平、细胞增殖活性明显降低($P<0.05$),细胞凋亡率、Caspase-9 蛋白表达及 G_2/M 期细胞明显增多($P<0.05$)。A + Dox 组较 C + Dox 组细胞增殖活性更低,且 Dox 对 A、C 组细胞的抑制呈时间依赖性;Caspase-9 蛋白表达明显增高($P<0.05$);细胞周期出现 G_2/M 为 0,细胞阻断于 S 期。**结论** RNAi 能有效抑制 XIAP 基因表达,抑制骨肉瘤细胞增殖活性,诱导其凋亡,并增加其对化疗药物的敏感性,其机制可能涉及抑制 DNA 合成及 Caspase 家族凋亡信号转导通路的活化。

[关键词] RNA;基因, X 连锁;骨肉瘤;细胞凋亡;细胞周期;药物疗法

[中图法分类号] R73-362; R738.1; R394.3 **[文献标志码]** A

RNAi silencing of XIAP gene induces apoptosis and susceptibility to chemotherapy of osteosarcoma cell line MG63

He Pan[1], Liang Shan[2] ([1] Department of Traumatic Surgery, [2] Clinical Institute of Medicine, People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan Province, 410005, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect RNAi-mediated inhibition of X-linked inhibit apoptosis protein (XIAP) gene on apoptosis and susceptibility to chemical therapy drugs in osteosarcoma cells and its underlying mechanism. **Methods** shRNA plasmid of XIAP gene were constructed. MG63 cells were conventionally cultured and divided into untreated group (group A, non-transfection), blank plasmid group (group B, psiRNA-Con transfected), the experimental group (group C, psiRNA-XIAP transfected), and 2 chemical drug interfered groups, non-transfection + 0.3 μmol Dox group (A + Dox group) and psiRNA-XIAP transfection + 0.3 μmol Dox group (C + Dox group). The XIAP expression in MG63 cells was detected by Western blotting. The proliferation of above-mentioned MG63 cells was examined by MTT assay. Flow cytometry (FCM) was employed to detect the cell apoptosis, cell cycle and Caspase-9 expression. **Results** Group C had a significantly lower protein level of XIAP and MTT value than group A and B ($P<0.05$), and had higher apoptotic rate, stronger Caspase-9 expression and larger percentage of G_2/M arrested cells than group A and B. In C + Dox group, MTT value was more lower and Caspase-9 expression more higher than in A + Dox group ($P<0.05$). There was no cell at G_2/M stage in C + Dox group, and its cell cycle was blocked before S stage. **Conclusion** RNAi could specifically suppress XIAP gene expression, effectively inhibit the proliferation and accelerate the apoptosis of MG63 cells, and enhance its susceptibility to chemical therapy drug. The mechanism may be related to the suppression of DNA synthesis and the activation of Caspase signaling pathway.

[Key words] RNA; genes, X-linked; osteosarcoma; apoptosis; cell cycle; drug therapy

Corresponding author: Liang Shan, Tel: 86-731-82278307, E-mail: liangshan5460@126.com

骨肉瘤细胞可通过对负责细胞生长和凋亡的细胞信息转导通路进行调控从而获得对化疗药的耐药性,甚至是多药耐药。X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibit apoptosis protein,XIAP)已被证实具有重要的抗凋亡作用,它的高表达将使已经恶变的骨肉瘤

[通信作者] 梁 珊,电话:(0731)82278307,E-mail:liangshan5460@126.com

细胞逃避凋亡,进而使肿瘤更趋向于快速、无节制的增长,而其表达和活性异常又能拮抗化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡,导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性下降[1]。RNA 干扰(RNA interference,RNAi)可以特异性和互补地与某一过度表达或有害靶基因 mRNA 序列结合,诱导其降解[2-4],在不影响其他基因功能的情况下达到肿瘤基因治疗的目的。本研究观察 RNAi 技术抑制 XIAP 基因对骨肉瘤 MG63 细胞凋亡、化疗药物敏感性的影响,并对其分子机制做了初步探讨。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

