

RNA 干扰技术对肝癌细胞内源 survivin 基因表达的影响*

闫歌¹⁾ 蒲丹¹⁾ 唐霓¹⁾ 高小玲¹⁾
宋文鑫¹⁾ 卢年芳¹⁾ 吴刚¹⁾ TONG-CHUAN HE²⁾ 黄爱龙¹⁾**

(¹⁾重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 重庆 400010;

(²⁾The University of Chicago Medical Center, Chicago, IL 60637, USA)

摘要 应用 RNA 干扰技术 (RNAi) 研究针对凋亡抑制因子 survivin 的 siRNA 抑制肝癌细胞株内源 survivin 基因的表达。转染重组质粒 pshRNA-survivin 至肝癌细胞株 SMMC-7721, 通过免疫荧光、蛋白质印迹和半定量 RT-PCR 检测 survivin 蛋白表达及 mRNA 转录水平的变化。结果表明: 构建的三种重组质粒 pshRNA-survivin1/2/3 均能明显抑制 survivin 基因的表达; 应用免疫荧光检测 survivin 基因的表达, 转染重组质粒 pshRNA-survivin 的实验组 survivin 荧光强度明显低于转染载体 pTZU6 + 1 和 pshRNA-GFP 对照组; 蛋白质印迹结果表明, 重组质粒 pshRNA-survivin 明显抑制 survivin 蛋白的表达, 抑制率为 62% ~ 78%, 通过半定量 RT-PCR 检测到 survivin 基因 mRNA 转录明显减少, 抑制率为 57% ~ 64%。由上述结果可以得出结论: 重组质粒 pshRNA-survivin 可明显抑制 SMMC-7721 细胞内源 survivin 的表达和 mRNA 的转录, 为 survivin 介导的肿瘤基因沉默疗法提供实验基础。

关键词 RNA 干扰, 肝癌细胞株, survivin 基因

学科分类号 Q3, R73

Survivin 是一类仅在肿瘤细胞中表达的凋亡抑制因子 (inhibitor of apoptosis, IAP), 在肿瘤的发生和发展过程中具有重要作用^[1]。研究表明, 抑制 survivin 基因的表达可介导肿瘤细胞的凋亡, 进而抑制肿瘤的生长^[2,3]。

本研究利用近年来广泛应用的 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi), 设计合成针对 survivin 编码基因的 siRNA, 于肝癌细胞 SMMC-7721 中, 观察 siRNA 能否诱导肿瘤细胞内源性 survivin 表达的沉默, 为肿瘤的基因沉默疗法提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒、菌株:

质粒 pTZU6 + 1 由美国 University of Michigan Dr. Engelke 惠赠, 带有 RNA pol III 启动子; pshRNA-GFP 是绿色荧光蛋白 (GFP) 的 siRNA, 由本实验室构建^[4]; 大肠杆菌 DH5 α 和 JM109 以及肝癌细胞株 SMMC-7721, 均由本研究所保存。

重组载体 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 和 pshRNA-survivin3, 由本室构建 (另文发表), 根据 RNA 设计原则^[5] 和 survivin 编码序列, 设计 19 ~ 21 nt 的 DNA 片段, 并利用 BLAST 进行查询,

确定其为特异性序列, 序列共设计合成 3 对 survivin 编码序列的 siRNA 片段, 分别构建 3 个 survivin 基因的 siRNA。Survivin1 siRNA (编码基因 95 ~ 116), 5' TCCAG GAC CAC CGC ATC TCT ACA TTC TTCG GAA TGT AGA GAT GCG GTG GTC TTTTT 3' (正义) 和 5' CTAGA AAAA GAC CAC CGC ATC T CT ACA TTC CGAA GAA TGT AGA GAT GCG GTG GTC C 3' (反义); Survivin-2 siRNA (编码基因 191 ~ 211), 5' TCCAG CTG AGA ACG AGC CAG ACT TG TTAGTACT CAA GTC TGG CTC GTT CTC AG TTTTT 3' (正义), 5' CTAGA AAAA CTG AGA ACG AGC CAG ACT TG AGTACTAA CAA GTC TGG CTC GTT CTC AGC 3' (反义); Survivin-3 (编码基因 282 ~ 301) siRNA, 5' TCCAG AAA GCA TTC GTC CGG TTG C GAGTACTG GCA ACC GGA CGA ATG TTT TTTTT 3' (正义) 和 5' CTAGA AAAA AAA GCA TTC GTC CGG TTG C CAGTACTC GCA ACC GGA CGA ATG CTT TC 3' (反义)。合成

