

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.011

## Survivin-pPRIME-IGF1R-miR30 慢病毒载体的构建及其对肝癌细胞生长的抑制

牛 坚, 刘 斌, 于 彬, 王 月, 李向农(徐州医学院附属医院 普外科, 江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的:探讨 survivin 启动子调控的重组慢病毒 survivin-pPRIME-IGF1R-miR30 载体(简称为 sur-IGF1R-miR30)对肝癌 Hep3B 细胞 IGF1R 表达和细胞生长的影响。方法:PCR 扩增 survivin 启动子,构建 sur-pPRIME;将针对 *IGF1R* 基因的干扰序列与 sur-pPRIME 载体连接,构建 sur-IGF1R-miR30 慢病毒载体。将 sur-IGF1R-miR30、psPAX2 和 pMD2G 质粒共转染 293T 细胞,扩增慢病毒,检测病毒滴度。以 sur-IGF1R-miR30 感染人肝癌 Hep3B 细胞和胎肝 L-02 细胞,RT-PCR、Western blotting 检测 Hep3B 细胞 IGF1R 的表达,CCK-8 法检测 Hep3B 细胞的生长。结果:成功构建 survivin 启动子调控的慢病毒载体 sur-IGF1R-miR30,滴度为  $4.58 \times 10^9$  PFU/ml。Sur-IGF1R-miR30 感染后,Hep3B 细胞中特异表达荧光蛋白,L-02 细胞中基本没有表达。Sur-IGF1R-miR30 感染 Hep3B 细胞可阻断 *IGF1R* mRNA 和 IGF1R 蛋白的表达。Sur-IGF1R-miR30 感染抑制肝癌细胞的生长,第 7 天时的抑制率达 60% ( $P < 0.05$ )。结论:成功构建的重组慢病毒载体 sur-IGF1R-miR30 可有效地降低肝癌细胞中 IGF1R 的表达,抑制肝癌细胞的增殖。

[关键词] 肝肿瘤;人胰岛素样生长因子 1 类受体;survivin 启动子;慢病毒;RNA 干扰

[中图分类号] R735.7; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)03-0302-06

## Construction of survivin-pPRIME-IGF1R-miR30 lentiviral vector and its inhibitory effect on proliferation of liver cancer cells

NIU Jian, LIU Bin, YU Bin, WANG Yue, LI Xiang-nong (Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of survivin-promoter-regulated survivin-IGF1R-miR30 (sur-IGF1R-miR30) lentiviral vector on the IGF1R expression and proliferation of hepatoma Hep3B cells. **Methods:** Survivin promoter was amplified by PCR and sur-pPRIME plasmid was constructed. Interference sequence targeting *IGF1R* gene was synthesized and cloned into sur-pPRIME plasmid, named sur-IGF1R-miR30. Sur-IGF1R-miR30, psPAX2, and pMD2G were co-transfected into 293T cells to amplify lentivirus, and the lentivirus titer was examined. IGF1R expression in Hep3B cells was detected by RT-PCR and Western blotting analysis, and the proliferation of Hep3B cells was evaluated by CCK-8 assay. **Results:** Sur-IGF1R-miR30 lentiviral vector regulated by survivin promoter were successfully constructed, and the virus titer was  $4.58 \times 10^9$  PFU/ml. Fluorescent protein after sur-IGF1R-miR30 infection was expressed in Hep3B cells, but not in L-02 cells. Sur-IGF1R-miR30 infection inhibited IGF1R mRNA and protein expressions in Hep3B cells and the proliferation of Hep3B cells, with the inhibitory rate being 60% at 7 d ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Sur-IGF1R-miR30 lentiviral vector can inhibit IGF1R expression and hepatoma cell proliferation.

