

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0125-04

靶向 survivin 的 siRNA 对骨肉瘤细胞 MG63 的抑制作用

杨彤涛,李存孝,高杰,黄立军,张勇,周勇,范清宇,马保安*(第四军医大学唐都医院全军骨科中心,西安 710038)

[摘要] 目的:探讨针对人 survivin 基因的 siRNA 对骨肉瘤细胞 MG63 的体内外抑制作用。方法:合成 survivin 基因的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)特异性片段,构建 survivin 特异性的 RNA 干扰载体 pSiS,转染 MG63 细胞,G418 筛选稳定转染的细胞系。细胞计数检测细胞生长情况;Western blotting 检测细胞中 survivin 蛋白表达的变化;通过 Annexin V 法染色和流式细胞术检测细胞凋亡;观察裸鼠皮下 MG63 移植瘤的形成。结果:成功构建了 survivin 基因 siRNA 真核表达载体 pSiS,获得了稳定转染的细胞 MG63/pSiS。与 MG63、MG63/pSi(空质粒对照细胞)相比,MG63/pSiS 细胞生长曲线十分平缓,差异有统计学意义($P < 0.01$);Western blotting 显示,MG63/pSiS 细胞中 survivin 蛋白表达减少,细胞凋亡率增加($P < 0.01$)。MG63/pSiS 移植瘤形成明显受到抑制。结论:Survivin 特异性 siRNA 可明显促进骨肉瘤细胞 MG63 的凋亡,抑制该肿瘤细胞体外生长和体内移植成瘤。

[关键词] 骨肉瘤;survivin;RNA 干扰;凋亡;抗肿瘤

[中图分类号] R738.1; R730.54 **[文献标志码]** A

Survivin-targeted siRNA inhibits proliferation of human osteosarcoma cell line MG63 *in vitro* and *in vivo*

YANG Tong-tao, LI Cun-xiao, GAO Jie, HUANG Li-jun, ZHANG Yong, ZHOU Yong, FAN Qing-yu, MA Bao-an (Department of Orthopedics, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effect of survivin-targeted siRNA on human osteosarcoma cell line MG63 *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** According to the survivin cDNA sequence, the specific RNA interference (RNAi) fragments were designed and synthesized, which were then cloned into pSilencer 3.0-H1 neo plasmid vector to construct pSiS vector. MG63 cells were transfected with RNAi vectors and negative control vector separately; the stably transfected cell strains were selected by G418; and cell growth was assessed by cell counting. Expression of survivin protein was investigated by Western blotting. Apoptosis analysis was examined by Annexin V method. Tumorigenesis assay was conducted in nude mice. **Results:** The specific survivin-targeted siRNA eukaryotic vector pSiS was successfully constructed, and transfectants were obtained. Compared with blank vector-transfected cells and un-transfected cells, MG63/pSiS cells had a slow growth ($P < 0.01$). Expression of survivin protein was significantly inhibited in MG63/pSiS cells, which had an increased apoptotic rate ($P < 0.01$). The tumorigenesis of transplanted MG63/pSiS was greatly inhibited. **Conclusion:** Survivin-targeted siRNA can promote the apoptosis of MG63 cells, and inhibit the *in vitro* growth and *in vivo* tumor formation in nude mice.

[Key words] osteosarcoma; survivin; RNA interference; apoptosis; antitumor

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2): 125-128]

骨肉瘤是人类常见的原发性恶性骨肿瘤,多见于 20~30 岁的年轻人。由于此类肿瘤进展迅速,病情严重,常危及患者生命。尽管近 30 年来随着基础医学与临床医学发展,骨肉瘤的诊断、治疗水平有了很大的提高,但骨肉瘤保肢治疗效果远未达到令人满意的程度。20 世纪 90 年代基因治疗的兴起,开辟了肿瘤治疗的新途径。10 多年来,已有多种基因治疗方案得到初步应用,同时研究人员仍在不断找

寻新的治疗基因^[1]。

Survivin 是 1997 年发现的一个凋亡抑制基因,属于 IAP 家族。它表达于几乎所有人类肿瘤组织

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30471988)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471988)

