

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)24-2235-04

siRNA 沉默 livin 基因对恶性黑色素瘤 LiBr 细胞凋亡、周期及增殖的影响王 昊¹, 谭升顺¹, 王新阳², 刘栋华¹, 于春水¹, 白转丽¹(西安交通大学医学院: ¹ 第二附属医院皮肤科, 陕西 西安 710004, ² 第一附属医院泌尿外科, 陕西 西安 710061)**Effects of livin gene silencing by siRNA on apoptosis, cycle and proliferation of malignant melanoma LiBr cells**WANG Hao¹, TAN Sheng-Shun¹, WANG Xin-Yang², LIU Dong-Hua¹, YU Chun-Shui¹, BAI Zhuan-Li¹¹Department of Dermatology, Second Affiliated Hospital, Xi'an 710004, China, ²Department of Urology, First Affiliated Hospital, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To investigate whether silencing livin gene by small interfering RNA (siRNA) leads to induction of apoptosis, arrest of cell cycle and inhibition of proliferation in malignant melanoma LiBr cells. **METHODS:** A chemically synthesized siRNA duplex targeting to livin, which had been validated to be efficient in downregulation of livin expression previously, was transfected to human malignant melanoma LiBr cells. Then TUNEL assay and Annexin V-FITC/ PI flow cytometric analysis were performed for apoptosis, PI flow cytometric analysis for cell cycle, immunofluorescence analysis for Caspase-3 protein expression, and MTT assay for cell proliferation. **RESULTS:** Silencing livin gene by siRNA could induce apoptosis ($P < 0.05$) and upregulate caspase-3 obviously ($P < 0.05$), arrest cell cycle at G0/G1 phase significantly ($P < 0.05$), and inhibit cell proliferation remarkably ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Livin can serve as a potential molecular target to malignant melanoma in gene therapy by siRNA.

【Keywords】 livin; melanoma; RNA interference; apoptosis; cell cycle; cell proliferation

【摘要】 目的: 观察沉默 livin 基因对恶性黑色素瘤 LiBr 细胞凋亡和周期及增殖的影响。方法: 采用 siRNA-3 转染人恶性黑色素瘤 LiBr 细胞后分别应用 TUNEL 法和 Annexin V-FITC/ PI 双染流式细胞术检测其对细胞凋亡的影响, 应用 PI 单染流式细胞术分析对细胞周期的改变, 应用免疫荧光细胞化学技术检测 siRNA 对凋亡效应蛋白 Caspase-3 表达的影响及应用

收稿日期 2007-07-09; 接受日期 2007-09-10

通讯作者: 谭升顺。Tel: (029) 85273647 Email: tanshengshun@hotmail.com

作者简介: 王 昊, 博士生(导师谭升顺), 副主任医师。Tel: (029) 85273647 Email: wanghaonxyc@126.com

MTT 法检测 siRNA 对细胞增殖的作用。结果: siRNA-3 转染 LiBr 细胞 72 h 可诱导细胞凋亡 ($P < 0.05$) 和引起细胞 G0/G1 期阻滞 ($P < 0.05$); 可下调 Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.05$) 及抑制细胞增殖 ($P < 0.05$)。结论: Livin 可做为应用 RNA 干扰技术探索恶性黑色素瘤基因治疗的潜在靶基因。

