

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.35.004

siRNA 沉默 Livin 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞化学治疗增敏作用的研究*

段文晶, 蒋爱梅, 段体德, 李维炜, 王艳梅[△]

(昆明医科大学第一附属医院乳腺外科, 昆明 650031)

摘要:目的 观察小干扰 RNA(siRNA)沉默 Livin 基因对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞生物学影响及 siRNA 沉默 MCF-7 细胞 Livin 基因对 4 种化学治疗药物的增敏作用。方法 Lipofectamine 2000 脂质体转染法转染 MCF-7。分组:空白组(无转染)、脂质体组、反义组、错义组、联合组。MTT 法测定氟尿嘧啶(5-FU)、表柔比星(EPI)、多西紫杉醇(DXT)、吉西他滨(GEM)单药(单药组)对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制作用。免疫组织化学检测 Livin 蛋白在 MCF-7 细胞中的表达及转染联合化学治疗药物对 Livin 蛋白的表达变化。实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测转染 Livin siRNA 后乳腺癌 MCF-7 细胞的 Livin 基因表达变化。同时利用 Annexin-V 检测乳腺癌细胞的凋亡及 siRNA Livin 联合 5-FU、EPI、DXT、GEM 诱导乳腺癌细胞凋亡的影响。结果 Livin 在 MCF-7 细胞中高表达,4 种化学治疗药物对 Livin 表达无明显影响,转染 Livin 基因 48、72 h 后联合 4 种药物后能明显下调 Livin 蛋白表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。5-FU、EPI、DXT、GEM 治疗乳腺癌 MCF-7 细胞 48、72 h 均能明显的引起细胞的凋亡,且呈剂量依赖性。转染 Livin 基因 48 h 联合 4 种药物后乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡率明显高于单药处理的细胞,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 siRNA 沉默 Livin 基因能促进由化学治疗药物 5-FU、EPI、DXT、GEM 引起的细胞凋亡,具有化学治疗增敏作用。

关键词:RNA, 小分子干扰; 乳腺肿瘤; Livin 基因; 化学治疗增敏

中图分类号: R73-36

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)35-4715-04

Chemosensitization effect of siRNA silence Livin gene on breast cancer MCF-7 cell*

Duan Wenjing, Jian Aimei, Duan Tide, Li Weiwei, Wang Yanmei[△]

(Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650031, China)

Abstract: Objective To observe the biological effect of small interfering (siRNA) silencing Livin gene expression on human breast cancer MCF-7 cell and sensitization of siRNA silencing MCF-7 cell Livin gene on four kinds of chemotherapy drugs. **Methods** MCF-7 was transfected by Lipofectamine 2000 system. There are 5 groups: control group (no transfection), liposomes group, antisense group, missense group and combination group. MTT assay was be used to detect the inhibition effect of 5-fluorouracil (5-FU), epirubicin (EPI), docetaxel (DXT), gemcitabine (GEM) on breast cancer cell MCF-7 proliferation, immunohistochemistry was be carried to detect the Livin gene expression of MCF-7 cells and the change of Livin protein expression by transformation chemotherapy drugs. The change of Livin gene expression of breast cancer MCF-7 cell which was transformation Livin siRNA by RT-PCR examination. At the same time, Annexin-V was used to detect breast cancer apoptosis and siRNA Livin induced breast cancer apoptosis with 5-FU, EPI, DXT, GEM. **Results** Livin gene was highly expressed in MCF-7 cell, there were no obvious differences on Livin expression of four kinds of chemotherapy drugs, the four drugs reduced the expression of Livin gene protein significantly after Livin gene was transfected 48, 72 h later ($P < 0.05$). 5-FU, EPI, DXT, GEM induced the apoptosis of breast cancer MCF-7 after 48 h and 72 h later, and it was dose-dependence, the apoptosis rate of breast cancer MCF-7 cells 48 h of combination group was higher than that of the group which use only chemotherapy drugs significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** siRNA silencing Livin gene could accelerate 5-FU, EPI, DXT, GEM induced cell apoptosis and it possess chemotherapy sensitization.