[作者简介] 杨彤涛(1970-),男,河北省保定市人,副教授,博士,主要从事骨肿瘤的外科治疗和生物治疗研究。yangtt@fmmu.edu.cn

* Corresponding author. E-mail: maban@fmmu.edu.cn

中,但极少见于正常组织,具有抑制肿瘤凋亡、通过调节细胞周期促进肿瘤快速增殖、促进实体瘤血管形成的突出特点,因而很快成为肿瘤诊断与治疗的靶点^[2],目前国内外已有成功的实验性治疗肿瘤的报道^[3,4]。Survivin 在骨肉瘤组织中也有表达,提示可能参与肿瘤的恶性生物学行为。本研究应用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,构建了针对 survivin 的 RNA 干扰载体,转染人骨肉瘤细胞 MG63,观察该细胞 survivin 表达变化,进一步探讨 survivin siRNA 对骨肉瘤细胞体内外的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

人骨肉瘤 MG63 细胞系、大肠杆菌 DH5 α 菌种为本室保存。DMEM 培养基、TRIZOL 试剂、脂质体 LipofectAmineTM2000、G418、T4 DNA 连接酶、新生小牛血清均购自 Invitrogen 公司。山羊抗人 survivin 多抗、辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG 购自 Santa cruz 公司。BCA Protein Assay Kit、Supersignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate 购自 Pierce 公司。DNA 合成与测序由上海生工生物工程公司完成。RNAi 载体 pSilencer 3.0-H1 neo 购自美国 Ambion 公司,具备氨苄青霉素和新霉素抗性,可用 G418 筛选。BALB/c 裸鼠(4~6 周龄,体重 16~20 g)购自上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物合格证号为 SCXK(沪)2003-0003]。

1.2 Survivin RNA 干扰特异性片段的合成

根据文献[4]报道的人 survivin 编码区 cDNA 的序列(survivin cDNA:5'-GGACCACCGCATCTCTACA-3')和载体设计的具体要求,设计 survivin 特异的 RNA 干扰片段:正义链:5'-GATCCCCGGAC CACCGCATCTCTACATTC AAGAGAACATCTCTACGC CACCAGGTTTTTGGAAA-3';反义链:5'-AGCTTT TCCAAAAGGACCACCGCATCTCTACATCTCTTGAA ACATCTCTACGCCACCAGGGG-3'片段。两端有 BamH I 和 Hind III 酶切位点(均为酶切后的黏端),由上海生工生物工程公司合成。

1.3 Survivin RNAi 载体 pSiS 的构建

合成好的两条 survivin RNAi 片段溶解于 TE 中。正义链和反义链溶液(终质量浓度 1 μ g/L)各取 2 μ l,与 46 μ l 退火缓冲液(pSilencer neo siRNA Expression Vector kit 附带)混匀。100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,自然冷却至 37 $^{\circ}$ C,维持该温度 1 h。自然冷却至 4 $^{\circ}$ C,-20 $^{\circ}$ C 保存。将退火后的正义链与反义链取 5 μ l 以 TE 稀释 10 倍,各取 1 μ l,分别与已经

BamH I 和 Hind III 酶切线性化的 pSilencer 3.0-H1 neo 载体 1 μ l 在 T4 DNA 连接酶的作用下,14 $^{\circ}$ C 连接 16 h,常规方法转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞。含氨苄青霉素的 LB 培养基平皿上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑选单菌落接种于 3 ml LB 培养基(含 1 mg/ml 氨苄青霉素)的试管中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。留取菌种收取重组质粒,测序。测序正确的重组质粒命名为 pSiS。

1.4 细胞转染与筛选

以测序正确的重组质粒 pSiS 在 24 孔板中转染 MG63 细胞(按 LipofectAMINETM2000 脂质体说明书进行操作)。之后加入 G418 溶液,使终质量浓度达到 1 000 mg/ml,隔天换液,至筛选成功,转染重组质粒细胞命名为 MG63/pSiS。以 pSilencer neo siRNA Expression Vector kit 中附带的空质粒为阴性对照(载体内插入的片段为与人、鼠、兔的已知序列完全不相关的序列,缩写为 pSi),pSi 转染后以 G418 筛选,获取的空质粒对照细胞命名为 MG63/pSi。

