论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0582-04

靶向 *survivin* 的 siRNA 对裸鼠肾癌移植瘤生长的影响

刘 富,胡自力 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科)

【摘要】 **目的** 观察生存素(*survivin*)小干扰 RNA(siRNA)在体内是否能抑制肾癌移植瘤体的生长。**方法** BALB/c 雌性裸鼠皮下种植 786-O 细胞,将成瘤阳性的裸鼠按照随机区组法分为 8 组(A~H 组),每组 5 只。选取 2 组 *survivin* 序列特异性双链 RNA(double-stranded RNA,dsRNA),导入裸鼠皮下肾癌移植瘤。观察各组裸鼠体内瘤体生长速度,绘制肿瘤生长曲线,采用 PCR、Western blot 技术测定肿瘤组织的 *survivin* 基因表达水平,原位末端标记技术(TUNEL)检测细胞凋亡。**结果** A 组(*survivin*1 siRNA + 脂质体 + 纯 RPMI1640)、B 组(*survivin*2 siRNA + 脂质体 + 纯 RPMI1640)较其他对照组(C~H 组)裸鼠皮下移植瘤生长缓慢;取出瘤体,肿瘤体积明显缩小($P<0.05$),*survivin* 基因表达下调($P<0.05$),肿瘤组织标本可见大量细胞核呈黄褐色、核质浓缩、细胞形态不规则的凋亡细胞($P<0.01$)。**结论** RNA 干扰明显抑制靶基因 *survivin* 在肾癌 786-O 细胞裸鼠皮下移植瘤中的表达及肿瘤细胞增殖,并诱导细胞凋亡,且特异性好。

【关键词】 RNA 干扰;肾肿瘤;*survivin*;细胞凋亡
【中图法分类号】 R73-362;R730.23;R737.11 【文献标志码】 A

Inhibitory effect of *survivin*-targeting siRNA on transplanted tumor growth of renal carcinoma in nude mice

Liu Fu, Hu Zili (Department of Urinary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of small interfering RNA (siRNA) targeting *survivin* gene on the growth of transplanted tumors of renal carcinoma in nude mice *in vivo*. **Methods** Human renal carcinoma 786-O cells were used to subcutaneously inoculate into BALB/c female nude mice to develop a transplanted tumor model of human renal carcinoma. When the tumor diameter reached 5 to 6 mm, forty tumor-carrying nude mice were randomly divided into eight groups (five for each group). Two groups of the mice were treated by *survivin*-specific double-stranded RNA (dsRNA) *via* intratumoral injection, *i. e.*, group A (pGenesil1.1-*survivin*1) and group B (pGenesil1.1-*survivin*2). Tumor volumes in each group were calculated every day. On the 18th day after the first intratumoral injection, all the mice were sacrificed and the tumors were taken out to undergo RT-PCR and Western blotting to detect *survivin* expression. Tumor cell apoptosis was detected by TUNEL assay. **Results** The mice in groups A and B indicated slower tumor growth, significantly smaller tumor volume ($P<0.05$), and lower *survivin* expression level ($P<0.05$) in comparison with those in the control groups. The TUNEL results showed a large amount of apoptotic cells with tawny nuclei, condensed chromatin and irregular cell shapes in groups A and B ($P<0.01$). **Conclusion** RNA interference can obviously and specifically down-regulate *survivin* gene expression, inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in the transplanted tumors of human renal carcinoma in nude mice.

【**Key words**】 RNA interference; renal cancer; *survivin*; apoptosis

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau(2008-2-228). Corresponding author: Hu Zili, E-mail: huzili6767@163.com

肾癌占成人恶性肿瘤的2%~3%,是泌尿系统肿瘤中是最致命的,在肾癌中以肾透明细胞癌最多见[1]。由于肾透明细胞癌对化疗、放疗均不敏感,免疫治疗也难以取得理想效果,目前只有手术是较可靠的治疗手段,生物治疗已成为研究的热点[2]。*survivin* 蛋白是近年来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins,IAP)家族的新成员[3],其在多数恶性肿瘤组织中表达丰富,但在正常成人组织中不表达,这种选择性表达特性使其成为目前恶性肿瘤诊断和治疗的新靶点。我们曾用 RNA 干扰(RNAi)抑制体外培养的