[Key words] liver neoplasms; human insulin like growth factor receptor 1; survivin promoter; lentivirus; RNA interfere  
[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 302-307]

肿瘤基因治疗的关键之一就是靶向性,应用特定的基因表达调控元件,使目的基因特异地在肿瘤细胞中表达,是实现肿瘤基因治疗靶向性的重要手段。Survivin 基因在多种肿瘤细胞中高表达而在相应的正常组织不表达<sup>[1]</sup>。因此,研究<sup>[2]</sup>认为 survivin 基因的启动子在肿瘤细胞有特异表达,可以成

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(No. 09kj320018)。Project supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Institutions (No. 09kj320018)

[作者简介] 牛坚(1976-),男,江苏省连云港市人,博士,副教授,主要从事肝胆肿瘤方面的研究

[通信作者] 牛坚(NIU Jian, corresponding author),Email: njnj\_001@163.com

为基因治疗肿瘤的新的靶向性工具。人胰岛素样生长因子 I 类受体 (human insulin like growth factor receptor 1, IGF1R) 在细胞的恶性表型的形成和维持上起了关键作用,在肝癌中表达,与肝癌的发生、发展及侵袭和转移密切相关<sup>[3]</sup>。本研究通过构建 survivin 基因启动子调控的沉默 IGF1R 的 miR30-shRNA 慢病毒,探讨其对肝癌细胞生物学行为影响,为肝癌基因治疗拓展新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

兔抗人 IGF1R 多克隆抗体购自 Sant Cruze 公司, CCK-8 试剂盒购于 Dojindo 公司, lipofectamin2000 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *EcoR* I、*Apa* I 和 *Nhe* I, 以及 T4 DNA 连接酶购于大连宝生物公司。质粒提取试剂盒、回收试剂盒购于上海生物工程有限公司。PCR 引物和其他试剂购于博亚公司。

人肝癌细胞株 Hep3B(不表达野生型 P53)、胎肝 L-02 细胞株、大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  由国家人类基因组南方研究中心提供。慢病毒的包装细胞 293T 细胞株由中科院上海细胞所提供。本实验所采用的重组慢病毒 pPRIME (potent RNAi using microRNA expression, 含有 microRNA 的 RNAi 表达系统) 系统由复旦大学医学院申海莲博士惠赠。该病毒包装系统由 pPRIME, psPAX2 和 pMD2G 3 种质粒组成。

### 1.2 PCR 扩增及鉴定 survivin 启动子

根据 GenBank 中 survivin 启动子序列设计一对引物:上游引物为 5'-ACGTGGGCCCCGCTTCTTTGAAAGCAGTC-3';下游引物为 5'-TATAGCTAGCCAGGCAGGGGCAACGT-3'。以上引物分别含有 *Apa* I 和 *Nhe* I 限制性酶切位点。以 HeLa 细胞的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 survivin 启动子,反应条件为:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 33 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物回收纯化, 上海博亚生物公司测序分析。

### 1.3 重组质粒 survivin-pPRIME-IGF1R-miRNA30 的构建

PCR 扩增的 survivin 启动子和穿梭质粒 pPRIME 用 *Apa* I 和 *Nhe* I 双酶切, 连接, 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 挑取重组阳性克隆测序鉴定, 质粒命名为 survivin-pPRIME。根据 *IGF1R* 基因序列 (NM\_000875), 通过 <http://codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl> 网站设计 shRNA, 采用 Blast 对选的靶序列

