

[文章编号] 1000-4718(2008)10-1873-04

· 论 著 ·

Survivin - siRNA 对前列腺癌 PC - 3M 细胞增殖的抑制作用*

刘艳波^{1,2}, 赵丽娟¹, 赵丽晶¹, 赵丹¹, 刘喜春¹, 高丽芳¹, 赵雪俭^{1△}

(1 吉林大学前列腺疾病防治研究中心, 吉林 长春 130021; 2 北华大学基础医学院病理生理学教研室, 吉林 吉林 132001)

[摘要] 目的: 探讨 survivin - siRNA 对前列腺癌细胞株 PC - 3M 的增殖抑制作用。方法: 构建两个针对 survivin siRNA 表达载体, 与脂质体和空质粒两个对照组一起分别转染前列腺癌 PC - 3M 细胞后, 利用半定量 RT - PCR 和 Western blotting 分别检测细胞 survivin mRNA 及蛋白表达水平, MTT 法测定细胞的增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡。结果: 转染 72 h 后, 两个实验组细胞的 survivin mRNA 水平是脂质体组的 $48\% \pm 6\%$ ($n=3$) 和 $30\% \pm 5\%$ ($n=3$), 蛋白表达水平是脂质体组的 $38\% \pm 4\%$ ($n=3$) 和 $36\% \pm 4\%$ ($n=3$)。MTT 检测实验组细胞的生长速度分别是脂质体组的 $44.20\% \pm 2.08\%$ ($n=3$) 和 $39.20\% \pm 1.93\%$ ($n=3$), 流式细胞术发现实验组 G₁ 期细胞比例明显高于两个对照组, 而 G₂ 期和 S 期细胞比例减少, 细胞出现凋亡。结论: 利用 survivin - siRNA 可明显抑制前列腺癌 PC - 3M 细胞的增殖, 细胞受阻于 G₁ 期, 诱导细胞凋亡, 为进一步进行动物体内研究奠定了基础。

[关键词] RNA 干扰; 前列腺肿瘤; PC - 3M 细胞; 细胞凋亡; Survivin

[中图分类号] R737.25

[文献标识码] A

Knockdown of survivin expression using siRNA inhibits the growth of PC - 3M cells

LIU Yan - bo^{1,2}, ZHAO Li - juan¹, ZHAO Li - jing¹, ZHAO Dan¹, LIU Xi - chun¹, GAO Li - fang¹, ZHAO Xue - jian¹

(¹The Prevention and Cure Center of Prostate Disease, Jilin University, Changchun 130021, China; ²Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132001, China. E - mail: pro_2@jlu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the inhibitory effects of survivin siRNAs on the growth of PC - 3M cells. **METHODS:** Two pairs of DNA template coding siRNA against survivin were synthesized to construct two recombinant plasmids, pSi - sur1 and pSi - sur2. The two recombinants and the two controls, lipofectin and vacant plasmid were transfected into PC - 3M cells. The expressions of survivin mRNA and protein were detected respectively by RT - PCR and Western blotting. Proliferation abilities were measured by MTT, and the cell cycle and apoptosis were assayed by FCM. **RESULTS:** After 72 h of transfection, the level of cell survivin mRNA in the two siRNA groups was $48\% \pm 6\%$ ($n=3$) and $30\% \pm 5\%$ ($n=3$) of that in lipofectin group, and expression of survivin protein were $38\% \pm 4\%$ ($n=3$) and $36\% \pm 4\%$ ($n=3$) respectively of that in lipofectin control. The proliferation rate of cells in pSi - sur1 and pSi - sur2 groups was also inhibited according to MTT, about $44.20\% \pm 2.08\%$ ($n=3$) and $39.20\% \pm 1.93\%$ ($n=3$) of that in lipofectin group. Cell numbers of G₁ phase in two siRNA groups were significantly higher than that in two controls, while cells of G₂ phase and S phase were much lower. Cell apoptosis was found in both siRNA groups. **CONCLUSION:** The two survivin siRNA significantly inhibit the expression of survivin in mRNA and protein levels, arrest the cell cycle in G₁ phase, and suppress the growth of PC - 3M cells and induce apoptosis *in vitro*.