Key words: RNA, small interference; breast neoplasms; Livin gene; chemosensitization

当前,乳腺癌是严重威胁女性健康的最常见的恶性肿瘤,在过去几十年里,尽管在乳腺癌的早期诊断和综合治疗方面取得了很大发展,但是其进展期的治疗效果依然不佳。从治疗的细胞学层面来看,一般的放射治疗、化学治疗和免疫治疗对凋亡调控缺陷的肿瘤细胞无法发挥有效的杀伤作用。Livin 是近年来发现的一个凋亡抑制基因, Yagihashi 等^[1]报道在乳腺癌患者的血清中针对 Livin 的抗体比健康人有显著增高。有研

究表明, Livin 蛋白在正常乳腺组织、乳腺增生性病变、乳腺非浸润性癌和浸润性癌组织中阳性表达率为 7.1%、29.8%、65.0%、73.1%^[2]。有研究结果显示, Livin 可能参与乳腺癌的发生、发展, Livin 可能成为治疗乳腺癌一个潜在的靶基因。笔者通过研究乳腺癌化学治疗的主要药物氟尿嘧啶(5-FU)、表柔比星(EPI)、多西紫杉醇(DXT)、吉西他滨(GEM)联合小干扰 RNA(siRNA)沉默 Livin 基因表达对人乳腺癌细胞 MCF-7

* 基金项目: 云南省科技厅科学研究项目(2012Y015); 昆明医学院第一附属医院博士启动金项目(2013BS05)。 作者简介: 段文晶(1973-), 硕士, 副主任医师, 主要从事乳腺外科临床工作。 [△] 通讯作者, Tel: 15087122464; E-mail: wangyanmei_yn@126.com。

细胞凋亡的影响,为探讨化学治疗增敏及 Livin 的基因功能提供一些实验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海生命科学研究所细胞库。胎牛血清购自美国 Gibco 公司。5-FU, 每支 250 mg; EPI, 每支 10 mg; DXT, 每支 20 mg; GEM, 每支 1 g; 分别购自天津金耀有限公司、辉瑞制药(无锡)有限公司、江苏恒瑞医药股份有限公司、法国礼来制药有限公司。MTT、二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。兔抗人 Livin 多克隆抗体购自 Imgenex 公司。免疫组织化学试剂盒 SP-9001 购自北京中杉金桥生物有限公司。Lipofectamine 2000、PCR 扩增引物由 Invitrogen 公司提供。Pemin Tag HOT start version 2×PCR 购自大连宝生物公司。PCR 所用 Taq 酶及 RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7 培养于 10% 胎牛血清 RPMI-1640 完全培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 根据文献设计合成反义寡核苷酸(ASODN)序列为:5'-GCA CTG TCT TTA GGT CCC AT-3'。无关错义序列(NSODN)序列为:5'-CAT CTG GCC TGC ATT GTT CA-3'作为对照,以证明 ASODN 具有序列特异性。由 Invitrogen 公司合成,Lipofectamine 2000 进行转染。

1.2.3 MTT 测定药物敏感性 取对数生长期 MCF-7 细胞,调整悬液细胞浓度为 1×10^5 个/mL;按 200 μ L/孔接种于 96 孔板上,待细胞贴壁后分别加入 5-FU、EPI、DXT、GEM 各 20 mL。药物终浓度如下,EPI: 0. 625 0、1. 250 0、2. 500 0、5. 000 0、10. 000 0 μ g/mL; 5-FU: 12. 500 0、25. 000 0、50. 000 0、100. 000 0、200. 000 0 μ g/mL; DXT 和 GEM: 0. 312 5、0. 625 0、1. 250 0、2. 500 0、5. 000 0 μ g/mL。每组药物浓度设 5 个复孔,另设不加药物的阴性对照组、空白调零组。分别于加药后 24、48、72 h 后加入 5 mg/mL 的 MTT 液孵育 4 h 后,用酶标仪测定各孔光密度(OD)值,测定波长为 490 nm。计算各个浓度细胞抑制率,肿瘤细胞抑制率=(空白对照组 OD 值-实验组 OD 值)/空白对照组 OD 值。采用 SPSS17.0 计算药物半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 免疫细胞化学法检测 Livin 在乳腺癌 MCF-7 中的表达