1.5 镜下计数检测 pSiS 转染对骨肉瘤细胞生长的抑制

将 MG63/pSiS、MG63/pSi 及 MG63 细胞分别按 0.5×10^5 /孔的密度分批接种至 6 孔板中培养,每组平行设 3 孔,分别于 1、3、5、7 d 消化,细胞重悬于少量培养液中,显微镜下以血球计数板计数。绘制细胞生长曲线。

1.6 Western blotting 检测 pSiS 转染后 MG63 细胞 survivin 蛋白的表达

将 MG63、MG63/pSiS 与 MG63/pSi 细胞培养至 80% 铺底,离心。加入 RIPA 细胞裂解液,裂解细胞收集蛋白。按照 BCA Protein Assay Kit 说明书操作,制备标准品梯度稀释液,将样品稀释,与 BCA 工作液混合,酶标仪蛋白定量。裂解细胞蛋白样品各取 100 μ g,15% SDS-PAGE 电泳后,转膜。室温封闭 2 h。将羊抗人 survivin 抗体用 TTBS 按 1:1 000 稀释,膜置于一抗中室温缓摇 1 h。用 200 ml TTBS 洗膜,37 $^{\circ}$ C、15 min \times 4 次。将辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊 IgG 用 TTBS 按 1:10 000 稀释,膜置于二抗中室温缓摇 1 h。200 ml TTBS 洗膜,37 $^{\circ}$ C、15 min \times 6 次。用 TBS 洗膜 15 min,去除 Tween-100。按 Supersignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate 说明配置发光工作液,暗室中曝光底片。同时进行 β -actin 检测(鼠抗人 β -actin 1:2 000 稀释,HRP 标记兔抗鼠 IgG 1:10 000 稀释)作为内参照。

1.7 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡

消化收集各实验组细胞,PBS 重悬。按 Annexin

V 试剂盒说明进行操作,流式细胞仪进行检测。

1.8 制备移植瘤观察 pSiS 转染对移植成瘤的影响

选取 4~6 周龄裸鼠(体重 16~20 g)共 20 只,于右侧后肢上部皮下分别接种 2×10^6 个 MG63/pSiS 与 MG63/pSi 细胞,定期观察成瘤情况。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Survivin RNAi 载体的构建及稳定转染细胞株的筛选

正义链和反义链的 DNA 片段退火成功后,与载体相连,转化的 DH5 α 感受态,在平皿中形成约 20 个单克隆,挑取 2 个菌落,测序证明插入片段为设计片段 pSiS。pSi、pSiS 分别转染细胞后,以 G418 筛选之初细胞生长缓慢且半数以上死亡。约 2 周后 MG63/pSi 生长逐渐增快,约 3 周生长稳定;而 MG63/PsiS 生长则较为缓慢,约 7 周才铺满瓶底。

2.2 Survivin siRNA 对骨肉瘤细胞生长的影响

MG63/pSi 和 MG63 细胞均为短梭形,细胞数量少时此特征尤为明显。MG63/pSiS 生长十分缓慢,部分细胞大而扁平,失去短梭形的特点。MG63、MG63/pSi 细胞 7 d 时细胞数可达到 $(8 \pm 0.45) \times 10^5$ (7.8 ± 0.52) $\times 10^5$ 。而 MG63/pSiS 生长曲线则十分平缓,7 d 时细胞数为 $(2.4 \pm 0.57) \times 10^5$,与其余两对照组的差异有统计学意义(图 1, $P < 0.01$)。

