维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0140-04

脂质体转染 survivin siRNA 对 A549 细胞增殖及凋亡的影响

刘永全,江 涛,冯燕梅

(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨脂质体转染 survivin siRNA 对人肺腺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响。方法:人工合成抑制 survivin 基因的 siRNA 片段,通过脂质体转染到 A549 细胞内,倒置荧光显微镜下观察细胞形态学变化;用四氮唑盐(MTT)法观察转染后 24h,48h,72h 对细胞增生的影响;流式细胞术检测各组细胞周期变化和凋亡指数;RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达。结果:转染 siRNA 后的 A549 细胞,细胞增殖受到显著抑制,细胞明显出现凋亡,survivin 基因 mRNA 表达显著下降。结论:应用 RNA 干扰靶向抑制 survivin 基因可以显著抑制 A549 细胞增殖,促进细胞凋亡。survivin 可能成为肺癌基因治疗的一个新靶点。

【关键词】Survivin,siRNA;细胞凋亡;肺癌;RNAi

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-03

Effect of liposomal transfection of survivin siRNA on proliferation and apoptosis of A549 cell

LIU Yong-quan, et al

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

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of liposomal transfection of survivin siRNA on the proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cell lines A549. *Method*: Survivin siRNA was synthetized and transfected into A549 cell by liposome. Cell morphological change was observed with inverted fluorescent microscope, cell proliferation was examined by MTT assay at 24h 48h and 72h after transfection. cell proliferation and apoptotic index detected by flow cytometry and survivin mRNA expression determined by RT-PCR. *Results*: For the A549 cell transfected with siRNA cell proliferation was ihibited significantly, cell apoptosis appeared obvious and the expression of survivin mRNA significantly decreased. *Conclusion*: Survivin siRNA is able to inhibit the proliferation of lung adenocarcinoma cell lines A549 and induce the cell apoptosis. Survivin might become a new target for lung carcinoma gene therapy.

【Key words】 Survivin, siRNA; Cell apoptosis; Lung carcinoma; RNAi

Survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis proteins,IAP)家族新成员[1],具有独特结构和性质,在包括肺癌在内的人类大多数肿瘤组织中都有较高的表达,它是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子。由于其表达的特异性及对细胞增殖和凋亡的双重作用,目前已成为在肿瘤发病机制及靶向治疗研究中的热点[2]。

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是 1998 年 Fire 首先发现并命名的转录后水平的基因沉默机制(Posttranscriptional gene silencing,PTGS),是近几年发展起来的一项特异性抑制基因表达的新方法,siRNA(Small interfering RNA)在哺乳动物细胞上的 RNA 干扰也获得了成功。目前研究发现 siRNA 是 dsRNA 发挥 RNAi 作用的中心环节和效应分子。根据这一生理机制,依照靶基因 mRNA 设计序列特异性 siRNA,可起到封闭特异性基因表达的作用。

survivin 在肺癌组织和细胞中有较高水平表达,可能是参与肺癌发生机制的重要环节。为了探讨靶向 survivin 治疗在肺癌发生发展中的意义和价值及评价 siRNA 介导的基因治疗技术,笔者设计合成了特异性靶向 survivin 的 siRNA 分子,并将其转染至 survivin 阳性表达肺癌细胞株 A549 细胞,观察其对 survivin 表达的阻抑作用及其对肺癌细胞凋亡、增殖

作者介绍:刘永全(1979-),男,硕士,研究方向:肺癌的靶向治疗。

通讯作者:江 涛,女,教授,E-mail:j*tcq@163.com。

基金项目:重庆卫生局基金资助项目(编号:05-2-140)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

脂质体为上海吉玛制药有限公司产品;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)相关试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司。

1.2 细胞株的培养

人肺癌 A549 细胞购自上海吉玛制药有限公司,在含 10%胎牛血清的 1640 中培养,温度为 37℃,CO_2 浓度为 5%。

1.3 survivin siRNA 分子的设计与合成

根据针对 survivin 编码框采用生物信息学设计 siRNA 序列,序列为:5'-GGACCACCGCAUCUCUACAdTdT-3',并同时合成 Anti-sense5'-UGUAGAGAUGCGGUGGUCCdTdT-3',经退火形成双链(dsRNA),即特异性 siRNA 分子。该序列经 BLAST 查询,确定为 survivin 特异性序列,排除与其他基因同源。阴性对照 siRNA 序列为:5'-CGUACGCGGAAUACUUC-GADTDT-3',此序列不与人类任何基因序列同源。FAM 标记的阴性对照 siRNA:Sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',Anti-sense5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3',以上核苷酸分子均由上海吉玛制药有限公司合成。

