维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0033-04

RNA 干扰技术阻断 EJ 细胞中 survivin 基因的表达

杨华安,苟 欣,吴 跃,郑传东

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:用真核转录载体 pSilencer2.0 构建针对 survivin 基因的重组真核转录载体,并转染膀胱肿瘤细胞系 EJ,通过 RNA 干扰(RNAi)阻断 EJ 细胞中 survivin 基因的表达。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、DNA 测序鉴定后,用脂质体法转染 EJ 细胞,通过 RT-PCR、免疫印迹检测干扰效果。结果:酶切及测序证实设计合成的 DNA 已正确插入载体。RT-PCR、免疫印迹检测实验表明:pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2 重组载体有效地阻断了 EJ 细胞中 survivin 基因的表达,survivin 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达明显下调($P<0.01$),其中 pSilencer2.0-SVV2 重组载体干扰效果更佳。结论:成功构建了针对 survivin 基因的真核转录载体 pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2,两者均可有效地阻断膀胱癌细胞系 EJ 细胞中 survivin 基因的表达,pSilencer2.0-SVV2 重组载体效果更佳,这为后继实验研究打下基础。

【关键词】RNA 干扰;Survivin;膀胱癌细胞

【中国图书分类法分类号】R730.15 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-07

Inhibition of survivin gene expression in EJ cells by RNAi

YANG Hua-an, et al

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

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic expression vectors with the pSilencer2.0 vector for inhibiting human survivin gene by RNA interference, and to detect the effect of the silenced survivin gene on EJ 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-SVV1and pSilencer2.0-SVV2, which were identified by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. Then the EJ cells were transfected with the recombinant vectors by lipofection and the interference effect was detected by RT-PCR and Western-blot. *Results*: Enzyme digestion analysis and DNA sequencing showed that two target segments were cloned into pSilencer2.0 vectors correctly. The results of RT-PCR and Western blot indicated that pSilencer2.0-SVV1 and pSilencer2.0-SVV2 vectors could significantly knock down the transcription and expression of survivin gene ($P<0.01$), and the latter was better. *Conclusion*: pSilencer2.0-SVV1 and pSilencer2.0-SVV2 vectors for survivin gene were constructed successfully. The transcription and expression of survivin gene were inhibited effectively by the constructed vectors in the bladder cancer cell line EJ and the latter was better. This paves way for the subsequent studies.

【Key words】 RNA interference; Survivin; Bladder cancer cell

肿瘤的发生是细胞增殖与细胞凋亡失衡所致,受体内外多因素调控,靶向治疗有其明显的特异性强、副作用小等优势。survivin[1]是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein)家族中成员,定位于染色体 17q25,全长 14.7kb 的基因编码 142 个氨基酸的蛋白质,相对分子质量(Mr)为 16 500。它广泛表达于人类各种肿瘤,具有抑制细胞凋亡、参与细胞周期调节和促进血管形成等功能。survivin 在肿瘤组织中高表达,而在绝大多数正常分化成熟的组织中不表达,而且它的上调联系着一系列人类肿瘤疾病发生,并使其更具侵袭性,患者存活时间更短和对化疗药物耐受[2]。

RNA 干扰(RNA interferene, RNAi)是指双链 RNA 介导的、序列特异的转录后基因沉默的过程。

作者介绍:杨华安(1981-),男,硕士,主要研究方向:膀胱肿瘤及肾移植。

通讯作者:苟 欣,男,教授,E-mail:cymnk@163.com。

基金项目:重庆市卫生局基金编号:04-2-130。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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 在膀胱癌细胞系 EJ 细胞内表达针对 survivin 基因的短发卡状 RNA(Short hairpin RNA，shRNA)，以阻断细胞中 survivin 基因的表达，为研究 survivin 基因沉默后对 EJ 细胞凋亡，细胞周期等产生的影响打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pSilencer2.0-U6 质粒购自美国 Ambion 公司；survivin 特异性 DNA 片断由上海骏驰公司合成；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；去内毒素质粒提取盒购自博大泰克公司；RPMI1640 培养液为 Gibco 产品；标准胎牛血清购自天津 TBD 公司；一步法总 RNA 提取试剂 TRIZOL、转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司；EJ 细胞株、DH5α 菌种为本室保存；兔抗人 β 肌动蛋白、survivin 多克隆抗体 Santanscruz 公司；二抗(羊抗兔)和 ECL 显色液为中杉公司产品。

