基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0178-04

靶向 survivin 的 siRNA 联合顺铂抑制肺腺癌 A549 细胞增殖的实验研究

姚草原[1],江 涛[1],韩晓黎[1],李 凡[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院呼吸内科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究靶向 survivin 的 siRNA 和顺铂联用对肺癌细胞 A549 的增殖抑制作用。方法:将 A549 细胞分为空白对照组,阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染组,顺铂处理组,pSilencer2.0-SVV2 转染组,pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组。转染采用脂质体法。MTT 法检测靶向 survivin 的 siRNA 和顺铂对 A549 细胞增殖的抑制作用;RT-PCR 法检测 A549 细胞 survivin mRNA 转录水平变化情况;流式细胞术和 TUNEL 法检测 A549 细胞凋亡情况。结果:MTT 法示:pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组增殖抑制率为 51.38% ± 1.35%,与其它各组相比抑制率明显增高,具有统计学意义($P<0.05$);RT-PCR 检测显示空白对照组,阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染组,顺铂处理组 survivin mRNA 表达无明显变化($P>0.05$),pSilencer2.0-SVV2 转染组、pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组 survivin mRNA 表达明显下降($P<0.05$);流式细胞术和 TUNEL 法检测 pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组凋亡率分别为 42.48% ± 2.28%和 40.65% ± 3.53%,与其它各组相比凋亡率明显增高,具有统计学意义($P<0.05$)。结论:将靶向 survivin 的 siRNA 和顺铂联合应用可以协同抑制 A549 细胞增殖,共同发挥诱导细胞凋亡作用。

【关键词】RNA 干扰;survivin 基因;肺肿瘤;顺铂
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-17

Empirical study on the anti-proliferation effect of siRNA against survivin combined with DDP on human lung cancer cell line A549

YAO Cao-yuan, et al
(*Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the anti-proliferation effect of siRNA against survivin combined with DDP on human lung cancer cell line A549.*Methods*: A549 cells were divided into five different treatment groups: blank control group, pSilencer2.0-NC group, DDP group, pSilencer2.0-SVV2 group, and pSilencer2.0-SVV2+DDP group. LipofectamineTM 2000 was used to transfect A549 cell. The effects on cell proliferation and apoptosis were analyzed by MTT assay, flow cytometry, and TUNEL respectively .The expression of survivin mRNA was evaluated by RT-PCR experiment. *Results*: The MTT assay indicated that the anti-proliferation rate of pSilencer2.0-SVV2+DDP group was 51.38% ± 1.35% .The anti-proliferation rate of this group was higher than any other group ($P<0.05$).The experiment of RT-PCR showed that the expression of survivin mRNA in pSilencer2.0-SVV2 group and pSilencer2.0-SVV2+DDP group were lower than that in other groups($P<0.05$), but its level in blank control group, pSilencer2.0-NC group, DDP group had no marked change ($P>0.05$).Flow cytometry and TUNEL indicated that the apoptosis rates of pSilencer2.0-SVV2+DDP were 42.48% ± 2.28% and 40.65% ± 3.53% respectively, higher than in any other groups($P<0.05$). *Conclusion*: siRNA against survivin combined with DDP can enhance the inhibitory effect on lung cancer cell line A549 and induce apoptosis in common.

【Key words】 RNA interference; Survivin; Lung cancer cell; DDP

原发性支气管肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,尽管采取了手术、化疗、介入治疗、放射治疗等综合措施,非小细胞肺癌的五年生存率仍低于 10%,小细胞肺癌则低于 5%,因此需要寻找新的治疗方式和新的治疗靶点。肿瘤的发生与细胞的增殖和凋亡失衡有关。survivin 属于凋亡抑制蛋白家族新成员,主要表达于绝大多数肿瘤组织,它不仅抑制肿瘤细胞凋亡而且还和肿瘤耐药性产生有一定关系[1]。顺铂是肺癌化疗的一线用药,但是其严重的毒副作用和耐药性的产生限制了其临床应用。如何提高顺铂的化疗效果减轻毒副作用和耐药性是目前临床治疗面临的重大难题之一。RNA 干扰是目前应用广泛的基因阻断技术,有类似于基因敲除的效果,常常用于基因治疗的研究。本实验将把靶向 survivin 的 siRNA 和传统的化疗药物顺铂相结合观察其对肺腺癌