1.4 细胞分组和转染

取对数生长期的 A549 细胞,传代接种于 6 孔板内,调整细胞浓度,使每孔细胞数为 1×10^5 个,常规条件下培养 24h,在显微镜下观察,细胞融合达到约 80%时开始实验。设置:①空白对照组;②脂质体组,只加入脂质体;③阴性对照组:转染荧光标记的阴性对照 siRNA 序列;④siRNA 转染组:转染特异性 siRNA 序列;⑤方法:按上海吉玛制药技术有限公司提供的转染试剂手册操作。

1.5 MTT 法检测细胞活性

将对数期生长的各组细胞,按 1×10^5 个/孔分别接种到 96 孔培养板中,在培养 24、48、72h 后收集上述 3 组细胞,MTT 法,酶标仪下 570nm 波长测 OD 值,每组 6 孔,重复 3 次,计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率 =(空白组 OD 值 - 处理组 OD 值)/ 空白组 OD 值 × 100%。

1.6 流式细胞术检测细胞增殖和凋亡指数

将收获的各组细胞制成单细胞悬液,加入预冷的冰乙醇,-4℃内固定 24h 后使用;取固定好的细胞,碘化丙啶溶液避光染色 30min 后待用;采用 Beckon/Dickinson Facssort 型流式细胞仪,在 488nm 波长处进行检测,应用相应程序软件进行资料的处理和分析。细胞凋亡指数(AI)= 亚二倍峰细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.7 RT-PCR 术检测 survivin mRNA 水平

收集培养细胞,调整细胞浓度为 5×10^6~1×10^7 个孔,采用 TRzoL 法提取总 RNA。采用 10μl 反应体系(含待测 RNA 1μl,AMV 0.5μl 及适当浓度的 Oligod T、dNTP 和氯化镁)30℃反应 10min,42℃反应 45min,99℃ 反应 5min,5℃反应 5min 以合成 cDNA。PCR 反应采用 40μl 反应体系(5× PCR Buffer 10μl,Taq 酶 0.25μl,引物各 0.5μl),PCR 反应条件为 94℃反应 2min,55℃反应 45s,72℃反应 2min,共经过 35 个循环反应。所得 PCR 产物在含 EB 的 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳分离,在紫外灯下分析结果。(所用的 survivin 的引物序列:上游引物为 5'-GGCATGGGTGCCCCGACGTT-3';下游引物为 5'-AGAGGCCTCAATCCATGGCA-3',产物为 393bp。同时以 β-actin:上游:5'-TGGCATTGCCGACAGGATGCAGAA-3',下游:5'-CTCGTCATACTCCTGCTTGCTGAT-3' 为反应内参(扩增片段 250bp)作为内参照。扩增产物经含 EB 的 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外线下观察并计算各条带的积分吸光度(IA),以 survivin 与 β-actin 的 IA 比值表示 survivin mRNA 的相对含量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件,对数据进行 t 检验。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察

荧光倒置显微镜下,转染组和阴性对照组出现黄绿色圆而透亮的细胞,细胞碎片增多(见图 1)。



图 1 FAM 标记的阴性对照 siRNA 转染 A549 细胞 8h

2.2 MTT 法比较细胞增殖活性

MTT 法结果显示,survivin siRNA 转染对 A549 细胞增殖有明显抑制作用,抑制率明显高于阴性对照组、脂质体空转染组和空白对照组($P<0.01$)。同时,阴性对照组与脂质体空转染组之间的差异无显著性($P>0.05$)。具体见表 1。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡指数

于转染 48h 后收集细胞检测细胞周期和凋亡,结果显示,survivin siRNA 转染组细胞明显被阻滞于 G_2/M 期,凋亡率 4 组分别为 survivin siRNA 转染组 6.08%,空白组 0.14%,空脂质体组 0.86%,阴性

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 脂质体转染 siRNA 在不同作用时间对 A549 细胞的生长抑制率($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞抑制率(%)		
	24h	48h	72h
空白对照组	—	—	—
空脂质体组	5.98 ± 1.28	6.30 ± 1.12	6.72 ± 1.05
阴性对照组	5.52 ± 1.76	5.73 ± 1.63	6.18 ± 1.81
SiRNA 组	12.38 ± 1.36	29.26 ± 1.42	21.22 ± 1.21*#

