

Survivin siRNA对人肺腺癌细胞SPCA1和SH77抑制作用的比较分析

刘全喜 董超颖 李丽君 孙捷 李春云 李亮

【摘要】背景与目的 Survivin是IAP家族的新成员，具有抑制凋亡和调节细胞增殖的双重作用，是迄今发现最强的凋亡抑制因子。本项研究的目的是通过将survivin的小干扰RNA（small interfering RNA, siRNA）表达载体分别转染至肺癌细胞SPCA1和SH77，分析survivin siRNA对不同肺癌细胞的增殖抑制作用。方法 构建靶向survivin的siRNA表达载体与pSi scrambled，经由脂质体法分别转染至肺癌细胞SPCA1和SH77。通过MTT法检测细胞增殖抑制，用流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期，利用半定量RT-PCR和Western blot印迹法分别检测细胞survivin mRNA及蛋白表达水平。结果 Survivin siRNA干预后，SPCA1和SH77细胞均出现凋亡，G₀/G₁期阻滞。实验组Survivin mRNA水平和蛋白表达水平比脂质体对照组明显减少。结论 Survivin基因特异性RNA干扰可以明显抑制肺癌SPCA1和SH77细胞的体外增殖并诱导明显的细胞凋亡。

【关键词】 小干扰RNA；Survivin蛋白；凋亡；肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2

Inhibitory Effects of the Survivin siRNA Transfection on Human Lung Adenocarcinoma Cells SPCA1 and SH77

Quanxi LIU¹, Chaoying DONG², Lijun LI³, Jie SUN⁴, Chunyun LI⁵, Liang LI⁵

¹Department of Thoracic Surgery, the First Hospital of Handan City, Handan 056002, China; ²No.2 Department of Brain Surgery, the First Hospital of Handan City, Handan 056002, China; ³College of Information and Technology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China; ⁴Company of Science and Technology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ⁵College of Life science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Corresponding author: Quanxi LIU, E-mail: hbhdluquanxi@163.com

【Abstract】 Background and objective Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) protein family, has been demonstrated as a potential new target for apoptosis-based therapy in cancer and lymphoma. The aim of this study is to investigate effects and mechanisms of survivin siRNA transfection on lung adenocarcinoma cell lines SPCA1 and SH77. **Methods** A siRNA plasmid expression vector and pSi scrambled against survivin were constructed and transfected into SPCA1 and SH77 cells with Lipofectamine 2000. The proliferations of lung adenocarcinoma SPCA1 and SH77 cells were detected by MTT. The apoptotic rate and cell cycle were detected by flow cytometer. The activity of survivin mRNA and protein expression were analyzed with RT-PCR and Western blot. **Results** Survivin siRNA reduced the proliferation of SPCA1 and SH77 cells. Cell cycle was inhibited in G₀/G₁. Expressions of survivin siRNA mRNA and protein were reduced in transfected cells compared with the control cells. **Conclusion** siRNA targeted against survivin can effectively suppress SPCA1 and SH77 cells proliferation and significantly induce SPCA1 and SH77 cells apoptosis.

【Key words】 Small interfering RNA; Survivin protein; Apoptosis; Lung neoplasms

肺癌为常见的恶性肿瘤之一，数十年来肺癌的发病率和死亡率有明显的增高趋势^[1]。Survivin是凋亡抑制

蛋白（inhibitor of apoptosis family of protein, IAP）家族新成员^[2]，可选择性地表达于恶性肿瘤组织中，而在除胸腺和生殖腺外的正常成人组织中不表达，这种特点使其成为目前恶性肿瘤诊断和治疗的新靶点。近年来，随着肿瘤分子生物学的发展以及对基因功能的深入研究，人们逐渐认识到基因治疗后对肿瘤细胞命运起主要决定作用的是基因型，而非制剂的基因毒性，肿瘤细胞相关基因的表达水平是造成患者对同一化疗药物敏感性不同的

作者单位：056002 邯郸，邯郸市第一医院胸外科（刘全喜）；056002 邯郸，邯郸市第一医院脑外科（董超颖）；050016 石家庄，河北师范大学信息技术学院（李丽君）；050017 石家庄，河北医科大学科技总公司（孙捷）；050016 石家庄，河北师范大学生命科学学院（李春云，李亮）（通讯作者：刘全喜，E-mail: hbhdluquanxi@163.com）

