基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1145-04

RNAi 沉默 livin 基因表达对胶质瘤 U251 细胞增殖的影响

兰胡翔,霍 钢,郑履平
(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)阻断胶质瘤 U251 细胞中 livin 基因的表达,研究 livin 基因沉默后对细胞生长和细胞凋亡的影响。方法:将合成的 DNA 正义链及反义链变性、退火,形成的双链 DNA 与 pSilencer2.0 线性质粒以 T4DNA 连接酶连接,重组质粒经酶切鉴定后,用脂质体法转染胶质瘤 U251 细胞,通过 RT-PCR、免疫印迹检测干扰效果。MTT 法检测细胞生长的影响,流式细胞仪检测转染后胶质瘤 U251 细胞的凋亡变化。结果:酶切证实设计合成的 DNA 片段已正确插入载体。RT-PCR、免疫印迹检测实验表明:pSilencer2.0-liv1、pSilencer2.0-liv2 重组载体均能有效地阻断胶质瘤 U251 细胞中 livin 基因的表达,使 livin 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达明显下调($P<0.01$),后者抑制效果更佳。转染后的 U251 细胞生长速度明显变慢。转染 pSilencer2.0-liv2 实验组细胞的凋亡增加了 17.0%。结论:重组真核载体能有效抑制 U251 细胞的 livin 表达,抑制细胞的增殖,诱导细胞凋亡。

【关键词】RNA 干扰;livin;胶质瘤细胞
【中国图书分类法分类号】R739.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-19

Effects of RNAi-silenced livin gene on glioma cell lines U251

LAN Hu-xiang, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic expression vectors by using the pSilencer2.0 vector for inhibiting human livin gene by RNA interference, and to detect the effect of the silenced livin gene on the growth and apoptosis of U251 cells. *Methods*: Two target gene segments were synthesized and cloned into the pSilencer2.0 vector respectively to construct two recombinant eukaryotic expression vectors: pSilencer2.0-liv1 and pSilencer2.0-liv2, both of which were identified by enzyme digestion analysis. Then the U251 cells were transfected with the recombinant vectors and the interfering effects were detected by RT-PCR and Western blot. The proliferation of the U251 cells was detected by MTT method and their apoptosis index detected by flow cytometry. *Results*: The results of Enzyme digestion analysis showed that two target segments were cloned into pSilencer2.0 vectors. The results of RT-PCR and Western blot indicated that pSilencer2.0-liv1 and pSilencer2.0-liv2 vectors could knock down the transcription and expression of livin gene, but the effect of pSilencer2.0-liv2 vectors was better than that of the pSilencer2.0-liv1 vectors. Obvious decrease in growth of the U251 cells was observed after transfected with pSilencer2.0-liv1 and pSilencer2.0-liv2 vectors, along with 17% increase of the apoptosis index in the U251 cells transfected with pSilencer2.0-liv2 vectors. *Conclusion*: The transcription and expression of livin gene were inhibited effectively in the glioma cell line U251. *After transfected with pSilencer2.0-liv2 vectors, the apoptosis index of the U251 cells was increased and the growth inhibited.*

【Key words】RNA interference; Livin; Glioma cell

肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡所致,受体内外多因素调控,靶向治疗有其明显的特异性强和副作用少等优势。Livin 是新近发现的凋亡抑制蛋白家族(Inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)成员之一,它具有凋亡抑制蛋白家族的特征性结构—BIR 结构域。这一结构域介导了 Livin 与 caspase-3、7、9 的直接结合,从而阻断 caspase 凋亡作用的发挥,达到抑制细胞凋亡的作用。

RNA 干扰(RNA interferenc,RNAi)是指双链 RNA 介导的、序列特异的转录后基因沉默的过程。它作为新兴的基因阻断技术,目前已广泛应用于基因功能及基因治疗的相关研究。本研究用真核转录载体 pSilencer2.0-U6 在胶质瘤细胞系 U251 细胞内表达针对 livin 基因的短发卡状 RNA(Short hairpin RNA,shRNA),以阻断细胞中 livin 基因的表达,研究 livin 基因沉默后对 U251 细胞凋亡、细胞生长产生的影响。