* 国家自然科学基金资助项目 (30371599) 和国家杰出青年基金资助 (B 类) (30228026)。

** 通讯联系人。

Tel: 13508312469, E-mail: ahuang@public.cta.cq.cn

收稿日期: 2004-03-25, 接受日期: 2004-04-06

的 DNA 两端设计有 *Xho* I 或 *Xba* I 酶切位点 (下划线处), 退火后分别与 pTZU + 1 载体连接, 构建重组载体 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 和 pshRNA-survivin3.

1.1.2 试剂: 去内毒素质粒提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒为 QIAGEN 产品, 内切酶 *Sal* I 和 *Xba* I 为 Roche 公司产品, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司, 化学发光检测试剂购自 PIERCE 公司, 免疫荧光试剂盒 SABC-Cy3 购于武汉博士德公司, DNA 片段由上海生工生物工程公司合成, 其他试剂均为进口分装或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 肝癌细胞株 SMMC-7721 常规培养于含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 培养条件为 37℃, CO₂ 饱和度为 5%, 定期观察细胞生长情况, 每 2~3 天用 0.25% 的胰酶消化, 进行传代培养.

1.2.2 转染细胞: 应用 QIAGEN 公司质粒提取试剂盒, 大量提取去内毒素重组质粒 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 和 pshRNA-survivin3 (具体操作过程见说明书), 并进行 DNA 定量. 用 Invitrogen 公司转染试剂, 将正常培养的 SMMC-7721 细胞用胰酶消化, 800 r/min 离心, RPMI-1640 培养液重悬, 每孔加 1×10^5 个/ml 的等量细胞到 24 孔板中, 置 37℃ 培养. 待细胞生长到占培养瓶底约 80%~90% 时, 培养液换为无抗菌素含血清的 RPMI-1640, 培养过夜. 转染载体按以下分组: (1) 脂质体; (2) pTZU6 + 1; (3) pshRNA-GFP; (4) pshRNA-survivin1; (5) pshRNA-survivin2; (6) pshRNA-survivin3. 于次日, 根据以上分组, 每孔除 (1) 组外均按总量为 0.8 μg 的质粒 DNA 分别进行转染, 具体操作详见 Invitrogen 转染试剂盒说明. 置 37℃ 培养, 4~6 h 后加入含血清的 RPMI-1640 培养液, 置 37℃ 培养, 转染 72 h 后收集细胞进行检测.

1.2.3 免疫荧光: 收集细胞, PBS 洗涤细胞, 4% 多聚甲醛固定, 按试剂盒说明进行免疫荧光检测. 一抗为兔抗 survivin (Santa Cruz, USA) 1:500, 二抗羊抗兔 IgG/HRP 1:1 000 配制. Cy3 标记的兔抗 survivin 在荧光显微镜下 (波长 568~574 nm) 呈鲜红色, 观察荧光表达变化并照相. 随机选择 5 个细胞区内 200 倍 (20 × 10 倍) 视野, 计数红色

荧光细胞数及总细胞数, 计算红色荧光细胞发生率 = (红色荧光细胞数/总细胞数) × 100%, 红色荧光细胞抑制率 = [总细胞数 - 红色荧光细胞数] / 总细胞数 × 100%.