[KEY WORDS] RNA interference; Prostatic neoplasms; PC - 3M cells; Apoptosis; Survivin

前列腺癌发病率在我国呈逐年上升趋势, 是危害男性健康的常见恶性肿瘤之一, 至今尚无满意的治疗方法。近年来生物治疗成为治疗前列腺癌的研究热点。survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白 (IAP) 家族新成员^[1], survivin 选择性地表达于恶性

肿瘤组织中, 而在胸腺和生殖腺外的正常成人组织中不表达, 这种特点使其成为目前恶性肿瘤诊断和治疗的新靶点。为探讨利用 siRNA 抑制 survivin 表达对于前列腺癌的治疗价值, 我们设计了 2 个 survivin - siRNA 表达载体, 将其转染前列腺癌细胞株

[收稿日期] 2008 - 04 - 10

[修回日期] 2008 - 08 - 15

* [基金项目] 国际科技合作重点项目 (No. 2004DFB02000)

△通讯作者 E - mail: pro - 2@jlu.edu.cn

PC-3M, 观察对其增殖抑制的作用。

材 料 和 方 法

1 材料

人激素非依赖性高转移前列腺癌 PC-3M 细胞株, 为本实验室传代保存。质粒 pGCsi-U6/Neo/GFP 购自上海吉凯基因化学有限公司, 各种分子克隆工具酶为 TaKaRa 产品, DNA 纯化试剂盒、RT-PCR 试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒为 Qiagen 产品, IMDM 培养基为 Hyclone 产品, 新生牛血清购自北京鼎国公司, 转染试剂 Lipofectamin2000 购自 Invitrogen, 兔抗人 survivin 抗体及羊抗兔 II 抗均为 Santa Cruz 产品, 蛋白定量试剂盒为 Bio-Rad 产品。其他试剂为进口或国产分析纯。DNA 片段及序列测定均由上海生工生物工程有限责任公司完成。

2 方法

2.1 真核表达质粒 pSi-sur 的构建 根据人 survivin mRNA 序列, 参照 siRNA 设计原则, 设计了 2 个 survivin siRNA, 长度均为 19 bp, 并利用 BLAST 查询确定了其特异性。人工合成 2 对互补并编码相应短发夹 siRNA 的寡核苷酸链, shRNA-survivin1 (编码基因 71-89): 5'-GATCC C GGA CCA CCG CAT CTC TAC A ttcaagaga T GTA GAG ATG CCG TGG TCC TTTTT GGA T-3' (正义链), 5'-AGCTA TCC AAAAA GGA CCA CCG CAT CTC TAC A tctcttgaa T GTA GAG ATG CCG TGG TCC G G-3' (反义链); shRNA-survivin2 (编码基因 368-386): 5'-GATCC C GCA GTT TGA AGA ATT AAC C tcaagaga G GTT AAT TCT TCA AAC TGC TTTTT GGA T-3' (正义链), 5'-AGCTA TCC AAAAA GCA GTT TGA AGA ATT AAC C tctcttgaa G GTT AAT TCT TCA AAC TGC G G-3' (反义链)。合成的 DNA 在 5' 端和 3' 端分别带有 BamH I 和 Hind III 酶切位点的一部分。互补寡核苷酸链退火后, 分别与 BamH I/Hind III 线性化的载体 pGCsi-U6/Neo/GFP 相连, 构建重组质粒 pSi-sur1 和 pSi-sur2。

2.2 重组质粒的提取与鉴定 将已构建好的 pSi-sur1 和 pSi-sur2 重组质粒分别转化 JM109 感受态细菌, 利用氨苄青霉素进行筛选, 阳性克隆菌株小量提取质粒, 经酶切鉴定后, 送上海生工生物工程有限责任公司进行测序。

2.3 细胞培养及质粒转染 利用 Qiagen 去内毒素质粒提取试剂盒, 大量提取去内毒素的重组质粒 pSi-sur1 和 pSi-sur2。接种 PC-3M 细胞于 100 mL 培养瓶中, 细胞数约为 1×10^6 , 用含 10% 新生牛血清但不含抗生素的 IMDM 培养液, 在 37 °C 培养至细胞占瓶底约 80% - 90% 时, 按 Invitrogen 公司的 Lipofectamine2000 使用说明书进行转染, 质粒和转染试剂的比例为 2:1。转染分组情况如下: (1) 脂质体对

对照组; (2) 空载体对照组; (3) pSi-sur1 组; (4) pSi-sur2 组。

2.4 半定量 RT-PCR 检测细胞 survivin mRNA 水平 转染 72 h 后, 利用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取 PC-3M 细胞总 RNA, RT-PCR 扩增目的基因 survivin 和内参基因 β -actin。反应体系中加入两对引物, 第一对是 survivin 基因的引物, 即 5'-GAATTCATGGGTGCCCGACGTTGCC-3' 和 5'-AGATCTTTCTTCTTATTGTTGGTTTCC-3', 扩增段断长度为 415 bp。第二对是 β -actin 基因的引物, 即 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' 和 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3', 扩增片段长度为 630 bp。PCR 反应条件: 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下拍照。

