

RNAi 基因沉默对消化系统肿瘤化疗敏感性的影响

邵 军,余文静,肖 斌,曾凡才[△]

(泸州医学院生物化学教研室,四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨 RNAi 基因沉默对消化系统肿瘤化疗敏感性的影响。方法 选取胃癌 SGC-7901 细胞株和食管癌 EC109 细胞株,常规分为转染组和阴性对照组培养,转染组两株细胞株转染 siRNA 沉默 Survivin 的表达,并给予顺铂药物 5 mg/L 共培养 72 h。空白对照组则给予常规培养,并给予转染组同剂量的顺铂共培养 72 h。MTT 法检测两组细胞株体外增殖速度并比较其对化疗药物顺铂的敏感性。结果 siRNA 沉默 SGC-7901 和 EC109 细胞株内 Survivin 的表达后,细胞对顺铂药物的敏感性提高,MTT 结果提示细胞的增殖活性明显低于未沉默组细胞株,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 采用 RNAi 基因沉默技术可以干扰 Survivin 基因表达,抑制肿瘤细胞的增殖,同时显著提高肿瘤对化疗的敏感性。

关键词: RNA 干扰;基因沉默;消化系统肿瘤;抗肿瘤联合化疗方案;敏感性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)12-1471-03

Study on influence of RNAi gene silence on chemosensitivity of human digestive system neoplasms

Shao Jun, Yu Wenjing, Xiao Bin, Zeng Fancai[△]

(Teaching and Research Section of Biochemistry, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of RNAi gene silence on the chemosensitivity of human digestive system neoplasms. Methods Esophageal cancer EC109 cells and gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells were selected and divided into the transfection group and the blank control group for culturing. Two cell lines in the transfection group were transferred by siRNA and silenced the expression of Survivin, giving cisplatin 5 mg/L to co-culture for 72 h. The blank control group was given the conventional culture and the same dose of cisplatin for co-culture for 72 h. The in vitro proliferation rate of cells in the two groups were measured by MTT and their sensitivities to the chemotherapy drug cisplatin were compared. Results After siRNA silencing the expression of Survivin in SGC-7901 and EC109 cell lines, the sensitivity of cells to cisplatin drugs was increased. MTT results suggested that the proliferation activity of cells was significantly lower than that in the non-silence cell lines, the difference showing statistical significance ($P < 0.05$). Conclusion Adopting RNAi gene silencing technique can interfere the expression of Survivin gene, inhibit the proliferation of tumor cell, and at the same time significantly improve the sensitivity of tumors to chemotherapy.

Key words: RNA interference; gene silencing; digestive system neoplasms; antineoplastic combined chemotherapy protocols; sensibility

消化系统肿瘤是人类常见的恶性肿瘤之一,由于其症状不明显,大部分患者有明显的临床症状时肿瘤已处于末期并发生转移,常规治疗手段疗效不佳^[1]。近年来,随着科学技术的发展,基因治疗是治疗肿瘤的一个值得探索的新型方法^[2]。选择理想的靶点是基因治疗重要的第一步^[3]。本研究采用 RNAi 的方法,抑制人胃癌 SGC-7901 细胞株和食管癌 EC109 细胞株 Survivin 的表达,从细胞学水平分析 Survivin 基因对化疗药物顺铂敏感性的影响,以探讨消化系统肿瘤的基因治疗。

1 资料与方法

1.1 材料 食管癌 EC109 细胞株和胃癌 SGC-7901 细胞株均由清华大学生命科学研究院提供。顺铂(DDP)、MTT 购自 Sigma 公司;10% 优级新生牛血清购自 Gibco 公司,DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,DMSO 购自 Amersco 公司;倒置显微镜购自奥林帕斯公司,全自动酶标检测仪(Dynatech MR5000 型)购自美国 Dynatech 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养、转染以及 Survivin 蛋白的检测 (1) 细胞培养:将 SGC-7901 和 EC109 细胞株分别培养于含 10% 新生小牛血清、5 mg/L DDP 药物的培养基中,随后放置于 37 ℃、

5% CO₂ 孵箱中,在饱和湿度下培养,隔日换液。(2) 细胞转染 si-RNA:选取 487-505 靶位点,根据靶位点设计寡核苷酸序列。序列中间设为茎环形,序列两端设为 siRNA 的正、反序列,同时采用 6 个 T 为 RNA polymerase III 转录终止子。载体 pBasi-hU6 经双酶切后与寡核苷酸相连接。等到 Survivin-shRNA 的表达载体。(3) Western blot 检测各组细胞株的 Survivin 蛋白表达。

