

抑制 survivin 表达增强人肝癌 HepG2 细胞 对高线性能量转移射线的辐射敏感性*

金晓东¹⁾ 李强^{1)**} 李萍^{1, 2)} 吴庆丰^{1, 2)} 陶家军^{1, 2)}

郝冀方¹⁾ 戴中颖^{1, 2)} 刘新国^{1, 2)}

(¹⁾中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000; (²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 探讨了肿瘤细胞中 survivin 的表达对高线性能量转移(LET)射线辐射敏感性的影响. 根据 GenBank 提供的 survivin 序列, 合成特异性 survivin-siRNA 寡核苷酸, 转染人肝癌 HepG2 细胞, 抑制 survivin 的表达. 发现 siRNA 转染后诱导了 HepG2 细胞 G2/M 期阻滞, 增加了自发性和辐射诱导的细胞凋亡. 在高线性能量转移(LET)碳离子辐照后, siRNA 转染细胞的克隆存活率明显下降. 这些结果表明 survivin 表达是 HepG2 细胞产生对高 LET 射线辐射抗性的关键因素.

关键词 survivin, 高射线能量转移(LET)射线, siRNA, 凋亡
学科分类号 R730, Q691

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00403

与常规放疗用射线如电子束、X 射线和 γ 射线相比, 高线性能量转移(linear energy transfer, LET)的重离子束具有倒转的深度剂量分布(Bragg 峰), 高的相对生物学效应(relative biological effectiveness, RBE)和低的氧增比(oxygen enhancement ratio, OER)等在物理学和生物学特性上的优势^[1]. 因此, 重离子束在放疗上的作用逐渐被研究者所重视, 国际上许多国家相继修建医用重离子加速器或者在已有的研究用重离子加速器上进行重离子治癌研究并取得了良好的治疗效果^[2, 3]. 作为高 LET 重离子束放疗的基础, 其辐射生物学效应也成为研究中最活跃的领域.

先前的研究表明, 电离辐射所导致细胞死亡的关键机理是诱导细胞凋亡^[4]. 因此, 临床上利用电离辐射诱导肿瘤细胞凋亡的放疗方法是众多治疗肿瘤的手段之一. 肿瘤细胞中往往细胞凋亡信号通路调控异常, 这是肿瘤细胞对各种治疗手段诱导的凋亡产生抗性进而产生细胞化疗抗性的一个原因. 因此抑制特定基因表达, 重建细胞正常的凋亡通路, 就有可能提高细胞的辐射敏感性. Survivin 是 1997 年发现的凋亡抑制蛋白家族(IAPs)的成员, 其主要生理功能为促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡^[5]. 在先前我们的研究中发现, 在高 LET 碳离子

辐照时, 人肝癌 HepG2 细胞中 survivin 的表达随照射剂量的增加而增强^[6].

RNA 干扰技术(RNAi)也被称之为 RNA 沉默(RNA silencing)或转录后基因沉寂. 它是一种由小的双链 RNA 分子诱导与其序列互补的单链 RNA 发生降解的现象^[7]. 近年来, 它正迅速发展成为研究基因功能的新工具, 广泛地应用于癌症治疗的相关研究当中.

本文应用 RNAi 中的效应分子 siRNA 抑制人肝癌 HepG2 细胞中 survivin 的表达, 研究了抑制 survivin 表达对细胞高 LET 射线辐射敏感性的影响及其原因.

1 材料与方法

1.1 细胞及其培养

实验所用的人肝癌 HepG2 细胞株由本实验室保存, 培养基为含 10%胎牛血清(兰州民海公司)的

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA02Z499), 国家自然科学基金重点资助项目(10835011), 国家自然科学基金资助项目(10905080)和中国科学院西部之光资助项目(0962030XBO).

** 通讯联系人.

Tel: 0931-4969173, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

收稿日期: 2009-07-02, 接受日期: 2009-09-23

DMEM(美国 GIBCO)培养液, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养.