取对数生长的细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔培养板中,1 mL/孔(内置 10 mm×10 mm 玻片,用于爬片)。实验分为空白组、反义组及错义组。以 1/3 (IC₅₀) 的 5-FU、EPI、DXT、GEM 处理细胞,48 h 后收集细胞用 4% 多聚甲醛固定。用 PBS 冲洗加 3% H₂O₂ 室温 20 min, PBS 再冲洗。正常山羊血清 37 °C 封闭 30 min,倾去。加一抗(兔抗人 Livin 单克隆抗体, PBS 稀释, 1:10 000),以 PBS 代替一抗作阴性对照,4 °C 过夜。依次加入二抗、三抗后 37 °C 孵箱各孵育 30 min。各步骤间以 PBS 冲洗,最后 DAB 染色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在高倍镜下选 5 个不同视野,每个视野均进行阳性细胞百分比计分和着色强度计分,计数阳性细胞与总细胞数比例。免疫组织化学结果的判读采用人工计数方法阳性判断标准:光镜下细胞质内出现棕色颗粒表示 Livin 免疫反应呈阳性,阴性对照中无棕色颗粒出现。阳性细胞百分比计分,按视野内细胞

阳性所占总细胞数的比例计分:≤25%、26%~50%、51%~75%、>76% 分别计分为 0、1、2、3、4 分。着色强度计分:按阳性细胞着色无、弱(淡黄)、中(棕黄)、强(棕褐)分别计分为 0、1、2、3 分。结果判定:本实验中每张切片随机取 5 个 400 倍视野,每个视野均进行阳性细胞百分比计分和着色强度计分,上述 2 种计分结果相加,0 分为阴性;2~3 分为弱阳性;4~5 分为中等阳性;6~7 分为强阳性。

1.2.5 RT-PCR 检测转染 Livin siRNA 及转染后分别联合 4 种化学治疗药物乳腺癌 MCF-7 细胞 Livin 基因表达水平 收集经小片段 Livin 基因转染、联合化学治疗药物处理后的 MCF-7 细胞制备成单个核细胞悬液,提取细胞的 RNA,采用 Trizol 试剂盒进行提取。以上述步骤提取的总 RNA 作为模板,使用 MO-MLR 逆转录酶合成 cDNA,扩增引物序列如下: Livin 上游:5'-TTC TAT GAC TGG CCG CTG AT-3'; Livin 下游:5'-GGG CTG CGT CTT CCG GTT CT-3'; 扩增长度为 283 bp。β-actin 上游:5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3'; β-actin 下游:5'-GGA CTC GTC ATA CTC CTG CT-3'; 扩增长度为 540 bp。PCR 反应条件 94 °C 变性 30 s; 60 °C 退火 60 s; 72 °C 延伸 1 min。反应 35~45 个循环。然后 72 °C 再延伸 5 min。94 °C 30 s, 72 °C 3 min 查看溶解曲线。

1.2.6 Annexin-V 流式细胞仪检测细胞凋亡 将对数生长的细胞培养于 50 mL 培养瓶中,各组于处理后 48 h 收集经过不同浓度药物处理的细胞株,用 0.25% 胰酶消化培养细胞,用 0.1 mol PBS 洗 2 遍,用预冷 70% 乙醇在 -20 °C 固定 24 h,再用 0.1 mol PBS 洗 2 遍,弃上清液;细胞沉淀中加入 0.1% RNA 酶 A 溶液 150 μ L,重悬细胞,4 °C 30 min;将细胞悬液混匀,用 200 目铜网过滤 MCF-7 细胞到流式专用细胞管中,以除去细胞团块,留下单个悬浮细胞。加入 5 μ L Annexin-V+195 μ L PBS 室温下 10 min, PBS 洗 1 次,加入 10 μ L PI+190 μ L PBS。FACScan 流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较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 免疫细胞化学法检测 Livin 在乳腺癌 MCF-7 中的表达 免疫细胞化学结果显示 Livin 在 MCF-7 细胞中高表达,用 RNAi 小片段 Livin 基因转染后的 MCF-7 细胞中表达下调明显,提示转染后细胞 Livin 基因受到抑制且 Livin 蛋白明显下调。与空白组及错义组的 MCF-7 细胞的表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