1.2.2 绘制 4 个细胞株的生长曲线图 96 孔板,细胞 5×10^3 个/孔,每组 8 个复孔,每孔 200 μ L。接种后 12~72 h,每隔 12 小时添加 5 mg/mL MTT 溶液,每孔 20 μ L。置于 37 ℃、5% CO₂ 孵育 4 h,去除上清液后加二甲亚砜(DMSO),每孔 150 μ L,震荡 20 min,待结晶充分溶解后,使用酶联仪测量每孔在 490 nm 波长的吸光值(A),以 A₄₉₀ 为纵轴,时间(h)为横轴,绘制细胞株的生长曲线。

1.2.3 细胞对 DDP 的敏感性分析 取生长期的细胞株,置于 96 孔板中,每孔容纳 5×10^3 个细胞。培养 12 h 后,加 0.5 mg/L DDP 溶液 200 μ L。DMSO 终浓度为 0.5%,DDP 终浓度分别为 100、50、10、0.4、0.08 和 0.016 μ g/mL。同时设阴性对照组(无 DDP)。继续培养 24 h 后阴性对照组的细胞密度接近

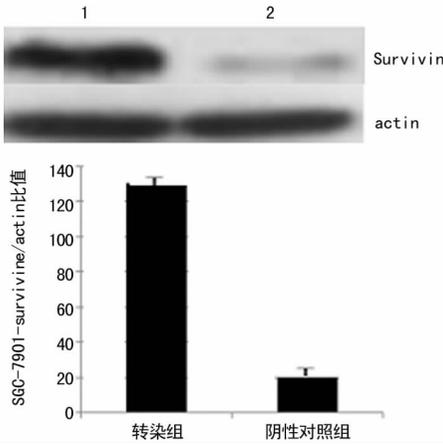
95%时,加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,调节温度至 37 ℃ 并放置 4 h,去除上清液后加 DMSO,每孔 150 μL,震荡 20 min,待结晶充分溶解后,使用酶联仪测量每孔在 490 nm 波长的 A 值。细胞生长抑制率=[阴性对照组 A₄₉₀-转染组 A₄₉₀(或空白对照组 A₄₉₀)]/阴性对照组 A₄₉₀。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 荧光显微镜下观察转染效率 转染组 SGC-7901 和 EC109 细胞株转染 si-RNA 后在荧光倒置显微镜下可以观察到绿色荧光,其感染效率为绿色荧光细胞数占总细胞数的比例,根据荧光显微镜显示 24 h 后转染组的感染效率已达到 90% 以上。

2.2 Western blot 检测转染后各株细胞株的 Survivin 蛋白的表达 转染组的 SGC-7901 和 EC109 细胞株 Survivin 蛋白表达明显低于阴性对照组,见图 1、2。



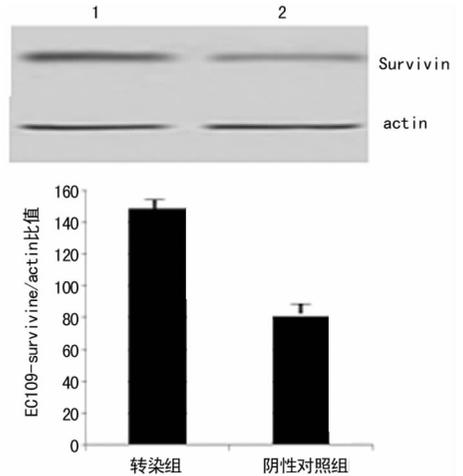
1: 转染组; 2: 阴性对照组。

图 1 两组 SGC-7901 细胞的 Survivin 蛋白表达

2.3 两组细胞的生长情况 转染组的感染慢病毒 SGC-7901 和 EC109 细胞株生长速度明显低于阴性对照组。两组细胞生

长曲线,见图 3。

2.4 转染后两组细胞株对 DDP 敏感性 经 MTT 检验后显示,转染组 SGC-7901、EC109 细胞株 IC₅₀ 在 24、48、72 h 也明显低于阴性对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。在 0.5 mg/L DDP 作用下细胞株的抑制率方面,转染组 SGC-7901 细胞株、EC109 细胞株的 24、48、72 h 的抑制率明显高于阴性对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。