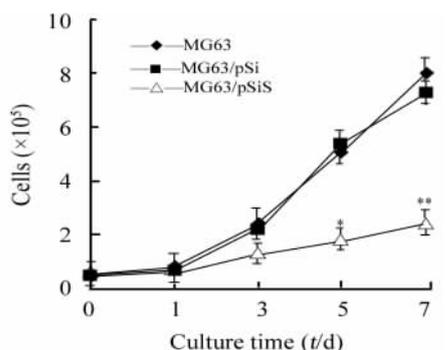


图 1 survivin siRNA 转染对 MG63 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of survivin-targeted siRNA on MG63 cell proliferation

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MG63 or MG63/pSi

2.3 Survivin siRNA 对 MG63 细胞 survivin 蛋白表达的抑制

MG63、MG63/pSi survivin 蛋白条带清晰并明显一致,MG63/pSiS 的 survivin 条带基本消失。结果表

明 survivin 蛋白的表达在 MG63/pSiS 细胞中受到明显抑制(图 2)。

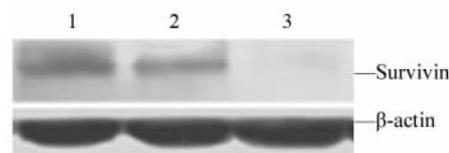


图 2 Survivin siRNA 转染对 MG63 细胞 survivin 蛋白表达的影响

Fig.2 Expression of survivin protein in MG63 cell after survivin-targeted siRNA transfection

1:MG63; 2: MG63/pSi; 3: MG63/pSiS

2.4 Survivin siRNA 对 MG63 细胞凋亡的影响

经流式细胞仪检测后发现,MG63/pSiS 细胞凋亡率达到 $(13.8 \pm 0.63)\%$,MG63/pSi 细胞凋亡率则为 $(2.33 \pm 0.54)\%$,MG63 细胞为 $(2.18 \pm 0.67)\%$;MG63/pSiS 与 MG63/pSi 和 MG63 的凋亡率比较,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 3)。

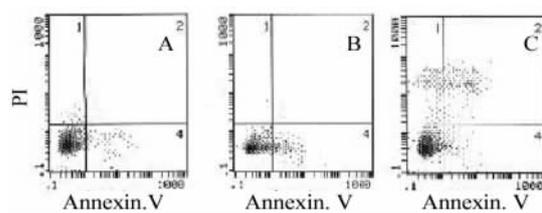


图 3 Survivin siRNA 转染对 MG63 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of survivin-targeted siRNA on MG63 cell apoptosis after transfection

A: MG63 cells; B: MG63/pSi cells; C: MG63/pSiS cells

2.5 Survivin siRNA 对骨肉瘤 MG63 细胞裸鼠移植成瘤的影响

MG63/pSi 和 MG63/pSiS 细胞分别接种 10 只裸鼠,MG63/pSi 细胞全部成瘤,4 周后,MG63/pSi 组的瘤体积为 $(870 \pm 31) \text{ mm}^3$;而 MG63/pSiS 细胞仅有 1 只裸鼠成瘤,瘤体直径仅约 1.5 mm。

3 讨论

2001 年,RNA 干涉成功用于哺乳动物细胞。在肿瘤的实验性治疗中,RNAi 可抑制癌基因的表达、敲除点突变激活的癌基因、抑制基因扩增或抑制融合基因表达、抑制其他肿瘤相关基因的表达^[5]。目前,应用的 siRNA 有两类:体外合成 RNA 干涉片段和 DNA 干涉载体。前者缺陷在于转染效率以及 RNAi 作用的瞬时性。后来发展了 DNA 载体在细胞

内表达 siRNA 的技术^[6,9]。本实验使用的 pSilencer 3.0-H1 neo 含有 H1 或 U6 启动子载体并带有新霉素抗性,便于细胞内转录 siRNA 和筛选稳定干涉后的细胞^[5,7]。

Kappler 等^[4]报道,人工合成的 siRNA 在 5 种人软组织肉瘤细胞中抑制 survivin mRNA 达 73% ~ 88%,抑制 survivin 蛋白达 52% ~ 81%。本研究构建了针对 survivin 的 siRNA 真核载体,转染骨肉瘤细胞 MG63,转染后细胞 survivin 蛋白表达基本消失。

