

· 论 著 ·

RNA 干扰 Livin 联合顺铂对食管癌细胞 Eca-109 增殖和凋亡的影响

陈 力¹, 李 凡²

(重庆医科大学附属第一医院:1. 胸外科;2. 普外科 400016)

摘要:目的 探讨 RNA 干扰 Livin 联合顺铂对食管癌细胞 Eca-109 增殖和凋亡的影响及相关作用机制。方法 利用慢病毒载体构建 shRNA-Livin 系统并转染至食管癌细胞 Eca-109, 将 Eca-109 细胞分为 5 组: 正常对照组、阴性对照组、干扰组、顺铂组、联合组(干扰+顺铂)。采用分光光度法、二甲氧喹黄比色法(XTT)、流式细胞术(FCM)、原位末端转移酶标记技术(TUNEL)、透射电镜(TEM) 分别检测食管癌细胞的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Caspase-9 表达, 细胞增殖、细胞周期、凋亡及形态学改变情况。结果 转染后, Eca-109 细胞 Caspase-3、Caspase-9 表达明显增强($P < 0.01$), 细胞存活率明显降低($P < 0.01$); 经 RNA 干扰后, 细胞周期主要被阻滞于 S 期, 细胞凋亡率明显增加; TEM 下可见典型的凋亡细胞。与顺铂组比较, 联合组细胞的上述表现尤为明显。结论 Livin 靶向 RNA 干扰联合顺铂通过上调 Caspase-3、Caspase-9 的表达从而抑制 Eca-109 细胞的增殖和促进其凋亡。

关键词:食管肿瘤; RNA 干扰; 顺铂; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; Livin 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)34-3442-03

Influence of RNA interference targeting Livin combined with cisplatin treatment on proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca-109 cells

Chen Li¹, Li Fan²

(1. Department of Thoracic Surgery; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the influence of RNA interference(RNAi) targeting Livin combined with cisplatin treatment on proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca-109 cells and its related mechanism. **Methods** shRNA-Livin system was constructed using lentiviral vector, which was subsequently transfected into Eca-109 cells. Eca-109 cells were divided into 5 groups: normal control group, negative control group, RNAi group, cisplatin group and combination group (RNAi combined with cisplatin treatment). Spectrophotometry, 2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) 5[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colormetric assay, flow cytometry (FCM), terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and transmission electron microscopy (TEM) were employed to detect the expression of cysteinyl aspartate specific protease(Caspase)-3 and Caspase-9, cellular proliferation, cell cycle, apoptosis and morphological changes in Eca-109 cells, respectively. **Results** After transfection, Caspase-3 and Caspase-9 expression in Eca-9 cells were obviously increased ($P < 0.01$), while cellular survival rate was markedly decreased ($P < 0.01$). Eca-109 cells showed a main S phase arrest and significantly increased apoptotic rate after RNAi. Typical apoptotic cells were observed by TEM. Compared to cells in cisplatin group, cellular features above in combination group were particularly obvious. **Conclusion** RNAi targeting Livin combined with cisplatin treatment can inhibit proliferation and induce apoptosis of Eca-109 cells via up-regulating Caspase-3 and Caspase-9 expression.

Key words: esophageal neoplasms; RNA interference; cisplatin; caspases; Livin

正常人体组织细胞增殖和凋亡总是处于平衡状态, 而肿瘤的发生, 不仅仅与细胞的增殖失控有关, 也与凋亡的减少密切相关。凋亡的负向调控涉及几个家族, 其中包括凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族。Livin 基因是该家族的新成员, 它在大多数正常成人组织中不表达或低表达, 而在包括乳腺癌之内的多种恶性肿瘤中高表达^[1-4], 能抑制肿瘤细胞凋亡, 并使其对化疗药物有抵抗作用^[5-6], 因此作为肿瘤治疗一个可能的新靶点而日益受到重视。

研究发现, 针对 Livin 的 RNA 干扰可有效升高细胞株中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Caspase-9 的表达。本研究采用慢病毒载体转染 Livin 高表达的食管癌 Eca-109 细胞株, 同时联合化疗药物顺铂观察其抑制 Eca-109 细胞增殖及其诱导凋亡效应, 从而探讨其相关作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 本研究前期实验筛选所得的高表达 Livin 的人食管癌 Eca-109 细胞株; 包装细胞 293T 细胞株购于中科院上海细胞所; 大肠埃希菌株 DH5 α 、胎牛血清、胰蛋白酶购于 Invitrogen; 限制性内切酶、1 kb/100 bp ladder 购于 Fermentas;

