



靶向survivin的siRNA诱导胰腺癌细胞凋亡的实验研究

Survivin基因是于1997年发现的凋亡抑制蛋白家族成员之一，具有抗凋亡和调节细胞周期的双重功能。survivin的表达具有高度的特异性，在多数肿瘤组织中存在过表达，而在大多数正常组织中不表达，是肿瘤基因治疗的理想靶点。RNA干扰(RNAi)是双链RNA介导的转录后基因沉默，具有高度的特异性和有效性，正成为基因功能研究的有力工具。因此我们构建了靶向survivin的小干扰RNA(siRNA)质粒表达载体并转染胰腺癌PC-2细胞，观察其抑制PC-2细胞增殖及诱导其凋亡的作用。

1 材料和方法

1.1 胰腺癌细胞株和培养

胰腺癌细胞株PC-2购自第四军医大学动物实验中心，为贴壁细胞。采用含100 ml/L小牛血清、 1×10^5 U/L青霉素、0.1 g/L链霉素的RPMI 1640培养基在37 °C、50 ml/L CO₂、饱和湿度的条件下传代培养。

1.2 靶向survivin的siRNA质粒表达载体的构建

质粒Pgenesil-1购自武汉晶赛生物工程技术有限公司。用BamHI、HindIII双酶切使其线性化，1%低熔点琼脂糖凝胶回收大片段。针对目的基因survivin的序列5'-GGA CCA CCG CAT CTC TAC A-3' [1]设计两条DNA链，一条为：5'-GATCC GGA CCA CCG CAT CTC TAC A TTCAAGACG TGT AGA GAT GCG GTG GTC C TTTTTT GAATTC A-3'；另一条为3'-GCCT GGT GGC GTA GAG ATG T AAGTTCTGC ACA TCT CTA CGC CAC CAG G AAAAAA CTTAAG TTCGA-5'，DNA链的结构为BamHI+正义链+环状结构+反义链+中止信号+EcoRI +HindIII。上述两条DNA链退火并磷酸化后与线性化质粒载体Pgenesil-1连接。取连接产物转化感受态细胞DH5 α ，涂布于含0.05 g/L卡那霉素的固体LB平板上，37 °C恒温培养过夜。从每个培养皿上各挑取3个单克隆菌落接种于3 ml含0.05 g/L卡那霉素的LB液体培养液中，37 °C恒温摇床培养过夜。提取质粒并酶切鉴定、测序。所得质粒命名为Pgenesil-sur(+)。同法构建阴性对照质粒命名为Pgenesil-sur(-)，其靶序列为：5'-GAC TTC ATA AGG CGC ATG C-3'，该序列与人、鼠无同源性。两条DNA链的序列为：5'-GATCC GAC TTC ATA AGG CGC ATG C TTCAAGACG GCA TGC GCC TTA TGA AGT C TTTTTT GTCGAC A-3'和3'-G CTG AAG TAT TCC GCG TAC G AAG TTCTGC CGT ACG CGG AAT ACT TCA G AAAAAA CAGCTG TTCGA-5'，其结构为BamHI+正义链+环状结构+反义链+中止信号+ SalI +HindIII。

1.3 质粒的提取

中量无内毒素质粒提取试剂盒购自北京天为时代公司，按试剂盒操作说明提取质粒，紫外分光光度计测定其浓度和纯度，-20 °C保存备用。

1.4 PC-2细胞的转染

以24孔细胞培养板为例。转染试剂LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司。常规消化收集细胞后，将细胞接种于24孔培养板。转染前1 d换用不含抗生素、含有血清的培养基。待细胞生长至密度为70%~80%时，进行转染。用不含抗生素和血清的培养基将质粒0.8 μ g、LipofectamineTM2000 2.4 μ l分别稀释至50 μ

1, 混匀后室温放置5 min, 然后将二者混合均匀, 室温放置20 min后加入培养孔中。多孔转染, 按上述比例批量制作转染混合物后进行转染。转染后6 h, 换用普通完全培养基, 12 h后于倒置荧光显微镜下观察细胞表达增强绿色荧光蛋白的情况。