主要原因^[3]。迄今为止,尚无科学研究比较分析不同肺癌细胞株小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制 survivin 表达的效果。因此,本实验将 survivin siRNA 转染两种肺癌细胞 SPCA1 和 SH77, 检测其对肺癌细胞增殖抑制作用的不同。

1 材料与方法

1.1 实验材料 根据真核表达载体 pSi-survivin 和 pSi-scrambled 的构建^[4]设计 survivin siRNA 和 scrambled 对照 cDNA 序列, 以 pGCsi U6/Neo/GFP 为载体, 构建表达载体测序鉴定。Survivin siRNA 靶基因的 cDNA 序列 (编码基因 368-386) 为 5'-GCAGTTGAAGAATTAAC-3'。

人肺腺癌细胞 SPCA1 和 SH77 来源于美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养基, 其内加入 2 mmol/L 的谷氨酰胺 + 0.05 mmol/L 2-巯基乙醇 (2ME) + 10% 胎牛血清 (胎牛血清)。保持细胞浓度为 2×10^4 个/mL - 9×10^4 个/mL, 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养。用甘油作为其冷冻保护剂。2.5 g/L 胰酶消化传代。实验时取对数生长期细胞。首先将细胞在 10% FCS 中培养 2 d。然后每 2 天通过离心、洗涤 6 次且以传代的方式收集细胞。

利用 Qiagen 去内毒素质粒提取试剂盒, 大量提取去内毒素的重组质粒 pSi-scrambled 和 pSi-survivin。接种 SPCA1 和 SH77 细胞于 100 mL 培养瓶中, 细胞数约 1×10^6 个, 用 10% 新生牛血清但不含抗生素的 RPMI-1640 培养液, 在 37 °C 培养至细胞占瓶底约 80% - 90% 时, 按 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 使用说明书进行转染, 质粒和转染试剂的比例为 2:1。转染分组情况如下: ① 脂质体对照组; ② pSi-scrambled 对照组; ③ pSi-survivin SPCA1 细胞实验组; ④ pSi-survivin SH77 细胞实验组。

1.2 MTT 法^[5]检测细胞增殖抑制 将 SPCA1 和 SH77 细胞种在 96 孔板中, 100 mL 培养基中 1×10^4 个细胞。将细胞分为 3 组, 分别转染空脂质体、pSi-scrambled 和 pSi-survivin 质粒。细胞在 37 °C 环境下培养 48 h。每个孔加入 50 mL 的 MTT 溶液。培养 4 h 后, 样品溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 并用酶标仪检测样品吸光度, 测定波长 492 nm, 参考波长 690 nm。光密度 (optical density, OD) 值表示试验组和对照组的光密度。重复实验 3 次。采用线性分析确定 IC₅₀ 值。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期 SPCA1 和 SH77 细胞培养为 5×10^5 个细胞/mL 的细胞浓度, 3 个重

复。孵育 48 h 后, 转染空脂质体、pSi-scrambled 和 pSi-survivin 质粒处理的细胞进行平行对照。细胞用 70% 乙醇收集并悬浮 (4 °C、1 h)。用胰蛋白酶进行收集并用 PBS 液冲洗 3 次。将悬浮颗粒置于 250 mL PBS 和 100 mL Annexin V/PI 溶液中。在避光室温情况下碘化染色 30 min, 细胞悬浮液通过流式细胞仪 (BD 公司, 美国) 进行检测。测定细胞周期, 观察 G₀/G₁ 期、G₂/M 期、S 期各期细胞所占的百分比, 观察是否存在凋亡峰。通过 WinMDI 2.5 版本软件 (TSRI 流式细胞术) 来分析。