1.2 转染实验

根据人类 survivin mRNA 序列 (GenBank Accession No. NM-001168)第 1 172~1 189 位设计并合成(赛百盛公司, 北京)反义(AS)寡核苷酸. 序列如下, 5' TGT GCTATTCTGTGAATT 3', 错配序列(MS)为, 5' TAAGCTGTTCTATGTGTT 3'. 合成序列均为硫代磷酸化修饰.

转染前 24 h 将细胞以 2×10^5 个 / 孔的密度接种于 12 孔板或 $\Phi 35$ 的培养皿中, 待细胞长至 60%~70%丰度时进行转染. 转染试剂采用梭华 -sofast 基因转染试剂(厦门太阳马生物工程有限公司), 具体方法如下: 倒掉培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 按照 1 μ g 寡核苷酸加入 50 μ l PBS, 2 μ l 转染试剂加入 50 μ l PBS 的比例, 两者混合, 室温孵育 20 min, 加入 12 孔板的 1 孔中或 $\Phi 35$ 的培养皿中, 转染后 4 h 更换新鲜含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基.

1.3 Real-time PCR 实验

转染不同时间后收集细胞, 用 Trizol 提取总 RNA, 将 mRNA 反转录为 cDNA, 用于检测. Real-time PCR 所需试剂为 Takara 公司所售 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(荧光为 SYBR Green I). PCR 仪为 iCycler iQ 实时 PCR 检测系统(美国 Bio-Rad 公司). 根据 GenBank 中 survivin 序列设计特异性扩增引物: 上游引物, 5' TTC TCA AGG ACC ACC GCA TC 3'; 下游引物, 5' GCC AAG TCT GGC TCG TTC TC 3', 扩增片段长度为 127 bp. β -Actin, 上游引物, 5' TGG CAC CCA GCA CAA TGA A 3'. 下游引物, 5' CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A 3', 扩增片段长度为 186 bp. β -Actin 阳性产物为内参. 引物均由 Takara(大连)公司合成.

1.4 Western blotting 检测

转染后不同时间收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 加入 RIPA 裂解液(碧云天生物有限公司)冰上裂解 30 min, 12 000 g 离心 15 min, 上清为总蛋白. BCA 试剂盒(碧云天生物有限公司)检测蛋白质浓度. 30 μ g 蛋白每泳道进行 SDS-PAGE, 将蛋白质电转到 PVDF 膜上(密理博公司), 5%脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h, 加入一抗(1:1 500, Cell Signal 公司), 4°C 杂交过夜, 洗膜, 转入偶联辣根过氧化物酶的二抗中(1:3 000, Cell Singal 公司), 室温杂交 1 h, 洗膜后用 ECL 试剂盒(碧云天生物有限公

司)检测.

1.5 细胞周期检测

转染后不同时间收集细胞, 150 g 离心 5 min, PBS 洗涤 2 遍, 75%乙醇固定, -20°C 保存 24 h 以上, 离心除去固定液, PBS 洗 1 遍, 加碘化丙锭 (PI) 0.5 ml (含 0.3 g/L RNAase, 20 mg/L PI), 常温避光染色 30 min 后, FACS Calibur 型流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司, 美国)检测.

1.6 辐照及克隆存活实验

辐照前 36 h, 将细胞接种于 $\Phi 35$ 的培养皿中, 辐照前 12 h, 对 siRNA 组细胞进行转染. 用兰州重离子研究装置(HIRFL)提供的碳离子束(能量为 68 MeV/u, LET 为 35 keV/ μ m)对细胞进行辐照. 辐照在室温下进行, 吸收剂量率约为 4 Gy/min, 照射剂量分别为 0, 1, 2, 3, 4, 6 Gy. 照射后的细胞经胰蛋白酶消化后进行细胞精确计数, 选择合适倍数稀释后, 以 100 个 / 皿的浓度种植于直径 6 cm 的培养皿中, 放置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱, 10 天后, 用 PBS 冲洗, 经甲醇 / 醋酸固定液固定, 用 Giemse 进行染色, 统计细胞数大于 50 个的克隆.

