

· 论 著 ·

高选择性 RNA 干扰抑制 survivin 基因对在体结肠癌的治疗作用*

王春毅,傅仲学[△]

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 400016)

摘要:目的 探讨肿瘤增殖型腺病毒 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 介导的针对 survivin 的高选择性 RNA 干扰对在体结肠癌细胞 HT-29 增殖和凋亡的影响。方法 用携带针对人 survivin 的 shRNA 的肿瘤增殖型腺病毒 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 转染结肠癌细胞 HT-29 裸鼠移植瘤模型,以携带相同 shRNA 的复制缺陷型腺病毒和脂质体载体为对照,检测移植瘤体变化,以及 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡率。结果 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 介导的高选择性 RNA 干扰使结肠癌裸鼠移植瘤的瘤体减小、移植瘤细胞凋亡率显著增加,且高于目前常用的复制缺陷型腺病毒载体和脂质体载体($P < 0.05$)。结论 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 介导的高选择性 RNA 干扰能高效地诱导结肠癌细胞凋亡并抑制其增殖。

关键词:肿瘤增殖型腺病毒;高选择性 RNA 干扰;survivin;结肠肿瘤;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3339-03

Effect of RNAi-mediated survivin gene with Conditionally replicating adenovirus silencing on therapy of colon carcinoma cell in athymic mouse*

Wang Chunyi, Fu Zhongxue[△]

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of RNAi-mediated survivin gene with conditionally replicating adenovirus Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP silencing on propagation and apoptosis of colon carcinoma cell lines HT-29. **Methods** Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP was transfected to transplantation tumor on athymic mouse, replication defective adenovirus and liposome vector which was contained the same shRNA as Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP were as control one. Then the change of transplantation tumor on athymic mouse was tested, and TUNEL was used to assay the apoptosis rate of transplantation tumor cells. **Results** After transfection of Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP, the quality of transplantation tumor on athymic mouse were reduced and the apoptosis rate of transplantation tumor cells were higher than replication defective adenovirus and liposome vector which was contained the same shRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** The effect of Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP to colon carcinoma cell on propagation and apoptosis were higher than replication defective adenovirus and liposome vector.

Key words: conditionally replicating adenovirus; RNA interference; survivin; colonic neoplasms; apoptosis

目前针对凋亡抑制因子 survivin 的研究很多,研究证明其能抑制肿瘤细胞凋亡,还与结直肠癌细胞的增殖密切相关^[1-2]。肿瘤增殖型腺病毒仅在肿瘤细胞中增殖,对正常细胞损伤小,以其为载体可以实现针对结直肠癌细胞的高选择性 RNA 干扰。在前期工作中,本研究构建了携带针对人 survivin 的 shRNA 的肿瘤增殖型腺病毒 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP,体外实验的结果提示其能高选择性地转染结肠癌细胞 HT-29 并使其携带的外源性基因有效表达并高效抑制细胞中 survivin 基因 mRNA 及蛋白表达^[3]。在此基础上,本研究进行了在体实验,旨在探讨以肿瘤增殖型腺病毒为载体的高选择性 RNA 干扰沉默 survivin 基因对在体结肠癌肿瘤中的治疗作用和对癌细胞凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 人结肠癌细胞株 HT-29 由重庆医科大学病理生理研究室提供,HEK-293 细胞株由本实验室保有。携带针对人 survivin 的 shRNA 基因序列的增殖缺陷型腺病毒 Ad-S-EGFP、肿瘤增殖型腺病毒 Ad-delE1b55KD-S-EGFP;携带与设计的 shRNA 序列组成相同但序列被打乱的阴性对照 shRNA 基因的增殖缺陷型腺病毒 Ad-EGFP 和肿瘤增殖型腺病毒 Ad-delE1b55KD-EGFP 均由本实验室构建。Tunel 试剂

盒购自晶美公司。无特殊病原(SPF)级 BALB/c 裸小鼠 15 只,4 周龄,雌雄不限,由中国医学科学院肿瘤研究所提供。其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 人结肠癌裸鼠移植瘤模型的建立和分组 取对数生长长期的人结肠癌细胞株 HT-29, PBS 清洗后制成 1×10^7 /mL 的细胞悬液,按每只 0.1 mL 接种于裸鼠皮下,原代生长后在鼠间传代,取出瘤体,切成 0.3 cm × 0.3 cm × 0.1 cm 大小的组织块,移植入裸鼠皮下。待移植瘤生长到直径 0.7 cm 左右时,选取 20 只肿瘤体积相近的裸鼠,随机分为 4 组,每组 5 只,分别为: Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 组(A 组),每只裸鼠瘤体内注射 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP(病毒浓度 1×10^{10} pfu); Ad-shRNA/survivin-EGFP 组(B 组),每只注射 Ad-shRNA/survivin-EGFP(病毒水平 1×10^{10} pfu);脂质体转染组(C 组),每只注射将 pCA13-shRNA/survivin-EGFP 质粒和脂质体按 1:2 稀释的溶液 0.1 mL,空白对照组(D 组),每只注射 PBS 0.1 mL,隔日注射 1 次,共 3 次。