进行同源分析, 排除非特异性 shRNA, 选择 *IGF1R* 基因 cDNA 序列中 21 nt 片段为合成的 shRNA 靶序列, 其序列为: ATCAACGGCCTATTGTCAGGT; 同时设计一条无关的序列: ATCAACGGCCTCTATTGTCAG。根据 pPRIME 载体的要求, 设计 95 nt 的长链序列: 5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGAATCAACGGCCTATTGTCAGGTTAGTGAAGCCACAGATAACCTGACAATAGCCGTTGATCTGCCTACTGCCTCGGA-3'。无关的序列为: TGCTGTTGACAGTGAGCGATCAGATCAACGGCCTCTATTGTAGTGAAGCCACAGATACAATAGAGGCCGTTGATCTGACTGCCTACTGCCTCGGA; 同时设计一对两端分别含有 *Xho* I 和 *EcoR* I 酶切位点的通用引物, 其序列分别为 P1: 5'-CTGCTCGAGACGACAACCTGTCCTCGCTTAGTTG-3'; P2: 5'-GAGGAATTCTCCGAGGCAGTAGGCAGTAGTTGCC-3'。均由上海博亚生物技术有限公司合成。以合成的 97 nt 长链为模版, 加入引物 P1、P2 和 pfu 聚合酶进行 PCR 反应, 反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 回收 PCR 产物。与经 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后的 pPRIME 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 挑取重组阳性克隆, 行 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切及测序鉴定。提取质粒 survivin-pPRIME-IGF1R-miRNA 和 survivin-pPRIME-IGF1R-mutation, 后面实验中简称为 sur-IGF1R-miR30 和 sur-IGF1R。

### 1.4 病毒的包装

将上述质粒 sur-IGF1R-miR30 或 sur-IGF1R 分别与 pMD2G、psPAX2 (3 质粒系统) 一起, 通过 lipofectamin2000 共感染 293T 细胞, 经过病毒空斑纯化, 包装成完整病毒颗粒。提取重组病毒 DNA, PCR 分析、测序鉴定正确者即为目的病毒 sur-IGF1R-miR30 和 sur-IGF1R。

### 1.5 病毒滴度的测定

取 96 孔板 1 块, 每孔加 293T 细胞  $1 \times 10^4$  个, 加液量 200  $\mu$ l, 孵箱培养 24 h 后更换无血清培养液; 待测病毒用 DMEM 完全培养液稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  等稀释度。每一浓度设 3 复孔, 每孔每一浓度取病毒溶液 200  $\mu$ l, 同时设培养液对照; 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养 36 ~ 48 h。镜检观察 CEP 现象, 按公式计算出病毒滴度: 病毒滴度 (PFU/ml) = 每孔细胞数  $\times$  病毒稀释倍数  $\times 10$  / 加入的病毒溶液量 (ml)。

### 1.6 Survivin 启动子的肿瘤特异性的鉴定

将 Hep3B、L-02 细胞低密度铺于 6 孔板, 1 d 后用 MOI = 10 的病毒 sur-IGF1R-miR30、PRIME 感染 Hep3B 细胞, L-02 细胞作为对照组。用 Imagepro-

Plus 6.0 软件分析 Hep3B、L-02 细胞的荧光照片, 通过计算每个荧光细胞的平均积分光密度( integrated optical density, IOD) 间接比较 survivin 启动子启动绿色荧光蛋白基因的表达水平。

1.7 RT-PCR 检测 IGF1R mRNA 的表达

将 Hep3B、L-02 细胞低密度铺于 6 孔板, 1 d 后用 MOI = 10 的 sur-IGF1R-miR30 感染细胞, 未处理的细胞作为对照组。48 h 后 TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA, 逆转录反应使用随机引物 OligdT s 合成第一链( 严格按照厂家说明书操作), 在 20  $\mu$ l 反应体系中加入 2  $\mu$ g 总 cDNA。引物序列为如下: 上游为 5'-GGAGGCTGAATACCG-CAAAGTC-3', 下游为 5'-AAAGACGAAGTTG-GAGGCGCT-3', 扩增产物为 398 bp; 内参照  $\beta$ -actin, 上游为 5'-GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3', 下游为 5'-CAGTGTACAGGTAAGCCCTG-3'。退火温度均为 55  $^{\circ}$ C。在同一条件下, 每次 PCR 以  $\beta$ -actin 为内参照, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像仪扫描成像, 表达丰度以特异基因条带灰度与内参照的比值表示。