作者介绍:兰胡翔(1982-),男,硕士,
研究方向:恶性胶质瘤的基础与临床。
通讯作者:霍 钢,男,副教授,E-mail:xiaomin198171@tom.com。

1 材料与方法

1.1 材料

pSilencer2.0-U6 质粒购自 Ambion 公司;livin 特异性DNA 片段由 invitrogen 公司合成; DL2000Marker、*BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ限制性内切酶、T4DNA 连接酶、反转录 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司;去内毒素质粒抽提试剂盒购自博大泰克公司;DMEM F12 培养液为 Gibco 产品;标准胎牛血清购自天津 TBD 公司;一步法 RNA 提取试剂 Trizol、转染试剂 Lipo-fectamine2000 购自 Invitrogen 公司;U251 细胞株、DH5α 菌种为本室保存;兔抗人 β 肌动蛋白、livin 多克隆抗体购自 santancruz 公司;二抗(羊抗兔)和 ECL 显色液为中杉公司产品;AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒为南京凯基公司产品。

1.2 方法

1.2.1 livin siRNA 序列设计 根据 GENBANK 中报道的 livin 的 cDNA 序列(BC014475)参考 ambion 公司 siRNA 设计原则和在线设计分析(http://www.ambion.com)分别设计 2 对 siRNA 干扰序列。序列 1,正义链: 5'-GATCCGGAAGAGACTTTGUCCACATTCGTGTGGACAAAGTCTCTTCCTTTTTTGGAAA-3';反义链:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGAAGACACTTTGUCCACACGAATGTGGACAAAGTCTCTTCCG-3'。序列 2,正义链:5'-GATCCAAGGAAGAGACTTTGTCCATTCGTGGACAAAGTCTCTTCCTTTTTTTTGGAAA-3';反义链:5'-AGCTTTTCCAAAAAAAAGGAAGAGACTTTGTCCACGAATGGACAAAGTCTCTTCCTTG-3'。划线部分为 livin 基因特异性序列,序列经同源性分析后,提交 invitrogen 公司合成。按质粒说明书方法将合成的 DNA 正义链及反义链变性、退火, 形成的双链 DNA 与 pSilencer2.0 线性质粒连接,连接产物转化 DH5α 感受态菌种, LB 平板(AMP+)筛选阳性克隆,摇菌抽提质粒进行 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切及琼脂糖电泳鉴定。将 2 个重组质粒分别命名为 pSilencer2.0-liv1 、pSilencer2.0- liv22,阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC(公司提供)。

1.2.2 实验分组 共设 4 个实验组,分别为 pSilencer2.0 -liv1 转染组 、pSilencer2.0-liv2 转染组及阴性对照质粒 pSilencer 2.0-NC 转染组,同时以未转染质粒的 U251 细胞为未转染对照组,同步进行实验。

1.2.3 重组质粒转染 U251 细胞 用去内毒素质粒提取试剂盒提取各重组质粒,并于核酸分析仪上测定浓度。将 U251 细胞按 1×10^5 个/孔的数量转种于 6 孔培养板,DMEM F12 培养液(含 10%胎牛血清, 100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素), 37℃、5%CO_2 培养细胞密度至 60%～80%时,更换无抗生素、无血清的 RPMI1640 培养液继续培养 6 h,分别用重组质粒 pSilencer2.0-liv1、pSilencer2.0-liv2 及阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染 U251 细胞,以未转染质粒的 U251 细胞为对照组。各转染组每孔质粒用量为 2.0μg,脂质体用量为 5.0μl。转染后 5 h 后更换为含 10%血清无抗生素 DMEM F12 培养液终止转染。