作者介绍:姚草原(1982-),男,硕士,
研究方向:肺癌早期诊断与治疗。
通讯作者:江 涛,女,主任医师,E-mail: j.tcq@163.com。

A549 细胞的增殖抑制作用，为改善肺癌的治疗疗效提供新的治疗方式和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

靶向 survivin 的 siRNA 真核载体质粒 pSilencer2.0-SVV2 购自美国 Amibion 公司（正义链 5'-GATCCGAATTAACCCTTGGTGAATTTCGATTCACCAAGGGTTAATTCTTTT TTGGAAA-3'；反义链 5'-AGCTT TTCCAAAAAAGAATTAACCCTTGGTGAATCGAAATTCACCAAGGGTTAATTCG-3'）；阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 由美国 Amibion 公司提供；去内毒素质粒提取盒购自 Omega 公司；RT-PCR 试剂盒购自于大连宝生公司；Trizol 试剂盒、转染试剂 Lipofectamine2000 购自于美国 Invitrogen 公司；小分子量蛋白 Marker 购自于 Galen 公司；PCR 引物由重庆升博生物科技有限公司设计合成；肺腺癌 A549 细胞株、DH5α 菌种本室保存；RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司；顺铂购自山东德州制药厂。TUNEL 试剂盒购自德国 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 将细胞接种在 100 ml 培养瓶中，用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37℃、5%CO_2 培养箱内传代培养，取对数生长期细胞进行实验。实验共分为五个组，空白对照组，阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染组，顺铂处理组，pSilencer2.0-SVV2 转染组，pSilencer2.0-SVV2 转染＋顺铂处理组。

1.2.2 质粒转染处理细胞（以 6 孔板为例） 用去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒，核酸分析仪测定浓度。将 A549 细胞按 1×10^5 个 / 孔的数量接种于 6 孔培养板，含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液、37℃、5%CO_2 培养细胞密度至 60%～80%时更换为无抗生素、无血清的 RPMI1640 培养液继续培养 6 h，分别用重组质粒 pSilencer2.0-SVV2 及阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染 A549 细胞，质粒用量为 4.0 μg，脂质体用量 10 μl。设立未转染质粒 A549 细胞为空白对照组和顺铂处理组。转染后 4h 换液，空白对照组、阴性对照质粒 pSilencer 2.0-NC 转染组、pSilencer2.0-SVV2 转染组换为含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液，顺铂处理组、pSilencer2.0-SVV2 转染＋顺铂处理组换为含顺铂终浓度为 1.5 μg/ml10%胎牛血清 RPMI1640 培养液。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖抑制率 将细胞以 5×10^3 个 / 孔密度接种于 96 孔培养板中行细胞转染。其转染方法和转染后处理同前（各组质粒用量为 0.2 μg，脂质体用量为 0.5 μl）。转染后 48 h 各组弃培养液，加入含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液每孔 100 μl37℃、5%CO_2 孵箱中培养 2 h，每孔加入 MTT 20 μl，继续培养 4 h。吸弃培养液，用无血清培养液洗 3 次，加入二甲亚砜 150 μl，震荡 10 min，紫色结晶完全溶解后，用酶标仪检测各组细胞的 $A_{570\,nm}$ 吸光值；以空白细胞组为对照组，其细胞存活率为 100%；抑制率计算公式：抑制率＝（1－各实验组吸光值 / 对照组吸光值）×100%。

1.2.4 转染后 48 h RT-PCR 提取 6 孔板中各组 A549 细胞总 RNA 并定量，各实验组取等量的 RNA 反转录后进行 PCR。Survivin 上游引物 5'-CTCAAGGACCACCGCATCTC-3'、下游引物 5'-AAAGCGCAACCGGACGAATG-3'，产物长度 287 bp。内参照物为 β-actin 的上游引物 5,-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3'、下游引物 5'-GAGCTACG AGCTG CCTGACG-3'，产物长度 416 bp。产物经 2.0%琼脂糖电泳后于 CHERMI-IMAGER 5500 图像分析系统分析。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡比率 实验分组同前。将细胞以 5×10^5 个 / 瓶 接种于 100 ml 培养瓶中，待细胞密度至 60%～80%时进行转染。其转染方法和转染后处理同前（各组质粒用量为 8.0 μg，脂质体用量为 20 μl）。转染后 48 h 收集各组细胞于离心管内；加入 4℃ 预冷的 70% 乙醇，置 4℃ 冰箱中固定 24 h。调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml，离心去上清液，加入碘化丙啶（PI）染液 1 ml，使其终浓度为 5 mg/ml，4℃避光染色 30 min 置流式细胞仪上，于激发波长为 488 nm 处检测，将所得数据资料输入计算机，并用相应的分析软件进行处理和分析。细胞凋亡比率（AI）按以下公式计算：AI（%）＝亚二倍峰细胞数 / 细胞总数×100%。

