

• 论 著 •

慢病毒载体介导 survivin 基因 siRNA 对裸鼠移植人肺腺癌的体内抗癌机制研究^{*}

隋玉飞¹, 刘乃政², 司 磊^{2△}

(1. 东营市河口区人民医院, 山东东营 257243; 2. 聊城市人民医院, 山东聊城 252000)

摘 要:目的 探讨慢病毒载体介导 survivin 基因小片段干扰 RNA(siRNA)对裸鼠移植人肺腺癌的体内抑瘤活性。方法 制备表达 survivin-siRNA 的慢病毒载体,构建裸鼠移植人肺腺癌模型,将裸鼠分为空白组(PC组)、空白载体组(NC组)、实验组(RNAi组)3组,分别给予生理盐水、空白病毒载体和 siRNA;siRNA 组肿瘤组织局部注射表达 survivin-siRNA 的慢病毒载体,观察肿瘤体积及其随时间的生长变化曲线;分别采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)及蛋白质印迹法检测各组裸鼠肿瘤组织中 survivin 基因的信使 RNA(mRNA)及其表达的蛋白水平变化;采用流式细胞术检测肿瘤细胞周期组方图变化。**结果** 慢病毒载体介导 survivin-siRNA 对裸鼠肺腺癌的抑瘤率为 46.07%;siRNA 组瘤重与 NC 组和 PC 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而 NC 组与 PC 组瘤重比较差异无统计学意义($P>0.05$);siRNA 组 survivin 基因 mRNA 及蛋白表达较 NC 组和 PC 组明显降低,抑制率分别为 72.00%、53.00%;G₁ 期细胞百分比明显增加,S 期细胞百分比则明显减少。**结论** 慢病毒载体介导的 siRNA 能有效抑制裸鼠移植人肺腺癌 survivin 基因的表达,有效激发细胞凋亡。

关键词:肺腺癌; survivin 基因; 小片段干扰 RNA; 慢病毒载体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0583-03

The study on anticancer mechanism of the lentiviral vectors mediated siRNA targeting survivin gene on human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice in vivo^{*}

Sui Yufei¹, Liu Naizheng², Si Lei^{2△}

(1. Hekou District People's Hospital of Dongying City, Dongying, Shandong 257243, China;

2. the People's Hospital of Liaocheng City, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: **Objective** To explore tumor inhibitory effect of the lentiviral vectors mediated small interfering RNA(siRNA)targeting survivin gene on human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice in vivo. **Methods** The lentiviral vector expressing survivin-siRNA was prepared. Then established human lung adenocarcinoma-bearing nude mice model, and divided nude mice into three groups, including the blank control group(PC group), blank vector group(NC group) and experiment group(RNAi group), treated with physiological saline, blank viral vector and siRNA respectively. The lentiviral vectors expressing survivin-siRNA were locally injected in tumor tissues of nude mice in the RNAi group. Then observed the curve about changes of tumor volume in different time. The expression levels of protein and mRNA were detected by using Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). The histogram of tumor cell cycle were examined by using flow cytometry. **Results** The rate of tumor inhibition of lentiviral vectors mediated survivin-siRNA on lung adenocarcinoma in nude mice was 46.07%. There were significant differences in tumor weight between siRNA group and NC group, PC group($P<0.05$), while no statistically significant difference was found between NC group and PC group($P>0.05$). Compared with NC group and PC group, the expression levels of survivin mRNA and protein were decreased, and rates of inhibition were 72.00% and 53.00% respectively. The percentage of G₁ phase cells was increased, whereas the percentages of S phase cells was decreased. **Conclusion** The lentiviral vectors mediated siRNA could effectively inhibit survivin gene expression on human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice and markedly induce the apoptosis of tumor.