1.2.4 抑制率的计算 RT-PCR 转染后 24 h,提取各组 U251 细胞总 RNA 并定量,各实验组取大致等量的 RNA 反转录后进行 PCR。Livin PCR 引物正义链: 5'-TTTCTCAAGGACCACCGCATCT-3',反义链:5'-GCGCACTTTCTCCGCAGTTTC-3',产物长度 359 bp。内参照物为 GAPDH PCR 引物正义链:5'-ACCACAGTCCATGCCAGCAC-3',反义链:5'-TCCACCACCCTGTTGCAGTA -3',产物长度 278 bp。PCR 反应条件:95℃ 变性 4min;94℃ 30 s,60.5℃ 30 s,72℃ 35 s,循环 35 次;72℃ 延伸 7 min。产物经 2.0%琼脂糖电泳后于 CHERM I-IMAGER 5500 图像分析系统分析。Livin mRNA 表达抑制率计算:抑制率 = [1-(siLIV-livin 条带灰度/siLIV-GAPDH 条带灰度)/(livin 条带灰度/GAPDH 条带灰度)]×100%。

1.2.5 细胞总蛋白的提取及免疫印迹实验 转染后 72 h 提取各组细胞总蛋白并定量,调整蛋白浓度至大致相同水平进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后,凝胶按操作说明装入半干电转印仪,60 mA 电转 40 min 后, PVDF 膜加 5%脱脂奶粉封闭;加 1:1 000 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)稀释的抗 livin 抗体,抗 β 肌动蛋白抗体 4℃过夜;PBS Tween220 洗涤,加 1:4 000 稀释的二抗室温 60 min;PBS Tween220 洗涤后 ECL 化学发光显影。CHERMI-IMAGER 5500 图像分析系统分析结果。

U251 livin 蛋白表达抑制率计算:抑制率(%) =[1-(U251-siLIV-livin 条带灰度/U251-siLIV-β-actin 条带灰度)/(U251 livin 条带灰度/U251 β-actin 条带灰度)]×100%。

1.2.6 检测转染后 U251 细胞生长曲线的变化 消化下各组 U251 细胞,按 3×10^3 个/孔的数量转种于 96 孔培养板,设 4 个时间点(24、48、72、96 h),每个点设 6 个复孔,DMEM F12 培养液(含 10%胎牛血清,无抗生素) 37℃、5%CO_2 培养至各时间点,MTT 法检测吸光度。

1.2.7 转染后细胞凋亡的检测 转染后 72 h,消化下 psilencer 2.0-NC 和 psilencer2.0-liv2 组 U251 细胞,PBS 洗涤,调整细胞数为(2～10)×10^5 个/ml,使用 AnnexinV-F ICT/PI 双染色法凋亡检测试剂盒按操作说明进行凋亡染色,上流式细胞仪检测细胞凋亡,细胞计数均大于 1×10^4 个。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 10.0 统计分析软件,各实验组 U251 细胞的凋亡率的比较使用 χ^2 检验,其他数据进行方差分析,实验组间的多重比较使用 SNK2q 检验。

2 结 果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

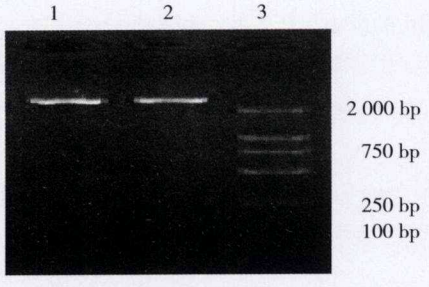
将重组质粒一起进行双酶切(*Hind* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ),同时进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1,重组质粒双酶切可见 2 个条带,大片段与载体 pSilencer2.0 大小(3 200 bp)一致,而小片段与目的基因大小(58 bp)一致,上述结果证明重组质粒构建成功,见图 1。