1.2.6 凋亡细胞原位检测（TUNEL 法） 实验分组同前。用 24 孔板常规细胞爬片。其转染方法和转染后处理同前（各组质粒用量为 0.8 μg，脂质体用量为 2.0 μl）。转染后 48 h 按 TUNEL 试剂盒（德国 Roche 公司）说明书操作。细胞核固缩、染色质凝集成块或边集、呈棕褐色者为凋亡细胞。每个视野计数 100 个细胞，计数 3 个视野，凋亡细胞数占细胞总数的百分率为凋亡指数（AI）。

1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，所有数据使用 SPSS10.0 统计分析软件，各实验组数据进行方差分析，实验组间的多重比较使用 SNK-q 检验。$P<0.05$ 为差异显著性。

2 结 果

2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制率（表 1）

MTT 法结果显示顺铂处理组、pSilencer2.0-SVV2 转染组、pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组对 A549 细胞增殖均有抑制作用，其抑制率高于 pSilencer2.0-NC 转染组和空白对照组（$P<0.05$），其中 pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组抑制率明显高于 pSilencer2.0-SVV2 组和顺铂处理组（$P<0.05$）。

表 1 MTT 法检测细胞增殖抑制率

组别	细胞抑制率（%）
空白对照组	—
pSilencer2.0—NC 转染组	6.41 ± 1.20
顺铂处理组	15.63 ± 1.33*#
pSilencer2.0—SVV2 转染组	29.28 ± 1.13*#
pSilencer2.0—SVV2 转染＋顺铂处理组	51.38 ± 1.35*#

注：*$P<0.05$，与空白对照组比较；#$P<0.05$，与 pSilencer2.0-SVV2 转染＋顺铂处理组比较。

2.2　RT-PCR 检测转染 48 h

A549 细胞中 survivin mRNA 表达　图像扫描分析后得出 survivin/β-actin 灰度比值：空白对照组 0.794±0.013，阴性对照质粒组 0.796±0.012，顺铂处理组 0.791±0.012，此 3 个组间两两比较无显著性差异（$P>0.05$）。pSilencer2.0-SVV2 转染组 0.496±0.063，pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组 0.518±0.017，两组相比无明显统计学差异（$P>0.05$）。后两组分别与前三组相比灰度比值显著降低（$P<0.05$）。结果表明 pSilencer2.0-SVV2 转染组、pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组在转染后 48 h 能使 survivin mRNA 表达明显下降，两组抑制率无显著差异，而顺铂处理组、阴性质粒对照组、空白对照组 survivin mRNA 水平无明显变化。

表 2 流式细胞检测细胞凋亡比率

序号	组别	细胞凋亡比率（%）
1	空白对照组	0.52 ± 0.02#
2	pSilencer2.0-NC 转染组	4.98 ± 0.38#
3	顺铂组	11.47 ± 0.90#▲
4	pSilencer2.0-SVV2 转染组	22.36 ± 2.09#▲
5	pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂组	42.48 ± 2.28

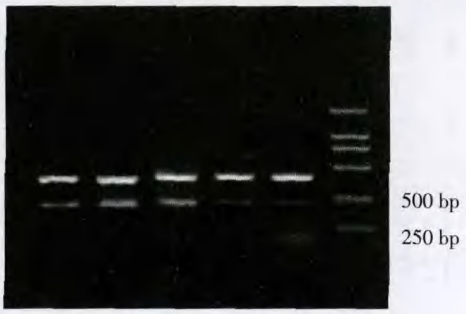
注：与 5 比较，#$P<0.05$；与 2 比较，▲$P<0.05$。

2.3　流式细胞术检测细胞凋亡比率

pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组能明显诱导细胞凋亡，其凋亡率为 42.48%，与 pSilencer2.0-SVV2 转染组、顺铂处理组、pSilencer2.0-NC 转染组相比，凋亡率明显增高差异均有统计学意义（$P<0.05$）。pSilencer2.0-SVV2 转染组、顺铂处理组分别与 pSilencer2.0-NC 转染组相比，凋亡率增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4　凋亡细胞原位检测结果