1.2 方法

1.2.1 survivin siRNA 序列设计 根据 GENBANK 中报道的 survivin 的 cDNA 序列(NM-00168)参考 ambion 公司 siRNA 设计原则和在线设计分析(http://www.ambion.com)分别设计两对 siRNA 干扰序列：序列 1：正义链 5'-GATCC GGACC ACCGC ATCTC TACA TTCG TGTAG AGATG CGGT GGTCC TTTTTT GGAAA-3'；反义链 5'-AGCTT TTCCAA AAAA GGACC ACCGC ATCTC TACA CGAA TGTAG AGATG CGGTG GTCCG-3'。序列 2：正义链：5'-GATCC GAATT AACCC TTGGT GAAT TTCG ATTCA CCAAGG GTTAA TTC TTTTT TGGAAA-3'；反义链：5'AGCTT TTCCAA AAAA GAATT AACCC TTGGT GAAT CGAA ATTCA CCAAG GGTT AATTCG -3'。画线部分为 survivin 基因特异性序列，序列经同源性分析后，提交上海英骏公司合成。按质粒说明书方法将正义链及反义链形成的双链 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，并提交上海生工公司进行 DNA 序列测定。将 2 个测序正确的重组质粒分别命名为 pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2，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-SVV1 转染组、pSilencer2.0-SVV2 转染组及阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染组，同时以未转染质粒的 EJ 细胞为未转染对照组，同步进行实验。

1.2.3 重组质粒转染 EJ 细胞 用去内毒素质粒提取试剂盒提取各重组质粒及 pEGFP 质粒，核酸分析仪测定浓度。将 EJ 细胞按 1×10^5 个/孔的数量转种于 6 孔培养板，10%胎牛血清的 RPMI 1 640 培养液，37℃、5%CO_2 培养细胞密度至 60%～80%时，更换无抗生素、无血清的 RPMI 1 640 培养液继续培养 6h，分别用重组质粒 pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2 及阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染 EJ 细胞，以未转染质粒的 EJ 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 5h 后更换为含 10%胎牛血清无抗生素 RPMI 1 640 培养液终止转染。

1.2.4 转染后 24h RT-PCR 提取各组 EJ 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。survivin PCR 引物正义链：5'-TTTCTCAAGGACCACCG-CATCT-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'-TCCACCAC-CCTGTTGCAGTA-3'，产物长度 452bp。产物经 2.0%琼脂糖电泳后于 CHERMI-IMAGER 5500 图像分析系统分析。EJ 细胞 survivin mRNA 的表达抑制率计算：抑制率 = [1-(EJ-siSVV-survivin 条带灰度/EJ-siSVV-GAPDH 条带灰度)/(EJ survivin 条带灰度/EJ GAPDH 条带灰度)]×100%

1.2.5 转染后 72h 细胞总蛋白的免疫印迹实验 一抗以述，滴度加 1:1 000，用 β-actin 作内参，滴度 1:4 000；ECL 化学发光显影。CHERMI-IMAGER 5500 图像分析系统分析结果。EJ 细胞 survivin 蛋白表达抑制率的计算：抑制率 =[1-(EJ-siSVV-survivin 条带灰度/EJ-siSVV-β-actin 条带灰度)/(EJ survivin 条带灰度/EJ β-actin 条带灰度)]×100%