注:(1) *同一时间,与各对照组比较,$P<0.05$;(2) # 同一组间,不同时间两两比较,$P<0.05$

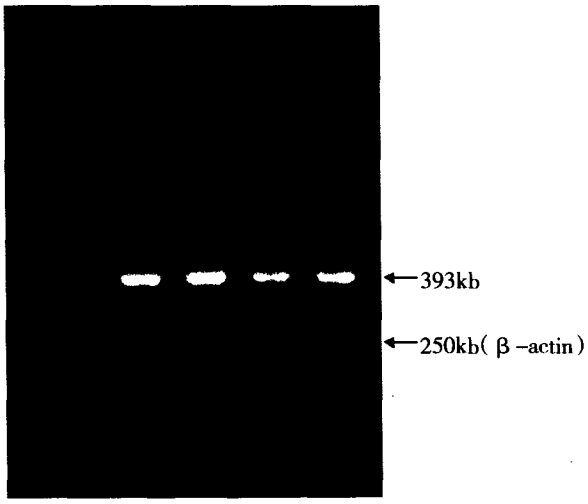
表 2 siRNA 转染对细胞周期变化和凋亡的影响

细胞周期 / 组别	G_0/G_1(%)	S(%)	G_2/M(%)	凋亡率(%)
空白对照组	84.40	7.60	8.00	0.14
空脂质体组	76.79	11.81	11.40	0.86
阴性对照组	73.23	8.56	18.22	1.28
siRNA 组	54.67	8.30	37.03	6.08

对照组 1.28%也明显高于其它 3 组。这说明 survivin siRNA 可以抑制 survivin, 诱导细胞凋亡 (表 2)。

2.4 survivin siRNA 转染对 A549 细胞 survivin mRNA 的影响

通过 RT-PCR 可获得 393bp(survivin)及 250bp(β-actin)2 条带,β-actin 在各组中表达相似、条带清晰,siRNA 组 survivin mRNA 表达的条带亮度低于其余各组(图 2),经凝胶分析系统鉴定电泳结果后,得出 survivin/β-actin 吸光度比值:空白对照组 0.886 ± 0.002,脂质体空转染组 0.825 ± 0.001,阴性对照组 0.794 ± 0.004,此 3 个实验组间两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。siRNA 转染组比值为 0.623 ± 0.006,与 3 个实验组比较均显著降低($P<0.05$)。统计学分析显示:siRNA 组 mRNA 的表达显著低于空白组,余各组之间无明显差别。结果表明,survivin siRNA 作用于 A549 细胞 48h 后 survivin mRNA 表达明显下调,而脂质体空转染组、阴性对照组和空白对照组 survivin mRNA 水平无明显变化。表明 survivin siRNA 可诱导 survivin mRNA 特异性降解。



1.空白组;2.脂质体组;3.阴性对照组;4.siRNA 组

图 2 siRNA 转染对 survivin mRNA 表达影响

3 讨 论

细胞凋亡对细胞生长和肿瘤发生起着重要的作用,许多研究表明凋亡调节功能的异常与肿瘤的发生有关,其中多个癌基因、抑癌基因在细胞凋亡途径中起作用。survivin 是最近发现的一种新的 IAPs 家族蛋白,是迄今发现的最小的 IAPs 蛋白,含有 142 个氨基酸,仅含有单一的杆状病毒 IAP 重复序列(Baculovirus IAP repeat,BIR)功能区,没有环指结构。survivin 具有控制细胞凋亡和调节细胞分裂的功能。survivin 可以通过抑制凋亡通路下游的 Caspase-3 和 Caspase-7 而发挥抗凋亡作用[3]。此外,survivin 还特异地在细胞周期 G_2~M 期高表达,通过与细胞有丝分裂纺锤体的微管结合,参与细胞增殖