2.5 Western blotting 分析细胞 survivin 蛋白含量 转染 72 h 后收集细胞提取总蛋白, 用 Bradford 法进行定量, 取 50 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 电泳结束后转移蛋白至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 1:200 稀释的兔抗人 survivin I 抗, 室温作用 3 h, TBST 洗膜, 加入 1:2000 稀释的羊抗兔 IgG/HRP, 室温温育 1 h, TBST 洗膜, 用 DAB 显色。

2.6 MTT 法检测细胞存活率 PC-3M 细胞培养于 96 孔培养板, 将细胞分为四组, 分别转染空脂质体、空载体、pSi-sur1 和 pSi-sur2。转染 72 h 后, 各孔分别加入 MTT (5 g/L) 20 μ L, 37 °C 培养 4 h, 轻轻吸去上清, 每孔加入 100 μ L DMSO, 37 °C 振荡溶解 10 min, 在 570 nm 处检测吸光度值 (A)。每组以 3 复孔检测, 最终结果取 3 孔平均值。各组所得数据分别与脂质体组进行比较。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 转染后 72 h 收集 10^6 个细胞, 用预冷 PBS 洗涤, 1000 r/min 离心 3 min, 反复 3 次。弃上清液, 收集细胞, 混匀沉淀, 快速加入 75% 冷乙醇中, 4 °C 固定 24 h, 用流式细胞仪进行检测。

3 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验进行各组间均数比较, 用方差分析进行各组间差异比较。

结 果

1 重组质粒 pSi-sur 的鉴定

重组质粒 pSi-sur1 和 pSi-sur2 转化 JM109 后, 小量提取质粒, 分别选取阳性克隆进行测序, 结果与所设计的寡核苷酸序列一致, 证明两个 pSi-sur 真核表达质粒构建成功。

2 siRNA 抑制转染细胞 survivin mRNA 水平

转染后 72 h 提取细胞总 RNA, 利用半定量 RT-PCR 方法检测 survivin 基因转录水平, 结果如图 1 所

示。运用 GIS 凝胶分析软件吸光度扫描分析,以脂质体组 survivin 产物与内参 β -actin 产物的电泳亮度比值定为 1,则其它各组的比值分别为:空载体组 $0.96 \pm 0.09 (n = 3)$, pSi-sur1 组 0.48 ± 0.06 , pSi-sur2 组 0.30 ± 0.05 。空载体组与脂质体组基本无差别,但两个实验组亮度明显减弱,实验组之间无显著差异。结果表明两个重组质粒 pSi-sur 均在 mRNA 水平上抑制了 survivin 基因转录。

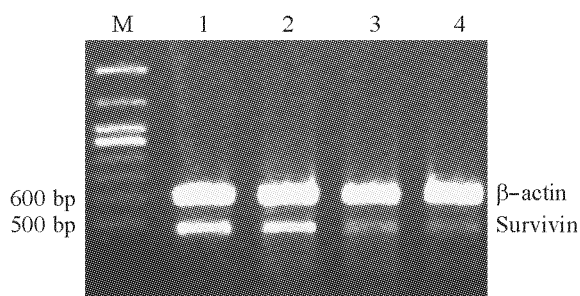


Fig 1 RT-PCR results of survivin-siRNA inhibiting PC-3M survivin mRNA expression. 1: Lipofectin control; 2: plasmid control; 3: pSi-sur1; 4: pSi-sur2.

图1 Survivin-siRNA 抑制 PC-3M 细胞 survivin mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果

3 siRNA 抑制细胞中 survivin 蛋白表达

转染 72 h 后提取细胞总蛋白进行 Western blotting 分析,结果如图 2 所示。吸光度扫描分析以脂质体组的 survivin 与内参 β -actin 的杂交带亮度比值定为 1,则其它组分别为:空载体组 $0.89 \pm 0.10 (n = 3)$, pSi-sur1 组 $0.38 \pm 0.04 (n = 3)$, pSi-sur2 组 $0.36 \pm 0.04 (n = 3)$ 。与脂质体对照组和空载体对照组相比,两个实验组细胞的 survivin 蛋白表达均受到了明显抑制 ($P < 0.05$),但实验组间无差异。

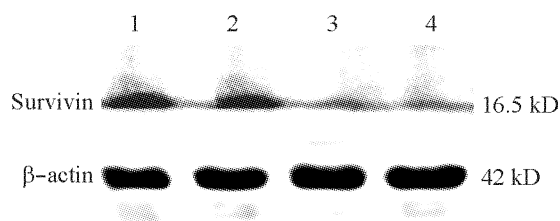


Fig 2 Western blotting results of survivin-siRNA inhibiting PC-3M survivin protein expression. 1: Lipofectin control; 2: plasmid control; 3: pSi-sur1; 4: pSi-sur2.

