重庆维普 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2008)09-1080-04

RNA 干扰技术特异性抑制肾癌 survivin 表达的实验研究

徐 斌,胡自力

(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:体外转录合成 survivin siRNA(Small interference RNA,siRNA),观察其在肾癌 786-O 细胞株中抑制 survivin 的表达情况。方法:体外转录合成 3 组 survivin 序列特异性双链 RNA(Double-stranded RNA,dsRNA),转染 786-O 细胞株中,用 RT-PCR 和 Western blot 检测转染后 survivin 基因的 mRNA 和蛋白的表达,MTT 法检测细胞活性。结果:有 2 组转染特异性 siRNA 的 786-O 细胞表达 survivin mRNA 及蛋白均下调,活性受到抑制,另一组效果不明显。结论:体外转录合成特异性 survivin siRNA 能有效抑制肾癌 786-O 细胞中 survivin 的表达,抑制细胞的活性,RNA 干扰(RNA interfering,RNAi)技术可能为肾癌的基因治疗提供一种新策略。

【关键词】肾癌;基因治疗;RNA 干扰;生存素

【中国图书分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-05

Inhibition of survivin expression by RNA interference in renal cancer cell line 786-O

XU Bin,et al

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

【Abstract】*Objective*:To study the inhibition of survivin expression by small interference RNA(siRNA) synthesized in vitro in renal cancer cell line 786-O. *Methods*:Three groups of survivin siRNAs were chemically synthesized in vitro and then transfected into cell line 786-O. The expression of survivin mRNA and protein after transfection were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)and Western Blotting. The proliferation of cells was detected by MTT. *Results*:Two sequence specific siRNAs targeting survivin down-regulated the expression of survivn mRNA and protein. The proliferation of cells was inhibited after transfection. The third one was ineffective. *Conclusion*:Sequence specific siRNA targeting survivin can efficiently inhibit the survivin expression and cell proliferation in renal cancer cell line 786-O. The successful application of RNAi targeting survivin might extend the list of available gene therapeutic modalities in renal cancer.

【Key words】 Renal cancer;Gene therapy;RNA interference;Survivin

Survivin 基因是近年来发现的一个细胞凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein,IAP)家族的新成员,它参与了细胞周期的调控,与肿瘤的发生、发展和预后密切相关,且由于其具有在正常组织中不表达,而在人类肿瘤中高表达的特性[1],有望成为肿瘤基因治疗的选择性靶点,近年来引起学者们的广泛关注[2,3]。

RNA 干扰技术是近年来发展起来的新技术,它主要利用双链 RNA 在细胞内经 Dicer 酶的识别、结合、酶切,产生有活性的长度为 21~23nt 小干扰RNA,与目的基因 mRNA 结合并使之降解,从而抑制目的基因的表达。RNAi 的发现为基因治疗学提供了更为有效的方法[4]。

本研究通过 RNAi 技术抑制已明确高表达 survivin 的人肾癌 786-O 细胞株的 survivin 表达[5],探讨利用体外转录 siRNA 的方法能否有效介导肿瘤细胞出现 RNA 沉默,为肾癌的基因治疗探索新策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 脂质体 Lipofectin® Reagent,SuperScript™ Ⅲ One-eStep RT-PCR with Platinum® Taq DNA Polymerase,Western

作者介绍:徐 斌(1981-),男,硕士,
研究方向:泌尿男生殖系肿瘤。

通讯作者:胡自力,男,主任医师,E-mail:huzili6767@163.com。

重庆维普 http://www.cqvip.com

Breeze 抗兔化学发光试剂盒均购自 Invitrogen 公司，一抗兔抗人 Survivin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司，Trizol 试剂购自 TaKaRa 公司，去内毒素质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。Survivin RT-PCR 上游引物 5'-TACAGCTTCGCTGGAAACCT-3'，下游引物5'-AGCCCGGATGATACAAACAG-3'，由上海 Invitrogen 公司合成，扩增片断预期产物 251bp。蛋白提取的 RIPA 裂解液购自碧云天公司。

