

生存素 siRNA 表达质粒对结肠癌细胞侵袭和增殖能力的抑制作用

尤振兵, 何敬东, 喻晓娟

siRNA Aiming at survivin Inhibit Invasive Ability and Proliferation of Colorectal Cancer Cell Line

YOU Zhen-bing, HE Jing-dong, Yu Xiao-juan

Department of Oncology, Huai'an First Hospital Affiliated of Nanjing Medical University, Huai'an 223300, China

Corresponding Author: HE Jing-dong, E-mail: hjddoctor@yahoo.com.cn

Abstract Objective To construct expression vectors of small RNA interference aimed at survivin gene and to explore effect of survivin siRNA gene on proliferation and invasive ability of SW480 cell line. Methods A survivin siRNA plasmid (pRNA T/sur-siRNA) was constructed using pRNA T U 6.1/ Neo vector. After pRNA T/sur-siRNA vectors were transduced into SW480 cell line 48 hours, the expression level of survivin mRNA and protein were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis, the effect of pRNA T/sur-siRNA vectors on SW480 cell line proliferation and invasive ability were evaluated by MTT assay and cell invasion experiment, respectively. Results survivin siRNA expression plasmid (pRNA T/sur-siRNA) was constructed successfully and pRNA T/sur-siRNA down-regulated expression level of survivin gene protein and mRNA dramatically in SW480 cell, 85%, 80% respectively. SW480 cell containing pRNA T/sur-siRNA vectors (sur-siRNA/SW480) was selected by G418 400 μg/L. MTT assay showed proliferation of sur-siRNA/SW480 cell was inhibited obviously (inhibition ratio was 37.4%), lower than proliferation of control group cell ($P < 0.01$). Cell invasion experiment showed that cell numbers of sur-siRNA/SW480, pRNA T/SW480 and SW480 cell, that penetrated membrane, were 153 ± 66, 505 ± 65 and 578 ± 98, penetration numbers of sur-siRNA/SW480 cell was reduced obviously, compare to control groups cell ($P < 0.01$). Conclusion The siRNA aimed at survivin gene could reduce the expression level of survivin gene protein and mRNA, and inhibit proliferation and invasive ability of SW480 cell line. The sequence of RNA interference against survivin may be a validity method to treat colorectal cancer.

Key words survivin; RNAi; Invasive ability; Colorectal cancer; Gene therapy

摘要 目的 构建针对生存素的小分子 RNA 干扰表达质粒, 研究 siRNA 表达质粒沉默生存素基因后对大肠癌细胞株 SW480 侵袭性和增殖性的影响。方法 用 pRNA T U 6.1/ Neo 载体构建生存素 siRNA 表达质粒 (pRNA T/sur-siRNA), 该质粒转染 SW480 细胞株 48 小时后, 用 Western blot 和半定量 RT-PCR 分析生存素蛋白和 mRNA 表达的变化。G418 400 μg/L 筛选出阳性克隆细胞株 (sur-siRNA/SW480), MTT 法检测 SW480 细胞体外增殖的变化; 细胞侵袭性实验研究 SW480 细胞的侵袭性变化。结果 成功地构建了 pRNA T/sur-siRNA 表达质粒, 并且该质粒明显下调 SW480 细胞生存素蛋白和 mRNA 的表达水平, 分别下调 85%, 80%。G418 400 μg/L 筛选出转染 pRNA T/sur-siRNA 的 SW480 细胞株 (sur-siRNA/SW480); sur-siRNA/SW480 细胞增殖受到显著抑制, 抑制率为 37.4% ($P < 0.01$); 细胞侵袭实验示 sur-siRNA/SW480 细胞的穿透数为 (153 ± 66) 个, 而对照组 pRNA T/SW480、SW480 细胞的穿透数为 (505 ± 65), (578 ± 98) 个细胞, sur-siRNA/SW480 细胞的穿透数与对照组相比显著减少 ($P < 0.01$)。结论 针对生存素 siRNA 可以显著降低生存素的表达, 抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭, 该生存素 siRNA 序列可能成为治疗结肠癌的一种有效手段。