1.4 半定量 RT-PCR 检测 survivin mRNA 水平 转染 72 h 后, 利用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取细胞总 RNA, RT-PCR 扩增目的基因 survivin 和内参基因 β -actin。反应体系中加入两对引物, 第一对是 survivin 基因的引物, 即 5'-GAATTCATGGGTGCCCGACGTTGCC-3' 和 5'-AGATCTTCTTCTTATTGTTGGTTTCC-3', 扩增片段长度为 475 bp。第二对是 β -actin 基因的引物, 即 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' 和 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTCC-3', 扩增片段长度 630 bp。PCR 反应条件: 94 °C、30 s, 59 °C、30 s, 72 °C、60 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下拍照。

1.5 Western blot 检测 survivin 蛋白含量 转染 72 h 后, 通过缓冲液裂解制备 SPCA1 和 SH77 全细胞裂解液, 缓冲液中含有 1% Nonidet P-40、乙磺酸 50 mmol/L (pH 7.5)、氯化钠 100 mmol/L、EDTA 2 mmol/L、焦磷酸缓冲液 1 mmol/L、原钒酸钠 10 mmol/L、苯甲基磺酰氟 1 mmol/L 以及氟化钠 100 mmol/L。相同浓度的裂解液与十二烷基硫酸钠反应 - 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并用转移缓冲液 (Tris 25 mmol/L, 甘氨酸 192 mmol/L, 甲醇 10% [v/v]) 将其转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 Tris 缓冲液 (TBS: Tris 10 mmol/L [pH 7.4], 氯化钠 150 mmol/L) 冲洗, 并用 TBS-5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 在室温下过夜, 含有抗体的 TBS-5% BSA 孵育。ECL 化学发光试剂盒 (Kirkegaard & Perry Laboratories) 显色进行检测 survivin 的表达。

1.6 统计分析 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。3 次独立实验的数据采用 Mean \pm SD 表示, 实验组与对照组的组间差异比较采用 *t* 检验分析, *P* < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 siRNA 转染后抑制 SPCA1 和 SH77 细胞增殖 利用 MTT

表 1 Survivin siRNA诱导细胞凋亡和SPCA1和SH77细胞周期阻滞

Tab 1 The cell cycle distribution of SPCA1 and SH77 cells apoptosis and cell cycle inhibition by the survivin siRNA

Group	Ratio of apoptosis (%)	Cell cycle distribution (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Liposomes	2.2±0.1	54.3±1.2	32.9±0.5	10.7±1.4
pSi-scramble	3.7±0.8	58.2±2.1	26.8±3.9	14.8±0.6
pSi-survivin SPCA1	38.8±3.6	73.6±3.7*	20.1±0.4*	6.3±1.5*
pSi-survivin SH77	33.1±2.0	74.1±2.7*	19.7±1.8*	6.1±1.3*

*P<0.05, vs control group.

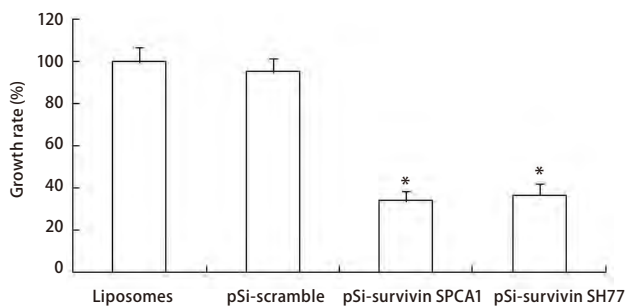


图 1 Survivin siRNA转染后抑制SPCA1和SH77细胞增殖。*: 与对照组相比, P<0.05。

Fig 1 The inhibition of SPCA1 and SH77 cells proliferation by survivin siRNA. *P<0.05, vs control group.

法检测各组转染细胞的存活状态, 以脂质体组的生存率作为100%, 则pSi-scrambled对照组、pSi-survivin SPCA1实验组和pSi-survivin SH77实验组的生存率分别为95.2%、33.8%和36.4%, pSi-survivin SPCA1实验组和pSi-survivin SH77实验组出现了较大程度地生长抑制现象, 与对照组相比较, 均具有统计学差异。但是实验组间差异不明显(图1)。

2.2 siRNA转染后诱导细胞凋亡并引起G₀/G₁细胞周期阻滞 pSi-survivin SPCA1实验组和pSi-survivin SH77实验组与脂质体对照组相比, 出现了明显的细胞凋亡。与阴性对照组相比, pSi-survivin SPCA1实验组和pSi-survivin SH77实验组细胞的G₀/G₁期比例明显增加, S期细胞减少, G₂期细胞明显减少, 细胞阻滞在G₀/G₁期(表1)。