1.2.4 蛋白质印迹: 收集细胞, PBS 洗涤 2 遍, 含 1 mmol/L PMSF (Merk, USA) 的细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 紫外分光光度计法进行蛋白质定量. 40 μg 蛋白质进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, Bio-Rad, USA), 以蛋白质电泳转移仪 (Bio-Rad, USA) 将产物转至 NC 膜上, 室温封闭 2 h, 加入 1:1 000 兔抗人 survivin (Santa Cruz, USA), 4℃ 反应过夜, PBST 洗膜, 加入 1:4 000 羊抗兔 IgG/HRP, 室温孵育 1.5 h, 用化学发光试剂反应 5 min, 发光成像仪取像.

1.2.5 半定量 RT-PCR: 转染后 72 h 用 0.25% 的胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗涤两遍, 按试剂盒说明分别提取细胞的总 RNA. RT-PCR 反应体系中加入两对引物, 第一对是内源对照三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基因的引物, 即 5' GGAAGGT-GAAGGTCGGAGTC 3' 和 5' GACCACCTGGTGCT-CAGTGT 3'; 第二对是被沉寂的目的基因的引物, 即 survivin 基因的引物 5' ATAGTCGACATGG-GTGCCCCGACGTTG 3' 和 5' CTCGGATCCTCAAT-CCATGGCAGCCAG 3'. 具体操作过程参照说明书, 根据凝胶电泳中内源 GAPDH 基因片段条带的强弱, 来判定模板的量, 进而确定 survivin 基因的 mRNA 被 siRNA 沉寂的程度.

1.2.6 统计分析: 实验结果采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 用方差分析分析各组间差别.

2 结果

2.1 siRNA 抑制细胞中 survivin 蛋白的表达

2.1.1 免疫荧光结果: survivin 蛋白是一种细胞内的胞浆蛋白, 用 Cy3 标记的抗体在荧光显微镜下呈鲜红色. 结果显示 (图 1): 无质粒和加入 pTZU6 + 1 质粒为对照的肿瘤细胞, 呈红色荧光的细胞较多, 亮度较强, 而转染重组质粒 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 或 pshRNA-survivin3 的细胞, 呈红色荧光的细胞较少, 荧光明显减弱, 统计分析证实三者之间无明显差异 ($P > 0.05$), 而与对照组相比有明显差异 ($P < 0.05$), 说明构建的 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 和 pshRNA-survivin3 三种 siRNA 均能在肿瘤细胞中明显抑制目的基因

survivin 蛋白的表达; 转染 pshRNA-GFP 的细胞红色荧光仍较强, 明显强于 pshRNA-survivin 作用组, 表明 pshRNA-GFP 不能抑制 survivin 基因蛋白的表达, 验证了 pshRNA-survivin 作用的特异性.

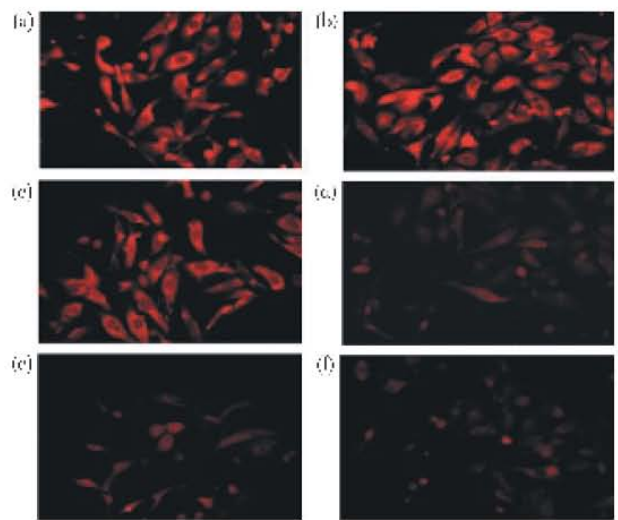


Fig. 1 Silencing effect of pshRNA-survivin on survivin expression by immunofluorescence staining
(a) Only Lipofectamine, (b) pTZU6 + 1, (c) pshRNA-GFP, (d) pshRNA-survivin1, (e) pshRNA-survivin2, (f) pshRNA-survivin3.