1: 空白对照组; 2: 转染组。

图 2 两组 EC109 细胞的 Survivin 蛋白表达

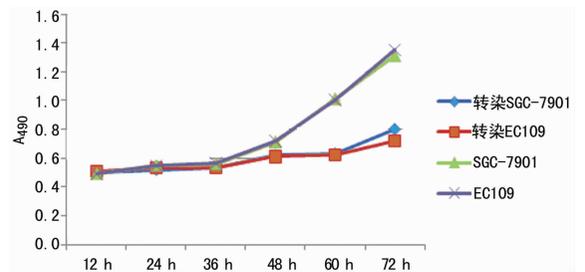


图 3 各细胞株的生长曲线

表 1 DDP 作用下两组细胞株的 IC₅₀ 比较 (mg/L)

组别	24 h		48 h		72 h	
	SGC-7901	EC109	SGC-7901	EC109	SGC-7901	EC109
转染组	0.95 ^a	1.02 ^a	1.25 ^a	1.13 ^a	1.41 ^a	1.42 ^a
阴性对照组	3.77	3.28	3.45	3.49	4.21	3.26

^a: *P*<0.05; 与阴性对照组比较。

表 2 0.5 mg/L DDP 作用下两组细胞株的抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	24 h		48 h		72 h	
	SGC-7901	EC109	SGC-7901	EC109	SGC-7901	EC109
转染组	35.88±0.75 ^a	28.49±0.73 ^a	32.09±0.88 ^a	25.48±0.92 ^a	35.10±0.98 ^a	26.12±0.84 ^a
阴性对照组	19.31±0.91	15.74±0.67	15.78±0.84	13.36±0.74	10.26±0.65	10.12±0.55

^a: *P*<0.05; 与阴性对照组比较。

3 讨 论

RNAi 是一种从基因角度治疗疾病的新技术, RNA 中少量的 siRNA 分子就能抑制其相应的基因表达^[4]。当 mRNA

中某段序列同源的 dsRNA 分子与 siRNA 分子导入肿瘤细胞时, dsRNA 可使目的基因产生特异性的降解, 从而导致目的基因表达的沉默。RNAi 技术具有高效和高特异性等优势^[5-6]。

Survivin 是一种凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP),Survivin 基因是由国外学者 Ambrosini 等^[7]在 1997 年的效应细胞蛋白酶受体-1cDNA 实验中从人类基因中筛选分离出来的。有研究表明,Survivin 在正常细胞中并不表达,而在肿瘤患者的肿瘤细胞内却呈现高表达^[8]。此外,Survivin 还与肿瘤治疗后的复发和转移有关^[9]。因此,Survivin 作为癌细胞特异性表达的一种凋亡抑制蛋白,其基因极有可能是肿瘤基因治疗中的一个最为理想的靶点。

本研究选取人胃癌 SGC-7901 细胞株和食管癌 EC109 细胞株,采用 RNAi 技术,将 siRNA 分子导入肿瘤细胞中,构建 siRNA-Survivin 表达载体,通过转染、筛选和鉴定得到稳定的细胞克隆体。同时采用 MTT 法进行细胞生长特性的检测,发现了 siRNA-Survivin 转染的胃癌 SGC-7901 细胞株和食管癌 EC109 细胞株体外培养增殖细胞数量明显下降,同时发现细胞株对化疗药物 DDP 的敏感度明显升高。其原因可能与 Survivin 对细胞的凋亡和分裂具有双重的调控作用有关^[10]。Survivin 在正常情况下只在细胞周期 G₂-M 期表达^[11]。在有丝分裂过程中,Survivin 与纺锤体的微管蛋白进行特异性的结合,维持有丝分裂的正常运作^[12]。Survivin 在细胞周期 G₂-M 期可对抗异常因素引起的细胞凋亡,而在肿瘤细胞中,Survivin 的高表达则可使细胞克服这个凋亡调控点而完成异常的有丝分裂^[13]。干扰 Survivin 与纺锤体的微管蛋白特异性结合后可使其抗凋亡的功能丧失,同时增加半胱氨酸蛋白酶的活性,从而导致细胞的 G₂-M 期凋亡,细胞分裂异常同时伴有倍体细胞形成^[14-15]。因此,诱导细胞凋亡是 RNAi 消化系统肿瘤细胞 Survivin 基因后抑制肿瘤细胞生长的重要机制。

