

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.22.001

## siRNA 沉默 STMN1 对食管癌 Eca-109 细胞紫杉醇敏感性的影响\*

朱鸿武, 江 丹, 谢子英, 周梅花, 孙大勇, 赵亚刚<sup>△</sup>

(广州军区广州总医院消化内科, 广州 510010)

**摘要:**目的 观察小干扰 RNA(siRNA)沉默 STMN1 其对食管癌 Eca-109 细胞紫杉醇敏感性的影响。方法 将 STMN1 siRNA 通过瞬时转染于食管癌 Eca-109 细胞,使用 qPCR 和 Western blot 实验检验转染效果,通过 MTT 实验和平板克隆实验观察 Eca-109 细胞对紫杉醇敏感性的变化,并且通过 Hoechst 33258 染料核染色后观察 Eca-109 细胞在紫杉醇作用下凋亡反应的差异。结果 成功转染 STMN1 siRNA 并有效抑制了 STMN1 的表达。转染 STMN1 siRNA 后 Eca-109 细胞对紫杉醇的药物敏感性明显增加( $P<0.01$ ),在紫杉醇作用下凋亡细胞增多( $P<0.01$ )。结论 通过 siRNA 抑制 STMN1 的表达后可以增加食管癌 Eca-109 细胞对紫杉醇的药物敏感性。

**关键词:** STMN1; siRNA; 食管癌; 紫杉醇; 化疗敏感性**中图分类号:** R571; R73-36**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2014)22-2833-03**Effects of silencing STMN1 by siRNA on sensitivity of oesophageal cancer cells Eca-109 to paclitaxel<sup>\*</sup>**Zhu Hongwu, Jiang Dan, Xie Ziyang, Zhou Meihua, Sun Dayong, Zhao Yagang<sup>△</sup>

(Department of Gastroenterology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of silencing STMN1 by siRNA on the sensitivity of oesophageal cancer cells Eca-109 to paclitaxel. **Methods** The STMN1 siRNA (siSTMN1) or scramble siRNA (SCR) were transiently transfected into Eca-109 cells. The mRNA and protein levels of STMN1 were detected by qPCR and Western blot in the Eca-109 cells of different groups. In vitro paclitaxel sensitivity of siSTMN1 and SCR transfected Eca-109 cell lines was tested by MTT assay and colony formation assay. Hoechst 33258 nuclear staining were used to investigate the effect of silencing STMN1 on the sensitivity of SCR, siSTMN1 transfected Eca-109 cells and nontreated counterparts under paclitaxel induced apoptosis. **Results** The transient transfection cell lines were successfully established. Both protein and mRNA levels of STMN1 were effectively down-regulated in the siSTMN1 transfected Eca-109 cells. Down-regulation of STMN1 significantly enhanced the sensitivity of Eca-109 cells in response to paclitaxel ( $P<0.01$ ). In addition, the siSTMN1 transfected Eca-109 cells displayed significant apoptosis as assessed by Hoechst nuclear staining ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Silencing STMN1 by siRNA could enhance the sensitivity of oesophageal cancer cells Eca-109 to paclitaxel.

**Key words:** STMN1; siRNA; oesophageal cancer; paclitaxel; chemosensitivity

食管癌是最为常见的肿瘤之一,在世界肿瘤疾病导致的死亡原因中位居第六<sup>[1]</sup>。中国是食管癌死亡率最高的国家之一,食管癌在中国癌症所致的死亡原因中位居第四<sup>[2]</sup>。有研究报道,食管癌患者即使在严格的病例选择和术前予以新辅助化疗,联合手术根治性治疗后预后仍较差,5年存活率仅在20%左右<sup>[3]</sup>。因此,提高食管癌化疗有效性、通过多模式治疗提高患者生存期和改善生存质量成为近年食管癌的研究热点。导致化疗失败的一个最主要的原因就是食管癌细胞对化疗药物的原发性或继发性耐药。但是,目前食管癌的耐药机制尚不清楚。因此,进一步研究并阐明食管癌的耐药机制有助于为临床提高食管癌患者的治疗预后提供重要的理论依据。