1.2.2 肿瘤生长抑制率的测定 4 周后处死裸鼠,剥离肿瘤并称取质量。肿瘤生长抑制率 = (对照组肿瘤质量 - 实验组肿瘤质量) / 对照组肿瘤质量 × 100% (A、B、C 3 组为实验组)。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30772547)。 作者简介:王春毅(1977~),博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基因治疗的研究。

[△] 通讯作者, Tel: (023)89012302; E-mail: fzx990521@sina.com。

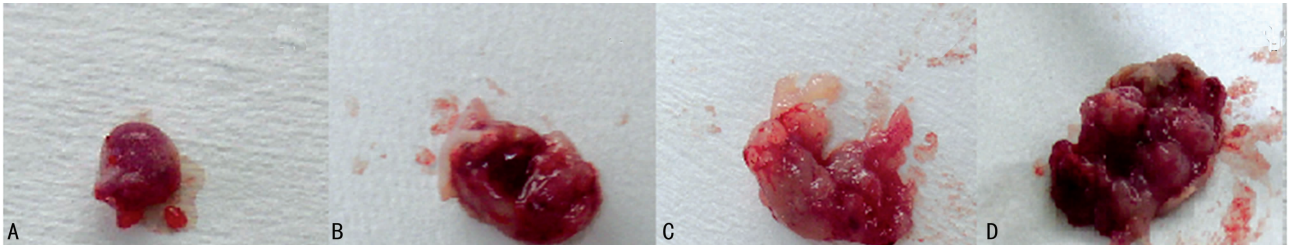
1.2.3 移植瘤病理检查 肿瘤称取质量后,切取部分肿瘤组织立即置入 10% 中性甲醛中固定 24 h,上行乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、石蜡切片、HE 染色,于显微镜下观察,并评价移植瘤细胞在光学显微镜下的病理变化。

1.2.4 TUNEL 染色法检测移植瘤凋亡 移植瘤取出后选择周边瘤组织,立即置入液氮中保存,8 μm 切片,置于氨丙基三氧基硅烷处理的载玻片上,用新制备的 4% 多聚甲醛溶液固定,室温 30 min。其余步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SAS9.2 统计分析软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间差异比较采用方差分析法,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤生长抑制率的测定 4 周后,A 组的肿瘤质量显著低于对照组,肿瘤生长移植率达 74.54%,而 B 组和 C 组的肿瘤质量较之对照组略有增加,见图 1、表 1。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 1 各组人结肠癌裸鼠移植瘤生长抑制情况

表 1 各组人结肠癌裸鼠移植瘤生长抑制情况

组别	肿瘤质量(g)					平均质量 ($\bar{x} \pm s$)
	第 1 只	第 2 只	第 3 只	第 4 只	第 5 只	
A 组	0.29	0.42	0.36	0.45	0.37	0.38 \pm 0.07
B 组	0.88	0.94	0.97	0.82	1.14	0.95 \pm 0.16*
C 组	0.95	0.82	1.27	1.15	0.86	1.01 \pm 0.17*
D 组	1.25	1.37	0.98	1.14	1.36	1.22 \pm 0.14*

*: $P<0.05$,与 A 组比较。

2.2 移植瘤病理检查结果 镜下可见移植瘤细胞异型性明显,细胞大小、形态不一,细胞核大小、形态及染色强度不一,核分裂像易见,证实为低分化腺癌,见图 2。

2.3 移植瘤细胞凋亡情况 A 组的瘤组织有成片密集的凋亡细胞,而 C 组和 D 组的瘤组织中没有或仅有少量分散的凋亡细胞, B 组的瘤组织中也仅有少量分散的凋亡细胞(图 3)。各组的凋亡指数分别为: A 组(45.28 \pm 1.34)%、B 组(12.59 \pm