【基金项目】 重庆市卫生局项目(2008-2-228)
【通信作者】 胡自力,E-mail:huzili6767@163.com

人肾癌 786-O 细胞 *survivin* 基因表达及抑制肿瘤细胞生长,取得了很好效果[4]。本实验选择人肾癌 786-O 细胞株建立裸鼠人肾癌细胞移植瘤模型,并选取本课题组已构建并经体外实验证实有最好干扰效果的 2 组 *survivin* 序列特异性双链 RNA,将其导入裸鼠皮下肾癌移植瘤,观察其对人肾癌细胞 *survivin* 基因表达和肿瘤生长的影响,为肾癌的基因治疗探索新策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,M-Mulv Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司,Trizol 试剂购自 Gibco 公司,一抗兔抗人 *survivin* 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,去内毒素质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司,TUNEL 试剂盒购自美国罗氏公司,蛋白提取的 RIPA 裂解液、Western 化学发光试剂盒均购自碧云天公司,标准小牛血清购自杭州四季青生物工程公司。

1.1.2 细胞株 人肾癌 786-O 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.1.3 实验动物 BALB/c 雌性裸鼠 50 只,4 ~ 5 周龄,体质量约 20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于中国人民解放军第三军医大学野战外科研究所实验动物中心的高度洁净的 SPF 环境中[实验动物合格证号:SCXK(京)2007-0001]。

1.1.4 siRNAs 的设计与合成 根据 *survivin* 基因在 GenBank 中的序列及本课题组已构建并经体外实验证实有最好干扰效果的 2 组阳性 siRNA[4] (*survivin*1 5′-GGACCACCGCATCTCTACA-3′,长度 166 bp;*survivin*2 5′-GGCTGGCTTCATCCACTGC-3′,长度 241 bp)和 1 组阴性对照(HK 5′-GACTTCATAAGGCGCATGC-3′),将其转录模板与 pGenesil1.1(带 GFP 基因及 neo 基因)连接并转化入大肠杆菌 DH5α 菌株(武汉晶赛公司完成)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 786-O 细胞常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,37 ℃,5% CO_2 孵箱中。

1.2.2 人肾癌 786-O 细胞裸鼠体内成瘤实验 收集体外培养的对数生长期 786-O 细胞,调整细胞数为 3×10^7/ml,取 0.2 ml(含 6×10^6 个细胞)注入 10 只裸鼠右前肢皱皱褶处皮下,6 ~ 7 周后瘤块出现。处死 10 只裸鼠,无菌条件下将瘤体剪成 0.1 cm^3 小块后吸入套管针,将瘤块穿刺至 40 只裸鼠右前肢皱褶处皮下,接种 1 周后即可出现皮下肿瘤结节。

1.2.3 实验动物分组及给药 肿瘤接种后 10 d,肿瘤长径长至 0.5 cm 时,将肾癌移植瘤小鼠按随机区组法分成 8 组(A ~ H 组),每组 5 只。并且在肿瘤接种后 10 d 按以上分组进行瘤内注射,每隔 2 d 注射 1 次,共 6 次,注射液的配制见表 1。药物处理后,于开始药物处理后的第 18 天处死所有裸鼠,取瘤组织待测。

1.2.4 裸鼠肿瘤体积测定 隔 2 d 观察裸鼠皮下移植瘤大小及全身情况,并用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b),计算肿瘤体积:$V(mm^3) = ab^2/2$,绘制肿瘤生长曲线。

表 1 各组裸鼠所用注射液(RNAi)的配制情况

组别	*survivin*1 siRNA (μg)	*survivin*2 siRNA (μg)	HK siRNA (μg)	脂质体(μl)	纯 RPMI1640 (μl)	生理盐水 (μl)	总量 (μl)
A	40	0	0	40	70	0	150
B	0	40	0	40	70	0	150
C	0	0	40	40	70	0	150
D	40	0	0	0	110	0	150
E	0	40	0	0	110	0	150
F	0	0	40	0	110	0	150
G	0	0	0	40	110	0	150
H	0	0	0	0	0	150	150

