



## 小分子干扰RNA靶向抑制survivin基因诱导U251细胞凋亡的实验研究

肿瘤的基因靶向治疗是目前肿瘤生物治疗研究的热点领域之一。肿瘤基因靶向治疗的策略包括肿瘤相关基因(tumor-associated antigen, TAA)诱导的特异性细胞毒T淋巴细胞的过继免疫治疗,这类TAA抗原须高度选择性表达于肿瘤细胞而不表达或低表达于正常组织和细胞[1][2];采用反义寡核苷酸技术(ASON)等技术靶向抑制在肿瘤发生发展中有重要功能的相关基因,也成为肿瘤靶向治疗的新热点,如与肿瘤增殖凋亡以及细胞周期相关的调控基因c-myc、hTERT、CyclinD等[1][2][3],国内外已有广泛报道。Survivin是由Altieri等人发现的一个新的抗凋亡基因,是凋亡抑制蛋白基因家族(IAP)的成员,选择性表达于肿瘤组织和胚胎组织,具有抑制凋亡、促进细胞分裂、调控G<sub>2</sub>/M细胞周期等重要功能[2][3][4]。研究显示,survivin基因在人胶质瘤细胞中普遍表达,其表达丰度与肿瘤恶性程度以及肿瘤耐药有密切联系,用survivin特异性的ASON可明显诱导肿瘤细胞的凋亡,并增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性[5][6][7][8]。RNA干扰技术(RNAi)是近年来迅速发展起来的生物技术,对特定基因的抑制效果是ASON的数十倍,已经成为基因功能研究以及基因治疗的强有力的工具[9][10][11]。目前,国内外关于采用RNAi技术靶向抑制survivin基因诱导人胶质瘤细胞凋亡的研究尚较少,本研究拟采用小分子干扰RNA(siRNA)介导的RNAi技术,研究靶向抑制survivin对U251细胞的凋亡诱导作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

- 1.1.1 细胞株 U251细胞购自上海生物细胞研究所,在含有10%胎牛血清的DMEM培养液中常规(37℃、5%CO<sub>2</sub>)培养。
- 1.1.2 质粒 干扰质粒pGenesil-1购自武汉市晶赛生物工程技术有限公司。
- 1.1.3 试剂 Trizol试剂购自美国MRC公司。限制性内切酶BamH I、HindIII、EcoR I、Sac I、Sal I、Pst I以及反转录试剂盒RevertAid™first strand cDNA Synthesis Kit购自立陶宛MBI公司。TaqDNA聚合酶、T<sup>4</sup> DNA连接酶、DL2000 Marker购自大连Takara公司。Metafectene™转染试剂购自德国Bionttx公司。胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自上海华舜公司。质粒大提试剂盒购自德国QIAGEN公司。survivin多抗购自美国Santa Cruz公司。Cy5标记的Annexin-V凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I购自罗氏公司。

#### 1.2 方法

- 1.2.1 siRNA靶序列的选择设计 siRNA靶位点的设计由晶赛公司在线设计软件(<http://www.genesil.com/business/products/order2.htm>)辅助设计,设计选取19nt的siRNA靶序列模

板, 设计9nt的茎环系列分割反向重复序列, 并以连续5个T作为U6启动子的转录中止信号, 两端分别形成BamH I和HindIII的粘性末端, 同时设计针对EGFP的siRNA靶序列转录模板作为阳性对照, 送上海英骏生物技术有限公司合成。siRNA-survivin的转录模板序列正义: 5'-GGA CCACCGCATCTCTAC-3'; 反义: 5'-TGTAGAGATGCGGTGGTCC-3'。siRNA-EGFP转录模板序列正义: 5'-GTGAACTTCAAGATCCGCC-3'; 反义: 5'-GGCGGATCTTGAAGTTCAC-3'。中间的茎环序列正义: 5'-T TCAAGACG-3'; 反义: 5'-CGTCTTGAA-3'。

1.2.2 siRNA表达载体pGenesi-1/survivin的构建 将合成的对应的发夹结构寡核苷酸单链退火成双链。BamH I和HindIII双酶切空载体pGenesi-1后, 用T<sub>4</sub>连接酶将退火后的寡核苷酸双链定向克隆至线性化的pGenesi-1, 抗生素筛选阳性克隆, 送测序鉴定。同样方法构建靶向针对EGFP的重组干扰载体pGenesi-1/EGFP, 送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