质粒及大肠杆菌购自上海吉凯基因化学技术有限公司。兔抗 XIAP 及二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗 β-actin、小鼠抗人 Caspase-9 单克隆抗体分别购自美国 Santa Cruz 公司,T_4连接酶购自美国 NEB 公司,脂质体 Lipofection™ 2000、二甲基亚砜(DMSO)购自英韦创津公司,凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司,质粒抽提试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,PCR 反应混合物由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与稳定转染　　MG63 细胞购于中南大学湘雅医学院细胞室。将 MG63 细胞以 2×10^5/孔接种于 6 孔板,于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基(含 100 U 青霉素 + 链霉素)中,37 ℃、5% CO_2培养箱中培养 1 d,待细胞融合到 80% 后按 Lipofection™2000 脂质体转染试剂盒行转染,转染 1 d 后,更换新鲜培养液培养 1 d,按 1∶10 传代,加嘌呤霉素至 0.5 μg/ml 筛选阳性克隆并扩大培养 3 周以获得稳定转染。将 MG63 细胞分为空白组(A 组,不作转染),阴性对照空白质粒转染组(B 组,psiRNA-Con 转染组),实验组(C 组,psiRNA-XIAP 转染组),在此基础上又设 A + 阿霉素(doxorubicin,Dox)组、C + Dox 组。

1.2.2　psiRNA-XIAP 质粒的构建　　参考文献[1]中的方法,设计针对 XIAP 基因的短发夹状干扰序列,正义链:5′-TCCCATGTGCTATACAGTCATTACTTCAAGAGAGTAATGACTGTATAGCACATTT-3′,反义链:5′-CAAAAAATGTGCTATACAGTCATTACTCTCTTGAAGTAATGACTGTATAGCACAT-3′;阴性对照正义链:5′-TCCCAGGTGCTAGTACAAGTCCGACTCAAGAGGTCGGACTTGTACTAGCACCTTT-3′,反义链:5′-CAAAAAAGGTGCTAGTACAAGTCCGACCTCTTGAGTCGGACTTGTACTAGCACCT-3′(下划线部分为 XIAP 靶序列)。5′和 3′端引入 *Bbs* Ⅰ酶切位点,颈环结构为 TCAAGAG。B 组和 C 组寡核苷酸经退火后,连接在 psiRNA-hH1 2 个 *Bbs* Ⅰ位点之间,命名为 psiRNA-XIAP 和 psiRNA-Con。以上序列均经上海吉凯基因化学技术有限公司测序证实。

1.2.3　XIAP 蛋白水平检测　　以 β-actin 作为内参照,常规 Western blot 检测 A、B、C 组 XIAP 蛋白水平的变化(抗体浓度 1∶100),用凝胶图像处理系统分析目标带相对灰度值。

1.2.4　细胞增殖分析　　将对数期细胞以 1×10^4/孔接种于 96 孔培养板,每组 6 个复孔(A + Dox 组、C + Dox 组中 Dox 浓度为 0.3 μmol),继续培养 1、2、3 d。按操作说明书行常规 MTT 检测,酶标仪测定 490 nm 处各孔光密度值[D(490)]。

1.2.5　细胞周期及凋亡率分析　　各组 48 h 重悬细胞经 70% 酒精固定后由湖南省人民医院临床医学研究所行流式细胞仪分析各组细胞凋亡率及周期:碘化丙啶(PI)染色法观察凋亡峰(AP 峰)及检测细胞周期、Annexin V-异硫氰酸荧光素 FITC-Annexin V/PI 双标法定量检测凋亡率。电脑自动分析并计算结果。实验重复 6 次。

1.2.6　流式细胞仪测定各组中 Caspase-9 的表达变化　　各组 48 h 细胞,用 PBS 洗涤 2 次。将细胞重悬,体积为 100 μl,加入 20 μl Caspase-9-聚乙烯(PE)直标抗体,以鼠 IgG-PE 抗体作为对照,4 ℃避光孵育 45 min,PBS 洗涤 2 次,24 h 内上流式细胞仪测定。

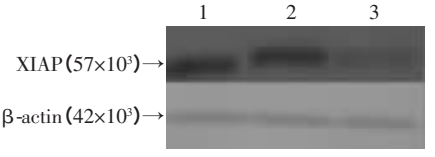
1.3　统计学分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,2 组样本的均数比较采用 t 检验,多个样本均数比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　RNAi 对 XIAP 基因表达的影响

Western blot 结果显示,A 组灰度值为(11.23 ± 1.12),B 组为(12.04 ± 1.17),C 组为(7.44 ± 0.97),C 组明显低于 A、B 组($P<0.05$,图 1)。



