

靶向 survivin siRNA 与 5-Fu 协同抑制 MCF-7 细胞增殖

薛兴欢,张淑群,姜建涛,王西京,薛锋杰,刘晓旭

Synergistic Inhibitory Effect of survivin siRNA in Combination with 5-Fu on Inhibiting Proliferation of MCF-7 Cells

XUE Xin-huan, ZHANG Shu-qun, JIANG Jian-tao, WANG Xi-jing, XUE Feng-jie, LIU Xiao-xu

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of the small interfering RNA (siRNA) targeted to survivin in combination with 5-Fu on inhibition the of MCF-7 cells proliferation. **Methods** A siRNA targeted to survivin was synthesized. siRNA was transfected into MCF-7 by lipofectin. Cell growth activity was evaluated by MTT assay. SAS software and Jin Zhenjun Method were used to evaluate the combination effects of siRNA and 5-Fu. **Results** Combination treatment with 5 nmol/L siRNA reduced the IC_{50} of 5-Fu from 4.42 $\mu\text{g/ml}$ to 1.18 $\mu\text{g/ml}$; the inhibitory of combination treatment on MCF-7 cells was higher than that of 5-Fu alone ($F=26.74, P<0.01$). And synergism ($Q=1.15$) was observed at the lower concentration of 5-Fu with combination of siRNA. **Conclusion** siRNA may enhance the effectiveness of 5-Fu on inhibiting the proliferation of MCF-7 cells.

Key words: RNA interfer; Chemotherapy; Combination therapy; MCF-7

摘要: **目的** 研究以 survivin 为靶标的小干扰 RNA (siRNA) 与化疗药 5-Fu 联合应用抑制 MCF-7 细胞增殖的作用。 **方法** 以脂质体为载体, 将 survivin siRNA 转染至 MCF-7 细胞中, 用四氮唑盐 (MTT) 法染色并计算 siRNA 联用 5-Fu 对 MCF-7 细胞的抑制率, 用 SAS 统计软件及金正均 Q 值法进行统计分析。 **结果** 单用 5-Fu, IC_{50} 为 4.42 $\mu\text{g/ml}$; 加入 5 nmol/L siRNA 后, IC_{50} 降为 1.18 $\mu\text{g/ml}$; siRNA 与 5-Fu 联用的抑制作用较单用 5-Fu 强 ($F=26.74, P<0.01$); Q 值分析表明 survivin siRNA 与中低浓度的 5-Fu 联用, 有较好的协同作用 ($Q=1.15$)。 **结论** survivin siRNA 与 5-Fu 联用, 可显著增强对 MCF-7 细胞增殖的抑制, 提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

关键词: RNA 干扰; 化学疗法; 联合治疗; MCF-7

中图分类号: R73-36⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)04-0255-03

0 引言

目前化疗存在两个主要缺点, 一是化疗药物对正常细胞的毒性, 二是肿瘤细胞对化疗药物的耐药性。本研究通过 RNA 干扰技术靶向抑制调节细胞凋亡的 survivin 基因的表达, 旨在研究 survivin siRNA 诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡和提高其对常用抗肿瘤药物敏感性的作用, 探讨 survivin 基因用于肿瘤基因治疗的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

收稿日期: 2007-05-15; 修回日期: 2007-09-19
基金项目: 陕西省科技公关资助项目 (2006k09-C9; 2007 K09-06(4)); 国家自然科学基金资助项目 (30500600)
作者单位: 710004 西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤科
作者简介: 薛兴欢 (1961-), 男, 学士, 副教授, 主要从事乳腺癌分子生物学诊断和治疗

LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司, 四氮唑盐 (MTS) 购自美国 Promega 公司, 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 购自天津人民制药厂 (生产批号: 0204242)。

1.2 细胞培养

MCF-7 细胞组织来源为人乳腺癌, 上皮样贴壁生长, 购于北京大学医学部分子生物中心。3 天左右传代一次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 新鲜配制含 10% 胎牛血清的 PRMF1640 培养基在 37^oC、5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养。

1.3 survivin siRNA 的制备

根据 Elbashir 等^[1]确定的 siRNA 的特点, 利用 T₇ RNA 聚合酶体外转录合成 siRNA 的方法^[2], 筛选出了一条 RNA 干扰 survivin 基因的靶序列。这条序列通过计算机经 BLAST 检索证明与 survivin 以外的人类基因无同源性。

```

survivin Target mRNA 5 GTCTGGCGTAA GATGATGG 3
siRNA 5 GUCUGGCGUAA GAUGAUGGUU 3 Sense strand
3 UUCAGACC GCAUUCUACUACC 5 Antisense strand