收稿日期: 2007-06-06; 修回日期: 2007-07-17

基金项目: 江苏省卫生厅资助项目 (H200653); 淮安市科技局资助项目 (HAS06035)

作者单位: 223300 南京医科大学附属淮安第一医院

通讯作者: 何敬东, E-mail: hjddoctor@yahoo.com.cn

作者简介: 尤振兵 (1971-), 男, 本科, 主要从事消化道肿瘤的研究

关键词: 生存素; RNA 干扰; 细胞侵袭; 结肠癌

中图分类号: R735.3⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2008)07-0471-05

0 引言

survivin 选择性地在肿瘤组织中表达而在正常成熟组织中不表达,在结直肠癌高表达且与肿瘤发生、发展有关^[1]。其与细胞凋亡密切相关,但是有关它对结直肠癌增殖及侵袭能力的影响研究报道较少^[2,3]。本研究构建 survivin siRNA 表达质粒并转染 SW480 细胞,分析 survivin siRNA 表达质粒对 survivin 基因沉默的效率及其对结肠癌细胞株 SW480 细胞增殖及细胞侵袭能力的影响。为 RNA 干扰 survivin 基因治疗结直肠肿瘤提供新的、有效的 RNA 干扰序列。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

pRNAT-U6.1/Neo 载体(Gene script 公司),限制性内切酶 Hind 和 Bam H (Promega, 美国),含 survivin shRNA 序列的核苷酸由上海博亚生物有限公司合成, survivin 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology. Inc.), 细胞转染试剂 lipfection 2000 (Invitrogen life 公司), 总 RNA 提取试剂 Trizol LS Reagent (Gibco BRL 公司), 细胞蛋白提取试剂盒(碧云天生物公司)。PVDF 膜购自 Pall 公司。MTT 购自上海生物工程技术公司; RPMI1640 培养基购自 Sigma 公司; 结肠癌细胞株 SW480 由本实验室保种, SW480 细胞培养液含 100 ml/L 灭活的小牛血清、100 KU/L 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养液。Matrigel (BD PharMingen 公司), transwell (Millipore 公司)。其他为国产生化试剂。

1.2 pRNAT/sur-siRNA 表达质粒的构建

shRNA 序列由 GeneScript 提供软件 GeneScript s siRNA Target Finder and siRNA Construct Builder 并根据 Survivin 基因(NM_001168) 在线设计。shRNA 序列为 CCGCA TCTCTACA TTCAA GAA 起始位置为 100。 siRNA 插入片段为 76 bp, 序列见图 1:

两条核苷酸链稀释为 40 ng/μl, 按照 20 μl 反应体系: 1 μl 5'-3' 核苷酸、1 μl 3'-5' 核苷酸、1 μl 20 × SSC、17 μl H₂O; 按照下列反应体系退火, 95 °C × 10 min, 25 °C × 1 h, 产物。

siRNA 插入片段插入经 Hind 和 Bam H 酶切的 pRNAT-U6.1/Neo 载体, 抗生素筛选阳性克隆, 测序验证构建的 pRNAT/sur-siRNA 表达质粒。

1.3 细胞转染 按照 Lipofectamine2000 试剂说明书进行。用无血清培养基分别溶解 pRNAT/sur-siRNA 表达质粒和 pRNAT 空质粒, 将 Lipofectamine2000 与核苷酸混合于聚苯乙烯试管中, 室温下静置 30 min 后, 转染 SW480 细胞株。G418 400 g/L 筛选阳性克隆细胞株(含 pRNAT/sur-siRNA 表达质粒的 SW480 细胞)。

1.4 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达 用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 分光光度计检测各组细胞总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.90 ~ 1.96; 细胞总 RNA 经电泳分离后, 可见清晰的 28 s 及 18 s RNA 条带, 且 28 s RNA 亮度是 18 s 亮度的 1.5 ~ 2.0 倍。 RT-PCR 为两步法。逆转录总体系 20 μl, 其中细胞总 RNA 1 μg, 30 °C 10 min, 42 °C 30 min 合成第一条 cDNA 链, 99 °C 5 min 灭活 AMV 逆转录酶。 PCR 反应体系为 50 μl。 survivin 上游引物: 5'-TTCA TCCACTGCCCACT-3'; 下游引物: 5'-CCTTCCCTAA GACA TTGCTAA-3'。 PCR 反应条件: 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 32 个循环。