2.3 siRNA抑制转染细胞survivin mRNA水平 转染后72 h提取细胞总RNA, 利用半定量RT-PCR方法检测survivin基因转录水平(图2A)。运用GIS凝胶分析软件光密度扫描分析, 以脂质体对照组survivin产物与内参β-actin产物的电泳亮度比值定为1, 则其它各组的比值分别为: pSi-scrambled对照组为0.57, pSi-survivin SPCA1实验组和pSi-survivin SH77实验组分别为0.76和0.33(图2B)。经

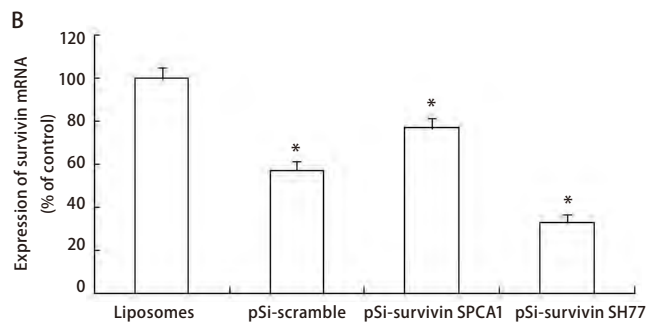
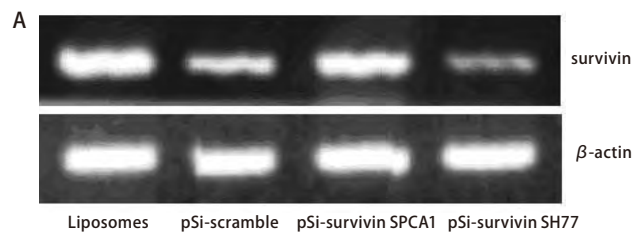


图 2 Survivin siRNA抑制SPCA1和SH77细胞survivin mRNA表达。A: RT-PCR检测结果; B: 柱状分析图表明survivin siRNA有效地抑制了两种细胞中survivin的基因表达。*: 与脂质对照组相比, P<0.05。

Fig 2 Expression of survivin mRNA in SPCA1 and SH77 cell inhibited by survivin siRNA. A: Result of RT-PCR test. B: The analysis of survivin mRNA in SPCA1 and SH77. It shows that survivin siRNA inhibited survivin mRNA expression effectively. *P<0.05, vs Liposomes control group.

统计分析脂质对照组相比, 其它三组均明显降低。结果表明重组质粒pSi-survivin在mRNA水平上抑制了survivin基因转录。

2.4 siRNA抑制细胞中survivin蛋白表达 与两对照组相比, pSi-survivin SPCA1实验组和pSi-survivin SH77实验组的survivin蛋白表达受到了明显抑制(图3)。结果证实survivin siRNA可在蛋白水平抑制survivin表达。