1.2.5 RT-PCR 检测 *survivin* mRNA 水平 取瘤组织按 Trizol 说明书提取各组组织总 RNA,用凝胶电泳分析 RNA 纯度并用紫外分光光度计测量 RNA 的浓度,并反转录为 cDNA。按 M-Mulv Reverse Transcriptase 说明进行反应。*survivin* 上游引物 5′-TACAGCTTCGCTGGAAACCT-3′,下游引物 5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′,扩增产物大小 251 bp;β-actin 上游引物 5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′,下游 5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′,扩增产物大小为 587 bp。PCR 反应条件 94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,循环 35 次,72 ℃延伸 10 min。电泳条带经 Quantity One 软件处理,各组的 *survivin* 条带/β-actin 条带灰度值比值作为其 *survivin* mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Western blot 检测 *survivin* 蛋白表达水平 取瘤组织,按 RIPA 裂解液说明书提取总蛋白,Bradford 法测蛋白浓度,一抗兔抗人 *survivin* 多克隆抗体及 β-actin,4 ℃孵育过夜,用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h 后,增强化学发光(ECL)法曝光、显像,再经 NIH Image Software 扫描胶片上的条带,Quantity One 图像分析软件测定灰度值。

1.2.7 TUNEL 检测肿瘤组织细胞的凋亡 根据 TUNEL 反应检测试剂盒说明书操作。镜下观察,并数 5 个以上高倍视野,每个视野 200 个细胞,计数 1 000 个细胞,阳性细胞数以百分数表示,即为肿瘤细胞凋亡指数(AI)。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据两两比较采用 t 检验,多组之间比较用方差分析。

2 结果

2.1 siRNA 对裸鼠人肾癌皮下移植瘤体积的影响

注射治疗前 8 组裸鼠的肿瘤大小(肿瘤接种后 10 d)基本一致。从肿瘤接种后第 10 天治疗开始,随着时间的延长,从肿瘤接种后的第 19 天(第 4 次注射药物)开始至肿瘤接种后第 28 天,A、B 组肿瘤体积显著小于 C、D、E、F、G、H 组($P < 0.05$),而 A、B 组及 C、D、E、F、G、H 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。并于药物处理后的第 18 天,处死所有裸鼠取出肿瘤,肉眼观察可见 A、B 组较 C、D、E、F、G、H 组肿瘤体积明显缩小。

2.2 siRNA 对裸鼠人肾癌移植瘤 *survivin* mRNA 表达的影响

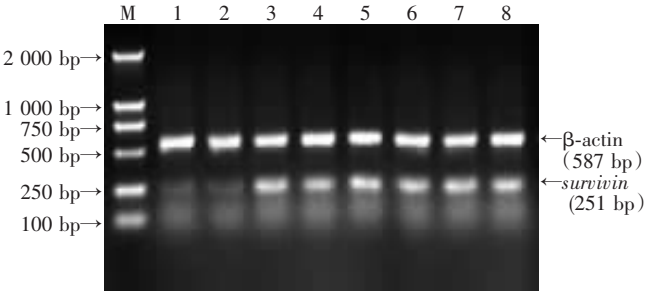
各组肿瘤组织 RNA 抽提后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示出 28S、18S、5S 的 3 条电泳条带,在紫外光栅分光光度计测

表2 肿瘤接种第10天后不同时间点各组裸鼠瘤体内肿瘤体积变化（mm^3，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	10 d	13 d	16 d	19 d	22 d	25 d	28 d
A	81.45±8.61	220.28±35.07	236.46±24.90	281.84±24.91	515.36±17.03	590.17±35.88	675.55±83.23
B	80.18±4.67	225.82±15.92	238.43±16.92	284.84±14.06	506.14±11.39	591.49±27.12	660.69±76.95
C	81.81±5.30	234.64±13.60	243.60±13.99	610.42±75.47[ab]	793.00±74.47[ab]	1451.34±91.45[ab]	1942.95±249.41[ab]
D	75.26±3.99	225.14±13.86	236.88±16.38	614.15±89.71[ab]	800.37±75.78[ab]	1460.36±115.08[ab]	2111.23±243.38[ab]
E	76.22±3.48	217.45±9.67	236.45±10.63	617.97±69.42[ab]	807.72±54.45[ab]	1473.85±98.72[ab]	2175.17±315.69[ab]
F	78.49±5.60	239.67±9.46	254.36±12.91	607.79±79.45[ab]	803.55±62.95[ab]	1507.67±69.11[ab]	2041.72±236.50[ab]
G	80.03±4.38	233.58±15.69	248.95±15.92	632.34±60.21[ab]	821.45±58.12[ab]	1528.67±103.14[ab]	1977.16±324.24[ab]
H	81.30±2.58	230.70±18.89	252.09±13.83	615.24±75.21[ab]	810.11±77.92[ab]	1542.30±118.09[ab]	2127.50±306.00[ab]