综上所述,采用 RNAi 基因沉默技术可以干扰 Survivin 基因表达,抑制肿瘤细胞的增殖,同时显著提高肿瘤对化疗的敏感性。

参考文献:

- [1] 边中启,刘霜,刘明秋,等. 靶向 preC/C 基因特异性 RNA 干扰对乙型肝炎病毒在肝癌细胞系中复制与表达的影响[J]. 中华医学杂志,2012,92(11):768-772.
- [2] Li C,Rossomando A,Wu SL,et al. Comparability analysis of anti-CD20 commercial(rituximab) and RNAi-mediated fucosylated antibodies by two LC-MS approaches [J]. MAbs,2013,5(4):565-575.
- [3] 李增军,宋宝,刘杰,等. 沉默高迁移族蛋白 B1 基因抑制胃癌 MGC-803 细胞的侵袭转移[J]. 中华肿瘤杂志,2013,35(4):244-248.
- [4] Vengut-Climent E,Terrazas M,Lucas R,et al. Synthesis, RNAi activity and nuclease-resistant properties of apolar carbohydrates siRNA conjugates[J]. Bioorg Med Chem Lett,2013,23(14):4048-4051.
- [5] 李建成,张和平,刘迪,等. 表皮生长因子受体 siRNA 对食管鳞癌细胞的放射增敏研究[J]. 中华放射医学与防护杂志,2013,33(1):23-26.
- [6] 姚伟,李凯,徐挺,等. 慢病毒介导的 shRNA 靶向干扰 β -catenin 神经母细胞瘤稳定细胞株的建立[J]. 中华小儿外科杂志,2013,34(4):290-294.
- [7] 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.
- [8] 朱新华,廖兵,王心悦,等. 趋化因子受体 3 RNA 干扰慢病毒载体的构建及对嗜酸粒细胞作用的初步研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2013,48(4):316-321.
- [9] 杨祝,张刚庆,高鹏,等. 慢病毒介导小干扰 RNA 沉默人结肠癌 HT-29 细胞芳香烃受体核转位蛋白基因的研究[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(3):448-451.
- [10] Kunze D,Erdmann K,Froehner M,et al. Enhanced inhibition of bladder cancer cell growth by simultaneous knock-down of antiapoptotic Bcl-xL and survivin in combination with chemotherapy[J]. Int J Mol Sci,2013,14(6):12297-12312.
- [11] 盛文文,陆娜娜,尹玉,等. Survivin 基因对大肠癌细胞 HT29 生物学行为的影响[J]. 临床与实验病理学杂志,2013,29(4):378-381.
- [12] Sarti M,Pinton S,Limoni C,et al. Differential expression of testin and survivin in breast cancer subtypes[J]. Oncol Rep,2013,30(2):824-832.
- [13] Portanova P,Notaro A,Pellerito O,et al. Notch inhibition restores TRAIL-mediated apoptosis via API1-dependent upregulation of DR4 and DR5 TRAIL receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Int J Oncol,2013,43(1):121-130.
- [14] Turksma AW,Bontkes HJ,Ruizendaal JJ,et al. Exploring dendritic cell based vaccines targeting survivin for the treatment of head and neck cancer patients[J]. J Transl Med,2013,20(11):152.
- [15] Li C,Ye H. Mifepristone sensitizing cisplatin for cervical adenocarcinoma HeLa cell sensitivity to chemotherapy and its mechanism[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2013,34(2):142-147.

(收稿日期:2013-10-11 修回日期:2013-12-01)

(上接第 1470 页)

Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress[J]. J Mol Cell Cardiol,2012,52(3):753-760.

[12] 王前,邓晶,蒋永新,等. CyclinD1 的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2009,17(2):350-353.

[13] 李启炯,宋军民,陆敏,等. CyclinD1 在肝细胞癌中的表达与肝细胞癌患者预后的关系[J]. 中华临床医师杂志:电

子版,2012,6(2):355-360.

[14] Park O,Wang H,Weng H,et al. In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression: implications for human liver disease progression[J]. Hepatology,2011,54(1):252-261.

(收稿日期:2013-11-18 修回日期:2013-12-26)