酶切鉴定结果表明，各序列已成功插入了 pSilencer2.0 载体。

2.2 转染后 U251 细胞中 livin 的表达

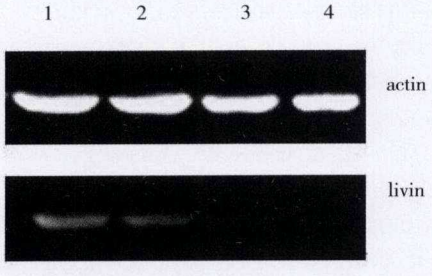
2.2.1 RT-PCR 检测转染后 24 h U251 细胞中 livin 的表达 图像扫描分析结果显示，与未转染组相比，pSilencer2.0-liv1、pSilencer 2.0-liv2 重组质粒转染的 U251 细胞的 livin mRNA 水平明显下调，livin 的灰度值、峰高及密度均明显降低（$P<0.01$）。livin mRNA 水平受到明显抑制，抑制分别达 20.7%、31.9%。pSilencer2.0-NC 转染的 U251 细胞相比于未转染组 livin mRNA 水平无明显。各组间 livin 的 mRNA 水平见图 2。

2.2.2 免疫印迹实验检测转染后 72 h U251 细胞中 livin 的表达 转染 72 h 后，与未转染重组质粒的 U251 细胞相比，pSilencer2.0-liv1 和 pSilencer2.0-liv2 重组质粒转染的 U251 细胞，livin 蛋白总量明显下调。蛋白抑制率分别为 40.4%和 62.3%。未转染对照组和 pSilencer2.0-NC 质粒转染组的 U251 细胞 livin 的总蛋白水平无明显差别。各组间 β-actin 和 livin 蛋白表达水平见图 3。



1. *Hind* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ 酶切 pSilencer2.0-liv1；2. *Hind* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ酶切 psilencer2.0-liv2；3. DNA marker

图 1 重组载体 pSilencer2.0 的酶切鉴定



1. 未转染；2. pSilencer2.0-NC 转染；3. pSilencer2.0-liv1 转染；4. pSilencer2.0-liv2 转染

图 3 转染后 72 h U251 细胞中 livin 及 β-actiion 的免疫印迹实验结果

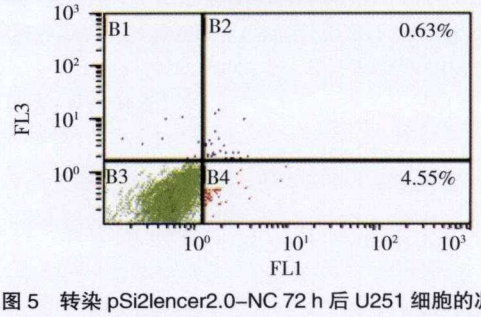


图 5 转染 pSi2lencer2.0-NC 72 h 后 U251 细胞的凋亡率

2.3 转染后 U251 细胞生长曲线的变化

与 pSilencer2.0-NC 转染组和未转染组相比，转染后 24、48、72、96 h，pSilencer2.0-liv1 和 pSilencer2.0-liv2 重组质粒转染组的 MTT 法检测的吸光度明显低于 pSilencer2.0-NC 转染组和未转染组（$P<0.01$），表明这 2 组的 U251 细胞的生长速度明显变慢（图 4）。

2.4 流式细胞仪检测

前述研究结果表明重组质粒 pSilencer2.0-Liv2 较 pSilencer2.0-liv1 重组质粒转染的 U251 细胞 livin 蛋白表达的抑制效果更佳，该检测项中以重组质粒 pSilencer2.0-liv2 组为研究对象。结果显示，转染 72 h 后 U251 的凋亡率为22.0%，而 pSi2lencer2.0-NC 质粒转染的 U251 细胞的凋亡率为 4.5%。（图 5、6）pSilencer2.0-liv2 重组质粒转染后细胞凋亡率明显上升（$P<0.01$）。



