基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0196-03

RNA 干扰抑制裸鼠皮下移植瘤中 Livin 基因表达的实验研究

谯 敏[1],向廷秀[2],王丕龙[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院实验研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:利用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术在裸鼠皮下移植瘤中抑制 Livin 基因表达,探讨 RNA 干扰用于胃癌治疗的可行性。方法:SGC-7901 细胞注射入裸鼠皮下,建立裸鼠皮下移植瘤的模型,设计靶向 Livin 基因的小干扰 RNA(Small interference RNA,siRNA),构建重组表达质粒 pTZU6+1-siRNA-Livin,并导入裸鼠皮下移植瘤中,在体内诱导 RNAi,采用 RT-PCR 和免疫化学检测 Livin 基因表达,Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 改变。结果:重组质粒 pTZU6+1-siRNA-Livin 导入裸鼠皮下移植瘤后 14 d 瘤体体积明显减小,Livin 的 mRNA 和蛋白表达均明显下调。结论:RNA 干扰明显抑制了靶基因 Livin 的表达及肿瘤细胞生长,可能与上调 Bax 的表达、下调 Bcl-2,从而诱导肿瘤细胞凋亡有关。

【关键词】RNA 干扰;胃癌;Livin

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-17

Experimental research on RNA interference targeting Livin in treatment of gastric carcinoma in nude mice

QIA O Min, et al

(*Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the feasibility of gastric carcinoma gene therapy by utilizing RNA interference (RNAi) to inhibit the expression of Livin in vivo. *Methods*: SGC-7901was injected into nude mice to form hypodermical gastric carcinoma.Small interference RNA(siRNA) homologous to Livin gene were designed, pTZU6+1-siRNA-Livin vector was constructed and injected into tumor to induce RNAi.The changes of Livin gene expression were detected with RT-PCR and immunochemistry, the expression of Bax and Bcl-2 were detected by western blot. *Results*: 14 days after transfected with pTZU6+1-siRNA-Livin, both the mRNA and the protein of Livin decreased obviously. The level of Bax was up-regulated and the level of Bcl-2 was decreased. *Conclusion*: RNA interference targeting Livin inhibits Livin expression and tumor growth, which may be related to up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2.

【Key words】RNA interference; Gastric carcinoma; Livin

Livin 是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族的新成员,位于染色体 20q13,转录时可产生 2 种 mRNA 亚型,分别为 1351 和 1257 碱基[1]。有研究发现,Livin 在正常成人的大多数组织中均不表达,表皮、淋巴、脾脏和黑色素细胞中表达量很低,而特异性地表达于大多数人类实体瘤细胞[1-3]。由于其在实体瘤中的特异性分布,可能成为实体瘤诊断和治疗的重要新靶点。RNA 干扰是指双链 RNA 引发细胞浆内同源 mRNA 降解的转录后基因沉默现象,具有特异、高效、可传递等优点,已被广泛应用于基因功能、遗传规律、生长发育、信号转导、抗肿瘤和抗病毒等多领域的研究中[4,5]。本实验首先构建胃癌细胞株 SGC-7901 的裸鼠皮下移植瘤,然后利用转录载体 pTZU6+1 构建 Livin 的短发夹状 RNA(Small hairpin RNA,siRNA)[6],将其导入裸鼠皮下移植瘤中,研究其对 Livin 基因的抑制作用及相关分子机制,以期为胃癌的基因治疗提供实验基础。

作者介绍:谯 敏(1977-),女,主治医师,博士,研究方向:胃癌的防治。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(编号:2008-2-121);重庆医科大学校办资助项目(编号:XBYB2007021)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 胃癌 SGC-7901 细胞株由重庆医科大学病理教研室提供。在含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液,37℃,5% CO_2 孵箱中培养。

1.1.2 质粒 pTZU6+1 质粒由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室黄爱龙教授惠赠。

1.1.3 试剂 限制性内切酶 *Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ购自 TakaRa 公司,质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、连接试剂盒、总 RNA 提取试剂和 RT-PCR 试剂盒等分别购自 TakaRa、Promega 和 Invitrogen 公司等。Livin 单克隆抗体购自 R&D 公司。Livin 引物和内参 GAPDH 引物以及 siRNA 转录模板由北京三博远志生物工程技术有限服务公司和大连宝