1.3 统计学分析

使用 SPSS 10.0 统计分析软件，各实验组数据进行方差分析，试验组间的多重比较使用 SNK-q 检验。$P<0.05$ 为差异为显著性。

2 结 果

2.1 重组质粒的酶切鉴定及序列测定

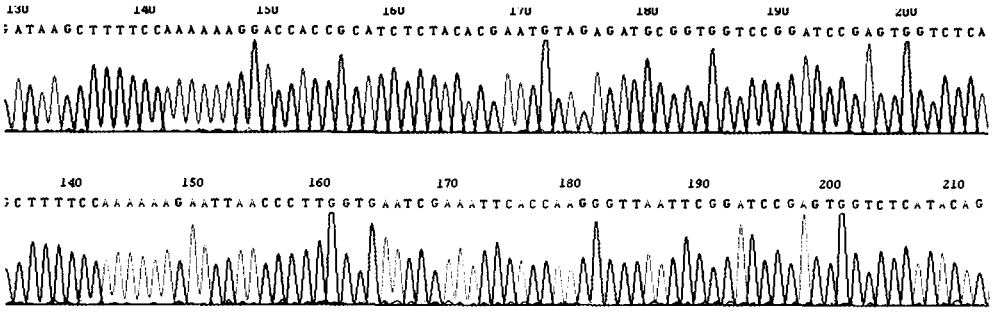
DNA 序列测定结果表明，各序列已成功插入了 pSilencer2.0 载体。测定结果见图 1。

2.2 转染后 EJ 细胞中 survivin 的表达

2.2.1 转染效率的观察 转染后 48h，经荧光倒置显微镜下观察 pEGFP 质粒同步转染的 EJ 细胞。结果显示见图 2。

2.2.2 RT-PCR 检测转染后 24h EJ 细胞中 survivin 的表达 图像扫描分析结果显示，与未转染组相较，pSilencer2.0-SVV1、pSilencer 2.0-SVV2 重组质粒转染的 EJ 细胞的 survivin mRNA 水平明显下调，survivin 的灰度值、峰高及密度均明显降低($P<0.01$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



上：pSilencer2.0-SVV1；下：pSilencer 2.0-SVV2

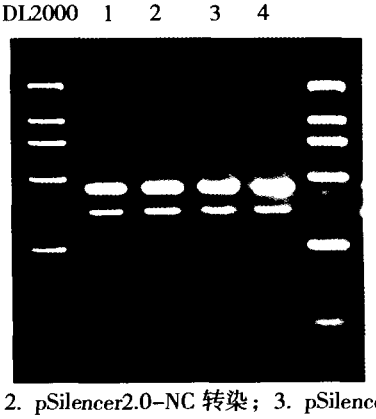
图 1 重组质粒测序鉴定序列图



图 2 pEGFP 质粒同步转染的 EJ 细胞，转染效率对照图片 1×100 倍

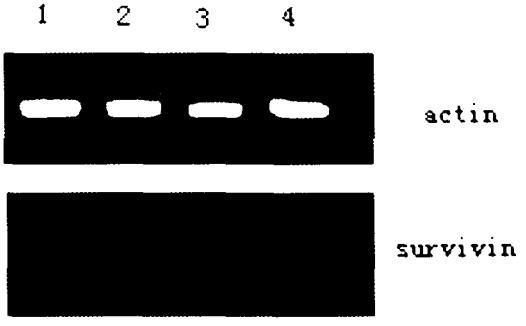
survivin mRNA 水平受到明显抑制，抑制分别达 20.7%，31.9%。pSilencer2.0-NC 转染的 EJ 细胞相比于未转染对照组的 survivin mRNA 水平无明显变化。各组间 GAPDH 和 survivin 的 mRNA 水平见图3。

2.2.3 免疫印迹实验检测转染后 72h EJ 细胞中 survivin 的表达 转染 72h 后，与未转染重组质粒的 EJ 细胞相比，pSilencer2.0-SVV1 和 pSilencer2.0-SVV2 重组质粒转染的 EJ 细胞，转染组的 EJ 细胞 survivin 的总蛋白水平明显下调，蛋白抑制率分别为 40.7%和 62.3%。未转染组与 pSilencer2.0-NC 组 survivin 蛋白表达无明显差别。各组间 β-actin 和 survivin 蛋白表达水平见图 4。



1. 未转染；2. pSilencer2.0-NC 转染；3. pSilencer2.0-SVV1 转染；4. pSilencer2.0-SVV2 转染

图 3 转染后 24h EJ 细胞中 survivin 及 GAPDH 的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图



1. 未转染；2. pSilencer2.0-NC 转染；3. pSilencer2.0-SVV1 转染；4. pSilencer2.0-SVV2 转染

图 4 转染后 72h EJ 细胞中 survivin 及 β-actin 的免疫印迹实验结果图

3 讨 论

RNAi 即双链 RNA 介导的、序列特异的转录后基因沉默。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 21～23nt 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 诱导的沉默复合物(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 12nt 的片段并使其降解[3]。由于 RNAi 具有高效、特异性，且 siRNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