-actin 作为内参, 引物为 5'-CGT GCGT GACAT TAA GGA GA-3', 下游引物 5'-CACCT-TCACC GTTCCA GTTT-3', 片段为 233 bp。

1.5 Western blot 检测 survivin 蛋白的表达 用细胞裂解液提取细胞胞浆蛋白, 细胞裂解液主要成分为 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 以及 EDTA, EGTA, sodium pyrophosphate, -glycerophosphate, Na₃VO₄, leupeptin 等。在使用前数分钟内加入 PMSF 至最终浓度为 1 mM。根据 Bradford 蛋白定量法进行蛋白定量。取 20 μg 提取的蛋白质, 经 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 恒压 100 V 1 h 电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF) 印迹膜。BSA 封闭 1 h 后, 加入兔抗人 survivin 多克隆抗体(1:200 稀释) 为一抗, 在室温、摇床上结合 2 h; TBST 洗膜后再用羊抗兔 IgG(1:1000 稀释) 为二抗, TBST(TBS 中加入 0.05% Tween20) 洗膜, 用化学发光法显色。

1.6 MTT 法检测细胞增殖性

0.25% 胰蛋白酶消化处于对数生长期的 sur-siRNA/SW480 细胞、pRNAT/SW480 细胞、SW480 细胞后, 用 10% 小牛血清培养液制成单细胞悬液(5 × 10⁵ 个/ml), 接种于 96 孔培养板中(100 μl/孔), 培养 24 h 更换上清液为无血清培养液, 继续培养 48 h。每组各设 6 个孔, 在终止培养前 6 h 加入 MTT (5 mg/ml) 10 μl/孔, 结束培养时加入 20% SDS 100 μl/孔, 使结晶充分溶解, 次日用酶联免疫标记分析仪测定每孔 570 nm 波长的吸光度 A 值(A₅₇₀)。按下列公式计算细胞生长抑制率: 细胞生长抑制率 R = [1 - (A 实验组 / A 空白组)] × 100%。

1.7 细胞侵袭实验

细胞体外侵袭能力的测定在 12 孔板 Transwell 小室中进行。Matrigel(BD PharMingen) 50 μ l 用不含血清的 DMEM 培养基 1:1 稀释, 加入 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上表面(12.0 μ m 膜孔径), 室温下通风橱中干燥 1 h。将 sur-shRNA/SW480 细胞、pRNA T/SW480、SW480 细胞用 PBS 洗 3 次, 消化后重悬于不含 10% FCS 的 DMEM 培养基中, 取 1 $\times 10^6$ /ml 细胞 500 μ l 至上室, Transwell 培养板下室加入 1 000 μ l 含 10% FCS 的 DMEM 培养液。37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 4% 福尔马林固定后行 Giemsa 染色。去除滤膜上层细胞, 用中性树脂将膜封于载玻片上。镜下($\times 400$)计数滤膜下表面的侵袭了基底膜的细胞数, 随机计数 5 个视野中的细胞数目, 每个标本重复 3 次, 实验重复 3 次, 以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.8 统计学方法

采用 *t* 检验, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 软件进行统计处理。

2 结果

2.1 成功地构建了 pRNA T/sur-siRNA 表达质粒 siRNA 的插入序列为 76 bp, 两端为 *Bam* H、*Hind* 酶切位点, 经测序序列与设计序列完全相符, 见图 2, pRNA T/sur-siRNA 表达质粒转染大肠癌细胞株 SW480 细胞后, 细胞胞浆中出现绿色荧光, 说明 pRNA T/sur-siRNA 表达质粒正确表达。