图2 Survivin-siRNA 抑制 PC-3M 细胞 survivin 蛋白表达的 Western blotting 检测结果

4 siRNA 转染后细胞存活率

利用 MTT 法检测各组转染细胞的存活状态,以脂质体组的生存率作为 100%,则空质粒组、pSi-sur1 组及 pSi-sur2 组的生存率分别为 $93.0\% \pm 6.1\% (n = 3)$, $44.2\% \pm 2.1\% (n = 3)$ 和 $39.2\% \pm 1.9\% (n = 3)$,两个实验组细胞均出现了较大程度的生长抑制现象,与脂质体组和空质粒组相比较,均显著差异 ($P < 0.05$),见图 3、4。

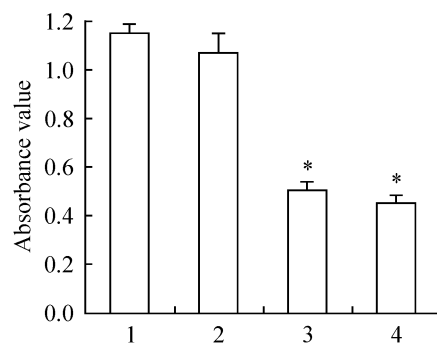


Fig 3 MTT detection results after survivin-siRNA transfection in PC-3M cell line. 1: Lipofectin control ($1.17 \pm 0.03, n = 3$); 2: plasmid control ($1.09 \pm 0.05, n = 3$); 3: pSi-sur1 ($0.52 \pm 0.02, n = 3$); 4: pSi-sur2 ($0.46 \pm 0.03, n = 3$). * $P < 0.05$ vs Lipofection.

图3 Survivin-siRNA 转染 PC-3M 细胞后的 MTT 检测结果

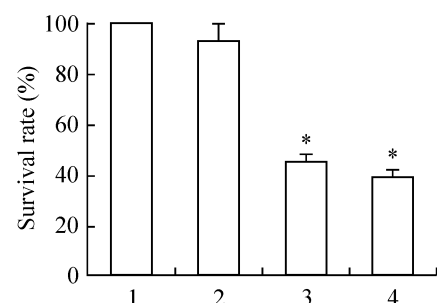


Fig 4 The survival rate after surviving-siRNA transfection in PC-3M cell line. 1: Lipofectin survival rate 100%; 2: plasmid control survival rate $93.0\% \pm 6.1\% (n = 3)$; 3: pSi-sur1 survival rate $44.2\% \pm 2.1\% (n = 3)$; 4: pSi-sur2 survival rate $39.2\% \pm 1.9\% (n = 3)$. * $P < 0.05$ vs Lipofectin group.

图4 Survivin-siRNA 转染 PC-3M 细胞后的细胞生存率

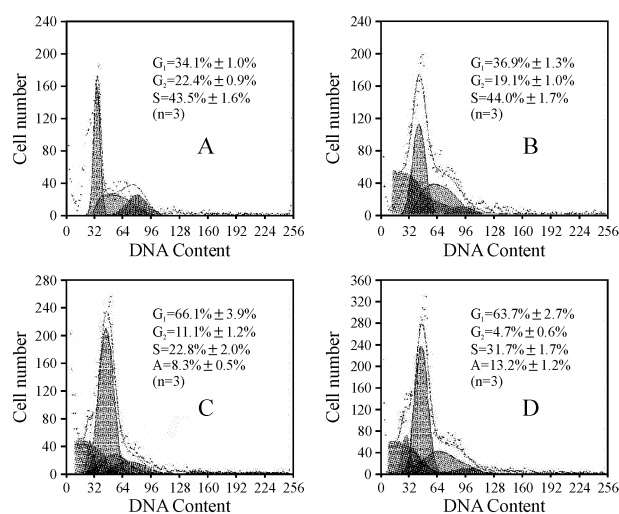


Fig 5 The flowcytometry detection results of survivin-siRNA affecting PC-3M cell cycle. 1: Lipofectin control; 2: plasmid control; 3: pSi-sur1; 4: pSi-sur2.