紫杉醇是从美国短叶红豆杉的树皮中提取而来的一种物质,因其可以促进微管聚合,抑制微管降解,使细胞分裂周期阻滞于G<sub>2</sub>/M期,最终导致肿瘤细胞凋亡,因而具有很强的抗肿瘤作用,目前已被应用于包括食管癌在内的多种肿瘤化疗之中<sup>[4]</sup>。但是,随着临床应用的增多,对紫杉醇耐药的现象也在逐渐增多<sup>[4]</sup>。STMN1是一种能够在细胞的有丝分裂期和分裂间期改变微管动力学的微管稳定化磷蛋白<sup>[5]</sup>,在许多人类癌组织中表达增加,参与了细胞增殖、细胞运动、微管动力学调

节和周期调节等功能<sup>[5]</sup>。近年来,有报道称 STMN1 在乳腺癌和骨肉瘤对紫杉醇的耐药中发挥了关键的作用<sup>[6-8]</sup>,提示 STMN1 也是一个耐药相关基因。STMN1 是否在食管癌对紫杉醇的耐药中具有促进作用呢?目前尚无研究报道。本研究使用小干扰 RNA (siRNA) 在食管癌 Eca-109 细胞中沉默 STMN1 的表达,进而通过药敏和凋亡等实验观察干预前、后食管癌细胞对紫杉醇的敏感性变化,初步探索沉默 STMN1 对食管癌细胞紫杉醇敏感性的影响。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 人食管癌 Eca-109 细胞购自中科院上海细胞库; Trizol/Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和 Opti-MEM I 购自 Invitrogen 公司; RIPA 裂解液、5X 蛋白上样缓冲液、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶配制试剂盒、PMSF、丽春红染色液、MTT 和结晶紫购自碧云天生物技术研究; NC 膜和 ECL 购自 Millipore 公司; RPMI-1640 培养基和 Hyclone 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 紫杉醇购自美国施贵宝公司; Hoechst 染色试剂盒购自碧云天生物技术研究; STMN1 siRNA 和 scramble siRNA 购自上海吉玛制药公司; 逆转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒购自宝生物 (大连) 公司。

anti-STMN1 一抗 (# 3352) 购自 Cell Signaling 公司; anti- $\beta$ -actin 一抗 (sc-47778) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗购自中杉金桥公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** Eca-109 细胞所用培养液为添加有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 除用于瞬时转染的细胞在实验前 1 周开始不使用抗菌药物以外, 所有培养液中已加入青霉素/链霉素。细胞培养于含 5%  $\text{CO}_2$  的 37  $^\circ\text{C}$  恒温培养箱内。所有用于实验的细胞均处于对数生长期。所有实验均重复 3 次。

**1.2.2 相关引物序列和 qPCR** 使用 pubmed BLAST 工具和查阅文献设计并合成相应的引物, STMN1 上游引物: 5'-TAC ACT GCC TGT CGC TTG TC-3', 下游引物: 5'-GGG GAA AGG GGG AAT TCT GG-3'; GAPDH<sup>[9]</sup>: 上游引物 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3', 下游引物: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'。采用 Trizol 氯仿法提取 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书配制反应体系并进行逆转录反应, 按照实时定量 PCR 试剂盒说明书配制反应体系并进行实时定量 PCR 反应。

**1.2.3 相关 siRNA 序列及转染实验** 根据文献[7]合成 STMN1 siRNA, 正义链: 5'-GAA ACG AGA GCA CGA GAA A-3', 反义链: 5'-UUU CUC GUG CUC UCG UUU C-3'; 无关 siRNA, 正义链: 5'-GCA AAA GAG CGA AAA G-3', 反义链: 5'-CUU UUC GCU CUU UUG C-3'。按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书进行瞬时转染步骤, 转染 6 h 以后更换培养液, 72 h 以后收取细胞进行相应的实验。

**1.2.4 Western blot 实验** 胰酶消化并收集细胞, 裂解液裂解并提取总蛋白, 测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳, 转膜并进行裁剪, 用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 封闭, 一抗 4  $^\circ\text{C}$  孵育过夜; 洗膜, 二抗室温孵育 1 h; 洗膜后加 ECL 溶液显影观察。