1.2.3 重组载体pGenesi-1/EGFP转染U251细胞 转染采用Metefectene™转染试剂。转染前一天, 细胞换液并调整细胞浓度为 $2 \times 10^5$ /ml, 以2 ml/孔接种于6孔板中培养。转染前给细胞加新鲜无血清培养基, 将质粒-转染试剂混合物转移至6孔板内(转染试剂:DNA=4:1), 37 °C、5%CO<sub>2</sub>培养16 h后换含新鲜的10% FCS的培养基, 继续培养以检测干扰效应。实验设转染pGenesi-1/survivin实验组、pGenesi-1/EGFP阳性对照组、pGenesi-1空载体作为阴性对照组、等量PBS作为空白对照组。转染48 h后细胞爬片, PBS洗两次后, 488 nm激发波长的荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 以评价转染效率及阳性对照的干扰效果。

1.2.4 实时荧光定量RT-PCR检测干扰前后survivin表达水平变化 用Trizol一步法分别从各组U251细胞中抽提总RNA, 用GeneQuant测定浓度和纯度。采用相同的RNA量, 采用下游特异性引物survivin-RTP (5'-GACGCTTCCTATC-3')以及反转录试剂盒RevertAid™ first strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。采用Roche公司LightCycler系统进行实时荧光定量PCR以验证干扰效果。实时荧光定量PCR采用20 μl毛细管体系进行, 体系采用LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, 含4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 上下游引物survivin-PCR5P (5'-ATGTTTCAA CTGTGCTCCTG-3')和survivin-PCR3P (5'-GGACTG TGACAGCCTCAA-3')各0.4 μmol/L, cDNA 2 μl。在每个循环延伸结束检测SYBR Green I嵌入荧光。

1.2.5 Western blotting检测干扰前后survivin表达水平变化 转染48 h后, 各组U251细胞各 $1 \times 10^6$ 及其培养液上清, 以SDS煮沸法裂解细胞提取总蛋白, 进行SDS-PAGE; 电泳后转至PVDF膜上, 含5%全脂奶粉的TBS封闭2 h; 加一抗抗survivin多抗(1:1 000)4 °C孵育过夜; 漂洗后滴加HRP标记的二抗(1:1 000)室温反应2 h, 加二氧基联苯胺(DAB)显色。

1.2.6 Cy5-Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡 转染48 h后, 收集细胞(连同悬浮细胞), 用PBS漂洗一遍后, 加入试剂盒中的Binding Buffer 200 μl、Cy5-Annexin V 10 μl、PI 5 μl, 避光室温下孵育30 min, 加入Binding Buffer 300 μl, 上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

## 2 结果

### 2.1 siRNA表达载体pGenesi-1/survivin和pGenesi-1/EGFP的转染

转染48 h后细胞爬片, 荧光显微镜下观察, 转染pGenesi-1/survivin实验组、pGenesi-1/EGFP阳性对照组和pGenesi-1空载体阴性对照组三组有数量和亮度各不相同的细胞表现为绿色荧光, 为成功转染的阳性细胞, PBS空白对照组无绿色荧光。其中pGenesi-1空载体阴性对照组绿色荧光最强; 转染实验组pGenesi-1/survivin荧光强度较转染pGenesi-1空载体组为弱; pGenesi-1/EGFP转染组与前两组相比, 绿色荧光明显减少, 亮度减弱(图1)。

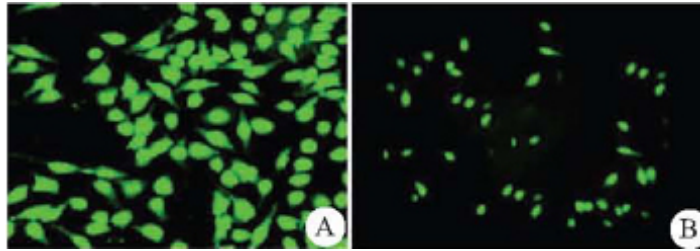


图1 转染pGenesi-1/EGFP对U251细胞EGFP表达的影响

Fig.1 Effect of pGenesi-1/EGFP transfection on enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression in U251 cells

A: U251 cells transfected with pGenesi-1 empty carrier, which expressed profuse EGFP;  
B: U251 cells transfected with pGenesi-1/EGFP carrier, with obviously diminished EGFP expression