1.8 Western blotting 检测 IGF1R 蛋白的表达

将 Hep3B、L-02 细胞低密度铺于 6 孔板, 1 d 后用 MOI = 10 的 sur-IGF1R-miR30 感染细胞, 未处理的细胞作为对照组。48 h 后提取核蛋白, 取 40  $\mu$ g 细胞裂解液与上样缓冲液混合, 煮沸 10 min 后上样, 进行 SDS-PAGE; 电转移法将蛋白从凝胶中转移到 PVDF 膜上, 甲醇固定 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 一抗 10 ml( 1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h, 二抗 10 ml( 1:5 000 稀释) 室温孵育 2 h 后, PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒处理并在暗室显影。

1.9 CCK-8 法检测 sur-IGF1R-miR30 对 Hep3B 细胞增殖的影响

参照 CCK-8 方法检测, 具体操作如下: 分别取对数生长期的各组细胞, 以每孔  $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中, 每孔体积为 200  $\mu$ l; 24 h 后换不含胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续培养 24 h 使细胞静止; 将 MOI = 10 的 sur-IGF1R-miR30 感染 Hep3B 细胞, 感染 48 h 后, 将待测孔内培养上清液移入空白的 96 孔板中; 在酶联免疫分析仪上测定各孔光密度(  $D_{450}$ ) 绘制生长曲线, 观察各组细胞连续 7 d 的增殖情况。每孔设 3 个复孔。

1.10 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 SAS6. 12 统计软件进行  $t$  检验分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin 启动子有效片段 PCR 产物的鉴定

以 HeLa 细胞 DNA 为模板, PCR 扩增 survivin 启动子有效片段, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 得到清晰的约 298 bp 的 DNA 片段( 见图 1)。与预期结果吻合。测序鉴定正确。

2.2 重组质粒 survivin-pPRIME 的鉴定

Survivin 启动子 PCR 扩增产物经 *Apa* I 和 *Nhe* I 双酶切后, 与 pPRIME 载体连接, 行 *Apa* I 和 *Nhe* I 酶切鉴定。重组质粒的酶切产物 916 bp( 插入片段为 298 bp), 以经双酶切后没有插入片段的 pPRIME 空载体产物 618 bp 为对照( 图 2), 鉴定结果与预期相符。测序结果表明, 合成的 survivin 启动子序列插入正确。此时命名慢病毒重组载体为 survivin-pPRIME。

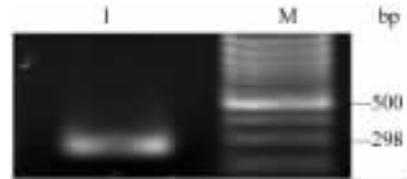


图 1 Survivin 启动子片段 PCR 产物的鉴定  
Fig. 1 Identification of survivin promoter fragment by PCR  
1: Survivin; M: Marker

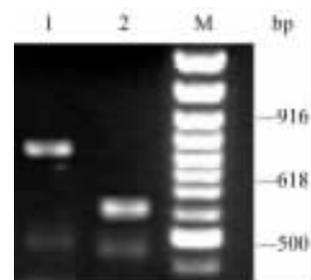


图 2 Survivin-pPRIME 的双酶切鉴定  
Fig. 2 Identification of survivin-pPRIME by double enzyme digestion  
1: Survivin-pPRIME; 2: pPRIME; M: Marker

2.3 重组质粒 sur-IGF1R-miR30 的鉴定

Sur-IGF1R-miR30 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 挑取重组阳性克隆, 行 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定阳性克隆, 片段大小为 96 bp 左右( 图 3), 但因为片段太小不易观察到。电泳结果显示: sur-IGF1R-miR30 与对照组 pPRIME、survivin-pPRIME 酶切相比, 未见 1 100 bp 左右的条带型, 且后面的条带位于同一条线上, 鉴定结果与预期相符。测序结果表明, 合成的