1.5 半定量RT-PCR检测survivin基因mRNA表达的变化

细胞接种于6 cm培养皿, 分为3组: (1)空白对照组; (2)阴性对照组; (3)阳性实验组。每组3个培养皿。空白对照组转染时仅加入Lipofectamine™2000; 阴性对照组转染时使用Pgenesil-sur(-)质粒; 阳性实验组转染时使用Pgenesil-sur(+)质粒。转染后24 h消化收集 1×10^6 个细胞, 按Trizol试剂说明书提取总RNA。紫外分光光度计测定其浓度和纯度。RT-PCR反应采用两步法。(1)cDNA的合成: 采用RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒, 取1 μ g总RNA, 按操作说明书合成cDNA; (2)PCR反应: 采用北京天为时代公司的一管便捷式PCR反应试剂盒。内参照GAPDH的引物序列采用国际标准序列: 5'-CGA AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' (上游引物); 5'-AGC CTT CTC GGT GGT GAA GAC-3' (下游引物), 扩增产物大小为306 bp。survivin的引物序列为: 5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3' (上游引物); 5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3' (下游引物), 扩增产物大小为447 bp。用凝胶成像分析仪进行摄像, 用Dolphin 1D软件进行半定量分析。survivin基因的表达强度用survivin基因RT-PCR反应产物的光密度与内参照GAPDH RT-PCR反应产物光密度的比值表示。按以下公式计算survivin基因表达的抑制率: $\text{survivin基因表达的抑制率} = (1 - \text{观察组survivin表达强度} / \text{对照组survivin表达强度}) \times 100\%$ 。

1.6 免疫组化法检测survivin基因蛋白表达的变化

将细胞接种于置入了细胞爬片的24孔培养板中进行转染。分组及转染同1.5, 每组8孔。转染后24 h用65%丙酮固定细胞, 免疫组化SP法检测survivin蛋白的表达。一抗为兔抗人单克隆抗体, 购自北京中山公司, 工作浓度为1:50。阳性对照为已知survivin表达阳性的乳腺癌石蜡切片; 用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。阳性表达为胞质或胞核出现棕黄色颗粒。根据细胞着色的深浅将survivin基因的表达强度分为: (1)阴性, 细胞不着色, 记0分; (2)弱阳性, 细胞呈淡黄色, 记1分; (3)阳性, 细胞呈棕黄色, 记2分; (4)强阳性, 细胞呈深棕黄色, 记3分。每张爬片于高倍镜下随机观察5个视野, 计数细胞并对每个细胞进行评分, 最后将评分之和除以细胞总数, 所得数值作为该张细胞爬片survivin的表达强度。按1.5中的公式计算survivin基因表达的抑制率。

1.7 MTT法检测对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

将细胞接种于6孔培养板中并进行转染, 分组及转染同1.5。12 h后消化、收集细胞, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/L, 分别将各组细胞接种于96孔培养板, 每组8孔, 每孔200 μ l。另设对照孔调零, 每个检测时间点接种1板, 共3板。于细胞接种后0、24、48 h采用MTT法检测对PC-2细胞增殖的抑制率: $\text{增殖的抑制率} = (1 - \text{观察组}A_{490}\text{值} / \text{对照组}A_{490}\text{值}) \times 100\%$ 。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

采用PI单染法检测PC-2细胞凋亡。细胞接种于6孔培养板, 分组及转染同1.5, 每组6孔。分别于转染后24、48 h消化收集细胞, 每次每组各取3孔细胞。PBS缓冲液洗两遍, 用预冷的75%乙醇固定过夜。1000 r/min、5 min离心, 倾去上清液, PBS缓冲液洗两遍, 加入0.05 g/L的RNase, 室温避光30 min, 去除细胞内RNA。加入0.06 g/L的PI, 室温避光30 min后上机检测。

1.9 统计学处理

应用统计学软件SPSS10.0进行统计分析, 多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 质粒的酶切鉴定和测序结果

质粒Pgenesil-1的多克隆酶切位点如下: HindIII-XbaI-SalI-PstI-BamHI-U6 Promotor-EcoRI-SalI-XbaI- DraIII。在插入的目的基因片段里, 我们设计了一个EcoRI的酶切位点[Pgenesil-sur(+)质粒]或SalI的酶切位点[Pgenesil-sur(-)质粒], 插入在质粒Pgenesil-1的BamHI和HindIII之间。若插入正确,