1.7 细胞凋亡率检测

采用南京凯基公司 Annexin-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡. 辐照后 48 h 收集细胞消化, 用 PBS 洗涤, 离心, 收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞, 再加入结合缓冲液, Annexin V-FITC, PI 混匀; 由 FACS Calibur 流式细胞仪进行检测($E_x=488$ nm; $E_m=530$ nm)细胞凋亡的情况(绿色荧光通过 FITC 通道 FL1 检测; 红色荧光通过 PI 通道 FL2 检测).

1.8 统计学处理

由于 HIRFL 上束流时间所限, 克隆存活和细胞凋亡数据由 1 次辐照得到, 其余数据均由 3 次独立实验得到. 细胞周期和凋亡率检测分析软件为 FlowJo 5.0. 所有数据用统计学软件 SPSS11.0 进行分析.

2 结 果

2.1 mRNA 水平上 survivin 抑制效果检测

图 1 显示了特异性的 siRNA 序列对细胞中 survivin 的抑制效果. siRNA 组转染 12 h 后, survivin 表达量为对照的 55%, 下降较明显, 随着时间的推移, survivin 表达进一步降低, 24 h 为 45%, 36 h 为 39%, 转染 48 h 后, siRNA 抑制效果有所降低, survivin 表达升高, 为对照的 44%, 与 24 h 相当. 由于我们构建的是一个瞬时表达系

统, 并不整合到宿主的基因组中, 导入的外源核苷酸会随着细胞分裂而逐渐丢失, 因此在 48 h, 抑制效果降低, 随着时间的延长, 外源核苷酸量进一步减少, survivin 的表达会恢复正常。

由图 1 还可以看到, 错配组转染 24 h 后, survivin 表达量为对照的 88%, 有所下降。因为我们设计错配寡核苷酸序列时, 与 GenBank 公布的序列进行了比对, 无同源序列, 因此有可能是转染试剂对细胞中 survivin 表达有影响, 但是这一表达的降低与 siRNA 抑制相比差很多, 因此转染试剂对实验结果的影响并不大。

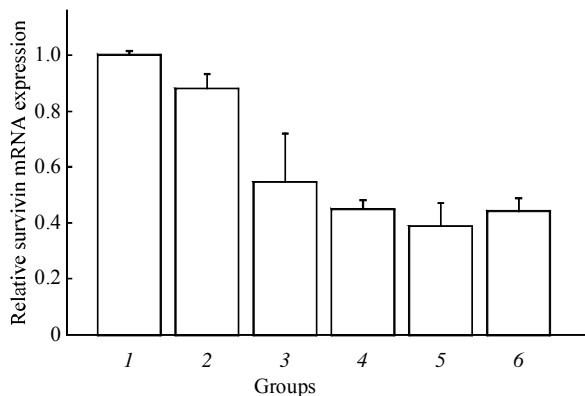


Fig. 1 Down-regulation of survivin mRNA in following transient transfection with survivin-specific siRNA

1: Untreated; 2: Mismatched 24 h; 3: siRNA 12 h; 4: siRNA 24 h; 5: siRNA 36 h; 6: siRNA 48 h.

2.2 蛋白质水平上 survivin 抑制效果检测

图 2 为用 Western blotting 方法检测 siRNA 抑制后, survivin 在蛋白质水平上表达情况。3 号泳道为 siRNA 转染后 12 h survivin 表达情况, 其亮度与对照相差不多, 说明在蛋白质水平上, 转染 12 h 后, survivin 表达并没有太多的降低, 直到 24 h (4 号泳道) 和 36 h (5 号泳道) 后, 蛋白质的表达才有明显的降低。错配转染 24 h 后, survivin 表达反而更明显。由图 1 和图 2 可以看出, 在 mRNA 和蛋白质水平上, siRNA 的抑制效果并不完全相

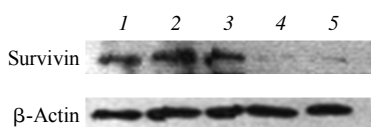


Fig. 2 The expression of survivin protein down-regulation by survivin-specific siRNA

1: Untreated; 2: Mismatched 24 h; 3, 4, 5: siRNA 12, 24, 36 h.