a：$P<0.05$，与A组比较；b：$P<0.05$，与B组比较

定$D(260)$、$D(280)$，计算$D(260)/D(280)$，均在1.9～2.0。说明提取的组织RNA的完整性和纯度可以满足后续实验要求。经RT-PCR扩增后，可见β-actin扩增片段大小为587 bp，各组电泳条带无明显变化。A组*survivin*/β-actin灰度值比值（0.424 5±0.043 2）、B组（0.467 5±0.043 9）明显弱于C（0.676 6±0.1731）、D（0.691 7±0.080 6）、E（0.812 0±0.107 6）、F（0.684 4±0.094 9）、G（0.694 0±0.0693）、H组（0.722 9±0.726 0）（$P<0.05$），而A、B组之间及C、D、E、F、G、H组之间无统计学意义（$P>0.05$）。见图1。

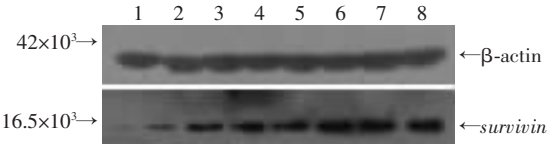


M：DNA标准（DL 2000）；1～8：A～H组

图1 各组裸鼠瘤体内注射RNAi后肿瘤组织*survivin* mRNA表达的变化

2.3 siRNA对裸鼠人肾癌移植瘤*survivin*蛋白表达的影响

A组*survivin*/β-actin灰度值比值（0.056 1±0.032 5）、B组（0.128 0±0.042 7）明显小于C（0.359 3±0.048 5）、D（0.390 9±0.080 0）、E（0.417 4±0.083 0）、F（0.432 8±0.059 6）、G（0.385 5±0.093 9）、H组（0.444 1±0.020 7）（$P<0.05$），而A、B组之间以及C、D、E、F、G、H组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图2。