2.2 survivin mRNA 和蛋白的表达

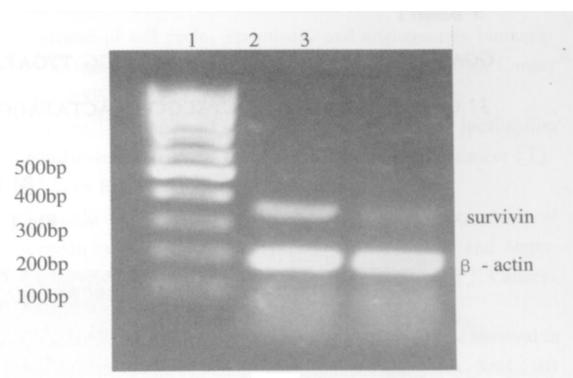
RT-PCR 结果显示 SW480 细胞株高表达 survivin mRNA, pRNA T/sur-siRNA 转染 SW480 细胞后 survivin mRNA 受到明显的抑制, 图像分析示抑制达到 80%, 见图 3a。Western blot 结果显示 survivin 蛋白的表达受到明显的抑制, 与对照组相比 survivin 蛋白表达明显下降达 85%, 见图 3b。表明 pRNA T/sur-siRNA 能有效的抑制 survivin mRNA 表达, 进而导致 survivin 蛋白表达下降。

2.3 MTT 法检测细胞增殖性

sur-siRNA/SW480 细胞、对照组(pRNA T/SW480)、SW480 细胞在 570 nm 处的吸光光密度 OD 值及增殖抑制率, 见表 1。可见 sur-siRNA 对 SW480 细胞增殖呈明显的抑制作用, 达 37.4%, 与对照组相比有明显的统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 细胞侵袭能力

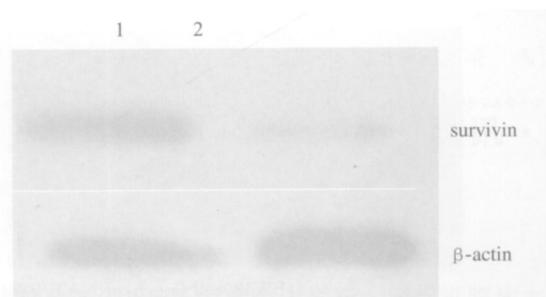
在镜下观察扫描全膜, 随即取 5 个视野的 sur-siRNA/SW480 细胞、pRNA T/SW480 细胞、SW480



1:100 bp DNA molecular weight marker; 2: survivin mRNA expression of SW480 cell line; 3: survivin mRNA expression of sur-siRNA/SW480 cell line

图 3a RT-PCR 分析 survivin mRNA 表达

Fig 3a A RT-PCR analysis of survivin mRNA expression



1: survivin protein expression of SW480 cell line; 2: survivin protein expression of sur-siRNA/SW480 cell line

图 3b Western blot 分析 survivin 蛋白表达

Fig 3b Western blot analysis of survivin protein expression

表 1 pRNA T/sur-siRNA 对 SW480 细胞增殖的影响($n=6$)

实验分组	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率 %
sur-siRNA/SW480	0.523 \pm 0.0373 [#]	37.4
pRNA T/SW480	0.795 \pm 0.0267 [#]	4.4
SW480	0.835 \pm 0.0362	0

[#]: $P < 0.01$

细胞的细胞穿透数分别为 153 \pm 66、505 \pm 65、578 \pm 98 个, 说明 pRNA T/Sur-siRNA 沉默 survivin 基因后, SW480 细胞的穿透数明显降低即细胞侵袭能力降低, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 4。

3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 现象广泛存在于生物界, 从低等的原核生物到人类均已有发现。是指由双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA) 介导的特异性同源基因 mRNA 降解的一种细胞反应过程, 是转录后的基因沉默^[4]。由于 RNA 干扰抑制靶基因的特异性和效率均较反义核