同, 这可能与 survivin 翻译后修饰, mRNA 的剪切方式以及 mRNA 的半衰期有关。

由 mRNA 和蛋白质表达水平上的结果可以看出, 本文设计的 siRNA 序列可以有效地抑制 HepG2 细胞中 survivin 的表达。

2.3 细胞周期检测

图 3 是 survivin 表达抑制后的细胞周期分布情况, 可以看到, siRNA 转染抑制 survivin 表达 12 h 后, 细胞出现了 G2/M 期阻滞, 由对照组的 20% 升高到 siRNA 组的 28%, 且差异具有显著性 ($P < 0.01$). 而在其他组别里, 未出现细胞周期阻滞 (错配 12 h 组为 21.3%, siRNA 转染 24 h 组为 18.5%, 转染 36 h 组为 22.5%, 与对照比均 $P > 0.05$).

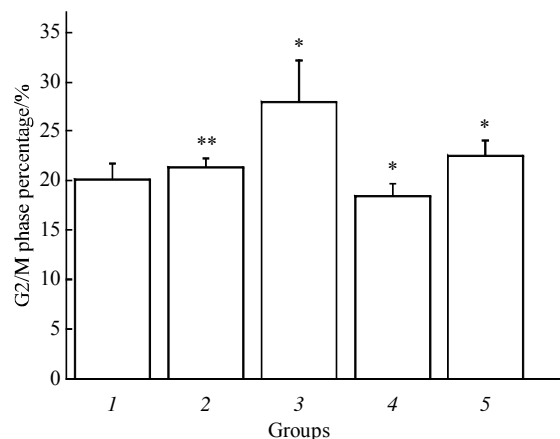


Fig. 3 Survivin attenuation by siRNA treatment affects cell cycle distribution

* $P < 0.01$ versus untreated control, ** $P > 0.05$ versus untreated control.

1: Untreated; 2: Mismatched 12 h; 3: siRNA 12 h; 4: siRNA 24 h; 5: siRNA 36 h.

2.4 Survivin 表达抑制后 HepG2 细胞对碳离子辐射敏感性的变化

图 4 显示了用 siRNA 抑制细胞中 survivin 表达后, 3 组细胞 (未转染, 错配转染, siRNA 转染) 对碳离子的辐射敏感性变化。由图 4 可知未转染组和错配组辐射敏感性差异不明显 (各剂点 $P > 0.05$), 而 siRNA 组辐射敏感性提高很多。以 2Gy 存活份数为生物学终点 (SF2), siRNA 组 SF2=0.07, 错配组 SF2=0.15, 未转染组 SF2=0.19, 后两组的存活份数基本上是 siRNA 转染组的 2 倍以上。这些实验结果说明, siRNA 抑制 survivin 表达后, 能够明显提高 HepG2 细胞对碳离子辐射敏感性。

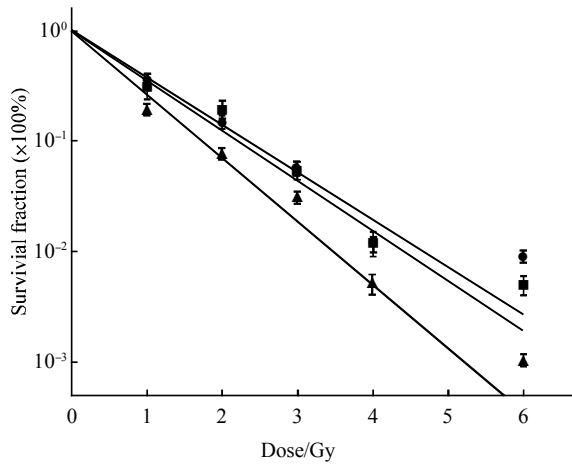


Fig. 4 Effect of survivin on the clonogenic survival of HepG2 cells transfected with either survivin-specific or mismatch-control siRNA

Untreated cells served as a control. \blacksquare — \blacksquare : Mismatched+irradiation; \circ — \circ : Irradiation alone (untreated); \blacktriangle — \blacktriangle : siRNA+irradiation.