【关键词】 livin; 黑色素瘤; RNA 干扰; 细胞凋亡; 细胞周期; 细胞增殖

【中图分类号】 R394.2**【文献标识码】** A**0 引言**

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)近年来在世界范围内的发病率明显上升, 因其高度恶性、易转移且对化学及放射疗法不敏感, 致患者 5 a 生存率不到 10%。livin 是近年来发现的凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的最新成员, 其在多数恶性肿瘤细胞中高表达而在正常细胞中不、或低表达的特点开始引起研究人员的关注^[1]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象的发现及小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)在哺乳动物细胞产生 RNA 干扰效应的技术建立为肿瘤基因治疗探索在方法上开辟了新的途径^[2]。我们以化学合成的 siRNA-3 序列沉默 livin 基因后观察其对恶性黑色素瘤 LiBr 细胞凋亡、周期及增殖的影响, 为探索恶性黑色素瘤的基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 恶性黑色素瘤细胞株 LiBr 由第四军医大学西京医院皮肤科高天文教授惠赠; DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; siRNA-3 为前期研究中从设计的靶向 livin(GenBank Accession No. NM_022161)的 3 条序列中确定的敲低效应最佳的干扰序列(sense 5'-GAG AGG UCC AGU CUG AAA GdTdT-3', antisense 5'-CUU UCA GAC UGG ACC UCU CdTdT-3', 与 livin mRNA 特异结合位点: 790-808) siRNA-NC 为与人类基因组序列无任何匹配的阴性对照序列(sense 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT-3', antisense 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT-3') 由中国上海 GenePharma 公司化学合成并

退火形成双链 (siRNA duplexes)。Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京 Keygen 公司; Annexin V-FITC 试剂盒购自深圳晶美公司。

1.2 方法 将复苏的 LiBr 细胞置事先加含 100 mL/L 胎牛血清的高糖型 DMEM 细胞培养液的 100 mm 培养皿中, 37℃ 50 mL/L CO₂ 孵箱内培养。常规更换培养液、传代。LiBr 细胞株系半贴壁细胞, 实验操作须动作轻柔, 传代时不需胰酶消化, 只需吹散即可。实验用细胞均使之处于状态良好的对数生长期。转染前 1 d 按不同试验要求将所需密度的细胞传代于相应规格的培养皿或培养板, 24 h 后, 待细胞达到所需融合率时, 在无血清 DMEM 环境中转染。转染操作按 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书进行。

1.2.1 TUNEL 法检测细胞凋亡 细胞以 1.5×10^5 /孔细胞密度接种于置入细胞爬片的 6 孔板中, 待细胞会合率达到 30% ~ 50% 时, 以 siRNA-3 序列 100 nmol/L 浓度转染 LiBr 细胞, 同时设 Blank, Mock, siRNA-NC 3 个对照组。转染 72 h 后按 TUNEL 法检测。操作按 TUNEL 试剂盒说明书并调整进行, 依次进行 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 30 nmol/L 双氧水甲醇溶液封闭 10 min, 1 nmol/L TritonX-100 通透处理 15 min, TdT 酶反应液 50 μL 37℃ 湿润避光反应 60 min, Streptavidin-HRP 工作液 50 μL 37℃ 湿润避光反应 30 min, 50 μL DAB (DAB 工作液 5 μL 20 × DAB + 1 μL 300 mL/L H₂O₂ + 94 μL PBS, 需新鲜配制) 室温显色反应 10 min, 封片。每步骤之间均需要 PBS 漂洗 1 min × 3 次。以不含末端脱氧核酸转移酶的标记液替代 TUNEL 反应液设立阴性对照。在光镜下观察细胞经标记和显色后的颜色反应及结合形态学变化确定凋亡细胞。不同处理组爬片高倍镜下均随机选 5 个视野, 计数凋亡阳性细胞。实验结果以凋亡指数表示。凋亡指数 (%) = (凋亡阳性细胞数/该视野下总细胞数) × 100%。

1.2.2 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率 以 7.5×10^4 /孔细胞密度在 12 孔板上种板。待细胞会合率达到 30% ~ 50% 时以 siRNA-3 序列 100 nmol/L 浓度转染 LiBr 细胞, 同时设 Blank, Mock, siRNA-NC 3 个对照组。转染 72 h 后分别将培养孔内细胞吹散吸至离心管 4℃ 1500 r/min 离心 5 min, 弃培养基, 再分别用 4℃ PBS 1 mL 洗细胞 2 次, 弃上清, 1 × Binding Buffer 重悬细胞并调整细胞浓度至 1×10^9 /L。吸细胞混悬液 100 μL 至 5 mL 流式管中, 加 Annexin V-FITC 5 μL 和 20 g/L 的 PI 10 μL, 充分混匀, 室温避光孵育 15 min, 每管加入 1 × Binding