1:A 组;2:B 组;3:C 组

图 1　Western blot 检测各组细胞的 XIAP 蛋白表达

2.2　细胞增殖活性

48 h 时 MTT 结果显示,A 组 D(490)值为(0.49 ± 0.01),B 组为(0.43 ± 0.04),C 组为(0.28 ± 0.02)。C 组细胞增殖活性明显低于 A、B 组($P<0.05$),而 A、B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Dox 对 A、C 组骨肉瘤细胞均有抑制增殖的作用,抑制随时间延长而增强,且药物作用 1 ~ 2 d 内的细胞增殖抑制幅度较 2 ~ 3 d 更为明显。在同一时间点,C + Dox 组 D(490)值明显低于 A + Dox 组($P<0.05$)。具体见表 1。

表 1　Dox 对细胞增殖活性的影响[D(490),$n=6$, $\bar{x}\pm s$]

组别	1 d	2 d	3 d
A + Dox 组	0.331 ± 0.02	0.278 ± 0.03	0.200 ± 0.01
C + Dox 组	0.214 ± 0.02	0.110 ± 0.02	0.014 ± 0.01
P 值	0.01	0.01	0.03

2.3　各组细胞 48 h 时流式细胞分析结果

由表 2 可见 A、B 组肿瘤细胞的“G_1峰”,但未检测到“AP 峰”的存在;而在 C 组中,“G_1峰”前有一“AP 峰”出现;在 C + Dox 组,由于强有力的诱导肿瘤细胞凋亡作用,“G_1峰”趋向消失,而“AP 峰”明显出现。

表2 各组细胞48 h时流式细胞分析结果（%，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	凋亡率	G_0/G_1	S	G_2/M
A组	2.53 ± 0.45^a	33.77 ± 5.21^a	48.10 ± 7.28^a	19.28 ± 2.77^a
B组	4.75 ± 0.88^a	35.42 ± 4.59^a	42.89 ± 5.47^a	21.10 ± 3.14^a
C组	40.76 ± 8.96^b	35.21 ± 6.12^b	27.01 ± 4.35^b	38.16 ± 3.56^b
A+Dox组	22.77 ± 5.62^b	45.77 ± 5.62^b	43.89 ± 6.01^b	12.36 ± 2.44^b
C+Dox组	59.32 ± 10.23	78.32 ± 10.23	21.93 ± 4.57	0

a：$P<0.05$，与C组比较；b：$P<0.05$，与C+Dox组比较

2.4 流式细胞测定各组48 h时Caspase-9的表达变化

C组细胞Caspase-9阳性细胞率[(17.14±0.9)%]明显高于A组[(6.35±1.0)%]、B组[(6.48±1.2)%]($P<0.05$)，而A、B组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Dox可增加A、C组骨肉瘤细胞Caspase-9阳性表达，且C+Dox组[(26.37±1.4)%]明显高于A+Dox组[(13.59±1.1)%]($P<0.05$)。

3 讨论

XIAP在大多数肿瘤细胞中高表达，具有明显肿瘤特异性[5,6]，虽然它在正常组织中微量存在，但有资料表明，XIAP缺陷的小鼠具有正常的寿命，没有发现明显的生理学和组织学缺陷[7]，由此可见XIAP是肿瘤基因治疗中的一个比较理想的靶点。

传统化学合成siRNA分子可启动相关蛋白结合到双链RNA，形成RNA诱导的封闭复合物，随后发挥核酸外切酶活性切割mRNA，实现转录后基因沉默，但它相对分子质量小，不稳定，极易被细胞内广泛存在的核酸酶降解，难以达到有效滴度[8]。本实验成功构建的针对XIAP shRNA干扰表达载体，可以在体内持续产生siRNA分子，其颈环结构可以抵挡核酸酶的降解，克服了此不足，为探讨RNAi技术抑制XIAP基因对MG63细胞生长及其对化疗药物敏感性的影响奠定了基础。进一步的Western blot结果证实了C组可以特异性沉默XIAP基因的蛋白表达，本实验结果显示C组较A、B组细胞MTT增殖能力明显下降，凋亡率增高，而A组与B组比较差异无统计学意义($P>0.05$)，从而排除了载体毒性，表明确系RNAi通过沉默XIAP基因表达抑制骨肉瘤细胞增殖，诱导凋亡。