0.58)%、C 组(9.81 \pm 0.44)%、D 组(9.34 \pm 0.41)%。

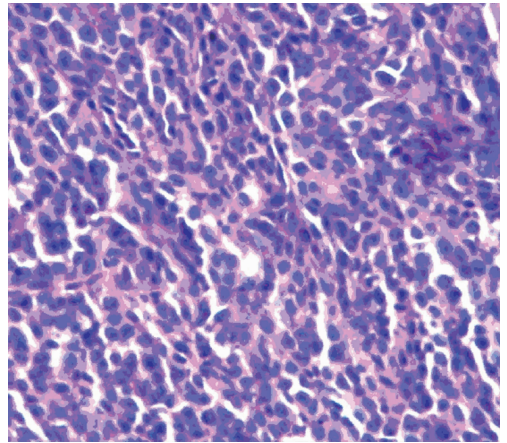
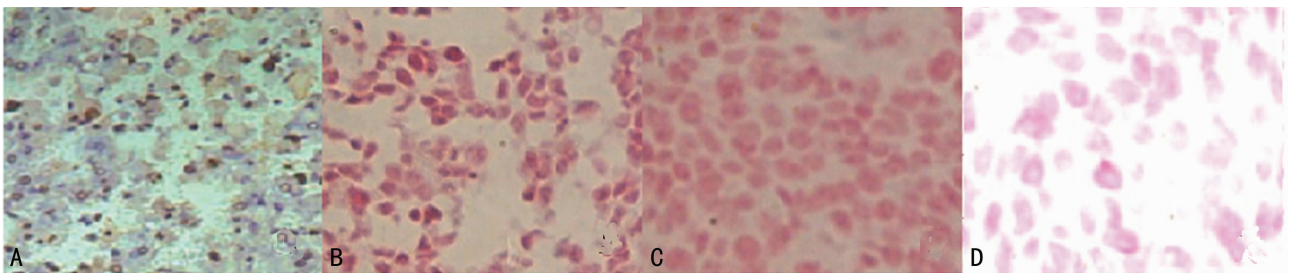


图 2 移植瘤组织切片(HE \times 200)



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 3 各组移植瘤细胞 TUNEL 染色

3 讨 论

RNA 干扰技术具有高序列特异性和高效性^[4-5]。研究表明,通过对 survivin 基因的 RNA 干扰,能使人类宫颈癌细胞、脑胶质瘤细胞及乳腺癌细胞凋亡率显著增高、增殖速度明显减低^[6]。在肝癌细胞株中用 RNA 技术干扰 survivin 基因的表达,能显著促进癌细胞的凋亡^[7]。

目前多采用脂质体直接包裹人工合成的改性 siRNA^[8]或包裹携带在宿主细胞中表达 siRNA 的前体分子(即 shRNA)进行转染^[9]。前者由于核酸酶的作用使外源性 siRNA 会逐渐

在细胞中代谢掉;后者的质粒核苷酸会插入宿主细胞 DNA 序列导致细胞基因的插入激活或灭活,使 RNA 干扰作用十分短暂和有限^[10]。

利用病毒作为载体进行 RNA 干扰的研究很多^[11-13],腺病毒是其中的热点载体。当细胞受腺病毒感染后,其内的 P53 蛋白会被激活,致细胞凋亡,病毒复制终止。而野生型腺病毒存在 E1B 55 \times 10³ 蛋白,这种蛋白能抑制 P53 的激活,故野生型腺病毒能在正常细胞内增殖。Bischoff 等^[14]研制了一种缺失 E1B 55 \times 10³ 蛋白的腺病毒,这种病毒感染正常细胞时,P53 被

激活,细胞很快凋亡,腺病毒不再增殖,使感染终止;而结直肠癌细胞中 P53 多已突变或失活,病毒感染后,P53 不能被激活,故缺乏 E1B 55kD 蛋白的腺病毒(肿瘤增殖型腺病毒),仍能在结直肠癌细胞中复制及增殖。实现了对结直肠癌细胞的高选择性感染。

本研究前期工作通过对 5 型腺病毒 E1b55KD 区的缺失突变构建了肿瘤增殖型腺病毒,在此基础上设计携带外源性基因的位点,将针对人 survivin 的 shRNA 携带入肿瘤增殖型腺病毒,使肿瘤增殖型腺病毒成为了介导 survivin 高选择性 RNA 干扰的载体。体外实验结果提示,其能高选择性转染结肠癌细胞 HT-29 并使其携带的外源性基因有效表达,高效抑制细胞中 survivin 基因 mRNA 及蛋白表达^[15]。