TUNEL 法原位检测发现除空白对照组外均出现不同程度的肿瘤细胞核呈棕褐色染色（图 2~7）。



1. 空白对照组 2. pSilencer2.0-NC 转染组 3. 顺铂处理组 4. pSilencer2.0-SVV2 转染组 5. pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组

图 1　转染后 48 h A549 细胞中 survivn mRNA 表达

各组的 AI 值分别为 pSilencer2.0-NC 转染组 4.26%±0.79%，顺铂处理组 10.49%±1.90%，pSilencer2.0-SVV2 转染组 20.44%±2.14%，pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组 40.65%±3.53%。与阴性质粒对照组相比，其它各实验组 AI 值均明显高于阴性对照质粒组（$P<0.05$），其中 pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组 AI 值最高，凋亡作用最明显，与顺铂处理组、pSilencer2.0-SVV2 转染组相比，差异具有显著性意义（$P<0.05$）。

3　讨　论

肺癌发生与发展不仅与肿瘤细胞分化异常、增殖过度有关，而且还与其凋亡机制失调有关。随着人们对细胞凋亡机制研究深入，通过诱导肿瘤细胞凋亡进行抗肿瘤治疗是当今研究热点之一。

Survivin 是凋亡抑制蛋白（Inhibitor of apoptosis proteins，IAP）家族的新成员；人类 survivin 基因包含 4 个外显子和 3 个内含子，其编码区包含 426 个碱基的开放阅读框，survivin 基因包含多个转录起始位点，该转录起始位点是由无 TATA 的启动子和 GC 富集区、2 个 CDE 区（GGCGG）和 1 个 CHR 区（ATTTGAA）组成。Survivin 是一种胞质蛋白，分子质量 16.5 ku，具有独特的碟形二聚体结构，它只含有一个 BIR 结构[2]。Survivin 具有抑制细胞凋亡和调节增殖双重作用，它可以直接作用于 caspase，抑制 caspase-3、caspase-7 的活性，阻断细胞的凋亡过程，这一功能通过在细胞内与微管的聚合和解聚来实现；Survivin 也可通过 p21 间接抑制 caspase，其机制是 survivin 与 CDK-4 形成 survivin-CDK4 复合物，释放出 CDK-4 复合体中的 p21，p21 进一步与线粒体 caspase-3 结合抑制其活性，阻断细胞凋亡[3]。Survivin 可以作为肿瘤基因治疗的理想靶点，下调 survivin 的表达很可能是重新启动细胞凋亡通路，诱导肿瘤细胞凋亡最快捷途径，对克服肿瘤细胞凋亡耐受可能具有重要价值。

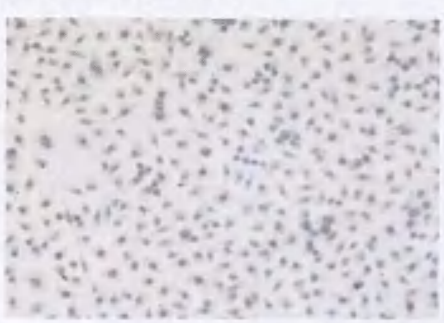


图 2　空白对照组 TUNEL 法未见到凋亡细胞（TUNEL×200）

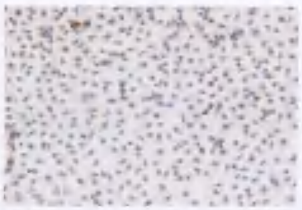


图 3 pSilencer2.0-NC 转染组（TUNEL×200）



图 4 顺铂处理组（TUNEL×200）



图 5 pSilencer2.0-SVV2 转染组（TUNEL×200）

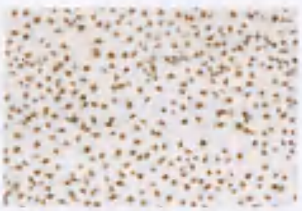


图 6 pSilencer2.0-SVV2 转染+顺铂处理组（TUNEL×200）

RNA 干扰也称转录后基因沉默，指真核细胞内一些短片段的双链 RNA（Double stranded RNA，dsRNA）在胞浆 dsRNA 特异性核酸内切酶（dsRNA specific endonuclease，Dicer）的作用下裂解成具有 21~23 nt 碱基的短片段双链 RNA 分子，称之为 siRNA（Small interfering RNA）。它与核酶复合体结合形成 RNA 诱导的沉默符合物（RNA induced silencing complex，RISC），RISC 通过碱基配对方式与同源靶向 mRNA 结合后，从 siRNA 的 3'端将靶向 mRNA 切割成小于 12 nt 的片段并使其降解[4]。RNA 干扰技术是目前基因治疗常用技术具有操作简单，投入少，高效率等优势。