1.1.2 细胞株 人肾癌 786-O 细胞株由重庆医科大学超声研究所提供。

1.1.3 siRNAs 的设计与合成 根据 survivin 基因在 GeneBank 中序列设计相应的 3 组阳性 siRNA（survivin1 5'-GGACCACCGCATCTCTACA-3' 166；survivin2 5'-GCATTCGTCCGGTTGCGCT-3' 358；survivin3 5'-GGCTGGCTTCATCCACTGC-3' 241）和一组阴性对照（5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3'），其转录模板与 pGenesil-1（带 GFP 基因及 neo 基因）连接并转化入大肠杆菌 DH5α 菌株的工作由武汉晶赛公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 786-O 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37℃，5%CO_2 孵箱中。细胞分组：A 组转染 survivin1 siRNA；B 组转染 survivin2 siRNA；C 组转染 survivin3 siRNA；D 组转染阴性对照 HK siRNA；E 组为正常肾癌细胞组（不加质粒只加脂质体）。

1.2.2 转染 转染前 24h，6 孔板接种细胞 1×10^5 个/孔，每孔加 2ml 无双抗的含 10% 血清的 RPMI1640，达 80% 融合时转染（每组加质粒浓度约 2.4μg/ml，脂质体浓度为 15μl/ml）。转染步骤按 Lipofectin® Reagent 说明书进行。我们随机选取 10 个视野，分别计数 GFP 阳性细胞和细胞总数，然后二者比值为转染率。

1.2.3 MTT 法 用 96 孔板培养细胞，每孔接种细胞密度为 500 个/200μl，每组平行 3 孔，并设立空白对照。接种 24h 后转染，转染 72h 后弃上清，每孔加 20μl 新配制的 5g/L MTT，孵育 4h，弃上清，加 150μl DMSO 溶解，混匀后用酶标仪 490nm 波长测定。

1.2.4 RT-PCR 转染 48h 后按 Trizol 说明书提取各组细胞总 RNA，用凝胶电泳分析 RNA 纯度并用紫外分光光度计测量 RNA 的浓度。按 SuperScript Ⅲ OneStep RT-PCR 说明进行反应。内参 β-actin：上游引物：5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3'，下游引物：5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3'，扩增片段为 587bp。RT-PCR 反应条件：50℃ 20min 合成 cDNA，94℃ 2min，94℃ 15s，58℃ 30s，68℃ 20s，40 个循环。电泳条带经 Quantity One 软件处理，各组的 survivin 条带/β-actin 条带灰度值比值作为其 survivin mRNA 的相对表达量。

1.2.5 Western blot 法 转染 72h 后，按 RIPA 裂解液说明书提取细胞总蛋白，Bradford 法测蛋白浓度。一抗兔抗人 Survivin 多克隆抗体及内参 β-Tubulin 抗体 37℃温育 1h，用 Western 试剂盒中鼠抗兔二抗室温孵育 30min，按其说明书发光成像。条带经 Quantity One 软件处理，各组的 Survivin 条带/β-Tubulin 条带灰度值比值作为其 Survivin 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

统计结果用 SAS 统计学软件进行分析，数据两两比较采用配对资料 t 检验，多组之间比较用 ANOVA 进行。

2 结 果

2.1 荧光倒置显微镜观察

转染 24h 后，各组细胞形态相似，荧光显微镜下 ABCD 组可见少量绿色荧光，30h 时每孔加入 G418（氨基糖甙类抗生素，neo 基因产生 G418 抗性），使其浓度为 350μg/ml。54h，各组部分细胞变圆，折光性降低，有较多坏死细胞，尤以 A、C 严重（见图1、2），荧光下 A、B、C、D 组绿色荧光较前明显增多。转染率的计算，5 个组分别为（35.600 0±0.121 8）%，（34.300 0±0.167 5）%，（36.800 0±0.163 2）%，（36.200 0±0.146 8）%，0（见图 3，4）。A、B、C、D 组之间转染率差异无统计学意义（$P>0.05$）。