就能被EcoRI或SalI酶切出一条约400 bp的小带。经酶切分析Pgenesil-sur(+)、Pgenesil-sur(-)均符合设计要求。送转化菌液去上海博亚生物公司测序，测序结果(图1)符合设计要求。

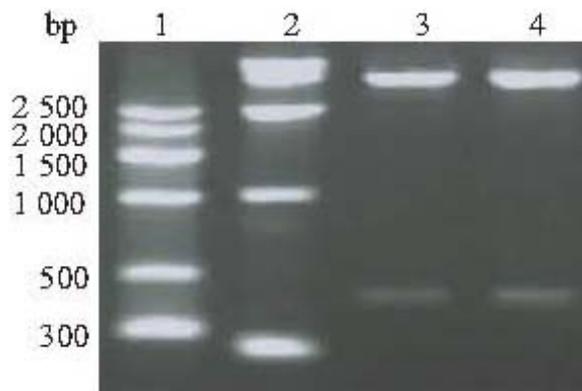


图1 质粒酶切鉴定凝胶电泳图

Fig.1 Verification of the plasmids digested with restriction endonuclease
Lane 1: MarkerVII; Lane 2: MarkerVI; Lane 3: Pgenesil-sur(+); Lane 4: Pgenesil-sur(-)

2.2 PC-2细胞的转染结果

PC-2细胞转染Pgenesil-sur(+)质粒或Pgenesil-sur(-)质粒12 h后，于倒置荧光显微镜下观察可见到有增强绿色荧光蛋白的表达，24 h左右表达最强(图2、3)，72 h后增强绿色荧光蛋白的表达逐渐减弱。

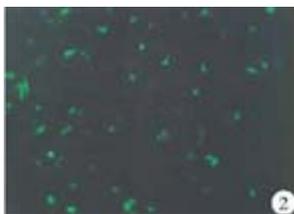


图2 PC-2细胞转染Pgenesil-sur(+)质粒24 h后增强绿色荧光蛋白表达情况

Fig.2 Expression of EGFP in PC-2 cells 24 h after transfection with plasmid Pgenesil-sur(+)
(Original magnification: $\times 200$)

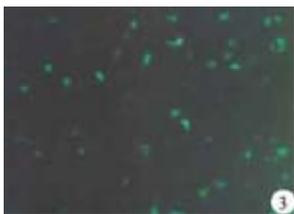


图3 PC-2细胞转染Pgenesil-sur(-)质粒24 h后增强绿色荧光蛋白表达情况

Fig.3 Expression of EGFP in PC-2 cells 24 h after transfection with plasmid Pgenesil-sur(-)
(Original magnification: $\times 200$)

2.3 半定量RT-PCR检测survivin基因mRNA表达的变化

转染后24 h，空白对照组、阴性对照组、阳性实验组survivin mRNA的表达强度(图4)分别为 0.96 ± 0.02 、 0.98 ± 0.03 和 0.18 ± 0.03 ，统计分析表明PC-2细胞转染Pgenesil-sur(+)质粒后，survivin的表达被显著抑制($P < 0.05$)，其抑制率达到81.25%；转染Pgenesil-sur(-)质粒对PC-2细胞survivin表达则无抑制作用($P > 0.05$)。

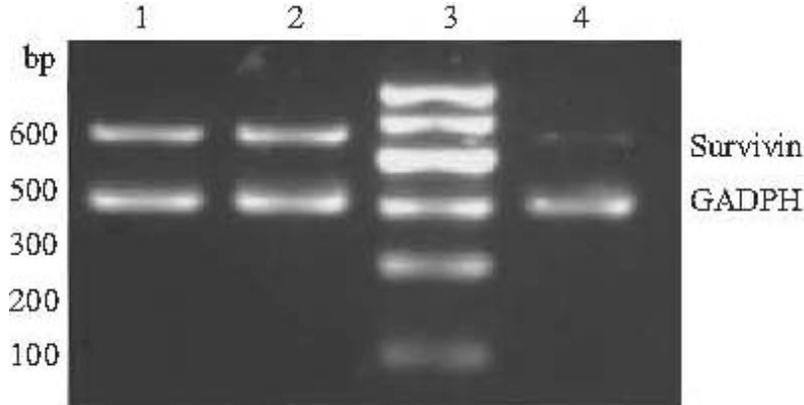


图4 半定量RT-PCR检测survivin基因mRNA表达变化的凝胶电泳图

Fig.4 Expression of survivin mRNA detected by semi-quantitative RT-PCR
Lane 1: Blank control group; Lane 2: Negative control group; Lane 3: Marker I; Lane 4: Positive experiment group

