基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0029-04

Survivin-siRNA 治疗膀胱移行细胞癌的动物实验研究

杜 虎[1],吴小候[1],罗春丽[2],何云锋[1],刘 川[3],尹志康[1],曾 柯[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2. 重庆医科大学检验系,重庆 400016;3. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建 survivin 特异性短发夹 RNA(shRNA)的表达载体,并以其修饰人膀胱移行细胞癌细胞株 T24,评价其在体内的抑制肿瘤生长增殖的作用。探讨其在膀胱移行细胞癌(TCCB)T24 细胞中的作用。方法:设计、合成 survivin 特异性的短链寡核苷酸,克隆到 PTZU6+1 质粒载体中,构建 survivin 特异 shRNA 表达载体,转染 T24 细胞;通过 PTZU6+1 质粒载体介导,成功建立了表达 survivin 的膀胱移行细胞癌细胞株 T24/ survivin-siRNA,拟在体内研究 survivin-siRNA 对膀胱移行细胞癌生长、增殖的影响。建立裸鼠皮下种植瘤模型,观察肿瘤形成时间和观察肿瘤形成时间,以及计算抑瘤率; HE 染色行组织学检查;SABC 法测定 survivin,评估 survivin 在 PTZU6+1 介导的 survivin-siRNA 治疗膀胱移行细胞癌后的表达。结果:未转染组、空载体组共发生肌肉侵润 6 例,可见肌纤维的溶解、断裂等;皮下注射含 survivin-siRNA 的转染组细胞所形成的种植瘤的时间显著地延长,与其它两组比较有显著性差异($P<0.01$);含 survivin-siRNA 的转染组所形成的种植性膀胱癌的体积明显受到抑制,与未转染组、空载体组有明显差异($P<0.01$);survivin-siRNA 转染组的抑瘤率为 68.93%,与未转染组、空载体组相比较有显著差异;survivin-siRNA 转染组 survivin 的阳性表达率降低。结论:应用 PTZU6+1 质粒载体构建 survivin 的 shRNA 表达载体,成功建立了表达 survivin 的膀胱移行细胞癌细胞株 T24/ Survivin-siRNA,有效抑制了 survivin 蛋白的表达,在体内实验中表明可以抑制T24 细胞移植瘤的生长,诱导 T24 细胞的坏死、凋亡。

【关键词】Survivin;Short hairpin RNA;膀胱肿瘤

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-03

Animal experimental study on the treatment of bladder transitional cell carcinoma by survivin-siRNA

DU Hu, et al

(*Department of Urological Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct the plasmid containing short hairpin RNA (shRNA) of survivin and modify human bladder transitional cell carcinoma(BTCC) T24 cell line with it to evaluate its inhibition on tumor growth and proliferation and further discuss its functions in T24 cells. *Methods*: Survivin specific oligonucleotides were designed and synthesized. These oligonucleotides were annealed to form double strand DNA fragment and this fragment was inserted into plasimid PTZU6+1 to generate the plasimid pshRNA-survivin2. Then T24 cells were inoculated into the right-back legs of BALB/c nude mice to establish bladder cancer model.Through plasimid PTZU6+1, T24/ survivin-siRNA expressing survivin was successfully constructed to study the effects of survivin-siRNA on BTCC growth and proliferation. Microscope was used to observe the morphological changes.Histological examination was under HE staining. Survivin was detected by SABC to evaluate the expression of survivin after the treatment of survivin-siRNA through PTZU6+1. *Results*: The expression of survivin in transfected T24 cells in vivo was markedly depressed as compared with control groups($P<0.01$).In vivo, pshRNA-survivin2 could inhibit the growth of BALB/c xenograft tumor and the inhibitory rate of tumor was 68.93%.Local necroses were observed by HE staining and distinct morphology changes of cell were observed by electron microscope. *Conclusion*: The results showed that the constructed pshRNA-survivin2 can successfully be transfected into BTCC cells T24 and can effectively inhibit the expression of survivin, and the experiment in vivo showed it can inhibit the growth of T24 xenograft tumor and induce the necrosis and apoptosis of T24 cells.