Buffer 400 μL, 轻微漩涡混匀, 1 h 内上流式细胞仪 (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) 检测。同时以不加 Annexin V-FITC 和 PI 的一管做为阴性对照。用软件 Cell Quest 进行分析, 左上象限 (UL) Annexin V⁻/PI⁺ 代表机械损伤细胞百分率, 右上象限 (UR) Annexin V⁺/PI⁺ 代表晚期凋亡细胞和坏死细胞百分率, 左下象限 (LL) Annexin V⁻/PI⁻ 代表正常细胞百分率, 右下象限 (LR) Annexin V⁺/PI⁻ 代表早期凋亡细胞百分率。

1.2.3 免疫荧光细胞化学检测 caspase-3 蛋白表达 细胞转染 72 h 后取出爬片, 经 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, 1 nmol/L TritonX-100 通透 15 min 及每个环节之间的 PBS 漂洗后置爬片于湿盒中, 每片滴加 1:200 稀释的 Caspase-3 一抗 30 μL, 其中一片加 PBS 30 μL 代替一抗做为荧光阴性对照, 37℃ 孵育 1 h。PBS 漂洗 30 s × 3 次, 每片滴加 1:100 稀释的 FITC 标记的二抗 30 μL, 37℃ 避光湿润孵育 30 min。PBS 漂洗 30 s × 3 次, 滤纸吸去多余液体, 置载玻片上, 滴加甘油封片剂 10 μL 封片。荧光显微镜下观察, 用软件 Image Pro Plus 进行荧光强度分析。

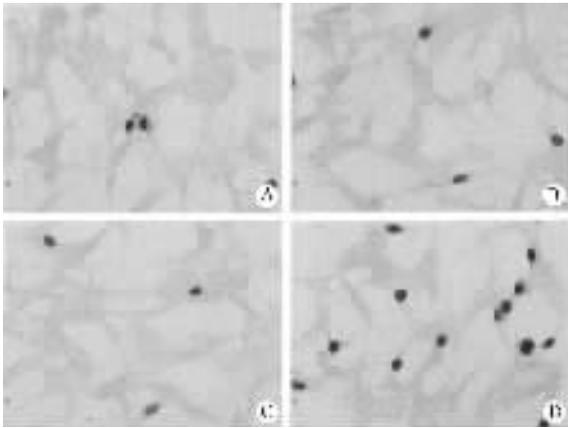
1.2.4 PI 单染流式细胞仪检测细胞周期 细胞重悬细胞于 4℃ 含 30 g/L BSA 的 700 mL/L 乙醇中, 4℃ 固定 24 h, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清。再分别 2 次 4℃ PBS 洗细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清。加 50 mg/L 的 RNase 1 mL, 室温避光 30 min。1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 60 mg/L 的 PI 1 mL, 室温避光 30 min 后上流式细胞仪 (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) 检测细胞周期。实验结果用随机所带软件 ModFitLT 分析。

1.2.5 MTT 检测 LiBr 细胞增殖 细胞以 5×10^3 /孔细胞密度接种于 96 孔板中, 共 4 块板。待细胞会合率达到 30% ~ 50% 时, 以 siRNA-3 序列 100 nmol/L 浓度转染 LiBr 细胞, 同时设 Blank, Mock, siRNA-NC 3 个对照组和只加培养基的调零组, 每组各设 5 个复孔, 每孔培养体积为 180 μL, 在转染后 24, 48, 72 和 96 h 时加入 5 g/L 的 MTT 20 μL, 继续培养 4 h 后小心吸出孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 微型振荡器上低速振荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上检测各孔 A 值, 检测波长 490 nm。不同时间点依次检测。实验结果取每组 5 个复孔的平均值。细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组 A 值/空白对照组 A 值) × 100%。绘制细胞生长曲线。