顺铂是肺癌联合化疗方案当中常用药物，主要是通过高活性的阳离子水化物与 DNA 链上的碱基作用，改变其正常复制模板的功能，引起 DNA 复制的障碍，从而抑制细胞分裂。但是顺铂的耐药性和毒副作用是限制化疗发挥作用的主要障碍。

本实验通过将顺铂与 RNA 干扰技术相结合观察其对 A549 细胞增殖抑制作用。我们研究显示在单独用顺铂处理组中，其诱导肿瘤细胞凋亡率约在 10%左右。而当其与靶向 survivin 的 siRNA 联用后，survivin 表达明显受抑制，细胞凋亡率约在 40%左右，明显高于单用顺铂处理组和单用 pSilencer2.0-SVV2 转染组。研究结果表明：顺铂不会有效降解 survivin 活性；单用 pSilencer2.0-SVV2 转染组未表现出理想抑制效应，说明目前靠单一基因抑制难以达到完全抑制肿瘤目的，这可能与转染效率低，基因沉默效应短暂等不足有关；两者联用后，靶向 survivin 的 siRNA 削弱了 survivin 蛋白功能，激活了凋亡信号级联反应，增强了化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用，可以发挥两者协同抑瘤效应。这与李伟等报道利用反以寡核苷酸封闭 survivn 联合顺铂明显增强肺癌 NCI-446 细胞凋亡作用相一致[5,6]。A549 细胞对顺铂的耐药性产生有可能与 survivin 基因存在密切关系，抑制 survivin 基因表达可以增强肺癌细胞对顺铂的敏感性的机制可能为：(1)顺铂介导的细胞死亡是通过 caspase-3 激活途径，survivin 基因表达下调可增加 caspase 活性，降低顺铂杀死癌细胞所需的凋亡阈值[6]；(2)顺铂化疗时，survivin 基因还能与肿瘤细胞释放的辅助性线粒体源性 caspase 激活因子结合，从而阻断后者对细胞凋亡蛋白促进剂的结合，进而抑制细胞凋亡[7]；(3)Survivin 基因与顺铂均作用于微管蛋白，两者可能存在竞争抑制作用，一旦 survivin 基因被抑制，可明显增加肺癌细胞对顺铂的药物敏感性[8]。具体细胞通路还有待于进一步研究。

本实验表明将靶向 survivin 的 siRNA 和顺铂联用可以协同抑制 A549 细胞的增殖并诱导其凋亡，减轻顺铂的毒副作用及肿瘤耐药性的产生，在不增加顺铂剂量的前提下增强肿瘤对其的敏感性。我们认为，将 RNA 干扰技术和传统化疗有机结合，既可以体现生物治疗的靶向安全性，又可以增强化疗药物细胞毒效力，两者相互促进，把抗肿瘤效应发挥到最大程度，这也许是目前合理利用基因治疗的一种有效途径。

参 考 文 献

[1] Chakravarti A, Noll E, Black PM, et al. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human glioms[J]. J ClinOncol, 2002, 20(4): 1063-1068.

[2] Muchmore SW, Chen J, Jalob C, et al. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor of apoptosis protein survivin[J]. Mol Cell, 2000, 6(1): 173-182.

[3] Tamm I, wang Y, Sansvillc E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5313-5320.

[4] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.

[5] 李 伟，陈余清，周继红，等. Survivin 反义寡核苷酸联合顺铂诱导肺癌细胞凋亡的研究[J]. 中华内科杂志，2006，45(5)：414-416.

[6] 刘永全，江 涛，冯燕梅. 抑制 survivin 基因表达对肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 重庆医学，2008，37(4)：388-390，392.

[7] Von Haefen C, Wieder T, Essmann F, et al. Paclitaxe1-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop[J]. Oncogene, 2003, 22(15): 2236-2247.

[8] Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti—apoptotie activity of survivin during taxol—induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(25): 23130-23140.

[9] Tamm L, Wang Y, Sausvile E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95). Bax, caspases, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5315-5320.

（责任编辑：关蕴良）