肿瘤的发病和细胞凋亡密切相关。细胞凋亡的主要生物学标志是核酸内切酶和Caspase的活化。细胞凋亡的定量检测主要借助于流式细胞仪(flowcytometry，FCM)，核酸内切酶的活化在其DNA图上表现为正常二倍体G_1峰前出现一低二倍体凋亡峰即AP峰。Annexin V可以特异性地结合凋亡早期从细胞膜内侧迁移至外侧表面的磷脂酰丝氨酸(PS)；而PI能透过凋亡中、晚期细胞和坏死细胞的细胞膜而使细胞核红染。因此，采用FITC-Annexin V/PI双染法可将正常、凋亡、残废细胞区分出来，具有更高的灵敏性。本实验在用PI法观察到“AP峰”出现的同时，为了提高可靠性和便于计算凋亡率，采用FITC-Annexin V/PI双染法检测各组细胞的凋亡率。我们的PI法检测结果中可见A、B组肿瘤细胞的“G_1峰”，但未检测到“AP峰”的存在，而在C组中，“G_1峰”前有一“AP峰”出现。FITC-Annexin V/PI双染定量结果示C组较A、B组凋亡率显著增加。

Caspase-9是Caspase家族中位于最上游的重要成员，它是凋亡途径中的重要起始因子。它与凋亡蛋白水解酶活化因子结合形成复合物后可以首先循环性使Caspase-9活化，继而裂解下游执行Caspase并使之激活，导致细胞凋亡[9,10]。本研究结果显示，C组较A、B组Caspase-9阳性细胞率显著增加，提示RNAi技术抑制XIAP基因诱导骨肉瘤细胞凋亡机制可能与Caspase-9的活化相关。

细胞周期调控机制的失活会导致细胞凋亡失控，使得变异的DNA可不经过修复直接进入细胞周期，为突变的积累、肿瘤的形成创造契机[11,12]。本研究发现XIAP还能对细胞周期进行调控，结果显示C组细胞XIAP基因被RNAi抑制后周期明显改变：S期细胞减少，G_2/M期细胞增多，表明细胞生长被阻滞在G_2/M期检测点，提示RNAi沉默XIAP基因可通过诱导凋亡和细胞周期阻滞而抑制肿瘤细胞生长。

阿霉素(doxorubicin，Dox)为目前应用较为普遍的化疗药物[13]。本研究中，MTT细胞增殖活性和各组细胞48 h时流式细胞分析结果表明RNAi技术抑制XIAP基因与Dox的联合治疗效果明显优于单独Dox或单独RNAi技术抑制XIAP基因治疗效果。在进一步对Dox处理前后的C组、C+Dox组和A组细胞凋亡率的析因分析中发现，RNAi技术抑制XIAP基因可增强骨肉瘤细胞对Dox的敏感性($P<0.05$)，两者协同使疗效更好。有研究[11]表明细胞周期进程中最重要的是从G_1进入S期，此过程的失调是所有癌细胞的共同特征。本实验结果表明Dox的作用与干扰细胞周期亦有紧密联系。FCM结果分析提示，C+Dox方法可能还从抑制DNA合成及启动Caspase家族凋亡信号转导通路来促进肿瘤细胞凋亡的。本实验结果提示：RNAi能有效抑制XIAP基因表达，抑制骨肉瘤细胞增殖活性，诱导其凋亡，并增加其对化疗药物的敏感性，这种基因联合化疗的治疗方式有望成为骨肉瘤治疗的一种新方式。

参考文献：

[1] Spee B, Jonkers M D, Arends B, *et al*. Specific down-regulation of XIAP with RNA interference enhances the sensitivity of canine tumor

cell-lines to TRAIL and doxorubicin[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 34.
[2] Moser J J, Eystathioy T, Chan E K, *et al*. Markers of mRNA stabilization and degradation, and RNAi within astrocytoma GW bodies[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(16): 3619-3631.
[3] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10): 737-747.
[4] Vickers T A, Koo S, Bennett C F, *et al*. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(9): 7108-7118.
[5] Ramp V, Krieg T, Caliskan E, *et al*. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas[J]. Hum Pathol, 2004, 35(8): 1022-1028.
[6] Wilkinson J C, Wilkinson A S, Galban S, *et al*. Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(1): 237-247.
[7] Hu Y P, Cherton-Horvat G, Dragowska V, *et al*. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2826-2836.
[8] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.
[9] Morizane Y, Honda R, Fukami K, *et al*. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO[J]. J Biochem (Tokyo), 2005, 137(2): 125-132.
[10] Marsden V S, Ekert P G, Van-Delft M, *et al*. Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9[J]. J Cell Biol, 2004, 165(6): 775-780.
[11] Liu Q, Hilsenbeck S, Gazitt Y. Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G_1 or G_2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL[J]. Blood, 2003, 101(10): 4078-4087.
[12] 王东, 张沁宏, 仲召阳, 等. 骨肉瘤 DNA 损伤修复相关基因表达与预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(13): 1370-1373.
[13] Swift L P, Rephaeli A, Nudelman A, *et al*. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death[J]. Cancer Res, 2006, 66(9): 4863-4871.