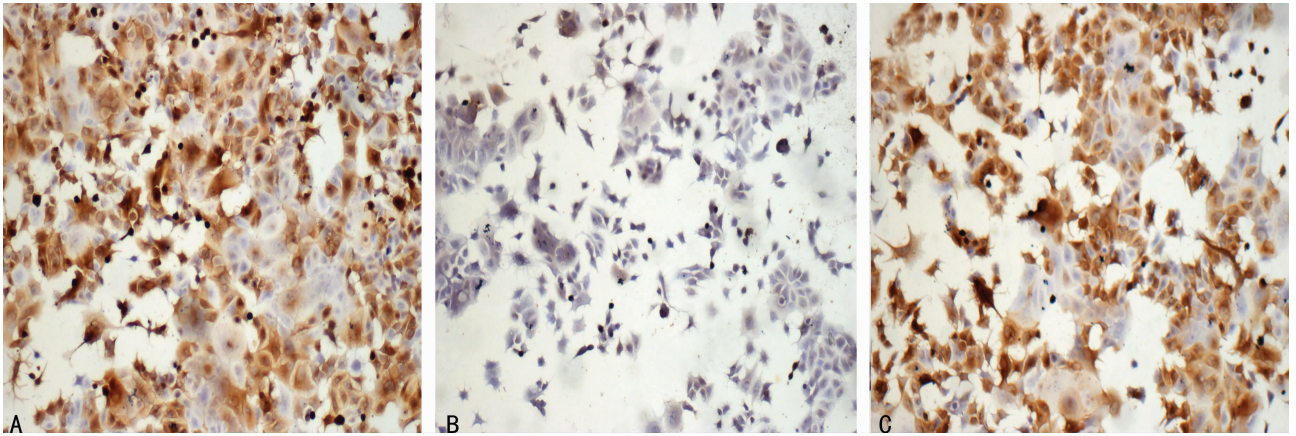
2.2 MTT 法检测 4 种化学治疗药物对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响 5-FU、EPI、DXT、GEM 处理 MCF-7 细胞 48 h 和 72 h 均能明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖且呈剂量依赖性。单因素方差分析结果显示,空白组与各药物组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。IC₅₀ 分别为 EPI 0. 118 μ g/ μ L, 5-FU 19. 700 μ g/ μ L, DXT 0. 975 μ g/ μ L, GEM 3. 375 μ g/ μ L。

2.3 转染 Livin siRNA 后分别联合 4 种化学治疗药物对 Livin 基因蛋白表达的影响 以 5-FU、EPI、DXT、GEM 4 种药物对 MCF-7 的半数抑制浓度的 1/3 的浓度作为联合用药的浓度,应用小干扰 Livin 基因片段转染乳腺癌 MCF-7 细胞,同时联合 4 种药物,观察 Livin 蛋白表达。结果显示 4 种药物对 Livin 蛋

白表达无明显影响,干扰 Livin 联合 4 种药物后 Livin 蛋白明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

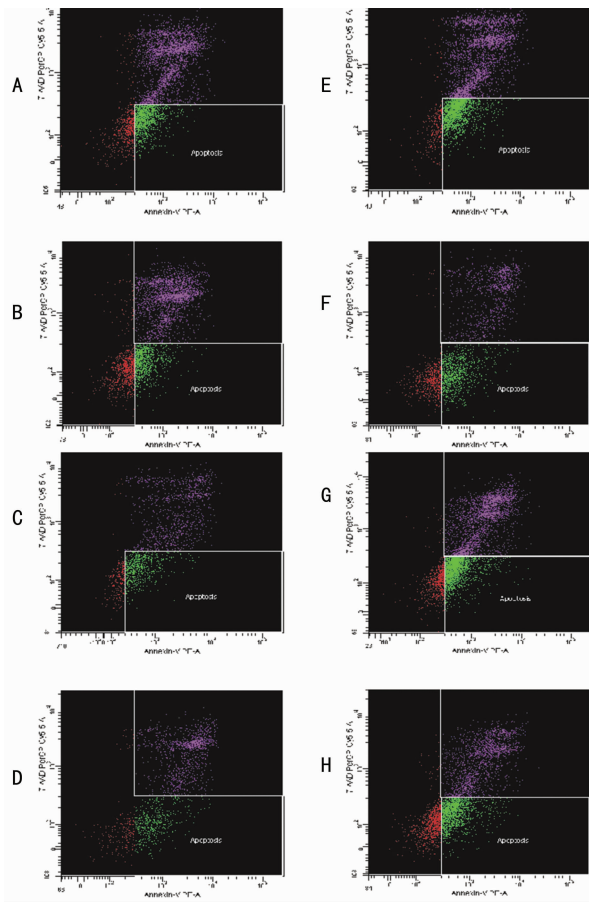
2.4 Annexin-V 流式细胞仪检测药物联合小干扰 RNA 对 MCF-7 细胞凋亡的影响 转染后 48 h 联合组的乳腺癌 MCF-