2.4 免疫组化法检测survivin基因蛋白表达的变化

转染后24 h, 空白对照组、阴性对照组、阳性实验组survivin蛋白的表达强度(图5)分别为 2.29 ± 0.23 、 2.34 ± 0.15 和 0.59 ± 0.16 , 统计分析表明PC-2细胞转染Pgenesil-sur(+)质粒后, survivin蛋白的表达被显著抑制($P < 0.05$), 其抑制率达到74.24%; 转染Pgenesil-sur(-)质粒对PC-2细胞survivin蛋白的表达则无抑制作用($P > 0.05$)。

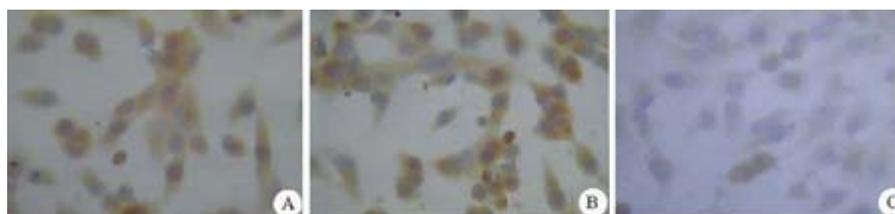


图5 不同组survivin表达情况

Fig.5 Immunohistochemistry for survivin expression in different groups (SP methods, original magnification: $\times 400$)
A: Blank control group; B: Negative control group; C: Positive experiment group

2.5 MTT法检测对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

MTT法检测结果表明转染Pgenesil-sur(+)质粒后可显著抑制PC-2细胞的增殖, 细胞接种后24、48 h的增殖抑制率分别为28.00%和33.38% ($P < 0.05$)。转染Pgenesil-sur(-)质粒对PC-2细胞的增殖无影响($P > 0.05$)。

2.6 流式细胞术检测PC-2细胞的凋亡

转染后24、48 h, 空白对照组、阴性对照组均未检测到细胞凋亡, 阳性实验组细胞24、48 h的凋亡率分别为 $(8.46 \pm 1.07)\%$ 和 $(7.53 \pm 0.93)\%$ 。统计结果表明转染Pgenesil-sur(+)质粒后PC-2细胞的凋亡率显著升高($P < 0.05$), 但阳性实验组细胞24、48 h的细胞凋亡率差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

胰腺癌是预后最差的恶性肿瘤之一, 手术或化疗后的5年生存率仅为1%~2%。胰腺癌细胞对凋亡的抵抗导致胰腺癌对大多数的抗肿瘤治疗如放疗、化疗、免疫治疗不敏感, 这是胰腺癌预后极差的重要原因之一[2]。

近年来的研究证实survivin与恶性肿瘤的关系密切，survivin在大多数肿瘤组织中存在着高表达，且与肿瘤的发生、发展，与血管形成，与肿瘤的化疗敏感性、放射敏感性以及复发、预后等密切相关，阻断survivin基因的表达，可以诱导肿瘤细胞的凋亡，提高肿瘤细胞对化疗药物和放疗的敏感性，抑制肿瘤血管形成[3][4]。对survivin与胰腺癌关系的研究表明，survivin在胰腺癌中也存在着过表达，并通过抑制细胞凋亡参与胰腺癌的发生、发展；survivin与胰腺癌放疗、化疗敏感性相关，是胰腺癌预后的指标[5][6]。这些研究提示survivin在胰腺癌的基因治疗中具有潜在的重要价值。

目前认为survivin抑制细胞凋亡的机制可能为：(1)直接或间接抑制caspases(caspase-3、caspase-7、caspase-6、caspase-8、caspase-9、caspase-10)的活性；(2)与cdk4/P21复合物相互作用，释放出P21，P21再与caspase-3结合；(3)与Smac/DIABLO(Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low Pi)结合并将其隔离，防止Smac/DIABLO与其他的凋亡抑制蛋白结合。对survivin在细胞分裂过程中定位的研究表明，survivin与INCENP(inner centromere protein)、Aurora-B等共同在调节细胞周期、细胞分裂的过程中扮演了重要角色。阻断survivin的表达，可以破坏微管的形成，导致多倍体的形成和细胞分裂失败[9]。