维普资讯 http://www.cqvip.com

的调节。survivin 的组织分布特征有明显的细胞选择性，它表达于胚胎和发育的胎儿组织，不见于终末分化的正常成人组织(胸腺和生殖腺除外)，但在体内外的未分化组织、包括肺癌在内的人类大多数肿瘤组织内有 survivin 的表达[4]，且其表达和肿瘤的恶性程度、预后和复发有关。有学者[5]研究 survivin 在早期 NSCLC 中的表达情况，发现肺癌细胞中 survivin 的表达明显高于非肿瘤组织，而且survivin 的表达几乎总是存在于 NSCLC 的早期阶段。这些结果为癌症的选择性治疗提供了一个新的途径。

RNA 干扰，是指将外源性或内源性双链 RNA (Double-stranded RNA，dsRNA)导入细胞后引起与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解，其相应的基因受到抑制。RNAi 技术有高效率、高特异性、显效快、可以向子代遗传和可同时进行多基因研究等优点，因此自发现以来，已广泛用于基因功能，基因诊断与治疗的研究中。孙建国等[6]利用 RNAi 技术在肺腺癌 SPC-A1 细胞株中分别建立 2 种 livin 异构体的基因沉默体系，发现 RNAi 能高效特异阻断 2 种 livin 异构体的表达，诱导细胞凋亡，为进一步探讨它们作为诱导肺癌细胞凋亡治疗分子靶点及提高肺癌放化疗的敏感性打下了基础。Kappler 等[7]体外合成了针对 survivin 的 dsRNA，构建了腺病毒载体，转染人软组织肉瘤细胞株，发现 survivin mRNA 表达下降了 73%～88%，survivin 蛋白表达减少了 52%～81%，90%的细胞阻滞在 G_2/M 期，细胞凋亡率上升，但有关 RNAi 在肺癌中的研究尚未见报道。

本研究成功构建了针对 survivin 的 siRNA，并通过脂质体转染 survivin 表达阳性的 A549 细胞，观测其对细胞 survivin 表达及细胞增殖、凋亡的影响。MTT 法结果显示，survivin siRNA 转染对 A549 细胞增殖有明显抑制作用，抑制率明显高于其他组；流式细胞术试验结果证实 survivin siRNA 转染可有效抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖活性，阻滞 A549 细胞于 G_2/M 期，诱导细胞凋亡。RT-PCR 结果显示，survivin siRNA 转染可显著抑制 survivin mRNA 的表达，证明针对 survivin 的 siRNA 转染 A549 细胞后可以有效抑制 survivin 表达，使靶细胞出现 G_2/M 期阻滞，造成细胞生长速度减慢，细胞凋亡增加，表明 survivin 参与了 A549 细胞周期和增殖调控，在 NSCLC 的发展中具有重要作用，这与国内外有关学者应用 survivin 反义寡核苷酸技术诱导肺癌细胞凋亡研究结果基本一致，如 Olie[8]等用最佳反义寡核苷酸序列 4 003 转染 A549 肺癌细胞 24h 后可使survivin mRNA 水平下降 30%，细胞生长受到抑制并直接诱导凋亡。同时肿瘤细胞对化疗的敏感性也提高了 6 倍，而不表达 survivin 的正常细胞却不受影响。但在基因功能研究和基因治疗方面 RNA 干扰技术比反义技术要更加优越，具有高稳定性、高特异性和高效率性。虽然本研究证实了应用 RNA 干扰技术抑制 survivin 表达的可行性，研究结果为应用 siRNA 进行肺腺癌基因治疗的进一步研究提供了实验基础和方向，然而，应用脂质体瞬时转染存在脂质体毒性较大、转染效率低、基因沉默效应短暂等不足，还需要构建带筛选标记的 siRNA 表达质粒，进行稳定转染，以获得较长时间的基因沉默效应和更为理想的干扰效果。

参 考 文 献

[1] Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis [J]. Br J Cancer, 2005; 92(2): 212-216.

[2] Altieri D C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003; 22(53): 8581-8589.

[3] 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): 1117-1123.

[4] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997; 3(8): 917-921.

[5] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Patllol, 2003; 200(5): 620-626.

[6] 孙建国，廖荣霞，陈正堂，等. Livin 异构体特异性 siRNA 表达载体的构建及其在 SPC-A1 细胞中的稳定表达[J]. 肿瘤，2006; 26(2): 139-143.

[7] Kappler M, Bache M, Barrel F, et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53[J]. Cancer Gene Ther., 2004; 11(3): 186-193.

[8] Olie RA, Simoes—Wust AP, BaumannB, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotberapy[J]. Cancer Res, 2000; 60(11): 2805-2809.

(责任编辑：谭乐勤)