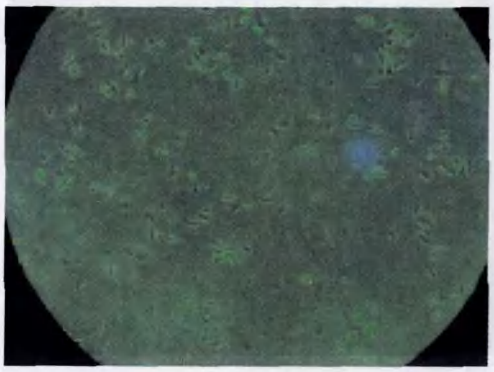


图 1 转染后 54h A 组细胞状态（×200）

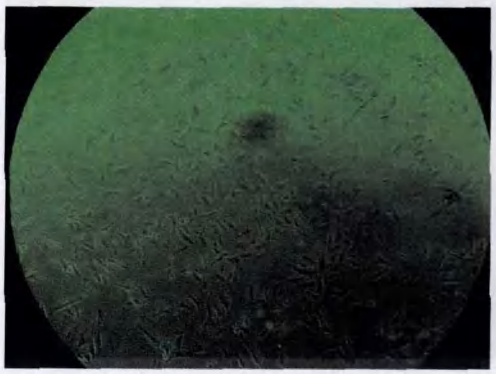


图 2 转染后 54h D 组细胞状态（×200）

重庆维普 http://www.cqvip.com

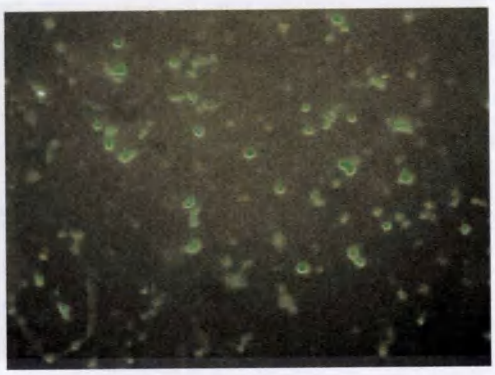


图 3 转染后 54h 荧光下 A 组细胞(×200)

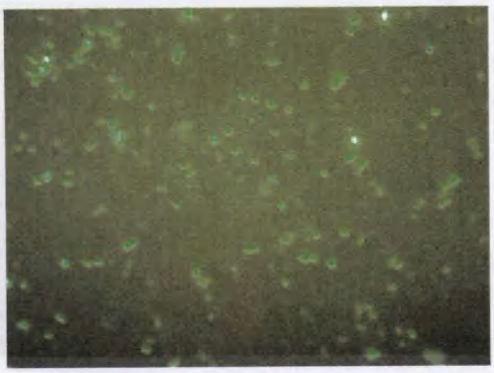


图 4 转染后 54h 荧光下 D 组细胞(×200)

2.2 RT-PCR

5 组细胞总 RNA 由 1%琼脂糖凝胶电泳均见 28s、18s、5s 的 3 条带,未见 DNA 条带。紫外分光光度法测总 RNA 吸光度(A_{260}/A_{280})值都在 1.9 左右。RT-PCR结果(见图 5)显示 5 个组 587bp 左右的 β-actin 条带亮度相当,251bp左右的survivin条带A、C组(survivin/β-actin 灰度值比值分别为 0.390 0±0.159 2 及 0.370 0±0.136 4)明显弱于 B、D、E 组(survivin/β-actin 灰度值比值分别为 1.080 0±0.142 6,1.03±0.096 8 及1.020 0±0.095 7)($P<0.01$),抑制率为 63.89%,而 A、C 组之间以及 B、D、E 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 Western blot