3 讨论

中国是一个高发性肺癌的危险区。对原发性肺癌

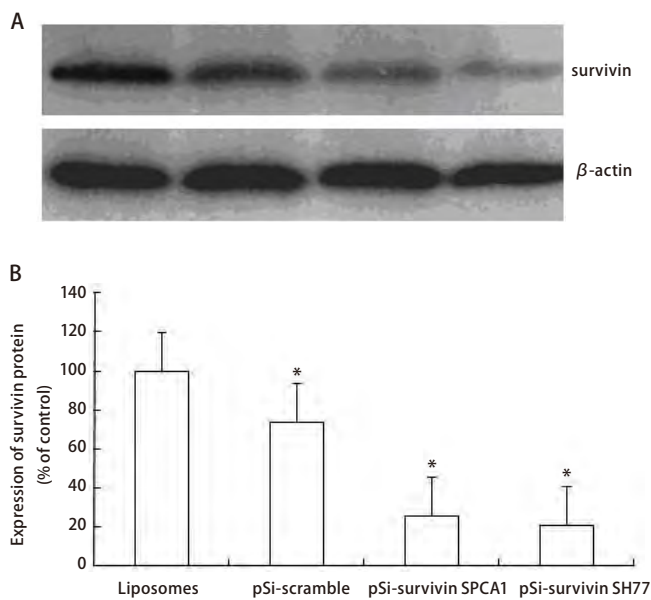


图3 Survivin siRNA抑制SPCA1和SH77细胞survivin蛋白表达。A: Western blot检测结果; B: 柱状分析图表明survivin siRNA有效地抑制了两种细胞中survivin的蛋白表达。*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Fig 3 Expression of survivin protein in SPCA1 and SH77 cell inhibited by survivin siRNA A. Result of Western blot test; B: The analysis of survivin protein expression in SPCA1 and SH77. It shows that survivin siRNA inhibited survivin protein expression effectively. * $P < 0.05$, vs control group.

治疗仍然困难, 并且依赖于基础医学研究。最近的研究^[6-8]结果表明, 细胞凋亡与肿瘤的发生、进展和转移密切相关。Survivin作为一种新发现的IAP, 具有抗凋亡和调节细胞周期的双重功能, 在人类众多恶性肿瘤中广泛表达, 而在正常组织中不表达或低表达。目前, survivin已经成为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)最显著的独立预后影响因子之一^[9-12]。Survivin的选择性分布特点使其成为肿瘤基因治疗的理想靶点, 针对survivin的基因治疗具有良好的靶向性、特异性和安全性, 可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖, 但对正常组织几乎没有不良影响。

令人感兴趣的是, 不同患者对相同化疗方案的治疗效果和反应有差别, 特别是不同病理类型的肺癌患者对化疗药物的敏感性差异较大^[13-16]。为避免治疗的盲目性, 有必要探索不同细胞对化疗敏感或耐药的更深层的原因, 以期为肿瘤的个体化疗提供依据。近年来, 随着肿瘤分子生物学研究的发展, 人们逐步认识到基因表达水平不但决定肿瘤发生、发展和预后, 而且与化疗敏感性存在某种相关性。所以, 本研究选择了2种类型的人

肺癌细胞株作为对象, 用survivin siRNA分别转染, 检测其对肺癌细胞的细胞周期、mRNA和蛋白表达水平的不同, 探讨同一种构建的survivin基因siRNA质粒对不同的细胞株是否有不同的作用效果。

本研究中我们构建了靶向survivin基因的siRNA表达质粒并转染肺癌细胞SPCA1和SH77, 通过半定量RT-PCR及Western blot检测结果表明, 所构建的靶向survivin的siRNA表达载体具有高度的特异性, 可有效地抑制SPCA1和SH77细胞中survivin mRNA及蛋白的表达; 抑制SPCA1和SH77细胞survivin基因的表达可以显著抑制细胞的增殖并诱导明显的细胞凋亡。本研究与于振香等^[17]的研究发现一致, 即survivin的siRNA表达载体可抑制肺癌细胞A549的增殖, 细胞受阻于 G_0/G_1 期, 可抑制survivin mRNA及蛋白表达, 并可诱导细胞凋亡。

可见, survivin siRNA可抑制多种细胞株的增殖, 并可诱导细胞凋亡。有望进一步扩充细胞株, 深入探讨其功能。

参考文献

- 1 Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never-smokers: A different disease. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(10): 778-790.
- 2 Ambrosini G, Adida C, Altier DC, et al. A novel anti-apoptosis gene, *survivin* expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- 3 Matsushashi N, Saio M, Matsuo A, et al. p53 dependence and apoptosis in response to FP treatment with p53 transfected colon cancer cell lines by use of thin layer collagen gel. *Oncol Rep*, 2004, 12(2): 357-361.
- 4 Liu XC, Yu Zhen, Gao RJ, et al. The inhibitive effect of survivin-siRNA on lung cancer cell A549 proliferation. *Chin J Gerontol*, 2007, 27(7): 641-643. [刘喜春, 于振香, 高瑞娟, 等. Survivin-siRNA对裸鼠前列腺癌生长影响的研究. *中国老年学杂志*, 2007, 27(7): 641-643.]
- 5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
- 6 Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*, 2005, 23(11): 2556-2568.
- 7 Duann P, Ho TY, Desai BD. Mesangial cell apoptosis induced by stimulation of the adenosine A3 receptor: signaling and apoptotic events. *J Investig Med*, 2005, 53(1): 37-43.
- 8 Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S, et al. Adenosine and deoxyadenosine induces apoptosis in oestrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells via the intrinsic pathway. *Cell Prolif*, 2005, 38(5): 269-285.
- 9 Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 121-126.
- 10 Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 1978, 86(1): 271-278.