**1.2.5 MTT 药敏实验** 胰酶消化收集细胞, 按  $5 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔培养液 200  $\mu\text{L}$ , 待细胞贴壁 16 h; 加入适当浓度梯度的紫杉醇进行体外药物敏感性检测, 同时设置调零孔、对照孔, 培养板置于培养箱中继续孵育 72 h; 72 h 以后先后加入 MTT 溶液和二甲基亚砜 (DMSO), 用酶标仪检测吸光度并进行分析。

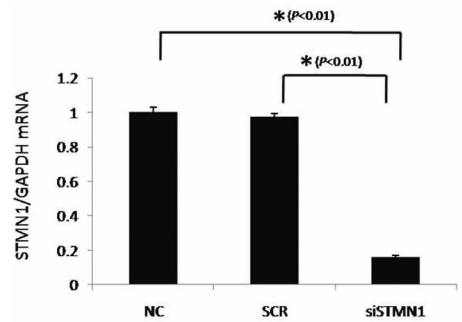
**1.2.6 平板克隆形成实验** 胰酶消化收集细胞, 按  $1 \times 10^3$ /孔的密度接种于 24 孔培养板中, 待细胞贴壁 16 h 后; 加入 0.04  $\mu\text{mol/L}$  的紫杉醇进行体外药物敏感性检测, 每 3 d 更换培养液 1 次, 共计培养 14 d; 14 d 后, 弃培养液, 清洗、固定, 0.5% 结晶紫染色, 数码相机拍照后用 Photoshop CS3 软件进行统计分析。

**1.2.7 Hoechst 33258 核染色实验** 胰酶消化收集细胞, 按  $1 \times 10^6$ /孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁 16 h; 加入 0.1  $\mu\text{mol/L}$  的紫杉醇, 培养板置于培养箱中继续孵育 36 h 诱导凋亡; 36 h 以后, 按 Hoechst 试剂盒说明书染色、封片, 用荧光显微镜观察并拍照。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件对实验数据进行分析, 组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 转染 STMN1 siRNA 前、后 Eca-109 细胞 STMN1 表达水平的变化** qPCR 和 Western blot 检测结果提示, 转染 STMN1 siRNA 72 h 以后, 食管癌 Eca-109 细胞中的 STMN1 的 mRNA 表达水平(图 1)和蛋白水平(图 2)均明显下降。



NC: 未转染 siRNA 对照组; SCR: 无关对照 siRNA 转染组; siSTMN1: 特异性 STMN1 siRNA 转染组。

图 1 转染 siRNA 前、后食管癌 Eca-109 细胞中 STMN1 mRNA 的表达变化(GAPDH 作为内参基因)

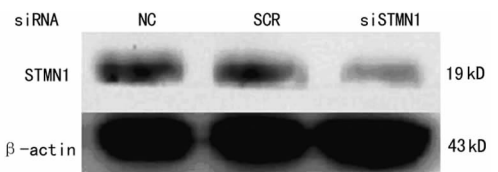


图 2 转染 siRNA 前、后食管癌 Eca-109 细胞中 STMN1 蛋白的表达变化( $\beta$ -actin 作为内参)

**2.2 MTT 药敏实验结果提示沉默 STMN1 可增加紫杉醇对 Eca-109 细胞的抑制率** MTT 药敏实验结果显示, 采用特异性 siRNA 沉默 STMN1 的表达后, 食管癌 Eca-109 细胞相对于非特异 siRNA 转染组的细胞, 对紫杉醇的  $\text{IC}_{50}$  值明显下降 ( $P < 0.01$ ), 提示对药物敏感性增加(图 3)。