T4 DNA 连接酶购于 NEB; 质粒 DNA 提取试剂盒购于 Axygen; 制备感受态试剂盒购于 BIOSCIENCES; 凝胶回收试剂盒购于 Qiagen; 顺铂安铂(CDDP)购于大连生物制药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分光光度法测定细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性 实验分为 3 组: 正常对照组、阴性对照组、干扰组。测定细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性具体检测方法按照分光光度法操作步骤进行。通过计算 OD 诱导剂/OD, 阴性对照的倍数来确定凋亡诱导剂组 Caspase-3 或 Caspase-9 活化程度。

1.2.2 比色法二甲氧喹黄(XTT)检测 Eca-109 细胞按照不同的实验要求分别接种于置入了细胞玻片的 24 孔板或者细胞培养瓶。细胞转染方法按照说明书进行。转染 48 h 后, 按实验需求, 分别在不同组加入 PBS 和终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂, 继续培养 48 h。实验分为 5 组: 正常对照组、阴性对照组、干扰组、顺铂组、联合组(干扰+顺铂)。XTT 法检测细胞存活率的方法按照说明书进行。

1.2.3 原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测

实验分为 5 组:正常对照组、阴性对照组、干扰组、顺铂组、联合组。TUNEL 检测细胞凋亡的方法按照说明书进行。

1.2.4 流式细胞术(flow cytometry,FCM)检测 实验分为 5 组:正常对照组、阴性对照组、干扰组、顺铂组、联合组。FCM 检测步骤按照说明书进行。

1.2.5 透射电镜(transmission electron microscopy,TEM)检测 实验分为 5 组:正常对照组、阴性对照组、干扰组、顺铂组、联合组。消化收集各组细胞沉淀,戊二醛固定细胞,Epon812 包埋,超薄切片铅铀双染色后进行 TEM 观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 分光光度法测定细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性 相对于正常对照组和阴性对照组,干扰组细胞 Caspase-3、Caspase-9 表达明显增强($P < 0.01$),见表 1。

表 1 不同组别细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Caspase-3(OD 405)	Caspase-9(OD 405)
正常对照组	0.133 0±0.060 0	0.125 3±0.006 0
阴性对照组	0.138 3±0.006 5	0.127 0±0.003 5
干扰组	0.264 0±0.008 2*#	0.227 7±0.003 5*#

*: $P < 0.01$,与正常组比较;#: $P < 0.01$,与阴性对照组比较。

2.2 XTT 检测结果 相对于正常对照组和阴性对照组,干扰组细胞存活率明显降低($P < 0.01$);干扰组与顺铂组之间细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$);但联合组细胞存活率相对于顺铂组明显减少($P < 0.01$),见表 2。

2.3 FCM 检测 细胞周期检测发现,经 RNA 干扰后,细胞周

期主要被阻滞于 S 期;而相对于顺铂组,联合组可明显增加阻滞于 S 期的细胞数;经 RNA 干扰后,细胞凋亡率明显增加;而相对于顺铂组,联合组可明显增加细胞凋亡率。见图 1、2。

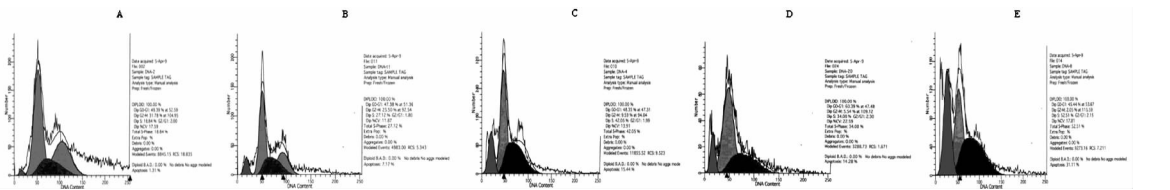
表 2 经不同方式处理的细胞增殖情况比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	OD 450
正常对照组	1.400 7±0.043 4
阴性对照组	1.390 0±0.025 2
干扰组	1.002 3±0.028 4*
顺铂组	0.978 0±0.102 2*
联合组	0.839 0±0.050 3*#