11 Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76 (7): 3116-3120.

12 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, *et al.* Expression of survivin and relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 127-134.

13 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, *et al.* Expression of the anti-apoptosis gene, *survivin*, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut*, 2000, 46(5): 645-650.

14 Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, *et al.* *Survivin* gene expression in early stage non-small cell lung cancer. *J Pathol*, 2003, 200(5): 620-626.

15 Singhal S, Vachani A, Antin Ozerkis D, *et al.* Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11): 3974-3986.

16 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, *et al.* Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene*, 2000, 19(29): 3225-3234.

17 Yu ZX, Hua SC, Yu S. The inhibitive effect of survivin-siRNA on lung cancer cell A549 proliferation. *Chin J Gerontol*, 2008, 28(11): 1057-1059. [于振香, 华树成, 于水. survivin-siRNA对肺癌细胞A549增殖抑制的影响. *中国老年病学杂志*, 2008, 28(11): 1057-1059.]

(收稿: 2010-09-13 修回: 2010-09-25)
(本文编辑 南娟)

• 消息 •

《中国肺癌杂志》已与Faculty of 1000合作

2010年9月,《中国肺癌杂志》与英国著名文献评价数据库Faculty of 1000签署合作协议。《中国肺癌杂志》将定期刊登F1000的专家对SCI及Pubmed等数据库收录的优秀肺癌文章的点评与分析, 欢迎关注。

Faculty of 1000简介:

Faculty of 1000是由BioMed Central出版的新型在线研究辅助工具, 由总共超过4,000位专家学者评议, 提供目前世界上最重要的生物和医学论文信息及研究趋势。

其主要特点是:

①主要对Pubmed收录的重要论文的进行客观评估, 评估依据是以学术成就而非该期刊是否被SCI收录。

②参加评估的评委会成员分别由美国和欧洲等国际知名机构的著名专家组成。根据论文对当前世界生物和医学研究的贡献程度和科学价值, 通过客观反映学术水平的指标 (F1000因子) 给予评分, 每日将最近一个月内的极少数优秀论文推荐给读者, 并提供Pubmed链接。

F1000三个等级分别为9分 (杰出)、6分 (必读) 和3分 (推荐)。研究人员发表的论文被Faculty of 1000收录并获得推荐是对该论文和研究人员的很高的认可。

Faculty of 1000数据库网址: <http://www.f1000biology.com/>和<http://www.f1000medicine.com/>

Faculty of 1000肺癌点评专家名单:

Heads

James R Jett (Thoracic Diseases, Mayo Clinic, USA)

Stephen Spiro (Department of Thoracic Medicine, University College London, UK)

Members

Sam Janes (Center for Respiratory Research, University College London, UK)

Robert Keith (Department of Medicine, University of Colorado Health Sciences Center, USA)

Pyng Lee (Division of Respiratory and Critical Care, National University Hospital, Singapore)

Michael Loebinger (The Rayne Institute, UCL, UK)

Patrick Nana-Sinkam (Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, The Ohio State University Medical Center, USA)

Neal Navani (The Rayne Institute, UCL, UK)

Raymond Osarogiagbon (Internal Medicine, University of Tennessee, USA)

Shiva Rahmanian (Pulmonary/Critical Care, Ohio State University Medical Center, USA)

Robert Ramirez (University of Tennessee Cancer Institute, USA)

Amen Sergew (University of Colorado, USA)

Thomas Stinchcombe (University of North Carolina, USA)

Anil Vachani (University of Pennsylvania School of Medicine, USA)

Nico van Zandwijk (C64-ANZAC Research Institute, The University of Sydney, Australia)