图 1 shRNA 序列

Fig 1 shRNA sequence

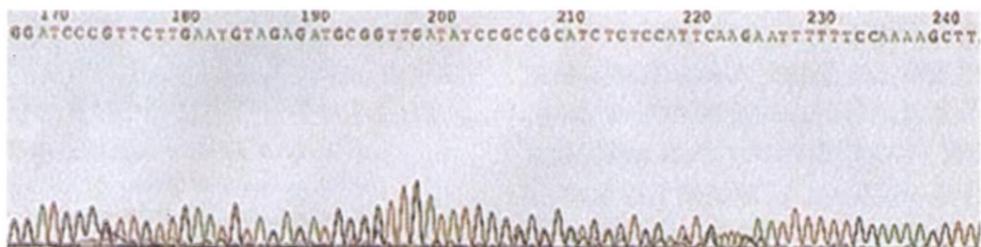


图 2 Sur-siRNA/pRNAT 重组质粒的测序图

Fig 2 A sequence figure of Sur-siRNA/pRNAT recombinant vector

a: SW480 cell line; b: pRNAT/SW480 cell line; c: sur-siRNA/SW480 cell line $\times 400$

图 4 细胞侵袭实验示所见视野的细胞穿透

Fig 4 Cell of breakthrough transwell membrane

昔酸高 10 倍以上,目前 RNAi 广泛应用于肿瘤基因治疗领域^[5,6]。survivin 是凋亡抑制蛋白 (Inhibition Apoptosis Protein, IAP) 成员之一,具有强大的抗细胞凋亡作用,并在维持细胞有丝分裂及血管形成调控过程中起重要作用^[7],在结直肠癌的致病过程中起重要作用^[1,8]。本研究观察了采用 RNA 干扰技术沉默 survivin 基因后大肠癌细胞株 SW480 细胞生物特性的变化。本研究根据 survivin 基因序列,设计、合成了针对 survivin mRNA 的特异性 RNA 干扰片断,并克隆入 pRNAT-U6.1/Neo 载体,构建了 survivin shRNA 真核表达质粒 (pRNAT/Sur-siRNA)。测序验证及 pRNAT/sur-siRNA 重组质粒转染 SW480 细胞后绿色荧光蛋白的表达皆证实构建的 pRNAT/sur-shRNA 重组质粒的正确性。通过脂质体介导将 pRNAT/sur-shRNA 和空载体 pRNAT 分别转染入大肠癌细胞株 SW480,通过 G418 筛选,建立了稳定转染 pRNAT/sur-siRNA 的 SW480 细胞系,RT-PCR 研究证实 survivin mRNA 的表达下调 85% 及 Western blot 分析证实 survivin 蛋白表达下调 80%,sur-siRNA 成功地抑制了 survivin 的表达,稳定转染 pRNAT/

Sur-siRNA 的 SW480 细胞系的建立,为进一步研究 survivin 基因对大肠癌细胞生物特性的影响提供了的物质基础。

本研究表明沉默 SW480 细胞 survivin 基因后,肿瘤细胞的增殖明显降低。其机制可能是 survivin 基因的表达主要在 G₂/M 期,可竞争性地与 Cdk4/p16INK4a 复合物结合,形成 survivin/Cdk4 复合物,把 p16INK4a 复合物从复合物中解离出来,从而激活 Cdk2/Cyclin E,导致 Rb 蛋白磷酸化,引起有丝分裂和细胞的增殖。当 survivin 蛋白下调后,G₁ 期细胞增加,而 S 期细胞减少,因此细胞增殖性降低^[9]。

侵袭性是恶性肿瘤的重要生物学特征,抑制肿瘤细胞的侵袭对于肿瘤的临床治疗具有深远的意义。研究发现,SW480 细胞的 survivin 被沉默后,SW480 细胞的侵袭能力明显降低,这提示 survivin 表达与大肠癌细胞侵袭性有关。其可能的机制是 survivin 被沉默后细胞阻滞在 G₂/M 期,影响微管、微丝的装配^[10],SW480 细胞在微管结构改变的情况下,可能引起细胞粘弹性系数下降,进而引起细胞侵袭下降。另外抑制 survivin 表达可以降低肿瘤的血

管生成,进而抑制 SW480 细胞的侵袭^[11,12]。总之针对 survivin 基因的 siRNA 可能是治疗大肠癌有效的方法。

参考文献:

- [1] Kim PJ, Plescia J, Clevers H, et al. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer [J]. Lancet, 2003, 362 (9379): 205-209.
- [2] LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer [J]. Oncogene, 1998, 17(25): 3247-3259.
- [3] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360-372.
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [5] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418 (6894): 244-251.
- [6] Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? [J]. Trends Genet, 2003, 19(1): 39-46.