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。

肿瘤的发生并非单个分子事件,而是一个多步骤过程,一般需要多个基因的改变,其中最广为人知的肿瘤抑制基因 p53 的突变是常见现象,膀胱癌的形成也不例外。膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,而移行细胞癌则是膀胱癌中最常见的组织学类型(90%),它具有容易复发的特点,部分浅表肿瘤随着复发将发生浸润和转移。如何针对膀胱癌的生物学特点采取合理的治疗措施是泌尿外科基础和临床研究者面临的重大挑战之一,survivin 蛋白因其特异的抗调亡和调节细胞周期的双功能,及其在膀胱癌组织细胞中的高表达,使其可能成为膀胱癌治疗的有力的潜在靶点。由于多数人膀胱癌组织 survivin 的异常高表达的同时伴随着野生型 p53 基因的突变。本研究选用的 EJ 细胞高表达 survivin 蛋白,同时该细胞株 p53 存在无意义突变。

Survivin 主要通过作用于各个凋亡途径的交汇点,直接或间接抑制凋亡终末效应器半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3、Caspase-7 及 Caspase-9 的活性、与周期蛋白激酶 Cdk4、$p34^{cdk2}$ 相互作用阻断凋亡信号转导通路这 2 条主要途径而阻断各种刺激因素诱导的细胞凋亡过程[4,5]。此外 survivin 参与形成过客蛋白复合体,调节细胞周期的进行,是联系细胞周期和凋亡界面的重要因子。因此 survivin 可能成为肿瘤基因治疗的新靶点[6,7]。此外,血管内皮生长因子(VEGF),血管形成素 -1(Ang-1)等在肿瘤管脉系统的生成, 特别是内皮细胞的增殖存活中起重要作用,这种作用有依赖于内皮细胞 survivin 的表达上调[8,9]。有研究显示 survivin 过度表达可能是某些肿瘤预后不良及产生耐药性的主要因素之一[10]。

本研究构建的 2 个针对 survivin 基因的重组真核转录载体 pSilencer2.0-SVV1 和 pSilencer2.0-SVV2,能在膀胱癌细胞系 EJ 细胞内表达针对 survivin 基因的 siRNA,且均可有效地抑制 EJ 细胞中 survivin 基因的表达,但 pSilencer2.0-SVV2 序列抑制效果更佳。近年来基因治疗是肿瘤治疗研究的热点之一,本实验构建的两个真核表达载体,特别是可高效地抑制 pSilencer2.0-SVV2 载体的构建成功,为进一步阐明 survivin 基因与膀胱癌的关系以及以 survivin 基因为靶点的膀胱癌基因治疗研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G,Adida C,Sirugo G,et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting[J]. J Biol Chem,1998;273(18):11 177-11 182.

[2] Johnson ME,Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein[J]. Vet Pathol,2004;41(6):599-607.

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

[4] Shin S,Sung BJ,Cho YS,et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7 [J]. Biochemistry,2001;40(4):1 117-1 123.

[5] Liu T,Brouha B,Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells[J]. Oncogene,2004;23(1):39-48.

[6] Yang D,Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004;101(42):15 100-15 105

[7] Beardmore VA,Ahonen LJ,Gorbsky GJ,et al. Survivin dynamics increases at centromeres during G_2/M phase transition and is regulated by microtubule-attachment and Aurora B kinase activity[J]. J Cell Sci,2004;117(18):4 033-4 042.

[8] Mesri M,Morales-Ruiz M,Ackermann EJ,et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting[J]. Am J Pathol,2001;158:1 757-1 765.

[9] Papapetropoulos A,Fulton D,Mahboubi K,et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/surviving pathway[J]. J Biol Chem,2000;275(13):9 102-9 105.

[10] Zaffaroni N,PennatiM, Colella G,et al. Expression of the antiapoptotic gene survivin correlateswith taxol resistance in human ovarian cancer[J]. Cell Mol Life Sci,2002;59(8):1 406-1 412.

(责任编辑:关蕴良)