*: $P < 0.01$,与正常对照组、阴性对照组比较;#: $P < 0.01$,与顺铂组比较。

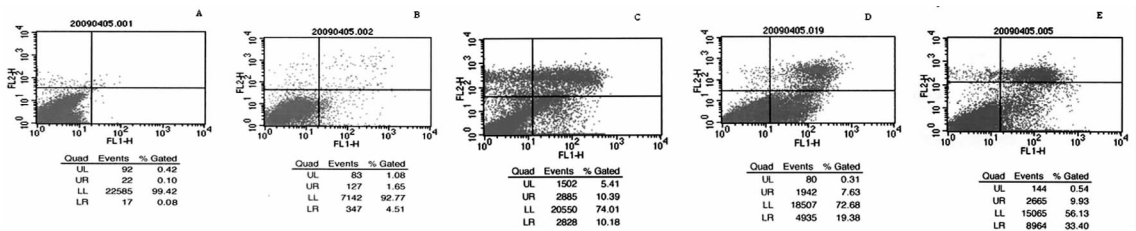
2.4 TUNEL 检测 经不同方式处理后的食管癌 Eca-109 细胞凋亡变化 被染上棕色的细胞呈典型的凋亡细胞形态学改变,细胞变小、变圆、核固缩;而正常细胞的细胞核不着染(插 I 图 3)。每张切片在高倍视野下($\times 200$)取 5 个视野,计数 5 个视野中每 100 个细胞中染色阳性的细胞数(%),取其平均数。干扰组与正常对照组和阴性对照组相比,细胞凋亡率显著增加;而联合组与顺铂组比较,细胞凋亡率显著增加。

2.5 TEM 下观察凋亡细胞的形态学改变 TEM 观察细胞结构显示,转染后,正常对照组及阴性对照组细胞的超微结构无明显改变,凋亡细胞少见,细胞有绒毛,细胞核、线粒体等细胞器正常(插 I 图 4 A、B);在顺铂组,凋亡细胞数目增加较明显,可见凋亡小体(插 I 图 4 C);在干扰组及联合组中,呈凋亡的形态改变的细胞数目增多,绒毛消失,细胞质浓缩,细胞核深染,核浓缩核聚集、核碎裂、核边集染色质浓缩,可见膜包裹着较多致密的凋亡小体(插 I 图 4 D、E)。



A:正常对照组;B:阴性对照组;C:干扰组;D:顺铂组;E:联合组。

图 1 5 组食管癌 Eca-109 细胞细胞周期改变



A:正常对照组;B:阴性对照组;C:顺铂组;D:干扰组;E:联合组;LL:正常细胞;LR:早期凋亡细胞;UR:晚期凋亡细胞;UL:死亡细胞。

图 2 5 组食管癌 Eca-109 细胞细胞凋亡情况

3 讨 论

中国是食管癌病死率最高的国家。顺铂自 20 世纪 70 年代开始用于临床以来,已成为治疗食管癌、肺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤的一线化疗药物^[7-8]。手术以后联合以铂类药物为基础的化疗已经成为中晚期食管癌的主要治疗手段。

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身程序,自己结束生命的过程。促凋亡和抗凋亡系统的平衡在肿瘤的发病机制中扮演了重要的角色,寻找一种新的途径对有效抑制肿瘤细胞生长和增加其对化疗的敏感性有重要的意

义^[9-11]。Livin 可作为肿瘤恶性改变的分子标记和预后指标。鉴于 Livin 与癌症的关系如此密切,不少研究者已经将 Livin 作为研制抗肿瘤新药的靶点,通过 RNA 干扰技术抑制 Livin 的生成并研究对癌细胞生物学功能的影响^[5-6,12]。

在本研究中,将 Livin 基因作为治疗食管癌一个可能的潜在靶点,利用 RNA 干扰技术对其功能进行研究。经针对 Livin 的 RNA 干扰后,相对于正常对照组和阴性对照组,干扰组细胞存活率明显降低;干扰组与顺铂组之间细胞存活率没有明显区别,但联合组细胞存活率相对于顺铂组明显减少。进一步研

究发现,下调 Livin 表达后,食管癌细胞周期重新分布, G_0/G_1 期细胞增加,S 期细胞减少,顺铂联合 RNA 干扰则可将细胞更多地阻滞于 S 期。本实验中, RNA 干扰 Livin 后,细胞由 G_0/G_1 期向 S 期发展的能力以及 DNA 的合成受到抑制,最终导致了细胞增殖的减少。