M. DNA 标准（DL 2 000）；1. 未转染；2. pSilencer2.0-liv1 转染；3. pSilencer2.0-liv2 转染；4. pSilencer2.0-NC 转染

图 2 转染后 24 h U251 细胞中 livin 的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

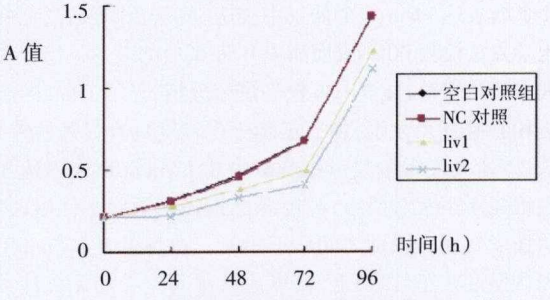


图 4 转染后各组 U251 细胞生长曲线

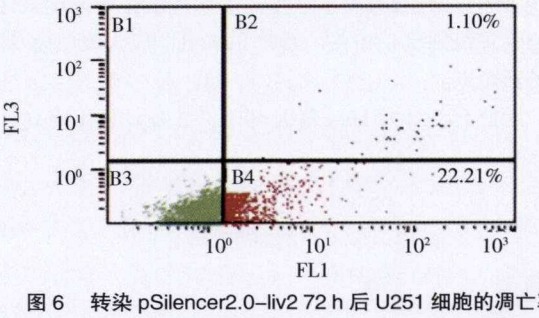


图 6 转染 pSilencer2.0-liv2 72 h 后 U251 细胞的凋亡率

3 讨 论

RNA 干扰是自然界生物体的一种遗传现象，其主要是利用双链 RNA 特异性介导其互补同源 mRNA 序列的降解，从而特异性抑制目的蛋白的表达，抑制作用强[1]。RNAi 具有高效、特异性，且 siRNA 的引入避免了 dsRNA 对哺乳动物细胞的毒性反应和诱导非特异性的干扰素激活途径。

细胞凋亡和细胞周期调控异常是恶性肿瘤无限增殖的重要原因。Livin 含有 IAPs 家族成员特有的 BIR 和 RING 指结构域。Livin 抑制细胞的程序化死亡(Programmed cell death，PCD)即凋亡是通过直接抑制凋亡蛋白酶(caspases)而实现的。Vueie 等[2]研究发现 Livin 可与 caspase3，caspase9 及 caspase9 前体发生免疫共沉淀现象，由此推断 livin 可以通过抑制caspase3 及 caspase9 的活性而抑制细胞发生凋亡。Kasof 等[3]用[35-]S- 甲硫氨酸标记的 livin 与活化的 caspase3 及 caspase7 混合孵育后，再用 caspase3 及 caspase7 抗体检测发现这两种 caspase 明显减少。这进一步说明 Livin 抑制细胞凋亡的作用是通过抑制 caspases 的活性而达到的。Livin 还能通过与 SMAC 结合而中和 SMAC 的 caspase 活化蛋白的活性，从而使多种 caspases 未能活化而发挥抗凋亡作用[4]。Irena 等[5]还发现 Livin 过度表达在肿瘤中直接或间接抑制凋亡，不仅有利于细胞的继续增殖，还有利于异常基因的进一步积聚，促使细胞恶性转化，从而有利于肿瘤的进展。