## 2.2 实时荧光定量RT-PCR检测siRNA干扰效果

实时荧光定量RT-PCR检测结果(图2)显示: U251细胞经特异性siRNA表达载体pGenesi-1/ survivin作用后, survivin基因的Ct值由22增加到35, 提示survivin基因的mRNA拷贝数明显降低; 转染阴性对照组以及阳性对照组survivin基因Ct值无明显变化。

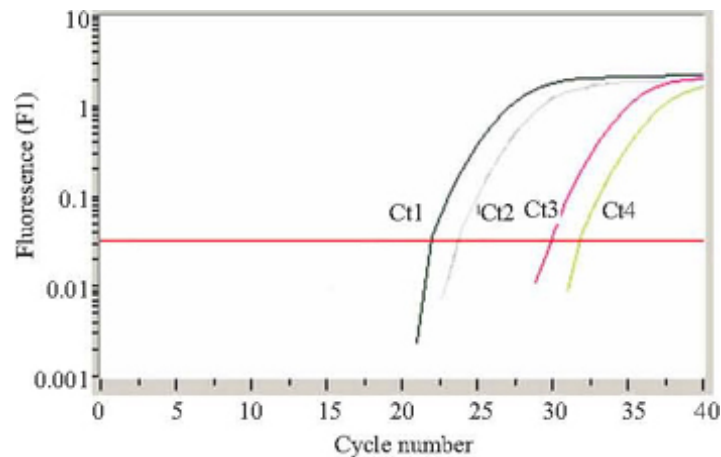


图2 实时定量PCR检测siRNA作用前后survivin基因mRNA水平变化

Fig.2 Changes of survivin gene mRNA expression after siRNA transfection determined by real-time RT-PCR

Ct1: Blank control; Ct2: Negative control; Ct3: Positive control; Ct4: Cells transfected with pGenesi-1/survivin

## 2.3 Western blotting分析siRNA作用后survivin蛋白水平

Western blotting分析(图3)显示: 空白对照组、阴性对照组以及转染pGenesi-1/EGFP阳性对照组survivin蛋白表达未发生明显变化, 转染pGenesi-1/ survivin组survivin蛋白表达明显下调。

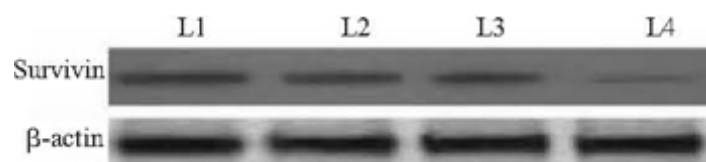


图3 Western blotting检测siRNA前后survivin蛋白表达

Fig.3 Western blotting for survivin expression before and after siRNA transfection  
L1: Blank control; L2: Negative control; L3: Positive control; L4: Cells transfected with pGenesi-1/survivin

## 2.4 siRNA诱导的U251细胞凋亡

Cy-5-Annexin-V/PI双色标记流式细胞仪检测分析(图4)显示:经转染靶向survivin基因的siRNA表达载体pGenesil-1/survivin后,Annexin-V/PI双染阳性细胞明显增加,提示特异性siRNA作用后U251细胞发生了明显的凋亡;转染阴性对照组、阳性对照组以及空白对照组凋亡未发现明显变化。

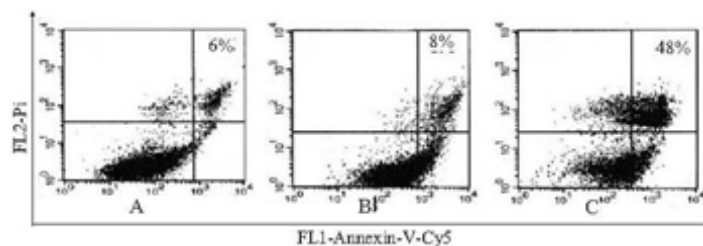


图4 流式细胞仪检测分析siRNA作用后U251凋亡

Fig. 4 Apoptosis of siRNA-transfected U251 cells determined by flow cytometry

A: Blank group; B: Negative control group;

