

## 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

徐如祥<sup>1</sup>, 涂艳阳<sup>1</sup>, 姜晓丹<sup>1</sup>, 封江南<sup>2</sup>, 黄俊 ( <sup>1</sup>南方医科大学珠江医院神经外科 / 广东省神经医学研究所, 广东 广州 510282 ; <sup>2</sup>武汉市晶赛生物工程技术有限公司, 湖北 武汉 430074 )

**摘要:**目的 构建靶向 survivin 基因的小分子干扰 RNA( siRNA )表达载体, 导入人胶质瘤细胞 U251 中, 研究 siRNA 靶向抑制 survivin 基因对 U251 细胞的凋亡诱导作用。方法 根据 siRNA 设计原则, 在 survivin 全长序列中选取设计含 19 个核苷酸( 19 nt )靶序列两条反向重复序列, 间以 9 个核苷酸的茎环序列, 两端分别加上对应的酶切位点, 形成 siRNA 的 DNA 模板并克隆到 siRNA 表达载体 pGenesil-1 中, 获得靶向抑制 survivin 基因的 siRNA 表达载体 pGenesil-1/survivin ; 采用 Metafectene 转染试剂将干扰质粒导入到胶质瘤细胞 U251 ; 分别采用实时荧光定量 PCR 以及 Western blotting 从 mRNA 和蛋白水平检测干扰效果 ; 采用 Annexin-V/PI 双色标记的流式细胞仪法检测 siRNA 诱导的细胞凋亡。结果 实时荧光定量 PCR 以及 Western blotting 显示 survivin 基因的 mRNA 转录水平以及蛋白水平的表达均得到显著抑制 ; 流式细胞仪检测结果显示 survivin 基因表达被抑制后, U251 细胞凋亡率明显增高。结论 靶向 survivin 基因的重组 siRNA 干扰载体 pGenesil-1/survivin 介导的 RNAi 显著靶向抑制了 survivin 基因在人胶质瘤细胞 U251 中的表达, 并明显诱导了 U251 细胞发生凋亡。

**关键词:**小分子干扰 RNA ; survivin 基因 ; 胶质瘤 ; U251 细胞 ; 细胞凋亡

中图分类号: R394.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254( 2006 )04-0398-04

### Apoptosis of glioma cell line U251 induced by small interfering RNA targeting survivin

XU Ru-xiang<sup>1</sup>, TU Yan-yang<sup>1</sup>, JIANG Xiao-dan<sup>1</sup>, FENG Jiang-nan<sup>2</sup>, HUANG Jun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery and Institute of Neuroscience of Guangdong Province, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; <sup>2</sup>Gensil Bio-technology Limited Company of Wuhan, Wuhan 430074, China

**Abstract: Objective** To construct recombinant expression vectors of small interfering RNA (siRNA) targeting survivin and investigate apoptosis of glioma cell line U251 mediated by the survivin-targeting siRNA. **Methods** According to the sequence of the coding region of survivin gene, two strings of 19 nucleotides of inverted sequence flanking the loop sequence of two complementary 9-base oligonucleotides were designed and synthesized to form hairpin construct as the DNA templates for the target siRNA. The siRNA templates were cloned into siRNA expression vector pGenesil-1, and the resulted vector pGenesil-1/survivin was transfected into U251 cells using Metafectene following the standard protocols. Real-time PCR and Western blotting were performed to evaluate survivin gene silencing induced by siRNA transfection at the RNA and protein levels, respectively. Flow cytometry analysis with Annexin-V/PI double staining was used to determine the cell apoptosis. **Results** Real-time RT-PCR and Western blotting revealed significantly lowered survivin expression at both RNA and protein levels in transfected U251 cells, which exhibited a significantly higher apoptosis rate after transfection as shown by flow cytometry analysis. **Conclusion** RNA interference mediated by the siRNA expression vector pGenesil-1/survivin can significantly reduce survivin expression and induce remarkable apoptosis in U251 cells.