本研究用 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况,发现典型的凋亡细胞形态学发生明显改变:细胞变小、变圆、细胞核固缩;而正常细胞的细胞核不着染。食管癌细胞中 Livin 下调后,细胞的凋亡率明显上升,提示它有诱导细胞凋亡的作用。判别细胞凋亡的金标准是电镜观察。TEM 观察发现 RNA 干扰 Livin 后的细胞出现典型的凋亡特征,这就进一步证实了 Livin 的下调可以诱导食管癌细胞自发的发生凋亡。本研究将 Livin 基因沉默后比较了干扰组和阴性对照组细胞的化疗敏感性。结果发现,联合组的细胞凋亡率显著高于阴性对照组和顺铂组的细胞。这提示靶向 Livin 的 RNA 干扰可能会增强食管癌对于顺铂化疗的敏感性及降低顺铂使用剂量,从而减少化疗过程中不良反应的发生。提示靶向 Livin 的 RNA 干扰,对化疗药物治疗食管癌可能起到辅助作用。

Caspase 是一组半胱氨酸蛋白酶家族,是介导细胞凋亡的重要蛋白家族,大多数刺激物是通过 Caspase 蛋白的级联激活反应引起细胞凋亡。本研究结果表明, Livin 表达下降后, Caspase-3 的表达随之升高,提示 Livin 靶向 RNA 干扰后可能通过减少了杆状病毒 IAP 重复序列(BIR 序列)与 Caspase-3 结合,导致 Caspase-3 升高、活性增加而最终导致食管癌细胞的凋亡增加。在本研究中,同样发现 Livin 靶向 RNA 干扰后,也增加了 Caspase-9 的表达,提示 Caspase-9 同样也参与了 Livin 所介导的食管癌细胞的凋亡。Nachmias 等^[13]也发现, Livin 可以和 Caspase-9 结合,在凋亡的起始阶段起抗凋亡作用。本研究的结果与前期的报道相符,说明 Caspase-3、Caspase-9 在 Livin 调控食管癌细胞凋亡的通路中,发挥着重要的作用。

综上所述,本实验构建的靶向 Livin 的 siRNA 可以有效地抑制 Livin 基因的表达,并通过上调 Caspase-3、Caspase-9 的表达,从而达到抑制食管癌细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用。Livin siRNA 对顺铂治疗食管癌可起到辅助作用,为提高临床食管癌治疗效果奠定了一定的实验基础。在以后的研究中,还需要用更多种类的化疗药物和食管癌细胞,以进一步分析 Livin 靶向 RNA 干扰与化疗敏感性之间的关系。

参考文献:

[1] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250 (2):168-176.

(上接第 3441 页)

[5] Yang B, Sun LJ, Ming ZQ, et al. The expression of P53, MDM2 proteins and the correlation in cervical cancer [J]. *Guizhou MED J*, 2007, 31(1):1-3.

[6] Matusan K, Dordevic K, Mozetic V, et al. Expression of osteopontin and CD44 molecule in papillary renal cell tumors [J]. *Pathol Oncol Res*, 2005, 11(2):108-113.

[7] Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, et al. Class III beta tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients [J]. *Clin cancer Res*, 2005, 11(1):298-305.

[8] Kim CH, Kim DK, Choi SJ, et al. Proteomic and transcrip-

[2] Choi J, Hwang YK, Sung KW, et al. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109(2):471-477.

[3] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 362(1/2):125-130.

[4] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3):1000-1009.

[5] Crnkovic-Mertens I, Muley T, Meister M, et al. The antiapoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2006, 54(2):135-142.

[6] Crnkovic-Mertens I, Wagener N, Semzow J, et al. Targeted inhibition of Livin resensitizes renal cancer cells towards apoptosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(9):1137-1144.

[7] Watanabe M, Nagai Y, Kinoshita K, et al. Induction chemotherapy with docetaxel/ cisplatin/5-fluorouracil for patients with node-positive esophageal cancer [J]. *Digestion*, 2011, 83(3):146-152.

[8] Okines A, Sharma B, Cunningham D. Perioperative management of esophageal cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(4):231-238.

[9] Di Cosimo S, Baselga J. Targeted therapies in breast cancer: where are we now [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(18):2781-2790.

[10] Fulda S. Tumor resistance to apoptosis [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(3):511-515.

[11] Syrigos KN, Zalonis A, Kotteas E, et al. Targeted therapy for oesophageal cancer: an overview [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2):273-288.

[12] Chang H, Schimmer AD. Livin/ melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6 (1):24-30.

[13] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, et al. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19):6340-6349.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-12)

tomics analysis of interleukin-1 beta treated lung carcinoma cell line [J]. *Proteomics*, 2003, 3(12):2454-2471.

[9] Rauch J, Ahlemann M, Schaffrik M, et al. Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(1):156-162.

[10] Evans MJ, Saghatelian A, Sorensen EJ. Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23 (10):1303-1307.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-09-12)