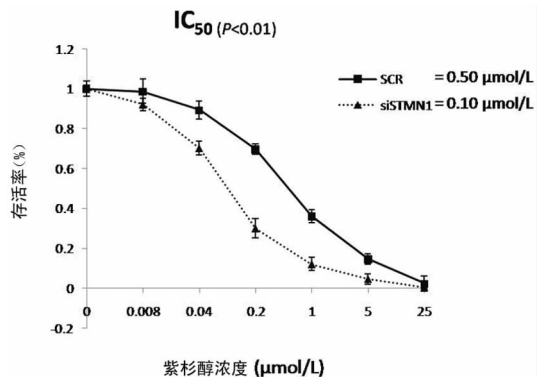
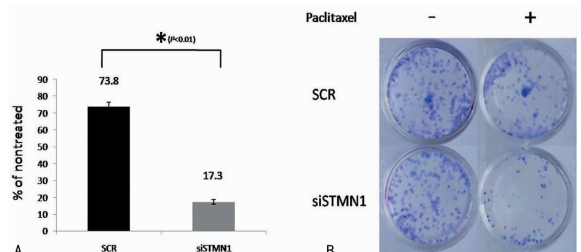


图 3 沉默 STMN1 后 Eca-109 细胞对紫杉醇的敏感性

**2.3 平板克隆形成实验结果提示沉默 STMN1 可增加 Eca-109 细胞对紫杉醇的敏感性** 平板克隆形成实验结果显示, 采用特异性 siRNA 沉默 STMN1 的表达后, 食管癌 Eca-109 细胞在 0.04  $\mu\text{mol/L}$  紫杉醇的作用下平板克隆数目与非特异 siRNA 转染组比较有明显减少, 见图 4。

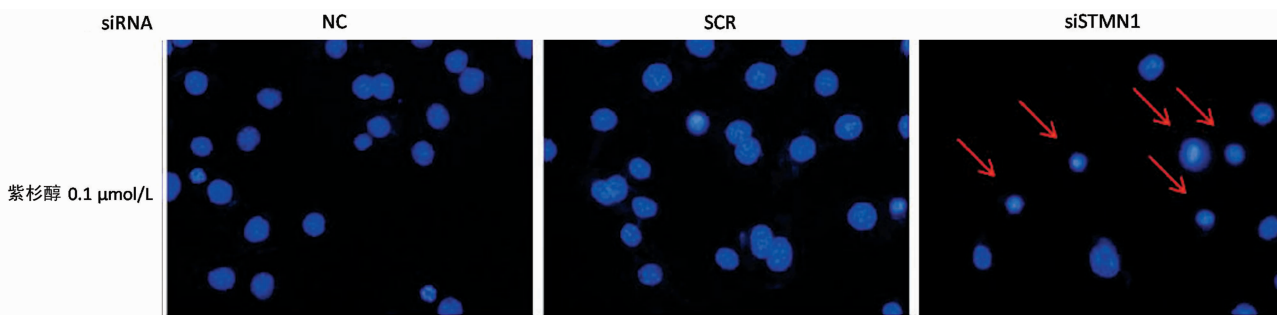


A: 统计结果; B: 有代表性的平板克隆染色照片。

图 4 沉默 STMN1 后食管癌 Eca-109 细胞紫杉醇作用下克隆形成数目

2.4 沉默 STMN1 后 Eca-109 在紫杉醇作用下凋亡增加 与空白对照组和无关 siRNA 转染组相比,转染了 STMN1 特异性 siRNA 的 Eca-109 细胞在 0.1  $\mu\text{mol/L}$  紫杉醇作用 36 h 以

后,Hoechst 33258 染料核染色显示核浓染和碎裂的细胞明显增多(图 5),提示凋亡细胞数目增加。



NC:未转染 siRNA 对照组;SCR:无关对照 siRNA 转染组;siSTMN1:特异性 STMN1 siRNA 转染组。

图 5 沉默 STMN1 后食管癌 Eca-109 细胞在紫杉醇作用下凋亡增加( $\times 400$ )

### 3 讨 论

紫杉醇为紫杉烷类代表性的一种物质,目前已被广泛应用于食管癌等多种恶性肿瘤的化疗方案之中<sup>[4,10]</sup>。但是,紫杉醇也具有较强的不良反应,如过敏反应、脱发、骨髓抑制和周围神经病等<sup>[11]</sup>,一定程度上影响了该药的使用。近年来,紫杉醇在肿瘤治疗中的原发性和继发性耐药问题逐渐受到重视。如何降低紫杉醇耐药的发生,甚至在降低该药的使用浓度亦能同样达到有效杀伤肿瘤细胞的作用,对临床食管癌患者的治疗具有重要的意义。