IGF1R- iR30-shRNA 序列插入正确。该慢病毒重组载体命名为 sur-IGF1R-miR30。

#### 2.4 重组质粒感染 293T 细胞的效应

表达质粒共感染 293T 细胞,细胞部分融合,多核复合体出现,随着病毒增殖,细胞内可见多量病毒颗粒,并逐渐从壁上脱落,出现细胞病理效应。病毒滴度测定结果显示,重组慢病毒表达克隆的滴度为  $4.58 \times 10^9$  PFU/L。

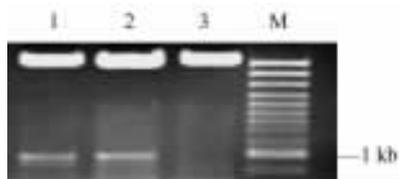


图3 Sur-IGF1R-miR30 的双酶切鉴定  
Fig.3 Identification of sur-IGF1R-miR30 by double enzyme digestion

1: pPRIME; 2: Survivin-pPRIME;  
3: Sur-IGF1R-miR30; M: Marker

#### 2.5 Survivin 启动子调控的肿瘤特异性表达活性

Survivin 启动子所调控的 sur-IGF1R-miR30 在 Hep3B 细胞中启动了表达( IOD = 260 ),具有很强的肿瘤特异性启动活性,而在 L-02 细胞中很低表达( 感染 pPRIME 组的 IOD = 61, 感染 sur-IGF1R-miR30 组的 IOD = 58 ),差异有统计学意义。pPRIME 在 Hep3B( IOD = 63 )和 L-02 细胞中都只有较低的表达,差异无统计学意义。详见图 4。

#### 2.6 感染慢病毒 sur-IGF1R-miR30 后肝癌细胞中 IGF1R mRNA 的表达

RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,398 bp 处可见特异性 IGF1R 目标条带( 图 5 ), sur-IGF1R-miR30 中 IGF1R 的表达较对照组明显减低,经灰度扫描及与内参照比较分析,干扰组 IGF1R mRNA 的表达量仅为对照组的 5% (  $P < 0.05$  ),表明针对 IGF1R 的慢病毒 sur-IGF1R-miR30 能干扰 IGF1R mRNA 的表达。实验还发现 sur-IGF1R-miR30 感染正常胎肝细胞 L-02 后 IGF1R 的表达与对照组比较无明显变化。

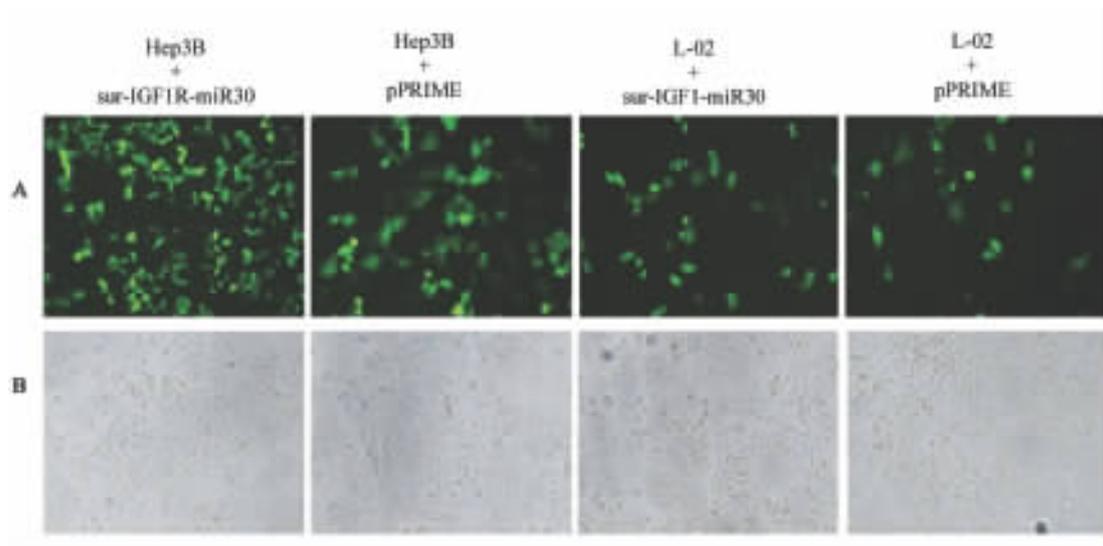


图4 Sur-IGF1R-miR30 在 Hep3B 细胞中的特异性表达(  $\times 100$  )  
Fig.4 Tumor-specific expression of sur-IGF1R-miR30 in Hep3B cells(  $\times 100$  )