Key words: lung adenocarcinoma; survivin gene; small interfering RNA; lentiviral vector

RNA 干扰(RNAi)技术可以有效地抑制特定基因的表达,恶性肿瘤组织中 survivin 基因多为高表达,且 survivin 基因高表达的恶性肿瘤多预后不良,而正常组织中该基因并不表达,基于选择性表达的特性 survivin 基因成为肿瘤基因治疗的研究热点和新的诊断及治疗靶点。有研究证实,抑制 survivin 基因的表达可明显诱发肿瘤细胞凋亡^[1]。另外有研究表明,可成功地借助 RNAi 技术在体内实验中明显抑制肿瘤及其衍生血管的生长^[2]。本研究采用转染效率最高的慢病毒载体,将合成

的靶向 survivin 基因的小片段干扰 RNA(siRNA)通过慢病毒载体导入肿瘤细胞,构建裸鼠移植瘤动物模型,采用体内给药的方式观察肿瘤变化,并检测该基因在体内的表达,以研究 RNAi 技术在恶性肿瘤基因治疗的体内实验临床价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/C nu/nu 裸鼠,4~6 周龄,体质量约 20 g,购于北京中国医学科学院实验动物研究所。裸鼠饲养于恒温(22~25℃)、恒定湿度的无特定病原体(SPF)层流罩中。

^{*} 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2014WS0042)。

作者简介:隋玉飞,男,主管检验师,主要从事免疫和生物医学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: sl8896@163.com。

经高压灭菌的标准饲料和水,供动物自由饮食。

1.2 主要试剂 慢病毒载体介导的 survivin-siRNA 由上海吉凯基因公司制备;A549 细胞购自上海吉凯基因公司;逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)相关试剂购自德国 Qiagen 公司;鼠抗人 survivin 及小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自美国 CST 公司;辣根过氧化物酶(HCRP)标记二抗购自美国 Sigma 公司;ECL+plusTM 显色试剂盒购自瑞典 Amersham 公司;其他试剂由本院中心实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 survivin-siRNA 合成 选择 survivin 基因(基因序列号为 NM_001168)互补 DNA(cDNA)序列上的一个位点,利用 BLAST 确定序列特异性,根据目的信使 RNA(mRNA)序列,设计 3 条 RNA 干扰靶序列(上海吉凯基因化学技术公司)并合成其短发夹状 RNA(shRNA)的 DNA 寡核苷酸(Oligo),序列如下:正义链为 5'-GAG GCT GGC TTC ATC CAC TGC-3',反义链为 5'-GCA GTG GAT GAA GCC AGC CTC-3'(基因序列位置:241)。把退火的 DNA 模板双链连接到线性载体中。采用 T4 连接酶,插入片断与载体的摩尔比约为 3:1。连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌,在 LB Amp 培养基上涂板,37℃ 培养过夜。挑取转化的菌落 PCR,2%琼脂糖凝胶电泳鉴定具有 shRNA 编码序列的阳性克隆。测序鉴定 PCR 阳性克隆的引物序列,上游引物:5'-GTG TCA CTA GGC GGG AAC AC-3';下游引物:5'-TTA TTC CCA TGC GAC GGT ATC-3'。

1.3.2 慢病毒载体制备 绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的慢病毒载体 pGCL-GFP 20 μ g、pHelper1.0(gag/pol 元件)载体 15 μ g、pHelper2.0(VSVG 元件)载体 10 μ g 混合包装 293T 细胞,收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液,于 4℃,3 000 r/min 离心 10 min;以 0.45 μ m 滤器过滤后置于 40 mL 超速离心管中,4℃,25 000 r/min 离心 20 min;而后以冰磷酸盐缓冲液(PBS)重旋病毒沉淀,于 4℃溶解过夜。取 6 个 Eppendorf 管分装病毒,每管中加入 90 μ L 预热的 OptiMEM 培养基,加 10 μ L 病毒颗粒于第 1 管,混匀,从第 1 管取 10 μ L 混合液于下一管,混匀,依次稀释病毒颗粒至第 6 管;将 96 孔板中的培养基吸出,每孔加 45 μ L 病毒颗粒稀释液(记为 siRNA1~siRNA6),37℃温育 8 h 后,更换含 100 ml/L 胎牛血清(FBS)的培养液继续培养。倒置荧光显微镜下检测 GFP 表达量,计算病毒滴度。