```

1.4 联合用药体外抗肿瘤活性测定

在 96 孔细胞培养板中,每孔加入含 4×10^3 个 MCF-7 细胞的 100 μ l 培养液,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养 24 h。在无血清无双抗状态下,用脂质体 Lipofectin™2000,按其说明书进行 siRNA 的转染,siRNA 的最终浓度为 5 nM。转染 6 h 后,换含不同浓度 5-Fu 的培养液 100 μ l。化疗药物 5-Fu 取其 IC₅₀ 上下的 5 个浓度(IC₅₀为 5-Fu 对经脂质体处理后的 MCF-7 细胞的半数致死剂量)(5-Fu:1.25、2.5、5、10、20 μ g/ml)分别与 siRNA 相组合,每种浓度组合重复 4 孔,以单用 siRNA 及单用 5-Fu(预先经脂质体处理)作为单药对照组,以经脂质体处理后不加药组作为空白对照。继续培养 48 h 后,每孔加 20 μ l MTS,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱 90 min 后,用多功能酶标仪测定吸光度 A_{490nm},并计算细胞增殖抑制率 I。

$$I\% = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.5 统计学方法

采用 SAS 统计软件进行析因分析。

1.6 协同作用分析方法

评价联合用药对肿瘤细胞的抑制是否有协同作用,参照文献^[3,4]以金正均 Q 值法判断: $Q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$,其中 E_{a+b}为合并用药的抑制率,E_a和 E_b分别为 A 药和 B 药单独用药的抑制率。式中分子代表“实测合并效应”,分母是“期望合并效应”,Q 是两者之比。Q < 0.85 为拮抗,0.85 < Q < 1.15 为相加,Q > 1.15 为协同。

2 结果

2.1 联合用药对 MCF-7 细胞增殖的抑制

图 1 表明,单用 5-Fu,IC₅₀为 4.42 μ g/ml;加入 5 nmol/L siRNA 后,IC₅₀降为 1.18 μ g/ml。上述结果说明在化疗药物中加入 survivin siRNA 后,药物对 MCF-7 的抑制效果均有明显增加,并且可以看出随着化疗药物浓度的增加,抑制率增高的趋势均逐渐变缓。

2.2 对化疗药物 5-Fu 与 siRNA 联用进行析因设计的方差分析

采用 SAS 统计软件对以上数据进行分析,siRNA + 5-Fu 的 F 值为 26.74, P 值均 < 0.01。

2.3 survivin siRNA 与化疗药物 5-Fu 之间的交互作用分析

采用药理学上较为经典的方法即金正均 Q 值法^[3,4]分析两药之间的交互作用。由表 1 中 Q 值可以看出,在 5-Fu 为低浓度时,与 siRNA 联合用药均可得到较好的协同作用(Q > 1.15),升高 5-Fu 浓度后,协同作用下降,直至转为相加作用,但没有出现拮抗作用。

表 1 siRNA 与 5-Fu 联合用药对 MCF-7 细胞抑制率的协同性观察

Tab 1 The interaction of survivin siRNA and 5-Fu on inhibiting the proliferation of MCF-7 cells

Group	5-Fu Concentration (μ g/ml)	Inhibition rate (%)	Q
siRNA Treatment		40.8	
5-Fu Treatment	1.25	10.8	
	2.5	30.4	
	5	53.6	
	10	57.2	
	20	58.6	
siRNA + 5-Fu Treatment	1.25	56.7	1.2
	2.5	67.8	1.153
	5	70.2	0.968
	10	72.2	0.966
	20	74	0.981

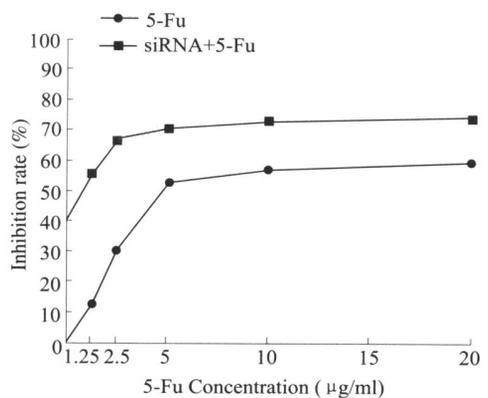


图 1 5-Fu 与 siRNA 联用及单用对 MCF-7 细胞的抑制率

Fig 1 Inhibition of 5-Fu alone and combination with survivin siRNA on the proliferation of MCF-7 cells

3 讨论

乳腺癌的发生发展是一个多步骤、多因素的复杂过程。在此过程中,凋亡抑制基因 survivin 通过抑制凋亡蛋白酶,干扰细胞周期,使已转化的细胞进行异常有丝分裂,导致乳腺上皮细胞的永生化和癌变。研究表明乳腺癌组织中 survivin 的表达率可达

72.3%^[5]。而 RNA 干扰 (RNAi) 是通过人为引入与内源靶基因具有相同序列的双链 RNA, 诱导内源靶基因的 mRNA 降解, 阻止基因表达, 达到基因治疗的目的^[6,7]。