**Key words:** small interfering RNA; survivin; glioma; U251 cells; apoptosis

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<sup>[1-2]</sup>; 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<sup>[1-3]</sup>, 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<sup>[2-4]</sup>。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<sup>[5-8]</sup>。RNA 干扰技术( RNAi )是近年来迅速发展起来的生物技术,

收稿日期: 2005-10-18

基金项目: 国家自然科学基金( 30170961 )

Supported by National Natural Science Foundation of China (30170961)

作者简介: 徐如祥, 男, 教授, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院副院长、脑外科主任, 广东省神经外科学会主任委员

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<sup>[9-11]</sup>。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 *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Sac* I、*Sal* I、*Pst* I 以及反转录试剂盒 RevertAid<sup>TM</sup> first strand cDNA Synthesis Kit 购自立陶宛 MBI 公司。TaqDNA 聚合酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、DL2000 Marker 购自大连 Takara 公司。Metafectene<sup>TM</sup> 转染试剂购自德国 Biontex 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 *Bam*H I 和 *Hind* III 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'-TGTAGAGATGC GGTGGTCC-3'。siRNA-EGFP 转录模板序列正义: 5'-GTGAACTTCAAGATCCGCC-3';反义 5'-GGCGG ATCTTGAAGTTCAC-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 pGenesil-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。*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切空载体 pGenesil-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 pGenesil-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 Metafectene<sup>TM</sup> 转染试剂。转染前一天,细胞换液并调整细胞浓度为 2×10<sup>5</sup>/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℃、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<sup>TM</sup> 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 1×10<sup>6</sup> 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℃孵育过夜,漂洗后滴加 HRP 标记的二抗(1:1 000) 室温反应 2 h,加二氨基联苯胺(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 )。

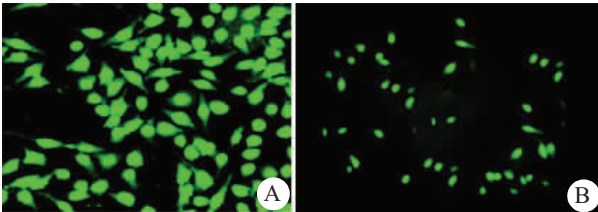


图 1 转染 pGenesi-1/EGFP 对 U251 细胞 EGFP 表达的影响  
Fig.1 Effect of pGenesi-1/EGFP transfection on enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression in U251 cells

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。

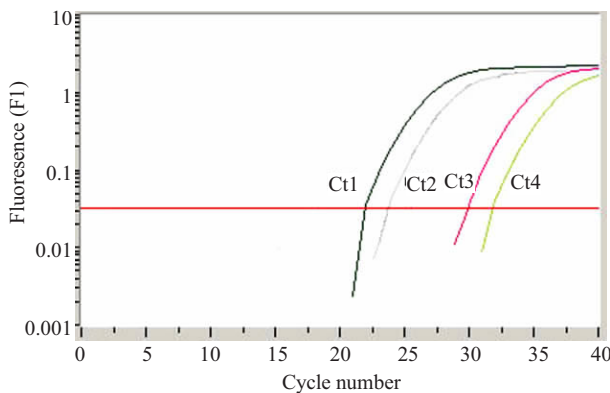


图 2 实时定量 PCR 检测 siRNA 作用前后 survivin 基因 mRNA 水平变化

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。

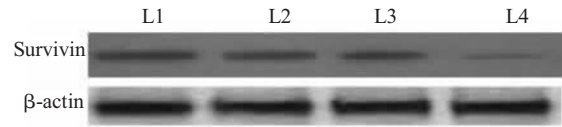


图 3 Western blotting 检测 siRNA 前后 survivin 蛋白表达  
Fig.3 Western blotting for survivin expression before and after siRNA transfection

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 pGenesi-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。

### 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<sup>[3-8]</sup>。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<sup>[10]</sup>。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



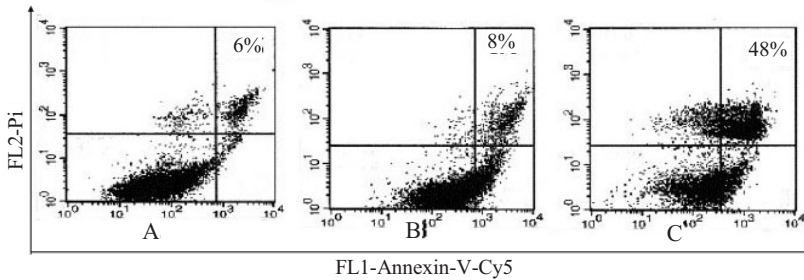


图 4 流式细胞仪检测分析 siRNA 作用后 U251 凋亡

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

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<sup>[11-14]</sup>。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。

#### 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 catalys[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.

(责任编辑:黄开颜)