2.1.2 蛋白质印迹结果: 蛋白质印迹检测结果显示 (图 2), 转染质粒 pTZU6 + 1 和 pshRNA-GFP 的 survivin 蛋白杂交带, 明显强于实验组即转染重组质粒 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 或 pshRNA-survivin3, 其中转染 pshRNA-survivin1 和 pshRNA-survivin3 两组杂交带更弱, 但与转染 pshRNA-survivin2 组无明显差异, 进一步证实了构建的 pshRNA-survivin 抑制 survivin 蛋白的表达, 以

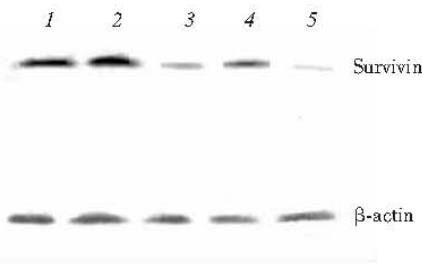


Fig. 2 Western blot analysis of survivin expression in transfected cells
1: pTZU6 + 1, 2: pshRNA-GFP, 3: pshRNA-survivin1, 4: pshRNA-survivin2, 5: pshRNA-survivin3.

及抑制作用的特异性. 应用 ImageMaster TotalLab 图像系统分析结果所示, 以转染质粒 pTZU6 + 1 的蛋白带为标准 (亮度定为 100), 其他几组与之比较, 转染质粒 pshRNA-GFP、pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 或 pshRNA-survivin3 的条带强度分别是转染质粒 pTZU6 + 1 组的 98.27%、28.57%、36.46%、20.41%.

2.2 半定量 RT-PCR

琼脂糖凝胶电泳结果表明 (图 3), 6 组泳道中细胞内源 GAPDH 基因片段条带的亮度强弱相似, 说明 RT-PCR 中加入模板的量一致, 而扩增的 survivin 基因电泳带存在明显差异. 其中转染脂质体、质粒 pTZU6 + 1 和 pshRNA-GFP 的 survivin PCR 扩增带亮度较强, 而转染重组质粒 pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 或 pshRNA-survivin3 的 survivin PCR 扩增带亮度明显减弱, 三者之间无明显差异, 证实了 3 种重组质粒 pshRNA-survivin 在 mRNA 水平上抑制 survivin 基因的 mRNA 转录, pshRNA-GFP 对目的 survivin 基因的 mRNA 没有抑制作用, 提示 siRNA 抑制目的基因转录的特异性. ImageMaster TotalLab 图像系统分析结果显示, 以转染脂质体的 RT-PCR 为标准 (亮度定为 100), 其他几组与之比较, 其中细胞内源 GAPDH 基因片段条带亮度相近, 转染质粒 pTZU + 1、pshRNA-GFP、pshRNA-survivin1、pshRNA-survivin2 或 pshRNA-survivin3 的条带强度分别是转染对照组的 86.79%、87.07%、30.56%、29.65%、23.81%.

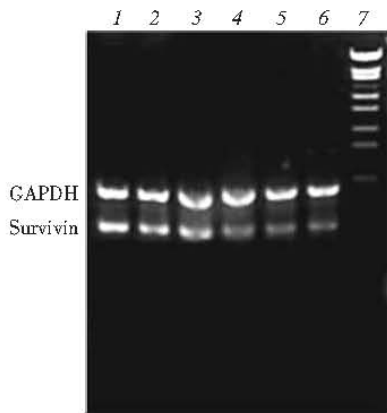


Fig. 3 The semi-quantitative RT-PCR of survivin and GAPDH
1: Only Lipofectamine, 2: pTZU6 + 1, 3: pshRNA-GFP, 4: pshRNA-survivin1, 5: pshRNA-survivin2, 6: pshRNA-survivin3, 7: Molecular mass marker.