1.3.3 体内实验 接种肺腺癌细胞悬液 8×10^6 个细胞于各 BALB/C 裸鼠皮下组织内,待肿瘤生长至长径 $\times$ 短径约

10 mm $\times$ 5 mm 时,将裸鼠随机分为 3 组:空白组(PC 组)、空白载体组(NC 组)、实验组(RNAi 组),每组 6~8 只,SPF 级屏障系统内设 IVC 环境饲养。称体质量标号后 3 组动物分别每只鼠瘤内注射生理盐水、空白载体、Lenti-survivin-siRNA 50 μ L 1 次。观察裸鼠生长状况、出瘤时间,肿瘤细胞接种后如有肿瘤生长,则每 7 天观察肿瘤生长情况。当 PC 组肿瘤长至足够大时(约 500 mm³),处死全部动物,取肿瘤。测量肿瘤最大直径及相对应的横径,根据公式 $V(\text{mm}^3)=\pi/6\times \text{瘤直径}(\text{mm})\times \text{瘤横径}(\text{mm})$,计算肿瘤大小及各组抑制率。

1.3.4 蛋白质印迹法(WB) 裂解缓冲液(Lysis Buffer)裂解细胞,取 20 μ g 蛋白上样,4℃,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),400 mA 恒流条件下电转移 120 min,采用凝胶图像分析系统,对电泳条带进行灰度分析。

1.3.5 RT-PCR 方法 按试剂盒说明书完成 RNA 的抽提纯化和 cDNA 的合成。RT-PCR 扩增 survivin 基因及内参 actin 特异性引物,上游引物:5'-TCT GGA GGT CAT CTC GGC TGT TC-3';下游引物:5'-TCA TCC TCA CTG CGG CTG TCT G-3'。扩增电泳并对条带密度扫描后进行灰度分析。

1.3.6 碘化丙锭(PI)染色 10 mg/mL 的荧光 PI 染色母液,1:1 000 稀释加入细胞,37℃二氧化碳培养箱培养,PI 与细胞核结合后以 PBS 洗涤,荧光显微镜 488 nm 激发光下检测细胞凋亡,拍照并统计数据分析。

1.3.7 流式细胞术(FCM) 胰酶收集细胞($1\sim 5$) $\times 10^6$ /mL, PBS 洗涤,70%乙醇固定,1 mL PI 染液染色,PI 用氩离子激发荧光,激光光波波长为 488 nm,发射光波波长大于 630 nm,产生红色荧光进行流式分析,观察细胞凋亡情况及细胞周期分布。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组肿瘤生长情况 慢病毒载体介导的 survivin-siRNA 50 μ L 瘤内注射,模型构建及肿瘤生长共计 21 d,实验周期裸鼠无死亡。裸鼠体质量无明显变化,RNAi 组抑瘤率为 46.07%,RNAi 组瘤重与 PC 组、NC 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),而 NC 组与 PC 组瘤重比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。移植人肺腺癌 A549 裸鼠肿瘤生长曲线,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 survivin-siRNA 对裸鼠移植人肺腺癌移植瘤的抑制作用

组别	导入途径	实验时间(d)	动物数量(<i>n</i>)	动物体质量($\bar{x}\pm s$,g)		瘤重($\bar{x}\pm s$,g)
				实验前	实验后	
NC 组	瘤内	21	6	17.6 $\pm$ 1.7	19.5 $\pm$ 1.4	2.07 $\pm$ 0.65*
PC 组	瘤内	21	6	18.7 $\pm$ 1.0	19.3 $\pm$ 0.6	1.94 $\pm$ 0.29*
RNAi 组	瘤内	21	8	18.8 $\pm$ 1.8	19.8 $\pm$ 1.9	1.12 $\pm$ 0.42