STMN1 也被称作 stathmin 1、肿瘤蛋白 18、metablasin、p18 或 p19,它由位于人染色体 1p36.1 的 STMN1 基因编码,是一种能够在细胞有丝分裂期和分裂间期改变微管动力学的微管脱稳定化磷蛋白<sup>[5]</sup>。STMN1 在细胞正常生理中参与了有丝分裂中微管的调节,但是,在肿瘤细胞中常常发生因为 STMN1 失调而导致有丝分裂纺锤体功能减退和导致对紫杉醇的耐药<sup>[12]</sup>。近年来亦有研究报道 STMN1 可促进乳腺癌和骨肉瘤对紫杉醇的耐药<sup>[6-8]</sup>。因此,推测 STMN1 很可能也参与了食管癌细胞对紫杉醇的耐药。

本研究通过脂质体转染法将 STMN1 siRNA 瞬时转染入食管癌 Eca-109 细胞中,qPCR 和 Western blot 提示基因干扰效果确切,转染后 STMN1 无论是 mRNA 水平还是蛋白水平均有明显下降。进一步在细胞药敏实验中发现,沉默 STMN1 的表达后食管癌 Eca-109 细胞对紫杉醇的化疗敏感性明显增强。由此推测,在有效沉默 STMN1 的表达后,即使降低紫杉醇的药物浓度亦可以同样有效地杀伤食管肿瘤细胞,因此有助于临床中降低化疗药物用量,减少不良反应的发生和提高治疗有效性。在细胞凋亡实验的检测中,发现沉默 STMN1 的表达后,食管癌 Eca-109 细胞在紫杉醇作用下凋亡也明显增加,提示 STMN1 导致的耐药机制之一可能为减少食管癌细胞在紫杉醇作用下的凋亡。

综上所述,STMN1 在食管癌对紫杉醇的化疗敏感性中发挥了关键的作用,通过 siRNA 有效沉默 STMN1 的表达有助于增强食管癌对紫杉醇化疗的敏感性并导致食管癌细胞化疗下凋亡的增加。本研究结果有助于进一步阐明食管癌对紫杉醇耐药的机制,亦可能有助于为临床中减少紫杉醇类药物不良反应和降低化疗耐药的发生提供理论依据。

### 参考文献:

[1] Schweigert M, Dubecz A, Stein HJ. Oesophageal cancer-

an overview[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10 (4): 230-244.

[2] 钟钊,谭家驹,徐致祥. 食管癌流行病学病因学研究进展 [J]. 河南预防医学杂志, 2011, 22(1): 1-10, 17.

[3] Crosby T, Evans M, Gillies RS, et al. The management of a patient with an operable carcinoma of the oesophagus [J]. Ann R Coll Surg Engl, 2009, 91(5): 366-370.

[4] Yared JA, Tkaczuk KH. Update on taxane development: new analogs and new formulations[J]. Drug Des Devel Ther, 2012, 6: 371-384.

[5] Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle[J]. J Cell Biochem, 2004, 93(2): 242-250.

[6] Carr JR, Park HJ, Wang Z, et al. Foxm1 mediates resistance to herceptin and paclitaxel[J]. Cancer Res, 2010, 70 (12): 5054-5063.

[7] Wang R, Dong K, Lin F, et al. Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression[J]. Mol Med, 2007, 13(11/12): 567-575.

[8] Alli E, Bash-Babula J, Yang JM, et al. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 6864-6869.

[9] Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of sirt1 enable human epithelial cancer cell growth and survival[J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10457-10463.

[10] Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin [J]. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2002, 2(1): 1-17.

[11] Gligorov J, Lotz JP. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences[J]. Oncologist, 2004, 9(Suppl 2): 3-8.

[12] McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, et al. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1785(2): 96-132.