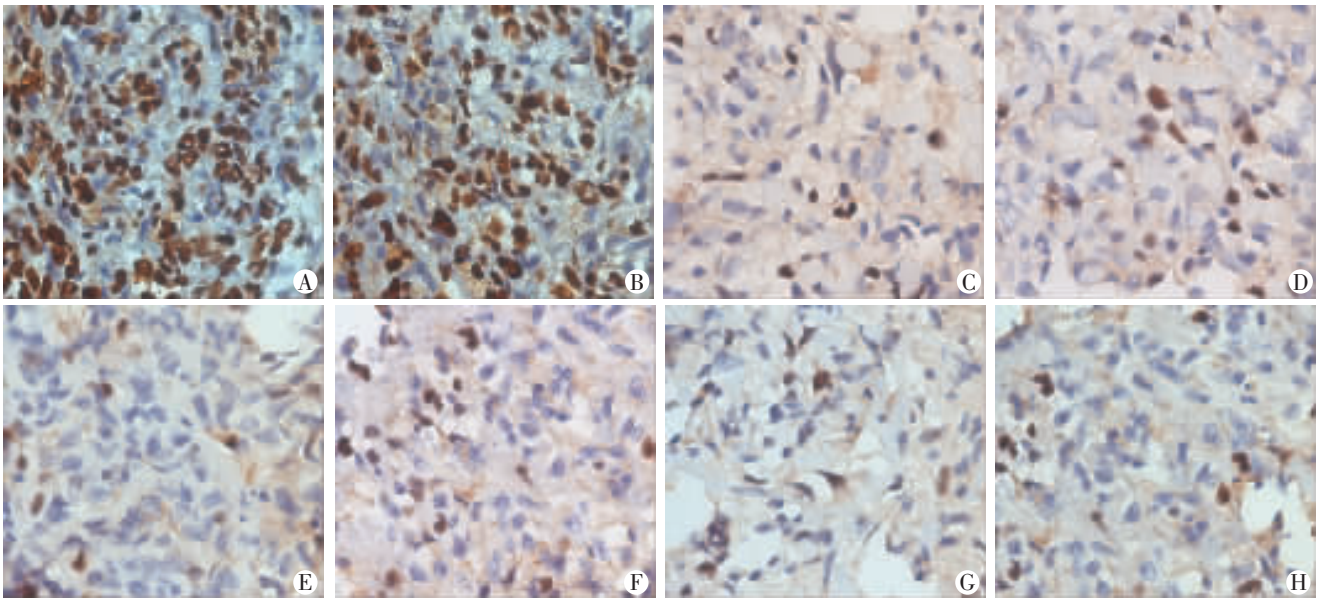


1～8：A～H组

图2 Western blot检测各组裸鼠瘤体内注射RNAi后肿瘤组织*survivin*蛋白表达的变化

2.4 siRNA对裸鼠人肾癌移植瘤凋亡的影响

TUNEL反应后显微镜下观察，阳性细胞细胞核呈黄褐色，核质浓缩，细胞形态不规则，阴性则无细胞形态学变化，不着色或轻微染色。A[（40.97±5.47）%]、B组[（38.62±3.35）%]移植瘤凋亡指数明显高于C[（10.76±1.50）%]、D[（11.26±1.87）%]、E[（10.67±3.16）%]、F[（11.17±1.76）%]、G[（11.20±3.38）%]、H组[（10.96±2.47）%]（$P<0.01$），而A、B组之间及C、D、E、F、G、H组之间差异无统计学意义（$P>0.01$）。见图3。



A～H：A～H组

图3 各组裸鼠瘤体内注射RNAi后肿瘤组织细胞凋亡情况（TUNEL ×400）

3 讨论

肾癌是泌尿外科常见的恶性肿瘤,其治疗以外科手术切除为主,这给晚期肾癌的治疗带来一定的困难[1]。生物治疗在临床上应用比较多且效果比较肯定[5]。基因治疗是生物治疗的一种,近年来对基因治疗的应用研究逐渐成为肾癌特别是中晚期肾癌新疗法的研究热点,并取得了一系列进展[6-7]。

survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子,位于人染色体17q25上,表达于几乎所有的人类肿瘤中,如肾癌、肺癌、胰腺癌等,而不表达于正常终末分化的组织和细胞[8-11]。*survivin* 通过一种BIR依赖性的方式与caspase-3和caspase-7相结合而抑制多聚ADP核糖聚合酶(poly ADP-ribose-polymerase,PARP)裂解,从而抑制凋亡[12-14],并通过促进细胞增殖和细胞分裂及血管形成,对肿瘤发生、发展、转归起重要作用[15-16]。因此 *survivin* 已经成为肿瘤基因治疗很有价值的靶点。

本实验选取的2组 *survivin* 序列特异性双链RNA能有效抑制裸鼠肾癌移植瘤的生长:采用RT-PCR检测注射RNA干扰药物A(*survivin*1 siRNA+脂质体+纯RPMI1640)、B(*survivin*2 siRNA+脂质体+纯RPMI1640)后,出现 *survivin* mRNA沉默,而其他组 *survivin* mRNA仍持续表达(图1);采用Western blot同样检测到了注射RNA干扰药物A(*survivin*1 siRNA+脂质体+纯RPMI1640)、B(*survivin*2 siRNA+脂质体+纯RPMI1640)后,出现 *survivin* 蛋白下调,与mRNA改变一致,其他组中肿瘤组织蛋白未见改变(图2);采用TUNEL发现注射RNA干扰药物A(*survivin*1 siRNA+脂质体+纯RPMI1640)、B(*survivin*2 siRNA+脂质体+纯RPMI1640)后,肿瘤组织细胞凋亡增加,其他组中肿瘤组织细胞凋亡少(图3)。综上结果说明 *survivin*1 siRNA、*survivin*2 siRNA干扰 *survivin* 表达,进而影响肾癌移植瘤的生长。本实验中还发现注射D(*survivin*1 siRNA+纯RPMI1640)、E(*survivin*2 siRNA+纯RPMI1640)、G(脂质体+纯RPMI1640)不会抑制肾癌组织 *survivin* 表达,与体外转染需要脂质体和纯RPMI1640一致,也进一步说明 *survivin*1 siRNA、*survivin*2 siRNA干扰 *survivin* 表达。