本次实验探讨了以肿瘤增殖型腺病毒为载体的高选择性 RNA 干扰沉默 survivin 基因对在体结肠癌肿瘤的治疗作用和对癌细胞凋亡的影响。结果提示,相对脂质体载体和复制缺陷型腺病毒载体,Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 能高效地诱导结肠癌细胞凋亡并抑制体结肠癌肿瘤生长,达到治疗结肠癌的目的。这种高效的抗肿瘤能力应该是 Ad-delE1b55KD-shRNA/survivin-EGFP 中针对人 survivin 的 shRNA 高效表达并发生有效持久 RNA 干扰作用的结果。提示肿瘤增殖型腺病毒介导 RNA 干扰对结肠癌可能是一种具有光明前景的新方法。

参考文献:

- [1] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(7):553-562.
- [2] 陈湘琦,李志鹰,林挺岩. RNA 干扰技术在肺癌基因治疗中的应用研究现状[J]. *中华临床医学杂志*, 2010, 4(7):1028-1031.
- [3] 王春毅,傅仲学. 靶向 RNA 干扰 Survivin 对结肠癌细胞 HT-29 增殖凋亡的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(5):563-566.
- [4] Cheng SQ, Wang WL, Yan W, et al. Knockdown of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(5):756-759.
- [5] 田瑞敏,鄢佳程,王含彦等. RNA 干扰技术在肿瘤基因治

疗中的研究现状[J]. *重庆医学*, 2013, 42(7):811-814.

- [6] Weng CJ, Hsieh YH, Chen MK, et al. Survivin SNP-carcinogen interactions in oral Cancer [J]. *J Dent Res*, 2012, 91(4):358-363.
- [7] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo [J]. *Mol Ther*, 2004, 10(1):162-171.
- [8] Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, et al. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine(PEI)-complexed siRNA in vivo [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(5):461-466.
- [9] Tauli R, Accornero P, Follenzi A, et al. RNAi technology and lentiviral delivery as a powerful tool to suppress Tpr-Met-mediated tumorigenesis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(5):456-463.
- [10] Ally N, Zou XL, Jiang BC, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor A expression in mouse granulosa cells by lentivector-mediated RNAi [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(4):4019-4033.
- [11] Spencer HT, Denning G, Gautney RE, et al. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(2):302-309.
- [12] 杨慧,倪丽,马豫茜,等. RNA 干扰靶向抑制 PI3K p85 α 表达对 5-FU 诱导大肠癌细胞凋亡的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(5):1085-1088.
- [13] 鲁玉刚,俞卫锋. 腺病毒载体用于基因治疗的研究进展 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2012, 28(5):514-516.
- [14] Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274(5286):373-376.
- [15] Wang CY, Fu ZX. The study of RNAi-mediated by conditionally replicating adenovirus silencing on Survivin gene in colon cancer cell lastingly [J]. *Chin-Germ J Clin Oncol*, 2008, 7(8):460-464.

(收稿日期:2013-03-10 修回日期:2013-05-28)

(上接第 3338 页)

- [6] 殷蔚伯,余子豪,徐国镇,等. *肿瘤放射治疗学* [M]. 4 版. 北京:中国协和医科大学出版社,2007:578.
- [7] 吴剑雄,陈龙. 减少呼吸运动在适形放射治疗中的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(3):481-484.
- [8] 李宝生. 肺癌精准放射治疗中呼吸运动解决方案 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(21):1601-1604.
- [9] 张书旭,周凌宏,杨俊,等. 基于 4D-CT 研究随呼吸运动靶区的剂量分布规律 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2010, 27(3):1825-1828.
- [10] Rietzel E, Chen GT, Choi NC, et al. Four-dimensional image-based treatment planning: Target volume segmentation and dose calculation in the presence of respiratory motion [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 61(5):1535-1550.
- [11] Keall PJ, Joshi S, Vedam SS, et al. Four-dimensional ra-

diotherapy planning for DMLC-based respiratory motion tracking [J]. *Med Phys*, 2005, 32(4):942-951.

- [12] Rietzel E, Liu AK, Doppke KP, et al. Design of 4D treatment planning target volumes [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66(1):287-295.
- [13] 张海南,汤日杰,张书旭,等. 基于 4D-CT 图像在肺癌放疗靶区勾画设计中的应用 [J]. *中国医学工程*, 2011, 19(5):4-6.
- [14] 陈慧娟,钟军,王索宇,等. ABC 对肺肿瘤运动和放疗靶区及肺受照射剂量的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2010, 25(1):53-56.
- [15] 于金明,姚春萍. 呼吸控制技术用于放射治疗的研究进展 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(1):1-3.

(收稿日期:2013-05-21 修回日期:2013-06-18)