3 讨 论

Survivin 是细胞凋亡抑制因子家族成员之一, 具有高度保守性和抑制细胞凋亡的作用, 它区别于其他 IAPs 的最大特点是仅在肿瘤细胞中表达. 研究表明, 人工合成的 survivin 反义寡核苷酸、反义 RNA 和负显性突变体导入肿瘤细胞内能抑制 survivin 基因的表达, 促进肿瘤细胞凋亡^[2,3,6].

RNA 干扰 (RNAi) 是自然界生物体的一种遗传现象, 其主要是利用双链 RNA 特异性介导其互补同源 mRNA 序列的降解, 从而特异性抑制目的蛋白的表达, 抑制作用强^[7], 研究发现 RNAi 抑制目的基因的作用强于反义寡核苷酸^[8]. 自发现以来, 已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性等疾病等的研究. Song 等^[9]用 RNAi 靶向 Fas 受体基因, 结果 Fas 激发了细胞的凋亡, 而且防止了小鼠肝细胞的炎症反应和坏死, 甚至还成功阻止了自身免疫性肝炎小鼠模型中肝衰竭和肝纤维化的发生. RNAi 在肿瘤研究中也取得了一些结果, Cioca 等^[10]构建的 c-raf 和 bcl-2 的 siRNA 能有效杀伤人类骨髓中的白血病细胞, 为白血病的基因治疗提供了新的途径, 并且它能提高化学药物治疗白血病的疗效. 本实验室利用 RNAi 技术构建针对 HBV 核心区的 siRNA, 能明显抑制 HBV 的复制和蛋白质的表达^[11].

目前为止, 尚未见到有关应用 RNAi 技术抑制 survivin 基因表达的报道, 本研究是在已构建针对 survivin 基因的 siRNA 的基础上, 观察其特异性抑制内源目的基因 survivin 的作用. 从结果上看, 重组质粒 pshRNA-survivin1.2.3 不仅能明显抑制目的基因 survivin 的表达以及 mRNA 的转录水平, 抑制作用分别达 53% 和 57% 以上, 而且重组质粒

pshRNA-GFP 对 survivin 基因无抑制作用, 表明重组质粒 pshRNA-survivin1.2.3 具有特异性抑制目的基因的作用. 本研究为下一步利用重组质粒 pshRNA-survivin 沉默 survivin 基因, 介导肿瘤细胞的凋亡提供了实验基础.

参 考 文 献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997, **3** (8): 917 ~ 921
- 2 Grossman D, Kim P, Schechner J S, *et al.* Inhibition of melanoma tumor growth *in vivo* by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (2): 635 ~ 640
- 3 Mesri M, Wall N R, Li J, *et al.* Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest*, 2001, **108** (7): 981 ~ 990
- 4 闫歌, 黄爱龙, 唐霓, 等. shRNA 抑制外源绿色荧光蛋白在肝癌细胞株中的表达. *重庆医科大学学报*, 2003, **28** (6): 681 ~ 684
Yan G, Huang A L, Tang N, *et al.* *J Chongqing Medical University*, 2003, **28** (6): 681 ~ 684
- 5 Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 446 ~ 448
- 6 Olie R A, Simoes-Wüst P, Baumann B, *et al.* A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*, 2000, **60** (11): 2805 ~ 2809
- 7 McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Rev Genet*, 2002, **3** (10): 737 ~ 747
- 8 Aoki Y, Cioca D P, Oidaira H, *et al.* RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, **30** (1 ~ 2): 96 ~ 102
- 9 Song E, Lee S K, Wang J, *et al.* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, 2003, **9** (3): 347 ~ 351
- 10 Cioca D P, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther*, 2003, **10** (2): 125 ~ 133
- 11 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 等. 应用 RNA 干扰技术抑制乙型肝炎病毒抗原表达的实验研究. *中华医学杂志*, 2003, **83**: 1309 ~ 1312
Tang N, Huang A L, Zhang B Q, *et al.* *Nat Med J China*, 2003, **83** (15): 1309 ~ 1312