本研究采用 Annexin V 法检测细胞凋亡,结果显示 MG63/pSiS 凋亡率明显高于对照组细胞($P < 0.01$)。从细胞群体生长速度观察, MG63/pSiS 细胞生长速度明显慢于两对照组细胞($P < 0.01$)。不难看出, MG63/pSiS 生长缓慢是由于其凋亡率增加所致。

Tamm 等^[10]发现 survivin 直接抑制效应因子 caspase3、7 引起细胞凋亡,而不影响 Fas、Bax 的表达。Shin 等^[11]将大肠杆菌表达的 survivin 蛋白与活化、非活化形式的 caspase 孵育,结果显示 survivin 只与活化的 caspase3、7 结合,说明 survivin 是直接作用在凋亡的效应阶段。本实验中, MG63/pSiS 的 survivin 表达得到抑制, survivin 的抗凋亡作用大大降低,从而使得细胞凋亡率大为增加。

移植瘤实验中, MG63/pSi 细胞接种 10 只裸鼠后全部成瘤,瘤体积达(870 ± 31) mm³,而 MG63/pSiS 细胞接种后仅 1 只裸鼠出现仅有 1.5 mm 直径的瘤块。单纯凋亡增加这一因素不会导致如此低的成瘤率,但联系到 survivin 还有调节细胞周期、参与血管形成等其他功能^[2],裸鼠移植瘤很低的成瘤率还是可以得到很好的解释。同时,其他研究^[12]也印证了这一点。将 survivin 显性负突变体 T34A 克隆到四环素诱导载体中,转染黑素瘤细胞 YUSAC-2 后移植于裸鼠皮下,3 周全部成瘤,瘤体积增长呈指数形式;撤去四环素,3 周后瘤体积减小 60%,表明抑制 survivin 表达还能阻止成瘤后的肿瘤生长。Tu 等^[13]对转染有 pcDNA3.0-AS 的胃癌移植瘤进行观察,不仅细胞自发凋亡增加,而且肿瘤内血管较少,腔也狭小。

综上所述,本研究证明了 survivin 特异性 RNAi 片段可通过下调骨肉瘤细胞 MG63 中 survivin 的表达,明显促进骨肉瘤细胞的凋亡,从而抑制该肿瘤细胞体内外的生长。应用 survivin RNAi 方法有可能成为基因治疗实体瘤的有效选择之一。

[参 考 文 献]

- [1] 李国东,蔡郑东,张寅权,等. 基因芯片对骨肉瘤发病相关基因的筛查[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(5):428-433.
- [2] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [3] 徐萍,崔大祥,潘碧峰,等. 树形分子递送 survivin 反义寡核苷酸对 HepG2 细胞的抑制效应[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007,14(5):411-416.
- [4] Kappler M, Bache M, Bartel F. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(3): 186-193.
- [5] Wall NR, Shi Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy[J]? Lancet, 2003, 362(9393):1401-1403.
- [6] Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) *in vivo*: strategies based on the direct application of siRNAs[J]. J Biotech, 2006, 124(1):12-25.
- [7] 管海涛,薛兴欢,王西京,等. 靶向 Survivin 的 siRNA 联合表阿霉素对乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的影响[J]. 四川大学学报:医学版,2006,37(2): 221-225.
- [8] 沈建军,刘家云,苏明权,等. 用 RNAi 沉默 survivin 基因表达对前列腺癌细胞系 PC3 的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006,13(1):37-41.
- [9] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, *et al.* Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA[J]. Cancer Letters, 2006, 232(2): 243-254.
- [10] Tamm I, Wang Y, Sausville E. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58(23): 5315-5320.
- [11] Shin S, Sung BJ, Cho YS. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4): 1117-1123.
- [12] Mesri M, Wall NR, Li J, *et al.* Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus[J]. J Clin Invest, 2001, 108(7): 981-990.
- [13] Tu SP, Jiang XH, Lin MC, *et al.* Suppression of survivin expression inhibits *in vivo* tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63(22): 7724-7732.

[收稿日期] 2007-11-08

[修回日期] 2008-02-23

[本文编辑] 韩丹