作为 IAPs 家族中的新成员，最早发现 Livin 在恶性黑色素瘤中高表达，之后，又在肺癌、膀胱癌、白血病等多种肿瘤组织中检测到高表达的 Livin。Kim 等[6]报道 68 例原发成神经细胞肿瘤中，18 例(26.5%)高表达 Livin，36 例(53%)低 - 中表达，14 例(20.5%)阴性。另外 7 个成神经细胞肿瘤细胞株中 4 个高表达 Livin，3 个低 - 中表达。杨辛治[7]等通过免疫组织化学方法检测 60 例胶质瘤中 livin 蛋白的表达，结合临床病理和随访资料，建立 Cox 模型进行分析，显示 Livin 的阳性表达和肿瘤直径大小、肿瘤细胞分化程度具有显著性差异。向欣[8]等研究发现脑星形细胞瘤中总 Livin mRNA 表达强度肿瘤组强于正常对照组，高度恶性组强于低度恶性组，且其表达强度与病理级别之间呈正相关。肿瘤组织 Livin mRNA 的表达强度在正常组、低、高度恶性组间差异均无统计学意义，而 Livin mRNA 的表达强度在肿瘤组和正常组间差异存在统计学意义，且其表达强度高度恶性组强于低度恶性组，并与病理级别呈正相关。因此 livin 可能成为胶质瘤基因治疗的新靶点。

因此我们针对 livin 基因设计了 2 条 siRNA 序列，分别转染 U251 细胞，RT-PCR 检测发现其中一条 siRNA 能够有效的抑制 livin 基因的表达，抑制效果在 31.9%左右，同时细胞经 pSilencer2.0-liv 作用后细胞增殖受到抑制。本实验结果表明两者均可有效地抑制 U251 细胞中 livin 基因的表达，但 LIV2 序列抑制效果更佳。这可能是由于不同细胞其靶 RNA 的空间构象、位点以及许多其他未知因素的影响，使得并非所有的 siRNA 均可对靶 RNA 产生高效的 RNA 干扰效应。细胞生长抑制检测表明它们均能抑制 U251 生长，该抑制作用呈时间依赖性，在 72 h 时抑制作用最强，这同载体在细胞内最佳表达时间点相吻合。凋亡检测显示 pSilencer2.0-liv2 转染作用后的 U251 细胞凋亡指数明显强于对 pSilencer2.0-NC 对照转染的 U251 细胞。上述结果表明：RNAi 特异性阻断了 livin 的抗凋亡作用，可能同时延缓了细胞周期的进程，使细胞生长活性明显降低。近年来，基因治疗是肿瘤治疗研究的热点之一，从本实验研究的数据分析：livin 基因可作为胶质瘤基因治疗的靶点，为 siRNA 介导的胶质瘤基因沉默治疗提供实验依据。但 siRNA 在体内对 livin 基因表达和胶质瘤细胞凋亡的影响有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G，Adida C，AltieriD C.A novel anti-apoptosis gene，survivin，ex ressed in cancer and lymphoma[J].NatMed，1997，3(8)：917-921.

[2] Vucicd，Stennicke H R，Pisabarro M T，et al.ML-IAP，a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J].Curr Biol，2000，10(21)：1359-1366.

[3] Kasof G M，Gomes B C.Livin，a novel inhibitor of apoptosisprotein family member[J].J Biol Chem，2001，276(5)：3238-3246.

[4] Vucic D，Deshayes K，Ackerly H，et al.SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis(ML-IAP) [J].J Biol Chem，277(14)：12275-12279.

[5] Irena C M，Thomas M，Michael M，et al.The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells[J].Lung Cancer，2006，54(2)：135-142.

[6] Kim D K，Alvarado C S，Abramowsky C R，et al.Expression of inhibitor of apoptosis protein(IAP)Livin by neuroblastoma cells：correlation with prognostic factors and outcome[J].Pediatr Dev Pathol，2005，8(6)：621-629.

[7] 杨辛治，袁贤瑞，史帅涛.Livin 蛋白在脑胶质瘤组织中的表达与预后的关系 [J].国际神经病学神经外科学杂志，2007，34(6)：497-499.

[8] 向 欣，黄正松，石忠松，等.脑星形细胞瘤 Livin 基因表达与细胞增殖的关系[J].中华实验外科杂志，2005，22(9)：1141.

(责任编辑：冉明会)