A: Under fluorescence microscope; B: Under light microscope

#### 2.7 感染后肝癌细胞中 IGF1R 蛋白的表达

慢病毒 sur-IGF1R-miR30 感染 Hep3B 细胞 48 h 后,细胞内 IGF1R 的表达与对照组比较明显下降,约为对照组的 10% (  $P < 0.05$  )。实验也发现慢病毒 sur-IGF1R-miR30 感染正常胎肝 L-02 细胞后,IGF1R 蛋白的表达与对照组比较无明显变化( 图 6 )。

#### 2.8 Sur-IGF1R-miR30 对 Hep3B 细胞增殖的影响

从实验组和对照组的细胞生长曲线可以看出,从第 2 天开始,sur-IGF1R-miR30 组细胞的生长明显慢于对照组;第 7 天与对照组比细胞数减少约 60% (  $P < 0.05$  ),而对照组间无明显差别( 图 7 )。

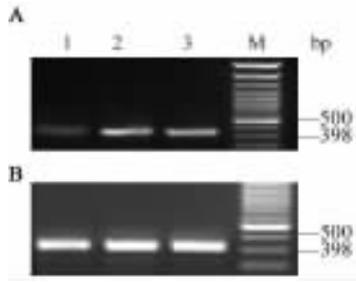


图5 RT-PCR 检测 sur-IGF1R-miR30 感染后 Hep3B( A)和 L-02 细胞( B)中 IGF1R mRNA 的表达  
Fig.5 IGF1R mRNA expression in Hep3B ( A) and L-02 ( B) cells after sur-IGF1R-miR30 infection as detected by RT-PCR

1: Sur-IGF1R-miR30; 2: Sur-IGF1R; 3: pPRIME; M: Marker

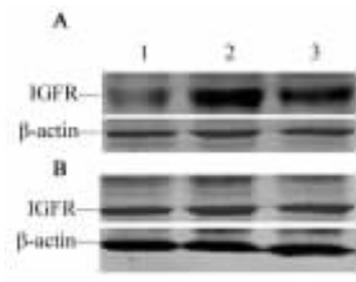


图6 Western blotting 检测 sur-IGF1R-miR30 感染后 Hep3B( A)和 L-02 细胞( B)IGF1R 蛋白的表达  
Fig.6 IGF1R protein expression in Hep3B ( A) and L-02 ( B) cells after sur-IGF1R-miR30 infection as detected by Western blotting analysis

1: Sur-IGF1R-miR30; 2: sur-IGF1R; 3: pPRIME

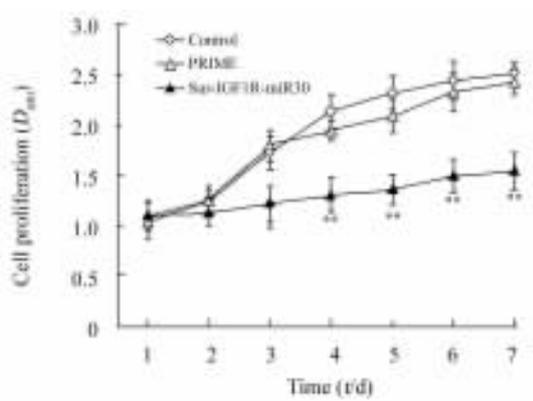


图7 Sur-IGF1R-miR30 感染抑制 Hep3B 细胞的增殖  
Fig.7 Sur-IGF1R-miR30 infection inhibited proliferation of Hep3B cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control or PRIME