*: $P<0.05$,与 RNAi 组比较。

2.2 各组肿瘤组织 survivin-mRNA 表达情况 对电泳条带进行灰度分析,RNAi 组 survivin-mRNA 表达较 PC 组、NC 组明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$),抑制率为 72.00%。 β -Actin 表达在各组中比较差异无统计意义($P>0.05$)。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 各组中 survivin 蛋白的表达 对电泳条带进行灰度测定,并对各组 survivin/ β -Actin 进行统计分析,RNAi 组 survivin 蛋白表达较 PC 组、NC 组明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$),抑制率为 53.00%。 β -Actin 表达在各组中比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3(见《国际检验医学杂志》

网站主页“论文附件”)。

2.4 FCM 检测 细胞周期分析可见 PC 组及 NC 组均有标准的 G₁/G₀ 期二倍体峰及分裂增殖的 G₂/M 期和 S 期四倍体峰,并无亚二倍体峰出现。RNAi 组用门技术排除聚集碎片等干扰,导入 siRNA 后出现凋亡细胞,显示 G₁/G₀ 期前亚二倍体峰。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)和表 2。

表 2 3 组肿瘤细胞各细胞周期所占百分比(%)					
组别	n	凋亡期	S 期	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期
PC 组	6	0.03	26.7	35.9	37.4
NC 组	6	0.05	28.3	38.5	33.2
RNAi 组	8	23.70	35.4	23.2	17.7

3 讨 论

RNAi 技术又称为转录后基因沉默,通过 siRNA 或 shRNA 介导可对致病基因进行抑制,该项技术多用于基因功能及基因治疗研究^[3-4]。中山医科大学与哈佛大学合作成功完成了 RNAi 体内实验,在小鼠肝炎模型中有效地抑制了 Fas 基因。国内外多项研究提示, RNAi 技术对肿瘤等疾病的治疗具有价值^[5-6], RNAi 通过抑制癌基因以降低肿瘤的发生率^[7]。

肿瘤中 survivin 基因的过度表达可抵制细胞凋亡的发生,并借助有丝分裂促进肿瘤细胞的异常增殖^[8]。survivin 基因可直接抑制 caspase-3 和 caspase-7 的表达^[9],从而阻断细胞凋亡。此外, survivin 可基于细胞周期的依赖性表达,降低 G₂/M 期凋亡发生, survivin 的 CDE 和 CHR 可抑制 G₁ 期并调节 G₂/M 期基因表达的半衰期^[10]。其 ATG 上游 200 bp 可调节 survivin 的启动子活性。细胞增殖信号介导 survivin 入核并结合 Cdk4, 激活 Cdk2/Cyclin、survivin/Cdk4 促使 p21 释放, Cdk4 与 caspase 作用而产生抑制凋亡的作用^[7]。

慢病毒载体可有效介导大容量基因片段,并且慢病毒感染特性具有宿主免疫反应低、安全性好、转染效率高,尤其对肿瘤细胞及干细胞、神经细胞等惰性细胞转染率高,可长期稳定整合的特点。为了最大效能地解决 siRNA 不能有效进入细胞内的问题,笔者采用了慢病毒载体从而提高其抑制效率。生物治疗的靶向性问题主要存在以下两种:(1)如何在不破坏细胞结构的前提下进入宿主细胞;(2)如何能特异选择进入某一类型的细胞而不被其他细胞摄取。这两个问题还需要对细胞表面分子标志及载体技术的进一步深入研究。目前的载体大多不具备细胞选择性,在有效进入肿瘤细胞的同时也可以进入正常细胞,因此导致体内实验结果往往不如体外细胞学实验理想,这也是国内对于 RNA 干扰体内实验研究较少的原因之一。从本实验过程来看,体内实验难度要远大于细胞学实验,抑制效果亦不如体外实验明显,通过该项研究笔者在体内实验积累了宝贵的基因治疗资料,可为今后在个体水平应用 RNAi 抑制组织基因特异性表达及疾病基因治疗提供理论依据。