7 细胞的凋亡率明显高于单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白组与脂质体组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。



A:空白组;B:反义组;C:错义组。

图 1 各组细胞 Livin 蛋白表达差异比较(免疫组织化学×400)



A:5-FU;B:EPI;C:DXT;D:GEM;E:转染+5-FU;F:转染+EPI;G:转染+DXT;H:转染+GEM。

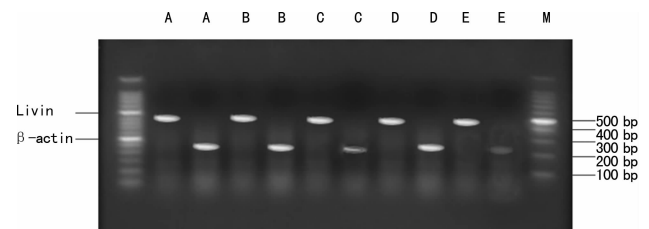
图 2 流式细胞仪分析单药组和联合组 MCF-7 凋亡率的变化

2.5 各组乳腺癌 MCF-7 细胞 Livin 基因表达水平 转染 siRNA Livin 48 h 后 RT-PCR 结果显示可明显下调 Livin 的 mRNA 表达,PCR 产物的条带亮度明显变淡;联合组与空白组、脂质体组、错义组及反义转染组比较,联合组与反义组的乳腺癌

MCF-7 细胞中的 Livin 基因表达明显下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合组 Livin 基因表达水平与反义组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

表 1 4 种药物与 siRNA Livin 联合对 Livin 表达的结果分析($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	阴性	弱阳性	阳性	强阳性	Z
反义组	22	5	3	0	83.02
转染+5-FU	25	2	1	0	71.61
转染+EPI	26	1	1	0	69.16
转染+DXT	27	1	0	0	66.45
转染+GEM	27	1	0	0	66.45



A:空白组;B:脂质体组;C:反义组;D:错义组;E:联合组, M: Marker。

图 3 5 组 Livin/ β -actin PCR 产物电泳图

3 讨论

近年来,随着凋亡抑制蛋白 IAPs 家族的发现和深入研究,各国学者发现,高表达的 IAPs 抑制了放射治疗、化学治疗引起的肿瘤细胞的凋亡调节失衡,使得本来应该进入凋亡的肿瘤细胞得以存活并加剧了突变积累,同时促成了肿瘤细胞的耐药性^[3-5]。Livin 作为 IAPs 家族的一员,主要定位于细胞核内或以丝状形式定位于细胞质,拥有一个 BIR 结构域和一个 RING 指基序。其中,RING 指基序在一些别的 IAPs 成员中有过深入研究,被认为主要负责泛素化凋亡调控蛋白并将其降

解,因此在 IAPs 的功能发挥上起着重要作用^[6-7]。但与其他 IAPs 成员不同的是, Livin 定位于细胞核内,研究发现 RING 指基序可能对 Livin 的亚细胞定位起着重要作用,在本研究采用的 MCF-7 乳腺癌细胞中,野生型 Livin 也分布于整个细胞质^[8],提示 Livin 在乳腺癌的发生、发展中有着更加独特的作用。目前在乳腺癌细胞中针对 Livin 基因进行的相关研究甚少,本研究首先采用免疫组织化学方法检测 Livin 在乳腺癌 MCF-7 中的表达情况,结果显示, Livin 在 MCF-7 细胞中高表达。免疫细胞化学的结果还显示, Livin 主要在细胞质中聚集,这与文献报道相同^[9],表明其主要在细胞质中发挥调控凋亡通路的作用。