### 3 讨论

肿瘤基因治疗中治疗基因能否在体内被有效的导入特定的肿瘤细胞,实现靶向高效表达是肿瘤基因治疗的关键所在,也是当前基因治疗研究领域的热点。选择具有较好靶向性的转移载体则成为肿瘤基因治疗基础研究中的一个焦点。本研究选用慢病毒作为载体,慢病毒载体具有以下优点:(1)长时间表达外源基因;(2)容量大;(3)感染细胞种类多而且高效(可以感染体内、体外分裂细胞与非分裂细胞);(4)滴度高;(5)低免疫原性。I 期临床表明以重组慢病毒为转基因载体,不但转入基因在人体内能有效表达,而且未见野生型慢病毒,十分安全<sup>[49]</sup>。

shRNA 目前是分子生物学的热点,利用载体表达的 shRNA 在疾病的治疗研究中意义更为重要<sup>[10-14]</sup>,但载体表达 shRNA 的效率直接影响 shRNA 的干扰效率。常用的 pol III 表达载体在 shRNA 的表达水平、处理效率方面还不是十分有效,而 miR30 天然表达的效率较高,同时其前体的处理机制也比较清楚。本实验所采用的重组慢病毒 pPRIME 慢病毒是在 miRNA( miR30)主要结构上建立起来的 RNAi 载体系统,对细胞和动物进行基因功能研究、基因治疗的有用工具<sup>[15]</sup>。

在 miR30 骨架基础上构建的干扰载体比目前通常用的 RNAi 载体更接近生理情况,可以更有效地发挥其干扰效应。实验中发现,目标基因 IGF1R 在蛋白和 mRNA 水平上明显下降。

治疗基因被导入体内后,能否在肿瘤细胞内特异、有效的表达,确保基因治疗的安全有效,是肿瘤基因治疗尚需解决核心问题之一。利用肿瘤组织和细胞特异性启动子调控目的基因表达使治疗基因靶向肿瘤细胞,实现治疗基因靶向表达的又一策略。恶性肿瘤特异表达基因启动子调控目的基因进行肿瘤治疗研究是目前常用的方法(如癌胚抗原基因启动子、端粒酶基因启动子等),但由于其均为弱启动子,目前没有见到应用于临床的报道。因此,探索应用新的肿瘤特异性启动子对肿瘤的基因治疗具有重要意义。

survivin 是近年来发现的一种具有肿瘤特异性表达的细胞凋亡抑制因子。survivin 基因在多种肿瘤细胞中高表达,而在正常细胞中不表达。因此,survivin 启动子可能成为一种肿瘤靶向、高效启动子,这使 survivin 启动子的研究更加成为热点<sup>[1-2,16]</sup>。

靶基因的选择是基因治疗的又一个关键点,胰岛素样生长因子1受体是IGF1发挥生物学效应的重要环节,研究表明了IGF1R在恶性转化中的重要作用:IGF1R在多数肿瘤及肿瘤细胞株中显著过表达,IGF1R基因敲除的胎鼠中建立的成纤维细胞系不能被一些常见癌基因中的任何一种转化,而重新介入有功能的受体,会使其对癌基因的恶性转化作用敏感。IGF1R的转化作用除了它的促有丝分裂作用外,很大程度依赖于其抗凋亡作用。实验<sup>[15]</sup>显示在将成纤维细胞置于大鼠皮下生物扩散时,细胞逐渐凋亡,而过表达IGF1R的成纤维细胞生存时间显著延长。研究<sup>[15]</sup>还表明IGF1R的数量水平在细胞生存中起着决定性作用,只有达到某一水平,才能将细胞由不进行有丝分裂的模式转化为有丝分裂模式。

IGF1R在恶性转化上有重要作用,以IGF1R为靶的治疗应当很有前景。利用RNAi技术降低IGF1R的表达,控制肝癌细胞的生长,将会给肝癌治疗提供可靠的手段。本课题组通过将针对IGF1R基因的RNA干扰片段装入特定质粒中,再感染入人肝癌细胞株中,虽然作用时间有所延长,但维持时间有限<sup>[17-18]</sup>。