2.5 Survivin 表达抑制后的细胞凋亡变化

Survivin 表达抑制 12 h 后, 进行碳离子辐照, 在辐照后 48 h, 检测细胞凋亡情况(图 5). 由未转

染细胞(图 5a)可以看出, 随着照射剂量的增加, 细胞凋亡数明显增加, 由 0 Gy 时的 5%, 提高到 2 Gy 时的 26%, 直到 5 Gy 时的 33%, 存在剂量依赖性. 在错配组和 siRNA 转染组也存在相同的情况.

siRNA 转染后细胞自发性凋亡也有明显提高(图 5 最左列), 未转染组为 5%, 错配组为 6%, 两者没有明显差别, 而 siRNA 转染组自发凋亡率为 25%, 接近其他两组细胞的 5 倍, 这说明 survivin 的高表达抑制了细胞的自发性凋亡.

碳离子辐照对 3 组细胞凋亡也有明显影响, 在相同剂量下, 错配组和未转染组细胞凋亡率差别不大, 而 siRNA 组与其他两组相比, 相同剂量下凋亡率明显上升. 2 Gy 照射时, siRNA 组凋亡率为 35%, 而错配组和未转染组均为 26%, 前者为后者的 1.3 倍. 5 Gy 照射时, 这一趋势更明显, siRNA 组凋亡率为 49%, 而错配组为 35%, 未转染组为 33%, 前者分别为后者的 1.4 和 1.5 倍. 这些实验结果表明, siRNA 转染抑制细胞中 survivin 表达后, 细胞自发性凋亡和辐射诱导的凋亡均明显提高.

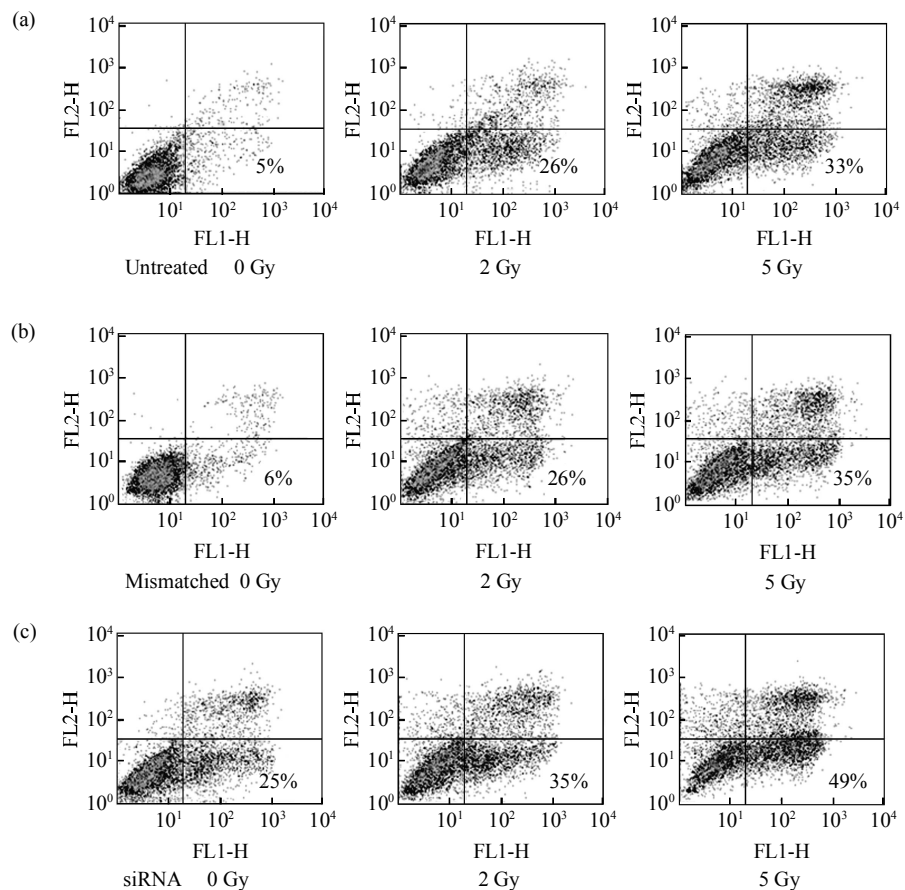


Fig. 5 Survivin attenuation by siRNA treatment affects spontaneous and radiation-induced apoptosis