促凋亡和抗凋亡系统的平衡在肿瘤的发病机理中扮演了重要角色,寻找一种新的途径能有效抑制肿瘤细胞生长和增加其对化学治疗的敏感性有重要的意义^[10-11]。Livin 可作为肿瘤恶性改变的分子标记和预后指标。本研究结果显示 Livin 基因在 MCF-7 细胞中增强了恶性细胞对化学治疗药物诱导凋亡的敏感性。Ding 等^[12]在结直肠癌中也得出了相似的结论,在 HCT116、RKO、KM12C、SW620 等结直肠癌细胞系中, Livin 基因的表达水平与细胞对顺铂诱导的凋亡的相应水平有关,而顺铂处理的细胞中 Livin 基因的 RNA 水平显著升高,提示 Livin 基因的转录被上调。本研究通过 MTT 法观察转染 siRNA Livin 及分别联合化学治疗药物对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响结果显示,对 Livin 基因的干扰能够有效地增强乳腺癌 MCF-7 细胞对 4 种乳腺癌常用化学治疗药物的敏感性。处理 MCF-7 48 h 和 72 h 均能明显的引起 MCF-7 的凋亡,且呈剂量依赖性。4 种化学治疗药物对 Livin 蛋白表达无明显影响, siRNA Livin 转染使乳腺癌细胞 MCF-7 的 Livin 蛋白的表达明显下调。siRNA Livin 联合 5-FU、EPI、DXT、GEM 能有效地诱导乳腺癌细胞的凋亡。通过流式细胞仪的分析,转染后 48 h 后联合组的乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡率比各单药组显著上调。这提示靶向 Livin siRNA 可能会增强乳腺癌细胞 MCF-7 对于 EPI、5-FU、DXT、GEM 的敏感性, Livin siRNA 对化学治疗药物治疗起到辅助作用。在后续研究中,还需要用更多种类的乳腺癌细胞及化学治疗药物,以分析 Livin 的表达与化学治疗敏感性之间的关系。

综上所述,本研究采用 Livin siRNA 实现了乳腺癌 MCF-7 细胞转录后的基因沉默,诱导癌细胞发生凋亡使 G₁、G₀ 期细胞进入细胞周期,可能克服了乳腺癌细胞的耐药,有效地增强乳腺癌细胞对化学治疗药物的敏感性,抑制癌细胞的增殖,促进凋亡。

参考文献:

[1] 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.

- [2] 陈建华, 范钦和, 陈森. Livin 在乳腺癌中的表达及与 c-erbB-2 和激素受体的关系[J]. 诊断病理学杂志, 2008, 15(4): 320-323.
- [3] Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are regulated by tumour necrosis factor-alpha in malignant pleural mesothelioma[J]. J Pathol, 2007, 211(4): 439-446.
- [4] Li J, Feng Q, Kim JM, et al. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins[J]. Endocrinology, 2001, 142(1): 370-380.
- [5] Tamm I, Kornblau SM, Segall H, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(5): 1796-1803.
- [6] Macfarlane M, Merrison W, Bratton SB, et al. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro[J]. J Biol Chem, 2002, 277(39): 36611-36616.
- [7] Morizane Y, Honda R, Fukami K, et al. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO[J]. J Biochem, 2005, 137(2): 125-132.
- [8] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 330-338.
- [9] Nedelcu T, Kubista B, Koller A, et al. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(2): 237-244.
- [10] Di Cosimo S, Baselga J. Targeted therapies in breast cancer: where are we now? [J]. Eur J Cancer, 2008, 44(18): 2781-2790.
- [11] Fulda S. Tumor resistance to apoptosis[J]. Int J Cancer, 2009, 124(3): 511-515.
- [12] Ding ZY, Liu GH, Olsson B, et al. Upregulation of the antiapoptotic factor Livin contributes to cisplatin resistance in colon cancer cells[J]. Tumour Biol, 2013, 34(2): 683-693.

(收稿日期: 2014-06-22 修回日期: 2014-09-29)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“ChongqingMedicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。