C: Cells transfected with pGenesil-1/survivin

## 3 讨论

Survivin是新发现的一个具有显著抗凋亡作用的IAP基因,选择性表达于胚胎组织和各类肿瘤组织,在肿瘤发生发展中具有抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞增殖的重要作用。目前已经明确的抗凋亡机制包括通过抑制p53基因的活性,抑制caspase家族成员caspase 3、caspase 7的激活等,抑制细胞凋亡;选择性表达于在细胞周期的G<sub>2</sub>/M期,促进细胞分裂;促进肿瘤新生血管生长等。survivin基因在人胶质瘤细胞中普遍高表达,并与肿瘤的恶性程度、肿瘤的耐药以及疾病预后等重要关联,这些均提示survivin作为一个重要的功能基因,是胶质瘤基因靶向治疗的理想靶点[3][4][5][6][7][8]。国外研究显示,利用ASON技术特异性抑制survivin基因的表达,可以诱导肿瘤细胞发生caspase依赖以及非caspase依赖的凋亡,提示通过抑制survivin的表达来诱导肿瘤细胞的凋亡是有效可行的[10]。目前,国内外关于采用RNAi抑制survivin基因表达诱导胶质瘤细胞凋亡的研究尚未多见。本研究采用载体介导的RNAi技术,采用siRNA靶向抑制survivin基因在胶质瘤细胞中的表达,研究其对U251细胞的诱导凋亡作用。

RNAi技术作为ASON技术后迅猛发展起来的分子生物学技术,其介导的基因沉默效应是后者的数十倍,因而被认为是基因治疗的理想技术[11][12][13][14]。在本研究中,我们选用了载体介导的RNAi技术。

pGenesil-1是一个siRNA真核表达载体,能在真核细胞中高效表达siRNA,通过形成RNA诱导沉默复合物特异性降解靶基因的mRNA,从而达到基因沉默的目的;同时pGenesil-1本身可以编码EGFP,便于检测和验证针对EGFP的干扰效果。为验证pGenesil-1介导的RNAi效应,我们首先设计构建了针对EGFP的siRNA表达载体pGenesil-1/EGFP,经导入U251细胞后,结果转染后EGFP明显被抑制,说明发夹结构设计合理,pGenesil-1可以在U251细胞中诱导高效的RNAi介导的基因抑制。接着我们设计了靶向survivin基因的siRNA靶序列,构建了针对survivin基因的siRNA表达载体pGenesil-1/survivin,采用Metafectene转染至人胶质瘤细胞系U251,经实时荧光定量PCR以及Western blotting分析显示,survivin基因的mRNA以及蛋白水平均明显降低,说明pGenesil-1/survivin在U251细胞内介导了有效的RNAi。为了检测siRNA特异性沉默survivin基因对于U251细胞凋亡的影响,采用了Annexin-V/PI双色标记的流式细胞仪分析方法。由于pGenesil-1本身带有EGFP的编码序列,EGFP与另一个常用的标记荧光FITC位于流式细胞仪的相同通道,因此选用了Cy-5标记的Annexin-V/PI试剂。流式细胞仪检测显示,干扰后U251细胞发生了明显的凋亡,而其他对照组未发生明显凋亡,提示靶向干扰survivin基因可以有效诱导U251细胞凋亡。



在本研究中, 我们成功构建了针对survivin基因的siRNA表达载体pGenesil-1/survivin, 导入人胶质瘤细胞U251后诱导了显著的凋亡, 提示采用siRNA介导的RNAi靶向抑制survivin基因诱导U251细胞凋亡, 可能是胶质瘤基因治疗的新的策略之一。但U251细胞中, 干扰survivin基因所导致的凋亡与caspase等凋亡相关基因的相互调节, 以及干扰后的凋亡通路, 以及特异性沉默survivin对于细胞周期的影响, 目前尚不清楚, 有待进一步深入研究加以阐明。

(责任编辑: 黄开颜)

#### 参考文献:

- [1]Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(1): 46-54.
- [2]Rich JN, Bigner DD. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma[J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(5): 430-46.
- [3]Macdonald DR. New frontiers in the treatment of malignant glioma[J]. Semin Oncol, 2003, 30(1): 72-6.
- [4]Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death[J]. Oncogene, 2005, 24(12): 1994-2007.
- [5]Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-9.
- [6]Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis[J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 212-6.
- [7]Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm[J]. J Cell Biochem, 2004, 92(4): 656-63.
- [8]Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, et al. Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index [J]. J Neurooncol, 2005, 72(3): 231-8.
- [9]Katoh M, Wilmotte R, Belkouch MC, et al. Survivin in brain tumors: an attractive target for immunotherapy[J]. J Neurooncol, 2003, 64(1-2): 71-6.
- [10]Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, et al. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways[J]. J Neurochem, 2001, 79(2): 426-36.
- [11] Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst[J]. Cell, 2001, 107(4): 415-8.
- [12]Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326-30.
- [13]Lee NS, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 500-5.
- [14]Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, et al. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 396-400.