(a) Untreated. (b) Mismatched. (c) siRNA.

3 讨 论

目前, 对于 *survivin* 表达在肿瘤化疗和放疗中的作用有了一定的研究. 例如, 夏雪梅等^[8]用 *survivin* 反义寡核苷酸转染两种肺癌细胞, 细胞增殖率明显下降而凋亡率明显上升. 抑制 *survivin* 表达, 可以加强诱导三苯氧胺在乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1 中的凋亡, 而细胞中过表达 *survivin*, 则可抑制凋亡^[9]. Chen 等^[10]利用 siRNA 方法抑制胃癌细胞 MGC-803 中 *survivin* 表达, 提高了细胞的凋亡率. 在 *survivin* 表达与辐射抗性方面也有一定的研究. Rodel 等^[11]研究发现, 用 siRNA 抑制结肠癌细胞 SW480 和 HCT-15 的 *survivin* 表达, 可以增强细胞自发性和辐射诱导的凋亡, 降低细胞的克隆存活率. 用目前进入临床 I 期实验的 *survivin* 拮抗剂(LY2181308 Eli Lilly 公司)也能达到抑制 *survivin* 效果, 将 LY2181308 与辐照联合处理移植到小鼠身上的 SW480 细胞, 可以延缓肿瘤的生长^[12].

以上的实验结果都表明, 对于化疗和低 LET 射线的常规放疗, *survivin* 是肿瘤产生治疗抗性的关键因素, 抑制它的表达就可以提高治疗的疗效. 对于高 LET 射线辐照是否存在相同的结果? 本文的实验结果证实了这一点. 由图 4 可以看出, siRNA 组与其余两组经高 LET 碳离子辐照后存活情况是不同的, siRNA 组细胞的辐射敏感性明显提高. 这些结果说明, *survivin* 表达也是细胞产生高 LET 射线辐射抗性的原因之一. 抑制其表达, 能提高细胞的高 LET 射线辐射敏感性.

在实验中, 我们也探讨了抑制 *survivin* 表达后, 细胞辐射敏感性提高的原因. 由于 *survivin* 是 IAP 家族的成员, 因此抑制其表达, 可能会重建细胞正常的凋亡通路, 诱导细胞凋亡. 实验结果证实了我们的想法. 由图 5 可以看出, 与未处理和错配组相比, siRNA 转染组自发性和辐射诱导的凋亡明显提高. 这是细胞辐射敏感性提高的原因之一.

另外, *survivin* 是染色体的过客蛋白, 它对于染色体的分离和胞质的分裂必不可少, 因此抑制它的表达, 会造成细胞有丝分裂的延迟, 这在 Rodel 等^[11]的实验中已得到证实. 在我们的实验中也得到相同的结果, 如图 3 所示, 在转染后 12 h, siRNA 组表现了明显的 G2/M 期抑制, 而在其他两组和 siRNA 组的其余时间内都没有观察到相同的现象. 而转染后 12 h, 正是细胞进行碳离子辐照的时间点. 也就是说, 细胞在进行辐照时, siRNA 组细胞

有很大一部分处于辐射较敏感的 G2/M 期. 这也是细胞辐射敏感性提高的原因之一.

以上的实验研究表明, *survivin* 基因的表达是细胞产生重离子辐射抗性的一个至关重要的因素, 如果用 siRNA 抑制 *survivin* 在细胞中的表达, 可以诱导细胞的自发性和辐射诱导的凋亡, 并且使细胞产生 G2/M 期阻滞, 从而使得 HepG2 细胞对重离子的辐射敏感性提高, 这为下一步开展以 *survivin* 为靶基因, 提高肿瘤细胞辐射敏感性, 从而将基因治疗与重离子放射治疗相结合的研究奠定了良好的基础.