【Key words】 Survivin; Short hairpin RNA; Bladder carcinoma

手术切除是膀胱移行细胞癌最为有效的治疗手段,然而肿瘤切除后,残余肿瘤的复发率仍较高,严重影响生存率。膀胱移行细胞癌复发率高的确切

作者介绍:杜 虎(1968-),男,副主任医师,博士,研究方向:泌尿系统肿瘤。

通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou79@hotmail.com。

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(项目计划编号:040313)。

原因目前尚无定论。近年的研究表明，survivin 作为抗肿瘤基因治疗的靶点备受人们关注。在以前实验中，我们已经对 survivin 与 Bca 的生长抑制的关系进行了分析，明确了 survivin 与 Bca 细胞的增殖是有关联的。此前也通过质粒载体介导，成功建立了表达 survivin 的膀胱移行细胞癌细胞株 T24/survivin-siRNA，同时证实了质粒载体能够长期、稳定表达针对靶基因 survivin 的 siRNA，因此，本部分实验拟在体内研究 survivin-siRNA 对膀胱移行细胞癌生长、增殖的影响，期望能够为 survivin-siRNA 应用于临床治疗膀胱移行细胞癌提供实验依据。

基于上述思路，本部分研究构建重组的 survivin-siRNA 载体，并以其修饰人膀胱移行细胞癌细胞株T24，评价其在体内的抑制肿瘤生长增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

膀胱移行细胞癌细胞株 T24 常规培养于含 10%的新生牛血清的 RPMI1640 培养液中，培养条件为 37℃，CO_2 饱和度为 5%，定期观察细胞生长情况，每 2~3 d 用 0.25%的胰酶消化，进行传代培养。

1.2 survivin siRNA

有效序列的选择及真核表达载体的构建。含有人全长 survivin 的 pTZU6+1 / survivin 质粒（即 pshRNA-Survivin2）由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室黄爱龙教授惠赠。根据shRNA 设计原则和 survivin 编码序列，设计 19~21 nt 的 DNA 片段，中间为 4 或 8 个与目的基因无同源性的插入序列（TTCG 或 TTAGTACT 或 GAGTACTG），并利用 BLAST 进行查询，确定其为特异性序列。实验中设计合成 3 对 survivin 编码序列的反向重复序列，本实验采用 survivin-2 siRNA（编码基因 191~211），5'-TCGAGCTGAGAACGAGCCAGACTTGTTAGTACTCAAGTCTGGCTCGTTCTCAG TTTTT-3'（正义链），5'-CTAGAAAAACTGAGAACGAGCCGACTTGGTACTAACAAGTCTGGCTCGTTCTCAGC-3'（反义链），合成的 DNA 两端设计有 *Xho* Ⅰ或 *Xba* Ⅰ酶切位点，便于与 pTZU＋1 载体连接。

1.3 pshRNA- survivin2 表达质粒的构建及鉴定

用 DNA 纯化试剂盒纯化形成双链的 DNA 片段，在 T4DNA 连接酶作用下，与限制酶 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切的转录载体 pTZU6+1 连接，4℃连接过夜，获得所设计的重组质粒。取 7 μl 转化大肠肝菌 JM109，Amp 抗性筛选，筛选克隆提取质粒 DNA，用 *Sal* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ分别酶切阳性克隆，并用相同的酶酶切载体 pTZU6+1 作为对照，1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。进一步测序鉴定，阳性重组质粒命名为 pshRNA-survivin2。

1.4 克隆细胞抗性筛选

转染前 1 d，将对数生长期细胞（0.5~2.0）× 10^5 个 /ml 接种于 6 孔板，每孔 2 ml。细胞长至 80%～90%融合度时进行转染。细胞转染时，实验分 T24/pTZU6+1 组（无血清培养基＋转染试剂＋T24/pTZU6+1）、T24/Survivin-siRNA 组（无血清培养基＋转染试剂＋T24/Survivin-siRNA）3 组。每孔质粒量为 4.0 μg。分别用 250 μl 无血清 RPMI1640 培养液稀释后，室温静置 5 min3 株膀胱移行细胞癌细胞对潮霉素（G418）最高耐受浓度均为 400 μg/ml，48 h 后用含 G418（400 μg/ml）RPMI1640 培养液筛选。2~3 d 更换 1 次培养液，10 d 左右 G418 浓度减为 200 μg/ml 继续筛选细胞，倒置荧光显微镜下观察细胞形态正常，即可获取稳定表达的阳性克隆转染细胞。