RNAi是自然界生物体的一种遗传现象，是一种由双链RNA介导的序列特异性的转录后的基因沉默过程。当外源性的双链RNA进入细胞后，被RNaseIII蛋白家族成员之一的Dicer酶所识别并被切割为21~23个核苷酸的短的双链RNA，即小干扰RNA(siRNA)。siRNA与RNA介导的沉默复合体结合后，识别并降解同源的mRNA，从而特异性地抑制目的基因的表达[10]，具有高效、特异、低毒的特点。自发现以来，siRNA已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性疾病预防等的研究。本实验中，我们参考Kappler等[1]的序列，设计构建了靶向survivin的siRNA质粒表达载体，其转录产物可在体内形成由1个茎环所分离的具有反向重复序列的发卡样RNA，此RNA随后被加工成siRNA而降解靶基因mRNA，达到阻断靶基因表达的目的。本实验中所构建的siRNA质粒表达载体中含有增强的绿色荧光蛋白，可以方便地观察到转染的效果。进行RNAi研究时，目的基因靶序列的选择至关重要，针对不同的靶序列干扰的效果可能相差甚远[11]。本实验所参考Kappler等[1]的序列已证实对多种肿瘤细胞有效[12]。我们的实验亦证实该序列对胰腺癌、乳腺癌有效(另文发表)，提示该序列可能具有通用性，可以作为研究靶向survivin的RNAi时的优先考虑的序列。我们采用免疫组化技术来检测survivin在蛋白质水平的表达变化有一个显著的优点，即在同一张细胞爬片上本身就存在着自身对照(转染成功的细胞和未转染的细胞)，可以直观地看到RNAi的效果。

RT-PCR和免疫组化检测结果表明，本实验中所构建的靶向survivin的siRNA质粒表达载体具有高度特异性，可以有效地抑制PC-2细胞survivin的表达。抑制PC-2细胞survivin基因的表达可以显著抑制PC-2细胞的增殖并诱发一定程度的自发凋亡，提示靶向survivin的siRNA在胰腺癌的治疗中具有一定的价值，为今后进一步研究提供了必要的实验基础。

参考文献：

[1]Kappler M, Bache M, Baterl F, et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduce the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of P53[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(3): 186-93.

[2]Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 6.

[3]Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer[J]. *Med Electron Microsc*, 2001, 34(4): 207-12.

[4]Coma S, Noe V, Lavarino C, et al. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumorangiogenesis[J]. *Oligonucleotides*, 2004, 14(2): 100-13.

[5]Sato K, Kaneko K, Hirota M, et al. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell

tumors[J]. *Cancer*, 2001, 92(2): 271-8.

[6]Asanuma K, Kobayashi D, Furuya D, et al. A role for survivin in radioresistance of pancreatic cancer cells[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(9): 1057-62.

[7]Kami K, Doi R, Koizumi M, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients[J]. *Surgery*, 2004, 136(2): 443-8.

[8]刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 等. Survivin反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡并增加吉西他滨的化疗敏感性[J]. *中华普通外科杂志*, 2004, 19(7): 401-3.

Liu JW, Li KZ, Dou KF, et al. Survivin antisense oligonucleotide induces apoptosis and sensitizes pancreatic cancer cells to Gemcitabine[J]. *Chin J Gen Surg*, 2004, 19(7): 401-3.

[9]Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin—an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond[J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9(4): 143-7.

[10]Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease[J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 80(1-2): 121-8.

[11]Luo KQ, Chang DC. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(1): 303-10.

[12]卢 昕, 郑启昌, 熊 俊, 等. siRNA抑制肝癌细胞株HepG2 survivin基因表达的研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2004, 33(6): 696-9.

Lu X, Zheng QC, Xiong J, et al. Inhibitory effect of siRNA on Survivin expression in HepG2 cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Tech (Health Sci)*, 2004, 33(6): 696-9.

[回结果列表](#)