生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 结构的设计和合成 根据 siRNA 设计原则[7]和 Livin 编码序列，设计 19 个碱基的 DNA 片段，中间为 8 个与目的基因无同源性的插入序列（TTAGTACT），末端终止子 TTTTT，并利用 BLAST 进行查询，确定其为特异性序列。共设计合成两对 Livin 编码序列的反向重复序列。合成的 DNA 两端设计有 *Xho* Ⅰ或 *Xba* Ⅰ酶切位点，便于与 pTZU6+1 载体连接。构建的重组质粒命名为 pTZU6+1-siRNA-Livin，对应不同的目的片段构建的重组质粒分别简称为 pL1-siRNA、pL2-siRNA。合成的两对 siRNA 序列为分别为：正义链：5'-TCGAGGCCTTCTCTAACCTCTCCTTTAGTACTAGGAGAGG TTAGAGAAGGCTTTTT-3'，反义链：5'-CTAGAAAAAGCCT TCTCTAACCTCTCCTAGTACTAAAGGAGAGGTTAGAGAAG GCC-3'；正义链：5'-TCGAGGGTGAGGTGCTTCTTCTGCTT AGTACTGCAGAAGAAGCACCTCA CCTTTTT-3'，反义链：5'-CTAGAAAAAGGTGAGGTGCTTCTTCTGCAGTACTAAGC A-GAAGAAGCACCTCACCC-3'。

1.2.2 重组载体 siRNA 的构建 内切酶 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切转录载体 pTZU6+1，凝胶电泳检查证实载体酶切完全。将其与纯化的双链 DNA 片段在 T4DNA 连接酶作用下，4℃连接过夜，转化大肠杆菌 JM109，Amp 抗性筛选。筛选克隆提取 DNA，用 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ分别酶切，并用相同的酶酶切载体 pTZU6+1 作为对照，琼脂糖凝胶电泳鉴定。将筛选的重组质粒测序确定，以证实目的 DNA 片段克隆入 pTZU6+1 载体。

1.2.3 裸鼠皮下移植瘤模型 取细胞数为 5×10^6 个的 SGC-7901 细胞接种于 BALB/c 裸鼠腹股沟皮下。继续喂养 4 周后将裸鼠随机分成两组，每组 5 只。1 组注射 pL1-siRNA、另 1 组注射空载体 pTZU6+1 于瘤体，每组每次均注射 50 μg，隔天 1 次，共 7 次，断颈处死裸鼠，分离出瘤组织。按公式 $V=1/2\ a\times b^2$（V 代表瘤体积，a 为长径，b 为短径）计算肿瘤体积，采用 RT-PCR 检测 Livin 基因的 mRNA 变化。

1.2.4 RT-PCR 检测 Livin mRNA 水平的改变 Trizol 试剂提取肿瘤组织的总 RNA，采用 Qiagen 公司的 RT-PCR 一步法试剂盒。反应条件为 50℃ 30 min，94℃ 10 min，94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min，35 cycles。以 GAPDH 作为内参，并设相应的阴性对照。合成的 GAPDH 引物为：正义：5'-CC ATGGAGAAGGCTGGGG-3'，反义：5'-CAAAGTTGTCATGG ATGACC-3'，产物长度 821 bp；Livin 引物序列为：正义：5'-T CTGAGGAGTTGCGTCTGGC-3'，反义：3'-TTCTTGGCCTTC TGCGTCGG-5'，产物长度为 306 bp。扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳 30 min，EB 染色，BIO-RAD 图像分析仪上观察并扫描制片，记录结果，软件 Image Proc Plus3.0（IPP3.0）进行分析。

1.2.5 免疫组织化学检测 Livin 蛋白表达的变化 分离得到的肿瘤组织包埋、固定，石蜡切片，脱腊，然后按照 Livin 抗体说明书（SABC 法）进行操作。DAB 显色，二甲苯透明，封片；照相。采用软件 Image Proc Plus3.0（IPP3.0）进行分析。