RNA Interference-mediated Inhibition of Endogenous Survivin Expression in Hepatocarcinoma Cell *

YAN Ge¹⁾, PU Dan¹⁾, TANG Ni¹⁾, GAO Xiao-Ling¹⁾, SONG Wen-Xin¹⁾,
LU Nian-Fang¹⁾, WU Gang¹⁾, TONG-CHUAN HE²⁾, HUANG Ai-Long¹⁾ **

(¹⁾ Institute for Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China;

(²⁾ The University of Chicago Medical Center, Chicago, IL 60637, USA)

Abstract To apply the small interfering RNAs targeting survivin to inhibit expression of endogenous survivin gene in human hepatocarcinoma cell SMMC-7721, the recombinant plasmid pshRNA-survivins were transfected into SMMC-7721. The expression level of survivin was determined by Western blot and immunofluorescence staining and

the transcription of survivin gene was detected by semi-quantitative RT-PCR. The introduction of plasmids pshRNA-survivin was showed to efficiently and specifically inhibit the expression of survivin according to results of Western blot and immunofluorescence staining, with inhibitory rates at 62% ~ 78% peaking 72 h. Semi-quantitative RT-PCR showed that mRNA transcription of survivin gene was reduced by nearly 57% ~ 64%. On the contrast, the control plasmid did exhibit no inhibitory effect on the protein expression and mRNA transcription of survivin gene. The results demonstrate that the small interfering RNA targeting survivin gene shows dramatic inhibition on protein expression and RNA transcription.

Key words RNA interference, hepatocarcinoma cell, survivin gene

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30371599) and Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars Grant (30228026).

** Corresponding author. Tel: 13508312469, E-mail: ahuang@public.cta.cq.cn

Received: March 25, 2004 Accepted: April 6, 2004

《药物微生物技术》

李越中主编

化学工业出版社 2004 年 4 月出版, ISBN7-5025-5063-4, 16 开, 216 页, 定价 30 元

本书是《现代微生物技术丛书》中的一个分册。全书系统论述了药物微生物技术的概念、研究内容和具体的应用技术。在介绍和归纳药物微生物、微生物药物和药物微生物技术的概念和内容的基础上, 详细论述了药源微生物和微生物药物的筛选技术以及药物发酵合成的优化和生产技术, 概述了微生物技术在基因工程药物和疫苗中的应用, 对次级代谢产物合成的基因工程改造(次级代谢工程)和药物微生物基因组技术等新方法进行了分析和讨论。本书在顾及药物微生物技术传统内容的同时, 将更多的篇幅用于介绍和归纳各种新的技术方法和思维策略, 以向读者提供更多的参考和可借鉴的思路。

《生物化学实验技术》

何忠效主编

化学工业出版社 2004 年 3 月出版, ISBN7-5025-5165-4, 16 开, 406 页, 定价 60 元

本书是《生物实验室系列》中的一本, 是一部综合性著作, 内容覆盖了有关生物化学实验技术的诸多领域, 从原始取材到生物大分子结构与功能的研究、从基本原理到实验操作都作了深入而详实的全面阐述。全书包括生物制备和分析检测方法; 免疫学方法在生化实验中的应用; 还用较大篇幅着重叙述了生物大分子的分离纯化及其结构与性质的研究。作为一本实验技术类的图书, 本书不仅较详细地阐述了有关技术的具本操作和程序, 更着力于对各种技术的基本原理及其相关的理论基础进行深层次的剖析。

以上图书在全国各大新华书店均有销售。

化学工业出版社: 北京市朝阳区惠新里 3 号 邮购电话: (010) 64918013, 64982530

欲了解更多相关图书信息请登录网站 www.cip.com.cn