结果(见图 6)显示 5 个组的 β-Tubulin 条带亮度相当,Survivin 蛋白条带 A、C 组(Survivin/β-Tubulin 灰度值比值 0.440 0±0.157 9 及0.480 0±0.135 2)明显小于 B、D、E 组(Survivin/β-Tubulin 灰度值比值 1.060 0±0.167 1,1.000 0±0.098 2 及 1.010 0±0.100 4)($P<0.01$),抑制率为 55.45%,而 A、C 组之间以及 B、D、E 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 细胞增殖抑制实验(MTT)

转染 72h 后,A 组细胞吸光度(0.370 0±0.015 3)与 C 组(0.360 0±0.022 7)无显著性差异($P>0.05$),

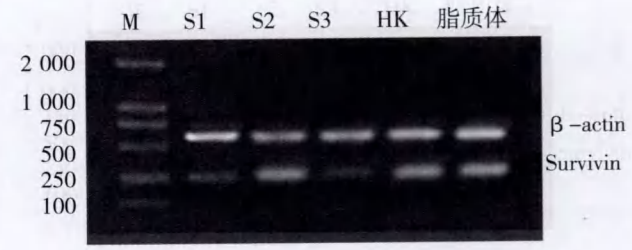


图 5 转染后的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

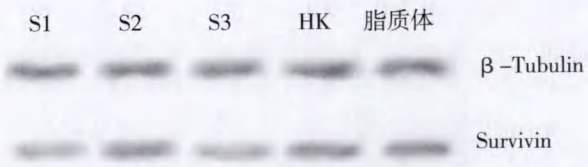


图 6 转染后 Survivin 蛋白的表达

B 组细胞吸光度(0.530 0±0.026 7)、D 组(0.530 0±0.038 8)、E 组(0.560 0±0.021 1)之间无显著性差异($P>0.05$),A、C 组与 B、D、E 组之间具有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨 论

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率占全身恶性肿瘤的 3%[6]。约 50%的患者首次就诊时已属晚期,且绝大多数肾癌为先天多药耐药,对化疗和放疗不敏感,除了早期肾癌应用手术治疗效果较好外,大多数中晚期肾癌缺乏特异性疗法。近年来,对基因疗法的应用研究逐渐成为肾癌特别是中晚期肾癌新疗法的研究热点,并取得了一系列进展[7,8]。

RNAi 是由 Fire 等在 1998 年研究 Caenorhabditis elegans 基因组计划时发现并命名的[9],Elbashir 等证实在哺乳动物细胞中也可以应用 RNAi 技术[10]。与其他技术相比,RNAi 干扰具有转染效率高,基因封闭作用强等优点。Survivin 是最近发现的一个在调控细胞内平衡中发挥多效应功能的重要分子,作为 IAP 家族成员之一,其主要通过 caspase 依赖和 caspase 非依赖两条途径来发挥抗凋亡作用[11]。Survivin 仅在多种肿瘤表达使靶向阻断 survivin 的免疫治疗或基因治疗促进肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤疗法成为可能。

本实验采用的质粒带有表达 GFP 的基因,目的是在荧光显微镜下通过观察 GFP 的表达情况,直接观察阳性转染的细胞并观察转染效率,这是此载体

重庆维普 http://www.cqvip.com

的显著优点。而 siRNAs 的设计是根据 Reynolds 的干扰 RNA 设计原则 [12]，运用体外转录合成针对 survivin 的 siRNA 成功地抑制了人肾癌 786-O 细胞株中的 survivin 基因的表达。Survivin 对细胞凋亡有调节作用，本实验 MTT 结果显示转染特异性 siRNA后，S1 和 S3 组的吸光度明显低于其他 3 组，提示阻断survivin 基因表达后抑制了细胞的增殖。运用RT-PCR 检测转染特异性 S1、S3 siRNA 48h 后即出现 survivin mRNA 的沉默。在转染 S2、非特异性的 siRNA及未转染的细胞中 survivin mRNA 仍持续表达。用Western blot 同样检测到了转染特异性 S1、S3 siRNA 72h 后即出现 Survivin 蛋白的下调，与转染后 mRNA 的改变一致，在转染 S2、非特异性的 siRNA 及未转染的细胞中Survivin 蛋白未见改变。可见，体外转录合成的 siRNA 能有效干扰目的基因，本实验中 survivin2 干扰效果不明显，可能是由于干扰片段属内含子或编码区空间构象被遮盖等问题。