统计学处理: 每项实验独立进行 3 次, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较用单因素方差分析及多重比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LiBr 细胞凋亡 siRNA-3 可明显诱导 LiBr 细胞凋亡, 凋亡指数达 $(16.0 \pm 2.6)\%$ ($P < 0.05$ vs Blank, Mock, siRNA-NC 3 个组)。相反, Blank, Mock, siRNA-NC 组凋亡指数分别为 $(6.2 \pm 1.1)\%$, $(6.5 \pm 1.5)\%$ 和 $(7.0 \pm 1.1)\%$ (图 1)。siRNA-3 可诱导 LiBr 细胞的早、晚期凋亡率分别为 $(28.7 \pm 5.6)\%$ 和 $(12.9 \pm 3.8)\%$ ($P < 0.05$ vs Blank, Mock, siRNA-NC 3 个组)。Blank, Mock, siRNA-NC 3 组早、晚期凋亡率分别为 $(4.9 \pm 2.0)\%$ 和 $(5.00 \pm 0.9)\%$; $(5.8 \pm 1.4)\%$ 和 $(7.2 \pm 1.8)\%$; $(7.0 \pm 1.6)\%$ 和 $(7.6 \pm 1.1)\%$ 。



A: 空白对照组 (Blank); B: 脂质体对照组 (Mock); C: 阴性对照组 (siRNA-NC); D: siRNA-3。

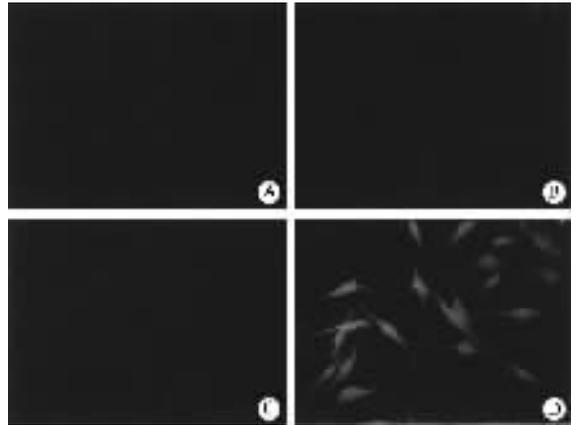
图 1 siRNA-3 转染 LiBr 细胞诱导细胞凋亡

2.2 LiBr 细胞 caspase-3 蛋白的表达 siRNA-3 作用的 LiBr 细胞胞质内可见明显绿色荧光, 而 Blank, Mock 和 siRNA-NC 作用的 LiBr 细胞观察不到或仅有极微弱的绿色荧光 (图 2)。荧光强度定量显示, siRNA-3 作用的 LiBr 细胞荧光强度为 27.21 ± 3.16 , 与 Blank 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 Blank, Mock 和 siRNA-NC 3 组的细胞荧光强度分别是 7.24 ± 1.09 , 8.04 ± 1.86 和 7.96 ± 1.45 , 彼此间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 LiBr 细胞周期 siRNA-3 作用的 LiBr 细胞 G0/G1 期为 $(69.4 \pm 4.4)\%$, S 期为 $(18.6 \pm 2.7)\%$ ($P < 0.05$), 与 Blank 组相比, G0/G1 期升高而 S 期下降 ($P < 0.05$)。相反, 与 Blank 组相比, Mock 和 siRNA-NC 组作用后的 LiBr 细胞周期差异无统计学意义 ($P > 0.05$ 图 3)。

2.4 LiBr 细胞增值 细胞增殖曲线显示, 与 Blank 组相比, siRNA-3 作用后的 LiBr 细胞其增殖速度在上述时间范围内明显降低 ($P < 0.05$) 其中, 在 72 h 时

对 LiBr 细胞的增殖抑制率最高, 可达 $(33.4 \pm 3.5)\%$ ($P < 0.05$ vs 24 h, 48 h, 和 96 h) 96 h 时细胞增殖速度加快, 抑制率有所下降。相反, 与 Blank 组相比, Mock 和 siRNA-NC 组作用后的 LiBr 细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ($P > 0.05$ 图 4)。