这些研究表明针对IGF1R基因的RNA干扰有望用于肿瘤治疗,需要更有效的载体,本实验中运用慢病毒就是一种有意义的探索。本研究成功构建survivin启动子替换慢病毒PRIME的CMV启动子,经PCR、测序鉴定证实survivin启动子调控靶向IGF1R基因shRNA慢病毒构建成功。本研究所采用的方法有一定独到之处,IGF1R的siRNA基因插入miR-30侧翼骨架中,确保siRNA表达效率高且稳定,而siRNA基因的转录由肿瘤特异性II型启动子survivin控制,确保siRNA基因在肿瘤细胞内特异表达。其目的是对肝癌Hep3B细胞和胎肝L-02细胞进行体外研究,结果发现,sur-IGF1R-miR30对体外Hep3B细胞有明显的抑制作用,且有较高的专一性,有望在肝癌基因治疗中提高安全性、特异性以及降低毒副作用等方面提供新思路。本研究所改造的shRNA表达载体,无论在基础研究还是应用研究中都具有重要的理论意义和应用价值。

## [参考文献]

- [1] Jang J, Kim K, Kang K, Choi J, Lee W, Kim C, et al. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer [J]. Lung Cancer, 2008, 60(1): 31-39.
- [2] Borbély A, Murvai M, Szarka K, Kónya J, Gergely L, Hernádi

- Z, et al. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis [J]. J Clin Pathol, 2007, 60(3): 303-306.
- [4] Camirand A, Lu Y, Pollak M. Co-targeting HER2/ErbB2 and insulin-like growth factor-1 receptors causes synergistic inhibition of growth in HER2overexpressing breast cancer cells [J]. Med Sci Monit, 2002, 8(12): 521-526.
- [5] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. Gene Ther, 2006, 13(6): 553-558.
- [6] Kock N, Kasmieh R, Weissleder R, Shah K. Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL [J]. Neoplasia, 2007, 9(5): 435-442.
- [7] Ross TM, Mahmood K, Crevar CJ, Schneider-Ohrum K, Heaton PM, Bright RA. Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge [J]. Vaccine, 2009, 27(4): 530-541.
- [8] Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslami C, et al. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2007, 104(6): 1771-1776.
- [9] Baba K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, et al. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector mediated RNA interference in feline cell lines [J]. J Vet Med Sci, 2008, 70(8): 777-783.
- [10] Pan M, Wei QJ, Cao F, Lu YJ, Zhu YZ, Shu YQ, et al. Inhibition of cell proliferation by siRNA targeting hPRLR in breast cancer MCF-7 cell line [J]. JNMU, 2007, 21(6): 372-376.
- [11] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3): 184-204.
- [12] Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research [J]. Future Oncol, 2007, 3(6): 655-664.
- [13] 牛 坚, 李向农, 韩泽广. 运用siRNA建立稳定低表达IGF1R基因的肝癌细胞株的实验研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2007, 11(6): 679-684.
- [14] 黄 欣, 陈 思, 李杨秋, 杨力建, 陈少华. RNA干扰下调bcl11b基因表达对Molt-4细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(3): 247-250.
- [15] Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation [J]. Oncogene, 2006, 25(46): 6156-6162.
- [16] 董俊红, 王振非, 付新华, 王守训, 黄焕生. RNAi沉默survivin表达对A549细胞凋亡及紫杉醇敏感性的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(3): 266-268.
- [17] Varo M, Baserga R. Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factors receptor [J]. Endocrinology, 2001, 142(9): 1073-1081.
- [18] 牛 坚, 钱海鑫, 黄 健, 韩泽广. RNA干扰胰岛素样生长因子1类受体的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(7): 872-873.

[收稿日期] 2009-03-23

[修回日期] 2010-04-28

[本文编辑] 韩 丹