3.1 survivin siRNA 与乳腺癌细胞 MCF-7 对 5-Fu 的敏感性

5-Fu 是影响核酸生物合成的药物, 是抗代谢药物之一。这类药物模拟正常代谢物质, 如叶酸、嘌呤碱、嘧啶碱等的化学结构, 在细胞周期 S 期与有关代谢物质发生特异性的拮抗作用, 从而干扰核酸, 尤其是 DNA 的生物合成, 阻止癌细胞的分裂繁殖 5-Fu 对多种肿瘤有效, 特别是对消化道癌症和乳腺癌疗效较好。

我们在实验中用 survivin siRNA 转染人乳腺癌细胞, 以 IC_{50} (50% inhibition concentration) 来表示乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性。 IC_{50} 越小, 表示肿瘤细胞对化疗药物的敏感性越大; 反之则表示敏感性越小。结果, siRNA 转染细胞的 IC_{50} 明显降低, 对 5-Fu 的敏感性增加。用 SAS 统计软件分析联合用药后药物对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用, 表明 5-Fu 与 survivin siRNA 之间的交互作用对结果起到了极显著的影响 ($P < 0.001$)。其中, 低剂量的 5-Fu ($< 5 \mu\text{g/ml}$) 不同程度地与 siRNA 有协同作用 ($Q = 1.15$)。随着化疗药物浓度的增加, 协同作用降低, 但在所取浓度范围内都没有出现拮抗作用。提示化疗药物与 survivin siRNA 联合用药, 可作用于细胞周期的不同环节, 降低细胞凋亡的阈值 (threshold), 抑制肿瘤细胞增殖, 促使肿瘤细胞凋亡增加, 确实可以提高药物敏感性, 降低化疗药物的剂量。

3.2 survivin siRNA 与常规化疗药耐药性和毒性

研究发现胰腺癌细胞经 X 线照射后, survivin mRNA 表达逐步升高, X 线治疗后, survivin 高表达的肿瘤细胞克隆形成率明显高于 survivin 弱表达的肿瘤细胞, 可见, 恶性细胞通过表达高水平 survivin, 可在化学治疗或放射治疗等细胞毒性状况下生存, 从而获得化学抵抗^[8]。在对食管癌化学治疗敏感性的研究中, 对治疗部分反应的病人 survivin mRNA 水平明显低于对治疗无效和进展期病人^[9]。Ikeguchi 等^[10]用顺铂治疗后, 胃癌细胞 survivin mRNA 和蛋白表达水平升高, 治疗后 48 h, mRNA 水平比未治疗细胞升高 2 ~ 6 倍, 治疗后 24 h 蛋白水平比未治疗升高 3 ~ 6.5 倍, 提示 survivin 可能介导了细胞对顺铂治疗的抵抗。上述研究都提示了

survivin 在恶性细胞对放、化疗抵抗中起重要作用。这可能由于 survivin 既调节凋亡, 又控制有丝分裂, 维持肿瘤细胞生存。在细胞分裂中, survivin 控制微管稳定性, 装配正常的有丝分裂纺锤体, 其过表达有助于细胞逃逸化学治疗和放射治疗诱导的 G_2/M 期凋亡检查点, 促进肿瘤细胞对放、化疗的抵抗作用, 而 siRNA 转染能封闭 survivin 的表达, 在一定程度上使细胞耐药逆转。

可见, survivin siRNA 与小剂量化疗药物 5-Fu 联用既可以提高疗效, 还可以降低抗癌药物使用剂量, 这将有助于克服单用化疗药所引起的毒副作用大的缺点, 并有助于解决单用 siRNA 治疗难以完全抑制肿瘤的生长且成本较高等问题。另外, survivin 蛋白表达所引起的乳腺癌细胞凋亡机制的缺陷, 在一定程度上参与了乳腺癌细胞对化疗药物耐药性的产生。对于癌症晚期及不适于手术治疗的癌症病人, siRNA 和化疗药物联用有其独特的优势和光明的前景, 值得在相互作用的分子机制方面进行深入研究。

参考文献:

- [1] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplex of 21-23 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836):494-498.
- [2] 张淑群, 杜清友, 杨英, 等. Polymerase synthesis and potential interference of a small interfering RNA targeting hPimr-2[J]. World Journal of Gastroenterology, 2004, 10(18):2657-2660.
- [3] 戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. 中国药理学通报, 1980, 14(5):479-480.
- [4] 金正均. 合并用药中的相加[J]. 中国药理学报, 1980, 1(1):70-76.
- [5] 张淑群, 强水云, 杨文彬, 等. survivin 蛋白在乳腺癌发生、发展不同阶段的表达及意义[J]. 癌症, 2004, 23(6):697-700.
- [6] Sohail M, Doran G, Riedemann J, et al. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(7):e38-42.
- [7] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)[J]. Oncogene, 2002, 21(37):5716-5724.
- [8] Asanuma K, Moriai R, Yajima T, et al. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer [J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(11):1204-1209.
- [9] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy[J]. Int J Cancer, 2001, 95(2):92-95.
- [10] Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment[J]. Apoptosis, 2002, 7(1):23-26.

[编辑:贺文;校对:安凤]