A: 空白对照组 (Blank); B: 脂质体对照组 (Mock); C: 阴性对照组 (siRNA-NC); D: siRNA-3。

图 2 siRNA-3 转染 LiBr 细胞上调 Caspase-3

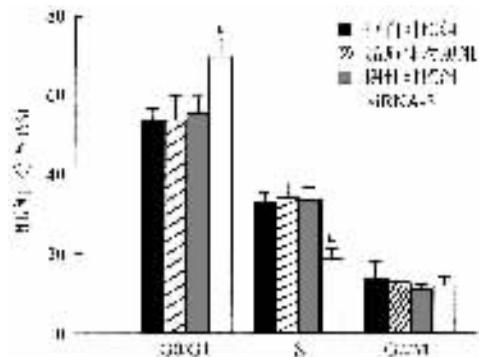


图 3 PI 单染流式细胞术分析 siRNA-3 转染 LiBr 细胞导致细胞周期 G0/G1 期阻滞 ($n = 3, \bar{x} \pm s, *P < 0.05$ vs 空白对照组)

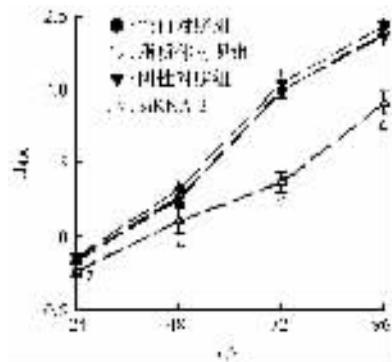


图 4 siRNA-3 转染 LiBr 细胞增殖抑制 ($n = 3, \bar{x} \pm s, *P < 0.05$ vs 空白对照组, $^{\circ}P < 0.05$ vs 24, 48 和 96 h)

3 讨论

凋亡抑制与肿瘤的发生与转移密切相关。以凋

亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP) 作为靶点成为新的基因治疗研究策略^[3]。本研究显示 靶向 livin 的 siRNA 双链可诱导恶性黑色素瘤 LiBr 细胞凋亡。livin 基因只含一个 BIR 结构域并通过抑制 Caspase-3, 7, 9 的活性实现抑制细胞凋亡^[4]。凋亡通路下游的效应分子 Caspase-3 是线粒体和死亡受体两条凋亡信号途径的共同通道, 凋亡通路一旦激活则引起 Caspase-3 级联反应并使其活化引起细胞凋亡。免疫荧光细胞化学检测表明, siRNA-3 转染后 Li-Br 细胞 Caspase-3 表达明显升高, 这提示沉默 livin 后 Caspase-3 活性释放, 激活凋亡通路, 促进了细胞凋亡^[5]。

本研究证实了靶向 livin 基因沉默后导致 LiBr 细胞周期出现 G0/G1 期阻滞和细胞增殖抑制。细胞周期调控异常是恶性肿瘤细胞凋亡和增殖异常的重要原因^[6]。本研究结果显示, LiBr 细胞被转染 siRNA-3 后进入 G0/G1 期的细胞明显增多, 进入 S 期的细胞明显减少, 表明靶向 livin 的 siRNA 转染 LiBr 细胞后恶性增殖信号受到抑制, 细胞增值周期进展受阻, 细胞增殖能力下降, 从而促进细胞凋亡进程。MTT 检测也标明转染后 LiBr 细胞增殖明显受到抑制, 在转染后 72 h 细胞增值抑制率最高。由此推测, livin 的表达可能具有周期依赖性。我们的研究初步证实了采