- [7] Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11): 3974-3986.
- [8] Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, et al. Cellular localisation of Survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(8): 504-510.
- [9] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis [J]. Cancer, 2001, 91(11): 2026-2032.
- [10] Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (42): 15100-15105.
- [11] Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1 [J]. Ann Oncol, 2006, 17(4): 597-604.
- [12] Beierle EA, Nagaram A, Dai W, et al. VEGF-mediated survivin expression in neuroblastoma cells [J]. J Surg Res, 2005, 127(1): 21-28.

[编辑:贺文] [校对:安凤]

· 简讯 ·

第十五届国际乳腺病大会暨第三届上海国际乳腺癌论坛将在上海举行

本次大会将于 2008 年 10 月 23 日至 10 月 26 日在上海商城剧院/ 波特曼丽嘉酒店举行。国际乳腺病大会是由 1976 年成立的国际乳腺病学会 (SIS) 发起, 每两年举办一次, 是欧洲和美洲最重要的乳腺病学术活动之一。本次大会是由国际 SIS、中国抗癌协会乳腺癌专业委员会 (CBCS)、复旦大学上海医学院及上海交通大学医学院共同主办。由 Umberto Veronesi、孙燕、沈镇宙和徐光炜教授担任大会荣誉主席, 意大利的 Bruno Salvadori 教授、香港的周永昌教授和中国的邵志敏教授共同担任大会主席, 李亚芬教授担任大会的本地副主席。

本次大会将就乳腺病各领域中的多个课题进行讨论, 包括: 流行病学、基础研究、乳腺成像、乳腺病理学、乳腺外科、新辅助治疗、放射疗法、辅助治疗、辅药及康复、转移性乳腺癌、新兴疗法与临床试验。Terry Mamounas、Giuseppe Viale、Stefan Gluck 等世界著名重量级专家将莅临现场并发表精彩学术报告。

本次大会提交的摘要将由大会的学术委员会评审, 被选中的摘要将刊登在《大会论文集》上, 同时本次大会将举办一系列的学术活动: (1) SCI 上刊推荐: 本次大会与被 SCI 收录期刊《BMC Cancer》(影响因子 2.359) 合作, 优秀的摘要将有机会被推荐在该 SCI 期刊上发表全文(费用自理)。 (2) 本次大会将与《中国癌症杂志》社合作举办“如何在 SCI 期刊上发表文章”的特别课程, 将邀请著名的华裔学者陆嘉德教授、邵志敏教授、《BMC Cancer》的特邀编委周永昌教授授课。 (3) 本次大会将组织专家团队, 在递交摘要中评出: 优秀青年医师奖、优秀壁报奖、优秀口头报告奖。 (4) 西部资助计划: 有机会免费出席本次会议(具体要求详见网站)。 (5) 病例研讨: 本次大会将特设病例研讨专区, 将邀请著名临床专家前来就乳腺的疑难杂症展开深入分析、研究及评论; 与会者将有机会与业内顶尖专家就特别的病例情况予以直面探讨和沟通, 届时还将进行个别案例的辩论, 以加强临床学术知识的传播。

本次会议将授予国家级继续教育学分 10 分, 欢迎全国从事乳腺癌防治研究, 临床及基础研究, 护理、心理、康复等专业人员踊跃参加。

更多详情请访问大会网站 <http://www.2008wcbd.com/>

大会秘书处联系方式:

电 话: 86 021 2281 9537 *802 / 800

联系人: 孙小姐 / 许小姐

邮 箱: contact@2008wcbd.com