我们曾发现RNAi可在体外抑制786-O细胞 *survivin* 基因表达,进而抑制细胞增殖[4]。为明确其体内抑瘤作用,我们建立肾癌移植瘤模型,将RNAi导入移植瘤中,进一步研究RNAi在体内对移植瘤 *survivin* 细胞表达、细胞凋亡及肿瘤生长的影响。本实验中,RNA干扰药物 *survivin*1 siRNA、*survivin*2 siRNA对肾癌组织 *survivin* 表达均有抑制作用,并可诱导人肾癌荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡,使肿瘤生长受抑,而阴性组和其他对照组无此作用。虽然,已经证实 *survivin* siRNA抗肿瘤作用,但还有很多的研究工作需要进一步实施,如 *survivin* siRNA的体内毒理学、脂质体的自身毒性问题等。

综上所述,通过体内外研究均表明 *survivin* 为靶基因的RNAi能特异性抑制 *survivin* 的表达,为以 *survivin* 为靶基因的肾癌基因治疗奠定了良好的理论基础。

参考文献:

[1] 郭应禄,周利群. 坎贝尔——沃尔什泌尿外科学[M]. 第9版. 北京:北京大学医学出版社,2009:1668-1725.
[2] Cohen H T, McGovern F J. Renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2005, 353(23):2477-2490.
[3] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8):917-921.
[4] 徐斌,胡自力. RNA干扰技术特异性抑制肾癌survivin表达的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(9):1080-1083.
[5] Bleumer I, Oosterwijk E, De-Mulder P, *et al*. Immunotherapy for renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2003, 44(1):65-75.
[6] Lee J W, Bae S H, Jeong J W, *et al*. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions[J]. Exp Mol Med, 2004, 36(1):1-12.
[7] Hirota E, Yan L, Tsunoda T, *et al*. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2006, 29(4):799-827.
[8] 宫大鑫,何舜发,孙志熙,等. Survivin在肾癌组织和肾癌细胞系中的表达及意义[J]. 中国医科大学学报,2008,37(1):116-118.
[9] 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.
[10] 王珍珍,周云,王文玉,等. 非小细胞肺癌组织中Survivin蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2010,45(4):653-654.
[11] 胡华梅,杨晓亚,熊刚,等. 食管鳞状细胞癌survivin表达与其CpG岛甲基化的研究[J]. 第三军医大学学报,2010,32(1):13-15.
[12] Vegran F, Boidot R, Oudin C, *et al*. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance[J]. Bull Cancer, 2005, 92(3):219-226.
[13] Kappler M, Taubert H, Bartel F, *et al*. Radiosensitization, after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation, is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt-p53 sarcoma cell line, but not in a mt-p53 sarcoma cell line[J]. Oncol Rep, 2005, 13(1):167-172.
[14] Takata-Tomokuni A, Miura Y, Hyodoh F, *et al*. Dysregulation of Fas and related molecules in silicosis patients[J]. Nippon Eiseigaku Zasshi, 2005, 60(1):30-37.
[15] Mu D, Chen W, Yu B, *et al*. Calcium and survivin are involved in the induction of apoptosis by dihydroartemisinin in human lung cancer SPC-A-1 cells[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2007, 29(1):33-38.
[16] Miao G Y, Lu Q M, Zhang X L. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8):1170-1174.

(收稿 2010-10-22 修回 2010-12-23)
(编辑 栾 嘉)