1.5 实验动物和细胞株

健康纯种 SPF 级 BALB/C 2 周龄雌性裸鼠 15 只，体重（15±2）g，购自上海斯莱克实验动物有限公司。在重庆医科大学动物实验中心饲养；膀胱移行细胞癌细胞株 T24 由重庆医科大学超声研究所赠送；含 survivin-siRNA、空载体的各细胞株已经成功建立。

1.6 主要试剂

兔抗人 survivin 蛋白多克隆抗体（武汉博士德生物工程有限公司）；二抗为 SA1022 山羊小鼠 IgG 免疫组化试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）；AR1022 DAB 显色试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）。

1.7 裸鼠皮下种植瘤模型的建立

取对数期生长膀胱移行细胞癌细胞株（包括 T24/survivin-siRNA、T24/pTZU6+1、T24），实验前 1d 换液，当天用 0.25%胰酶消化，培养液吹打将细胞制备成细胞悬液，850 r/min 室温下离心 10 min，弃上清，PBS 重悬细胞，调整细胞数 6×10^6 个 /ml；实验分为含survivin-siRNA 组（5 只）、空载体组（5 只）、未转染组（5 只）3 组；4 周龄雌性 BALB/C 裸鼠共 15 只，消毒皮肤，无菌操作。肿瘤细胞液摇匀后，每只裸鼠皮下接种细胞数为 5×10^6 个 /ml 的 0.2 ml 细胞悬液。恒温、通风、无菌条件下饲养。隔日测量肿瘤大小，计算肿瘤体积 $=L\times S^2\times0.5$（L：肿瘤长径；S：肿瘤短径）；种植瘤浸蜡、包埋、修块、切片（5 μm），HE 染色光镜检查；SABC 法测定 survivin。

1.8 数据分析

应用 SPSS10.0 统计学软件，采用均数之间方差分析，$P<0.01$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 survivin-siRNA 对裸鼠种植性膀胱癌形成时间的影响

表 1 表明：皮下注射含 survivin-siRNA 的转染组细胞所形成的种植瘤的时间显著地延长，与其它两

表 1 不同处理因素对种植瘤形成时间的影响

处理因素	种植瘤形成时间(d)
未转染组	12.4 ± 0.55
空载体组	12.8 ± 0.84
survivin-siRNA 组	17.0 ± 1.30*

*$P<0.01$，与空载体组和未转染组比较

组比较有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 survivin-siRNA 对裸鼠种植性膀胱癌形成体积的影响

表 2 表明：在形成种植瘤的第 14 d 后，含 survivin-siRNA 的转染组所形成的种植性膀胱癌的体积明显受到抑制，与未转染组、空载体组有明显差异($P<0.01$)。

表 2 不同处理因素对种植瘤形成体积的影响(mm^3)

种植瘤形成时间(d)	未转染组	空载体组	survivin-siRNA 组
7	39.04 ± 16.61	32.07 ± 15.77	14.91 ± 2.01
14	138.40 ± 12.44	167.15 ± 13.15	54.19 ± 3.81
21	311.02 ± 37.01	338.24 ± 19.62	149.54 ± 11.49*

*$P<0.01$，与空载体组和未转染组比较

表 3 不同处理因素对种植性膀胱癌的抑瘤率

处理因素	重量(mg)	抑瘤率(%)
未转染组	589.98 ± 52.48	-
空载体组	560.16 ± 36.15	0.49
survivin-siRNA 组	183.72 ± 15.89	68.93*

*$P<0.01$，与空载体组和未转染组比较

2.3 survivin-siRNA 能够抑制裸鼠种植性膀胱癌的生长、侵袭

2.3.1 survivin-siRNA 能够抑制种植性膀胱癌的生长、侵袭 survivin-siRNA 的转染组所种植性瘤的体积较小，多呈圆形、单个，周围无转移结节，活动性较大。而未转染组、空载体组形成的种植性瘤的体积较大，周围多有转移性卫星结节，较固定，未转染组、空载体组发生肌肉侵润分别有 2 例、4 例。