本研究通过构建可介导 survivin-siRNA 的慢病毒载体,将其局部注射裸鼠肺腺癌组织后,肿瘤生长受到抑制,同时通过 RT-PCR 和 WB 检测, survivin 基因及蛋白表达水平均较对照组明显抑制,但蛋白水平的抑制程度较基因水平抑制程度弱,表明可能与 survivin 基因的转录翻译分子生物学机制尚不明确有关。实验中肿瘤在经过 survivin-siRNA 治疗后,不仅肿瘤形态学等物理指标存在明显改变,在分子水平上亦有抑制作用。同时 FCM 等细胞凋亡检测技术发现,实验组中 survivin

基因抑制促进了肿瘤细胞的凋亡。FCM 检测结果表明, survivin 表达抑制后, G₁ 期细胞百分比升高, S 期、G₂/M 期细胞百分比相对减少,并检测到凋亡细胞的亚二倍体峰,有 30%~35% 的肿瘤细胞凋亡。实验结果表明, survivin-siRNA 通过慢病毒载体导入肿瘤组织内后, RNAi 技术可以明显抑制肿瘤的生长,但是伴随着时间延长一次给予的 survivin-siRNA 对肿瘤的抑制作用逐渐减弱。这可能与肿瘤伴随多个癌基因激活和失活,使正常细胞不断增生、转化等因素有关,单独抑制 survivin 尚不能完全消除肿瘤。同时可以说明 RNAi 在体内实验中同样有降解的代谢途径。因此,延长其在体内的作用时间是下一步研究需要解决的问题。体内实验 RT-PCR 和 WB 检测结果与体外实验相比,由于关于基因在体内的准确作用机制及慢病毒的体内代谢机制尚存争论, RNAi 用于体内实验的效果较体外实验稍差,但与其他载体相比慢病毒载体可稳定提高其转染效率。已有研究证实慢病毒载体可作为多种疾病模型及不同类型细胞的基因治疗工具^[11]。

综上所述,本实验发现以 RNAi 作为体内基因治疗方法进行研究,尚需采用多剂量 siRNA、多频次给药的深入研究,但该实验不失为有益的尝试,为肿瘤的基因靶向治疗提供了动物实验依据。

参考文献

[1] Groner B, Weiss A. Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches[J]. BioDrugs, 2014, 28(1): 27-39.

[2] Wen LJ, Gao LF, Jin CS, et al. Small interfering RNA survivin and GRIM-19 co-expression salmonella plasmid inhibited the growth of laryngeal cancer cells in vitro and in vivo[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(10): 2071-2081.

[3] Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspases independent apoptosis in survivin targeted melanoma cells[J]. Oncogene, 2004, 23(1): 39-48.

[4] Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347-351.

[5] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 446-448.

[6] 刘中宏, 郑长青, 何英. Survivin 的研究现状与 RNA 干扰在基因治疗中的进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 165-168.

[7] Asanuma K, Tsuji N, Endoh T, et al. Survivin enhances Fas ligand expression via up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells[J]. Immunol, 2004, 172(6): 3922-3929.

[8] 李继霞, 周克元, 梁统, 等. 利用 siRNA 阻抑 survivin 基因表达诱导乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞凋亡的研究[J]. 癌症, 2005, 24(3): 268-272.

[9] 陈余清, 李伟, 周继红, 等. survivin 抗肺癌细胞凋亡的分子机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6): 413-417.

[10] Connell CM, Colnaghi R, Wheatley SP. Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective[J]. J Biol Chem, 2008, 283(6): 3289-3296.

[11] 张大. NDRG1 对人神经母细胞瘤化疗耐药性及耐药基因的作用[D]. 河南: 郑州大学, 2012.

(收稿日期: 2015-11-26)