参 考 文 献

- [1] Blakely E A, Kronenberg A. Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness. *Radiat Res*, 1998, **150** (5 Suppl): S126-S145
- [2] Li Q, Dai Z, Yan Z, *et al.* Heavy-ion conformal irradiation in the shallow-seated tumor therapy terminal at HIRFL. *Med Bio Eng Comput*, 2007, **45**: 1037-1043
- [3] Tsujii H, Mizoe J, Kamada T, *et al.* Clinical results of carbon ion radiotherapy at NIRS. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2007, **48**(Suppl A): A1-A13
- [4] Capalbo G, Rödel C, Stauber R H, *et al.* The role of *survivin* for radiation therapy. *Strahlenther Onkol*, 2007, **11**: 593-599
- [5] Altieri D C. *Survivin*, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature Reviews*, 2008, **8**(1): 61-70
- [6] Jin X D, Gong L, Guo C L, *et al.* *Survivin* expressions in human hepatoma HepG2 cells exposed to ionizing radiation of different LET. *Radiat Environ Biophys*, 2008, **47**(3): 399-404
- [7] Zamore P D. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 2002, **296**(5571): 1265-1269
- [8] 夏雪梅, 陈余清, 蔡映云, 等. 反义寡核苷酸诱导肺癌细胞株凋亡的研究. 蚌埠医学院学报, 2005, **30**: 4-8
- [9] Xia X M, Chen Y Q, Cai Y Y, *et al.* *J Bengbu Med Coll*, 2005, **30**: 4-8
- [10] Moriai R, Tsuji N, Moriai M, *et al.* *Survivin* plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, **117** (2): 261-271 (DOI 10.1007/s10549-008-0164-5)
- [11] Chen T, Deng C. Inhibitory effect of siRNA targeting *survivin* in gastric cancer MGC-803 cells. *Int Immunopharmacol*, 2008, **8**(7): 1006-1011
- [12] Rodel F, Hoffmann J, Distel L, *et al.* *Survivin* as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res*, 2005, **65**(11): 4881-4887
- [13] Rodel F, Frey B, Leitmann W, *et al.* *Survivin* antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, **71**(1): 247-255

Inhibiting Survivin Expression Increases The Radiosensitivity of Human Hepatoma HepG2 Cells to High-LET Radiation*

JIN Xiao-Dong¹⁾, LI Qiang^{1)**}, LI Ping^{1,2)}, WU Qing-Feng^{1,2)}, TAO Jia-Jun^{1,2)},
HAO Ji-Fang¹⁾, DAI Zhong-Ying^{1,2)}, LIU Xin-Guo^{1,2)}

¹⁾ Institute of Modern Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

²⁾ Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract The influence of survivin expression on the radiosensitivity of tumor cells to high linear energy transfer (LET) radiation is investigated. Survivin-specific short-interfering RNA (siRNA) oligonucleotides were synthesized based on the survivin sequence provided by GenBank. Human hepatoma HepG2 cells were transfected with survivin-specific siRNA to inhibit its expressions. It was found that the transfection with surviving-specific siRNA increased the levels of G2/M arrest and the apoptotic rates induced by radiation in HepG2 cells. After exposure to high-LET carbon ions, a reduced clonogenic survival effect was observed in the cells treated with siRNA. These results show that survivin plays a key role in mediating the radioresistance of cells to high-LET radiation.

Key words survivin, high-LET radiation, siRNA, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00403

*This work was supported by a grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02Z499), Key Project of National Natural Science Foundation of China(10835011), The National Natural Science Foundation of China (10905080) and Western Talents Program of Chinese Academy of Science(O962030XBO).

**Corresponding author.

Tel: 86-931-4969316, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

Received: July 2, 2009 Accepted: September 23, 2009