用 RNA 干扰技术靶向 livin 可诱导恶性黑色素瘤 LiBr 细胞凋亡, 引起细胞周期阻滞和抑制细胞增殖。但化学合成的 siRNA 系瞬时转染, 干扰效应维持时间较短, 以后可构建表达产生 siRNA-3 序列的真核表达载体以期较长期、稳定产生 livin 基因的沉默效应^[7]。该体外研究结果为靶向 livin 基因的恶性黑色素瘤的基因治疗提供了实验参考依据。

【参考文献】

- [1] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment[J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 168-176.
- [2] Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(3): 217-227.
- [3] Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): An emerging therapeutic target in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(4): 231-243.
- [4] Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 24-30.
- [5] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330-8336.
- [6] Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis[J]. Toxicology, 2002, 27(1812182): 475-481.
- [7] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3238-3246.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)24-2238-01

复方甘草酸苷片联合咪唑斯汀治疗慢性荨麻疹疗效观察

侯秀芳 (解放军第451医院皮肤科, 陕西 西安 710054)

【关键词】布替萘芬乳膏; 真菌感染; 治疗
【中图分类号】R758.22 【文献标识码】B

1 临床资料 2006-02/2007-02 共观察慢性荨麻疹患者 162 例。病例入选标准: ① 年龄 18~60 岁, 性别不限; ② 病程 > 6 wk, 就诊时均有皮疹存在; ③ 治疗前 1 mo 未应用长效皮质类固醇激素, 1 wk 内未服用抗组胺药及皮质类固醇激素; ④ 无严重心、肺、肝、肾、胃等系统性疾病及非妊娠或哺乳期妇女。按就诊顺序分为治疗组 86(男 44, 女 42)例, 年龄 18~60(平均 30.21)岁, 病程 8 wk~9 a(平均 2.63) a; 对照组 76(男 38, 女 38)例, 年龄 19~60(平均 31.24)岁, 病程 7 wk~8 a(平均 2.69) a。两组患者资料差异无显著性差异。治疗组口服复方甘草酸苷片 75 mg 2 次/d, 同时口服咪唑斯汀 10 mg 1 次/d, 对照组仅口服咪唑斯汀, 用法同上。均连用 4 wk 后评定疗效。疗效判定标准: 瘙痒程度用直观模拟标尺法(VAS)评价; 风团按照数目、直径, 每次发作持续时间和红斑严重程度按

0~3 的 4 级评分法评定疗效。治愈 疗效指数 > 90%; 显效 疗效指数 > 61%; 进步 疗效指数 ≥ 20%; 无效 疗效指数 < 20% 或加重。疗效指数 = (治疗前记分数 - 治疗后记分数) / 治疗前记分数 × 100%, 有效率以治愈 + 显效计。结果见表 1。治疗组和对照组各有 2 例出现短暂的轻、中度嗜睡反应, 但并未影响继续治疗。治疗组有效率为 83.7%, 明显高于对照组 (63.1%), 两组有显著性差异 ($\chi^2 = 4.442, P < 0.05$)。

表 1 两组患者治疗效果比较

组别	n	治愈	显效	进步	无效	有效率(%)
治疗	86	34	38	12	2	83.7
对照	76	22	26	16	12	63.1

2 讨论 复方甘草酸苷是以甘草甜素为主要成分, 具有抗炎、抗过敏反应、免疫调节、类固醇皮质激素样作用而无糖皮质激素的各种副作用, 能有效缓解慢性荨麻疹的临床症状, 抑制疾病复发^[1]。咪唑斯汀是一种强效、高选择性的组胺 H1 受体拮抗剂, 具有抗组胺和抗炎双重作用, 临床上广泛用于治疗慢性荨麻疹, 并取得了很好的效果。本研究结果表明, 复方甘草酸苷片与咪唑斯汀联合应用具有起效快、治愈率高、复发率低、安全可靠等优点, 值得临床推广。

【参考文献】

- [1] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 3 版, 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 513.

编辑 王雪萍

收稿日期 2007-09-11; 接受日期 2007-10-25

作者简介: 侯秀芳, 副主任医师. Tel: (029) 84734085 Email: hxf2008

@sina.com