1.2.6 Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 的表达变化 将肿瘤组织研磨、超声破碎、蛋白上样缓冲液处理，煮沸、混匀，-20℃保存备用。配制 10%SDS-PAGE 分离胶和 5%SDS-PAGE 浓缩胶。取保存的样品，上样 10 μl，90V 恒压电泳约 60 min，120 V 恒压电泳约 2 h。电泳完毕后取出凝胶，4℃、25 V 恒压电转过夜。次晨取出 NC 膜，加 1/500 稀释的 Bax 和 Bcl-2 一抗溶液，4℃过夜，加 1/1 000 的辣根过氧化物酶标记稀释二抗溶液，37℃、轻轻振荡 2 h 后弃反应液，用 DAB 染色试剂盒染色，BIO-RAD 图像分析仪上观察并扫描制片，记录结果。采用软件 Image Proc Plus3.0（IPP3.0）进行分析。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 χ^2 检验和 t 检验进行统计学分析。

2 结 果

2.1 质粒鉴定

pL1-siRNA 和 pL2-siRNA 质粒经 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切，同时做 pTZU6+1 空载体双酶切对照。1%琼脂糖电泳，pTZU6+1 空载经双酶切后呈两条带，分别为 2.8 kb 的载体片段和 352 bp 的小片段；而构建质粒则为 2.8 kb 的载体片段和 408 bp 的目的片段（图 1）。测序结果均正确。

2.2 裸鼠皮下移植瘤体积

pL1-siRNA 质粒处理组裸鼠皮下移植瘤明显小于转染 pTZU6+1 组（$P<0.05$）（表 1）。

2.3 半定量 RT-PCR 检测 Livin mRNA 水平的变化

以琼脂糖电泳条带的亮度来判断 Livin mRNA 水平高低。实验结果（图 2）显示，pL1-siRNA 质粒处理组裸鼠皮下移植瘤中 Livin 的 mRNA 水平较对照组明显下调。

2.4 免疫组织化学法检测细胞 Livin 蛋白表达变化

对照组的裸鼠皮下移植瘤组织中可见细胞浆黄染，内有较多棕黄色颗粒，为阳性。而 pL1-siRNA 质粒处理组裸鼠皮下移植瘤中，细胞浆的黄色明显减弱、变浅，说明 Livin 蛋白表达低于对照组（图 3）。

2.5 Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

以 β-actin 蛋白特异反应条带的亮度作为标准，与对照组相比，转染 pL1-siRNA 质粒的肿瘤组织中 Bax 蛋白表达上调，而 Bcl-2 蛋白表达下调（图 4）。

3 讨 论

胃癌是一种高发病率、高恶性度、预后不良的恶性肿瘤，临床手术切除后常需进行辅助性放疗，化疗，其目的在于抑制肿瘤细胞生长，诱导肿瘤细胞凋亡。Livin 是近年发现的人类 IAP 基因家族的成员之一，生理状态下其在除胎盘外的大多数终末分化组织中低表达或不表达。研究表明，Livin 在胃癌等多数肿瘤中高表达，提示 Livin 在恶性肿瘤的发生和发展过程中可能起着重要作用[1-3]。RNAi 是 1998 年发现的一种新技术。Elbashir 等[7]证实在哺乳动物细胞中可以应用 RNAi 技术，揭开了 RNAi 应用于哺乳细胞研究的新篇章。目前，研究者已经利用 RNAi 对多种内、外源性基因的表达进行了抑制[8-10]。

在本实验中，我们建立了胃癌细胞株 SGC-7901 的裸鼠

表 1　裸鼠皮下移植瘤肿瘤体积的变化（n=5，$\bar{x} \pm s$）

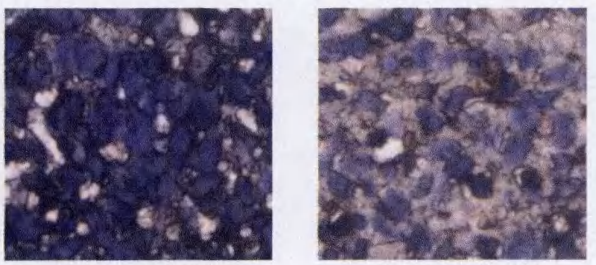
分组	处理前（对照组）	处理后
pL1-siRNA 处理组	84.28 ± 3.22	42.67 ± 5.32*
pL2-siRNA 处理组	92.47 ± 2.58	104.56 ± 6.50