图5 Survivin-siRNA 影响 PC-3M 细胞的细胞周期的流式细胞术检测结果

5 siRNA 转染后对细胞周期的影响

流式细胞术检测结果表明,转染 survivin - siRNA 后,细胞周期发生明显改变(图 5)。两个实验组的 G₁ 期细胞比例均增加,高于脂质体对照组和空质粒对照组;实验组 G₂ 期和 S 期的细胞比例减少,低于脂质体对照组和空质粒对照组。实验组细胞与对照组相比,出现了明显的细胞凋亡($P < 0.05$)。

讨 论

凋亡抑制基因 survivin 是 Ambrosini 等^[1]于 1997 年分选出来的 1 个新基因,人类 survivin 基因定位于染色体 17q25,长 75 - 130 kb,含 3 个内含子和 4 个外显子,无 TATA 启动子结构,编码产生 1 个由 142 个氨基酸组成的分子量约为 16.2 kD 的胞质蛋白。Survivin 具有抑制凋亡和调节细胞增殖的双重作用,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子,其编码的蛋白是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员^[2-4]。

Survivin 的组织分布有明显的选择性,除胚胎组织外,在正常成人组织中(除胸腺和生殖腺)不表达,但在几乎所有恶性肿瘤组织内均有表达,如肺癌、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌等^[5-7]。McEleny 等^[8]提出 survivin 在不同的前列腺癌细胞株均有表达,在前列腺肿瘤的发生、发展中扮演一个重要的角色。Shariat 等^[9]认为 survivin 在前列腺肿瘤的高水平表达与肿瘤的分期、分级有关。Survivin 的选择性分布特点使其成为肿瘤基因治疗的理想靶点,针对 survivin 的基因治疗具有良好的靶向性、特异性和安全性,可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖,但对正常组织几乎没有不良影响。

RNA 干扰(RNAi)是 1998 年由 Fire 等^[10]提出的、近年快速发展的一种基因沉默技术,具有高度特异性、作用效率高和干扰作用可扩散的特点,具有很强的抑制目的基因的作用。反义 DNA 及 siRNA 均能抑制目的基因, Fuessel 等^[11]分别利用 survivin 的反义 DNA 及 siRNA 转染膀胱癌细胞,发现二者均能降低细胞 survivin 表达水平,细胞对于化疗药物的敏感性明显增强,但 siRNA 的效果优于反义 DNA,提示在肿瘤治疗方面,siRNA 比反义寡核苷酸抑制目的基因的效果更强。

本实验设计了两个针对 survivin 的 siRNA 表达载体,转染前列腺癌细胞 PC - 3M 后,均可以抑制细胞 survivin mRNA 及蛋白表达,两种 survivin - siRNA 都能够显著抑制细胞的生长,流式细胞术检测进一步发现细胞生长受到了明显抑制,并出现凋亡,细胞多受阻于 G₁ 期。这说明了 survivin 在细胞 G₁ 期向 S 期转换中起着重要作用。本研究结果从另一面证实了 Suzuki 等^[12]的研究发现,即 survivin 过表达会导致细胞加快向 S 期转换,抵抗 G₁ 期抑制,从而促进

细胞增殖。

通过实验我们发现,以 survivin 基因为靶点的 RNAi 能明显抑制前列腺癌 PC - 3M 细胞中 survivin 基因的表达,细胞受阻于 G₁ 期,诱导细胞凋亡,这为以 survivin 基因为靶点进行 RNAi 来治疗前列腺癌提供了可靠的实验依据,我们将继续进行深入的动物体内实验来确认其有效性。

[参 考 文 献]

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altier DC, et al. A novel anti - apoptosis gene, survivin expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8):917 - 921.
- [2] Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2001,7(12):542 - 547.
- [3] Carvalho A, Carmena M, Sambade C, et al. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol - treated HeLa cells[J]. *J Cell Sci*, 2003,116(pt 14): 2987 - 2998.
- [4] 马向涛,余力伟,王 杉,等. Stat5b/survivin 信号转导通路调控结肠癌细胞凋亡的机制[J]. *中国病理生理杂志*,2007, 23(6):1049 - 1052.
- [5] Adida C, Crotty PL, McGrath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti - apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. *Am Pathol*, 1998, 152(1): 43 - 49.
- [6] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 127 - 134.
- [7] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, et al. Expression of the anti - apoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. *Gut*, 2000, 46(5): 645 - 650.
- [8] McEleny KR, Watson RW, Coffey RN, et al. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines[J]. *Prostate*, 2002,51(2): 133 - 140.
- [9] Shariat SF, Lotan Y, Saboorian H, et al. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma[J]. *Cancer*, 2004, 100(4): 751 - 757.
- [10] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6699): 806 - 811.
- [11] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, et al. Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin - directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA[J]. *Cancer Lett*,2006, 232(2): 243 - 254.
- [12] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation[J]. *Oncogene*, 2000, 19(29): 3225 - 3234.