2.3.2 不同处理因素对种植性膀胱癌的抑瘤率差异有统计学意义 表 3 结果表明 survivin-siRNA 转染组的抑瘤率为 68.93%，与未转染组、空载体组相比较差异有统计学意义。（注：未转染组、空载体组共发生肌肉侵润 7 例，手术摘取种植瘤时切除了少量肌肉，因而切除肿瘤的实际重量轻微增加，最终可能导致抑瘤率的增高。）

2.4 免疫组织化学染色

survivin 在 survivin-siRNA 转染组的阳性表达率降低。survivin 表达阳性主要表现为胞浆/核呈棕黄色染色(图 1 所示)。survivin-siRNA 转染组 survivin 的阳性表达率降低(图 2)。



图 1 Survivin 表达阳性（SABC×400）

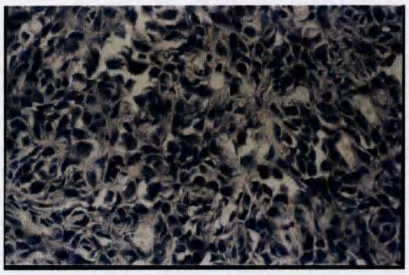


图 2 Survivin 表达阴性（SABC×400）

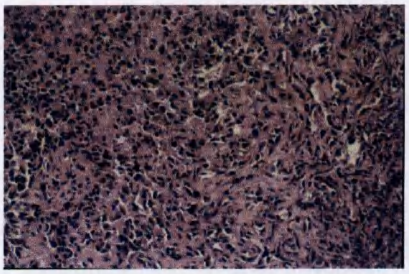


图 3 T24 细胞（HE×200）

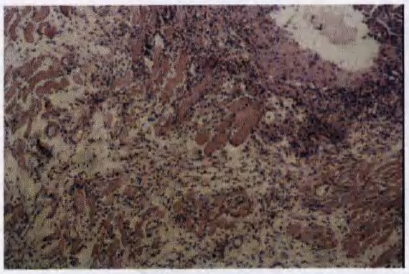


图 4 肌肉侵润（HE×100）

2.5 组织学检查

HE 染色膀胱癌的细胞特征包括高有丝分裂相、高核质比和多型核，这与 T24 细胞一致(图 3)。未转染组、空载体组共发生肌肉侵润 6 例，可见肌纤维的溶解、断裂等(图 4)。

3 讨 论

存活素(survivin)是 1997 年发现的 1 种细胞凋亡抑制因子[1]，是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis

protein,IAP)家族中的 1 个特殊新成员,基因位于17 q25,长约 15 kb,由 3 个内含子和 4 个外显子组成,相对分子质量为 16 500,由 142 个氨基酸残基构成,存在变异体,具有特殊的结构和组织分布及明显的抗凋亡作用,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。因此,自从 survivin 被发现以来,一直是肿瘤研究工作者研究的热点问题。survivin 主要分布于胚胎组织及肿瘤。在成人,除胸腺、子宫内膜组织、睾丸里有微量表达外,大多数肿瘤组织中 survivin 表达水平异常升高。Tamm 等[2]研究结果显示 survivin 可作用于凋亡通路下游的 Caspase-3 和 Caspase-7,并抑制两者的酶原转变为有活性的 Caspase-3 和 Caspase-7。Shin 等[3]也进一步研究证实 survivin 是 Caspase-3 和 Caspase-7 的生物抑制剂。