*P<0.05，与对照组比较



1~5. pTZU6+1 质粒处理组；6~10. pL1-siRNA 质粒处理组；11.DL2000 分子标准。

图 2　裸鼠皮下移植瘤中 livin mRNA 的水平



A. pTZU6+1 处理组　　B. pL1-siRNA 处理组

图 3　免疫组化检测裸鼠皮下移植瘤中 livin 蛋白的表达

皮下移植瘤，并构建了靶向 Livin 基因的重组质粒 pTZU6+1-siRNA-Livin。结果发现 pL1-siRNA 显著下调瘤体组织中 Livin 表达，而 pL2-siRNA 处理的瘤体组织中 Livin 表达无明显改变，pL1-siRNA 处理组的瘤体体积明显小于对照组。说明 pL1-siRNA 质粒在动物体内可诱导 RNAi，且 RNA 干扰对同源 mRNA 的作用是很特异的，针对靶基因不同位点所设计的 siRNA 在诱导 RNA 干扰时的作用效力是不同的。这与 Elbashir 等的报道相一致[7]。

Bcl-2 基因家族是细胞凋亡过程中的主要调控基因，其中 Bcl-2[11]是已发现的最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因，其同源基因 Bax 可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡。我们在实验中发现 pL1-siRNA 质粒处理的瘤体组织中 Bax 表达上调，而 Bcl-2 的表达明显下调，说明抑制 Livin 基因可激活 Bax，抑制 Bcl-2，进而激活细胞凋亡的信号通路，导致细胞的凋亡。

综上所述，本研究以 pTZU6+1 质粒为载体，成功构建了重组表达质粒 pTZU6+1-siRNA-Livin，导入胃癌细胞株 SGC-7901 的裸鼠皮下移植后，能明显抑制 Livin 表达，并抑制肿瘤细胞生长，诱导细胞凋亡，可能为进一步的研究提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al.Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J].FEBS Letters, 2001, 495(1-2): 56-60.

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

[3] Kasof G M, Gomes B C.Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J].J Biological Chemistry, 2001, 276(5): 3238-3264.

[4] Song E, Lee S K, Wang J, et al.RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347-351.

[5] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[J]. Cancer Cell, 2002, 2(3): 245-249.

[6] Sui G, Soohoo C, Affar B, et al.A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5515-5520.

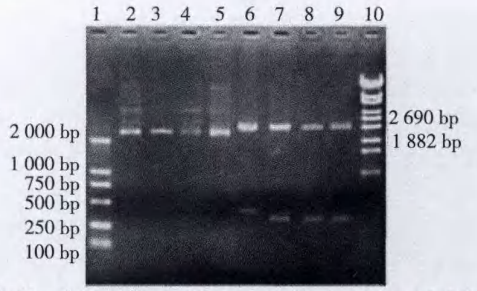
[7] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.

[8] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(6): 829-834.

[9] Phipps K M, Martinez A, Lu J, et al. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism[J]. Antiviral Res, 2004, 61(1): 49-55.

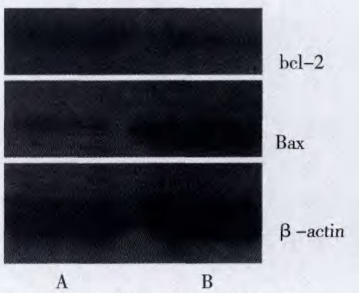
[10] 徐　斌，胡自力.RNA 干扰技术特异性抑制肾癌 survivin 表达的实验验研究[J]，重庆医科大学学报，2008，33(9)：1083-1089.

[11] Lauwers G Y, Scott G V, Karpeh M S.Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas [J]. Cancer, 1995, 75(9): 2209-2213.



1. DL2000 分子标准；2. pTZU6+1 质粒；3,4. pL1-siRNA 质粒；5. pL2-siRNA 质粒；6. pTZU6+1 质粒被 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切；7,8. pL1-siRNA 质粒被 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切；9. pL2-siRNA 质粒被 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切；10. λ DNA/EcoT14 分子标准

图 1　重组质粒的酶切鉴定



A. pTZU6+1 处理组；B. pL1-siRNA 处理组

图 4　Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

（责任编辑：冉明会）