本研究结果显示，体外转录合成的 siRNA 可转染肾癌 786-O 细胞并抑制功能基因的表达。可见，RNAi 的方法能成功的沉默人肾癌中的 survivin 基因，这为今后研究 survivin 在肾癌中的作用机制及其途径提供了良好的基础。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Lin PY, Fosmire SP, Park SH, et al. Attenuation of PTEN increases p21 stability and cytosolic localization in kidney cancer cells: a potential mechanism of apoptosis resistance[J]. Mol Cancer, 2007;6(72):16.

[3] Pan J, Mestas J, Burdick MD, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis[J]. Mol Cancer, 2006;5(58):56.

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

[5] 焉杰克，徐忠华，王洪伟，等.凋亡抑制因子 Survivin 在肾癌中的表达及意义[J]. 现代泌尿外科杂志，2007;12(5):284-286.

[6] Atrick C, Walsh M D. 坎贝尔泌尿外科学[M]. 北京科学出版社，2001.2292.

[7] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducihle factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions[J]. Exp Mol Med, 2004;36(1):1-12.

[8] Hirota E, Yan L, Tsunoda T, et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2006;29(4):799-827.

[9] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998;391(6669):806-811.

[10] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in culture mammalian cells[J]. Nature, 2001;411(6836):494-508.

[11] 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.

[12] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[M]. Nat Biotechnol, 2004;22(9):326-330.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 1046 页)

性 ED 发生的一个重要机制。提示：老年性糖尿病ED时可使用氧自由基清除剂，减轻海绵体超微结构改变以及改善海绵体血管内皮依赖性舒张功能达到近期和远期改善海绵体勃起能。

参 考 文 献

[1] EL-Sakka AI, Tayeb KA. Ectile dysfunction risk factors in noninsulin dependont diabetic Saudi patients[J]. J Urol, 2003;169(3):1043-1047.

[2] Yamanaka M, Shirai M, Shiina H, et al. Diabetes induced erectile dysfunction and apo-ptosis in penile crura are recovered by insulin treatment in rats[J]. Jurol, 2003;170(1):291-297.

[3] 黄淑妍.糖尿病性勃起功能障碍研究进展[J]. 中华男科学杂志，2006;12(2):178.

[4] 陈 赟，戴玉田，孙则禹，等.糖尿病性勃起功能障碍多因素发病机制研究[J]. 南京大学学报(自然科学)，2006;42(5):464.

[5] 柳其中，龚同欣.糖尿病大鼠阴茎组织细胞凋亡的研究[J]. 中化男科学杂志，2004;18(2):35-36.

[6] 黎英荣，汪恕萍.糖尿病大鼠阴茎勃起功能的变化及胰岛素的治疗作用[J]. 重庆医科大学学报，2002;27(2):142-144.

[7] 孙 蓉、孙 玲，刘持年.川芎抗氧化的研究进展和应用前景[J]. 中国新医药，2003;2(9):42.

[8] 雷康福，陈秀芳，董 敏.L-精氨酸对糖尿病大鼠肾脏、大脑、睾丸氧自由基和抗氧化水平的影响[J]. 中国老年学杂志，2005;25(8):936.

[9] 程赣萍，王桥根，应卫婵，等.依达拉奉治疗糖尿病周围神经病变临床观察[J]. 中国药物与临床，2006;6(1):75.

[10] 王少莲，陈 丽.糖尿病血清一氧化氮与血管内皮依赖性舒张功能的关系[J]. 中华中西医学杂志，2005;3(6):19.

(责任编辑：冉明会)