Ij 等[4]提出 survivin 蛋白、7 微管蛋白和 P21 蛋白结合成复合物,共同定位于中心粒。P21 蛋白被结合在中心粒上,细胞周期的负向调节减弱,细胞进行分裂的速度加快。细胞凋亡与细胞周期在共同的调控分子 survivin 蛋白的调节下相互紧密地配合,适应细胞不同生存状态的需要。当细胞需要快速增殖时,生长因子大量分泌,激活 survivin 蛋白的表达,survivin 蛋白与 Caspase-3 相互作用,使细胞凋亡受阻;并与 p21 结合使 p21 聚集在中心粒上,使细胞周期缩短。当细胞不需要快速增殖时,Caspase-3 重新出现在凋亡途径,凋亡将不受抑制;p21 再次阻挡细胞周期,细胞周期将发生停滞。Swana 等[5]报道,膀胱癌的 survivin 阳性表达率为 77.8%(28/36),在高分化中其表达高于低分化,Ⅲ期 6 例均为阳性,Ⅱ期 10 例中有 9 例阳性,而Ⅰ期 20 例中 13 例阳性。Smith 等[6]在 46 例新生或复发时膀胱癌患者尿中全部检测出了 survivin,而在 32/35 例经过治疗的膀胱癌并经膀胱镜检查无复发的患者尿中无 survivin;正常人或前列腺癌、肾癌、阴道癌、子宫颈癌无 1 例表达,而 30 例非肿瘤性泌尿系统疾病患者尿液中仅有 3 例表达。而 Gazzaniga 等[7]发现浅层膀胱癌阳性表达率为 30%(9/30)。

本研究的结果显示 survivin 主要表达在裸鼠移植瘤细胞胞浆中,这与 Zheng 等[8]人的研究结果相一致。pshRNA-Survivin2 处理后 survivin 阳性表达率明显降低($P<0.05$)。提示 pshRNA-survivin2 能够抑制移植瘤细胞中 survivin 的高表达。pshRNA-survivin2 通过抑制 survivin 基因的表达,使其丧失对凋亡的抑制,增加肿瘤的自发性凋亡,并使细胞周期的负向调节增强,细胞分裂得到抑制。

本实验通过建立膀胱癌 T24 细胞株裸鼠移植瘤模型,观察 pshRNA-survivin2 的抑瘤作用。发现实验组能够明显抑制移植瘤细胞的生长,与体外实验的结果相一致。我们采用表达 survivin 的膀胱移行细胞癌细胞株(T24/survivin-siRNA)建立移植瘤模型的方式,从第 14 d 开始,处理组裸鼠移植瘤的体积开始明显小于对照组裸鼠移植瘤体积,实验组抑瘤率为 68.93%,与对照组比较其差异具有显著性($P<0.05$)。本实验提示表达 survivin 的膀胱移行细胞癌细胞株(T24/survivin-siRNA)能够在较短的时间内出现抑瘤效果。

光镜下可见实验组和对照组移植瘤细胞形状不规则,核大,深染,核异形性明显,可见病理性核分裂象。各组均有瘤组织坏死,但实验组坏死区更为广泛,坏死面积较对照组显著增大。未转染组、空载体组共发生肌肉侵润 6 例,可见肌纤维的溶解、断裂等。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G,Adida C,Altieri D.A novel anti-apoptosis gene. surviving.expressed in cancer and lymphoma[J]. NatMed,1997,3(8):917-921.

[2] Tamm I,Wang Y,Sausville E,et al. IAP-family protein Survivin inhibits caspase activity and apeptosis induced by Fas(CD95),Bax,caspases,and anticancer drugs[J]. Cancer Res,1998,58(23):5315-5320.

[3] Shin S,Sung B J,Cho Y S,et al. An anti-apoptotic protein human Survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7[J]. Biochemistry,2001,40(4):1117-1123.

[4] Li F,Ackermanne J,Beni C,et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by inteference with survivin function[J]. Nat Cel Biol,1999,1(8):461-466.

[5] Swana H S,Grossman D,Anthony J N,et al.Tumor content of the anti-apoplosis molecule Survivin and recurrence of bladder cancer[J]. N Engl J Med,1999,341(6):452-453.

[6] Smith S D,Wheeler M A,Plescia J,et al. Urine detection of Survivin and diagnosis of bladder cancer[J]. JAMA,2001,285(3):324-328.

[7] Gazzaniga P,Gradilone A,Giuliani L,et al. Expression and prognostic significance of Livin,Survivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J]. Ann Oncol,2003,14(1):85-88.

[8] 郑清友,靳风烁.凋亡抑制因子 survivin 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报,2005,27(10):1030-1032.

(责任编辑:冉明会)