（**收稿**:2009-11-24;**修回**:2009-12-28）
（编辑　张　维）

文章编号:1000-5404(2010)12-1315-01

个案与短篇

老年起病的灰质异位症 1 例

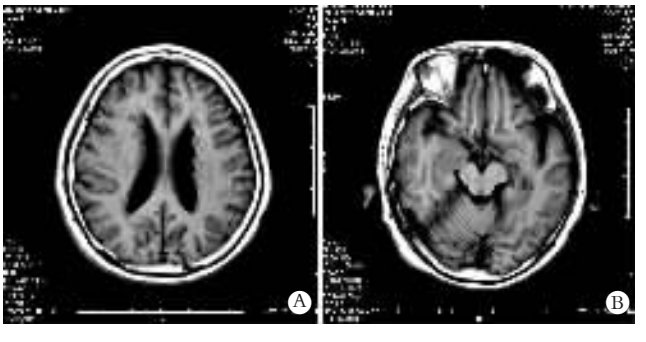
黄　诚,牟　君,董为伟　（400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科）

[关键词] 灰质异位症;老年人;癫痫
[中图法分类号] R742.8　**[文献标志码]** B

脑灰质异位症(heterotopic gray matter,HGM)是指胚胎期神经迁移异常或室周基质内的神经母细胞凋亡失败导致皮质下神经元不能迁移到正常部位所引起的一种皮质发育畸形疾病[1]。临床表现为癫痫、精神和智力发育障碍、神经系统功能缺失三大主征。通常在儿童期或 10~20 岁起病[2],老年发病罕见。我院诊断 1 例 61 岁以癫痫起病,不伴有精神、智力发育障碍及神经系统功能缺失的灰质异位症患者,现报告如下。

1　临床资料

患者,女性,64 岁,因发作性意识丧失 2 个月于 2009 年 12 月 30 日入本院。入院前 2 个月,患者于坐位突然出现头部后仰、双目凝视、牙关紧闭、呼之不应,持续约数分钟,不伴有肢体抽搐、舌咬伤及大小便失禁,发作 2 次。追问病史,入院前 1 年曾有类似发作 1 次,在急诊送往医院途中意识恢复。3 年前患者夜间起床上厕所时突然出现意识丧失,跌倒伴有左上臂骨折,发作时无家属在场,具体发作情况及意识障碍持续时间不详。既往有高血压病史 4 年,最高血压 190/110 mmHg,平时口服厄贝沙坦 150 mg(1 次/d)降压,血压控制理想。个人史:顺产,幼年无高热惊厥史,无头颅外伤史,发育正常,育 1 子 1 女,子女健康。无癫痫家族史。查体:神清,合作,对答切题,记忆、计算、视空间能力、人格正常。颅神经检查阴性,肌力、肌张力正常,腱反射对称,无感觉障碍、共济失调及脑膜刺激征。左下肢巴氏征(+),右下肢巴氏征(±)。头颅、脊柱、关节、四肢未见畸形。心肺腹未查及阳性体征。辅助检查:EEG:可见额叶和颞叶中-高幅 θ 活动、高幅 δ 波、尖波、尖慢波,持续时间 2~5 s,双侧不对称。头颅 MRI 平扫提示双侧侧脑室体部呈波浪状改变,还见到海马萎缩和皮层萎缩(图 1)。头颈部 CTA 提示右侧大脑前动脉 A1 段未见显示,右侧颈内动脉虹吸部局限性狭窄。血、尿、大便常规、肝肾功、电解质、血脂、血糖正常。诊断为继发性癫痫、灰质异位症。患者未服用抗癫痫药物,随访 3 个月无发作。



A:侧脑室体部呈波浪状改变;B:海马、皮层萎缩
图 1　患者头颅 MRI 平扫结果

[通信作者] 牟　君,E-mail:mujun0719@hotmail.com

（下转 1320 页）